Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Efecto del glifosato sobre el crecimiento y la reproducción de crustáceos superiores

Avigliano, Luciana

2018-04-27

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:
Avigliano, Luciana. (2018-04-27). Efecto del glifosato sobre el crecimiento y la reproducción de crustáceos superiores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Avigliano, Luciana. "Efecto del glifosato sobre el crecimiento y la reproducción de crustáceos superiores". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018-04-27.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Efecto de glifosato sobre el crecimiento y la reproducción de crustáceos superiores

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área de las Ciencias Biológicas

Lic. Luciana Avigliano

Director de tesis: Dr. Enrique Marcelo Rodríguez

Consejero de Estudios: Dr. Enrique Marcelo Rodríguez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología de Crustáceos, Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA) CONICET-UBA. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental (DBBE) FCEN-UBA.

Buenos Aires, 2018

Efecto de glifosato sobre el crecimiento y la reproducción de crustáceos superiores

Resumen

El glifosato es el herbicida más utilizado actualmente en Argentina, y sus efectos deletéreos a largo plazo sobre los organismos acuáticos que se encuentran potencialmente expuestos, recién comienzan a conocerse. Los objetivos del presente trabajo fueron determinar los efectos subletales de glifosato (ácido y/o una formulación comercial): -sobre la tasa de crecimiento, los niveles de las principales reservas energéticas y la actividad de algunas enzimas del metabolismo intermedio en juveniles de *C. quadricarinatus*; -sobre el potencial reproductivo de hembras adultas de *N. granulata*; -sobre la incubación del desove y la eclosión larval en tres especies de crustáceos con diferente tipo de desarrollo (directo o indirecto). En juveniles tempranos de *Cherax quadricarinatus* expuestos a glifosato ácido, la ganancia en peso, los niveles de varias reservas energéticas y la actividad enzimática indicaron, en conjunto, un cuadro de estrés crónico asociado a una depresión metabólica, así como a un posible daño tisular. Al evaluar, tanto *in vivo* como *in vitro*, los efectos del herbicida sobre el crecimiento ovárico de *Neohelice granulata* se observó, a concentraciones relativamente bajas de glifosato ácido y tiempos de exposición relativamente prolongados (período pre-reproductivo de tres meses), un aumento de las reabsorciones oocitarias, mientras que a concentraciones mayores y tiempos más cortos (remaduración gonadal) se observó una estimulación del crecimiento ovárico, sugiriendo que el glifosato podría actuar como un desorganizador endocrino. Algunos resultados obtenidos *in vitro* aportaron también evidencias a favor de esta hipótesis. Finalmente, se evaluaron los efectos del glifosato sobre la progenie. Las larvas eclosionadas de hembras ovígeras de *N. granulata* expuestas a glifosato formulado (Roundup Ultramax®), se redujeron en número y presentaron varias anormalidades morfológicas. Los juveniles del camarón *Neocaridina heteropoda heteropoda* metabolizaron menos vitelo durante el desarrollo embrionario, por efecto de glifosato ácido, mientras que los estadios embrionarios tardíos de *C. quadricarinatus* se vieron afectados en su sobrevida y crecimiento, aunque a concentraciones relativamente elevadas del formulado.

Palabras claves: glifosato, Roundup, crustáceos, crecimiento ovárico, crecimiento somático, desarrollo embrionario, herbicidas.

Effect of glyphosate on growth and reproduction of higher crustaceans

Abstract

Glyphosate is the herbicide currently most used in Argentina, whose long-term deleterious effects on the aquatic organisms potentially exposed, are just beginning to be studied. The aims of this work were to determine the sublethal effects of glyphosate (acid and/or a commercial formulation): on the growth rate, levels of the main energy reserves and the activity of some enzymes of intermediate metabolism in juveniles of *C. quadricarinatus*; -on the reproductive potential of adult females of *N. granulata*; -on incubation of spawning and larval hatching in three crustacean species with different types of development (direct or indirect). In early juveniles of *Cherax quadricarinatus* exposed to acid glyphosate, several variables such as weight gain, levels of energetic reserves and enzymatic activity indicated a chronic stress syndrome, associated to both a metabolic depression and tissue damage. After evaluating, both *in vivo* and *in vitro*, the effects of the herbicide on the ovarian growth of *Neohelice granulata,* an increase of oocyte reabsorption was seen at relatively low concentrations and longer times of exposure to acid glyphosate (three months of pre-reproductive period), while stimulation of the ovarian growth was observed at higher concentrations and lower times of exposure (gonad re-maturation), suggesting that glyphosate could act as an endocrine disrupter. Some results obtained *in vitro* also provided evidence supporting this hypothesis. Finally, the effects of glyphosate on the progeny were also evaluated. Larvae hatched from *N. granulata* ovigerous females exposed to formulated glyphosate (Roundup Ultramax®) decreased in number, also presenting several morphological abnormalities. Juveniles of the shrimp *Neocaridina heteropoda heteropoda* metabolized less amount of vitellum during the embryonic development, by effect of acid glyphosate, while late embryonic instars of *C. quadricarinatus* were affected in their survival and growth, although at relatively high concentrations of the commercial formulation.

Key words: glyphosate, Roundup, crustaceans, ovarian growth, somatic growth, embryonic development, herbicides.

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires por brindarme el lugar para desarrollar mi trabajo de doctorado y por la formación recibida.

A la AGENCIA y CONICET por las becas otorgadas. A Haydée por su confianza.

A Enrique por guiarme en este camino, por estar siempre dispuesto y por su paciencia.

A Dani por estar "para resolver" siempre, por acompañarme y compartir infinitos mates.

A Naty, Cami, Juli, Ivi y Gaby, por la ayuda en este trabajo, y fundamentalmente por hacer lo cotidiano más llevadero y divertido.

A Laura por su predisposición y buena onda siempre.

A Caro, Lía, Anita y Vero por compartir lo cotidiano.

A mis amigas biólogas por las horas de terapia compartidas.

A Ceci por compartir estos años y hacerme reir.

A Fede por acompañarme, por apoyarme siempre y por hacer esta tesis más "bella".

A mamá y papá, Flor y Pauli, Mau, Pau y Vicen, por formar parte de mi vida.

A la vida…

Dedicatoria

A Joa, Manu y Fede.

A papá.

Índice **Página**

INTRODUCCIÓN 1

Agricultura en Argentina, introducción de organismos genéticamente modificados y expansión de la frontera agrícola 2

Glifosato: uso y presencia en el ambiente 7

Biología de Crustáceos

Anatomía general 11

Muda y crecimiento 14

Biología reproductiva 17

Desarrollo embrionario e incubación de huevos 23

Especies en estudio – Consideraciones particulares de las especies utilizadas como modelos experimentales

Cherax quadricarinatus 25

Neohelice granulata 31

Neocaridina heteropoda heteropoda 39

Toxicidad del glifosato para organismos y comunidades silvestres 45

CAPÍTULO 1: Efectos del glifosato sobre el crecimiento somático 49

Hipótesis, Objetivo y Objetivos específicos 50

MATERIALES Y MÉTODOS 51

Tratamientos 51

Animales 52

Variables analizadas 52

Análisis de datos 58

RESULTADOS 59

DISCUSIÓN 66

CAPÍTULO 2: Efectos del glifosato sobre la maduración y remaduración ovárica en el cangrejo de estuario *Neohelice granulata* 73

Hipótesis, Objetivo y Objetivos específicos 74

MATERIALES Y MÉTODOS 76

Metodología general (común a ambos ensayos) 76

Muestreo y aclimatación de animales 76

Protocolo general de experimentación 78

Tratamientos 79
Variables analizadas en ambos ensayos 81
Análisis de datos 83
Metodología particular utilizada para cada ensayo
-Ensayo 1: maduración ovárica (período pre-reproductivo) 83
Ensayo *in vivo* 83
Ensayo *in vitro* 86
-Ensayo 2: remaduración ovárica (período reproductivo) 88
RESULTADOS
Ensayo 1: maduración ovárica (período pre-reproductivo) 89
Ensayo 2: remaduración ovárica (período reproductivo) 97
DISCUSIÓN 102
CAPÍTULO 3: Efectos del glifosato sobre la progenie 111
Hipótesis, Objetivo y Objetivos específicos 112
MATERIALES Y MÉTODOS 113
Metodología general (común a los tres ensayos) 113
Metodología particular utilizada para cada ensayo 114
-Ensayo 1: **Exposición de hembras ovígeras de *N. granulata*** 114
a) Animales 114
b) Tratamientos - Serie de concentraciones ensayadas 115
c) Variables analizadas 116
-Ensayo 2: **Exposición de hembras ovígeras de *N. heteropoda heteropoda*** 117
a) Animales 117
b) Tratamientos - Serie de concentraciones ensayadas 117
c) Variables analizadas 118
-Ensayo 3: **Cultivo *in vitro* de huevos aislados de *C. quadricarinatus*** 118
a) Animales 118
b) Tratamientos – Series de concentraciones ensayadas 119
c) Variables analizadas 120
RESULTADOS 120
Ensayo 1: **Exposición de hembras ovígeras de *N. granulata*** 120
Ensayo 2: **Exposición de hembras ovígeras de *N. heteropoda heteropoda*** 123

Ensayo 3: **Cultivo *in vitro* de huevos aislados de *C. quadricarinatus*** 125
DISCUSIÓN 128
CONCLUSIONES FINALES 135
BIBLIOGRAFIA 139
ANEXOS 163
ADDENDA 168

Abreviaturas

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico)

ADP: adenosina difosfato

ALAT: alanina aminotransferasa

AMPA: ácido aminometilfosfónico

ASAT: aspartato aminotransferasa

CC: control concurrente

CHH: hormona hiperglucemiante de crustáceos

CI: control inicial

DNPH: dinitrofenil hidracina

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

EPSPS: 5-enolpiruvatoshikimato-3-fosfato sintetasa

GIH: hormona inhibidora de las gonadas

GM: genéticamente modificados

GSH: hormona estimulante de las gonadas

IGS: índice gonadosomático

IHS: índce hepatosomático

IPA: sal isopropilamina

LDH: lactato deshidrogenasa

MF: metil farnesoato

MIH: hormona inhibidora de la muda

MOIH: hormona inhibidora del órgano mandibular

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PBS: buffer fosfato salino

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PYK: piruvato kinasa

Vg: vitelogeninas

Vn: vitelinas

Los resultados de la presente tesis fueron parcialmente publicados en:

-Effects of glyphosate on growth rate, metabolic rate and energy reserves of early juvenile crayfish, *Cherax quadricarinatus* M. Avigliano, L., Fassiano, A.V., Medesani, D.A., Rios de Molina, M.C. y Rodríguez, E.M. 2014. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 92 (6): 631-635.

-Effects of glyphosate on egg incubation, larvae hatching, and ovarian rematuration in the estuarine crab *Neohelice granulata*. Avigliano, L., Álvarez, N., Mac Loughlin, C. y Rodríguez, E.M. 2014. Environmental Toxicology and Chemistry, 33 (8): 1879-1884.

-Effects of glyphosate on somatic and ovarian growth in the estuarine crab *Neohelice granulata*, during the pre-reproductive period. Avigliano, L., Canosa, I.S., Medesani, D.A. y Rodríguez, E.M. 2018. Water, Air & Soil Pollution, 229 (2): 44.

INTRODUCCIÓN

Agricultura en Argentina, introducción de organismos genéticamente modificados y expansión de la frontera agrícola

Indudablemente algo cambió en la producción agrícola argentina a partir de los años ´90. El modelo productivo se modificó y, con ello, las palabras "biotecnología", "paquete tecnológico" e "ingeniería genética", entre otras, comenzaron a hacerse familiares, y a asociarse con otros términos tales como "siembra directa", "rentabilidad", "productividad", o con frases como "alimentar al mundo". Bajo el argumento que las malezas compiten con los cultivos por los nutrientes y la luz, disminuyendo su rendimiento y calidad, los agricultores desde hace varias décadas vienen empleando herbicidas que, en general, sólo sirven para determinado tipo de malezas y sus residuos persisten en el suelo por mucho tiempo. De esta manera, la biotecnología aplicada a los cultivos ha crecido en las últimas décadas también a un ritmo exponencial. Así, se desarrollaron organismos genéticamente modificados (GM) por inserción de un gen bacteriano en el genoma de las plantas. A mayor escala, con estas semillas GM se desarrollaron cultivos transgénicos tolerantes a herbicidas de amplio espectro, como el glifosato, que además de eliminar las malezas, se degradarían en el suelo más rápidamente que los herbicidas tradicionales y facilitarían la implementación de prácticas conservacionistas de manejo, tal como la Siembra Directa (ArgenBio, 2017).

El primer cultivo transgénico en Argentina fue la soja tolerante a glifosato. Se aprobó en 1996 y desde ese momento el área sembrada con cultivos GM ha crecido en forma sostenida (Figura 1). Después de Estados Unidos y Brasil, Argentina es el tercer productor mundial de cultivos GM, con 24,9 millones de hectáreas en 2016 (ArgenBio, 2017), lo cual

representa el 13% del total de la superficie sembrada con transgénicos a nivel mundial. En la campaña 2016/17, prácticamente el 100% de la superficie de soja y de algodón fue sembrada con variedades GM, mientras que el maíz transgénico representó el 96% del total de ese cultivo (Figura 2). En el caso de la soja, se cultivan variedades tolerantes a glifosato y variedades que combinan la tolerancia a glifosato con la resistencia a insecticidas. En algodón, el 90% del algodón transgénico sembrado correspondió a variedades con ese tipo combinado de tolerancia, mientras que para el caso del maíz transgénico, más del 75% del total de hectáreas fue sembrada con híbridos que presentaban las mismas características. Estos datos nos dan una idea del volumen de glifosato que se está utilizando actualmente en Argentina. La producción de soja en Argentina evidenció una gran expansión del área sembrada en la última década (Figura 3). Los motivos de la gran expansión sojera se vinculan a la buena adaptación a los suelos, la incorporación de tecnología y los buenos precios del mercado internacional, entre otros (Altieri y Pengue, 2006). En el mismo período, la producción se elevó en un 90% por un aumento de los rindes promedios, aunque como se observa en la Figura 3, existieron campañas con una merma importante de la producción, como ocurrió en los ciclos 2008/09 y en menor medida en los años 2012/13, debido a la sequía registrada en esos períodos.

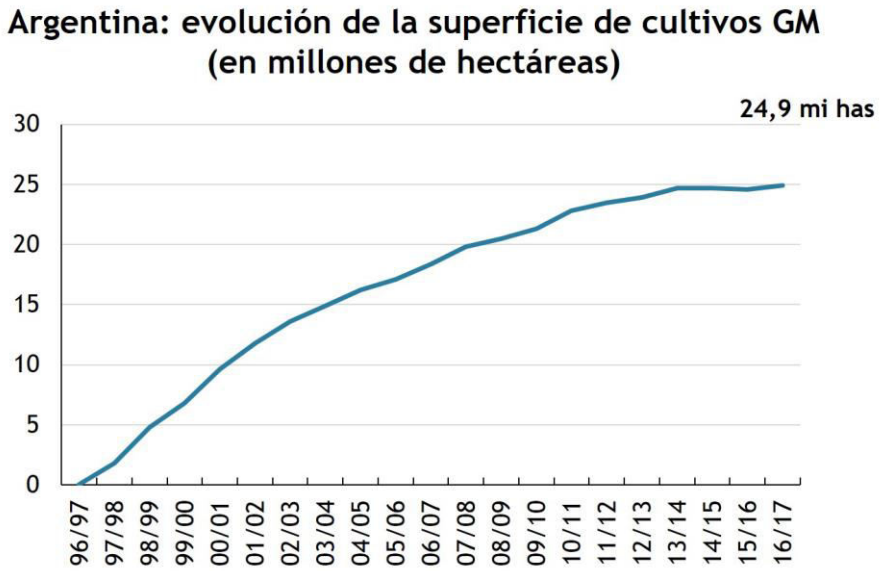


Figura 1. Evolución de la superficie sembrada con semillas GM desde su introducción en el mercado argentino hasta la actualidad (Trigo, 2016).

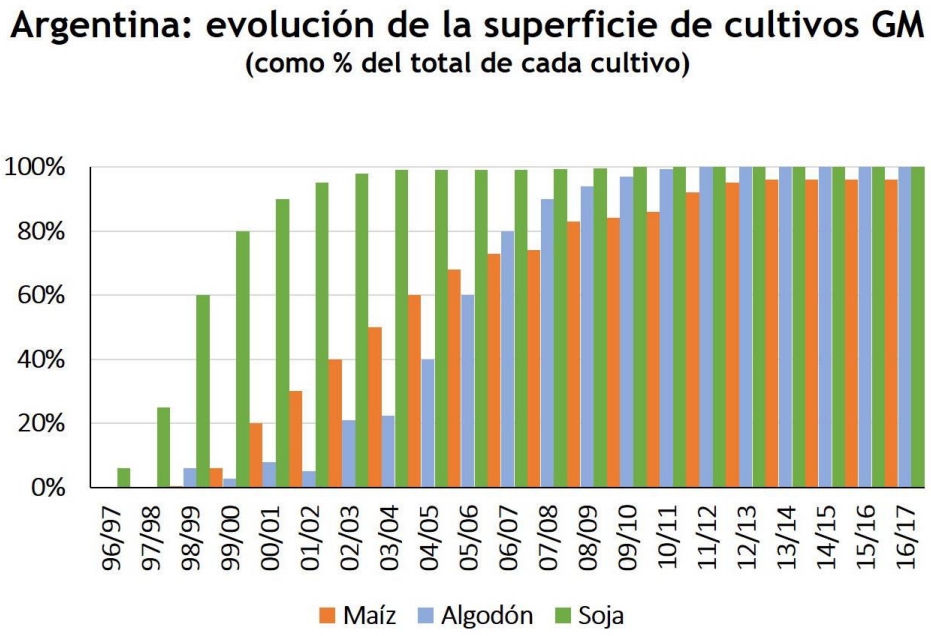


Figura 2. Evolución de la superficie sembrada con semillas GM de maíz, algodón y soja desde su introducción en el mercado argentino hasta la actualidad (Trigo, 2016).

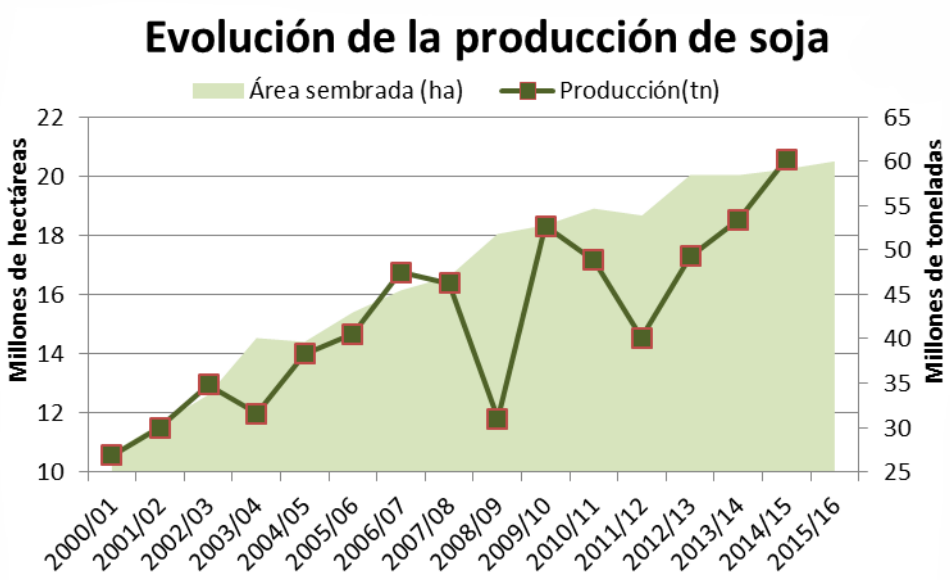


Figura 3. Evolución de la producción de soja en los últimos 16 años. Tomado de FyO (2017).

Nuestro país es el tercer productor a nivel mundial del poroto de soja, con una participación del 19% en la oferta mundial (FyO, 2017). La Figura 4 muestra la distribución de la producción, en millones de toneladas. A nivel regional, si consideramos a la cuenca del Paraná incluyendo territorios de Brasil, Paraguay, Argentina y Bolivia, nos encontramos desde hace casi una década ante el conglomerado de mayor producción de soja a nivel mundial. Aunque Estados Unidos lidere la producción de granos de soja con un 34%, y produzca (al igual que China) el 22% de los productos derivados, tales como el aceite o harina de soja, los países de la cuenca del Paraná representan el 50% de la producción mundial de granos de soja, y el 35% de la producción de productos derivados (De Boeck, 2017).

En el caso de la Argentina, la soja y el modelo agrosojero ha cobrado un protagonismo casi excluyente. Es entendible que con una producción de más de 50 millones de

toneladas anuales, lo que representa casi el 50% de toda la producción granífera del país, y habiendo incrementado la superficie sembrada con este cultivo de 5 a 18 millones de hectáreas en los últimos 20 años, la soja haya prácticamente monopolizado la discusión sobre el estado actual de la producción agrícola (Melón *et al.,* 2014).

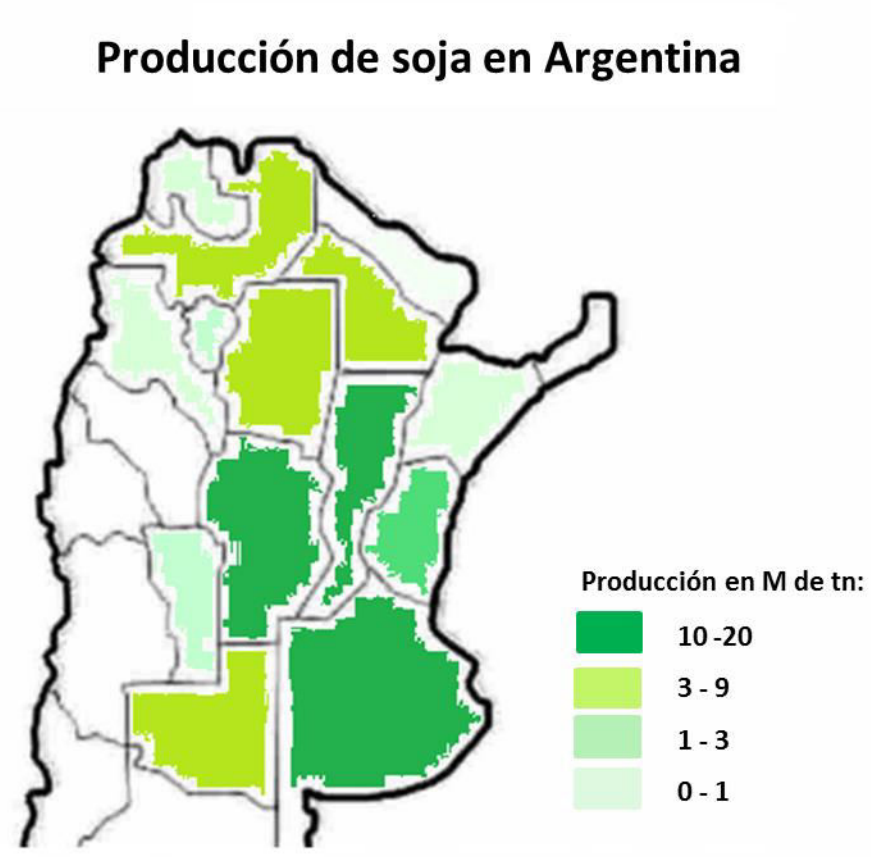


Figura 4. Área sembrada por provincia en la campaña 2014/2015. Tomado de FyO (2017).

La aplicación generalizada de plaguicidas enfatiza la importancia de comprender los impactos de estos químicos en las comunidades naturales (Mikó *et al.,* 2017). El glifosato, desde su introducción en el mercado mundial en la década del ´70, ha sido considerado uno de los plaguicidas con mayor tasa de incremento en su producción y uso (Giesy *et al.,* 2000). Además de su uso en la agricultura extensiva, se utiliza también en jardines domiciliarios para la erradicación de malezas en cultivos de diversas variedades de

plantas, genéticamente modificadas para tolerar el tratamiento con este herbicida. Así, los herbicidas de amplio espectro más comúnmente aplicados en el mundo son a base de glifosato (Altieri y Pengue, 2006), y es imprescindible conocer los efectos que estos productos inducen en organismos no blanco, particularmente luego de exposiciones crónicas a concentraciones ambientales. En este sentido, la presente tesis aporta un conjunto de resultados sobre los efectos crónicos del glifosato y su formulación comercial Roundup Ultramax, sobre algunos aspectos fisiológicos relacionados al crecimiento y la reproducción de crustáceos decápodos.

Glifosato: uso y presencia en el ambiente

El glifosato [N-(fosfonometil) glicina] es un herbicida sistémico no selectivo que puede inhibir eficientemente el crecimiento de plantas, tanto terrestres como acuáticas, interfiriendo con la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano); consigue este efecto al inhibir la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS). Aunque el crecimiento se detiene a las pocas horas de la aplicación, las hojas tardan días en volverse amarillas (Steinrücken y Amrhein, 1980). Dicha enzima sólo es sintetizada por plantas y algunos microorganismos, pero no está presente en animales, por lo que este mecanismo de acción no los estaría afectando directamente (Funke *et al.,* 2006; Maeda y Dudareva, 2012).

El glifosato es un compuesto polar y anfotérico que se une fuertemente a los suelos, pero también es muy soluble en agua (más de 10.000 mg/L a 25 °C). El glifosato tiene una vida media en el suelo que varía entre 2 a 215 días, y una vida media en el agua entre 2 a 91 días, dependiendo de la temperatura y la composición microbiana, entre otros factores

(Giesy *et al.,* 2000; Vera *et al.,* 2010; Battaglin *et al.,* 2014). En el medio ambiente, y debido principalmente a procesos microbianos, el glifosato se degrada a su metabolito AMPA (ácido aminometilfosfónico). Este metabolito es también muy soluble en agua y se degrada más lentamente que el glifosato (Battaglin *et al.,* 2014); tiene una vida media en suelo que oscila entre 60 y 240 días y una vida media en agua comparable a la del glifosato (Giesy *et al.,* 2000; Battaglin *et al.,* 2014). Según Battaglin *et al.,* (2014) el glifosato y el AMPA generalmente se detectan juntos, son móviles y se distribuyen ampliamente en el medio ambiente.

En otros países, se han reportado niveles de glifosato tan altos como 3 y 7,6 mg/L (Mann y Bibwell, 1999; Giesy *et al.,* 2000; Solomon y Thompson, 2003). En nuestro país, los niveles de glifosato en zonas de cultivo intensivo de soja varían entre 0,1 y 0,7 mg/L, en agua, y entre 0,5 y 5 mg/Kg, en sedimento (Peruzzo *et al.,* 2008). En una zona con intensa actividad agrícola de la región pampeana se ha encontrado que entre el 27 y 55% de las muestras de agua superficial contenían glifosato y AMPA, siendo las concentraciones máximas en estos cuerpos de agua de 1,8 a 1,9 mg/L (Primost *et al.,* 2017). En este mismo trabajo, los autores infieren que, según las prácticas actuales, las tasas de aplicación son más altas que las tasas de disipación y, por lo tanto, el glifosato y el AMPA deben considerarse contaminantes "pseudopersistentes" (Primost *et al.,* 2017). Asimismo, en un relevamiento llevado a cabo recientemente en un área altamente productiva de la zona de Balcarce, como es la cuenca alta de la quebrada Crespo, que cubre un área de 226 km^2, de la cual el 94,7% se encuentra bajo producción agrícola, más del 90% de las muestras de suelo contenían glifosato y AMPA (con un límite de detección en agua de 0,1 µg/L). Las concentraciones más elevadas se encontraron en el mes de junio,

correspondiente al período de barbecho, y consecuentemente a la aplicación de glifosato como control químico de malezas en sistemas de siembra directa (Okada *et al.,* 2017).

Aunque algunos de estos ejemplos son considerados como los peores casos, es lo que ocurre cuando se fumiga un campo y llueve durante los días posteriores a la fumigación. En esta situación, el glifosato que no ha llegado a retenerse en los sedimentos de los campos de cultivo donde se aplicó, alcanza por escorrentía los cuerpos de agua donde viven y se reproducen, entre otros componentes de la biota acuática, los invertebrados. En tal circunstancia, no sería sorprendente encontrar valores más elevados que los reportados en otros momentos del año para los cuerpos de agua próximos a las zonas de alta producción agrícola. Esta situación se agrava además con las diversas formulaciones de glifosato actualmente aplicadas a una amplia extensión de nuestro territorio, una situación comparable a la de otros países productores de soja como los Estados Unidos. En una nota periodística de julio de 2017, el periodista Patricio Eleisegui afirma que "Argentina aparece hoy como el país con mayor consumo de glifosato en el planeta, en términos de cantidad de habitantes. Mientras que Estados Unidos, con un uso anual de 136 millones de litros, promedian 0,42 litros del herbicida por habitante; Argentina, con 187 millones de litros anuales, ostenta una pauta de 4,3 litros/año por cada persona que puebla nuestra geografía" (Eleisegui, 2017).

La Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable (SAyDS) reportaba en 2008 la utilización de entre 180 y 200 millones de litros de glifosato por año (Aparicio *et al.,* 2013). Actualmente, en el sitio web de la mencionada Secretaria (devenida en Ministerio,

MAyDS), se reporta para el año 2013 un volumen comercializado de plaguicidas de 281,70 millones de litros. No hay datos más actualizados al respecto.

Las formulaciones comerciales de los herbicidas a base de glifosato contienen como ingredientes la sal isopropilamina (IPA) o alguna otra sal del glifosato, uno o más surfactantes y agua (Donadío de Gandolfi *et al.,* 2009). Los más utilizados en nuestro país son básicamente granulados solubles con agregados de coadyuvantes siliconados con concentraciones del principio activo que varían entre el 66 y el 79%. Estos coadyuvantes generalmente son surfactantes, denominados por la industria productora como "elementos inertes", no declarados, que actúan como emulsionantes y humectantes capaces de aumentar la permeabilidad del principio activo, permitiendo que éste atraviese la barrera cuticular vegetal con mayor facilidad. En la mayoría de las formulaciones, estos coadyuvantes llegan a representar el 15% de la formulación (Donadío de Gandolfi *et al.,* 2009). Se encuentran registrados en SENASA (2017) 403 formulaciones comerciales con glifosato como principio activo, solo o en asociación a otros principios activos, tales como Imazetapir, 2-4 D o Dicamba. Las formulaciones comerciales que se encuentran entre las más utilizadas en la pampa y en el litoral fluvial (las dos ecorregiones de mayor productividad sojera de Argentina) son **Eskoba®** (Red Surcos) 48% (p/v) de sal de isopropilamina [N–(fosfonometil) glicina], **Panzer Gold®** (Dow Agrosciences) 60,8% (p/v) de sal de dimetilamina–[N–(fosfonometil) glicina], **Sulfosato Touchdown®** (Syngenta Agro) 62% (p/v) de sal potásica del ácido–[N–(fosfonometil) glicina] y **Roundup Ultramax®** (Monsanto) 74,7% (p/p) de sal monoamónica–[N–(fosfonometil) glicina] (CASAFE, 2013; Reno *et al.,* 2016).

Dada la mayor presión antropogénica sobre las poblaciones silvestres, se vuelve cada vez más importante identificar estrategias y enfoques para evaluar rápidamente el grado de estrés experimentado por las diferentes poblaciones, integrar los efectos de múltiples factores de estrés y predecir su posible resultado para la supervivencia de la población (Sokolova *et al.,* 2012).

Independientemente de la evaluación de la toxicidad inherente a una o varias de las formulaciones de glifosato actualmente más utilizadas, la evaluación de la toxicidad intrínseca del glifosato como principio activo cobra cada más importancia, dada la gran cantidad de formulaciones comerciales que se aplican, según se mencionó más arriba, y cuya variedad tiende a aumentar vertiginosamente con el tiempo. De esta manera, los efectos causados por el glifosato *per se* serían extrapolables, en principio, a cualquier formulación comercial presente o futura que lo contenga.

Biología de Crustáceos

-Anatomía general

Los crustáceos representan un extenso subfilo dentro de los Artrópodos, con más de 67.000 especies. En su mayoría son acuáticos, encontrándolos tanto en aguas marinas, salobres o dulciacuícolas, a excepción de los isópodos que son terrestres. Si bien su morfología es muy variada, en general su cuerpo está dividido en tres tagmas o regiones: céfalon (cabeza), pereion (tórax) y pleon (o abdomen), formando los primeros segmentos del tórax unidos a la cabeza el cefalotórax (Figura 5). Es un grupo muy diverso en cuanto a tamaño corporal, hábitat y forma de vida, incluyendo entre otros representantes pulgas

de agua, copépodos, percebes, kril y, dentro del orden Decapoda, camarones, langostas, langostinos y cangrejos (Brusca y Brusca 2005; Hickman *et al.,* 2009).

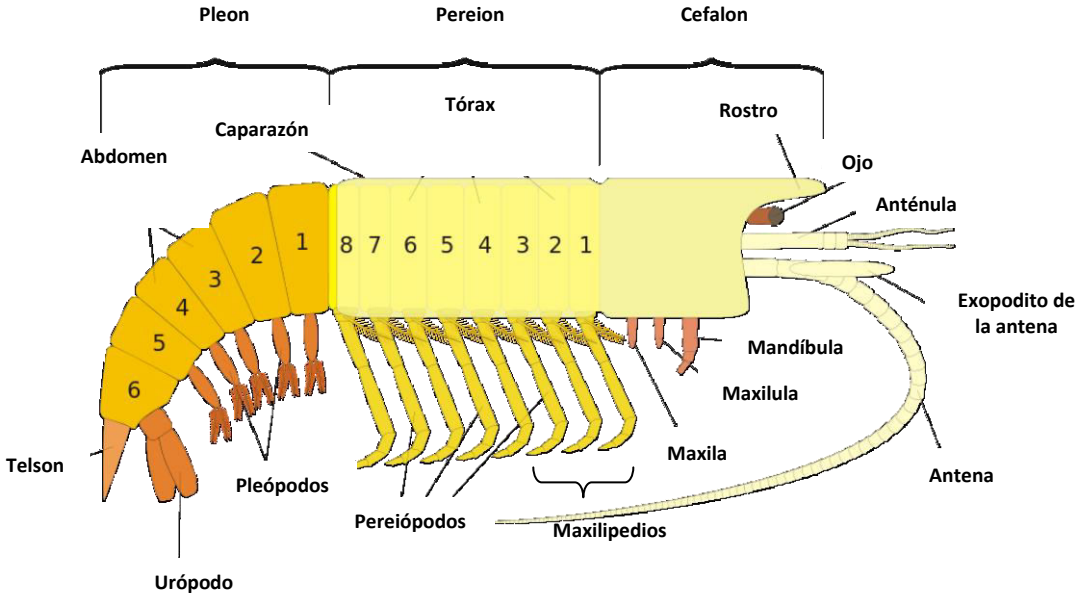


Figura 5. Anatomía de un crustáceo malacostraco generalizado. Tomado de Hillewaert (2017).

Entre los decápodos, los camarones son los más primitivos: poseen un cuerpo cilíndrico o comprimido lateralmente, con abdomen bien desarrollado y exoesqueleto fino y flexible. La mayor parte de los camarones son bentónicos y utilizan sus pleópodos para nadar ocasionalmente, aunque existen especies netamente pelágicas con una natación muy activa. El resto de los crustáceos decápodos son bentónicos, con patas caminadoras fuertes, cuerpos aplanados dorsoventralmente y exoesqueletos más duros (Barnes *et al.,* 1993; Brusca y Brusca, 2005). En el caso de las langostas (Infraorden Astacidae y Palinuridae) poseen un cuerpo más largo que ancho y el abdomen extendido. El primer par de pereiópodos está modificado conformando un quelípedo. El resto de los pereiópodos son utilizados para caminar, aunque también se pueden observar

movimientos rápidos ocasionales que se producen al flexionar el abdomen, como mecanismo de huida ante el peligro. Los pleópodos son utilizados por las hembras en la ventilación de los huevos y las mismas repliegan el abdomen cuando se encuentran ovígeras, protegiendo la puesta. Los pseudocangrejos (Infraorden Anomura) presentan forma de cangrejo, aunque con el abdomen semiextendido, es decir, no replegado completamente. Al igual que las langostas, presentan quelípedos en el primer par de pereiópodos, mientras que el quinto par está reducido y no tiene función caminadora, por lo que usualmente no se observa exteriormente. Los cangrejos verdaderos (Infraorden Brachyura) poseen cuerpos cortos altamente especializados, el cefalotórax está aplanado dorsoventralmente y se expande lateralmente. Al igual que las langostas y pseudocangrejos, el primer par de pereiópodos está modificado formando quelípedos y el resto son utilizados como patas caminadoras. En algunas especies, el quinto par puede estar modificado para la natación ocasional. Los machos carecen del tercer, cuarto y quinto par de pleópodos. Los dos primeros pares están modificados cumpliendo funciones reproductivas. En las hembras, los pleópodos están modificados y son utilizados para ventilar los huevos cuando se encuentran ovígeras. El abdomen simétrico y reducido se pliega sobre el cefalotórax. En general, el urópodo es inexistente, excepto en algunas formas primitivas. En los cangrejos verdaderos, la reducción y flexión del abdomen se reconoce como una posible adaptación relacionada con la locomoción, ya que el centro de gravedad está ubicado por debajo de los apéndices caminadores (Barnes *et al.,* 1993; Brusca y Brusca, 2005; Negro, 2013).

-Muda y crecimiento

El crecimiento somático puede expresarse como un incremento del largo, ancho, volumen o peso corporal de los organismos en el transcurso del tiempo, y en general, en los crustáceos suele concluir cuando éstos alcanzan la madurez sexual. En este grupo, dicho incremento es discontinuo e involucra el evento de muda, el cual incluye la preparación para la exuviación del viejo exoesqueleto, un rápido incremento de tamaño mediante la absorción de agua y la posterior formación y endurecimiento del nuevo exoesqueleto (Fingerman y Rodríguez, 2009). Se sabe que este proceso se encuentra regulado a nivel endocrino (Figura 6) y que la glándula del seno de los pedúnculos oculares es la fuente de una hormona inhibitoria de la muda (MIH, por sus siglas en inglés). La acción de MIH como su nombre lo indica, es inhibitoria sobre la secreción de las hormonas de la muda, es decir, los ecdiesteroides (principalmente ecdisona) secretados por el órgano Y (Rodríguez *et al.,* 2007).

