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 de Maestría

Chilina gibbosa como especie centinela de la contaminación acuática por insecticidas utilizados en Argentina

Boburg Castroconde, Beverly

2017

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:
Boburg Castroconde, Beverly. (2017). Chilina gibbosa como especie centinela de la contaminación acuática por insecticidas utilizados en Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6520_BoburgCastroconde

Cita tipo Chicago:
Boburg Castroconde, Beverly. "Chilina gibbosa como especie centinela de la contaminación acuática por insecticidas utilizados en Argentina". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6520_BoburgCastroconde

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. **Contacto:** bibliotecadigital.exactas.uba.ar
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Chilina gibbosa como especie centinela de la contaminación acuática por insecticidas utilizados en Argentina

Tesis presentada para optar al Título de

Magíster de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Ambientales

Lic. Beverly Boburg Castroconde

Directora de tesis: Dra. Gisela Kristoff

Buenos Aires, noviembre 2017

RESUMEN

Los organismos centinelas son aquellos en los que cambios sobre algunas características conocidas pueden ser medidas para evaluar el grado de contaminación ambiental y sus implicancias para la salud humana. La elección de estos organismos se realiza en función de su sensibilidad a determinadas sustancias, rol ecológico, potencial de exposición y distribución geográfica o abundancia, entre otros. Muchos autores coinciden al reconocer la importancia de estos organismos y su utilidad para detectar cambios en el ambiente que pueden servir como alertas tempranas. *Chilina gibbosa* es un gasterópodo bentónico, endémico de las provincias de Buenos Aires, Río Negro, Neuquén, Chubut y Santa Cruz (Argentina) y Chile que habita en cuerpos de agua dulce limpios, fríos y oxigenados. El organofosforado metilazinfos y el carbamato carbaril fueron los insecticidas encontrados con mayor frecuencia en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, en la Patagonia argentina. Ambos pesticidas tienen el mismo mecanismo de acción, inhiben específicamente a la acetilcolinesterasa, provocando la acumulación del acetilcolina en el espacio sináptico alterando el funcionamiento normal del impulso nervioso. También pueden unirse a las carboxilesterasas siendo un blanco de inhibición alternativo y de esta manera actúan protegiendo a las colinesterasas de su inhibición y a los organismos de sufrir efectos neurotóxicos. Tanto las colinesterasas como las carboxilesterasas son los biomarcadores de elección para evaluar la exposición a organofosforados y carbamatos pero pueden utilizarse otros como por ejemplo parámetros comportamentales y reproductivos. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la exposición aguda a distintas concentraciones de metilazinfos producía severos signos de neurotoxicidad como la falta de adherencia a las superficies, exposición anormal de la región céfalo-pedal fuera de la concha y disminución de la movilidad. Además el metilazinfos a concentraciones ambientales inhibía la actividad de colinesterasas y

causaba disminución de la actividad de carboxilesterasas sólo a altas concentraciones. El objetivo general de este trabajo consistió en profundizar el conocimiento sobre parámetros bioquímicos, de comportamiento y reproductivos en *C. gibbosa* para poder ser utilizado en ensayos ecotoxicológicos y ser propuesto o no como especie centinela. En este trabajo de tesis se establecieron las condiciones apropiadas para realizar ensayos sub-crónicos con esta especie, se aportaron datos sobre distintos parámetros reproductivos, se logró la reproducción y la supervivencia de las crías bajo condiciones de laboratorio y se llevaron a cabo exposiciones por 14 días a la misma concentración molar de metilazinfos y de carbaril (0,063 nM) en organismos adultos. Los resultados mostraron que las condiciones para realizar ensayos sub-crónicos deben incluir aireación, alimentación y recambio periódico del agua. Por otro lado, se pudieron describir algunos parámetros reproductivos en condiciones de laboratorio: tamaño y forma de las puestas, cantidad de huevos por puesta, tiempo que requieren para eclosionar y período de oviposición. Estos datos aportan información de utilidad para poder evaluar en el futuro efectos de distintos tóxicos sobre parámetros reproductivos. Este trabajo es el primer reporte para esta especie de efectos sub-crónicos de pesticidas y de efectos de exposición a carbaril. Se observaron diferencias entre las respuestas a metilazinfos y a carbaril. La exposición a metilazinfos produjo en el 100 % de los individuos la salida anormal de la cabeza-pie fuera de la concha y en el 90 % la falta de adherencia y una inhibición de colinesterasas del 89 % a los 7 días. La inhibición de carboxilesterasas se observó recién a los 14 días y correspondió a un 39 % con p-nitrofenil acetato y a un 30 % con p-nitrofenil butirato. Con respecto al carbaril, no se observaron signos de neurotoxicidad ni inhibición de colinesterass y carboxilesterasas determinadas con p-nitrofenil acetato durante los 14 días. Por el contrario, la actividad con p-nitrofenil butirato se inhibió a los 7 días en un 59 % la cual se mantuvo disminuida a los 14 días (62 %). En organismos de *C. gibbosa* expuestos a metilazinfos la alta inhibición de colinesterasas y la menor inhibición de carboxilesterasas se relacionan con

la neurotoxicidad observada. Por el contrario, a pesar de tener el mismo mecanismo de acción, ante la exposición al carbaril las carboxilesterasas resultaron más sensibles y la falta de inhibición de colinesterasas se relacionaría con la falta de neurotoxicidad observada. *C. gibbosa* resulta un organismo muy sensible a la contaminación acuática por insecticidas anticolinesterásicos mostrando efectos tóxicos a concentraciones ambientales. Según los criterios considerados en esta tesis para el término centinela, *C. gibbosa* podría utilizarse en nuestro país como una especie centinela debido a su alta sensibilidad a los pesticidas utilizados, su rol ecológico, la fácil detección de los signos neurotóxicos y su distribución.