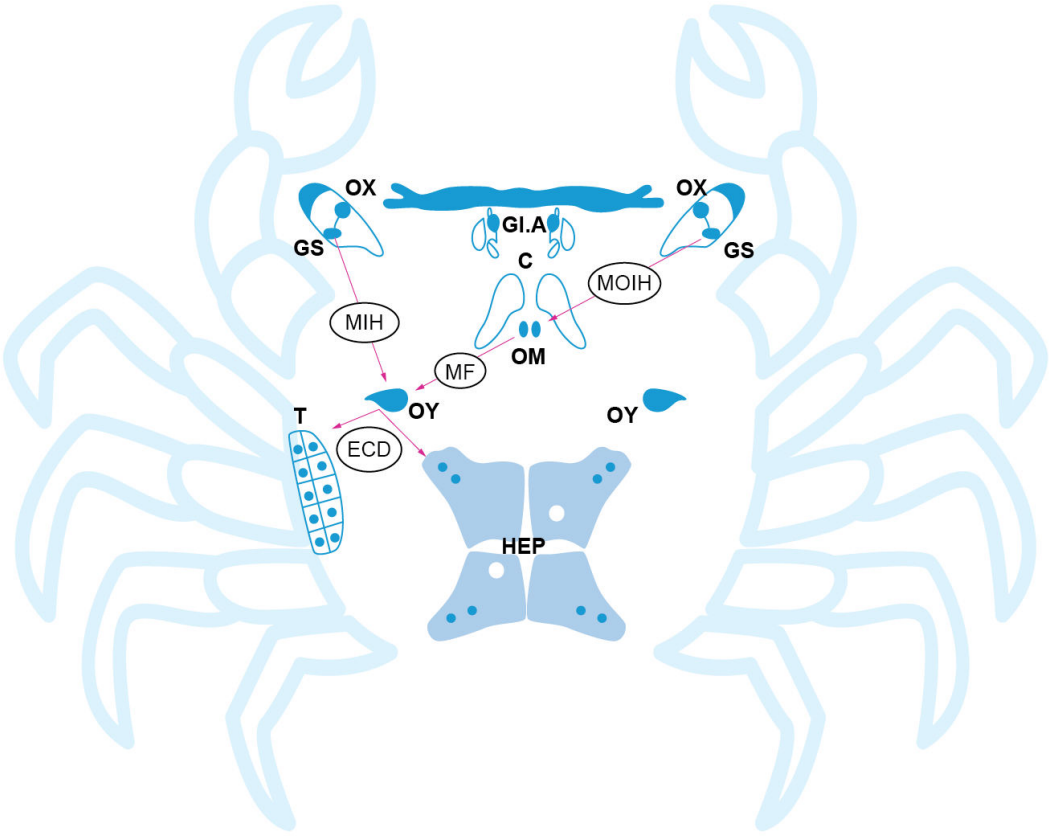


Figura 6. Control endocrino de la muda de crustáceos. OX: órgano X, GS: glándula del seno, OY: órgano Y, OM: órgano mandibular, C: cerebro, HEP: hepatopáncreas, T: tegumento, Gl. A: glándula antenal, MIH: hormona inhibidora de la muda, ECD: ecdisona, MOIH: hormona inhibidora del órgano mandibular y MF: metil farnesoato. Tomado de Rodríguez *et al.* (2007).

La hormona hiperglucemiante de los crustáceos (CHH, por sus siglas en inglés) ha demostrado ser una hormona multifuncional. Además de participar en la regulación y metabolismo de la glucosa, es responsable de la captación de agua que ocurre durante el proceso de muda (Fingerman y Rodríguez, 2009). Asimismo, los órganos mandibulares también intervienen en el proceso de muda, secretando metil farnesoato (MF). El MF, análogo a la hormona juvenil de los insectos, cumple funciones tanto en la reproducción como en el proceso de muda, estimulando la secreción de ecdisona (Nagaraju, 2007;

Rodríguez *et al.,* 2007). La secreción de MF es controlada negativamente por la hormona inhibidora del órgano mandibular (en inglés, MOIH), secretada por la glándula del seno (Liu *et al.,* 1997).

Las funciones metabólicas y el crecimiento somático se inician muy tempranamente en la historia de un organismo (típicamente durante la embriogénesis) e interactúan entre sí durante toda la vida. A partir del momento de la ontogenia en el cuál se adquiere la madurez sexual y se inicia la función reproductiva, se agrega al “balance energético" otro proceso de un elevado requerimiento energético, generándose cambios en el modo en que se distribuye la energía disponible (López Greco, 1997).

Así, encontramos que en los crustáceos la fuente de energía más relevante son los carbohidratos, constituyendo la glucosa y el glucógeno una tercio del total de carbohidratos presentes; aunque también ha sido verificada la utilización de lípidos y proteínas (Frontera, 2010; Ghanawi y Saoud, 2012). La mayor parte de éstos está almacenada como quitina, un polisacárido nitrogenado, que constituye aproximadamente entre el 65 y el 75% del exoesqueleto (Drach y Lafon, 1942). Por su localización y función, esta fuente de carbohidratos parece no estar disponible para su utilización inmediata en el metabolismo energético.

Se sabe también que los componentes del plasma varían considerablemente según la condición fisiológica y el estado nutricional en la que se encuentra el animal, influyendo además eventos tales como la muda y la reproducción, y variaciones estacionales de parámetros ambientales tales como el fotoperíodo, la temperatura y la salinidad (Vogt,

2002; Prymaczok, 2008). La glucosa es el glúcido más abundante en hemolinfa, mientras que otros azúcares, como la maltosa, han sido encontrados en concentraciones menores (Telford, 1968; Schwoch, 1972). Así, la hemolinfa funciona como un sitio de almacenamiento transitorio para la glucosa. Como se ha mencionado anteriormente, la glucemia se encuentra regulada por los niveles circulantes de CHH, la hormona hiperglucemiante secretada en los pedúnculos oculares (Chang y O'Connor, 1983). La hemolinfa además almacena glucógeno en sus hemocitos; aunque los principales tejidos de almacenamiento de esta reserva son el músculo y el hepatopáncreas (Parvathy, 1971). Los carbohidratos movilizados desde los sitios de almacenamiento, son transportados por la hemolinfa e ingresan a otros tejidos para seguir cuatro rutas metabólicas principales: la síntesis de quitina, la producción de mucopolisacáridos, la síntesis de ribosa y NADPH, o la glucólisis, dando como producto final L-lactato, o bien CO_2 y agua (Herreid y Full, 1988; Frontera, 2010).

-Biología reproductiva

En la mayoría de los crustáceos, el ciclo reproductivo es estacional y se encuentra influenciado por factores ambientales tales como la temperatura y el fotoperíodo (Fingerman, 1995). Daniels *et al.* (1994) evaluaron en hembras de *Procambarus clarkii* el efecto del fotoperíodo (intensidad de luz) y de la temperatura en el desarrollo ovárico y determinaron que ambos factores influyen en el ciclo reproductivo de la especie, siendo la temperatura la variable que condiciona el inicio del desarrollo ovárico, que posteriormente se acelera debido al aumento del fotoperíodo. Estudios similares realizados con hembras de la especie *Cherax quadricarinatus*, mostraron que la exposición de las mismas a un fotoperíodo de invierno durante el verano, induce la

puesta de huevos en el periodo invernal posterior (Karplus *et al.,* 2003). Existen otros factores externos que afectan también la maduración gonadal, como el tipo de sustrato, la disponibilidad de refugios, la densidad de animales y la proporción de sexos (García-Guerrero *et al.,* 2003a,b).

En su mayoría, los crustáceos presentan un patrón sexual de tipo gonocórico (sexos separados), aunque también se observan casos de hermafroditismo, intersexualidad y partenogénesis (Ferré, 2012). Como características generales de la reproducción de crustáceos se puede destacar la existencia de cópula, el desarrollo de mecanismos de cortejo y la incubación de huevos (Barki y Karplus, 1999). Las características sexuales externas de muchos crustáceos están asociadas con los procesos de apareamiento que realizan, en cuanto a la complejidad, la duración y el sexo que inicia el cortejo (Barki y Karplus, 1999; Ferré, 2012). Como se mencionó anteriormente, los machos de algunas especies de decápodos presentan apéndices modificados para la transferencia de los espermatozoides, o para el comportamiento durante el cortejo. En las hembras de algunas especies, el dimorfismo sexual se observa, por ejemplo, en el pleon modificado para la incubación de los huevos o en el tamaño corporal (Jones, 1997). El cortejo es iniciado por feromonas, señales químicas que son detectables por quimiorecepción a distancia o bien por contacto táctil (Kamio *et al.,* 2000). El evento de cópula implica la transferencia de los espermatozoides contenidos en un espermatóforo por parte del macho a la hembra. Los espermatóforos están constituidos por una mezcla de espermatozoides y secreciones de adherencia cuyo origen es el vaso deferente del aparato reproductor masculino (Vogt, 2002); varían en su forma, tamaño, cantidad y composición de las secreciones, según la especie y el tipo de fecundación que presenten

(López Greco *et al.,* 2007). Los espermatóforos se adhieren al abdomen de la hembra, en una zona próxima a los gonoporos femeninos, a fin de facilitar la fecundación.

A los fines de la presente tesis, se describen a continuación solamente las estructuras femeninas implicadas en la reproducción y los procesos madurativos que involucran.

Los ovarios son estructuras pares, localizados dorsal o dorsolateralmente al intestino, que presentan dos oviductos, normalmente reconocibles como extensiones laterales del ovario, que conectan a éste con los gonoporos ubicados en la base de algún par de apéndices del abdomen (Subramonian, 1999). El ovario de distintos crustáceos experimenta importantes cambios de color y tamaño, conforme progresa el desarrollo oocitario. Distintos autores han propuesto diversos estadios de desarrollo oocitario, basándose en criterios tales como el diámetro, color y tamaño de los oocitos. Más aún, a nivel histológico puede identificarse con precisión el grado de madurez ovárica, en base a la observación de distintos cambios microscópicos que suceden en el tejido ovárico, tales como la relación de tamaño entre oocito y núcleo, la abundancia y distribución de glóbulos de lípidos y de vitelo (López Greco, 1997; Cahansky, 2010). Entonces, la maduración del ovario también incluye un aumento en el tamaño del ovario a medida que los oocitos proliferan y incrementan su diámetro, debido a la acumulación de vitelo (Nagaraju, 2011).

La vitelogénesis es un proceso clave en la reproducción de los crustáceos decápodos, que involucra la síntesis y acumulación por parte del oocito de proteínas del huevo o vitelo, esenciales para el desarrollo del embrión (Charmantier, 1997; Ferré, 2012). El mayor

componente de ese material nutritivo está dado por las proteínas denominadas vitelinas (Vn), derivadas de su precursor vitelogenina (Vg) (Huberman, 2000). En los decápodos, distintos autores proponen que los sitios de síntesis de la Vg serían el hepatopáncreas, los ovarios o ambos (Ferré, 2012). En diferentes épocas del año, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales, el ovario inicia el proceso de vitelogénesis. De manera general, este proceso puede subdividirse en dos etapas: la etapa previtelogénica, caracterizada por la síntesis de vitelo por el propio oocito (vitelogénesis primaria o endógena), en un ovario aún inmaduro; y la etapa vitelogénica, caracterizada por la incorporación al oocito de vitelogenina sintetizada en un sitio extraovárico, típicamente el hepatopancreas (vitelogénesis secundaria o exógena) (Charniaux-Cotton, 1985; Abdu *et al.,* 2000; Tsukimura, 2001). A medida que progresa la vitelogénesis, la vitelina se acumula en los oocitos, el tejido ovárico comienza a pigmentarse (verde o naranja, según la especie) y el oocito aumenta significativamente de tamaño (Meusy y Charniaux-Cotton, 1984; Charniaux-Cotton, 1985; Tsukimura, 2001; Vazquez *et al.,* 2008). Durante la vitelogénesis, es típico que las células foliculares del ovario se encuentren rodeando a cada oocito, siendo una de sus funciones mediar en la importación de vitelogenina (Charniaux-Cotton, 1985; Abdu *et al.,* 2000).

Otro aspecto importante que se ve modificado durante el desarrollo gonadal es la composición bioquímica y el contenido energético del ovario (Cahansky, 2010). Varios trabajos realizados en distintas especies de crustáceos, han reportados cambios estacionales en las gónadas, en cuanto al contenido de diferentes biomoléculas. Ejemplo de esto es el aumento de las reservas lipídicas, tanto en gónadas como en hepatopáncreas, correlacionado con el aumento del tamaño gonadal y vinculado con la

mayor demanda asociada a la reproducción (Fernandes *et al.,* 1996; Cahansky *et al.,* 2008a,b; Da Silva Castiglioni *et al.,* 2009; Rodríguez-Gonzales *et al.,* 2009). Las puestas viables de huevos que se producen durante el periodo reproductivo de los crustáceos son posibles siempre que la acumulación previa de vitelogenina en los oocitos en crecimiento haya sido normal (Van Herp, 1993). La edad y el tamaño de madurez sexual varían entre las distintas especies.

Todos estos procesos involucrados en la reproducción se encuentran bajo la regulación del sistema endocrino (Figura 7). La glándula del seno de los decápodos es la fuente de una neurohormona, denominada hormona inhibidora de las gónadas (GIH, por sus siglas en inglés) (Fingerman y Rodríguez, 2009). Esta hormona, que se encuentra presente también en machos, inhibe la vitelogénesis en las hembras. Además, se ha descripto otra neurohormona en decápodos, la hormona estimulante de las gónadas (GSH por sus siglas en inglés), la cual parece ser esencial para el inicio de la maduración oocitaria (Fingerman y Rodríguez, 2009). De acuerdo a Nagaraju (2011) la maduración de la gónada femenina de los crustáceos parece estar regulada por los dos neuropéptidos antagonistas arriba mencionados: GIH (sintetizada y secretada por el complejo órgano X-glándula del seno (OX-GS) del pedúnculo ocular, y GSH, que se cree que es producida por el cerebro y el ganglio torácico.

Por otra parte, hormonas lipofílicas tales como el metil farnesoato, secretado por el órgano mandibular, así como los esteroides producidos por el mismo ovario, estimulan el crecimiento del ovario (Nagaraju, 2011; Rodríguez *et al.,* 2007). Finalmente, de acuerdo a lo observado en algunas especies, CHH también tendría una función en la reproducción,

estimulando la vitelogénesis y favoreciendo de esa manera el crecimiento de los oocitos (Fingerman y Rodríguez, 2009; Nagaraju, 2011). Se ha propuesto incluso que la GSH podría ser una isoforma particular de CHH, secretada a nivel del sistema nervioso extrapeduncular (Fanjul Moles, 2006).

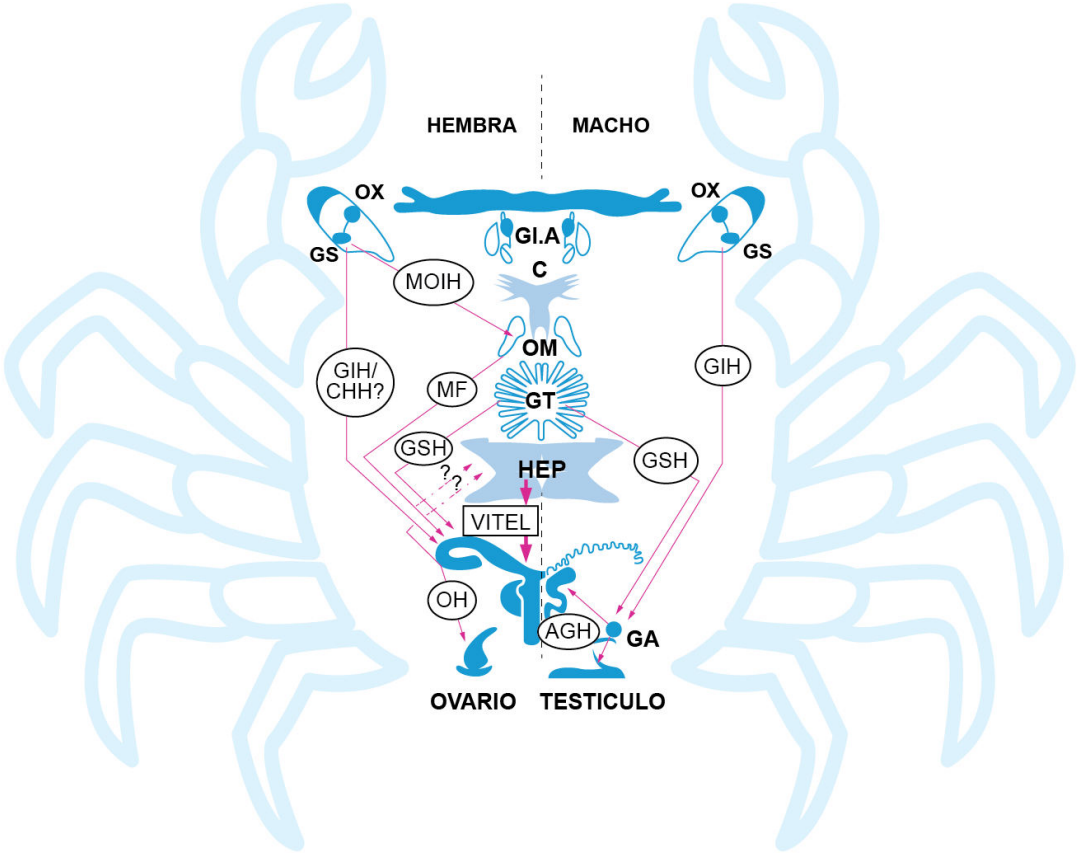


Figura 7. Control endocrino de la reproducción de crustáceos. OX: órgano X, GS: glándula del seno, OM: órgano mandibular, C: cerebro, GT: ganglio torácico, HEP: hepatopáncreas, OV: ovario, T: testículo, GA: glándula androgénica, Gl. A: glándula antenal, GIH: hormona inhibidora de gónadas, GSH: hormona estimulante de gónadas, MOIH: hormona inhibidora de los órganos mandibulares, CHH: hormona hiperglucemiante de crustáceos, MF: metil farnesoato, OH: hormona de ovario, AGH: hormona de la glándula androgénica y VITEL: vitelogenina. Tomado de Rodríguez *et al.* (2007).

En muchos crustáceos, la reproducción y la muda son dos procesos fisiológicamente opuestos, al menos desde el punto de vista de la inversión energética. De hecho, la

reproducción de una gran variedad de especies de crustáceos decápodos, tales como cangrejos y langostas, ocurre durante la intermuda (período entre dos mudas consecutivas). Ambos procesos se encuentran, como ya se mencionó, bajo control hormonal (Fingerman, 1997; Lawrence y Jones, 2002). La glándula del seno secreta, generalmente con un determinado patrón estacional que varía entre especies, dos hormonas inhibitorias: la MIH y la GIH. Por tal motivo, al remover los pedúnculos oculares, puede generarse una muda precoz o un avance gonadal acelerado, dependiendo tanto del sexo del organismo como de la estación del año en la que se practique la ablación peduncular (Fingerman y Rodríguez, 2009). Más aún, se ha propuesto que la MIH es un regulador endocrino clave en la coordinación de la muda y la reproducción en crustáceos, que simultáneamente inhibe la muda e induce la maduración ovárica (Nagaraju, 2011).

-Desarrollo embrionario e incubación de huevos

En cuanto al desarrollo embrionario de los crustáceos, podemos observar variantes en correlación con el ambiente acuático que habitan: marino, estuarial o dulciacuícola. El tipo de desarrollo que pueden presentar se encuentra evolutivamente relacionado con la conquista del agua dulce por parte de los crustáceos, y define diferentes estrategias reproductivas. Así, los cangrejos marinos o estuariales como *N. granulata*, producen huevos pequeños con un desarrollo embrionario indirecto o anamórfico, de los cuales eclosionan larvas planctónicas, favoreciendo así los mecanismos de dispersión (Barnes *et al.,* 1993; Brusca y Brusca, 2005). El elevado número de huevos desovados compensa la alta mortalidad esperada para las larvas eclosionantes, que aún deben mudar varias veces antes de alcanzar el primer estadío juvenil, y por lo tanto están sujetas a una predación

potencialmente importante. Por otro lado, las especies de crustáceos que han conquistado el agua dulce, tales como *N. heteropoda heteropoda* y *C. quadricarinatus*, tienen puestas con menor cantidad de huevos y presentan un desarrollo directo o epimórfico, donde han desaparecido los estadios larvales de vida libre (desarrollo larval abreviado), eclosionando en cambio organismos juveniles (Barnes *et al.,* 1993; Anger, 1995; Brusca y Brusca, 2005), mucho más robustos y equipados para afrontar los desafíos de un ambiente altamente cambiante, como es el dulciacuícola. Por este motivo, los huevos desovados por estos crustáceos de agua dulce son de mayor tamaño, a fin de desarrollar embriones lecitotróficos, es decir, con la cantidad de vitelo necesaria para soportar un período de incubación mayor. De esta manera, alcanzan un desarrollo más completo, al cuál se le suma tanto la protección de la puesta como el cuidado parental por parte de las hembras (López Greco *et al.,* 2004) de modo de producir una progenie con una alta tolerancia al estrés físico-químico generado por el ambiente (Anger, 1995).

Por otra parte, la membrana de los huevos de los crustáceos decápodos dulciacuícolas es más gruesa que la de los decápodos marinos, aumentando el aislamiento de los embriones en desarrollo y protegiéndolos contra el estrés osmótico (Negro, 2013). Glas *et al.* (1997) describieron para los huevos del camarón de agua dulce *Palaemonetes pugio,* una o varias capas protectoras extracelulares a las cuales refieren, en conjunto, como "capa embrionaria" o "corion". Tales capas, morfológicamente distinguibles, van siendo degradadas por el embrión antes de la eclosión. En el caso de las especies dulciacuícolas, la eclosión de los juveniles se produce a consecuencia de los movimientos de los pereiópodos que realizan los embriones, para romper mecánicamente el corion.

El periodo de incubación de los huevos varía en los distintos grupos de crustáceos, comprendiendo desde algunas semanas hasta diez meses, incluso con periodos de diapausa. La duración del período de incubación es dependiente de la temperatura, entre otros factores (Reynolds, 2002), por lo que puede variar en una misma especie a diferentes latitudes. Salvo algunas excepciones, la mayor parte de los crustáceos incuban sus huevos en alguna estructura especializada, como ser cámaras incubadoras especiales o sacos ovígeros a ambos lados del abdomen. Las hembras de los crustáceos malacostracos, por lo general llevan sus huevos (y eventualmente también los juveniles tempranos) sujetos a apéndices abdominales modificados; son las denominadas hembras ovígeras (Hickman *et al.,* 2009).

Especies en estudio – Consideraciones particulares de las especies utilizadas como modelos experimentales

Cherax quadricarinatus

- *Origen, hábitat y hábitos alimentarios*

C. quadricarinatus (Decapoda, Parastacidae) (Figura 8) es una especie de langosta de agua dulce denominada comúnmente “red claw crayfish” o “pinzas rojas”, originaria del norte de Australia, que se cultiva intensiva o semi-intensivamente en otros países de clima tropical o subtropical, como la Argentina. Esta especie presenta muchas ventajas para su cultivo, debido a sus características fisiológicas y biológicas en general, tales como un rápido crecimiento, un gran potencial para adaptarse a distintos climas y un ciclo de vida simple con desarrollo directo, sin estadíos larvales. Existen numerosos trabajos sobre la biología reproductiva de la especie, muchos de ellos enfocados hacia su cultivo (Jones,

1997; Cahansky *et al.,* 2002; Lawrence y Jones, 2002; Vazquez y López Greco, 2007; Chaulet *et al.,* 2008; Ferré, 2012).

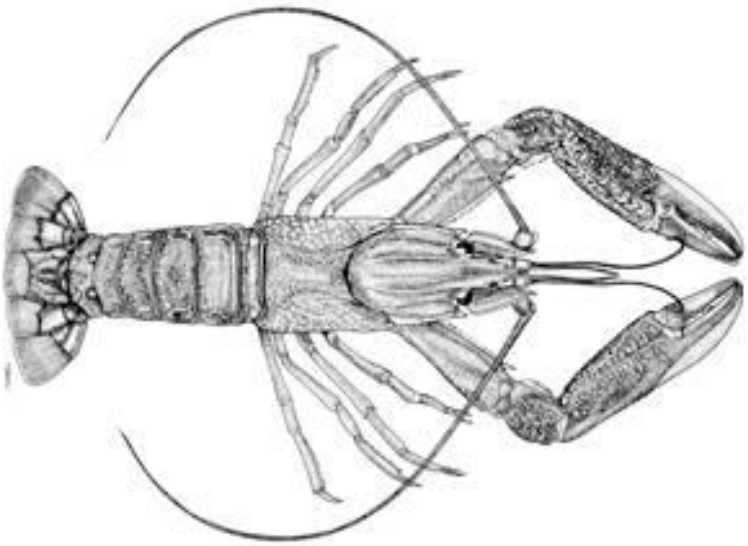


Figura 8. Ilustración de un ejemplar adulto de *C. quadricarinatus* von Martens, 1868. Tomado de FAO (2008).

Esta especie de langosta puede considerarse como omnívora-detritívora (Jones, 1997), ya que su dieta incluye tanto especies animales como vegetales y en su ambiente natural, la mayoría de los nutrientes lo aportan microorganismos como bacterias, hongos y protozoos asociados a plantas en descomposición. Sin embargo, las condiciones óptimas para el crecimiento de los juveniles no son las mismas que para el crecimiento de los adultos. Los juveniles requieren un mayor consumo de biomasa animal, y de hecho en su hábitat natural el zooplancton es uno de los principales componentes de su dieta (Jones, 1997).

- *Características morfológicas y anatómicas de la especie*

C. quadricarinatus comparte las características generales del Orden Decapoda. Pertenece al Suborden Pleocyemata, Infraorden Astacidae, Superfamilia Parastacoidea, Familia Parastacidae. Como particularidades, en el extremo anterior del cefalotórax se ubica un par de ojos pedunculados y otros órganos sensoriales constituidos por un par de anténulas y un par de antenas largas, ambas sensitivas (quimiorreceptoras y táctiles), las cuales le permiten al animal localizar el alimento y percibir el ambiente en cuanto a la calidad del agua, temperatura y salinidad, entre otras variables. Además, esta especie presenta dimorfismo sexual: los machos presentan unos quelípedos característicos, que son relativamente más grandes y gruesos que los de las hembras, y poseen además una membrana lateral de color rojo denominada "red patch", sobre la superficie externa de cada quelípedo. Además, los machos poseen gonoporos ubicados en la base del quinto par de pereiópodos, mientras que las hembras presentan dichas aberturas genitales en el tercer par (Jones, 1997; Lawrence y Jones, 2002; Cahansky, 2010).

- *Ciclo reproductivo, cópula y período de incubación de los huevos*

El período reproductivo de esta especie comprende principalmente los meses de primavera y verano, cuando en su ambiente natural se verifica el mayor número de puestas. Se ha observado que una misma hembra puede ser impregnada más de una vez durante un mismo ciclo reproductivo (Jones, 1997). Este mismo patrón reproductivo estacional se observa también en los criaderos ubicados en climas templados, e incluso bajo condiciones de temperatura y fotoperíodo de verano mantenidas constantes en el laboratorio durante todo el año (Barki *et al.,* 1997). Durante el invierno (periodo pre-reproductivo), el ovario crece de tamaño y alcanza su madurez al comienzo de la

primavera. Durante el otoño (período pos-reproductivo), el ovario se mantiene en estado quiescente (Karplus *et al.,* 2003).

Luego del cortejo entre machos y hembras, deviene la cópula, en la que el macho manipula a la hembra volcándola sobre el dorso, con el lado ventral hacia su propio vientre, depositando un espermatóforo en la cercanía del gonoporo femenino. Luego los animales se separan y entre las 12 y 24 horas siguientes a la cópula, la hembra produce el desove. Los oocitos liberados quedan retenidos en una cámara temporaria de incubación, ubicada en la cara ventral del pleon. Los espermatozoides se liberan por rotura del espermatóforo, e ingresan a dicha cámara de incubación. La fecundación se realiza ahí dentro y los huevos quedan firmemente adheridos a las setas de los apéndices de la hembra. En esta especie, los huevos recién fecundados son de color verde oliva. Durante la etapa de desarrollo de los mismos, la hembra ovígera transporta los huevos adheridos a sus pleópodos, se encarga de limpiarlos y oxigenarlos y se la observa replegando el pleon para proteger la masa de huevos hasta el momento de la eclosión. Dependiendo del tamaño de la hembra, su puesta varía entre los 200 y 1000 huevos (Barki *et al.,* 1997). Durante el desarrollo, se observa un cambio secuencial en la coloración del huevo que progresa de verde oliva a violeta y luego a marrón; en correlación con este cambio de coloración se verifica la organogénesis embrionaria, que culmina luego de aproximadamente 40 días de incubación con la eclosión de un juvenil; a los 30 días de incubación, este juvenil ya presenta características morfológicas similares al adulto (Jones, 1997; García-Guerrero *et al.,* 2003b). Una vez eclosionados, los juveniles continúan utilizando a sus madres como refugio hasta su completa independencia, lo que ocurre al alcanzar el estadío de juvenil III (Jones, 1997). Así, posteriormente al estadío

hatching (eclosión), continúan los estadíos post embryo I y II (de acuerdo a García-Guerrero *et al.,* 2003b) que se corresponden con los estadíos juvenil I y II (según Jones, 1997). Ante condiciones apropiadas de hábitat y disponibilidad de alimento, los juveniles crecen rápidamente alcanzando la madurez sexual a los 12 meses aproximadamente (Jones, 1997).

Figura 9. Principales países productores de *Cherax quadricarinatus*. Tomado de FAO (2008).

- *Importancia*

La Figura 9 muestra los principales países en donde se cultiva esta especie. En Argentina, los pocos criaderos existentes actualmente se encuentran en zonas agrícolas (Tucumán, Corrientes) por lo que estarían expuestos a la contaminación por plaguicidas. Así, los criaderos de esta especie se encuentran emplazados en (o en la cercanía de) campos de cultivo de soja, resultando por lo tanto afectados por la fumigación de glifosato.

En los criaderos (Figura 10) se realiza una primera fase de pre-engorde durante aproximadamente tres meses, en piletones bajo techo a temperaturas de 26 a 28 °C. En esta primer etapa, los juveniles denominados comúnmente “tempranos” (<1 gramo de peso corporal) son más sensibles a los cambios en las condiciones ambientales. Luego, los juveniles “avanzados” (de entre 1 y 5 gramos), más resistentes, son transferidos a piletones de engorde (Jones, 1997; FAO, 2008). Estos piletones de engorde para los juveniles se encuentran excavados en tierra, y en general sin cobertura. Esta fase de engorde comprende de 6 a 8 meses, abarcando principalmente las estaciones de otoño e invierno; al término de este período los animales alcanzan la talla comercial mínima de 50 gramos (Jones, 1997).

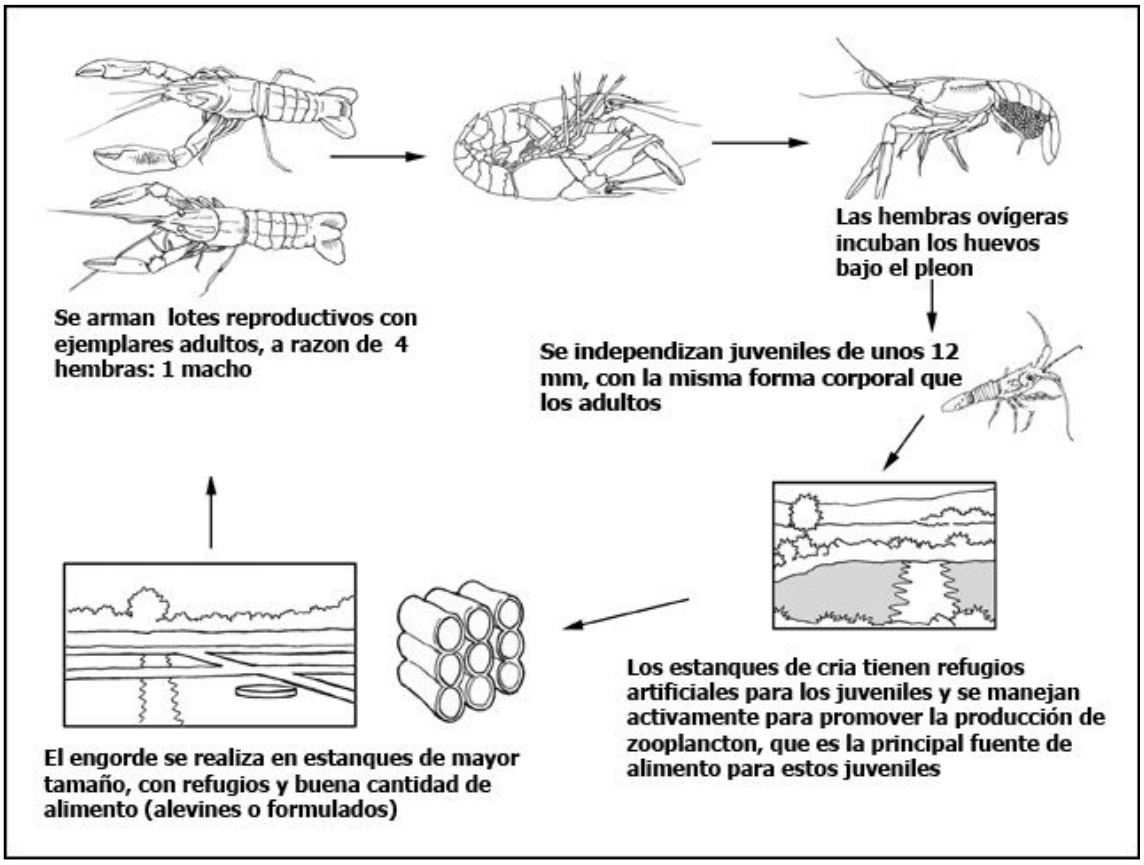


Figura 10. Ciclo productivo de *C. quadricarinatus.* Modificado de FAO (2008).

Tanto el tipo de desarrollo de esta especie, como las características de su ciclo de vida, nos llevan a considerarla un buen modelo experimental para evaluar el posible impacto del glifosato sobre el crecimiento somático de los juveniles.

Neohelice granulata

-Origen, hábitat y hábitos alimentarios

Neohelice (=Chasmagnathus) granulata (Dana 1851) (Figura 11) es una especie autóctona de amplia distribución en ambientes estuariales de Argentina y Brasil, particularmente en la franja intermareal, donde realizan cuevas en la zona litoral fangosa influenciada por las mareas. Así, se encuentran grandes poblaciones formando cangrejales en la provincia de Buenos Aires (Mar Chiquita y Bahía de Samborombón), así como en estuarios del sur de Brasil (Lagoa dos Patos) (Figura 12).

Figura 11. Ilustración de un ejemplar adulto de *Neohelice (=Chasmagnathus) granulata* (Dana 1851). Gentileza de Pablo Yungblut.

Los cangrejales de esta especie son particularmente numerosos a lo largo de los 150 km de costa de la Bahía de Samborombón, en la Provincia de Buenos Aires. En esta bahía desembocan importantes cursos de agua, tales como los ríos Salado y Samborombón, que reciben a su vez las escorrentías provenientes de una amplia superficie de campos

sembrados. Particularmente, en la zona de Punta Rasa la salinidad varía entre 10 y 25% dependiendo de la época del año, así como de las mareas, los vientos predominantes y los aportes de agua dulce de la cuenca. La temperatura media anual es de 14,5 °C (Urien, 1972).

Figura 12. Distribución geográfica de *Neohelice granulata* en América del Sur (marcado en celeste).

El hábito alimenticio de la especie es omnívoro-detritívoro, con una dieta compuesta por restos de *Spartin*a spp., detritos, microflagelados, foraminíferos, diatomeas, ostrácodos,

cianofíceas, insectos y otros crustáceos decápodos; también se ha observado un comportamiento carroñero de *N. granulata* sobre peces y cangrejos muertos (Botto e Irigoyen, 1972). En relación a su rol en el ecosistema que habita y a su composición dietaria, esta especie constituiría un vector de transferencia de materia y energía desde el ambiente semiterrestre, donde se alimentan los adultos, hacia el ambiente acuático, donde eclosionan las larvas que sirven de alimento a varias especies de peces. *N. granulata* constituye en el área de la Bahía de Samborombón una especie cuantitativamente muy importante y su principal predador es la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) (Sánchez *et al.,* 1991), formando parte además de la alimentación de aves playeras migratorias, principalmente gaviotas (*Larus* spp.) y ostrero pardo *(Haematopus palliatus*) (Martinetto *et al.,* 2007).

- *Características morfológicas y anatómicas de la especie*

Dentro del Orden Decapoda, *N. granulata* pertenece al Infraorden Brachyura, Superfamilia Grapsidae, Familia Varunidae y no escapa a las generalidades descriptas anteriormente para crustáceos decápodos (anatomía general, muda, crecimiento y biología reproductiva). Como particularidades morfológicas, estos cangrejos presentan un cefalótorax y abdomen deprimido dorsoventralmente, y los adultos alcanzan una talla de unos 3-5 cm de ancho de caparazón. Tanto las quelas como el caparazón presentan pequeñas protuberancias o granulaciones, y de ahí deriva su nombre. Su coloración suele variar según la alimentación, aunque generalmente el dorso del caparazón es pardo, las quelas y pereiópodos suelen ser más claros, y ventralmente suelen ser rosados con el abdomen reducido y replegado ventralmente. Presentan dimorfismo sexual, siendo el macho algo más grande que la hembra, con quelas notoriamente de mayor tamaño.

Además, se pueden diferenciar fácilmente observando su abdomen; éste es redondeado y ancho en las hembras, para la incubación de los huevos desovados, y es estrecho y de forma triangular en los machos.

Los ovarios de los Brachyura son estructuras pares, con forma de H, con un puente ovárico que se sitúa a la altura del estómago. El ovario presenta un par de ramas laterales, los oviductos, que se comunican con los receptáculos seminales o espermatecas, también pares, que son dilataciones de los oviductos. Los gonoporos, o aberturas genitales, son pares y se abren, como en la mayoría de los Brachyura, en el esterno del sexto segmento torácico (López Greco, 1997).

- *Ciclo reproductivo, cópula y período de incubación de los huevos*

El período reproductivo de *N. granulata* puede variar según la latitud a la que se encuentre la especie (López Greco, 1997). En Samborombón y Mar Chiquita el ciclo reproductivo de *N. granulata* comprende tres periodos (López Greco y Rodríguez, 1999): **pre-reproductivo** (invierno), durante el cual el ovario crece y madura; **reproductivo** (primavera y verano), cuando ocurren tanto el desove como la eclosión de los huevos; y finalmente el período **pos-reproductivo** (otoño), donde el ovario permanece generalmente inactivo y se produce la muda de los organismos adultos.

El ovario inmaduro presenta importantes cúmulos de oogonias (o nidos oogoniales), rodeados por los oocitos en vitelogénesis primaria o endógena, que presentan un mayor diámetro que las oogonias, debido al incremento de volumen citoplasmático. El

citoplasma es de aspecto homogéneo y adquiere una marcada basofilia, característica de la fase de vitelogénesis endógena. López Greco (1997) realizó una descripción sobre el ciclo anual de la reproducción de esta especie, incluyendo detalles histológicos sobre la maduración del ovario. Allí, también observó tejido no germinativo, células foliculares de forma redondeada que se distribuyen al azar entre oogonias y oocitos en vitelogénesis primaria, posiblemente involucradas en la producción de vitelo, en la formación del corion de los oocitos y en Ia producción de hormonas (López Greco, 1997; Subramonian, 1999). Se sabe que en los cangrejos las células foliculares permanecen en los ovarios luego de la ovulación, participando en el proceso de reabsorción oocitaria. Los ovarios inmaduros de *N. granulata*, muy difícilmente distinguibles, se observan al estado fresco de una tonalidad transparente, localizándose dorsolateralmente al hepatopáncreas. Un aspecto similar presenta el ovario de postpuesta reciente (1 o 2 días luego de la puesta) ya que también adquiere un color transparente ó ligeramente opalescente. Al inicio de la vitelogénesis exógena, el citoplasma se colorea de rosado y conforme el oocito se colmata de vitelo, el citoplasma adopta una coloración anaranjada y un aspecto espumoso. En esa instancia, las células foliculares se disponen en número variable rodeando a cada oocito que ingresa en vitelogénesis exógena (proceso de foliculogénesis), adoptando una configuración aplanada y haciéndose histológicamente más picnóticas. En el ovario completamente maduro, sólo son distinguibles los oocitos en vitelogénesis exógena. El núcleo mantiene su posición central (huevos centrolecíticos) y en algunos casos aún es visible el nucléolo, finalizando la maduración con el desove (López Greco, 1997).

Los ovarios maduros de *N. granulata* presentan características similares a los de otros Brachyura y han mostrado ser útiles indicadores de daño histopatológico por efecto de contaminantes (Rodríguez y Medesani, 1994; Álvarez *et al.,* 2015; Silveyra *et al.,* 2017). Además, esta especie presenta grandes ventajas para el trabajo experimental, dada su buena supervivencia en cautividad, buen tamaño y elevado potencial reproductivo.

N. granulata presenta un sistema de cópula de tipo “hembras duras", es decir, que se verifica con el exoesqueleto totalmente calcificado. El tiempo que dura la cópula es corto y no hay selección ni competencia por las hembras; la protección post-cópula también está ausente en esta especie. Tampoco existen mecanismos de competencia espermática, siendo sus espermatecas del tipo ventral. Las hembras pueden acumular suficientes espermatozoides en sus espermatecas para fecundar más de una puesta de huevos en ausencia de machos, por lo que el número de puestas no implica el mismo número de cópulas. Los eventos de muda (tanto para los juveniles como para los adultos), puestas y eclosiones Iarvales están fuertemente ligados a los ciclos naturales: diario, mareal y estacional (López Greco, 1997; López Greco y Rodríguez, 1999). Es importante destacar que la modulación por dichos factores no se pierde bajo las condiciones de laboratorio impuestas en los diseños experimentales.

Las hembras de *N. granulata* pueden tener más de una puesta durante cada período reproductivo. Cada puesta puede contener hasta 30000 huevos (López Greco y Rodríguez, 1999). La incubación dura unos 30 días; inicialmente los huevos desovados tienen una coloración violeta intensa, y a medida que avanza su desarrollo se tornan amarronados, ya próximos a la eclosión. Durante el período de incubación, las hembras se alimentan

poco y hacia el final de la incubación se internan en el estuario buscando aguas de salinidad elevada, más profundas y propicias para la supervivencia larval (Figura 13). Las larvas son pelágicas, de vida libre y se alimentan del plancton. Tienen varios estadios larvales (4 zoeas y una megalopa) que se van sucediendo mediante mudas (Boschi *et al.,* 1967). Cuando alcanzan el estadio megalopa, regresan a la costa donde mudan al primer estadio juvenil (similar al adulto en cuanto a morfología externa). Cuando las hembras alcanzan una talla de entre 1,8 y 2 cm de ancho de caparazón, se produce la muda puberal, adquiriendo los juveniles la madurez sexual y convirtiéndose en adultos funcionalmente reproductivos (López Greco y Rodríguez, 1999). Los machos suelen alcanzar la madurez sexual a un tamaño menor. En el ambiente natural, la madurez sexual se adquiere en las hembras al segundo ó tercer año de vida. Esta especie vive entre 3 y 4 años (López Greco, 1997; Petriella y Boschi, 1997).

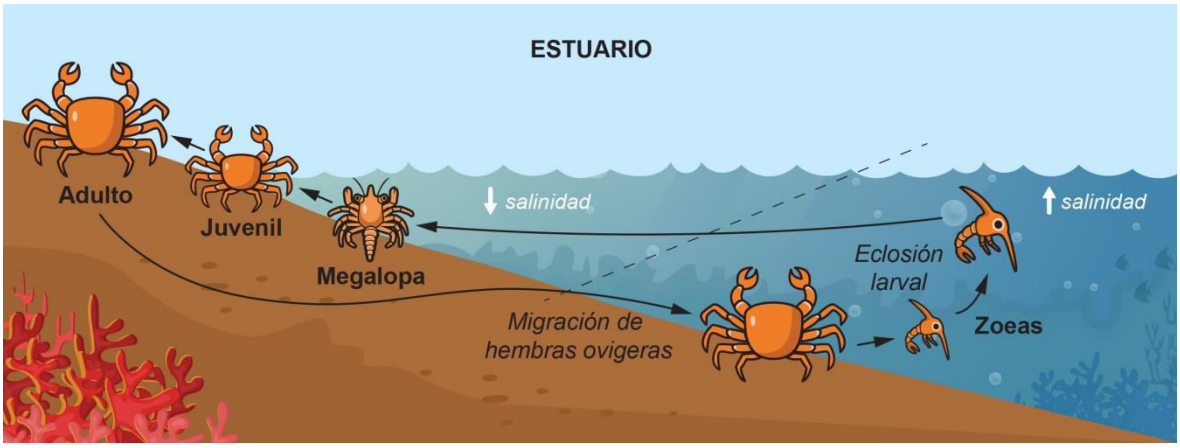


Figura 13. Esquema del ciclo de vida de *Neohelice granulata.*

Como se mencionó anteriormente, el tiempo de incubación larval es de aproximadamente un mes, influyendo el ciclo lunar tanto en la dinámica de las puestas (o desoves) como de las eclosiones, verificándose estas últimas principalmente durante las

lunas creciente y llena. Al igual que en otras especies que habitan el meso y supralitoral, este sincronismo podría ser una estrategia destinada a optimizar la exportación de las zoeas; tal sincronización se observó incluso en condiciones constantes de laboratorio (López Greco y Rodríguez, 1999).

- *Importancia*

Se han realizado importantes contribuciones acerca del efecto de varios plaguicidas y metales pesados sobre el éxito reproductivo de esta especie (Beltrame *et al.,* 2010; 2011), especialmente en relación al desarrollo embrionario y larval (Sánchez *et al.,* 1991; Rodríguez y Pisanó, 1993; Rodríguez y Medesani, 1994; Zapata *et al.,* 2001; Lavolpe *et al.,* 2004; Álvarez *et al.,* 2015). Esta especie ha servido también de modelo para evaluar posibles desorganizadores endocrinos (Rodríguez *et al.,* 2007; Silveyra *et al.,* 2017; Canosa *et al.,* 2018), incluyendo la interferencia de metales pesados en el control neuroendocrino de la reproducción y la muda (Rodríguez Moreno *et al.,* 2003; Medesani *et al.,* 2004a). Más aún, existen numerosos trabajos científicos sobre esta especie evaluando su tolerancia a los cambios de salinidad, y caracterizando su hábito semiterrestre (Spivak, 2010). Además de los estudios ecotoxicológicos mencionados, también se ha utilizado como modelo para estudios de neurofisiología, comportamentales y ecológicos (Maldonado, 2002; Bianchini *et al.,* 2008; Fanjul *et al.,* 2008; Silva *et al.,* 2009; entre muchos otros).

Neocaridina heteropoda heteropoda

- *Origen, hábitat y hábitos alimentarios*

El género *Neocaridina*, originario de China, Japón, Corea, Vietnam y Taiwán, comprende varias especies de camarones de agua dulce (Cai, 1996), que en la actualidad se cultivan como especies ornamentales (Heerbrandt y Lin, 2006). De hecho, existe más información sobre las especies proveniente de aficionados acuaristas que del ámbito científico. En particular, *N. heteropoda heteropoda* es popular entre los acuaristas de agua dulce debido a su llamativa coloración, lo que le ha valido el nombre de "red cherry". Estos camarones tan coloridos han sido obtenidos mediante manipulación de su cultivo y mediante cruzas seleccionados en cautiverio (Werner y Schäfer, 2008). No se han encontrado en la naturaleza organismos de esta especie con coloración llamativa, por el contrario son más bien parduzcos (Barbier, 2010). Estos camarones de agua dulce son abundantes en diversos tipos de cuerpos de agua continentales como lagos, embalses, estanques, ríos y arroyos de montaña (Cai, 1996). En general tienen hábitos gregarios (Figura 14A) y viven en arroyos o lagos con fondos rocosos, con abundante vegetación y disponibilidad de sustratos preferentemente oscuros, como por ejemplo troncos en descomposición (Barbier, 2010).

- *Características morfológicas y anatómicas de la especie*

Dentro del Orden Decapoda, pertenece al Suborden Pleocyemata, Infraorden Caridea, Familia Atyidae. Es una especie de tamaño pequeño con adultos que tienen longitudes que varían entre 1,5 y 2,5 cm, con el cuerpo generalmente cilíndrico y comprimido lateralmente (Figura 14B) (Barbier, 2010; Cabrita, 2012; Pantaleão *et al.,* 2015). El

promedio de vida es de 18 meses; son omnívoros y se alimentan principalmente de algas y detritos (Cabrita, 2012).

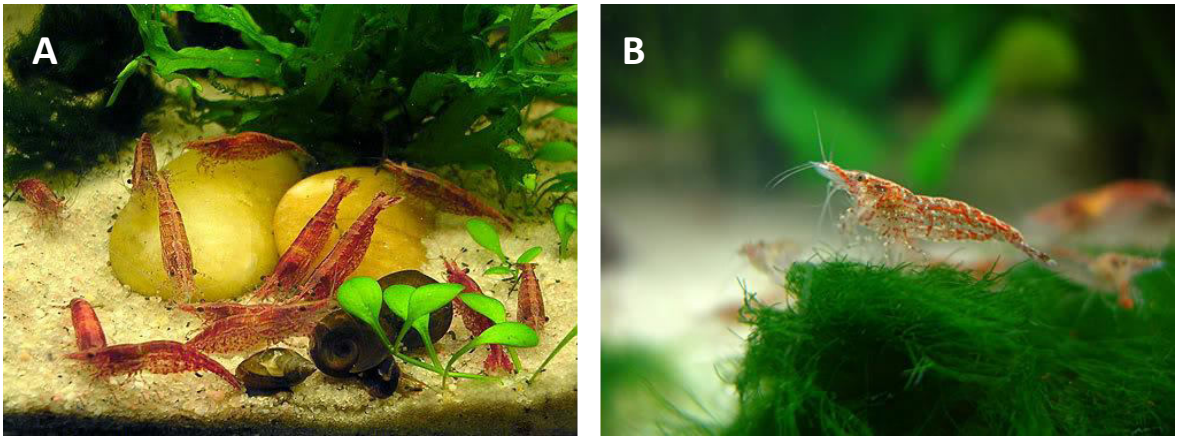


Figura 14. A: grupo de camarones *N. heteropoda heteropoda.* B: macho joven. Fotos: Méndez Lecuanda (2012).

En esta especie existe dimorfismo sexual y es posible distinguir fácilmente las hembras de los machos. Las hembras presentan un pleon más ancho, con expansiones laterales que se extienden hacia abajo, para proteger a los huevos. Los machos tienen pereiópodos más largos, lo que les permite manipular más fácilmente a las hembras durante el apareamiento. Las hembras pueden alcanzar hasta 24 mm de longitud, mientras que los machos son un poco más pequeños, alcanzando un largo de hasta 21 mm (Barbier, 2010). Las hembras de mayor tamaño presentan una tonalidad de rojo bastante más intenso que los machos y que las hembras más jóvenes (Méndez Lecuanda, 2012). En la Figura 15 puede notarse la diferencia de pigmentación entre una hembra adulta grande y otra de menor tamaño; en esta última se observan por transparencia los ovarios de color amarillo-verdoso.

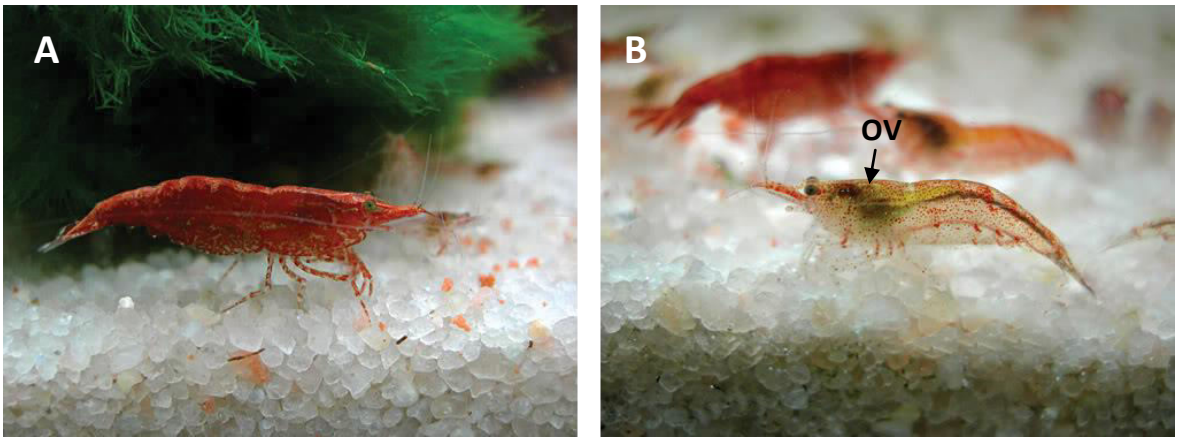


Figura 15. A: hembra adulta de *N. heteropoda heteropoda.* B: hembra joven, OV: ovarios. Fotos: Méndez Lecuanda (2012).

Los apéndices genitales de los machos se localizan a nivel de los primeros pares de pleópodos (Bauer, 2004). Los ovarios se encuentran ubicados en la región dorsal del abdomen de la hembra, y generalmente pueden observarse por transparencia, ya que se visualizan más amarillentos y brillantes en relación a la coloración del cuerpo (Cabrita, 2012).

- Ciclo reproductivo, cópula y período de incubación de los huevos

En esta especie, la hembra realiza una muda cuando los oocitos se encuentran en la fase final de maduración. Luego de la muda, libera feromonas en el agua que tienen como objetivo estimular a los machos maduros sexualmente para que las detecten mediante su flagelo antenal. En esta fase se observa una "natación nupcial" en toda la columna de agua, y al encontrarse ambos sexos, el macho se posiciona en la región dorsal de la hembra, girando posteriormente para quedar ubicado en la región ventral de la misma (Figura 16A, B). En ese momento, el macho deposita el espermatóforo en los gonoporos pares de la hembra, situados en la base de las coxas del tercer par de pereiópodos. Luego

los oocitos son expulsados por los gonoporos y el espermatóforo se disuelve, posibilitando la fecundación. Sólo un macho fecunda los oocitos. A continuación, la hembra traslada los huevos hacia el abdomen (Figura 17A, B, C, D), con la ayuda del quinto par de pereiópodos, y segrega una sustancia viscosa que permite la permanencia de los huevos bajo el abdomen, sosteniéndolos con la ayuda de los pleópodos. Durante la incubación, la hembra garantiza la oxigenación y limpieza de los huevos, girándolos entre sus patas con la ayuda de "peines", existentes al final de los apéndices del quinto par de pereiópodos. Los huevos no fertilizados o dañados son eliminados. El tiempo de incubación es variable según la temperatura del agua, reduciéndose el tiempo de incubación a mayor temperatura (Tropea *et al.,* 2015); a 25 °C, el período de incubación comprende aproximadamente cuatro semanas. En su hábitat de origen, estos camarones viven en aguas templadas; durante el invierno se observa una pausa en el ciclo reproductivo, período durante el cual la hembra disminuye además la tasa metabólica, que aumenta a las temperaturas más altas de la primavera (Barbier, 2010).

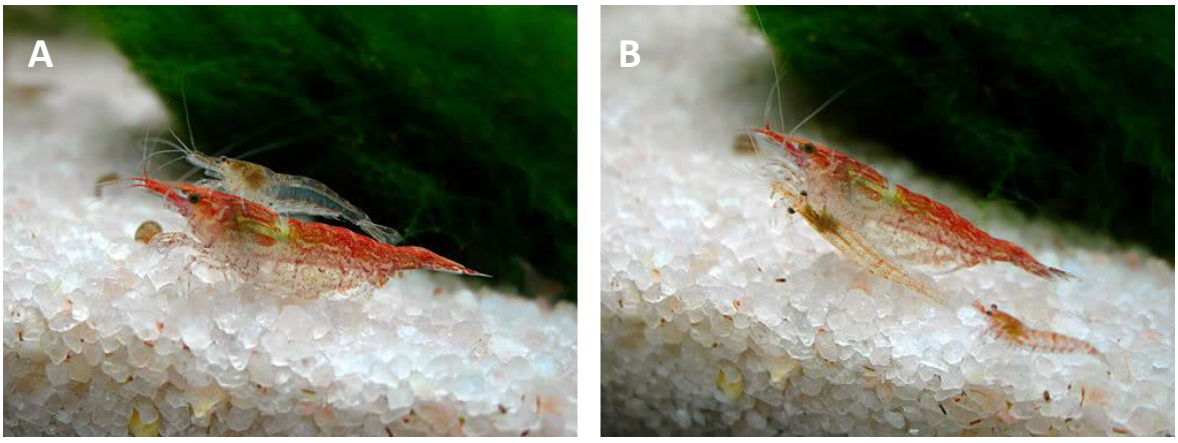


Figura 16. Pareja de *N. heteropoda heteropoda* durante la cópula. A: macho sobre el dorso de la hembra. B: macho en posición ventral. Fotos: Méndez Lecuanda (2012).

Figura 17. Hembras ovígeras de *N. heteropoda heteropoda* portando huevos en diferentes estadíos. A: hembra ovígera. B: hembra ovígera con huevos amarillos, tempranos. C: hembra ovígera con huevos verdosos, avanzados. D: hembra ovígera con huevos maduros previos a la eclosión, donde se observan los ojos de los embriones. Fotos: Méndez Lecuanda (2012).

Una hembra desova en promedio de 20 a 40 huevos de un diámetro aproximado de 1 mm (Barbier, 2010), es decir, pocos pero grandes en proporción al tamaño de la hembra. En esta especie, el desarrollo es directo, por lo que nacen camarones juveniles de aspecto similar a los adultos, pero más pequeños y transparentes (Figura 18). Los juveniles I, ya independizados, mudan en un periodo de tiempo muy corto a Juvenil II, y más aún, alcanzando el estadio Juvenil III dentro de las primeras 24 hs. Pantaleão *et al.* (2015) distinguen a los primeros estadios (post-hatching) básicamente mediante la observación

de los urópodos (abanico caudal) y la presencia o ausencia de vitelo. Los juveniles I y II no buscan alimento, ya que aún conservan algo de vitelo; al alcanzar el estadio de juvenil III, comienzan a alimentarse de microfauna pero no de plantas vasculares. En esta especie, el color característico comienza a observarse a partir de la segunda semana de edad. La madurez sexual se alcanza a los tres meses de vida, y como se ha mencionado, las hembras se vuelven receptivas luego de la muda ("sistema de hembras blandas") (Bauer, 2004; Barbier, 2010; Bauer 2011; Cabrita, 2012).

Figura 18. Juvenil I de *N. heteropoda heteropoda.* Fotos: Méndez Lecuanda (2012).

- *Importancia*

A pesar de su potencial importancia económica como camarón ornamental, existe relativamente poca información sobre su biología, si bien en los últimos años se han llevado a cabo algunos estudios sobre el rendimiento reproductivo, las condiciones de cría, la nutrición y el crecimiento de esta especie (Pantaleão *et al.,* 2015; Tropea *et al.,* 2015; Viau *et al.,* 2016; Pantaleão *et al.,* 2017). Algunos trabajos han evaluado los efectos sobre la actividad enzimática ante la exposición a selenio (Wang *et al.,* 2010; 2014).

Toxicidad del glifosato para organismos y comunidades silvestres

Mesnage *et al.* (2015), en una minuciosa revisión de la bibliografía existente hasta ese año, reportan numerosos efectos teratogénicos, tumorigénicos (cancerígenos) y hepato-renales causados por Roundup®, a concentraciones menores a las establecidas por las regulaciones internacionales. Los mismos autores plantean que tales efectos podrían explicarse por desorganización endocrina y/o estrés oxidativo, lo que a su vez produce alteraciones metabólicas, dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición al herbicida ácido o a sus formulaciones comerciales. Otras revisiones publicadas en años recientes, resumen los efectos del herbicida ácido y/o sus formulaciones comerciales sobre humanos y animales tradicionales de laboratorio (IARC, 2015; Gill *et al.,* 2017; entre otros).

En el ámbito local, algunos informes como el elaborado por la Universidad del Litoral, resumen los resultados de diversos trabajos científicos sobre los efectos del glifosato y de algunas de sus formulaciones comerciales sobre diferentes comunidades acuáticas autóctonas (Arregui *et al.,* 2010). Cabe mencionar que CONICET también elaboró en 2009, a pedido de la Comisión Nacional de Investigación sobre agroquímicos (Decreto 21/2009), un informe en el que concluyen que “bajo condiciones de uso responsable (entendiendo por ello la aplicación de dosis recomendadas y de acuerdo con buenas prácticas agrícolas) el glifosato y sus formulados implicarían un bajo riesgo para la salud humana o el ambiente. Ello sin perjuicio de la necesaria ejecución sostenida en el tiempo de controles sistemáticos sobre los niveles residuales del herbicida y los compuestos de degradación en alimentos, en la biota, en el ambiente y en la población expuesta, así como de estudios exhaustivos de laboratorio y de campo, que involucren a los formulados conteniendo

glifosato y también su(s) interacción(es) con otros agroquímicos, bajo las condiciones actuales de uso en Argentina" (Donadío de Gandolfi *et al.,* 2009).

Debido a su uso intensivo y a su eficaz absorción por parte de los organismos, el impacto contaminante del glifosato en ambientes acuáticos resulta potencialmente relevante (Giesy *et al.,* 2000; Relyea, 2005). Si bien los animales no poseen la enzima afectada por este herbicida, la ya mencionada EPSPS, a esta altura se ha acumulado bastante evidencia sobre los efectos nocivos del principio activo y de diferentes formulados a base de glifosato. Además, existe una amplia variedad de surfactantes no declarados que se han utilizado durante los últimos años en varias formulaciones de glifosato, tanto de Roundup como de otras marcas comerciales (Mesnage *et al.,* 2015). En este sentido, es importante establecer una línea de base sobre los efectos perjudiciales causados por el glifosato ácido, información valiosa para evaluar la toxicidad de cualquier formulación comercial de este herbicida.

La exposición de peces a glifosato evidenció diversos efectos. Por citar algunos, una concentración de 35 mg/L del formulado comercial Glifosato 2 de Atanor® produjo la mortalidad del 100% de peces *Cnesterodon decemmaculatus*, a las 24 hs de exposición (Ferreyroa, 2010). En otras especies de peces expuestos a Roundup® se vieron alteraciones sobre varios parámetros enzimáticos y metabólicos indicando una posible situación de estrés asociada a una depleción de reservas energéticas (Glusczak *et al*., 2006; 2007; Do Carmo Langiano y Martínez, 2008; Menéndez-Helman et al., 2014; 2015); o respuestas compensatorias (Glusczak *et al.,* 2007). En anfibios se ha reportado la inhibición de varias enzimas clave (acetilcolinesterasa, butiril colinesterasa,

carboxilesterasa, glutatión-S-transferasa) por parte de varias formulaciones comerciales de glifosato (Lajmanovich *et al*., 2011) así como diversos efectos en el desarrollo embrionario (Paganelli *et al.,* 2010; Carrasco, 2013; Bach *et al.*, 2016). Otros efectos perjudicales de glifosato sobre el comportamiento de renacuajos han sido recientemente reportados (Bach *et al.*, 2016; Mikó *et al.,* 2017). La elevada sensibilidad de los anfibios al glifosato ya había sido previamente reportada por Jones *et al.* (2010).

En especies acuáticas de invertebrados han sido relativamente escasos los trabajos que han evaluado efectos subletales del glifosato, particularmente en relación a la reproducción. Los trabajos realizados en crustáceos se han referido principalmente a la toxicidad letal aguda del glifosato y sus formulaciones, en cladóceros y copépodos (Tsui y Chu, 2003; Tsui *et al.,* 2005; Deepananda *et al.,* 2011). En otros trabajos más recientes, se han encontrado efectos en el metabolismo energético de anfípodos expuestos a concentraciones bajas de Roundup, tales como una disminución significativa en todos los parámetros bioquímicos evaluados y en la actividad de la bomba Na/K ATPasa, así como un aumento significativo en los niveles de lipoperoxidación (Dutra *et al.,* 2011). También se ha reportado una reducción en el crecimiento del camarón *Caridina nilotica* expuesto a Roundup® (Mensah *et al.,* 2012). En juveniles de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* expuestos a una mezcla de glifosato y POEA, se observó una reducción significativa tanto en la tasa de crecimiento como en el nivel de proteína muscular, junto con un descenso en las reservas de lípidos e hidratos de carbono (Frontera *et al.,* 2011).

En base a lo mencionado, las hipótesis planteadas en la presente tesis se refieren a los modelos experimentales que fueron considerados como los más apropiados para

ponerlas a prueba. Es decir, evaluamos el efecto del glifosato sobre el crecimiento somático en *C. quadricarinatus*, sobre el crecimiento gonadal en *N. granulata,* y sobre la progenie en ambas especies mencionadas y en *N. heteropoda heteropoda*.

CAPÍTULO 1

Efectos del glifosato sobre el crecimiento somático

Hipótesis

a) El glifosato ácido reduce la tasa de crecimiento de juveniles tempranos de C. quadricarinatus.

b) El glifosato ácido afecta la tasa metabólica, disminuye los niveles de reservas energéticas y modifica la actividad de enzimas del metabolismo energético, en juveniles tempranos de C. quadricarinatus.

OBJETIVO

Determinar los efectos subletales de glifosato sobre la tasa de crecimiento, los niveles de las principales reservas energéticas (lípidos, carbohidratos y proteínas) y la actividad de algunas enzimas del metabolismo intermedio en juveniles de *C. quadricarinatus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Evaluar los efectos subletales de glifosato sobre el crecimiento somático de juveniles tempranos de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

2) Evaluar los efectos subletales de glifosato sobre el metabolismo de juveniles tempranos de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, en términos de tasa metabólica, niveles de reservas energéticas y actividad de las enzimas del metabolismo intermedio.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en condiciones semi-estáticas (con renovación del medio) de acuerdo a los procedimientos estandarizados recomendados por la American Public Health Association (APHA, 2005), y comprendió una duración de 60 días. El fotoperíodo en la sala de experimentación se estableció en 14:10 (luz: oscuridad), la temperatura en los acuarios se mantuvo en 26 ± 1 °C, y el pH en 8,0 ± 0,5, adicionando NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N cuando fue necesario. El oxígeno disuelto fue siempre mayor a 5 mg/L. El agua de dilución utilizada fue agua corriente de red (dureza: 80 mg/L como equivalentes de $CaCO_3$), purificada mediante un sistema de filtros Hidroquil® (Anexo 1).

Tratamientos

Las concentraciones nominales de glifosato ácido ensayadas fueron 10 y 40 mg/L, verificadas como subletales mediante ensayos previos realizados en la misma especie. La solucion madre o "stock" (5 g/L) de glifosato (como ácido, pureza 99,8%; Sigma, Missouri, EEUU) fue preparada semanalmente con agua destilada, disolviendo las cantidades estrictamente necesarias para el ensayo. Las soluciones de ensayo se prepararon a partir de la adición de las alícuotas necesarias de la solución madre al agua de dilución, a fin de alcanzar 10 y 40 mg/L de glifosato. De cada concentración y del control, se tomaron muestras de 15 mL (por duplicado) a 0 y 48 hs (justo antes del recambio del medio) a fin de determinar la concentración real de glifosato. El análisis se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando un cromatógrafo DIONEX DX-100 (Sunnyvale, CA) con un detector de conductividad y un bucle de muestra de 25 mL, en una columna analítica DIONEX AS-4 con una mezcla de NaOH / Na_2CO_3 (4 mM / 9 mM)

como eluyente con una velocidad de flujo de 2 mL / min (determinado en el INQUIMAE, FCEN-UBA, de acuerdo a Di Fiori *et al.,* 2012).

Animales

Se trabajó con un stock de 36 juveniles independizados de *C. quadricarinatus* (1,28 ± 0,06 gr de peso), eclosionados a partir de tres hembras ovígeras y mantenidos en condiciones de laboratorio. A cada tratamiento y al control se le asignaron 12 organismos al azar. Cada juvenil se aisló en un recipiente de vidrio de 13 cm de diámetro conteniendo 400 mL de agua de dilución con la alícuota correspondiente de solución madre, según el tratamiento. En todos los casos se colocó dentro de los frascos un tubo de PVC (1,9 cm de diámetro) y una red plástica como refugio. La solución de todos los recipientes se reemplazó completamente tres veces por semana, y los individuos fueron alimentados durante las 4hs previas al recambio del medio, con alimento balanceado estandarizado para juveniles de *C. quadricarinatus* (Chaulet *et al.,* 2008), cuya composición se detalla en el Anexo 2. Se complementó la alimentación con hojas frescas de *Elodea* sp., luego del recambio del medio.

Variables analizadas

- **Mortalidad y eventos de muda**

Se registraron diariamente la mortalidad y los eventos de muda. Al finalizar el ensayo, se registró el peso de los juveniles en una balanza digital (Ohaus, precisión: ± 0,01 mg) y se midió con calibre (precisión: ± 0,02 mm) el largo del cefalotórax, desde el extremo del rostrum hasta el borde posterior del caparazón. Además, se calcularon los siguientes índices**:**

1) Ganancia en peso (GP) = (peso final/ peso inicial) x 100

2) tasa específica de crecimiento (TEC) = ((ln (peso final) – ln (peso inicial))/ t) x 100

Donde t: duración del ensayo en días (60)

- **Consumo de oxígeno**

A fin de estimar la tasa metabólica, dos días antes de finalizar el ensayo se midió el consumo de oxígeno en 8 animales por tratamiento, elegidos al azar. Para esto, cada langosta se inmovilizó dentro de una pequeña jaula plástica, ubicando al conjunto dentro de una cámara completamente llena de agua dulce declorada a 22 °C. Para lograr que la concentración de oxígeno se mantuviese homogénea en toda la cámara, se colocó un magneto en el fondo de la misma, ubicando a todo el dispositivo sobre un agitador magnético. Luego de colocar al animal dentro del dispositivo (Figura 19), se procedió a registrar el consumo de oxígeno durante 15 minutos, a volumen constante, mediante un sensor de oxígeno disuelto (Pasco® Xplorer GLX). La tasa de consumo de oxígeno se calculó a partir de la pendiente (con signo positivo) de la regresión de los μgO_2 remanentes en la cámara en función del tiempo (minutos), y se expresó por gramo de peso corporal.

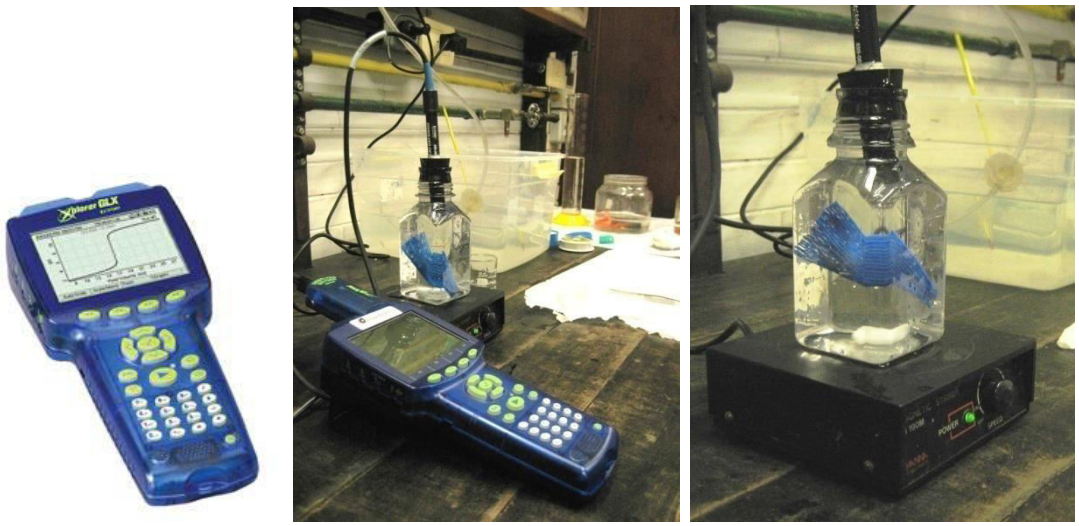


Figura 19. Dispositivo utilizado para la determinación del consumo de oxígeno en juveniles tempranos de *C. quadricarinatus.*

- **Reservas energéticas**

Al finalizar el ensayo se determinaron los niveles de glucógeno, lípidos y proteínas en el músculo y el hepatopáncreas; mientras que en hemolinfa se determinó glucosa, a partir de muestras extraídas desde la base del 4º ó 5º par de patas, utilizando jeringas de tuberculina con agujas 29G.

Extracción y medición de glucógeno

Para extraer el glucógeno se usó el método de Van Handel (1965): se colocó cada fragmento de tejido, con un peso de 40 a 80 mg, en un tubo de ensayo al cual se agregaron 0,4 mL de KOH 30%. Luego, se incubaron los tubos tapados en baño térmico a 100 °C durante 2 horas. Una vez retiradas la muestras del baño y enfriadas, se les agregaron 2 gotas de Na_2SO_4 saturado, agitando con vortex; el Na_2SO_4 precipita el glucógeno. Posteriormente, se agregaron 0,9 mL de etanol a cada tubo, se centrifugó durante 10 minutos a 3.500 rpm y se descartó el sobrenadante dejando escurrir los tubos boca abajo sobre papel secante (este paso se repitió dos veces más). Para el dosaje del glucógeno, se resuspendió el precipitado en 0,3 mL de agua bidestilada, y luego se tomó de cada muestra 0,1 mL a los que se les adicionó 0,1 mL de HCl 4N. De esta manera, el HCl hidroliza el glucógeno en moléculas de glucosa. Utilizando un patrón de glucógeno se preparó una curva de calibración. Tanto la curva como las muestras fueron neutralizadas con Na_2CO_3; a continuación, se cuantificó la concentración de glucosa tanto en los tejidos como en las muestras de hemolinfa utilizando un método enzimático (kit Wiener Laboratories), midiendo en espectrofotómetro Zeiss MQII a 505 nm.

Extracción y medición de lípidos

Los lípidos totales se extrajeron usando el método de Folch *et al.* (1957): se pesaron los fragmentos de tejido y se homogeneizaron manualmente adicionando (bajo campana) una mezcla de cloroformo: metanol (2:1), según el peso del fragmento. Los homogenatos se mantuvieron en tubos de vidrio durante 24 hs en heladera, tapados con parafilm y aluminio; posteriormente, cada muestra fue filtrada, con embudo y papel de filtro, y recolectada en tubos graduados para la medición del volumen resultante. Luego, se agregó solución fisiológica fría (cloruro de sodio 0,9%) en una relación 1:5 (v/v) con respecto al volumen resultante. A continuación, las muestras se agitaron con vortex y se centrifugaron durante 10 minutos a 2.000 rpm. La fase superior se descartó con pipeta Pasteur de vidrio y nuevamente se registró el volumen resultante. Se agregó solución fisiológica en la proporción adecuada y se repitieron los últimos tres pasos, pero sin descartar la fase superior. Los tubos fueron tapados con film y aluminio, y guardados en heladera por 24 hs. Transcurrido este tiempo, se retiró la fase superior con pipeta Pasteur de vidrio y se tomaron 20 µL de cada muestra para realizar el dosaje y la cuantificación de lípidos totales por el método de Frings y Dunn (1970). Para ello, se agregó a cada muestra 1 mL de ácido sulfúrico, mezclándose suavemente y llevando a 100 °C en baño térmico durante 10 minutos; luego se enfriaron los tubos en agua con hielo hasta temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron a todos los tubos 2,5 mL de vainillina (0,016 M + fosfato diácido monosódico 0,04 M). El grupo sulfato forma un complejo con la vainillina (sulfofosfovainillina) que da color; la absorbancia de las muestras se midió en espectrofotómetro Zeiss MQII a 530 nm y se utilizó aceite de oliva como patrón para realizar la curva de calibración.

Extracción y medición de proteínas

La extracción de proteínas se realizó con la adición de KOH 30% a cada muestra, incubando durante 2 horas a 100 °C. La concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando albúmina bovina como patrón. Para la determinación, se prepararon tres reactivos: "Reactivo C" (50 mL de Reactivo A + 1 mL de Reactivo B), "Reactivo B" (1 mL de tartrato de sodio y potasio 2% + 1 mL de sulfato cúprico 1%) y "Reactivo A" (20 gr de Na_2CO_3 + 1000 mL de NaOH 0,1N). Siguiendo el protocolo propuesto por Lowry *et al.* (1951), se adicionaron 2 mL del Reactivo C en todos los tubos y luego de 10 minutos a temperatura ambiente se agregaron 0,2 mL de Folin (1N) y se agito con vortex (las muestras comienzan a tener un color azulado). Luego de 30 minutos a temperatura ambiente, la absorbancia de cada muestra fue medida a 650 nm, en espectorfotómetro Zeiss MQII.

- **Enzimas**

Actividad enzimática en hemolinfa, músculo abdominal y hepatopáncreas

Al finalizar el ensayo, se utilizó una técnica de punto final para medir la actividad enzimática específica (expresada como Unidades/mg de proteínas) de la piruvato quinasa (PYK por sus siglas en inglés) y de la lactato deshidrogenasa (LDH) en músculo abdominal y hepatopáncreas. Ambos tejidos fueron extraídos de juveniles previamente anestesiados en frío. Para esto, los tejidos se pesaron y se homogeneizaron utilizando un homogeneizador motorizado teflón-vidrio Precytec (1500 rpm) en KCl 0,154 M (1:5 p/v), agregando fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM y benzamidina 0,2 mM como inhibidores de proteasas. Los homogenatos se centrifugaron en una microcentrífuga

refrigerada Herlmle, modelo Z216 a 20.000xg y el sobrenadante resultante se utilizó inmediatamente para medir la actividad de dichas enzimas.

La enzima LDH promueve la reducción del piruvato a lactato utilizando como agente reductor NADH. El método espectrofotométrico para medir la actividad de LDH (utilizando el método de Schiedek, 1997) se basa en el monitoreo de la disminución de NADH cuyo pico de absorbancia es a 340 nm. Una unidad de LDH fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de un micromol de piruvato por minuto, es decir, el consumo de un micromol de NADH por minuto. Teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar del NADH es de 6,22 mM^{-1} cm^{-1}, se obtuvieron las unidades de LDH totales por mililitro de muestra.

La enzima PYK promueve la transformación del fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato con liberación de ATP. El piruvato se detectó por medio de una reacción colorimétrica con dinitrofenil hidracina (DNPH), que en un medio básico forma un complejo coloreado (piruvato-DNPH) cuyo pico de absorbancia se observa a 505 ± 15 nm. La actividad PYK se evaluó mediante un nuevo protocolo que combina el método de Bücher y Pfleiderer (1955) y el de Reitman y Frankel (1957). Para esto se preparó un volumen total de 200 µL de una mezcla que contenía solución *buffer* Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), ADP 0,23 mM, $MgSO_4$ 8 mM, KCl 75 mM y fosfoenolpiruvato (PEP) 0,2 mM, añadiendo por último el homogenato conteniendo PYK. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de DNPH para obtener una concentración de 0,78 mM. Luego de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió NaOH hasta alcanzar una concentración de 2,7 M. En paralelo, se realizó una curva de calibración utilizando como solución estándar piruvato a diferentes concentraciones. Se midió la absorbancia de las muestras y de la curva de calibración a

490 nm. Definimos una unidad PYK como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un micromol de piruvato por hora.

Por último, al finalizar el ensayo se determinó en todos los individuos sobrevivientes la actividad alanina y aspartato aminotransferasa (ALAT y ASAT respectivamente) en muestras de hemolinfa, siguiendo el método cinético de Reitman y Frankel (1957) con 30 minutos de incubación, midiendo la absorbancia del complejo piruvato-DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) a 490 nm. Debido a que la ASAT es una enzima citosólica y mitocondrial presente en todos los tejidos, y la ALAT es una enzima que principalmente se expresa en el hígado (o hepatopáncreas), se considera al cociente ASAT/ALAT como indicador de daño tisular generalizado (Mayer *et al.,* 1992).

Las mediciones enzimáticas mencionadas se realizaron en colaboración con la Dra. Anabella Fassiano (IQUIBICEN-CONICET).