ABREVIATURAS

OPs	insecticidas organofosforados
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
MAZ	metilazinfos
DMF	N,N-dimetilformalmida
DMSO	dimetilsulfóxido
ChEs	colinesterasas
CEs	carboxilesterasas
DTNB	5,5’ -ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico)
p-NFB	p-nitrofenil butirato
p-NFA	p-nitrofenil acetato
AsCh	ioduro de acetiltiocolina
FCEN	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
UBA	Universidad de Buenos Aires
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS DE RESULTADOS DE ESTA TESIS

Publicaciones:

-"Aquatic ecotoxicology: native freshwater gastropods from Argentina" in "Ecotoxicology in Latin America".

Cossi, P., Herbert, L., Boburg, B., Kristoff, G.

Nova Science Publishers, 2017. ISBN 978-1-53610-609-1

Presentaciones a congresos:

-"Effects of subchronic exposure to the organophosphate azinphos-methyl on the native gastropod *Chilina gibbosa"*

Boburg, B., Herbert, L., Cossi, P., Luquet, C., Kristoff, G.

SETAC Latin America 11th Biennial Meeting: The Role of Science in Environmental Decision-Making, Septiembre 2015. Publicado en el Libro de Resúmenes, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, pág. 53.

-"Respuestas diferenciales en el caracol de agua *Chilina gibbosa* por exposición al carbamato carbaril y al organofosforado metilazinfos"

Boburg, B., Herbert, L., Wolansky, M., Kristoff, G.

VI Congreso SETAC Capítulo Argentino, Octubre 2016. Publicado en "Compromiso entre academia, industria y gobierno por un ambiente mejor" pág. 181. ISBN 978-987-42-2288-6.

Otras publicaciones:

-"Recovery study of cholinesterases and neurotoxic signs in the non-target freshwater invertebrate Chilina gibbosa after an acute exposure to an environmental concentration of azinphos-methyl"

Cossi, P., Boburg, B., Luquet, C., Kristoff, G.

Aquatic Toxicology, 167, 248-256, 2015.

AGRADECIMIENTOS

A Gise, mi directora de tesis, porque tu paciencia y perseverancia son un ejemplo a seguir. Gracias por tu apoyo, ha significado mucho para mí. Sin ti no habría podido terminar.

A Pau y Lu, por su apoyo moral y técnico. Las quiero!

Al equipo del Dr. C. Luquet (INBIOMA-CONICET UNCo) por la recolección de los organismos utilizados en este trabajo.

Al Lic. Luis Corapi por las determinaciones de los parámetros fisicoquímicos del agua.

Al Departamento de Química Biológica y de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires y al Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA-CONICET.

A los subsidios otorgados por CONICET, UBA y AGENCIA.

A mi esposo, Pablo, por ser y estar.

A TODOS, familia, amigos, allegados o simples colaboradores, quienes de alguna u otra manera pusieron un granito de arena y contribuyeron a que lleguemos a este momento culminante, GRACIAS!

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN..... 11

I.1- ESPECIES CENTINELA..... 11

I.1.1- Definición e importancia..... 11

I.1.2- Gasterópos como centinelas..... 12

I.2- *Chilina gibbosa*..... 12

I.2.1- Descripción de la especie..... 12

I.3- CONTAMINACIÓN DE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS Y USO DE PESTICIDAS EN ARGENTINA..... 15

I.3.1- Pesticidas..... 16

I.3.1.1- Pesticidas seleccionados: Organofosforados (metilazinfos) y Carbamatos (carbaril)..... 18

I.3.1.1.1- Organofosforados (metilazinfos)..... 18

I.3.1.1.2- Carbamatos (carbaril)..... 21

I.3.1.2- Uso de metilazinfos y carbaril en Argentina..... 23

I.3.1.3- Antecedentes del efecto de metilazinfos y carbaril sobre la biota..... 26

I.4- BIOMARCADORES..... 27

I.4.1- B-esterasas y su uso como biomarcadores de contaminación por pesticidas..... 29

I.4.2- Otros biomarcadores: efectos subletales de los pesticidas sobre comportamiento y reproducción..... 31

I.4.3- Antecedentes de biomarcadores estudiados en *Chilina gibbosa*: estudios de exposición aguda, sub-cronica y crónica..... 33