Análisis de datos

Para evaluar los resultados obtenidos de las variables medidas entre los diferentes grupos experimentales y el control se realizaron ANOVAs de una vía seguidos por contrastes múltiples LSD. Cuando fue necesario, se realizó una transformación logarítmica de los datos para obtener homogeneidad de varianzas. Tanto la proporción de individuos que murieron como los que mudaron fueron comparadas mediante el test exacto de Fisher (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS

La validación de las concentraciones nominales de glifosato utilizadas en el ensayo, se muestran en la Tabla 1. No se encontraron variaciones entre las concentraciones de glifosato medidas inicialmente y las medidas previamente al recambio del medio. En la misma tabla, se resumen los porcentajes de mortalidad y los eventos de muda registrados. Se registró una mortalidad significativamente mayor ($p<0,05$) a la concentración más alta, con respecto al control. No se observaron diferencias ($p>0,05$) en los porcentajes de muda.

Tabla 1. Validación de las concentraciones nominales de glifosato ácido (promedio de t= 0 + t= 48 ± ES). Ni: número inicial de hembras. Nf: número final de hembras. Porcentaje de mortalidad y eventos de muda registrados según el tratamiento, luego de 60 días de exposición. Todos los valores se refieren al promedio ± error estándar. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control ($p<0,05$).

Concentración nominal (mg/L)	Concentración medida (mg/L)	Ni	Mortalidad (%)	Muda (%)		Nf
				1er muda	2da muda	
0 (control)	0	12	0	91,67	33,30	12
10	9,03 ± 0,03	12	16,7	75,00	16,70	10
40	40,13 ± 8,83	12	33,30*	75,00	50,00	8

Al evaluar el crecimiento de los juveniles al término del ensayo, el largo del cefalotórax no mostró diferencias significativas ($p>0,05$) entre los tratamientos (promedio general= 21,61 ± 0,36 cm, N=30). Por el contrario, el crecimiento somático sí se vio afectado, ya que se registró una menor ganancia en peso al finalizar el ensayo en los juveniles expuestos a 40 mg/L de glifosato, en comparación con el control (Figura 20).

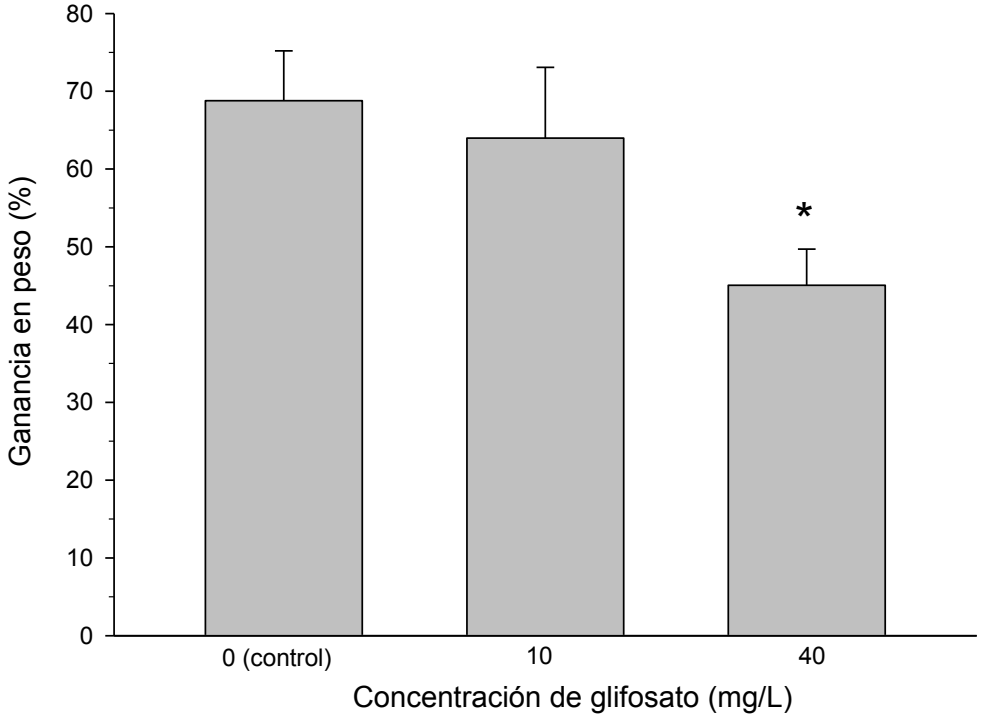


Figura 20. Porcentaje de la ganancia en peso luego de 60 días de exposición a los distintos tratamientos. Todos los valores están representados como el promedio ± error estándar. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control ($p<0,05$).

La Figura 21 muestra la tasa metabólica medida en los últimos días del ensayo. Se observó un leve aumento en los individuos expuestos a la concentración 10 mg/L, así como un leve descenso a 40 mg/L, aunque en ningún caso las diferencias fueron significativas ($p>0,05$) con respecto al control.

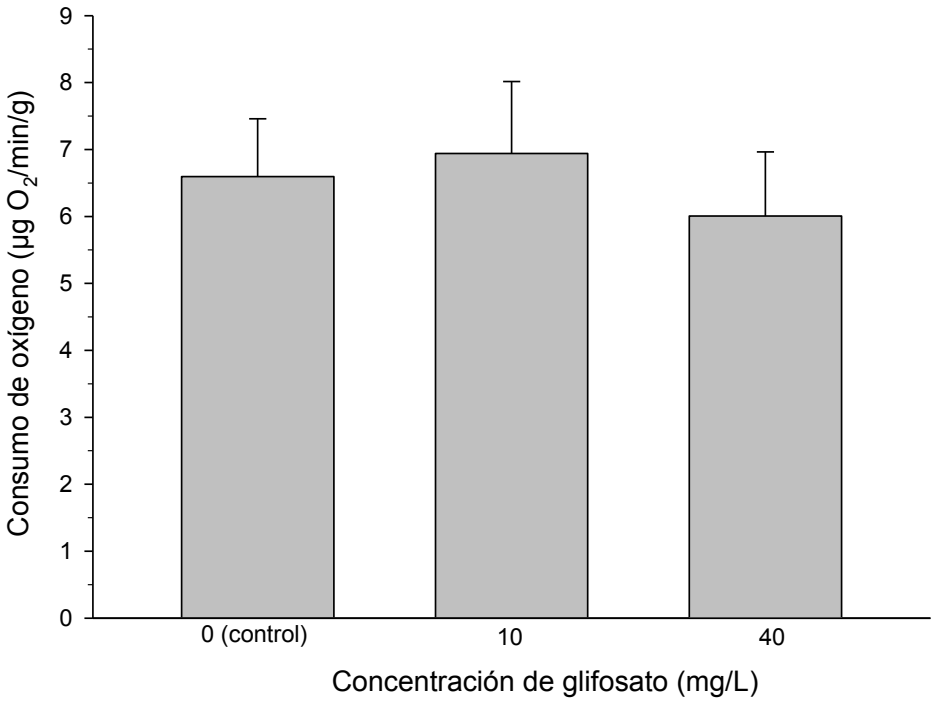


Figura 21. Consumo de oxígeno (µg O_2/min*g) estimado dos días antes de la finalización del ensayo. Todos los valores están representados como el promedio ± error estándar.

En correlación con el descenso de la ganancia en peso registrado en los individuos tratados, se observó también un descenso significativo en el contenido de proteínas totales en músculo, a 40 mg/L, y en hepatopáncreas a ambas concentraciones ensayadas (Figuras 22 y 23). Además, el contenido de lípidos totales en músculo para los individuos tratados con 40 mg/L de glifosato fue significativamente menor en comparación con el control ($p<0,05$) (Figura 22). El contenido de glucógeno hepatopancreático aumentó significativamente ($p<0,05$) a la concentración más alta de glifosato.

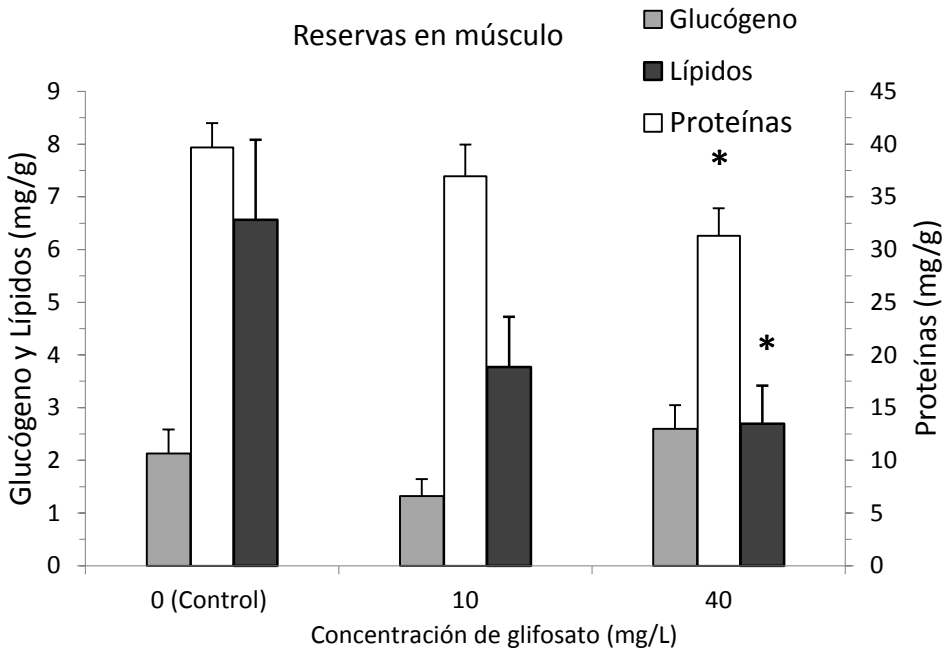


Figura 22. Concentración de glucógeno, lípidos y proteínas totales en músculo (mg/g de tejido) al finalizar el ensayo. Todos los valores están representados como el promedio ± error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto al control.

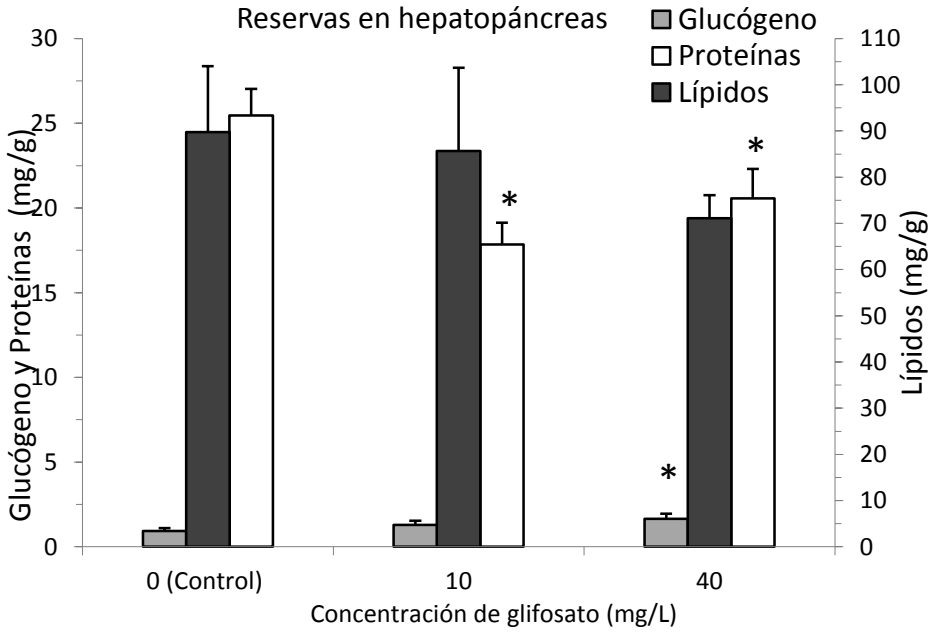


Figura 23. Concentración de glucógeno, lípidos y proteínas totales en hepatopáncreas (mg/g de tejido) al finalizar el ensayo. Todos los valores están representados como el

promedio ± error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto al control.

Con respecto a la glucosa en hemolinfa, si bien la concentración más alta de glifosato ensayada mostró una disminución con respecto al control, este descenso no resultó ser estadísticamente significativo ($p>0,05$) (Figura 24).

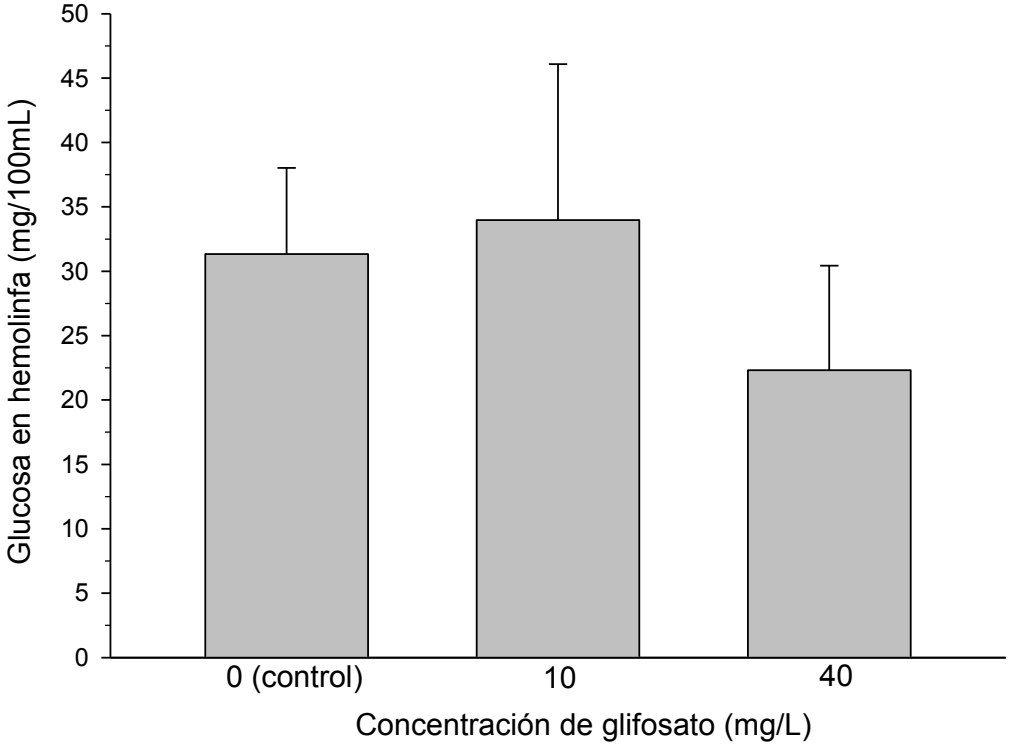


Figura 24. Niveles de glucosa en hemolinfa (mg/100 mL) al finalizar el ensayo (día 60). Todos los valores están representados como el promedio ± error estándar.

La actividad de PYK muscular fue significativamente menor en los organismos expuestos a 10 mg/L, con respecto al control ($p<0,05$) (Figura 25). Sin embargo, no se encontraron en el hepatopáncreas diferencias significativas en la actividad de dicha enzima.

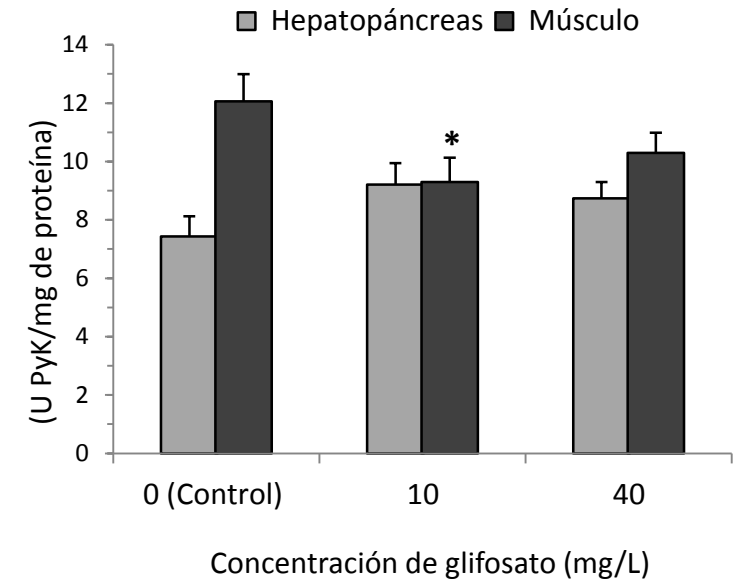


Figura 25. Actividad de piruvato kinasa (PyK, Unidades/mg de proteína) en músculo abdominal y hepatopáncreas al finalizar el ensayo. Todos los valores están representados como el promedio ± error estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto al control.

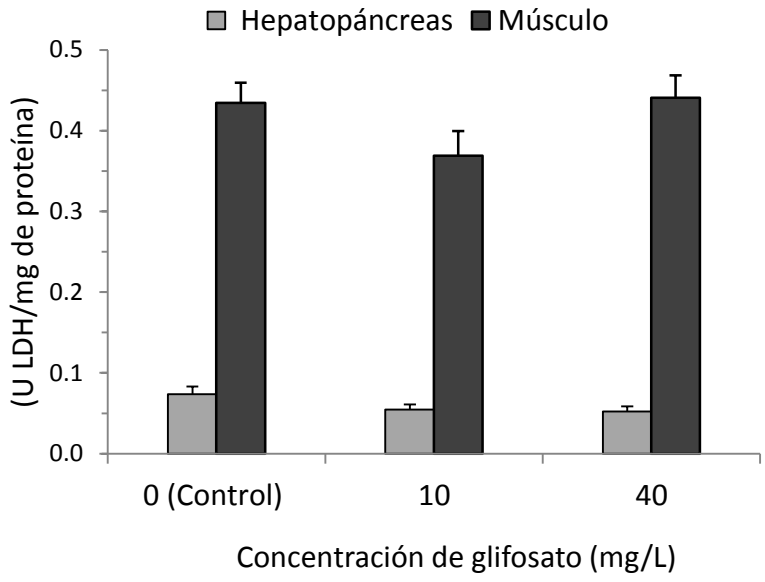


Figura 26. Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH, Unidades/mg de proteína) en músculo abdominal y hepatopáncreas al finalizar el ensayo. Todos los valores están representados como el promedio ± error estándar.

En cuanto a la actividad de LDH, se observó un incipiente descenso en el hepatopáncreas, aunque en ninguno de los tejidos se registraron diferencias significativas entre las concentraciones de glifosato y el control (Figura 26).

El cociente ASAT/ALAT calculado a partir de la actividad de ambas enzimas medidas en hemolinfa, resultó ser significativamente más alto ($p<0,05$) a la concentración de 40 mg/L de glifosato ácido, en relación con el control (Figura 27).

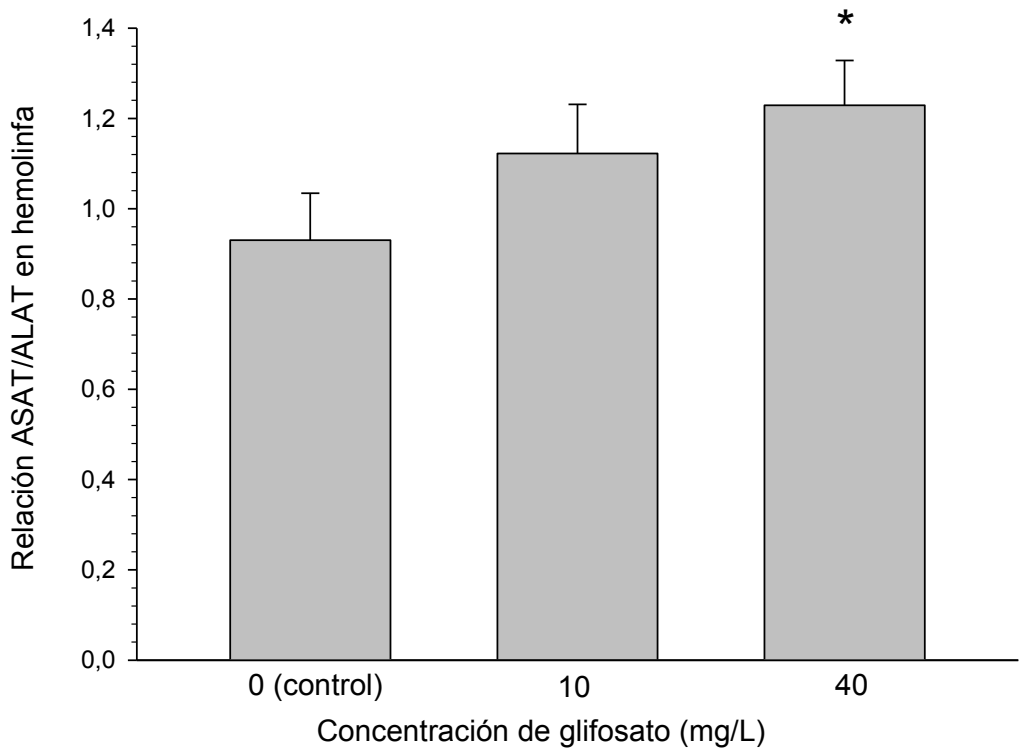


Figura 27. Proporción ASAT/ALAT al finalizar el ensayo. Todos los valores están representados como el promedio ± error estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto al control.

DISCUSIÓN

Como se ha mencionado en la introducción, *C. quadricarinatus* es un crustáceo de importante valor comercial, que actualmente se cría en numerosos países (FAO, 2008; Frontera *et al.,* 2011). En la Argentina, la cría de esta especie, y particularmente el engorde de los juveniles, se realiza en piletones externos excavados en la tierra, en campos con alta actividad agrícola o cercanos a ellos. Por este motivo, es elevada la probabilidad de que estos piletones se encuentren bajo la influencia de los plaguicidas utilizados en la práctica agrícola. Conociendo los antecedentes del efecto del glifosato sobre los juveniles avanzados (Frontera *et al.,* 2011), decidimos evaluar el efecto del herbicida sobre el crecimiento de los juveniles tempranos, es decir, sobre los estadíos considerados como más sensibles dentro del ciclo de vida de la especie (Jones, 1997). Tales efectos podrían influir directamente sobre la talla comercial de los organismos expuestos, sin considerar los posibles efectos de bioacumulación.

Las concentraciones de glifosato utilizadas en este ensayo fueron similares a las nominales y se comprobó que no hubo un descenso significativo del herbicida durante el tiempo de exposición, asegurando así una exposición relativamente constante de los juveniles en estudio. La concentración más baja de glifosato ensayada (10 mg/L) fue relativamente cercana a algunas concentraciones ambientales reportadas en nuestro país (Peruzzo *et al.,* 2008). Si bien la concentración más alta evaluada en nuestro ensayo (40 mg/L) supera las reportadas hasta el momento, estaría reflejando una situación extrema, accidental o afectada por condiciones climáticas desfavorables. A esta concentración, nuestros resultados evidenciaron un cierto efecto sobre la supervivencia de los juveniles ya que se registró una mortalidad de hasta un 33% al finalizar los 60 días de exposición.

Se sabe que los crustáceos deben mudar para incrementar su tamaño, y alcanzar así su talla máxima y su madurez sexual cuando son adultos. Los resultados del presente trabajo no permiten inferir un efecto directo del contaminante ensayado sobre el evento de muda en esta especie, ya que la mayoría de los individuos mudaron al menos una vez. En este sentido, se ha reportado que los juveniles del cangrejo azúl (*Callinectes sapidus*) expuestos a Roundup, hace que muden con frecuencia y sean particularmente sensibles a este y otros plaguicidas presentes en los estuarios, provocando una reducción en el tiempo de duración de las intermudas larvales y consecuentemente un menor tamaño de los organismos (Osterberg *et al.,* 2012).

Nuestros resultados evidencian un claro efecto del glifosato sobre el crecimiento somático ya que la ganancia en peso de los juveniles tratados con 40 mg/L del herbicida ácido fue menor respecto al control, al término del ensayo. Frontera *et al.* (2011) evaluaron también el crecimiento de *C. quadricarinatus,* en juveniles avanzados (4,72 ± 0,61 g) de la misma especie, expuestos durante 50 días a 22,5 mg/L de glifosato ácido, y también observaron una disminución en la ganancia en peso, aunque no fue significativa. Esta diferencia entre ensayos puede deberse a que los juveniles tempranos son más sensibles que los avanzados, tal como se ha visto en otros estudios realizados en la misma especie, en relación a diversas variables ambientales (Jones, 1997; Barki y Karplus, 2004). Por otra parte, cabe aclarar que la menor ganancia en peso registrada en los organismos expuestos al contaminante en el presente ensayo no se puede adjudicar a una menor ingesta de alimento. Esta posibilidad fue descartada en un ensayo posterior, realizado en iguales condiciones experimentales, en el que se evaluó el consumo de alimento y no se

registraron diferencias significativas entre los tratamientos (Anexo 3). En consecuencia, la menor ganancia en peso causada por el glifosato, estaría relacionada con sus efectos a nivel metabólico.

La tasa metabólica estimada a partir del consumo de oxígeno es un parámetro que se utiliza como indicador de desequilibrio metabólico en los organismos expuestos a contaminantes (McKenzie *et al.,* 2007). Ante esta situación, se espera *a priori* un incremento de la tasa metabólica, asociada a un aumento en la utilización de reservas energéticas, para poder afrontar el estrés generado (Sokolova *et al.,* 2012). En cangrejos estuariales, se reportó un aumento en el consumo de oxígeno ante la exposición, tanto aguda como crónica, al insecticida paratión y al herbicida 2,4-D (Rodríguez y Monserrat, 1991). Sin embargo, Frontera *et al.* (2011) registraron una disminución en el metabolismo aeróbico de los juveniles avanzados de *C. quadricarinatus* expuestos a 22,5 mg/L de glifosato, que los autores proponen podría estar relacionado con algún tipo de arresto metabólico producto de una inhibición enzimática. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en el consumo de oxígeno medido en los organismos al finalizar el ensayo, si bien se observó un incipiente descenso para el tratamiento con 40 mg/L. No podemos descartar del todo la posibilidad de que tal descenso haya estado atenuado por un aumento de la tasa metabólica debido a la manipulación de los animales, previa a la medición, aún con las precauciones tomadas al respecto; en este sentido, la tasa metabólica ha mostrado ser muy dependiente de factores tales como el estrés agudo (Randall *et al.,* 2002). En este sentido, es importante destacar también que la medición de consumo de oxígeno se realizó entre los 57 y 58 días de exposición, dando tiempo a que

se recuperaran del estrés generado por la medición, antes de extraer las muestras para medir reservas energéticas y actividad enzimática, al día 60 del ensayo.

Se observó una disminución significativa tanto en las reservas energéticas como en la actividad de la piruvato kinasa muscular, enzima indicadora de la utilización de energía a nivel celular. El hecho de que se haya detectado una disminución tanto en las reservas energéticas como en las enzimas del metabolismo intermedio (y en menor medida, de la tasa metabólica) podría parecer contradictorio. Sin embargo, debemos interpretar estos resultados dentro del contexto del síndrome de estrés descripto inicialmente por Seyle (Mayer *et al.,* 1992). Esto implica la existencia de tres fases sucesivas: la fase de alarma, la de resistencia y finalmente la fase de agotamiento. Durante la fase de resistencia, el organismo trata de adaptarse a la presencia del estresante, invirtiendo una cantidad extra de energía para hacerle frente; en el caso de un xenobiótico, se ponen en juego sistemas de detoxificación que requieren de una inversión energética específica, y que, colateralmente, restan energía para los procesos de crecimiento y reproducción. De persistir el estímulo estresante, puede llegarse a la fase final de agotamiento y colapso, en la cual disminuyen tanto la producción como la demanda de energía para distintos procesos (Sokolova *et al.,* 2012). En este contexto, es esperable que a comienzos y mediados del ensayo realizado se haya consumido una cierta proporción de las reservas energéticas, a una tasa metabólica elevada, y que hacia el final del ensayo la producción de energía ya esté disminuida o arrestada, en correspondencia con la fase de agotamiento.

En *C. quadricarinatus*, tanto proteínas como lípidos han sido identificados como las principales reservas para el crecimiento o la reproducción (Ghanawi y Saoud, 2012). En nuestro ensayo, el descenso en la ganancia en peso registrado en los organismos tratados se vio acompañado por un menor contenido de lípidos y proteínas totales, tanto en músculo como en hepatopáncreas, en detrimento de la energía disponible para el crecimiento somático de estos juveniles. El contenido de lípidos también disminuyó en isópodos expuestos a glifosato y otros plaguicidas tales como el endosulfán y el paratión, debido a su uso como reserva de energía, junto con el glucógeno (Dutra *et al.,* 2011). Además, se observó que varios crustáceos movilizan proteínas en situaciones de estrés por inanición; en relación con esto, el hepatopáncreas de los crustáceos es capaz de activar la gluconeogénesis a partir de proteína muscular como sustrato para elevar la glucemia y así afrontar una mayor demanda metabólica (Sánchez-Paz *et al.,* 2006).

En cuanto a la glucosa, cabe aclarar que sus niveles en hemolinfa son variables, dependiendo el estadio de muda, el estrés, la actividad, el estadio de reproducción, la inanición y la temperatura de aclimatación a la cual se encuentran los organismos (Chang y O'Connor, 1983). Es importante tener en cuenta que la regulación de la glucemia está dada por lo niveles circulantes de la hormona CHH, secretada por los pedúnculos oculares (Santos y Keller, 1993). Como consecuencia, la hemolinfa funciona como un sitio de almacenamiento transitorio para la glucosa. El glucógeno puede almacenarse en los hemocitos, aunque los principales tejidos de reserva son el hepatopáncreas y el músculo (Parvathy, 1971). En base a nuestros resultados, en los juveniles tempranos de *C. quadricarinatus* el glucógeno se mantendría como reserva de energía para su inmediata

utilización ante una situación de mayor estrés, como se ha reportado para otros crustáceos (Zhou *et al.,* 2011).

Ribeiro *et al.* (2001) han encontrado un descenso en el contenido de proteínas, en isópodos expuestos a paratión, sugiriendo que se debe a una respuesta fisiológica para compensar el estrés generado por el plaguicida, afrontando la alta demanda energética mediante el catabolismo de las proteínas. En anfípodos expuestos al insecticida carbofurano, Dutra *et al.* (2008; 2009) asociaron la disminución en el contenido de proteínas a un crecimiento más lento de los individuos. De manera similar a lo reportado en crustáceos, se ha descripto tanto en caracoles de agua dulce (Rambabu y Rao, 1994) como en anguilas (Sancho *et al.,* 1998) expuestos a insecticidas organofosforados, que una disminución en el contenido de proteínas podría deberse también a la formación de lipoproteínas utilizadas para reparar tejidos, células dañadas y organelas.

La constancia en la actividad de LDH en ambos tejidos (hepatopáncreas y músculo) indica que la vía anaeróbica no se vio particularmente activada en los organismos expuestos a glifosato, al menos en la ventana temporal considerada y a las concentraciones ensayadas. El descenso en la actividad de PYK en músculo indica que un posible arresto metabólico tuvo lugar en este tejido al término del ensayo, como un posible indicador de que los animales han ingreso a la fase de agotamiento, dentro del cuadro de estrés generado por la exposición crónica al glifosato.

Como se ha mencionado anteriormente, el aumento de la relación ASAT/ALAT en hemolinfa es considerado como indicador de daño generalizado a los tejidos (Mayer *et*

al., 1992). En nuestro ensayo, se vio en los organismos tratados con 40 mg/L un incremento en dicha relación enzimática, evidenciando un efecto del glifosato ácido sobre la integridad celular, y reafirmando así la posibilidad de que los organismos se encuentren en una fase de agotamiento, cercana al colapso, al finalizar el ensayo. El-Shenawy (2009) ha reportado en ratas tratadas con glifosato (ácido y formulado Roundup) un incremento de estas mismas enzimas en sangre, siendo aún mayor el efecto con el formulado. Este autor propone un posible efecto pro-oxidante del glifosato, aumentado en el caso del formulado por la presencia de surfactantes. Dewes *et al.* (2006) encontraron que el daño en el hepatopáncreas puede ser precedido por una baja actividad de LDH, en hepatocitos del cangrejo *N. granulata* expuestos a microcistinas. Este resultado estuvo de acuerdo con los nuestros, ya que se registró un incipiente descenso de LDH en hepatopáncreas, en correlación con el daño celular indicado por el cociente ASAT/ALAT registrado en hemolinfa.

En resumen, el glifosato como principal ingrediente activo en la mayoría de las formulaciones comerciales, provocó una disminución en la ganancia en peso así como en los niveles de lípidos y de proteínas. Estos efectos habrían ocurrido durante la fase de resistencia al estrés generado por el glifosato, sobre los juveniles tempranos. Por otra parte, la menor actividad enzimática (de PYK) detectada en músculo hacia el final del ensayo, junto con la presencia de enzimas citósolicas en la hemolinfa, estaría indicando una cierta depresión metabólica asociada a la fase final de agotamiento, dentro del cuadro de estrés crónico asociado al herbicida en estudio.

CAPÍTULO 2

Efectos del glifosato sobre la maduración y remaduración ovárica en el cangrejo de estuario *Neohelice granulata*

Hipótesis

a) *El glifosato, tanto ácido como formulado, reduce la ganancia en peso de hembras adultas durante la maduración ovárica (periodo pre-reproductivo).*

b) El glifosato, tanto ácido como formulado, produce un desbalance en el proceso de madurez gonadal (tanto en la fase de maduración inicial como en la remaduración), alterando la proporción oocitaria normal y disminuyendo el tamaño de los oocitos en la fase de vitelogénesis, mediante algún tipo de interferencia endocrina.

c) El glifosato produce efectos histopatológicos en gónadas.

OBJETIVO

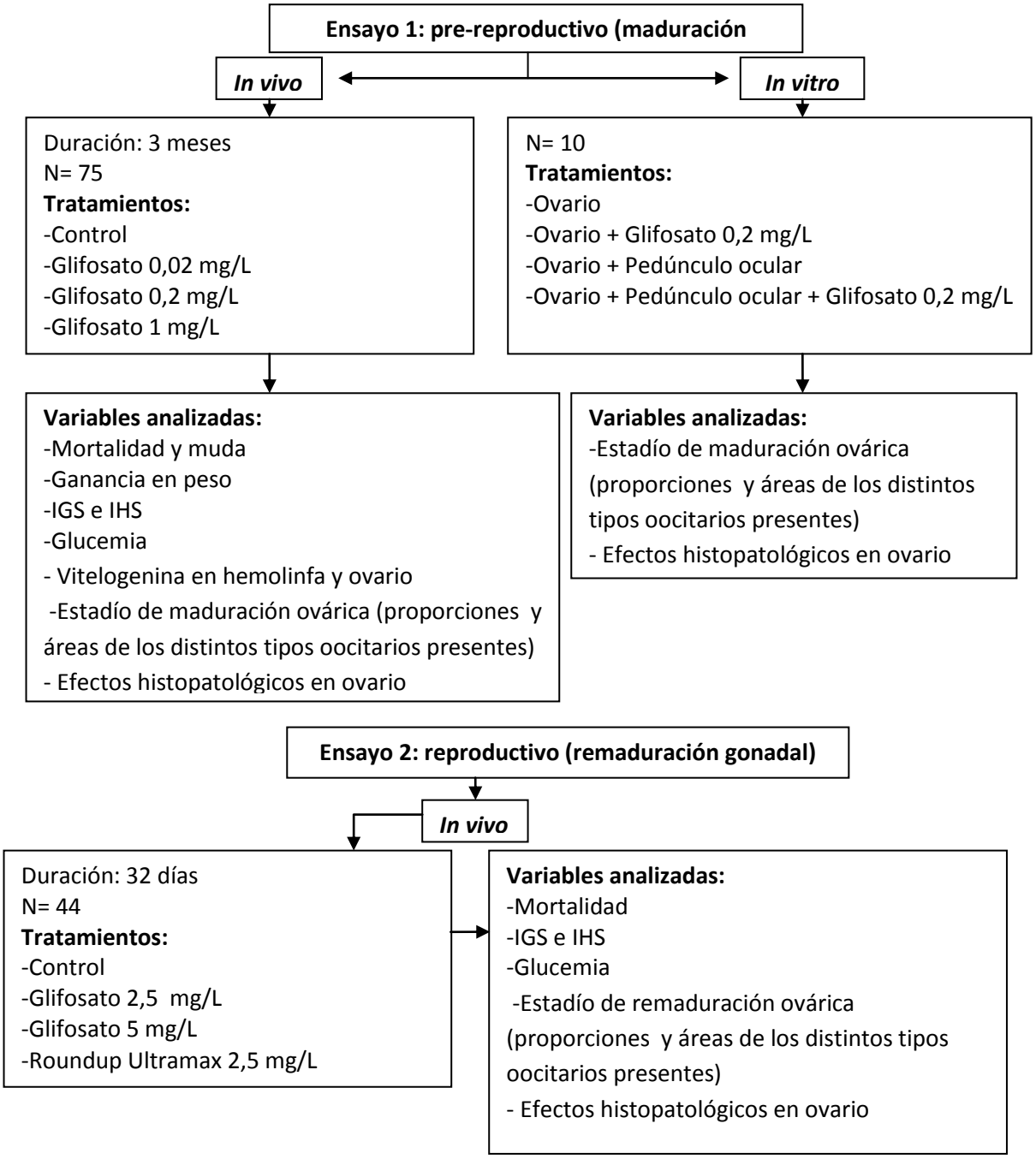
Determinar los efectos subletales de glifosato sobre el potencial reproductivo de hembras adultas de *N. granulata*, evaluando los efectos a nivel gonadal y sobre la condición general de los reproductores.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Evaluar los efectos subletales de glifosato durante el período pre-reproductivo (invierno), en el cual el ovario crece hasta alcanzar la maduración necesaria para la primera puesta, determinando las siguientes variables:
   a) Ganancia en peso
   b) Grado de madurez ovárica (proporción y tamaño de los tipos oocitarios)
   c) Efectos histopatológicos en el ovario
   d) Niveles de vitelogenina y vitelinas presentes tanto en el ovario como en la hemolinfa
   e) Glucemia en hemolinfa

2) Evaluar el grado de madurez ovárica y los efectos histopatológicos durante la fase de remaduración ovárica, que tiene lugar en el período reproductivo luego de la puesta inicial de huevos.

A fin de facilitar la lectura para la comprensión del presente capítulo, se anexa el siguiente esquema de contenido.



MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos ensayos a fin de probar las hipótesis planteadas, con animales en los siguientes estadios:

Ensayo 1) período pre-reproductivo / **maduración ovárica**. El muestreo se realizó en el mes de Junio.

Ensayo 2) período reproductivo / **remaduración ovárica**. En este caso se utilizaron hembras inicialmente ovígeras, con huevos inmaduros. El muestreo se realizó a mediados de Octubre.

Metodología general (común a ambos ensayos)

Los ensayos se realizaron en condiciones semi-estáticas (con renovación del medio cada 72 hs) de acuerdo con los procedimientos estandarizados, recomendados por la American Public Health Association (APHA, 2005). Como agua de dilución, se utilizó agua salina preparada a partir de sales para agua de mar artificial (Tetra Marine Salt Pro, EEUU) en agua corriente de red declorada (dureza: 80 mg/L como equivalentes $CaCO_3$) y purificada mediante un sistema de filtros Hidroquil®, que incluía la secuencia de los siguientes filtros: lana de vidrio (para material en suspensión), carbón activado (para trazas de compuestos orgánicos) y resina de intercambio iónico (para trazas de metales pesados) (Anexo 1).

Muestreo y aclimatación de animales

Las hembras de *N. granulata* se recolectaron en Punta Rasa (36° 18' 16,5" S -56° 46' 18,6" O), una zona libre de contaminantes de la Bahía de Samborombón (Figura 28), ubicada en el sector externo del estuario del Plata, y se trasladaron en bateas plásticas rectangulares con agua del lugar y aireación hasta el laboratorio (FCEN-UBA). Una vez allí, los animales

fueron dispuestos en bateas plásticas con agua marina artificial a una salinidad acorde para cada ensayo (ensayo 1= 12 g/L; ensayo 2= 30 g/L; N= 15 hembras por batea). Durante el período de aclimatación, se alimentó a las hembras con pellets de alimento balanceado de composición conocida, elaborados en el laboratorio (Chaulet *et al.,* 2012), y hojas frescas de *Elodea* sp.

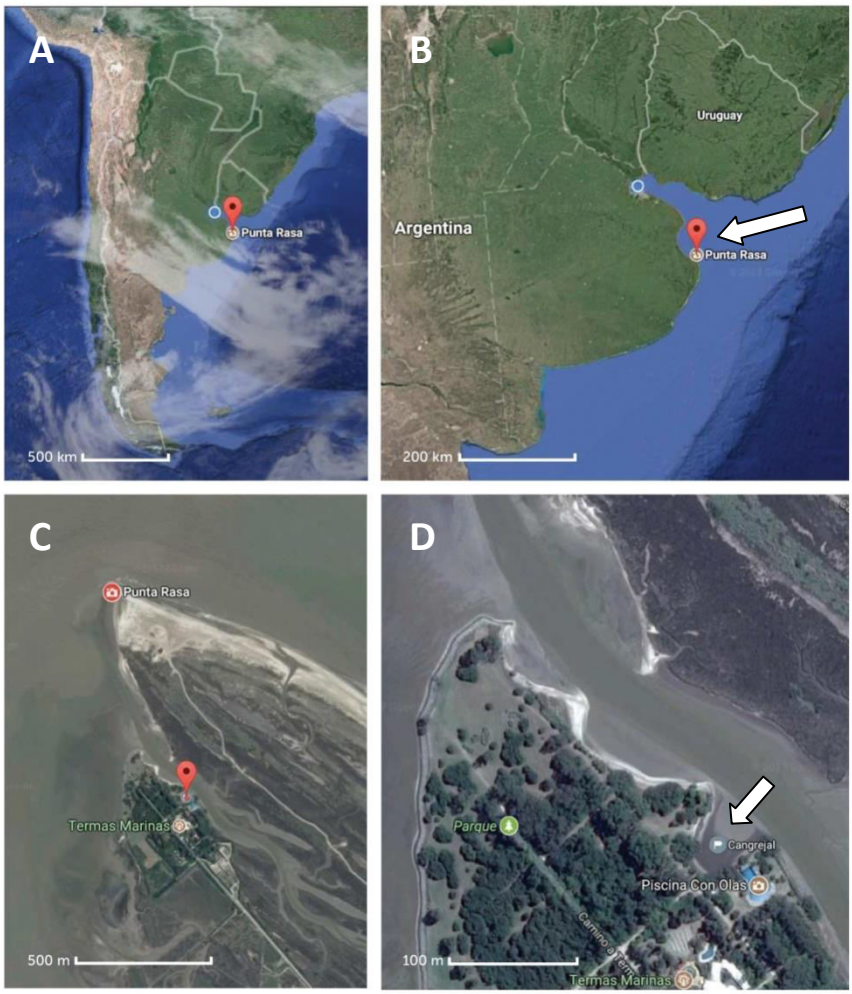


Figura 28. A: Mapa de la República Argentina. B: Mapa de Provincia de Buenos Aires y estuario del Río de la Plata; la flecha indica la Bahía de Samborombón. C: Mapa de Punta Rasa. D: Localización del sitio de muestreo en el cangrejal. Tomado de Google Maps.

Protocolo general de experimentación

Inicialmente, las hembras fueron pesadas en balanza digital (Ohaus, precisión ± 0,01 mg) y se les asignó un tratamiento al azar. Cada hembra se colocó aislada, en un recipiente de vidrio de 13 cm de diámetro (Figura 29) conteniendo un volumen adecuado del agua salina que sirvió como agua de dilución (400 mL de agua a 12 g/L para el ensayo 1, y 500 mL de agua salina a 30 g/L para el ensayo 2). Las diferentes salinidades y volúmenes de solución utilizados en ambos ensayos obedeció a la necesidad de mantener viable el desove de las hembras ovígeras utilizadas en el ensayo 2 (remaduración) (Rodríguez y Medesani, 1994; Medesani *et al.,* 2004b). Se proveyó de aireación constante y se controló periódicamente que el oxígeno disuelto fuera mayor a 5 mg/L. La solución de todos los recipientes se reemplazó completamente dos veces por semana. Los frascos fueron tapados con celofán perforado para evitar el escape de las hembras y/o la posible evaporación del medio. Los individuos se alimentaron durante las horas previas al recambio del medio con los mismos pellets utilizados para el período de aclimatación, en una cantidad equivalente al 5% de la masa corporal, y posteriormente al recambio de la solución se les ofreció *Elodea* sp.

Diariamente se registró la mortalidad y los eventos de muda, así como el pH y la temperatura de la solución. Además, se registró mensualmente el peso de los individuos sobrevivientes.

Figura 29. Vista general y detalle del armado y disposición de los frascos designados a los diferentes tratamientos en el recinto del laboratorio de experimentación.

Tratamientos

a) Preparación de solución stock

Para el ensayo 1, se prepararon semanalmente soluciones madre (o "stock") de glifosato ácido en su forma ácida, pureza 99,8% (Sigma, EEUU), disolviendo en agua bidestilada la cantidad necesaria para obtener una solución madre de concentración acorde a la serie de concentraciones ensayadas, llevando el pH a 8 mediante la adición de NaOH 0,1 N. En el caso del ensayo de remaduración, además de la solución stock de glifosato ácido arriba mencionada, se preparó una solución stock de Roundup Ultramax® (sal monoamónica del N-fosfonometil glicina, en forma de gránulos solubles, 67,9% p/p de equivalentes de glifosato ácido, Monsanto. Argentina). El glifosato (ácido o formulado) se pesó en balanza analítica digital (Ohaus) de precisión ± 0,0001 g, utilizando un agitador magnético para conseguir una buena disolución en agua bidestilada. Las soluciones stock fueron conservadas en la heladera (5 °C) y al resguardo de la luz, para evitar su degradación.

b) Serie de concentraciones ensayadas

Para cada ensayo, se evaluó una serie de concentraciones nominales subletales, seleccionadas de acuerdo a estudios previos realizados en el laboratorio (Frontera *et al.,* 2011). A partir de la solución stock correspondiente, se extrajeron las alícuotas necesarias que se agregaron a los recipientes de ensayo para conseguir la serie de concentraciones deseadas, detalladas en las particularidades de cada ensayo.

Como parte del procedimiento para validar las concentraciones nominales, se tomaron muestras de 15 mL, por duplicado, a t=0 hs (inicial) y t=72 hs (final), es decir, el periodo de renovación del medio en todos los recipientes de ensayo. El método utilizado para analizar las muestras provenientes del ensayo 1 (maduración ovárica) consistió en una derivatización de las muestras a pH= 9 con 9- fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-CL), y luego se midieron las concentraciones de glifosato por cromatografía líquida de alta presión, acoplada a un detector de espectrofotometría de masas Agilent, modelo VL. Se utilizó una columna cromatográfica C_{18} de X-SELECT y se utilizó una mezcla de MeOH: NH_4 (5 mM: 9 mM) como fase móvil, con una velocidad de flujo de 0,5 mL/min (determinado en el CIMA, UNLP). En el caso del ensayo 2 (remaduración ovárica), la concentración real de glifosato en las muestras se determinó mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando un cromatógrafo DIONEX DX-100 con un detector de conductividad y un bucle de muestra de 25 mL. Se utilizó una columna cromatográfica analítica DIONEX AS-4 con un error experimental inferior al 5%. Se seleccionó una mezcla de NaOH / Na_2CO_3 4 mM / 9 mM como eluyente, con una velocidad de flujo de 2 mL/min. La velocidad de disipación de glifosato (k) se estimó usando $C_t = C_0\, e^{(-kt)}$, donde C_t es la concentración en el tiempo t y C_0 es la concentración inicial (determinado en el INQUIMAE, FCEN-UBA).

Variables analizadas en ambos ensayos

- **Ganancia en peso**

Al finalizar cada uno de los ensayos se registró el peso de las hembras sobrevivientes. Con los datos de peso obtenidos se calculó la ganancia en peso (GP) como GP = (peso final/ peso inicial) x 100.

- **Índices Gonadosomático y Hepatosomático**

Al finalizar el ensayo, se anestesió a las hembras en frío y se les extrajo el ovario. El mismo fue pesado y se calculó el índice gonadosomático (IGS) como IGS= (PO/PF) x100, donde PO es el peso húmedo del ovario y PF es el peso final húmedo de la hembra.

Del mismo modo, se extrajo el hepatopáncreas y se calculó el índice hepatosomático (IHS) como IHS= (PH/PF) x100, donde PH es el peso húmedo del hepatopáncreas y PF es el mencionado anteriormente.

- **Glucemia**

Se determinaron los niveles de glucosa circulantes en muestras de hemolinfa. Para esto se siguió la metodología empleada para el mismo fin, descripta en el Capítulo 1 de la presente Tesis.

- **Estadío de maduración/remaduración y efectos histopatológicos en ovario**

Una porción del ovario disecado se fijó en solución acuosa de Bouin durante 4 hs a temperatura ambiente y luego fue preservado en alcohol al 70% para su posterior inclusión y análisis histológico. Para realizar los preparados histológicos a partir de muestras previamente fijadas, se prosiguió con la deshidratación mediante el pasaje por una serie de alcoholes (70% v/v nuevo; 90% v/v; 96% v/v), luego alcohol 96%: xilol (1:1 v/v) y finalmente xilol puro. Luego de la deshidratación se pasó a xilol:parafina para ser incluido finalmente en Paraplast®, tallándose luego los tacos definitivos. Posteriormente,

se realizaron en ultramicrótomo cortes de aproximadamente 5 a 8 µm de espesor, que se montaron en portaobjetos. Luego, se los hidrató progresivamente en agua destilada y se realizó la coloración con hematoxilina de Carazzi. Luego de un lavado, se colocaron los preparados en eosina alcohólica iodada (0,25% en ROH 70%), se lavaron nuevamente y se deshidrataron finalmente con alcohol 90% y 100%. Se dejaron secar bajo campana y se montaron utilizando bálsamo de Canadá sintético. Como resultado, se observó el núcleo celular de color violeta y el citoplasma rosado.

A fin de determinar bajo microscopio el estadío de remaduración ovárica, se examinaron tres secciones representativas del ovario de cada animal, para determinar las proporciones relativas de los oocitos normales y anormales. Los oocitos se caracterizaron como previtelogénicos, intermedios o vitelogénicos según su tamaño y grado de basofilia. Para evaluar las proporciones de los diferentes tipos oocitarios, se utilizó una cuadrícula de 100 puntos, montada sobre un lente ocular de 8x combinado con un lente objetivo de 40x. Para estimar el área de los oocitos, se minimizó el sesgo dado por el nivel de corte, seleccionando sólo aquellos en los cuáles se observaba el núcleo, midiendo el diámetro mayor (M) y menor (m) de hasta 30 oocitos de cada tipo, en las mismas secciones histológicas mencionadas anteriormente. Para la medición de los diámetros, se utilizó una regla micrométrica, calibrada contra una placa Leitz Wetzlar con un espaciado de 1/100 mm. Al igual que en estudios previos (Rodríguez y Medesani, 1994) se calculó el área de los oocitos como (π / 4) x M x m.

Análisis de datos

Para comparar los resultados obtenidos entre los distintos grupos experimentales se utilizaron ANOVAs de una vía seguidos por contrastes múltiples (LSD), utilizando transformación angular o logarítmica de los datos cuando fue necesario. Las proporciones de mortalidad y muda fueron comparadas por el test exacto de Fisher (Sokal y Rohlf, 1981).

Metodología particular utilizada para cada ensayo

-Ensayo 1: maduración ovárica (período pre-reproductivo)

Ensayo *in vivo*

El ensayo duró 3 meses (24-6 al 24-9) y se utilizaron 75 hembras, previamente aclimatadas durante 2 semanas a las condiciones de laboratorio indicadas en la Metodología General. A cada tratamiento (control inicial, control concurrente o concentración de glifosato) se asignaron 15 hembras al azar, que se colocaron en frascos con un volumen final de 400 mL de agua salina (12 g/L). Se utilizó en este caso una solución stock de glifosato ácido de concentración 4 g/L. Las concentraciones nominales ensayadas fueron 0,02; 0,2 y 1 mg/L de glifosato ácido. La temperatura en los acuarios se mantuvo en 23 ± 1 °C y el fotoperiodo de la sala de experimentación en 12:12 hs (luz: oscuridad).

A fin de evaluar el crecimiento ovárico previo al desove y de reducir la variabilidad biológica asociada a la muda, sólo fueron analizadas las hembras que no quedaron ovígeras ni mudaron en el transcurso del ensayo.

Variable analizada sólo para el ensayo 1 – In vivo

Se empleó la técnica ELISA (Enzyme-linked Imnunosorbent Assay) para determinar el contenido total de proteínas vitelogénicas (Vg: vitelogenina y vitelinas) en muestras de hemolinfa y fragmentos de ovario, expresado como µg/mL y µg/g de tejido, respectivamente. Para estas determinaciones, al finalizar el ensayo se les extrajo a las hembras 100 µL de hemolinfa con jeringa de tuberculina (27G) desde la base del 4º ó 5º par de pereiópodos. Cada muestra fue recogida en un tubo Eppendorf® conteniendo 15 µL de oxalato de potasio al 10% e inhibidor de proteasas PMSF 0,01 mM. Los fragmentos de ovario disectados fueron pesados y homogeneizados en buffer Fosfato de Sodio ($PBNa^+$: 50 mM, pH 7,4 y 2 µL/mL de inhibidor de proteasas PMSF 0,1 mM) en una relación 1:3 (peso/volumen) en un homogeneizador de vidrio con émbolo con punta de teflón. Cada homogenato fue centrifugado a 10.000xg por 25 minutos en centrífuga Eppendorf® 5415D a 4 °C. Finalizada la centrifugación, el pellet fue descartado y el sobrenadante obtenido fue llevado a un volumen final de 5 mL con PBS (1X) y luego ultracentrifugado a 100.000xg (37.000 rpm) durante 50 minutos en ultracentrífuga Beckman® modelo XL-90 con rotor 90Ti, a 4 °C (Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA). Nuevamente, se separó el sobrenadante de cada muestra y, junto con las muestras de hemolinfa, se conservaron en freezer a -70 °C hasta su utilización. En la técnica ELISA desarrollada a continuación, se obtuvo un anticuerpo primario contra Vg nativo inoculando conejos con Vg purificado, según estudios previos (Dreon *et al.,* 2003; García *et al.,* 2008). Se utilizó anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (BIOARS Lab.) como anticuerpo secundario. Se uso VG purificada de ovario de *N. granulata* en una dilución 1/500 para preparar una curva de calibración, utilizando un intervalo de

concentración de la proteína de 0 a 300 ng/uL. Las muestras se diluyeron en *buffer coating* (carbonato de sodio 15 mM, bicarbonato sódico 35 mM, pH = 9,6), se colocaron 50 µL del estándar o de la muestra, por triplicado, en una placa de 96 pocillos (Nunc-Immunoplate Polisorp) y se las incubó durante 90 minutos a 37 °C en cámara húmeda. A continuación, se descartó el excedente de anticuerpo de cada pocillo y se lavaron los pocillos con 300 µL de PBS (1X). Siguiendo el protocolo, se agregaron 300 µL de la solución de bloqueo al 6% (PBS 1X, pH 7,4 con leche en polvo descremada). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 2 hs y luego se lavaron secuencialmente con PBS- Tween (20%) 0,05%. Tanto los anticuerpos primarios como secundarios se diluyeron (1/500) en PBS (1X) + 0,05% de Tween + 6% de leche en polvo. Se sembraron 50 µL del anticuerpo primario por pocillo y se incubó toda la noche en cámara fría a 4 °C. Después de ese tiempo, se realizaron lavados sucesivos con PBS- Tween 0,05%, se sembró el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (50 µL) y las placas se incubaron nuevamente en cámara húmeda a 37 °C durante 2 hs. Luego, se realizaron los cinco lavados con PBS-Tween y se colocaron 100 µL de solución de revelado (ácido cítrico 0,1 M, Na_2HPO_4 0,2M, ABTS y H_2O_2 disueltos en agua bidestilada, protegidos de la luz) por pocillo que se dejó actuar durante 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. La reacción colorimétrica se detuvo colocando 50 µL de ácido oxálico 2% en cada pocillo y luego se midió la absorbancia en cada placa a 420 nm, utilizando un lector de placas de ELISA (Optima Fluostar, Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA). A partir de los valores de pendiente y ordenada al origen de la curva de calibración, se transformó el valor de absorbancia obtenido en cada pocillo y se determinó la concentracion de Vg en cada muestra. Cabe destacar que las determinaciones de Vg mediante la técnica ELISA

mencionada se realizó en colaboración con las Licenciadas Ivana Canosa y Gabriela Silveyra, ambas tesistas del laboratorio de Fisiología Animal Comparada.

Ensayo *in vitro*

Durante el mes de junio se realizó un ensayo *in vitro* utilizando hembras del stock y siguiendo la metodología de trabajos previos realizados en el laboratorio (Rodríguez *et al.,* 2002, Zapata *et al.,* 2003, Medesani *et al.,* 2004b, Cahansky *et al.,* 2008; 2011), con el objetivo de evaluar la vía de acción del glifosato.

Cada hembra utilizada fue anestesiada en hielo y luego, utilizando bisturí y pinza de disección, se realizó la disección del ovario. Cada ovario fue fragmentado en al menos cuatro fragmentos de aproximadamente 1 x 0,5 cm, cada uno de los cuales fue asignado a un tratamiento determinado. Estos fragmentos fueron colocados en placas de cultivo estéril de 12 pocillos (Cellstar®, Greiner Bio-one), los cuales se llenaron previamente con 2 mL de medio de cultivo M 199 (Sigma®), disuelto en una solución salina para crustáceos (Cooke *et al.,* 1977) modificada para compensar las sales ya presentes en el medio de cultivo. Como en estudios anteriores (Sarojini *et al.,* 1997, Rodríguez *et al.,* 2000), el medio fue suplementado con penicilina G (100 unidades/mL), estreptomicina (0,1 mg/mL), PMSF (0,1 mM), suero fetal bovino (10% v/v) y EDTA (5% v/v), ajustándose el pH a 7,4 con NaOH 0,5 N.

Se asignaron 10 hembras a cada serie experimental, proporcionando de cada hembra una pieza similar de ovario a cada uno de los cuatro tratamientos (diseño en bloques). Una serie consistió en ovario, ya sea con la adición de glifosato ácido a 0,2 mg/L (una alícuota de 20 µL, a partir de una solución stock concentrada) o sin ella (control); una segunda

serie implicó los mismos tratamientos anteriores, a los que se les añadió una alícuota de homogenato de pedúnculo ocular equivalente a un pedúnculo (50 µL). Para elaborar este último, a cada hembra sacrificada se le ablacionaron ambos pedúnculos oculares en su articulación con el cefalotórax y se eliminó con bisturí la región de las omatidias. Después de diseccionar suavemente la cutícula de cada pedúnculo ocular, se los homogeneizó en frío manualmente, se colocó el homogenato obtenido en un tubo Eppendorf y se realizó una centrifugación a 10.000 xg por 10 minutos a 4 °C. Luego se descartó el pellet y el sobrenadante (extracto de pedúnculo ocular) se asignó a cada uno de los viales correspondientes a ese tratamiento. Los grupos experimentales fueron en consecuencia los siguientes:

1) Ovario (Ctrl): con la alícuota conteniendo el vehículo (agua bidestilada) en el cual se administra el glifosato a los demás tratamientos.

2) Ovario + gli (Glifosato): similar al control, con el agregado de 20 µL de glifosato.

3) Ovario + PO (Pedúnculo ocular): similar al control, con el agregado del equivalente a un pedúnculo ocular.

4) Ovario + PO + gli (Pedúnculo ocular + Glifosato): similar al control, con el agregado del equivalente a un pedúnculo ocular y de 20 µL de glifosato.

Estas placas fueron incubadas durante 24 hs dentro de una cámara de cultivo mantenida a 27 °C, oscuridad constante y con una atmósfera controlada de CO_2 al 5%. Al final del período de incubación, todas las piezas ováricas fueron fijadas y procesadas para su análisis histológico, siguiendo la misma metodología descrita para los ensayos *in vivo*.

-Ensayo 2: remaduración ovárica (período reproductivo)

El ensayo duró 32 días. Tanto al control como a cada tratamiento se asignaron al azar 11 hembras ovígeras (N =44) con huevos inmaduros (color violeta). En este caso, la aclimatación duró solo dos días, a fin de exponer a las hembras desde el comienzo de la remaduración gonadal. Las hembras fueron aisladas de manera individual en frascos con un volumen final de 500 mL de agua salina (30 g/L). Se utilizó en este caso una solución stock de glifosato ácido de concentración 5 g/L. Las concentraciones nominales ensayadas para el glifosato ácido fueron de 2,5 y 5 mg/L, mientras que se utilizó solamente 2,5 mg/L para el tratamiento con Roundup Ultramax®. En este caso, la temperatura en los acuarios se mantuvo en 25 ± 1 °C y el fotoperiodo de la sala de experimentación en 14:10 hs (luz: oscuridad).

Las hembras ovígeras no fueron alimentadas durante el ensayo, ya que las mismas no se alimentan en esa condición (Rodríguez y Medesani, 1994; Medesani *et al.,* 2004b). Luego de la eclosión de los huevos (un promedio de 9,86 ± 0,57 días), las hembras continuaron siendo expuestas hasta completar los 32 días de exposición a los mismos tratamientos, pero se ajustó la salinidad del medio a 12 g/L a fin de reproducir las condiciones acordes al comportamiento de las hembras en la naturaleza (retorno a la costa del cangrejal). Las hembras no-ovígeras se alimentaron dos veces por semana con pellets (Chaulet *et al.,* 2012) y hojas frescas de *Elodea* sp. *ad libitum.*

RESULTADOS

Ensayo 1: maduración ovárica (período pre-reproductivo)

Las concentraciones de glifosato medidas en el ensayo no fueron significativamente diferentes a las nominales ($p>0,05$) (Tabla 2). No hubo disminución del herbicida a t=72 h.

La mortalidad fue baja en casi todos los tratamientos (Tabla 3), aunque en la menor concentración de glifosato alcanzó un 33,33% ($p<0,05$, en comparación con el control). Los porcentajes de hembras que mudaron y/o quedaron ovígeras alcanzaron el 20 y 26,67% respectivamente, a la mayor concentración ensayada, sin llegar a ser este incremento estadísticamente significativo (Tabla 3). Se observó que todas las hembras que quedaron ovígeras durante el ensayo perdieron los huevos desovados durante los primeros días de incubación; mediante la observación bajo lupa (50x) de una muestra de los huevos, se verificó que los mismos no estaban fecundados.

Tabla 2. Validación de las concentraciones nominales de glifosato ácido (Promedio ± error est.) (Ensayo 1).

Concentración nominal (mg/L)	Concentración medida (mg/L)
0,02	0,0245 ± 0,0025
0,2	0,2073 ± 0,0192
1	1,2658 ± 0,2256

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad, eventos de muda y ovígeras registradas según el tratamiento, luego de 90 días de exposición (Ensayo 1). Ni: número inicial de hembras. Nf: número final de hembras, descontando aquellas que quedaron ovígeras o que mudaron. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control ($p<0,05$).

Concentración de glifosato (mg/L)	Ni	% mortalidad	% muda	% ovígeras	Nf
0 (control)	15	0	6,67	13,33	12
0,02	15	33,33 *	13,33	6,67	7
0,2	15	6,67	13,33	20	9
1	15	6,67	20	26,67	7

La ganancia en peso resultó ser significativamente ($p<0,05$) menor que la del control, en todas las concentraciones de glifosato ensayadas (Figura 30). Aunque no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el índice gonadosomático o en el índice hepatosomático, se observó una tendencia a la reducción de IGS a medida que aumentaba la concentración de glifosato (Figura 30). Se observó además un incremento entre los IGS del control inicial (CI) y el control concurrente (CC), si bien no resultó ser estadísticamente significativo ($p>0,05$).

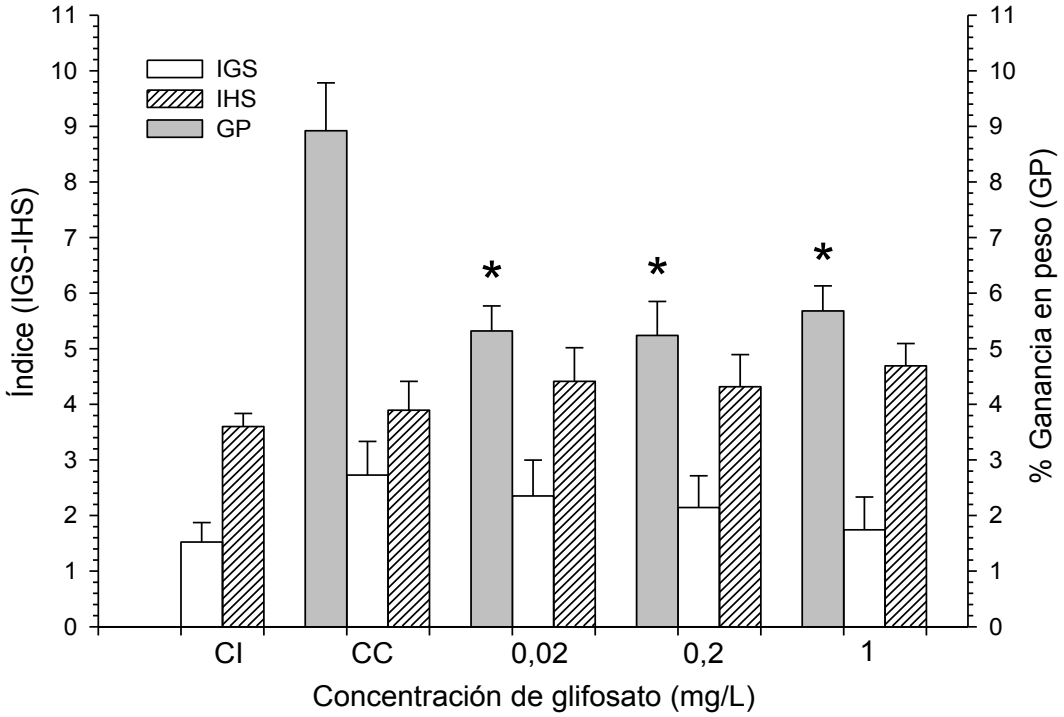


Figura 30. Ganancia en peso (GP) e índices hepatosomático (IHS) y gonadosomático (IGS) de las hembras luego de la exposición a los distintos tratamientos (Ensayo 1). El número de hembras (Nf) se indica en la Tabla 2. CI = control inicial; CC = control concurrente. Todos los valores están representados como el promedio ± error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto al control (CC).

La Tabla 4 resume los resultados obtenidos en la determinación de glucemia. Los niveles de glucosa en hemolinfa, encontrados al finalizar el ensayo, fueron relativamente menores para los individuos tratados, acentuándose este efecto con el aumento de la concentración del herbicida, si bien estas diferencias no resultaron ser significativas ($p>0,05$) con respecto al control.

Tabla 4. Niveles de glucosa en hemolinfa (mg/100mL). El número de hembras (Nf) se indica en la Tabla 3. Todos los valores están representados como el promedio ± error estándar.

Concentración de glifosato (mg/L)	Glucosa (mg/100mL)
0 (control)	27,27 ± 5,87
0,02	26,18 ± 5,34
0,2	21,96 ± 5,06
1	19,50 ± 3,63

En el ensayo *in vivo* no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) ni en el contenido de proteínas vitelogénicas presentes en el ovario (media general: 1969,11 ± 202,15 µg/g) ni en sus niveles circulantes en hemolinfa (media general: 91,93 ± 7,93 µg/mL).

A partir de los preparados histológicos se pudieron diferenciar los tres tipos oocitarios definidos: previtelogénicos, intermedios y vitelogénicos. Respecto a sus proporciones relativas, observadas en el ovario al final del ensayo, se encontró una proporción significativamente mayor ($p<0,05$) de oocitos vitelogénicos reabsorbidos a la concentración de glifosato más alta, junto con una menor proporción de oocitos vitelogénicos normales (Figura 31).

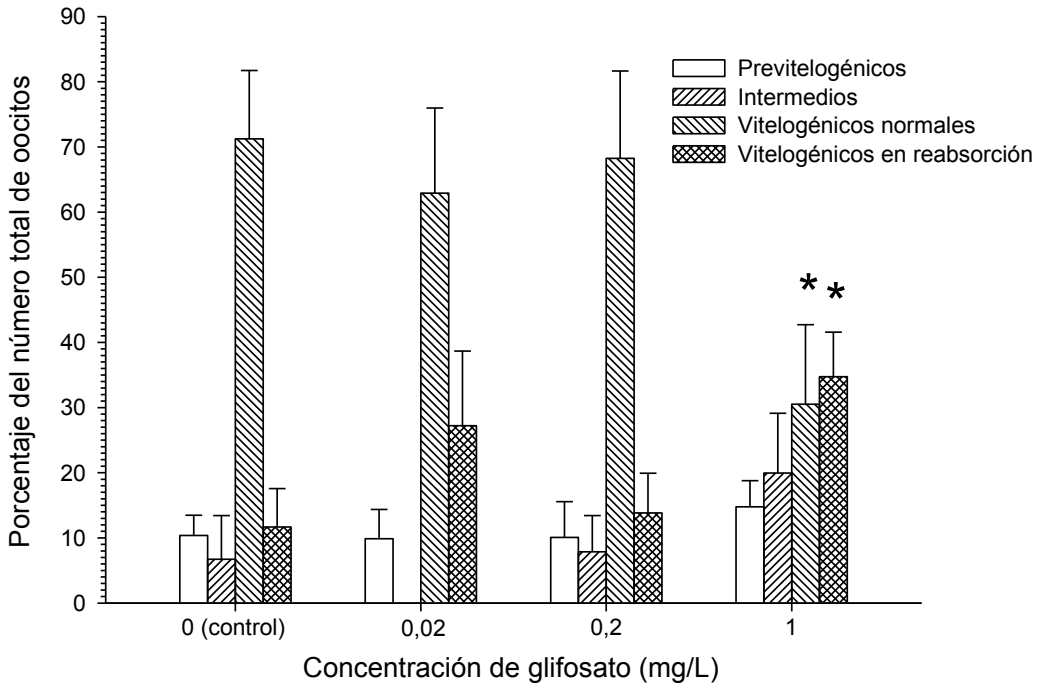


Figura 31. Proporción oocitaria en el ovario (promedio ± error estándar), al final del experimento *in vivo* (Ensayo 1). El número de hembras (Nf) se indica en la Tabla 3. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto al control.

Por otra parte, el área de los oocitos previtellogénicos normales resultó ser significativamente ($p <0,05$) mayor en el tratamiento con glifosato ácido a 1 mg/L (Figura 32).

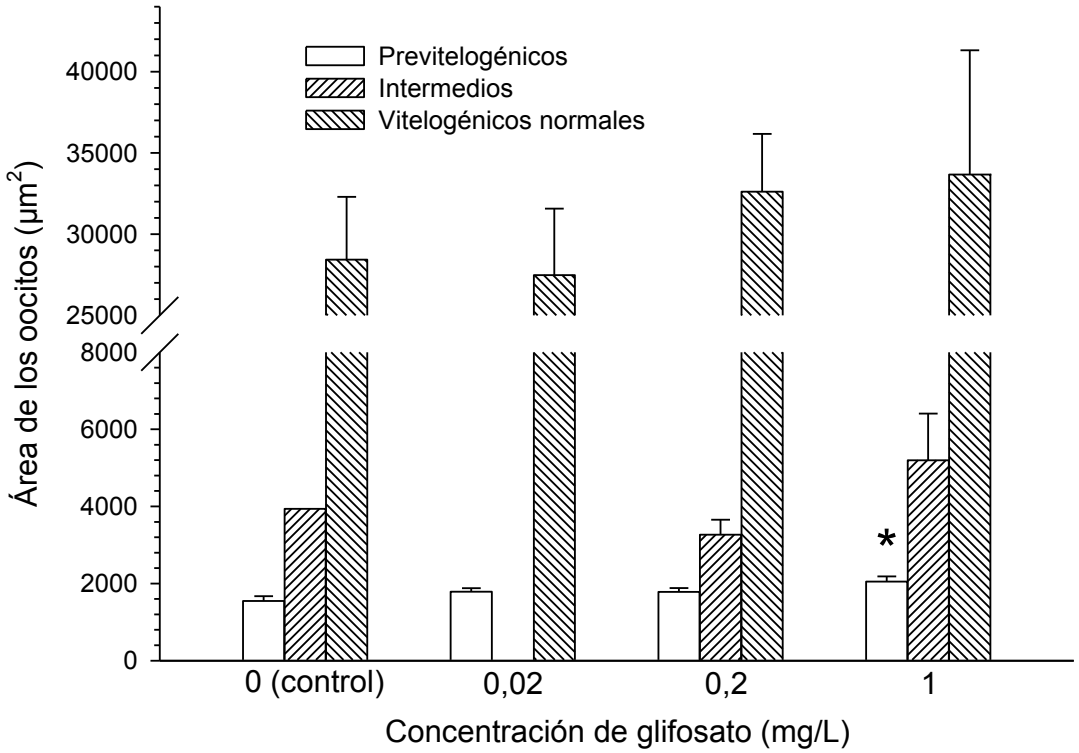


Figura 32. Área relativa de oocitos en el ovario (promedio ± error estándar) de las hembras, al final del experimento *in vivo* (Ensayo 1). El número de hembras (Nf) se indica en la Tabla 3. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

En cuanto a los resultados del experimento *in vitro*, se observó un porcentaje mayor y significativo ($p < 0,05$) de oocitos vitelogénicos reabsorbidos, cuando se agregó glifosato en presencia de pedúnculo ocular (Figura 33). Además, se pudo reconfirmar que los oocitos previtelogénicos alcanzan un área significativamente mayor ($p<0,05$) respecto al control, cuando se agregó glifosato al medio de cultivo a una concentración de 0,2 mg/L (Figura 34). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el área de los oocitos cuando se agregó extracto de pedúnculo ocular.

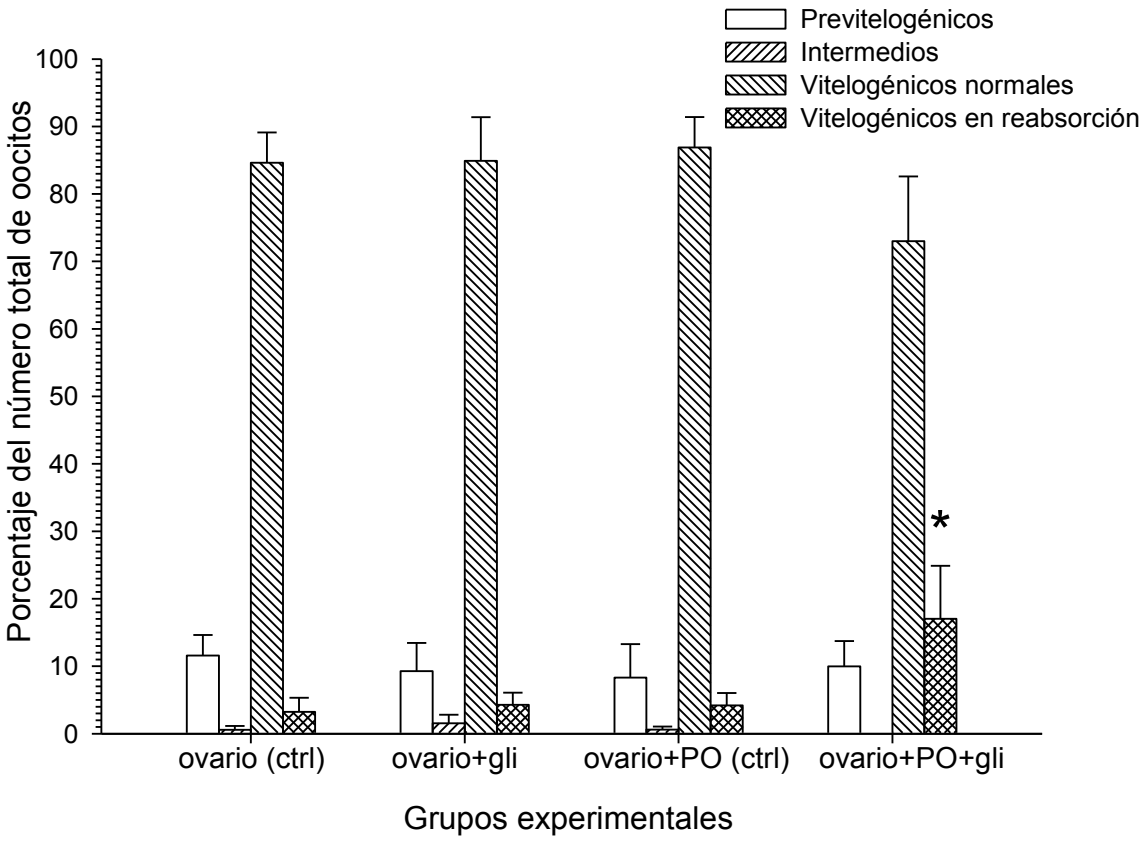


Figura 33. Proporción de tipos de oocitos (promedio ± error estándar) en ovario, a partir de los experimentos *in vitro*. ctrl: control; gli: glifosato a 0,2 mg/L; PO: homogenato de pedúnculo ocular. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

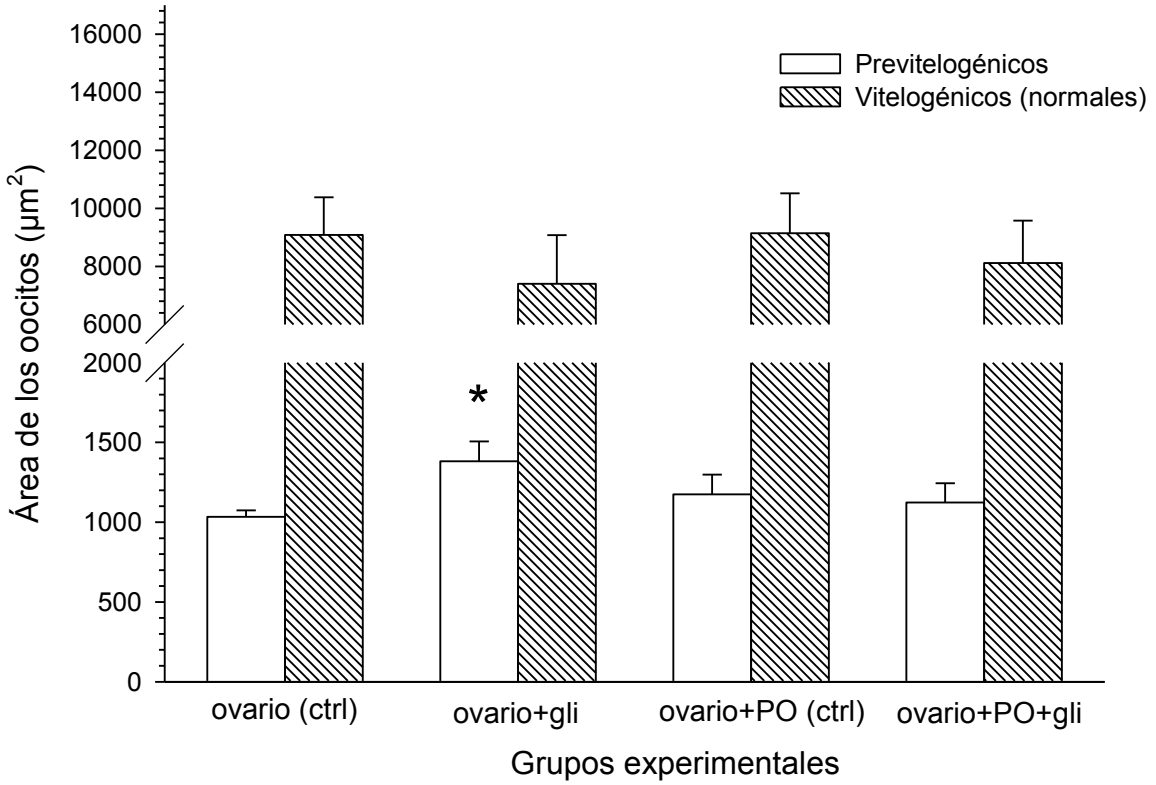


Figura 34. Área relativa de los oocitos en el ovario (promedio ± error estándar), expuestos *in vitro*. ctrl: control; gli: glifosato a 0,2 mg/L; PO: homogenato de pedúnculo ocular. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control. Debido a que se observaron muy pocos oocitos intermedios, estos no se consideraron para el cálculo del área.