I.4.3.1- Estudios de exposición aguda..... 34

I.5- OBJETIVOS E HIPÓTESIS..... 37

I.5.1. Objetivo general..... 37

I.5.2- Objetivos específicos e hipótesis..... 37

II.- MATERIALES Y MÉTODOS..... 39

II.1- Materiales..... 39

II.1.1- Reactivos..... 39

II.1.2- Equipo..... 39

II.1.3- Organismos..... 39

II.2- Métodos..... 41

II.2.1- Bioensayos..... 41

II.2.2- Homogenatos..... 44

II.2.3- Proteínas totales..... 45

II.2.4- Actividad general de colinesterasas..... 45

II.2.5- Actividad general de carboxilesterasas..... 46

II.2.6- Mortalidad y signos de neurotoxicidad..... 46

II.2.7- Análisis estadístico..... 46

III.- RESULTADOS..... 48

III.1- Ensayos sub-crónicos con pesticidas..... 48

III.1.1- Exposición sub-crónica a metilazinfos..... 48

III.1.1.1- Mortalidad..... 48

III.1.1.2- Signos de neurotoxicidad..... 49

II.1.1.3- Actividad de colinesterasas..... 51

III.1.1.4- Actividad de carboxilesterasas..... 52

III.1.1.5- Resumen de los efectos de metilazinfos sobre las Enzimas β-esterasas..... 54

III.1.1.6- Resumen de efectos de una exposición sub-crónica a MAZ.... 54

III.1.2- Exposición aguda y sub-crónica a carbaril..... 55

III.1.2.1- Mortalidad..... 56

III.1.2.2- Signos de neurotoxicidad..... 56

III.1.2.3- Actividad de colinesterasas..... 56

III.1.2.4- Actividad de carboxilesterasas con p-nitrofenil acetato..... 56

III.1.2.5- Actividad de carboxilesterasas con p-nitrofenil butirato..... 56

III.1.2.6- Resumen de los efectos de carbaril sobre las enzimas β-esterasas..... 57

III.1.3- Efectos de metilazinfos vs efectos de carbaril..... 58

III.2- Experimento de mantenimiento y reproducción de los organismos..... 60

III.2.1- Ajuste de las prácticas de mantenimiento..... 60

III.2.2- Estudio de algunos parámetros de reproducción..... 61

III.2.2.1- Bioensayo de reproducción..... 63

III.2.2.1.1- Cantidad de puestas..... 65

III.2.2.1.2- Tamaño y forma de las puestas..... 65

III.2.2.1.3- Cantidad de huevos por puesta..... 67

III.2.2.1.4- Registro fotográfico del desarrollo de los embriones..... 69

IV.- DISCUSIÓN..... 72

V.- CONCLUSIONES..... 81

VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 83

I.- INTRODUCCIÓN

I.1- ESPECIES CENTINELA

I.1.1- Definición e importancia

Existen diversos criterios de selección y definiciones para el término "especie centinela", en la actualidad varios autores han dedicado amplias evaluaciones al uso del término y han propuesto conceptos cada vez más específicos y delimitados (Sedeño-Díaz y López-López, 2012; Roméo y Giambérini, 2013; Contador *et al.*, 2014). Sin embargo existen discrepancias y aún no parece existir un consenso sobre el tema. A efectos del presente estudio hemos tomado un concepto más amplio partiendo de los primeros usos del término.

Según O'Brien *et al.* (1993) se llama centinelas a los organismos en los que cambios sobre características conocidas de los mismos pueden ser medidos para evaluar el grado de contaminación ambiental y sus implicancias para la salud humana. Grove (2009), complementó este concepto en base a Lower y Kendall (1990) y agregó que el uso de estos organismos se realiza en función de su sensibilidad a determinadas sustancias, posición en la comunidad biótica, potencial de exposición y distribución geográfica o abundancia.

Varios grupos han sido estudiados en todo el mundo para su uso como especies centinelas de la contaminación, entre ellos vertebrados como mamíferos (Bossart, 2006; Basu *et al.*, 2007; Moore, 2008; Basu *et al.*, 2009), aves (Grove, 2009; Mallory *et al.*, 2010; Smits y Fernie, 2013), peces (Orlando *et al.*, 2004; Sedeño-Díaz y López-López, 2012) y anfibios (Hayes *et al.*, 2002; Maselli *et al.,* 2010) e invertebrados como poliquetos (Cañete *et al.*, 2000), insectos (Jardine *et al.*, 2005; Boyce *et al.*, 2007), moluscos (Conn *et al.*, 2013; Milinkovitch *et al.*, 2015) y crustáceos (Sturm y Hansen, 1999; Varó *et al.*, 2002), entre otros. Muchos autores coinciden al reconocer la importancia de estos organismos y su aplicación para detectar cambios en el ambiente que pueden servir como primera alerta permitiendo tomar acciones en las primeras etapas de la contaminación y así evitar mayores

daños a los ecosistemas y a la salud humana (Beeby, 2001; Gerhardt, 2002; Tabor y Aguirre, 2004; Sardi Sulvarán, 2008; Grove *et al.*, 2009; Berthet, 2012).

I.1.2- Gasterópodos como especies centinelas

Los moluscos, particularmente los bivalvos, son frecuentemente empleados como especies centinelas, debido a su amplia distribución, su poca movilidad, su forma de alimentación que los hace susceptibles a la bioaculumación de contaminantes (Rittschof y McClellan-Green, 2005) y a su baja habilidad para eliminar tóxicos a través de los órganos excretores (Legierse *et al.*, 1998). Se les considera ideales para evaluar la contaminación ambiental. Los moluscos son organismos ecológicamente muy importantes. Los gasterópodos constituyen el 85 % de los moluscos y cumplen distintos roles en varios ecosistemas contribuyendo de forma significativa a la biomasa (Oehlmann *et al.*, 2007).

Si bien los gasterópodos son utilizados en menor medida que otros moluscos, existen varios antecedentes del uso de caracoles como centinelas y en diferentes estudios de contaminación (Gomot de Vaufleury y Pihan, 2000; Beeby, 2002; Verrengia Guerrero *et al.*, 2002; Ansaldo *et al.*, 2006; Regoli *et al.,* 2006; Gagnaire *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2011; Druart *et al.*, 2011; Kristoff *et al.*, 2012; Cacciatore *et al.*, 2013; Bianco *et al.*, 2014).

I.2- *Chilina gibbosa*

I.2.1- Descripción de la especie

Chilina gibbosa es un gasterópodo de agua dulce perteneciente a la familia Chilinidae Dall 1870 (Gastropoda: Hygrophila). La familia incluye un solo género, *Chilina* Gray 1828, con alrededor de 32 especies, de las cuales 21 se encuentran en Argentina y 14 de éstas se consideran endémicas (Gutiérrez Gregoric *et al.*, 2010 a y b, 2014), entre ellas *C. gibbosa*. En términos generales el 39,6 % de las especies de gasterópodos de agua dulce de Argentina son endémicos y 10,9 %

de este endemismo le corresponde a Chilinidae (Rumi *et al.*, 2004; Rumi *et al.*, 2006). La familia chilinidae es exclusiva de América del Sur, extendiéndose desde el Trópico de Capricornio hasta el Cabo de Hornos e Islas Malvinas (Castellanos y Gaillard, 1981). Su distribución geográfica se considera restringida y la continua amenaza a sus hábitats por la presencia de especies invasoras, el cambio climático y la contaminación, han llevado a catalogar a la familia como vulnerable (Valdovinos, 2006).

C. gibbosa es una especie bentónica, comúnmente asociada a macrófitas, que se alimenta aparentemente de perifiton (Aufwuchs) y diatomeas (Bosnia *et al.*, 1990). Un ejemplar adulto puede llegar a medir alrededor de 2 cm de largo (Fig. 1). En cuanto a los hábitos reproductivos se cree que son organismos semélparos con un ciclo de vida anual y un período de mayor reproducción en verano (Pérez y Batres, 2010) evacuando sus huevos desde la primavera hasta principios del otoño (Castellanos y Gaillard, 1981). Además se consideran hermafroditas, como es característico de su género (Gutiérrez Gregoric, 2010 a y b).

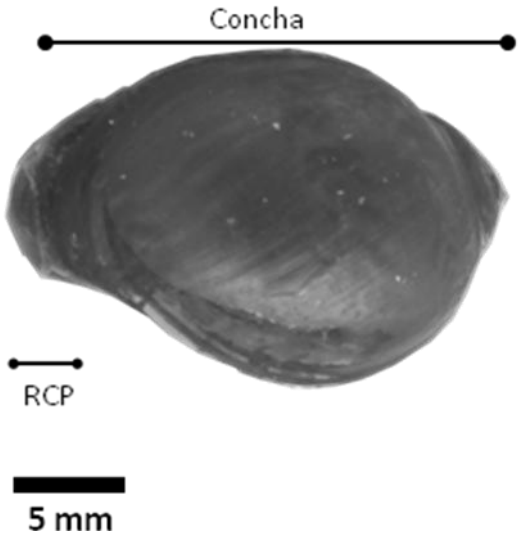

Figura 1. Ejemplar adulto de *Chilina gibbosa*.

De acuerdo a la literatura, existen evidencias de que se distribuyen en el río Maule, en la Región del Maule, Chile (Valdovinos, 2006) y en las provincias de Buenos Aires, Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz en Argentina (Fig. 2) (Rumi *et al.*, 2008).

Figura 2. Distribución de *Chilina gibbosa* en Argentina. La estrella indica las provincias en las cuales se encuntran estos organismos: Buenos Aires, Neuquén, Chubut, Río Negro, Chubut y Santa Cruz.

Diversos autores han prestado interés en esta especie, ya sea por su rol en la cadena trófica donde sirve de alimento para una variedad de aves y peces, algunos incluso de interés comercial, como la trucha marrón (*Salmo trutta*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y el Pejerrey patagónico (*Patagonina hatcheri*) (Ferriz, 1988; Bosnia, 1990; Ferriz y Aramburu, 1994; Pérez y Batres, 2010); por su papel como vector de parásitos potencialmente dañinos para el ser humano (Flores y Semenas, 2008; Flores *et al.*, 2015) y por su presencia en excavaciones arqueológicas que demuestran su uso por antiguas poblaciones (Pérez y Batres, 2010). Sin embargo hasta el día de la fecha existe muy poca información sobre esta especie y no se habían estudiado efectos de contaminantes en esta especie hasta los estudios de nuestro grupo de investigación (Bianco *et al.*, 2013; Bianco, 2014; Cossi *et al.*, 2015).