En la Figura 35 se muestran varias secciones de cortes histológicos obtenidos en los ensayos *in vivo* e *in vitro*. Para el primer ensayo, se observa la reabsorción de los oocitos vitelogénicos por efecto del glifosato, proceso que implica la participación de las células foliculares tal como se muestra en la Figura 35B. En esta figura también se observan algunos oocitos previtelogénicos (OP) de mayor tamaño en el tratamiento con glifosato, en comparación con el control (Figura 35A). En las Figuras 35C y 35D se observa el mismo efecto, para el ensayo *in vitro*.

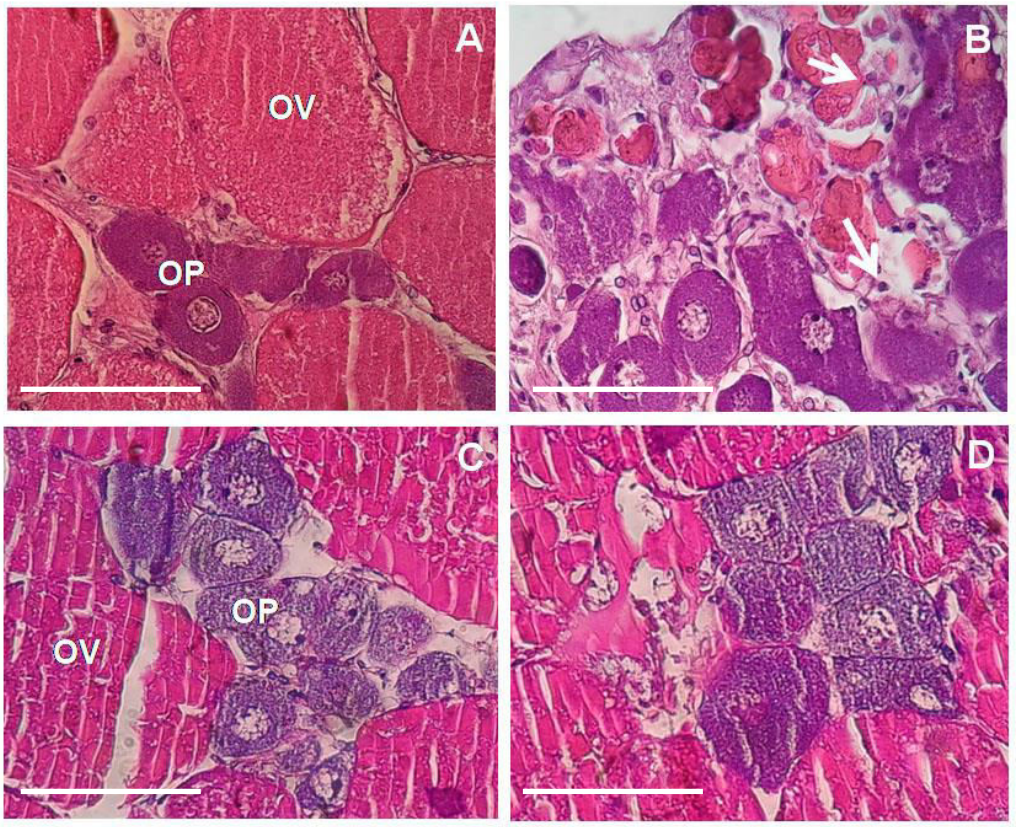


Figura 35. Secciones histológicas del ovario, tanto *in vivo* (A = control, B = expuesto a 1 mg/L de glifosato) como *in vitro* (C = control, D = expuesto a 0,2 mg/L de glifosato) correspondientes al Ensayo 1. Las flechas indican células foliculares que participan en la reabsorción de oocitos vitelogénicos (OV). En los ovarios de los tratamientos con glifosato se puede observar un mayor tamaño de oocitos previtelogénicos (OP) que en los controles. Aumento: 400x en todos los casos; la barra horizontal representa 50 µm.

Ensayo 2: remaduración ovárica (período reproductivo)

Las concentraciones medidas, tanto de glifosato ácido como formulado, fueron relativamente cercanas a las concentraciones nominales respectivas (r^2=0,988 y r^2=0,954 para tiempo t=0 y t=72 hs, respectivamente) (Tabla 5). Al finalizar el ensayo, no se registró una mortalidad significativa (p>0,05) con respecto al control, ni se registraron mudas en los distintos tratamientos.

Tabla 5. Validación de las concentraciones nominales (promedio ± error estándar). Porcentaje de mortalidad registrado según el tratamiento luego de 32 días de exposición (Ensayo 2). Ni: número inicial de hembras. Nf: número final de hembras.

Tratamiento	Ni	Concentración nominal (mg/L)	Concentración medida (mg/L)	% mortalidad	Nf
Control	11	0 (control)	0,000	27,27	8
Glifosato	11	2,5	2,715 ± 0,315	9,09	10
Glifosato	11	5	6,230 ± 0,900	9,09	10
Roundup Ultramax	11	2,5	2,185 ± 0,025	9,09	10

En la Figura 36 se muestran los índices hepatosomático (IHS) y gonadosomático (IGS) determinados al finalizar el ensayo. Se observó un IHS significativamente ($p<0,05$) mayor sólo para la concentración más baja de glifosato, comparado con el control; mientras que el IGS fue significativamente mayor ($p<0,05$) para ambas concentraciones de glifosato ácido ensayadas.

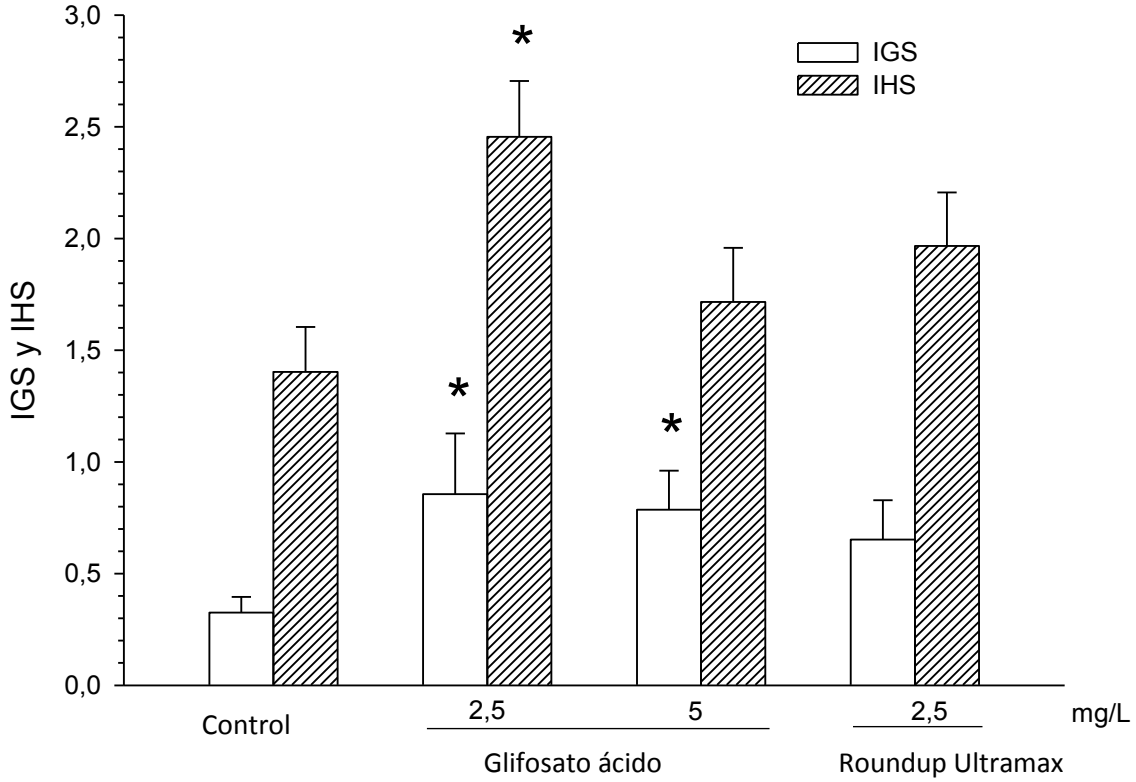


Figura 36. Índice gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) para cada tratamiento, al final del Ensayo 2 (promedio ± error estándar). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto al control.

Los niveles de glucosa en hemolinfa determinados en las hembras sobrevivientes al finalizar el ensayo fueron significativamente ($p<0,05$) mayores en el tratamiento con Roundup (38,63 ± 2,45 mg/100 mL), en comparación con el control (29,55 ± 1,17 mg/100 mL).

En la Figura 37 se muestra el porcentaje de los distintos tipos oocitarios encontrados. Se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) en el porcentaje de oocitos vitelogénicos normales de hembras expuestas a la concentración baja de glifosato ácido (2,5 mg/L) con respecto al grupo control, evidenciado por un menor porcentaje de oocitos intermedios y

un mayor porcentaje de vitelogénicos en los individuos tratados con el herbicida. Si bien el glifosato produjo un aumento en el porcentaje de oocitos en reabsorción, particularmente los oocitos vitelogénicos en el tratamiento con Roundup, estas diferencias no resultaron ser significativas (p>0,05) con respecto al control.

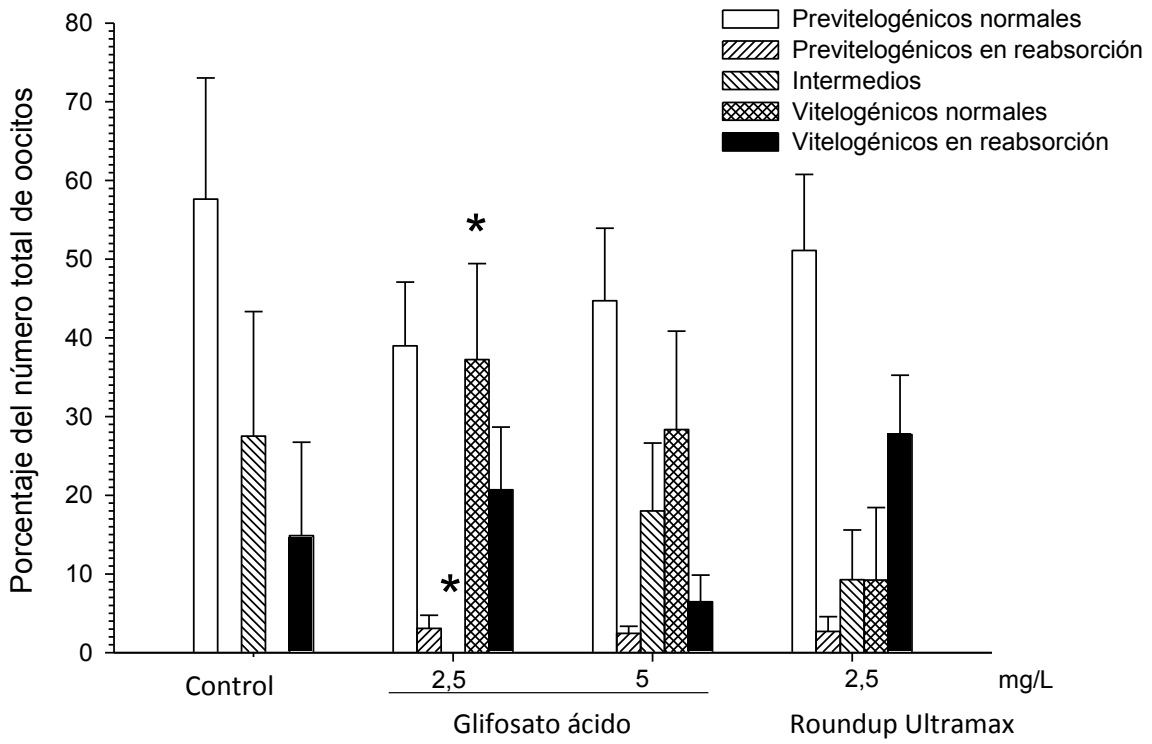


Figura 37. Proporción oocitaria en el ovario (promedio ± error estándar) de las hembras, al final del Ensayo 2. El número de hembras (Nf) se indica en la Tabla 5. Los asteriscos indican diferencias significativas (p<0,05) con respecto al control. Los datos fueron transformados (transformación angular) a fin de cumplir con los supuestos del análisis.

En cuanto a las áreas de los oocitos medidos, no se encontraron diferencias significativas (p>0,05) entre los grupos tratados y los controles, ni con glifosato ácido ni con formulado. Los valores medios de las áreas (promedios generales) fueron 1.158,62 ± 42,36 μm^2, 4.013,50 ± 286,98 μm^2 y 10.322,87 ± 1.614,91 μm^2 para los oocitos previtelogénicos,

intermedios, y vitelogénicos normales, respectivamente. En la Figura 38 se muestran los tipos de oocitos identificados.

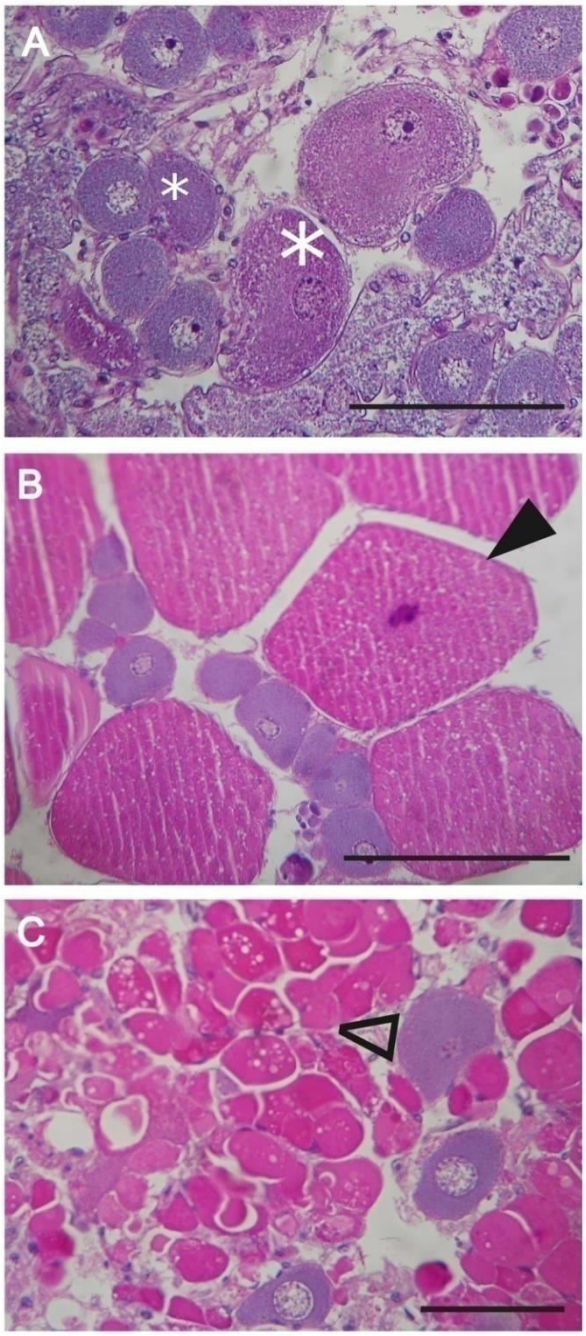


Figura 38. Secciones histológicas del ovario (A) Control, con oocitos previtelogénicos (asteriscos pequeños) e intermedios (asteriscos grandes), correspondientes al Ensayo 2. (B) Glifosato 2,5 mg/L, con oocitos vitelogénicos (punta de flecha sólida). (C) Roundup Ultramax 2,5 mg/L, mostrando oocitos vitelogénicos en reabsorción (punta de flecha). La barra representa 50 µm.

DISCUSIÓN

Concentraciones, mortalidad y muda en ambos ensayos

Las concentraciones medidas de glifosato ácido y formulado correspondientes a los ensayos del presente capítulo, fueron cercanas a las nominales propuestas, siendo similares a algunos niveles ambientales mencionados en la Introducción, en especial las concentraciones utilizadas en el Ensayo 1. Al no observarse un descenso en las concentraciones de glifosato al inicio y previamente al recambio de la solución, estaríamos garantizando la exposición relativamente constante de los organismos durante todo el periodo de exposición *in vivo*. También pudo verificarse la subletalidad de las concentraciones ensayadas, al no observarse una mortalidad significativa. Solo en la concentración más baja de glifosato ácido (0,02 mg/L) utilizada en el ensayo de maduración ovárica, que comprendió tres meses de exposición, se observó una mortalidad significativamente mayor con respecto al control. En este mismo ensayo, los porcentajes de hembras mudadas y ovígeras fueron en su mayoría discretos, y no se observaron diferencias entre los tratamientos y el control. La reducida proporción de hembras mudadas estuvo de acuerdo con la baja frecuencia de muda en los adultos de esta especie (López Greco, 1997). Aun así, la exclusión de estos animales para un análisis posterior nos permitió una estimación más precisa del desarrollo ovárico, al poder controlar la variabilidad biológica asociada tanto a la inversión energética en la muda (López Greco y Rodríguez, 1999) como a la incipiente remaduración ovárica que presentan las hembras ovígeras recientes.

Ensayo de maduración ovárica (período pre-reproductivo)

La reducción en el crecimiento somático por efecto del glifosato ácido, evidenciado a partir de una menor ganancia en peso en el ensayo de maduración ovárica, concuerda con los resultados obtenidos en los estudios previos con juveniles tempranos de la langosta *C. quadricarinatus*, en los cuales también pudo observarse una ganancia en peso corporal disminuida por efecto de glifosato ácido, en correlación con una disminución tanto en los niveles de proteínas totales como en las reservas de lípidos (Capítulo 1 de la presente tesis). Se han reportado también resultados similares en juveniles avanzados de *C. quadricarinatus* por efecto del principio activo y de la mezcla de glifosato con polioxietilenamina (POEA), el coadyuvante declarado en la formulación original de Roundup (Frontera *et al.,* 2011). Esta formulación de glifosato también provocó una reducción del crecimiento somático en camarones de agua dulce expuestos durante 40 días a concentraciones que oscilaron entre 2,2 y 5,4 mg/L (Mensah *et al.,* 2012). Este tipo de respuesta se ha reportado también en peces, durante la etapa de agotamiento ante un cuadro de estrés crónico, en el cuál los principales procesos fisiológicos están comprometidos (Mazeaud *et al.,* 1977).

Con respecto al ovario, un primer resultado obtenido en este ensayo permitió comprobar que efectivamente se verifica el crecimiento ovárico en condiciones control, ya que se incrementó el índice gonadosomático (IGS) del control concurrente con respecto al índice del control inicial, en concordancia con el crecimiento ovárico esperado durante el período pre-reproductivo de la especie (López Greco y Rodríguez, 1999).

Al analizar histológicamente la composición oocitaria, particularmente en el tratamiento con 1 mg/L de glifosato ácido, se observó que la proporción de oocitos vitelogénicos normales fue menor con respecto al control, a costa de una mayor proporción de oocitos vitelogénicos en reabsorción. Estos últimos presentaron una alta proliferación de células foliculares dentro de los oocitos atrésicos, cuya función es participar activamente en la reabsorción del vitelo (Rodríguez y Medesani, 1994). Con el fin de explicar la reabsorción de oocitos observada en los cangrejos expuestos a glifosato, una primera posibilidad a considerar es que la reabsorción de vitelo podría ser un mecanismo para obtener energía a costa de la inversión energética destinada a la reproducción, tal como se ha reportado para muchos otros casos de estrés (Sokolova *et al.,* 2012; Mayer *et al.,* 1992).

Sin embargo, en el experimento *in vitro* se observó una mayor reabsorción de oocitos vitelogénicos por efecto de glifosato ácido, pero sólo cuando se añadió el homogenato del pedúnculo ocular. Según Charmantier (1997) el crecimiento de los oocitos en el ovario está determinado principalmente por la disminución gradual de la hormona inhibidora de las gónadas (GIH), la cual es secretada por la glándula del seno, ubicada en los pedúnculos oculares. Si la secreción de esta hormona inhibidora aumenta cuando el ovario está experimentando la vitelogénesis exógena (como en el experimento *in vitro* realizado), podría explicarse la reabsorción de oocitos vitelogénicos. Además, algunas otras hormonas relacionadas con GIH podrían participar también en la reabsorción ovárica, tanto *in vivo* como *in vitro*. De hecho, GIH pertenece a la familia de hormonas que incluye también a la CHH (hormona hiperglucemiante de crustáceos, Santos y Keller 1993) propuesta como la hormona del estrés de los crustáceos (Chang *et al.,* 1999); se ha reportado su rol multifuncional, incluyendo algunos efectos sobre el ovario de crustáceos

(Fanjul-Moles, 2006; De Kleijn *et al.,* 1998). Por lo tanto, no debe descartarse que una secreción aumentada de CHH desde los pedúnculos oculares (o eventualmente desde otros sitios), esperable en una situación estresante, pueda afectar al ovario provocando la reabsorción de los oocitos.

En un estudio previo realizado con hembras de *N. granulata*, se observó una reacción atrésica que condujo a la reabsorción de oocitos por efecto del herbicida 2,4-D, en combinación con el emulsionante comercial nonilfenol (Rodríguez *et al.,* 1994). Sabemos que el período pre-reproductivo es crítico para la reproducción de la especie estudiada, ya que el ovario está creciendo para alcanzar la madurez final necesaria para desovar (López Greco, 1997). En hembras de *N. granulata* expuestas a paratión, se observó también un tamaño mayor de los oocitos, tanto previtelogénicos como vitelogénicos (Rodríguez *et al.,* 1994).

El aumento del área de los oocitos previtelogénicos expuestos a 1 mg/L de glifosato ácido durante el período de maduración ovárica nos sugiere una aceleración del proceso vitelogénico normal del ovario, que no puede explicarse como una respuesta inespecífica al estrés. Por el contrario, este resultado apoya la hipótesis de una interferencia de tipo endocrino. Asimismo, este efecto también se observó *in vitro* cuando se añadió glifosato (0,2 mg/L) a los viales que contenían solamente piezas ováricas. Los resultados de ambos ensayos (*in vivo* e *in vitro*) sugieren que el glifosato podría estimular la secreción de alguna hormona estimulante producida por el ovario, tal como algún tipo de esteroide ovárico (Charmantier, 1997; Nagaraju, 2011), o bien podría actuar como un agonista esteroideo. Por último, el hecho de que el aumento del área de los oocitos

previtelogénicos no se haya observado en el ensayo *in vitro* que contenía tanto tejido de ovario como pedúnculo ocular, fue coherente con el posible aumento de la secreción de GIH a partir del pedúnculo ocular por efecto de glifosato, arriba mencionado, que podría estar contrarrestando el efecto estimulante del herbicida sobre el crecimiento ovárico durante el ensayo *in vitro* a corto plazo.

Ensayo de remaduración ovárica (período reproductivo)

En este ensayo no se evaluó crecimiento somático debido a que se trabajó con hembras ovígeras hasta la eclosión, que no se alimentan durante el período de incubación del desove.

Por otra parte, a diferencia del ensayo anterior, la glucemia se vio aumentada en los organismos expuestos durante el período reproductivo al formulado comercial Roundup y no así en los que fueron expuestos al glifosato ácido, tal como se había observado en el ensayo de maduración. Este resultado sugiere que el efecto hiperglucémico podría atribuirse a los componentes coadyuvantes presentes en la formulación, que actuarían como estresantes inespecíficos.

En varias especies de crustáceos expuestos a diferentes tipos de contaminantes, incluyendo plaguicidas, hidrocarburos y metales pesados, se han reportado también respuestas hiperglucémicas (Fingerman *et al.,* 1998). Dado que la hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH) se libera para aumentar la glucemia como una respuesta adaptativa a varios estímulos (tales como emersión, inanición, temperaturas

críticas y otros), se ha propuesto que esta hormona funciona como una hormona del estrés en crustáceos, según se mencionó más arriba (Chang *et al.,* 1999). En el camarón *Palaemon elegans* se comprobó que varios metales pesados (mercurio, cadmio y cobre) inducían hiperglucemia, en una magnitud dependiente del metal analizado, de la concentración utilizada y del tiempo de exposición (Lorenzon *et al.,* 2000). La posible interferencia de ciertos metales pesados como el cobre sobre los receptores de CHH, causando una hipoglucemia, también ha sido reportada (Rodríguez *et al.,* 2007).

Mazeaud *et al.* (1977) reportaron un aumento de la glucemia en salmones (*Oncorhynchus kisutch*, *O. nerka* y *O. tshawytscha)* como una respuesta fisiológica secundaria durante la fase de resistencia al estrés. En peces se ha demostrado que el estrés provocado por condiciones de hipoxia o hacinamiento, podría aumentar la secreción de catecolaminas y cortisol, que controlan el metabolismo de carbohidratos en vertebrados, elevando los niveles plasmáticos de glucosa y suprimiendo la secreción de insulina (El-Khaldi, 2010).

Con respecto al ovario, en este ensayo se pudieron observar claramente los efectos acumulativos del glifosato sobre el crecimiento ovárico de *N. granulata*. Un primer indicador fue la observación de un IGS mayor en todos los organismos tratados con glifosato ácido (2,5 y 5 mg/L), evidenciando un claro efecto estimulante del principio activo. En correspondencia con este resultado, en el tratamiento con 2,5 mg/L de glifosato ácido aumentó la proporción de oocitos vitelogénicos normales. De esta manera, estos resultados nos estarían indicando una aceleración en el desarrollo normal del ovario por efecto del glifosato, reafirmando la posibilidad de desorganización endocrina discutida para los resultados del ensayo de maduración, en términos del

aumento en la secreción de alguna hormona estimulante del crecimiento ovárico. En este sentido y dado que se trató de un ensayo *in vivo*, pueden considerarse varias posibilidades: la neurohormona estimulante del crecimiento ovárico (GSH) secretada por el ganglio torácico, el metil farnesoato secretado por el órgano mandibular y los esteroides sexuales posiblemente secretados por las células foliculares del ovario (Nagaraju, 2011; Rodríguez *et al.,* 2007). El glifosato también podría unirse a los receptores ováricos de alguna de las hormonas estimulantes mencionadas, actuando como agonista.

Se han reportado casos de desorganización endocrina en vertebrados, por efecto de glifosato. Por ejemplo, la disminución de los niveles de estradiol junto con un mayor valor del IHS se ha reportado en peces expuestos a 3,6 mg/L de glifosato (Benck Soso *et al.,* 2007). En las células hepáticas humanas, el glifosato fue capaz de producir, a concentraciones ambientales, efectos anti-estrogénicos (Gasnier *et al.,* 2009), mientras que también se han descrito efectos deletéreos del glifosato en la síntesis de varios esteroides sexuales (Quassinti *et al.,* 2009; Richard *et al.,* 2005; Mesnage *et al.,* 2015).

Comparación entre ambos ensayos.

En el ensayo de remaduración ovárica, tanto el IGS como la proporción de oocitos vitelogénicos aumentaron significativamente en los organismos tratados con glifosato ácido (2,5 y 5 mg/L), en comparación con el control. Por el contrario, no se observaron diferencias en tales parámetros en el ensayo de maduración, a las concentraciones evaluadas (0,02; 0,2 y 1 mg/L). En principio, esta diferencia podría explicarse por las

distintas concentraciones utilizadas en uno y otro ensayo. Aun cuando el tiempo de exposición fue mayor en el ensayo de maduración (3 meses) que en el de remaduración (1 mes), las concentraciones más altas utilizadas en este último parecen ser necesarias para disparar la secreción de alguna/s hormona/s estimulante/s del crecimiento gonadal, por encima de los niveles normales, o bien para que el glifosato pueda expresarse como un agonista de alguna de tales hormonas. La posibilidad de que la secreción de la hormona inhibidora GIH se encuentre disminuida no parece ser una causa probable de la estimulación ovárica, debido a los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro*, que sugieren un eventual aumento de su secreción.

En cuanto a las reabsorciones oocitarias, sólo se observaron de manera significativa durante el ensayo de maduración ovárica, que comprendió la exposición a glifosato ácido. Dado que, como se mencionó más arriba, este ensayo fue el más extenso de los dos, comprendiendo tres meses de duración, la causa de las reabsorciones podría deberse al mayor tiempo de exposición al glifosato que comprendió el ensayo mencionado. Como se discutió previamente, la reutilización del vitelo es una de las estrategias para afrontar una situación de estrés crónico. En este caso, un mayor tiempo de exposición al herbicida habría provocado una mayor reabsorción oocitaria, en el contexto del cuadro de estrés crónico al cual los organismos se encontraban sometidos. Más aún, los resultados obtenidos durante el período pre-reproductivo, tanto *in vivo* como *in vitro*, indican que el aumento en las reabsorciones de oocitos vitelogénicos se correspondería con un aumento de la secreción de alguna hormona peduncular tal como GIH ó CHH, reforzando la posibilidad de que el glifosato actúe como un posible desorganizador endocrino.

El hepatopáncreas es un órgano dinámico, involucrado entre otras funciones, en mecanismos de detoxificación. El incremento observado en el IHS en ambos ensayos, aunque no resultó ser estadísticamente significativo ($p>0,05$), podría ser provocado por un aumento en el número de células especializadas en la detoxificación o por un aumento de su tamaño.

Finalmente, el hecho de que se haya trabajado con glifosato ácido en ambos ensayos *in vivo*, permitiría, en principio, extrapolar los efectos observados a cualquiera de las formulaciones comerciales a base de glifosato. Este ítem es relevante, sobre todo teniendo en cuenta que durante los últimos años se han utilizado diversos coadyuvantes no declarados en varias formulaciones de Roundup y de otras marcas comerciales (Mesnage *et al.,* 2015). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente capítulo podrían establecer una línea de base sobre los efectos deletéreos causados por glifosato ácido, información valiosa para evaluar la toxicidad de cualquier formulación comercial de este herbicida.

CAPÍTULO 3

Efectos del glifosato sobre la progenie

Hipótesis

a) El glifosato, tanto ácido como formulado, afecta la incubación de los huevos desovados y produce anormalidades morfológicas en las larvas recién eclosionadas de N. granulata.

b) El glifosato afecta la incubación de huevos y produce malformaciones en los juveniles recién eclosionados de N. heteropoda heteropoda.

c) El glifosato, tanto ácido como formulado, afecta el peso y la talla de los primeros estadios juveniles C. quadricarinatus.

OBJETIVO

Determinar en especies de crustáceos con diferente tipo de desarrollo (directo o indirecto), los efectos subletales de glifosato (ácido y/o formulado) sobre la incubación del desove y la eclosión larval, evaluando además posibles patologías en los estadios recién eclosionados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Evaluar en una especie de crustáceo con desarrollo indirecto, *N. granulata,* los efectos subletales del glifosato (ácido y formulado) sobre la incubación de huevos y la eclosión larval, evaluando además posibles patologías en las larvas eclosionadas.

2) Evaluar en una especie de crustáceo con desarrollo directo, *N. heteropoda heteropoda,* los efectos de concentraciones subletales del glifosato ácido sobre la incubación de huevos, evaluando además posibles patologías en los juveniles eclosionados.

3) Evaluar en una especie de crustáceo con desarrollo directo, *C. quadricarinatus,* los efectos de glifosato sobre el desarrollo de los primeros estadios juveniles, eclosionados de huevos incubados *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron tres ensayos a fin de probar las hipótesis planteadas:

Ensayo 1) exposición de hembras ovígeras de *N. granulata.*

Ensayo 2) exposición de hembras ovígeras de *N. heteropoda heteropoda.*

Ensayo 3) cultivo *in vitro* de huevos aislados de *C. quadricarinatus.*

Metodología general (común a los tres ensayos)

Los ensayos se realizaron en condiciones semi-estáticas (con renovación del medio dos o tres veces por semana, según se detalla en particular para cada ensayo) de acuerdo con los procedimientos estandarizados recomendados por la American Public Health Association (APHA, 2005). Como agua de dilución, se utilizó agua de red corriente declorada (dureza: 80 mg/L como equivalentes $CaCO_3$) y purificada mediante un sistema de filtros Hidroquil®, que incluía la secuencia de los siguientes filtros: lana de vidrio (para material en suspensión), carbón activado (para trazas de compuestos orgánicos) y resina de intercambio iónico (para trazas de metales pesados).

Preparación de solución stock

Se prepararon semanalmente soluciones madre (o "stock") de glifosato ácido en su forma ácida, pureza 99,8% (Sigma, EEUU), disolviendo en agua bidestilada la cantidad necesaria para obtener una solución madre de concentración suficiente para obtener las concentraciones ensayadas mediante la adición de las alícuotas necesarias, llevando el pH a 8 mediante la adición de NaOH 0,1 N. Además de la solución stock de glifosato ácido arriba mencionada, cuando se evaluó la formulación comercial se preparó una solución madre de Roundup Ultramax® (en forma de gránulos solubles, 67,9% p/p de principio activo, como equivalente ácido, Monsanto. Argentina). Las soluciones madre fueron conservadas en la heladera (5 °C) y al resguardo de la luz, para evitar su degradación.

Análisis de datos

Para comparar entre los distintos grupos experimentales los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se realizaron ANOVAs de una vía seguidos por contrastes múltiples (LSD), utilizando transformación angular o logarítmica de los datos cuando fue necesario. Las proporciones de mortalidad y muda fueron comparadas mediante el test exacto de Fisher (Sokal y Rohlf, 1981).

Metodología particular utilizada para cada ensayo

-*Ensayo 1:* Exposición de hembras ovígeras de *N. granulata.*

a) Animales

Se utilizaron 44 hembras ovígeras recolectadas en la zona de muestreo mencionada en el capítulo 2 (período reproductivo). Todas las hembras muestreadas presentaban una

puesta de huevos relativamente sincrónica, determinada cualitativamente por la coloración violeta de los huevos. Una vez en el laboratorio, las hembras se aclimataron durante 48 horas a las condiciones de experimentación (agua salina, fotoperíodo y temperatura) a utilizarse en los ensayos. Las hembras fueron aisladas en frascos de vidrio conteniendo un volumen final de 500 mL de agua salina (30 g/L). La temperatura en estos acuarios se mantuvo en 25 ± 1 °C y el fotoperíodo de la sala de experimentación en 14:10 hs (luz: oscuridad).

Los frascos fueron tapados con papel celofán perforado, para evitar el escape de las hembras y minimizar la evaporación de la solución. La solución de todos los recipientes se reemplazó completamente 2 veces por semana. Las hembras no fueron alimentadas durante el ensayo, ya que las mismas no se alimentan mientras están ovígeras (Rodríguez y Medesani, 1994; Medesani *et al.,* 2004b).

b) Tratamientos - Serie de concentraciones ensayadas

Se utilizó una solución stock de concentración 5 g/L tanto para el glifosato ácido como para el formulado comercial, de la cual se extrajeron las alícuotas necesarias que fueron agregadas a los recipientes de ensayo correspondientes, a fin de conseguir las concentraciones nominales deseadas: 2,5 y 5 mg/L de glifosato ácido; 2,5 mg/L de glifosato (como equivalente ácido) contenido en el formulado Roundup Ultramax®. Se estableció además un tratamiento control, con hembras expuestas solamente al agua de dilución utilizada. El ensayo comenzó con la exposición de hembras ovígeras inmaduras, y se extendió hasta la eclosión de las larvas, abarcando en consencuencia el tiempo de incubación de los huevos.

c) Variables analizadas

- **Número de hembras con eclosión y tiempo de incubación de los huevos**

Diariamente se registró la mortalidad, la pérdida de la puesta y/o eclosión de los huevos. Con estos datos se determinó el porcentaje de hembras con eclosión y la cantidad de días transcurridos hasta la eclosión de los huevos.

- **Número de larvas eclosionadas por hembra**

Inmediatamente luego de la eclosión, se agitaron suavemente los frascos para conseguir una distribución homogénea de las larvas presentes y se tomaron de cada recipiente dos muestras de 10 mL cada una, las cuales fueron fijadas en formol al 5%. A partir estas dos muestras se realizó el recuento de larvas y se calculó luego el número total de larvas eclosionadas por hembra mediante la extrapolación al volumen total de solución contenida en el recipiente.

- **Anormalidades en larvas eclosionadas**

Para determinar la proporción de anomalías morfológicas de las larvas correspondientes a cada desove, se examinó bajo lupa una submuestra aleatoria de 50 larvas en una cámara de Bogorov de 5 mL similar a las utilizadas para el recuento de zooplancton. A partir de dicho recuento, se estableción la proporción de cada anomalía encontrada. Para el diagnóstico y cuantificación de las anormalidades detectadas, se siguió el mismo criterio utilizado en trabajos previos con varias especies de crustáceos (Rodríguez y Medesani, 1994; López Greco *et al.,* 2002; Sánchez *et al.,* 2005; Lavolpe *et al.,* 2004, entre otros).

-Ensayo 2: **Exposición de hembras ovígeras de *N. heteropoda heteropoda.***

a) Animales

Se utilizó un lote de hembras provenientes de acuarios comerciales, las cuales fueron aclimatadas a las condiciones de laboratorio durante un mes. En este caso, se asignó al azar un total de 24 hembras a los distintos tratamientos, a medida que se las detectó ovígeras (día 1). Cada hembra se dispuso aislada en un recipiente de vidrio de 13 cm de diámetro conteniendo 1 L de agua corriente de red proveniente de los filtros mencionados, con aireación constante y adicionando la alícuota de solución stock correspondiente, según el tratamiento. La solución de todos los recipientes se reemplazó completamente dos veces por semana. En este ensayo, las hembras fueron alimentadas tres veces por semana con alimento balanceado para peces (TetraColor®, molido) y hojas frescas de *Elodea* sp., *ad libitum*. La temperatura del medio se mantuvo en 27,0 ± 1,0 °C y el fotoperiodo de la sala de experimentación en 14:10 hs (luz:oscuridad).

b) Tratamientos - Serie de concentraciones ensayadas

Cada hembra ovígera se asignó de manera aleatoria a alguno de los tratamientos: control (N= 11), 1 mg/L (N= 8) y 5 mg/L (N= 5) de glifosato ácido. Se utilizó una solución stock de concentración 5 g/L de glifosato, que fue preparada disolviendo el herbicida en agua bidestilada, ajustando el pH tal como se indica más arriba. A partir de esta solución madre, se extrajeron las alícuotas necesarias que fueron agregadas a los recipientes de ensayo correspondientes para conseguir las concentraciones nominales deseadas, arriba mencionadas. Al igual que para *N. granulata,* la duración del ensayo comprendió el tiempo de incubación de los huevos.

c) Variables analizadas

- **Número de hembras con eclosión y tiempo de incubación de los huevos**

Diariamente se registró la mortalidad de las hembras, la pérdida total y/o parcial de la puesta y la cantidad de días transcurridos hasta la eclosión de los juveniles.

- **Número de juveniles eclosionados por hembra**

Se determinó el número de juveniles que eclosionaron de cada hembra ovígera, y dentro de las 24 hs siguientes todos ellos fueron fijados en formol al 5% y luego conservados en alcohol 70% para determinar su estadio, mediante observación bajo lupa siguiendo el criterio establecido por Pantaleão *et al.* (2017).

- **Anormalidades en los juveniles eclosionados**

Se determinó el número de juveniles anómalos mediante observación bajo lupa. Si bien la bibliografía específica es escasa, se utilizó como criterio para diagnosticar un retraso en el desarrollo una mayor presencia de vitelo en los juveniles expuestos al herbicida, con respecto al control. Además, en los juveniles eclosionados se midió bajo lupa el largo del cefalotórax, desde el extremo del rostrum hasta la línea definida por la inserción del pleon, utilizando un ocular micrométrico calibrado con una placa Leitz Wetzlar 1/100 mm.