I.3- CONTAMINACIÓN DE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS Y USO DE PESTICIDAS EN ARGENTINA

Se entiende por contaminación acuática antropogénica a la adición, por acción humana, de sustancias que alteran parámetros físicos, la composición química o microbiológica del agua produciendo alteraciones indeseables, como daño a los organismos que en ella habitan o bien a los seres humanos que la utilizan (Lloyd, 1992; Barba Ho, 2002). La actividad antropogénica es una constante amenaza para la estabilidad de los ecosistemas y en este sentido los ecosistemas acuáticos son receptores de toda clase de desechos generados por el hombre (Barba Ho, 2002) lo que resulta en la contaminación de los mismos.

La contaminación puede ser de diferentes tipos según si nos referimos a su origen o fuente: localizadas o no localizadas (Ongley, 1996); o a la naturaleza del contaminante: físicos, químicos, térmicos; o si partimos de la actividad que la produce: agrícola, industrial o doméstica. Si bien son todas distintas formas de agrupar la gran diversidad de contaminantes que existe, no son excluyentes entre sí.

Toda actividad humana que involucra el uso de agua devuelve la misma al ambiente en un estado alterado respecto del original, en la mayoría de los casos esa alteración se traduce en contaminación.

Según Schwarzenbach *et al.* (2010) los contaminantes químicos del agua pueden dividirse en dos grandes categorías, un número relativamente pequeño de macrocontaminantes, que se encuentran en el medio ambiente a razón de miligramos por litro, tales como el nitrógeno; y microcontaminantes (contaminantes emergentes) que se encuentran en aguas naturales a concentraciones en el orden de nanogramos o microgramos por litro. Muchos de estos últimos son capaces de producir efectos tóxicos a muy bajas concentraciones y sus efectos suelen ser no agudos, sino sutiles y crónicos. Los pesticidas serían un ejemplo de esto.

I.3.1- Pesticidas

Los pesticidas, son compuestos principalmente químicos utilizados en la agricultura convencional para el control de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos, conforman un aspecto central de las prácticas agrícolas, tanto en países desarrollados como en desarrollo. Además tienen un uso doméstico para destruir o mitigar plagas que afectan a las plantas, animales y al hombre y un uso industrial.

Se clasifican según su blanco de acción en: herbicidas (hierbas), insecticidas (insectos), fungicidas (hongos y mohos), rodenticidas (roedores) y molusquicidas (moluscos), entre otros. La estructura química de los pesticidas es muy diversa, siendo los grupos más importantes los siguientes (Biziuk *et al.*, 1996):

- **Carbamatos:** eficaces herbicidas, insecticidas y fungicidas, son altamente biodegradables. El carbaril y la carbenzima son los más empleados.
- Cloroacetanilidas: pre-herbicidas para controlar la proliferación de la maleza. El metaloclor fue uno de los primeros pesticidas que se detectó en las aguas subterráneas y superficiales.

- Clorofenoxiácidos: herbicidas para uso agrícola, en las actividades forestales y de control de la maleza, tienden a absorberse en el suelo. Los ejemplos más comunes de este tipo de compuestos son la bentazona y triclopyr.
- Organoclorados: insecticidas agrícolas, altamente persistentes en el medioambiente, son hidrófobicos, tienen muy baja solubilidad y son conocidos por su alta toxicidad. Los compuestos de este tipo que se encuentran más frecuentemente en el agua son el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil) etano (DDT), la dieldrina, el lindano y el metoxicloro.
- **Organofosforados:** insecticidas que actúan como neurotóxicos.
- Piretroides: insecticidas, son hidrofóbicos y pueden ser persistentes en el medioambiente. Por ejemplo, la cipermetrina.
- Triazinas: herbicidas selectivos. Algunos ejemplos de triazinas son la cianazina, la atrazina, y la simazina, estos dos últimos son persistentes y solubles en agua.

Se considera que únicamente el 10 % de los plaguicidas aplicados es absorbido por el organismo blanco, por lo tanto, un alto porcentaje de los mismos es depositado en componentes abióticos (suelo, agua y sedimentos), y en organismos no blanco, afectando la salud humana y al ambiente (del Pilar Díaz *et al.*, 2015).

Los pesticidas llegan a cuerpos de agua por escurrimiento, infiltración y erosión de los suelos, en lugares donde se han aplicado. También pueden movilizarse por transporte tanto atmosférico como por escurrimiento durante lluvias o riego agrícola y, de esta manera, transportarse hacia cuerpos de agua tanto superficiales como subterráneos hasta contaminar el agua y los sedimentos (Ongley, 1996; Schwarzenbach *et al.*, 2006).

Los pesticidas presentan un elevado peligro para la salud de las personas, la flora, la fauna y el medio ambiente. Actualmente se conocen alrededor de 16 millones de pesticidas diferentes y cada año se sintetizan, aproximadamente, 250.000 nuevos compuestos (Patiño *et al.*, 2014).

I.3.1.1- Pesticidas seleccionados: Organofosforados (metilazinfos) y Carbamatos (carbaril)

Los insecticidas organofosforados (OPs) y los carbamatos, como se mencionó anteriormente, se encuentran listados entre los grupos de pesticidas más importantes utilizados en la agricultura para el control de plagas (Biziuk *et al.*, 1996). Al ser poco selectivos, debido a que su blanco de acción primario no es exclusivo de los insectos, terminan en muchas ocasiones afectando organismos que no son su blanco de acción. Actúan inhibiendo específicamente a la acetilcolinesterasa a nivel de las sinapsis. Se unen a la enzima en el mismo sitio al que se une el neurotrasmisor acetilcolina impidiendo su degradación. Al estar esta enzima inhibida se acumula la acetilcolina en el espacio sináptico alterando el funcionamiento normal del impulso nervioso. La acumulación de acetilcolina se produce en las uniones colinérgicas neuroefectoras (efectos muscarínicos), en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos (efectos nicotínicos) y en el sistema nervioso central (efectos centrales).

I.3.1.1.1- Organofosforados (metilazinfos)

Los OPs son ésteres del ácido fosfórico (unión de un ácido y un alcohol) y una variedad de alcoholes. Generalmente son liposolubles con una baja persistencia en el ambiente y acumulación en los organismos.

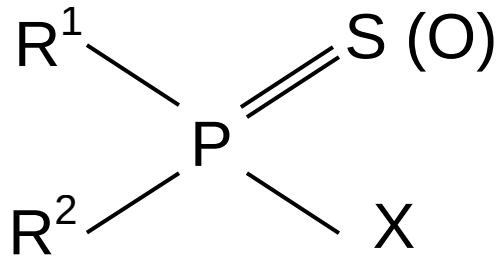

Figura 3. Estructura básica de un organofosforado

La Fig. 3 muestra la estructura general de los OPs, donde R es un CH_3- o CH_3 – CH_2^-, mientras que X es un radical fácilmente hidrolizable. Todos presentan un átomo de fósforo y una unión P=O o P=S. (Chambers *et al.*, 2001).

Los OPs pueden ingresar a los organismos por vía cutánea, respiratoria ó digestiva. Los que presentan una unión P=S requieren un proceso de activación metabólica formando el oxón P=O derivado, que puede unirse fuertemente a la enzima (Galloway y Handy, 2003). Dentro del organismo la oxidación al oxón derivado se lleva a cabo por el sistema de monooxigenasas de función mixta (MFO) microsomales que contienen al citocromo P450, una flavoproteína y NADPH o nicotinamida adenina dinucleótido NADH como cofactores (Timbrell, 2000).

Algunas propiedades generales a destacar son:

- La mayoría son liposolubles, lo que favorece su penetración en el organismo;
- Poseen baja presión de vapor, excepto unos pocos, lo que los hace poco volátiles;
- Sus principal forma de biodegradación en el ambiente es la hidrólisis, principalmente bajo condiciones alcalinas, lo cual es importante en el proceso de destrucción del plaguicida;
- Tiene relativamente baja persistencia en el ambiente;
- No son especie-específicos por lo que tienen alta toxicidad aguda para especies que no son su blanco de acción (Fulton y Key, 2001); y
- Los OPs inhiben a la acetilcolinesterasa de forma irreversible.

El **metilazinfos** (MAZ) (O,O-dimetil-S-[4-oxo-1,2,3-benzo-triacin-3-(4H)-il-metil]-ditiofosfato, número CAS 86-50-0), OP seleccionado para esta tesis, es un pesticida utilizado como acaricida-insecticida.

El MAZ (Fig. 4) presenta la unión P=S, como tal, es un pobre inhibidor de la acetilcolinesterasa y es metabolizado *in vivo* a través de una oxidación desulfurativa al metilazinfos-oxón derivado. El metilazinfos-oxón es el que tiene una alta afinidad por la acetilcolinesterasa.

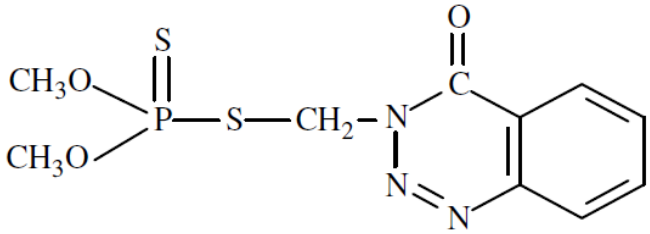

Figura 4. Estructura química del metilazinfos

El MAZ tiene una masa molecular relativa de 317,32 g mol^{-1}, densidad de 1,518 g ml^{-1}, punto de fusión de 73 ºC, presión de vapor de 7,5 x 10^{-9} mm Hg (25 ºC). Su solubilidad en agua es de 28 mg L^{-1} a 20°C, >250 g L^{-1} en dicloroetano, acetona, acetonitrilo, acetato de etilo y dimetilsulfóxido, de 1,2 g L^{-1} en n heptano y de 170 g L^{-1} en xileno a 20°C. El log K_{OW} es de 2,75.