-Ensayo 3: **Cultivo *in vitro* de huevos aislados de *C. quadricarinatus.***

a) Animales

Se obtuvieron adultos de *C. quadricarinatus*, tanto machos como hembras, de un criadero comercial (Pinzas Rojas S. R. L., Tucumán, Argentina), que luego de su aclimatación durante 15 días a las condiciones de laboratorio, fueron dispuestos en grupos reproductivos en una relación 3:1 (macho:hembra). A partir de las primeras dos hembras que quedaron impregnadas y ovígeras, se utilizó un total de ciento cincuenta huevos de

30 días de edad, contando desde la oviposición. Los huevos utilizados se encontraban en el estadío hatching o post-embryo I, equivalente al estadío de juvenil I según la descripción de García-Guerrero *et al.* (2003b). Los mismos fueron extraídos de las hembras cuidadosamente, utilizando pinzas de disección. Inicialmente, se fijaron 20 huevos en formol al 5% para confirmar su estadio. Cada huevo fue colocado al azar en un pocillo, aislado del resto, totalizando 10 huevos por cada placa de cultivo estéril de 12 pocillos (Cellstar®, Greiner Bio-one), y asignándose finalmente 3 placas (réplicas) a cada tratamiento (N= 30 por tratamiento). Cada pocillo contenía 2 mL de agua de dilución o solución de tratamiento, según correspondiese. Las placas se dispusieron sobre un agitador orbital, a bajas revoluciones, a fin de proveer aireación constante. El experimento comprendió 16 días y la solución de todos los recipientes fue renovada 3 veces por semana. En el transcurso del ensayo, a medida que los embriones eclosionaban al primer estadio juvenil de vida libre (Juvenil III) se los dispuso individualmente en recipientes plásticos de 7 cm de diámetro conteniendo un volumen total de 100 mL de la misma solución a la cuál habían sido expuestos previamente. A partir de allí, se los comenzó a alimentar con alimento balanceado para peces (TetraColor®, molido) en las horas previas al recambio del medio, y con hojas frescas de *Elodea* sp. *ad libitum*, posteriormente al recambio. Además, se les colocó una pieza de malla plástica para facilitar la muda, y un tubo pequeño de PVC a modo de refugio. La temperatura de la solución se mantuvo siempre a 29 ± 2 °C.

b) Tratamientos – Series de concentraciones ensayadas

El agua de dilución fue preparada con agua corriente de red proveniente del sistema de filtros Hidroquil, arriba mencionado, declorada durante 48 hs en tanques de

almacenamiento, con el agregado de los antibióticos estreptomicina (0,6 mg/L) y penicilina (0,6 mg/L).

Se ensayaron las siguientes concentraciones: 10 y 50 mg/L de glifosato ácido, 10 y 50 mg/L de glifosato (como equivalente ácido) contenido en el formulado comercial Roundup Ultramax® y un tratamiento control con agua de dilución. Tales concentraciones fueron definidas a partir de ensayos previos realizados en la misma especie (Frontera *et al.,* 2011).

c) Variables analizadas

- **Mortalidad**

Durante el ensayo se registraron diariamente las muertes y los eventos de muda observados.

- **Peso, largo del cefalotórax y largo total**

Al concluir el ensayo, los juveniles fueron pesados con balanza de precisión, medidos bajo lupa con ocular micrométrico (largo total y largo de cefalotórax) y luego fijados en formol al 5%. La medida del largo de cefalotórax se tomó desde el extremo del rostrum hasta la línea definida por la inserción del pleon, y el largo total se midió desde el rostrum hasta el extremo del urópodo más largo.

RESULTADOS

Ensayo 1: **Exposición de hembras ovígeras de *N. granulata.***

La validación de las concentraciones nominales utilizadas en el presente ensayo se muestran en la Tabla 2 del Capítulo 2 (ensayo de remaduración gonadal). Como se mencionara oportunamente, la correlación entre concentraciones nominales y concentraciones medidas fue muy buena (r^2= 0,988 y r^2= 0,954 para tiempo t= 0 y t= 72

hs, respectivamente). Durante el período de incubación no se registró mortalidad de las hembras, que presentaron un peso corporal promedio de 9,85 ± 0,43 gr al finalizar el ensayo (no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los tratamientos). No se registró pérdida de huevos en las hembras durante la incubación, por lo que el 100% de las hembras presentó una eclosión normal (Tabla 6). El tiempo de incubación promedio fue de 9,86 ± 0,57 días, no observándose diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$) (Tabla 6). Si bien, en comparación con el control, el número promedio de larvas eclosionadas por hembra fue menor en todos los tratamientos con glifosato (ácido y formulado), sólo se observó una reducción estadísticamente significativa ($p<0,05$) en el tratamiento Roundup 2,5 mg/L (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de hembras con eclosión, tiempo de exposición hasta la eclosión y número de larvas eclosionadas por hembra (promedio ± error estándar). El número de larvas eclosionadas por tratamiento, representa el promedio de la media de las dos submuestras medidas. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control ($p<0,05$).

Concentración nominal (mg/L)	**n**	**♀ con eclosión (%)**	**días hasta eclosión (promedio ± ES)**	**número de larvas eclosionadas (promedio ± ES)**
0 - Control	11	100,00	9,72 ± 1,28	33745 ± 4969
2,5 - Glifosato	11	100,00	11,27 ± 1,34	26739 ± 5519
5 - Glifosato	11	100,00	9,18 ± 0,76	25411 ± 4504
2,5 - Glifosato en Roundup Ultramax®	11	100,00	9,27 ± 1,11	15448 ± 2036*

En la Figura 39 se presentan las anormalidades morfológicas observadas en las larvas que eclosionaron de las hembras expuestas al glifosato durante el período de incubación, así como en las larvas provenientes de hembras control. La mayor proporción de patologías encontradas fueron: hidropesía (Figura 39D), relacionada con una hidratación anormal de los tejidos, especialmente en el cefalotórax; atrofia de espinas y setas, probablemente no evaginadas, especialmente en los maxilipedios (Figura 39F); atrofia de los ojos, mostrando un contorno irregular (Figura 39D); y ojos hipopigmentados, debido a una distribución anormal de pigmentos de pantalla en las omatidias (Figura 39E).

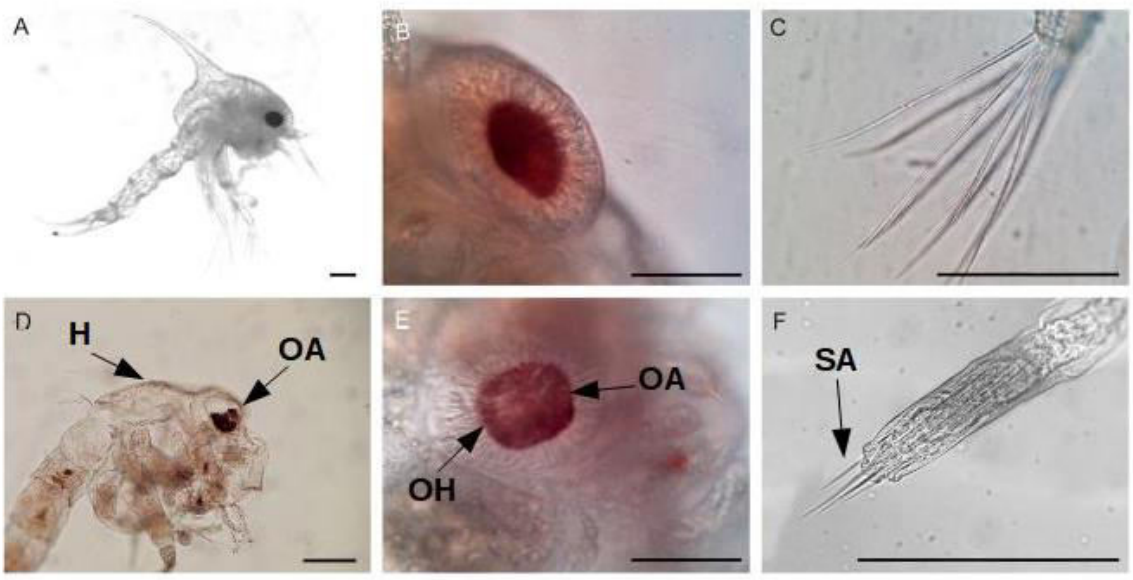


Figura 39. Anomalías observadas en larvas eclosionadas de hembras ovígeras de *Neohelice granulata* expuestas al glifosato. A, B, C: control, D, E, F: expuestas a glifosato ácido. OH: ojo hipopigmentado; OA: ojos atrofiados; H: hidropesía; SA: Setas en maxilipedios atrofiadas. Barra de escala = 100 µm.

La incidencia de estas anomalías se muestra en la Figura 40. En comparación con el control, se observó un número significativamente mayor ($p<0,05$) de larvas con hidropesía (Figura 39D) y también de larvas cuyos ojos presentaban hipopigmentación

(Figura 39E), tanto para glifosato ácido como para Roundup (2,5 mg/L de glifosato en ambos casos). Además, se observó una mayor incidencia de ojos atrofiados (Figura 39D, 39E), con su contorno irregular, en el tratamiento Roundup.

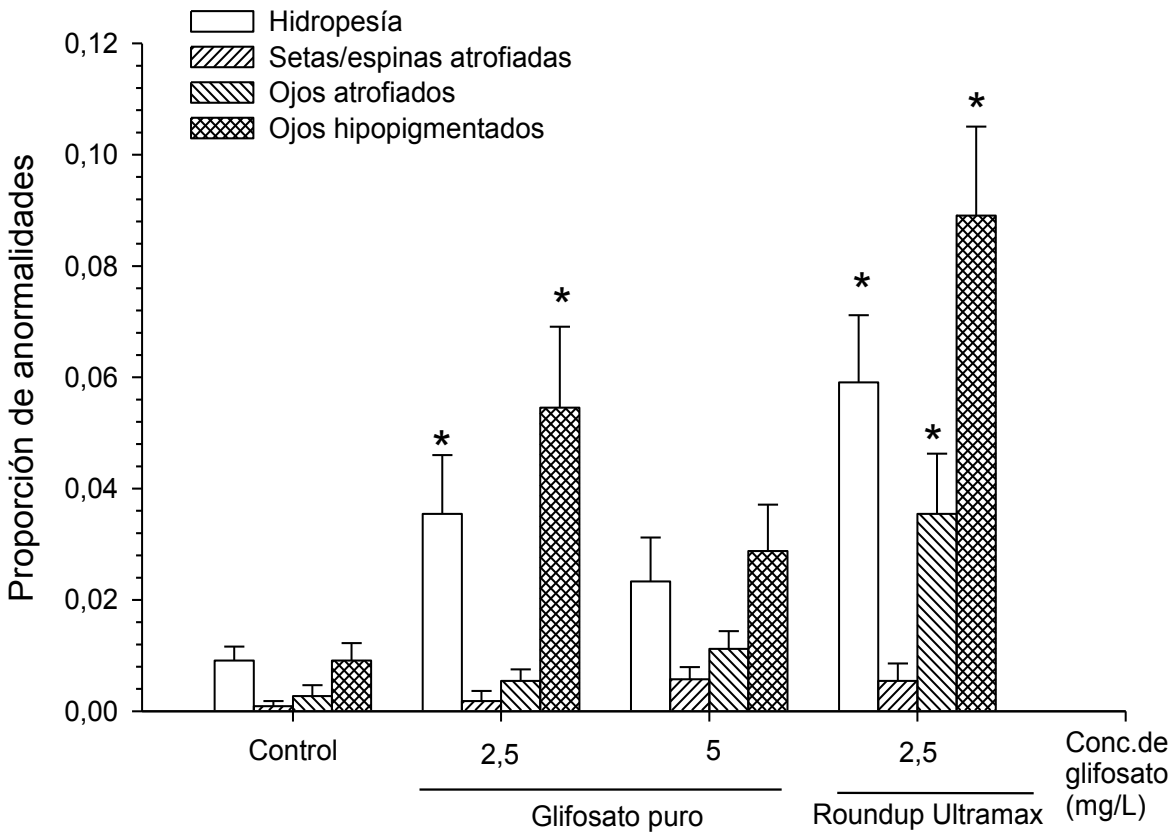


Figura 40. Porcentaje de larvas con anormalidades por tratamiento (promedio ± error estándar). El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control ($p<0,05$). Los datos fueron transformados (transformación angular) a fin de cumplir con los supuestos del análisis.

Ensayo 2: **Exposición de hembras ovígeras de *N. heteropoda heteropoda*.**

En la Tabla 7 se presentan los resultados del ensayo, considerando únicamente la concentración que resultó ser relativamente subletal (1 mg/L). Cabe aclarar que todas las

hembras expuestas a 5 mg/L murieron transcurridos 18 días de exposición, registrándose la pérdida de la puesta durante los primeros diez días de exposición. Asimismo, todas las hembras control y expuestas a 1 mg/L de glifosato que murieron, perdieron la puesta previamente. En las hembras sobrevivientes, no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el tiempo de incubación, registrado como días transcurridos hasta la eclosión, que varío entre 13 y 17 días. Tampoco se registraron diferencias significativas ($p>0,05$) en la cantidad de juveniles eclosionados por hembra, ni en el largo del cefalotórax (longitud promedio= 1,17 ± 0,01 mm; N= 80). Por el contrario, en los juveniles eclosionados a partir de hembras expuestas a glifosato se registró, con respecto a los juveniles eclosionados de hembras control, una cantidad significativamente mayor ($p<0,05$) de vitelo almacenado en el cefalotórax (Figura 41).

Tabla 7. Mortalidad, porcentaje de hembras con eclosión, tiempo de exposición hasta la eclosión y número de juveniles eclosionados por hembra. El asterisco indica diferencias significativas con respecto al control ($p<0,05$).

Concentración nominal de glifosato (mg/L)	**N**	**Mortalidad (%)**	**♀ con eclosión (%)**	**Días hasta la eclosión**	**Nro. de juveniles eclosionados**	**Juveniles con exceso de vitelo (%)**
0 (Control)	11	20,00	80,00	14,25 ± 0,45	13,13 ± 2,93	0,00 ± 0,00
1	8	12,50	87,50	14,86 ± 0,51	24,86 ± 4,28	12,77 ± 1,65*

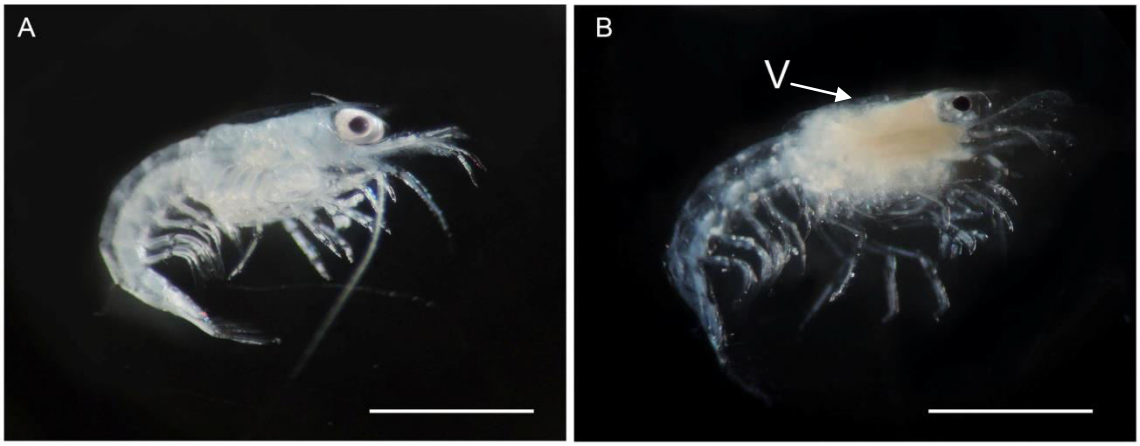


Figura 41. Anomalías observadas en los juveniles eclosionados a partir de hembras ovígeras de *N. heteropoda heteropoda* expuestas al glifosato. A: control, B: expuesta a glifosato ácido (1 mg/L). V: vitelo. Barra de escala = 1 mm.

Ensayo 3*: Cultivo *in vitro* de huevos aislados de *C. quadricarinatus.

La mortalidad de los organismos control (superior al 20%) fue la esperada al tratarse de una incubación *in vitro*. De todos modos, la mortalidad registrada en el tratamiento 50 mg/L de Roundup Ultramax superó significativamente ($p<0,05$) a la registrada en el control (Figura 42).

Al finalizar el ensayo, la mayoría de los organismos sobrevivientes alcanzaron el primer estadio juvenil de vida libre (juvenil III); solo el 6% y el 12,5% de los organismos expuestos, respectivamente a la concentración más alta de glifosato ácido y a Roundup, se encontraron en un estadio previo (post-embryo II, equivalente a juvenil II), sin diferir significativamente ($p>0,05$) del control. La Tabla 8 detalla en que estadio se encontraban tanto los organismos que murieron como los que sobrevivieron al período de exposición.

Tabla 8. Número (N) y estadio determinado tanto para los eclosionantes de *C. quadricarinatus* que murieron como para los sobrevivientes, al finalizar el período de exposición. Estadio h: hatching o eclosionantes; pe I: post-embryo I; pe II: post-embryo II; j: juveniles (juvenil III).

Parámetros numéricos	**Control**	**10 mg/L**		**50 mg/L**	
		Glifosato ácido	**Glifosato en Roundup Ultramax**	**Glifosato ácido**	**Glifosato en Roundup Ultramax**
N inicial	27	22	30	30	30
N muertos	10	9	10	15	22
Estadio **h**	2	2	4	3	5
Estadio **pe I**	8	3	5	8	6
Estadio **pe II**	-	4	1	3	11
Estadio **j**	-	-	-	1	-
N sobrevivientes	17	13	20	15	8
Estadio **pe II**	-	-	-	1	1
Estadio **j**	17	13	20	14	7

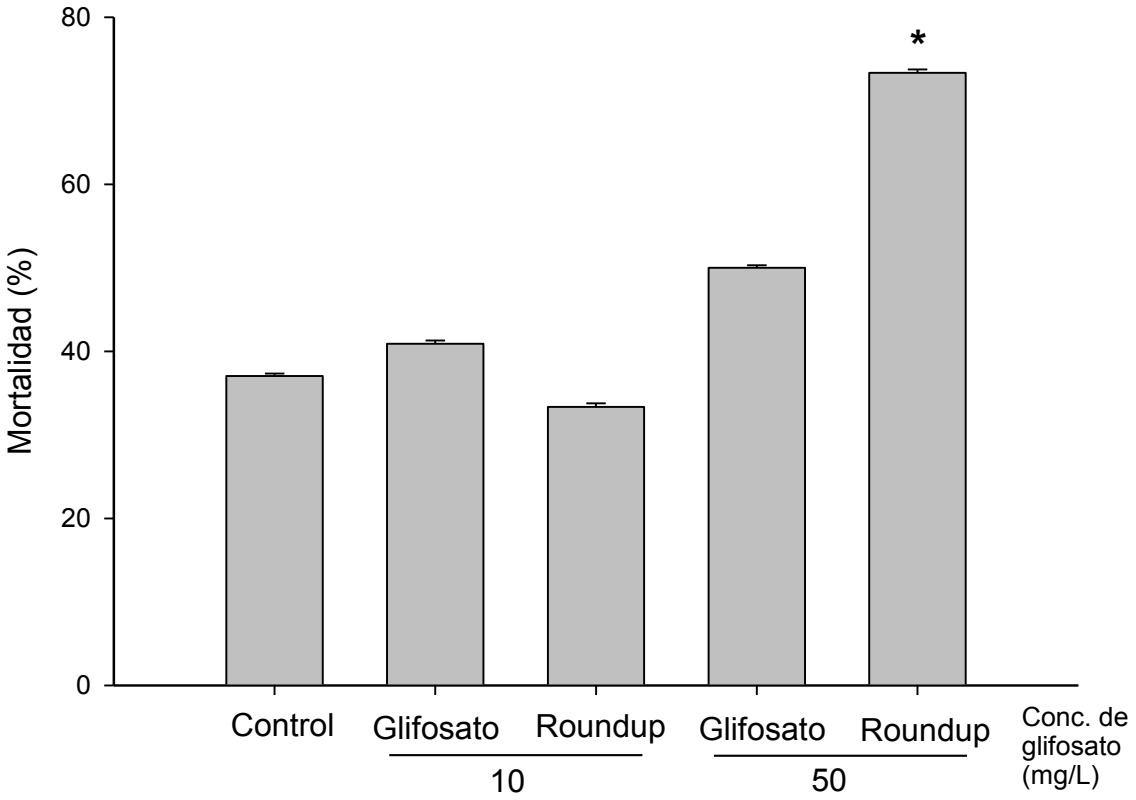


Figura 42. Porcentaje de mortalidad registrada al finalizar el ensayo con huevos aislados de *C. quadricarinatus*. Todos los valores están representados como el promedio ± error estándar. El asterisco indica diferencias significativas respecto al control ($p<0,05$).

Al finalizar el ensayo, los organismos tratados con la mayor concentración de Roundup Ultramax presentaron un peso corporal significativamente menor ($p<0,05$) que los controles (Tabla 9). Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los organismos control y tratados respecto al largo del cefalotórax, sí se encontró una disminución significativa ($p<0,05$) en el largo total, entre los controles y los expuestos a la concentración más alta de Roundup Ultramax, en correlación con las diferencias significativas encontradas en el peso corporal, para los mismos grupos experimentales.

Tabla 9. Variables morfométricas medidas (promedio ± error estándar) en los eclosionantes de *C. quadricarinatus* que sobrevivieron al finalizar el ensayo. L cef: largo del cefalotórax; L tot: largo total. El N de cada tratamiento se corresponde con el N de sobrevivientes de la Tabla 8. El asterisco indica diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto al control.

Variable medida	Control	10 mg/L		50 mg/L	
		Glifosato ácido	Glifosato en Roundup Ultramax	Glifosato ácido	Glifosato en Roundup Ultramax
Peso (mg) ± ES	10,21 ± 0,78	10,08 ± 0,98	9,99 ± 0,73	10,07 ± 1,28	8,50 ± 1,12*
L cef (mm) ± ES	3,7 ± 0,30	3,5 ± 0,27	3,75 ± 0,24	3,63 ± 0,29	3,56 ± 0,21
L tot (mm) ± ES	6,72 ± 0,40	6,79 ± 0,41	6,88 ± 0,20	6,71± 0,45	6,40 ± 0,43*

DISCUSIÓN

El presente capítulo tuvo como premisa evaluar los efectos del glifosato, ácido y/o formulado sobre los primeros estadios de vida de especies de crustáceos que presentan distintos tipos de desarrollo embrionario, de acuerdo con el ambiente acuático en el que habitan: estuarial, en el caso de *N. granulata*, y dulciacuícola, en el caso de *N. heteropoda heteropoda* y de *C. quadricarinatus*.

El glifosato, al igual que otros bioelementos esenciales y no esenciales, podría afectar a los embriones por dos vías: por transferencia materna (a través del vitelo) o directamente

atravesando el corion (Bakker *et al.,* 2017). Dados los modelos utilizados (hembras ya ovígeras o huevos aislados) solamente evaluamos la segunda posibilidad. Las tres especies estudiadas fueron expuestas al herbicida durante un período que comprendió de 10 a 16 días, lo cual representó casi todo el periodo de incubación en *N. granulata* y *N. heteropoda heteropoda*, y sólo el desarrollo tardío en *C. quadricarinatus*.

Se sabe que el corion es una estructura dinámica durante todo el desarrollo embrionario y representa una barrera de protección para el embrión a los agentes microbianos, físicos y químicos del ambiente acuático, mientras que permite el paso de gases y otros metabolitos (Glas *et al.,* 1997). Utilizando isotiocianato de fluoresceína (FITC) y dextrinas marcadas de diferentes pesos moleculares, estos autores encontraron en *Palaemonetes pugio* que la permeabilidad del corion disminuye entre 0 y 5 días después de la oviposición, y luego aumenta hasta la eclosión (la especie presenta un período de incubación total de 12 días). Ante esta evidencia, podríamos presumir que el ingreso del glifosato a través del corion sería potencialmente más probable durante la segunda mitad del período de incubación, pudiendo en consecuencia afectar el desarrollo de las tres especies ensayadas.

En el ensayo con *N. granulata*, se redujo el número de larvas eclosionadas de hembras tratadas con el formulado comercial Roundup que contenía glifosato a 2,5 mg/L. Sin embargo, el glifosato ácido aplicado a la misma concentración no redujo el número de larvas eclosionadas, lo cual estaría indicando una mayor facilidad del formulado para atravesar el corion. Esta diferencia probablemente fue causada por los coadyuvantes presentes en la formulación comercial, diseñados precisamente para facilitar el ingreso

del herbicida a través de la cutícula vegetal. El efecto letal que puedan haber ejercido los coadyudantes *per se* tampoco puede descartarse. En hembras ovígeras de *N. granulata* expuestas al insecticida organofosforado paratión, en mezcla con coadyuvantes de uso comercial, también se vio una disminución en el número de larvas eclosionadas aunque a una concentración tan baja como 30 µg/L, debido a la elevada neurotoxicidad de este insecticida (Rodríguez y Pisanó, 1993).

Si bien se han encontrado anormalidades similares en larvas eclosionadas de *N. granulata* por exposición a diferentes plaguicidas (Rodríguez y Pisanó, 1993) o metales pesados (Rodríguez y Medesani, 1994; Zapata *et al.,* 2001), la incidencia relativa de las anomalías detectadas en las larvas expuestas a glifosato en el presente estudio mostró un patrón particular. En este sentido, las anormalidades que mostraron mayor incidencia fueron aquellas relacionadas con los ojos (atrofia e hipopigmentación).

Una condición grave de atrofia de ojos, pero no así de hipopigmentación, se ha reportado asociada a la exposición a paratión, capaz de interferir con la inducción que el sistema nervioso ejerce sobre la formación de los ojos (Rodríguez y Pisanó, 1993). Por otra parte se han reportado ojos hipopigmentados, pero no atrofiados, luego de la exposición a algunos metales pesados, como cobre, zinc y mercurio, probablemente debido a la inhibición de las enzimas involucradas en la síntesis de los pigmentos oculares de pantalla (Zapata *et al.,* 2001; Sánchez *et al.,* 2005, entre otros). El glifosato, en su versión formulada, causó simultáneamente ambas patologías mencionadas (atrofia e hipopigmentación ocular), aunque con una incidencia relativamente baja (menor al 10%). El patrón de patologías causado por glifosato se completa con una hidropesía

significativa, una patología que ha demostrado ser claramente inespecífica, ya que ha sido reportada en estudios con otros contaminantes, factores de estress o metales en hembras ovígeras de esta especie (Rodríguez *et al.,* 2007). Finalmente, a diferencia de lo reportado en los estudios mencionados, el glifosato no produjo una incidencia significativa en la atrofia de setas y espinas, en correlación con un tiempo de incubación de huevos similar al del control. En este sentido, es importante tener en cuenta que la eversión de setas y espinas ocurre hacia el final del desarrollo embrionario (Amin *et al.,* 1998).

Mientras que la atrofia de los ojos se observó sólo con el formulado Roundup, se observaron ojos hipopigmentados tanto con Roundup como con glifosato ácido, a igual concentración (2,5 mg/L, e. a.). Este resultado indica que, al menos en lo referente a la hipopigmentación ocular, el causante es el propio glifosato, aunque el mecanismo por el cual produjo esta patología queda aún por dilucidarse. Se sabe que los procesos teratogénicos pueden ser de origen genético o ambiental, en este último caso, por exposición a agentes biológicos y/o físico-químicos incluyento los medicamentos e irradiaciones que pueden producir desórdenes genéticos y/o interferir con actividades celulares responsables de los procesos morfogenéticos y de diferenciación celular, pudiendo causar asimismo alteraciones en el metabolismo celular y en el status nutricional (Herkovits y Pérez Coll, 2006). Se han descripto en peces efectos genotóxicos (inducción de micronúcleos) por exposición a algunas formulaciones de glifosato (Vera-Candioti *et al.,* 2013). También fueron reportados efectos genotóxicos y de desarrollo en caimanes expuestos durante la etapa embrionaria temprana a diferentes concentraciones subletales de glifosato y Roundup (Poletta *et al.,* 2011). Mottier *et al.* (2012) han

informado varias anomalías embrionarias e incluso la interrupción del desarrollo en ostras expuestas tanto a glifosato ácido como a varias formulaciones comerciales de Roundup, mostrando estas últimas la mayor toxicidad relativa.

Pese a que no se observó una diferencia de tamaño entre los juveniles eclosionados de *N. heteropoda heteropoda* controles y tratados, la presencia de vitelo estaría relacionada a una diferencia en su consumo, lo que nos lleva a postular un posible arresto metabólico en los juveniles pre-expuestos al glifosato durante el desarrollo embrionario. Así, la presencia de mayor cantidad de vitelo en los juveniles eclosionados, expuestos a 1 mg/L de glifosato ácido, podría estar relacionado a un desbalance metabólico de los embriones, reflejado en una menor tasa metabólica y consecuentemente en un menor consumo de vitelo en los organismos expuestos al herbicida. También la presencia de vitelo podría deberse a una eclosión temprana de estos juveniles, pero ante nuestros resultados, esta posibilidad quedaría descartada ya que no se observó una disminución significativa en el tiempo de incubación.

La posibilidad de que estos organismos estuviesen experimentando un arresto metabólico fue reportada en juveniles de *Procambarus clarkii,* expuestos a 22,5 mg/L de glifosato ácido y a la mezcla de glifosato y POEA, en los que se vio un aumento de la glucosa hemolinfática y un descenso en la tasa de consumo de oxígeno, disminuyendo el metabolismo aeróbico (Frontera *et al.,* 2014). De manera similar, en juveniles avanzados de *C. quadricarinatus* también se observó una menor tasa de consumo de oxígeno durante la exposición crónica a la misma concentración de glifosato (22,5 mg/L) (Frontera *et al.,* 2011).

Los resultados obtenidos en los juveniles de *N. heteropoda heteropoda* apoyarían la hipótesis planteada en juveniles tempranos de *C. quadricarinatus* (Capítulo 1 de la presente tesis), ya que la presencia de vitelo podría relacionarse con una disminución de la tasa metabólica. En los juveniles tempranos de *C. quadricarinatus* se observó un descenso en la actividad de la piruvato quinasa, una enzima clave del ciclo de Krebs, junto con un descenso en la ganancia en peso de los organismos expuestos al herbicida.

De manera similar a lo discutido previamente para los estadíos tempranos de *N. granulata*, los resultados observados en el ensayo con huevos de *C. quadricarinatus* mostraron que a 50 mg/L de glifosato en el formulado Roundup, la mortalidad de los organismos se vio incrementada, a diferencia de lo observado con el principio activo ácido. Más aún, en los juveniles sobrevivientes al tratamiento Roundup 50 mg/L, tanto el peso corporal como el largo total fueron significativamente menores que en el control. Estos resultados evidencian que el ingreso de glifosato a través del corion se vio afectado de manera diferencial por los coadyuvantes presentes en el formulado comercial, originalmente diseñados para facilitar el ingreso del herbicida a las malezas. En consecuencia, tal facilitación se daría también para el caso de los huevos de crustáceos de agua dulce, de manera similar a lo discutido más arriba para el desove del cangrejo estuarial *N*. *granulata.*

En el Capítulo 1 de la presente Tesis propusimos que la disminución significativa en la ganancia de peso de los juveniles tempranos utilizados podría estar relacionada con la mayor sensibilidad de estos juveniles más pequeños y más jóvenes (aproximadamente 1 gr de peso corporal), en comparación con los juveniles avanzados de la misma especie

(Frontera *et al.,* 2011). Varios estudios realizados sobre ambos tamaños de juveniles han mostrado claramente una diferencia de sensibilidad entre ellos (Jones, 1997; Barki y Karplus, 2004), siendo más sensibles los juveniles tempranos que los avanzados. Sin embargo, en embriones sin eclosionar, las concentraciones que presentan efectos son mayores a las reportadas para los juveniles de vida libre. Todo indica que esta diferencia se debe a la presencia del corion, que actúa como barrera de protección para los embriones y también, en el caso de *C. quadricarinatus,* protege a los primeros estadios juveniles (juveniles I y II), que se desarrollan dentro de los huevos desovados.

CONCLUSIONES FINALES

- Los juveniles tempranos de *C. quadricarinatus*, expuestos durante 60 días a 10 y 40 mg/L de glifosato ácido, disminuyeron su ganancia en peso y los niveles de lípidos y/o proteínas en músculo y hepatopáncreas. Estos efectos habrían ocurrido durante la fase de resistencia al estrés generado por el glifosato sobre los juveniles tempranos.
- En los mismos juveniles se detectó una menor actividad de piruvato kinasa en el músculo, lo que estaría indicando una posible depresión metabólica asociada a la fase final de agotamiento frente al glifosato, actuando como estresante.
- En tales juveniles, el cociente entre los niveles hemolinfáticos de las enzimas ASAT y ALAT aumentó significativamente por efecto de glifosato, indicando un posible daño a varios tejidos.
- Las hembras adultas de *N. granulata*, expuestas durante el período pre-reproductivo completo (90 días) a 0,02; 0,2 y 1 mg/L de glifosato ácido mostraron, además de una reducción de su ganancia en peso, una incidencia significativa de reabsorciones oocitarias, indicando un cuadro de resistencia al estrés producido por el herbicida.
- Los ensayos *in vitro* realizados durante el período pre-reproductivo sugieren que las reabsorciones oocitarias podrían estar mediadas por la secreción de alguna hormona peduncular, tal como GIH ó CHH.
- Tanto *in vivo* como *in vitro* se observó, durante el período pre-reproductivo, un aumento del tamaño de los oocitos previtelogénicos por efecto de glifosato. Los ensayos *in vitro* sugieren, como posible explicación, que el glifosato podría estar actuando como un desorganizador endocrino al aumentar la secreción de algún esteroide de origen ovárico y/o actuar como agonista de alguna de las varias hormonas estimulantes del crecimiento gonadal.

- En las hembras adultas de *N. granulata* remadurantes expuestas durante 32 días, en el período reproductivo, a 2,5 y 5 mg/L de glifosato ácido, si bien se observó un cierto aumento en la incidencia de reabsorciones oocitarias, el efecto significativo observado fue una estimulación del crecimiento ovárico, tanto a nivel macro como microscópico. Este resultado refuerza aún más la hipótesis del glifosato como posible desorganizador del control endocrino del crecimiento gonadal.
- La exposición de hembras ovígeras de *N. granulata* a 2,5 mg/L de glifosato en la formulación comercial Roundup Ultramax®, produjo en las larvas eclosionadas tanto una reducción significativa en su número como una mayor incidencia de malformaciones (hidropesía, ojos atrofiados e hipopigmentación ocular). Por el contrario, la exposición a 2,5 y 5 mg/L de glifosato ácido produjo esos efectos en menor grado, sugiriendo que la presencia de coadyuvantes en la formulación comercial utilizada facilita el ingreso del herbicida a través del corion que protege los huevos desovados, sin descartar los efectos de los coadyuvantes *per se.*
- Los juveniles eclosionados de hembras ovígeras de *N. heteropoda heteropoda* expuestas a 1 mg/L de glifosato ácido mostraron una acumulación anormal de vitelo, reforzando la hipótesis del arresto metabólico planteada para los juveniles tempranos de *C. quadricarinatus.*

- La exposición de embriones de *C. quadricarinatus* durante el desarrollo tardío, mostró tanto un aumento de la mortalidad como una disminución en el incremento de peso y tamaño, pero sólo a la concentración de 50 mg/L de glifosato en la formulación Roundup Ultramax®, mientras que estos efectos significativos no se observaron a la misma concentración de glifosato ácido. Nuevamente, los coadyuvantes presentes en

el formulado parecen facilitar el ingreso del herbicida a los huevos desovados, que en esta especie han demostrado, de todos modos, ser más resistentes a la exposición al herbicida en comparación con las otras dos especies estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

Abdu, U., Yehezkel G. y Sagi A. 2000. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Invertebrate Reproduction and Development, 37 (1): 75-83.

Álvarez, N.B., Avigliano, L., Mac Loughlin, C. y Rodríguez, E.M. 2015. The adverse effect of the herbicide atrazine on the reproduction in the intertidal varunid crab *Neohelice granulata* (Dana, 1851). Regional Studies in Marine Science, 1: 1-6.

Altieri, M.A. y Pengue, W. 2006. La soja transgénica en América Latina. Una máquina de hambre, deforestación y devastación socioecológica. Biodiversidad, 47: 14-19.

Amin, O.A., Rodríguez, E.M., Hernando, M., Comoglio, L.I., López, L.S. y Medesani, D.A. 1998. Effects of lead and cadmium on hatching of the southern king crab *Lithodes santolla* (Decapoda, Anomura). Invertebrate Reproduction and Development, 33(1): 81-85.

Anger, K. 1995. The conquest of freshwater and land by marine crabs: adaptations in life-history patterns and larval bioenergetics. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 193: 1-2.

Aparicio, V.C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P. y Costa, J.L. 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. Chemosphere, 93 (9): 1866-1873.

APHA, American Public Health Association. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewaters. 21°, Ed. APHA.

ArgenBio. 2017. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. www.argenbio.org

Arregui, M.C., Beldoménico, H.R., Cassano, A.E., Collins, P., Gagneten, A.M., Kleinsorge, E.C., Lajmanovich, R.C., Lenardón, A., Lorenzatti, E., Luque, E.H., Maitre, M.I., Muñoz de Toro, M., Ortega, H.H., Peltzer, P.M., Poletta, G.L., Rodríguez, A.R., Sánchez, D., Scagnetti, J., Simoniello, M.F., Varayoud, J. y Zalazar, C.S. 2010. Informe acerca del grado de toxicidad del glifosato. Ed. Comisión de la Universidad Nacional del Litoral.

Bach, N.C., Natale, G.S., Somoza, G.M. y Ronco, A.E. 2016. Effect on the growth and development and induction of abnormalities by a glyphosate commercial formulation and its active ingredient during two developmental stages of the South-American Creole frog, *Leptodactylus latrans*. Environmental Science and Pollution Research, 23 (23): 23959-23971.

Bakker, A.K., Dutton J., Sclafani M. y Santangelo N. 2017. Accumulation of nonessential trace elements (Ag, As, Cd, Cr, Hg and Pb) in Atlantic horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) early life stages. Science of the Total Environment, 596: 69-78.

Barbier, Cécile. 2010. Crevettes d'eau douce en aquariophilie : exemple de maintenance de la *Neocaridina heteropoda* pour les débutants. Tesis doctoral, Universidad de Toulouse.

Barki, A. y Karplus, I. 1999. Mating behavior and a behavioral assay for female receptivity in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. Journal of Crustacean Biology, 19 (3): 493-497.

Barki, A. y Karplus, I. 2004. Size rank and growth potential in redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*): Are stunted juveniles suitable for grow-out? Aquaculture Research, 35 (6): 559-567.

Barki, A., Levi, T., Gideon, H. y Karplus, I. 1997. Annual cycle of spawning and molting in the red-claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under laboratory conditions. Aquaculture 157: 239-49.

Barnes, R.S.K., Calow, P. y Olive P.J.W. 1993. The invertebrates: a new synthesis. 2°, Ed. Blackwell Scientific Publications Ltd.

Battaglin, W.A., Meyer, M.T., Kuivila, K.M. y Dietze, J.E. 2014. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. Journal of the American Water Resources Association, 50 (2): 275-290.

Bauer, R. T. 2011. Chemical communication in decapod shrimps: the Influence of mating and social systems on the relative importance of olfactory and contact pheromones. En: Chemical Communication in Crustaceans, Ed. Springer, 277-296.

Bauer, R.T. 2004. Remarkable shrimps: adaptations and natural history of the Carideans. Ed: University of Oklahoma Press.

Beltrame, M.O., De Marco, S.G. y Marcovecchio J.E. 2011. The burrowing crab *Neohelice granulata* as potential bioindicator of heavy metals in estuarine systems of the Atlantic coast of Argentina. Environmental Monitoring and Assessment, 172 (1-4):379-389.

Beltrame, M.O., De Marco, S.G. y Marcovecchio J.E. 2010. Influences of sex, habitat, and seasonality on heavy-metal concentrations in the burrowing crab (*Neohelice granulata*) from a coastal lagoon in Argentina. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 58 (3): 746-756.

Benck Soso, A.B., Barcellos, L.J.G., Ranzani-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Lima, M., Bolognesi da Silva, L., Ritter, F., Calliari Bedin, A. y Finco, J. A. 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). Environmental Toxicology and Pharmacology, 23 (3): 308-313.

Bianchini, A., Machado Lauer, M., Maia Nery, L.E., Pinto Colares, E., Monserrat, J. M. y dos Santos Filho E.A. 2008. Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 151 (3): 423-436.

Boschi, E.E., Scelzo, M.A., y Goldstein, B. 1967. Desarrollo larval de dos especies de crustáceos decápodos en el laboratorio, *Pachycheles haigae* Rodrigues Da Costa (Porcellanidae) y *Chasmagnathus granulata* Dana (Grapsidae). Boletín del Instituto de Biología Marina, (12): 1-46.

Botto, J.L. e Irigoyen, H.R. 1972. Biología de la comunidad del cangrejal. Contribución al conocimiento biológico del cangrejo estuarino *Chasmagnatus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del Río Salado, provincia de Buenos Aires.

Memorias de Seminario sobre Ecología bentónica y sedimentación de la plataforma continental del Atlántico Sur (1).

Brusca, R.C. y Brusca, G.J. 2005. Invertebrates. Ed: McGraw-Hill Interamericana.

Bücher, T. y Pfleiderer, G. 1955. Pyruvate kinase from muscle: Pyruvate phosphokinase, pyruvic phosphoferase, phosphopyruvate transphosphorylase, phosphate-transferring enzyme II, etc. Phosphoenolpyruvate + ADP ⇌ Pyruvate + ATP. Methods in Enzymology, 1 (1): 435-440.

Cabrita, J.G.N. 2012. Estudo do comportamento do camarão *Neocaridina heteropoda* var. red em relação a diferentes substratos. Tesis doctoral, Universidad Técnica de Lisboa.

Cahansky, A.V., López Greco, L.S. y Rodríguez, E.M. 2002. Inducción de crecimiento ovárico en *Cherax quadricarinatus* mediante hormonas y neuroreguladores incorporados en el alimento. Congreso Iberoamiericano Virtual de Acuicultura, 3: 720-724.

Cahansky, A.V., Medesani, D.A., Rodríguez, E.M. 2008a. Induction of ovarian growth in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, by the enkephalinergic antagonist naloxone: *in vivo* and *in vitro* studies. Invertebrate Reproduction and Development, 51 (2): 61-67.

Cahansky, A.V., Kaiser Dutra B., da Silva Castiglioni, D., Turcato Oliveira, G., Bond Buckup, G. y Rodríguez, E.M. 2008b. Induction of ovarian growth in *Aegla platensis* (Crustacea, aeglidae) by means of neuroregulators incorporated to food. Revista de Biología Tropical, 56 (3): 1201-1207.

Cahansky, A.V. 2010. Inducción del crecimiento ovárico en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*, mediante la administración de antagonistas dopamineérgicos y encefalinérgicos. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.

Cahansky, A.V., Medesani, D.A., Chaulet, A., y Rodríguez, E.M. 2011. *In vitro* effects of both dopaminergic and enkephalinergic antagonists on the ovarian growth of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae), at different periods of the reproductive cycle. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 158 (1): 126-131.

Cai, Y. 1996. A revision of the genus *Neocaridina* (Crustacea: Decapoda: Atyidae). Acta Zootaxonómica Sinica, 21 (2): 129-160.

Canosa, I.S., Silveyra, G.R., Avigliano, L., Medesani D.A. y Rodríguez, E.M. 2018. Ovarian growth impairment after chronic exposure to Roundup Ultramax® in the estuarine crab *Neohelice granulata*. Environmental Science and Pollution Research, 25 (2): 1568–1575.

Carrasco, A. 2013. Efecto del glifosato en el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis* (Teratogénesis y glifosato). Laboratorio de Embriología Molecular, manuscrito.

CASAFE, Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. 2013. Guía de Productos Fitosanitarios. 15°, Ed. CASAFE.

Chang, E.S. y O'Connor, J.D. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. En: The Biology of Crustacea. 5°, Ed. Mantel, 263-287.

Chang, E.S., Chang, S.A., Keller, R., Sreenivasula, R., Snyder, M.J. y Spees, J.L. 1999. Quantification of stress in lobsters: crustacean hyperglycemic hormone, stress proteins and gene expression. American Zoologist, 495: 487-495.

Charmantier, G. 1997. Hormonal regulation of growth and reproduction in crustaceans. Recent Advances in Marine Biotechnology, 1: 109-161.

Charniaux-Cotton, H. 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. American Zoologist, 25: 197-206.

Chaulet, A., López Greco, L.S. y Rodríguez, E.M. 2008. Somatic growth of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* fed diets supplemented with ecdysone. Tópicos Especiais em Biología Aquática e Aqüicultura II, 305-313.

Chaulet, A., Medesani, D.A., Freitas, J., Cervino, A., Cervino, N. y Rodríguez, E.M. 2012. Induction of somatic growth in juvenile crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae), by ecdysone and insulin growth factor. Aquaculture, 370: 1-6.

Cooke, I.M., Haylett, B.A. y Weatherby, T.M. 1977. Electrically elicited neurosecretory and electrical responses of the isolated crab sinus gland in normal and reduced calcium salines. Journal of Experimental Biology, 70 (1): 125-149.

Da Silva Castiglioni, D., Cahansky, A.V., Rodríguez, E.M, Dutra, B.K., Oliveira, G.T. y Bond-Buckup, G. 2009. Indução do crescimento ovariano em *Aegla uruguayana* (Crustacea, Anomura, Aeglidae) mediante a incorporação de neuroreguladores ao alimento. Iheringia, Serie Zoologia, 99 (3): 286-290.

Daniels, H., D'abramo, L. y Graves, K. 1994. Ovarian developmental of females red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) as influenced by temperature and photoperiod. Journal of Crustacean Biology, 14: 530-537.

De Boeck, M.E. 2017. Biopolítica, territorio y agronegocios. Ludus Vitalis, 25 (47): 155-166.

De Kleijn, D.P.V. y Van Herp, F. 1998. Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapod crustaceans. Invertebrate Reproduction and Development, 33: 263-272.

Deepananda, K.H.M.A., Gajamange, D., de Silva, W.A.J.P. y Wegiriya, H.C.E. 2011. Acute toxicity of a glyphosate herbicide, Roundup®, to two freshwater crustaceans. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 39 (2): 169-173.

Dewes, L.J., Sandrini, J.Z., Monserrat, J.M. y Yunes, J.S. 2006. Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura). Ecotoxicology and Environmental Safety, 65 (2): 201-208.

Di Fiori, E., Pizarro, H., dos Santos Afonso, M. y Cataldo, D. 2012. Impact of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* on glyphosate concentration in water. Ecotoxicology and Environmental Safety, 81: 106-113.

Do Carmo Langiano, V. y Martinez, C.B. 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 147(2): 222-231.

Donadío de Gandolfi, M.C., García, S.I., Ghersa, C.M., Haas, A.I., Larripa, I., Marra, C.A., y Ricca, A. 2009. Evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente. Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos. Ed. Consejo Nacional De Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Drach, P. y Lafon, M. 1942. Etudes biochimiques sur le squelette tegumentaire des decapodes branchyoures (Variations au tours du cycle d´intermue). Archives de Zoologie Expérimentale et Générale, 82: 100-118.

Dreon, M.S., Heras, H. y Pollero, R.J. 2003. Metabolism of ovorubin, the major egg lipoprotein from the apple snail. Molecular and Cellular Biochemistry, 243 (1-2): 9-14.

Dutra, B.K., Fernandes, F.A. y Oliveira, G.T. 2008. Carbofuran-induced alterations in biochemical composition, lipoperoxidation, and Na+/K+ ATPase activity of *Hyalella pleoacuta* and *Hyalella curvispina* in bioassays. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 147 (2): 179-188.

Dutra, B.K., Fernandes, F.A., Failace, D.M. y Oliveira, G.T. 2011. Effect of Roundup® (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella Castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). Ecotoxicology, 20 (1): 255-263.

Dutra, B.K., Fernandes, F.A., Lauffer, A.L. y Oliveira, G.T. 2009. Carbofuran-induced alterations in the energy metabolism and reproductive behaviors of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 149 (4): 640-646.

Eleisegui P. 2017. Vivir entre pesticidas: ahora demostraron que el glifosato no alcanza a degradarse. http://el-galo.blogspot.com.ar/2017/07/vivir-entre-pesticidas-ahora.html.

El-Khaldi, A. T.F. 2010. Effect of different stress factors on some physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Saudi Journal of Biological Sciences, 17 (3): 241-246.

El-Shenawy, N S. 2009. Oxidative Stress Responses of Rats Exposed to Roundup and Its Active Ingredient Glyphosate. Environmental Toxicology and Pharmacology, 28 (3): 379-385.

Fanjul, E., Grela M.A., Canepuccia, A. y Iribarne O. 2008. The Southwest Atlantic intertidal burrowing crab *Neohelice granulata* modifies nutrient loads of phreatic waters entering coastal area. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 79 (2): 300-306.

Fanjul-Moles, M.L. 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 142: 390-400.

FAO, Fishery Statistics. 2008. Main producer countries of *Cherax quadricarinatus*. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cherax_quadricarinatus/en.

Fernandes, M.A.S., Mendonca, M.I.R., Marques, J.C. y Madeira, V.M.C. 1996. Seasonal changes in the biochemical composition and energy content of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) in the lower Mondego. Journal of Crustacean Biology, 14: 736-743.

Ferré, L.E. 2012. Niveles de vitelogenina en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae): ensayos *in vitro* e *in vivo*. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.

Ferreyroa, G.V. 2010. Efectos del glifosato en juveniles de *Cnesterodon decemmaculatus*. Tesis de Licenciatura, Universidad de Buenos Aires.

Fingerman, M. 1995. Endocrine mechanisms in crayfish, with emphasis on reproduction and neurotransmitter regulation of hormone release. American Zoologist, 35 (1): 68-78.

Fingerman, M. 1997. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. Invertebrate Reproduction and Development, 31 (1-3): 47-54.

Fingerman, M., Jackson, N.C., Nagabhushanam, R. 1998. Hormonally regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 120 (3): 343-350.

Fingerman, M. y Rodríguez, E.M. 2009. Regulación endócrina en crustáceos. En: Biotecnología Marina. Ed. AGT, 277-307.

Folch, J., Lees, M. y Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry, 226 (1): 497-509.

Frings, C.S. y Dunn, R.T. 1970. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. American Journal of Clinical Pathology, 53 (1): 89-91.

Frontera, J. 2010. Efectos tóxicos del glifosato y su formulación comercial sobre juveniles de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*. Tesis de Licenciatura, Universidad de Buenos Aires.

Frontera, J., Vatnick, I., Chaulet, A. y Rodríguez, E.M. 2011. Effects of glyphosate and polyoxyethylenamine on growth and energetic reserves in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). Archives Environmental Contamination Toxicology, 61: 590-598.

Frontera, J.L., Gilette, N., Hull, B., Korang, J., Amorim, C., Vatnick, I. y Rodríguez, E.M. 2014. Effects of glyphosate and polyoxyethylene amine on metabolic rate and energy reserves of *Procambarus clarkii* juveniles. Open Environmental Science, 8: 49-53.

Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M.L., Fischer, M. y Schönbrunn, E. 2006. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (35): 13010-13015.

FyO. 2017. Futuros y Opciones.com S.A. https://news.agrofy.com.ar/especiales/soja15-16/siembra-soja. http://www.fyo.com/.

García, F., Cunningham, M.L., Garda, H. y Heras, H. 2008. Embryo lipoproteins and yolk lipovitellin consumption during embryogenesis in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 151 (3): 317-22.

García-Guerrero, M., Villarreal, H. y Racotta, I. S. 2003a. Effect of temperature on lipids, proteins, and carbohydrates levels during development from egg extrusion to juvenile stage of *Cherax quadricarinatus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 147-154.

García-Guerrero, M., Hendrickx, M. E. y Villarreal, H. 2003b. Description of the embryonic development of *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Decapoda, Parastacidae), based on the staging method. Crustaceana, 76 (3): 269-280.

Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.C. y Seralini, G.E. 2009. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. Toxicology, 262 (3): 184-191.

Ghanawi, J. y Saoud, I.P. 2012. Molting, reproductive biology, and hatchery management of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). Aquaculture, 358: 183-195.

Giesy, J.P., Dobson, S., y Solomon, K.R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. En: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Ed. Springer, 35-120.

Gill, J.P.K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S. y Girdhar M. 2017. Glyphosate toxicity for animals. Environmental Chemistry Letters, 1-26.

Glas, P.S., Courtney, L.A, Rayburn, J.R. y Fisher, W.S. 1997. Embryonic coat of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. The Biological Bulletin, 192 (2): 231-42.

Glusczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., da Fonseca, M.B., de Araújo Pedron, F., Duarte, M.F. y Vieira, V.L.P. 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 65 (2): 237-241.

Glusczak, L., dos Santos Miron, D., Moraes, B. S., Simões, R. R., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M. y Loro, V. L. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 146 (4): 519-524.

Heerbrandt, T.C. y Lin, J. 2006. Larviculture of red front shrimp, *Caridina gracilirostris* (Atyidae, Decapoda). Journal of the World Aquaculture Society, 37 (2): 186-190.

Herkovits, J. y Pérez Coll, C. 2006. Teratogénesis y medio ambiente. En: Genética toxicológica (editado por M. Mudry y M. Carballo). Editorial de los Cuatro Vientos, 481-493.

Herreid, C.F. y Full, R.J. 1988. Energetics and locomotion. En: Biology of the land crabs. Ed. Cambridge University Press, 333-377.

Hickman, C.P., Larson, A., Roberts, L.S., Anson H.I. y Eisenhour, D.J. 2009. Principios integrales de zoología. 14°, Ed. McGraw-Hill.

Hillewaert, H. 2017. https://es.wikipedia.org/wiki/Malacostraca#/media/File:General_malacostracan_es.svg

Huberman, A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. Aquaculture, 191: 191-208.

IARC, International Agency for Research on Cancer. 2015. Monography: Glyphosate. https://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/2016/glyphosate_IARC2016.php

Jones, C. 1997. The biology and aquaculture potential of the tropical freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. Queensland Department of Primary Industries and Fisheries, 116.

Jones, D.K., Hammond, J.I. y Relyea, R.A. 2010. Roundup and amphibians: the importance of concentration, application time, and stratification. Environtal Toxicology and Chemistry 29 (9): 2016-2025.

Kamio, M., Matsunaga, S. y Fusetani, N. 2000. Studies on sex pheromones of the helmet crab, *Telmessus cheiragonus*: an assay based on precopulatory mate-guarding. Zoological Science, 17 (6): 731-733.

Karplus, I., Gideon, H. y Barki, A. 2003. Shifting the natural spring–summer breeding season of the Australian freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* into the winter by environmental manipulations. Aquaculture, 220 (1-4): 277-286.

Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M. y Cabagna, M.C. 2011. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 60 (4): 681-689.

Lavolpe, M., López Greco, L.S., Kesselman, D. y Rodríguez, E.M. 2004. Differential toxicity of copper, zinc, and lead during the embryonic development of *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura, Varunidae). Environmental Toxicology and Chemistry, 23 (4): 960-967.

Lawrence, C. y Jones, C. 2002. *Cherax*. En: Biology of freshwater crayfish. Ed. Holdich, 635-669.

Liu, L., Laufer, H., Wang, Y. y Hayes, T. 1997. A neurohormone regulating both methyl farnesoate synthesis and glucose metabolism in a Crustacean. Biochemical and Biophysical Research Communications, 237 (3): 694-701.

López Greco, L.S. 1997. Adquisición de la madurez sexual y caracterización del patrón de crecimiento y reproducción en *Chasmagnatus granulata* de Bahía Samborombón, Buenos Aires, Argentina. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.

López Greco, L.S. y Rodríguez E.M. 1999. Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). Cahiers de Biologie Marine, 40: 155-164.

López Greco, L.S., Rodríguez, E.M., Bolaños, J., Hernández, G. y Fingerman, M. 2002. Toxicity of copper sulphate during early and late embryonic development of a palaemonid shrimp (Crustacea). Invertebrate Reproduction and Development, 41: 1-3.

López Greco, L.S., Viau, V., Lavolpe, M., Bond-Buckup, G. y Rodríguez, E.M. 2004. Juvenile hatching and maternal care in *Aegla uruguayana* (Anomura, Aeglidae). Journal of Crustacean Biology, 24 (2): 309-313.

López Greco, L.S., Vazquez, F. y Rodríguez, E.M. 2007. Morphology of the male reproductive system and spermatophore formation in the freshwater "red claw" crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). Acta Zoológica, 88 (3): 223-229.

Lorenzon, S., Francese, M. y Ferrero, E.A. 2000. Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 39 (2): 167-176.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Bological Chemistry, 193: 265-75.

Maeda, H. y Dudareva, N. 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. Annual Review of Plant Biology, 63 (1): 73-105.

Maldonado, H. 2002. Crustaceans as models to investigate memory illustrated by extensive behavioral and physiological studies in *Chasmagnathus*. En: The crustacean nervous system. Ed. Springer, 314-327.

Mann, R.M. y Bibwell, J.R. 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 36 (2): 193-199.

Martinetto, P., Valiñas, M., Palomo, G. y Iribarne, O. 2007. Negative interactions between two SW Atlantic intertidal crabs in soft-bottom habitats. Marine Biology, 151 (4): 1479-1490.

Mayer, F.L., Versteeg, D.J., McKee M.J., Folmar, L.C., Graney, R.L, McCume, D.C. y Rattner B.A. 1992. Physiological and nonspecific biomarkers. En: Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Eds: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L., 5-85.

Mazeaud, M.M., Mazeaud, F., y Donaldson, E.M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. Transactions of the American Fisheries Society, 106 (3): 201-212.

McKenzie, D.J., Garofalo, E., Winter, M.J., Ceradini, S., Verweij, F., Day, N., Hayes, R., van der Oost R., Butler P.J., Chipman J.K. y Taylor E.W. 2007. Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 362 (1487): 2043-2059.

Medesani, D.A., López Greco, L.S. y Rodríguez E.M. 2004a. Disruption of endocrine regulation of glycemia levels by cadmium and copper in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 73 (5): 942-946.

Medesani, D.A., López Greco, L.S. y Rodríguez, E.M. 2004b. Interference of cadmium and copper with the endocrine control of ovarian growth, in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. Aquatic Toxicology, 69 (2): 165-174.

Melón, D., Zuberman, F., Verseñassi, D., Viale, E., Flores, C., Sarandon, S. y Rodríguez Striebeck, M.P. 2014. La Patria Sojera: el modelo agrosojero en el Cono Sur. Ed. El Colectivo.

Méndez Lecuanda, A. 2012. Red Cherry Shrimp, (*Neocaridina heteropoda* var. red). Plants and Shrimps. http://www.plantsnshrimps.com/gambas/red-cherry-shrimp-neocaridina-heteropoda-var-red/.

Menéndez-Helman, R., Salibián, A. y dos Santos Afonso, M. 2014. Lethal and sublethal Glyphosate effects on non-target fish species: biomarkers responses in *Cnesterodon decemmaculatus.* En: Handbook on herbicides: biological activity, classification and

health & environmental implications. Editores: Kobayashi, D. y Watanabe, E. Nova Science Publishers, Hauppauge, New York. 85-109.

Menéndez-Helman, R.J., Miranda, L.A., dos Santos Afonso, M. y Salibián, A. 2015. Subcellular energy balance of *Odontesthes bonariensis* exposed to a Glyphosate-based herbicide. Ecotoxicology and Environmental Safety, 114: 157-163.

Mensah, P.K., Muller, W.J. y Palmer, C.G. 2012. Using growth measures in the freshwater shrimp Caridina nilotica as biomarkers of Roundup® pollution of South African freshwater systems. Physics and Chemistry of the Earth, 50-52: 262-268.

Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J. y Seralini, G.E. 2015. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. Food and Chemical Toxicology, 84: 133-153.

Meusy, J.J. y Charniaux-Cotton, H. 1984. Endocrine control of vitellogenesis in Malacostraca crustaceans. Advances in Invertebrates Reproduction, 3: 231-241.

Mikó, Z., Ujszegi, J., Gál, Z., y Hettyey, A. 2017. Effects of a glyphosate-based herbicide and predation threat on the behaviour of agile frog tadpoles. Ecotoxicology and Environmental Safety, 140: 96-102.

Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentini, A., Lebel, J.M., Jha, A.N. y Costil, K. 2012. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquatic Toxicology, 128-129: 67-78.

Nagaraju, G.P.C. 2007. Is methyl farnesoate a crustacean hormone? Aquaculture, 272: 39-54.

Nagaraju, G.P.C. 2011. Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. Journal of Experimental Biology, 214 (1): 3-16.

Negro, C.L. 2013. Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae). Tesis doctoral, Universidad Nacional del Litoral.

Okada, E., Perez, D., De Geronimo, E., Aparicio V. y Costa, J. L. 2017. Agricultural non-point source pollution of glyphosate and AMPA at a catchment scale. En: EGU General Assembly Conference Abstracts. Ed. EGU, (19): 1946.

Osterberg, J.S., Darnell, K.M., Blickley, T.M., Romano, J.A. y Rittschof, D. 2012. Acute toxicity and sub-lethal effects of common pesticides in post-larval and juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 424-425: 5-14.

Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S.L., y Carrasco, A.E. 2010. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. Chemical research in toxicology, *23*: 10, 1586-1595.

Pantaleão, J.A.F., Barros-Alves, S.D.P., Tropea, C., Alves, D.F., Negreiros-Fransozo, M.L. y López-Greco, L.S. 2015. Nutritional vulnerability in early stages of the freshwater ornamental "red cherry shrimp" *Neocaridina davidi* (Caridea: Atyidae). Journal of Crustacean Biology, 35 (5): 676-681.

Pantaleão, J.A.F., Gregati, R.A., da Costa, R.C., López-Greco, L.S. y Negreiros-Fransozo, M.L. 2017. Post-hatching development of the ornamental 'Red Cherry Shrimp' *Neocaridina davidi* (Bouvier, 1904) (Crustacea, Caridea, Atyidae) under laboratorial conditions. Aquaculture Research, 48 (2): 553-569.

Parvathy, K. 1971. Glycogen storage in relation to the moult cycle in the two crustaceans *Emerita asiatica* and *Ligia exotica*. Marine Biology, 10 (1): 82-86.

Peruzzo, P.J., Porta, A.A. y Ronco, A.E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. Environtal Pollution, 156 (1): 61-66.

Petriella, A.M. y Boschi, E.E. 1997. Crecimiento en crustáceos decápodos: resultados de investigaciones realizadas en Argentina. Investigaciones Marinas, 25: 135-157.

Poletta, G.L., Kleinsorge, E., Paonessa, A., Mudry, M.D., Larriera, A. y Siroski, P.A. 2011. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in caiman latirostris exposed

in ovo to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. Ecotoxicology Environtal Safety, 74 (4): 852-859.

Primost, J.E., Marino, D.J.G., Aparicio, V.C., Costa, J.L. y Carriquiriborde, P. 2017. Glyphosate and AMPA, "pseudo-persistent" pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. Environmental Pollution, 229: 771-779.

Prymaczok, N.C., Medesani, D.A. y Rodríguez, E.M. 2008. Levels of ions and organic metabolites in the adult freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, exposed to different salinities. Marine and freshwater behaviour and physiology, 41 (2): 121-130.

Quassinti, L., Maccari, E., Murri, O. y Bramucci, M. 2009. Effects of paraquat and glyphosate on steroidogenesis in gonads of the frog *Rana esculenta in vitro*. Pesticide Bochemistry and Physiology, 93 (2): 91-95.

Rambabu, J.P. y Rao, M.B. 1994. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid, and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Müller). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 53 (1): 142-148.

Randall, D., Burggren, W., French, K. y Eckert, F.R. 2002. Animal Physiology, Mechanisms and adaptations. Ed. Freeman W.H. and Company Ltd.

Reitman, S. y Frankel, S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamate oxaloacetate transaminases. American Journal of Clinical Pathology, 28: 56–63.

Relyea, R. A. 2005. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of north american tadpoles. Archives Environmental Contamination Toxicology, 48 (3): 351-357.

Reno, U., Regaldo, L. y Gagneten, A.M. 2016. Efectos subletales de cuatro formulaciones de glifosato sobre *Daphnia magna* y *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea, Cladocera). Natura Neotropicalis, 47 (1): 7.

Reynolds, J.D. 2002. Growth and reproduction. En: Biology of freshwater crayfish. Ed. School of Life and Environmetnal Science, 152-191.

Ribeiro, S., Sousa, J.P., Nogueira A.J. y Soares, A.M. 2001. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 49 (2): 131-138.

Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N. y Seralini, G.E. 2005. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. Environmental Health Perspectives, 113 (6): 716-720.

Rodríguez Moreno, P.A., Medesani, D.A., y Rodríguez, E.M. 2003. Inhibition of molting by cadmium in the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda Brachyura). Aquatic Toxicology, 64 (2): 155-164.

Rodríguez, E.M. y Monserrat, J.M. 1991. Acute and chronic effects of paratión and 2,4 D on the oxygen consumption of *Chasmagnatus granulata* (Decapoda, Brachyura). Acta Physiologica, Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana, XLI: 201-210.

Rodríguez, E.M. y Pisanó, A. 1993. Effects of parathion and 2,4D to eggs incubation and larvae hatching in *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). Comparative Biochemestry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 104 (1): 71-78.

Rodríguez, E.M. y Medesani, D.A. 1994. Pathological lesions in larvae hatched from ovigerous females of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura) exposed to cadmium. Experientia, 50 (10): 975-977.

Rodríguez, E.M., Schuldt, M. y Romano, L. 1994. Chronic histopathological effects of parathion and 2,4-D on female gonads of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). Food and Chemical Toxicology, 32 (9): 811-818.

Rodríguez, E.M., López Greco, L.S. y Fingerman, M. 2000. Inhibition of ovarian growth by cadmium, in the fiddler crab *Uca pugilator* (Decapoda, Ocypodidae). Ecotoxicology Environmental Safety, 46: 202–206.

Rodríguez, E.M., López Greco, L.S., Medesani, D.A., Laufer, H. y Fingerman, M. 2002. Effect of methyl farnesoate, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis. General and Comparative Endocrinology, 125 (1): 34-40.

Rodríguez, E.M., Medesani, D.A. y Fingerman, M. 2007. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 146 (4): 661-671.

Rodríguez-Gonzales, H., Villarreal, H., García-Ulloa, H. y Hernández-Llamas, A. 2009. Dietary lipid requirements for optimal egg quality of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. Journal of the World Aquaculture Society, 40 (4): 531-539.

Sánchez, M.F., Marí, N.R., Lasta, C.A. y Giangiobbe, F. 1991. Alimentación de la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) en la Bahia Samborombón. Frente Maritimo, 8: 43-50.

Sánchez, M.V., Cahansky, A.V., López Greco, L.S. y Rodríguez, E.M. 2005. Toxicity of mercury during the embryonic development of *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura, Varunidae). Environmental Research, 99 (1): 72-78.

Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F., Muhlia-Almazán, A., Peregrino-Uriarte, A.B., Hernández-López, J. y Yepiz-Plascencia, G. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36 (4): 241-49.

Sancho, E., Ferrando, M.D., Fernández, C. y Andreu, E. 1998. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* aftere to fenitrothion. Ecotoxicology and Environmental Safety, 41 (2): 168-175.

Santos, E.A. y Keller, R. 1993. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 106 (2): 343-347.

Sarojini, R., Nagabhushanam, R. y Fingerman, M. 1997. An *in vitro* study of the inhibitory action of methionine enkephaline on ovarian maturation in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. Comparative Biochemestry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 117: 207-210.

Schiedek, D. 1997. *Marenzelleria viridis* (Verrill, 1873) (Polychaeta), a new benthic species within European coastal waters some metabolic features. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 211 (1): 85-101.

Schwoch, B.G. 1972. Some studies on biosynthesis and function of trehalose in the crayfish *Orconectes limosus* Rafinesque. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: 43: 905-17.

Silva, P.V., Luppi, T.A., Spivak, E.D. y Anger, K. 2009. Reproductive traits of an estuarine crab, *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata* (Brachyura: Grapsoidea: Varunidae), in two contrasting habitats. Scientia Marina, 73 (1): 117-27.

Silveyra, G.R., Canosa, I.S., Rodríguez, E.M. y Medesani, D.A. 2017. Effects of atrazine on ovarian growth, in the estuarine crab *Neohelice granulata*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 192: 1-6.

Sokal, R.R., y F.J. Rohlf. 1981. Biometry. Ed. Freeman.

Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G. y Sukhotin, A.A. 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. Marine Environmental Research, 79: 1-15.

Solomon K.R. y Thompson, D.G. 2003. Ecological risks assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews, 6: 289-324.

Spivak, E.D. 2010. The crab *Neohelic*e (=*Chasmagnathus*) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. Helgoland Marine Research, 64 (3): 149-154.

Steinrücken, H.C. y Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. Biochemical and Biophysical Research Communications, 94 (4): 1207-1212.

Subramonian, T. 1999. Endocrine regulation of egg production in economically important crustacean. Current Science, 76: 350-360.

Telford, M. 1968. The identification and measurement of sugars in the blood of three species of Atlantic crabs. Biological Bulletin, 135: 574-584.

Trigo, E.J. 2016. Veinte años de cultivos genéticamente modificados en la agricultura Argentina. Ed. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología.

Tropea, C., Stumpf, L. y López Greco, L.S. 2015. Effect of temperature on biochemical composition, growth and reproduction of the ornamental red cherry shrimp *Neocaridina heteropoda heteropoda* (Decapoda, Caridea). PLoS ONE, 10 (3): 1-14.

Tsui, M.T. y Chu, L.M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere, 52 (7): 1189-1197.

Tsui, M.T., Wang, W.X. y Chu, L. M. 2005. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup®) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. Environmental Pollution, 138 (1): 59-68.

Tsukimura, B. 2001. Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. American Zoology, 41: 465-476.

Urien, C.M. 1972. Río de la Plata estuary environments. En: Environmental Framework of Coastal Plain Estuaries, 213-234. Ed. The Geological Society of America.

Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. Analytical Biochemestry, 11: 256-265.

Van Herp, F. 1993. Importance of reproductive biological knowledge for application of biotechnology in aquaculture: crustaceans as an example. Jounal of Marine Biotechnology, 1: 17-20.

Vazquez, F.J. y López Greco, L.S. 2007. Diferenciación sexual en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). Revista de Biología Tropical, 55 (1): 33-37.

Vazquez, F.J., Tropea, C. y López Greco, L.S. 2008. Development of the female reproductive system in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). Invertebrate Biology, 127 (4): 433-443.

Vera, M.S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Perez, G.L., Rodríguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferraro, M., Bonetto, C., Zagarese, H. y Pizarro, H. 2010. New evidences of Roundup (Glyphosate Formulation): impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. Ecotoxicology, 19 (4): 710-721.

Vera-Candioti, J., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. 2013. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). Ecotoxicology and Environmental Safety, 89: 166-173.

Viau, V.E., Marciano, A., Iriel, A. y López Greco, L.S. 2016. Assessment of a biofilm-based culture system within zero water exchange on water quality and on survival and growth of the freshwater shrimp *Neocaridina heteropoda heteropoda*. Aquaculture Research, 47 (8): 2528-2542.

Vogt, G. 2002. Functional anatomy. En: Biology of Freshwater Crayfish. Ed. Holdich, 53-151.

Wang, H., Xu, H., Xiao, G., Zhao, C., Wang, Z., Cai, D., Li, H. y Zhao, J. 2010. Effects of selenium on the antioxidant enzymes response of *Neocaridina heteropoda* exposed to ambient nitrite. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 84 (1): 112-117.

Wang, H.W., Wang, J.X., Yang, L.K., Liu, L., Lu, S.S., Yang, F.K. y Cai, D.B. 2014. Effects of dietary selenium supplements on the superoxide dismutase (SOD) activity of *Neocaridina heteropoda* (Crustacea: Decapoda: Atyidae: Caridina) exposed to ambient sodium polyphosphate. Advanced Materials Research, 1073: 1841-1843.

Werner, U. y Schäfer, F. 2008. All about shrimps, crayfishes, and crabs in the freshwater aquarium. Ed. Aqualog.

Zapata, V., López Greco, L.S. y Rodríguez, E.M. 2001. Effect of copper on hatching and development of larvae of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). Environmental Toxicology and Chemistry, 20 (7): 1579-1583.

Zapata, V., López Greco, L.S., Medesani D. A. y Rodríguez, E.M. 2003. Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulata* induced by hormones and neuroregulators throughout the year: *In vivo* and *in vitro* studies. Aquaculture, 224 (1-4): 339-352.

Zhou, M., Wang, A. L. y Xian, J. A. 2011. Variation of free amino acid and carbohydrate concentrations in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: effects of continuous cold stress. Aquaculture, 317(1-4): 182-186.

ANEXOS

Anexo 1 - Sistema de purificación de agua

El agua de red utilizada en los ensayos se purificó previamente mediante un sistema de filtros (Hidroquil®) compuesto por una serie de tres filtros con cartuchos recambiables, como se muestra en la Figura 43: filtro 1) lana de vidrio, a fin de retener sedimentos; filtro 2) carbón activado, a fin de retener sustancias orgánicas; filtro 3) resina de intercambio catiónico, a fin retener principalmente trazas de metales pesados.

Figura 43. Dispositivo instalado en el laboratorio, utilizado para la purificación del agua de red.

Anexo 2 – Alimento balanceado formulado en el laboratorio

El alimento balanceado fue elaborado según los ingredientes de la Tabla 10, mediante mezcla y elaboración manual de pellets que luego fueron secados en estufa a 60 °C durante 24 hs. Posteriormente se los fraccionó y reservó en un recipiente cerrado (tipo Tupperware®).

Tabla 10. Composición (%) del alimento elaborado para el ensayo. Contenido final: 35,1%, de proteínas, 11,12% de lípidos y 20,84% de carbohidratos. El análisis proximal de este alimento fue realizado por Chaulet *et al.,* (2012).

Ingredientes	**% (p/p)**
Harina de pescado	28
Harina de soja	39
Aceite de soja	6
Glutagel	19
Bentonita	6
Vitafac Super Aqua*	2

*Suplemento vitamínico fabricado por DSM Productos Nutricionales Argentina S. A.

Anexo 3 – Ensayo consumo de alimento

Objetivo, protocolo y resultados

El objetivo del presente ensayo fue evaluar el efecto del glifosato en el consumo de alimento en juveniles tempranos de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus,* de modo de poder diferenciar si la disminución en la ganancia en peso observada en el ensayo original se debió a una menor ingesta de alimento o a un efecto en el metabolismo de los organismos.

Para evaluar el consumo de alimento de los juveniles se asignaron 10 individuos al azar a cada tratamiento, aislándolos en recipientes de vidrio y, manteniendo las mismas condiciones experimentales mencionadas en el Capítulo 1. Se procedió al recambio del medio tres veces por semana y se los alimentó con los pellets ya mencionados, previamente pesados (Pi). Transcurridas tres horas de alimentación, se recolectaron los restos de alimento no ingeridos con pipeta Pasteur plástica, agrupándolos luego sobre fragmentos de papel aluminio pesados, identificados y colocados en placas de 12 pocillos (Nunc-Immunoplate Polisorp). Las mismas se colocaron en estufa durante 24 hs a fin de evaporar el agua contenida y posteriormente obtener el peso seco (Pf) del pellet. El porcentaje de alimento consumido por individuo se calculó mediante la fórmula [(Pi - Pf)/Pi]*100 (Mensah *et al.,* 2012). Para evaluar diferencias entre los grupos experimentales y el control se realizaron ANOVAs de una vía seguidos por contrastes múltiples LSD (Sokal y Rohlf, 1981).

La Figura 44 muestra los resultados obtenidos (promedios) en las determinaciones del consumo de alimento durante el período que duró el ensayo. No se encontraron diferencias significativas en la ingesta ($p<0,05$) entre los juveniles expuestos a glifosato y los juveniles control.

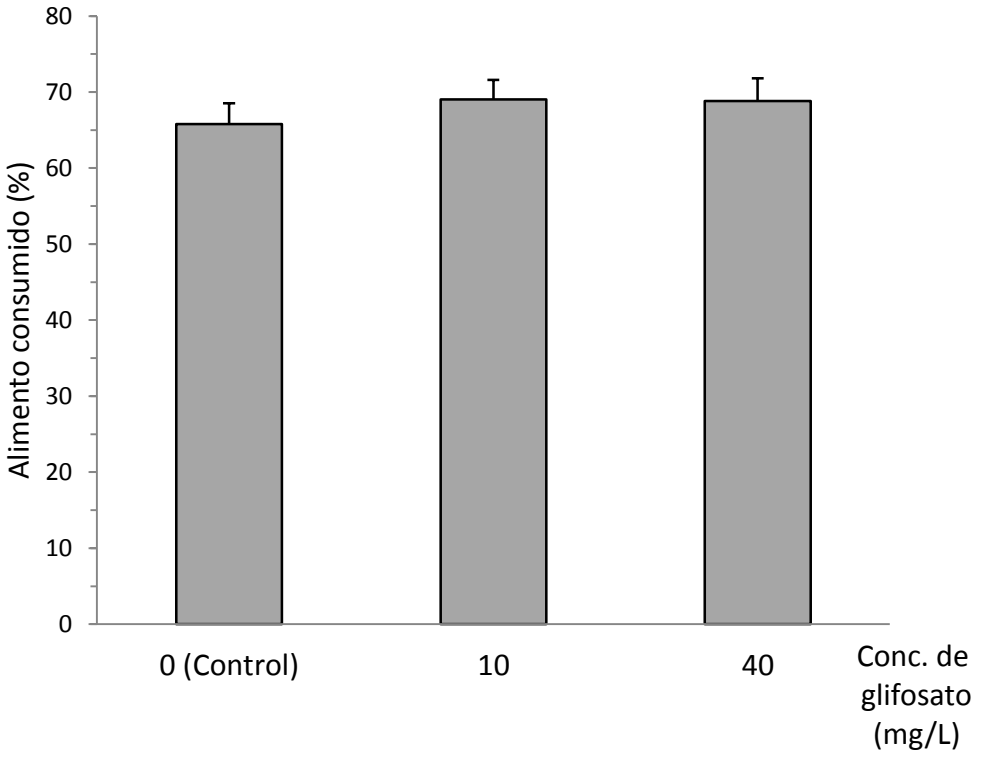


Figura 44. Porcentaje de alimento consumido en los distintos tratamientos, medido durante el ensayo con juveniles de *C. quadricarinatus*.

Addenda

- Por ensayo crónico se refiere a una exposición cuya duración representa una fracción importante del tiempo de vida de las especies estudiadas. Esta exposición comprendió, en el caso de *C. quadricarinatus* y *N. granulata*, varios meses de exposición.

- Por desove entendemos la masa de huevos desovada por las hembras de todas las especies estudiadas.

Efecto de glifosato sobre el crecimiento y la reproducción de crustáceos superiores.

Lic. Luciana Avigliano

FCEN-UBA

2018