La acción del MAZ sobre los organismos ocurre por contacto e ingestión. Este pesticida alcanza los cursos de agua por drenaje asociado a lluvias, percolación en suelos y deriva aérea (US EPA, 2001; Gormley *et al.*, 2005; Loewy *et al.*, 2006). Es considerado de alta toxicidad y elevada residualidad, siendo altamente tóxico para abejas, muy tóxico para aves y extremadamente tóxico para peces (Res. SAGyP 10/1991).

La biodegradación y volatilización son las rutas primarias de eliminación en el suelo. Además, puede ser removido por hidrólisis y fotólisis, sobre todo en suelos con alto contenido de humedad. En los cuerpos de agua la degradación microbiana y fotolítica son uno de los principales mecanismos de remoción. La hidrólisis resulta relevante en aguas alcalinas, con pH mayor a 11 y los productos que se forman incluyen al ácido antranílico y benzamida entre otros (Cacciatore, 2013). Este insecticida muestra una baja a moderada tendencia a adsorberse en los sedimentos y en los sólidos en suspensión. En el suelo su persistencia es baja en condiciones ambientales (aproximadamente de 5 a 18 días). En el agua tiene una vida media de 26 días a 30°C y pH 7 (US EPA, 2001).

I.3.1.1.2- Carbamatos (carbaril)

Los carbamatos son ésteres de ácidos carbámicos. En cuanto a su uso como pesticidas, según su estructura química pueden actuar como insecticidas, herbicidas o fungicidas.

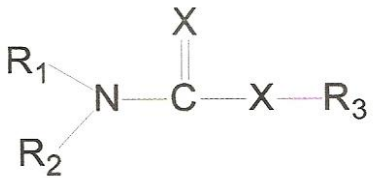

Figura 5. Estructura general de los carbamatos

En la Fig. 5, X puede ser O o S. En el caso de los insecticidas X corresponde a O. R_3 es un radical orgánico o un metal. R_1 y R_2 por lo general, son radicales orgánicos pero pueden ser átomos de hidrógeno. Si R_2 es un hidrógeno y R_1 es un metilo actúa como insecticida. Si R_2 es un hidrógeno y R_1 es aromático actúa como herbicida. Si R_1 es benzinidazol actúa como fungicidas. Los carbamatos generalmente son liposolubles.

Los carbamatos ingresan al organismo por vía cutánea, respiratoria o digestiva. No se acumulan en el organismo y su biotransformación ocurre a través de tres mecanismos básicos: hidrólisis, oxidación y conjugación. Su eliminación ocurre principalmente por la orina, las heces y el aire expirado.

Algunas propiedades generales a destacar son:

- Son liposolubles, lo que favorece su penetración en el organismo;
- Poseen baja presión de vapor, lo que los hace poco volátiles;
- Sus principales formas de biodegradación en el ambiente son la hidrólisis y la oxidación, además los presentes en aguas superficiales pueden ser degradados por la radiación solar;
- Tienen relativamente baja persistencia en el ambiente; y
- Son muy solubles en metanos y acetona, moderadamente solubles en benceno y tolueno, y poco solubles en agua

Su blanco de acción primario, al igual que los OPs, es la inhibición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa. A diferencia de los OPs, los insecticidas carbamatos, no requieren de un proceso de activación metabólica, pudiendo unirse a la enzima directamente. La unión a la enzima da lugar a la formación de una enzima carbamilada que es mucho menos estable que la fosforada generada por la unión de los OPs. Esto hace que la inhibición producida por los carbamatos sea reversible (Sogorb y Vilanova, 2002).

El **carbaril** (1-natfil metil carbamato, número CAS 63-25-2), carbamato utilizado en esta tesis, es un pesticida utilizado para el control de insectos plaga en cultivos, corrales y en los domicilios (US EPA, 2003; Escolástico León y Cabildo Miranda, 2003).

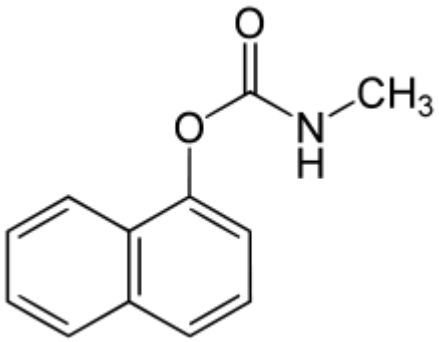

Figura 6. Estructura química del carbaril ($C_{12}H_{11}NO_2$)

El carbaril (Fig. 6) tiene una masa molecular relativa de 201,22 g mol^{-1}, densidad de 1,2 g ml^{-1}, punto de fusión 142 °C y presión de vapor de 0,07 mm Hg (20°C). Su coeficiente de reparto octanol/agua como log K_{ow} es 2,34 (Ficha Internacional de Seguridad Química, 1994). Su solubilidad en agua es 120 mg L^{-1} a 20°C, es moderadamente soluble en disolventes orgánicos polares como la N,N-dimetilformalmida (DMF), el dimetilsulfóxido (DMSO) y la acetona. En otros disolventes carece de solubilidad como es el caso del hexano y del benceno (Castellanos y Galvis, 2015). Es un polvo cristalino ligeramente coloreado (rosa o verde pálido) e inodoro. Presenta una vida media a pH 7 de 12 días (Guía de Productos Fitosanitarios, 2009).

Distintos estudios realizados en laboratorios demostraron que el carbaril es prácticamente no tóxico por exposición aguda para aves, moderadamente tóxico para los mamíferos y los peces y altamente tóxico para abejas e invertebrados acuáticos (US EPA, 2003). Se ha determinado que la dosis letal 50 oral aguda (DL_{50}) es de 108-840 mg Kg^{-1} para ratas, ratones, conejos, cobayos, perros, gatos y ciervos (Jorsaraei *et al.*, 2014). Es altamente tóxico para invertebrados marinos y otras especies acuáticas (Castellanos y Galvis, 2015). Para el ser humano se ha considerado un químico capaz de producir cáncer, debiendo evitarse por completo su presencia en aguas destinadas al consumo (Estado de California - EPA, 2010).

La degradación de carbaril se ve afectada por factores extrínsecos como la temperatura, pH, anoxia y alto contenido de materia orgánica (Hanazato y Yasuno, 1989; Lartigues y Garrigues, 1995). En aguas y suelos cuyo pH es básico, la degradación de carbaril es rápida: de 1,8 días a pH 8 (Aly y El-Dib, 1971) comparada con la degradación a pH neutro o ácido (10,5 días a pH 7-7,4) según Howard (1991). La degradación de carbaril es llevada a cabo en el medio ambiente, de manera abiótica por hidrólisis o fotodegradación, y por factores bióticos como el metabolismo de animales, plantas y microorganismos, donde ocurre hidrólisis e hidroxilación del anillo (Castellanos y Galvis, 2015).

I.3.1.2- Uso de metilazinfos y carbaril en Argentina

Tanto los OPs como los carbamatos son ampliamente utilizados en la agricultura y en la actividad frutihortícola en Argentina. En el año 2007, el MAZ y el carbaril fueron considerados unos de los principios activos más utilizados en la Región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén ubicada en la Patagonia Norte (Argentina), un área de más de 35.000 hectáreas de uso agrícola intensivo, según un trabajo multicéntrico elaborado por investigadores de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Comahue y por datos aportados de un consultor privado de la Cámara de Distribuidores de Agroquímicos del Alto Valle (Anguiano y Pechén de D'Angelo, 2007) (Fig. 7).

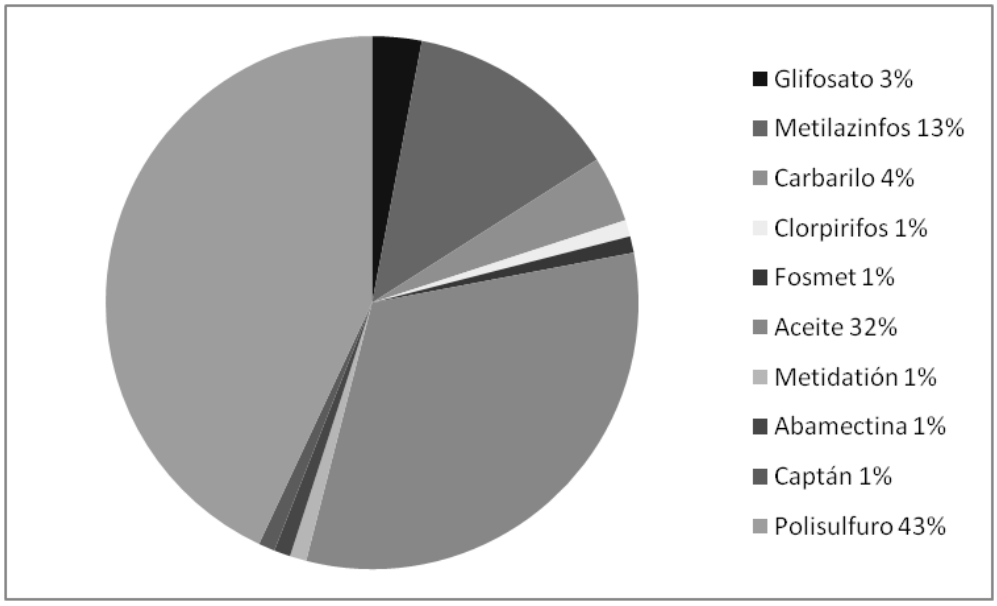

Figura 7. Principios activos de los plaguicidas más utilizados en el Alto Valle en las provincias de Río Negro y Neuquén.

Según Lascano *et al.* en el año 2009 MAZ fue considerado el principal OP aplicado en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, tanto en la frecuencia de aplicación (cada 15 días en el período productivo) como en la cantidad empleada (0,7 Kg por hectárea), alcanzando un total de 600 toneladas pulverizadas sobre 200.000 ha por año. En el agua de la región del Alto Valle, Loewy *et al.* (1999) detectaron una concentración máxima de 79,30 µg L^{-1} de MAZ.

Boland *et al.* (2007) reportaron un monitoreo de residuos de agroquímicos realizado durante el ciclo productivo 2004-2005 en los ríos Limay, Neuquén y Río Negro situados en la región del Alto Valle, con el propósito de determinar su presencia en diversos componentes del ecosistema fluvial y evaluar principalmente la calidad de la fuente de agua para el abastecimiento humano y el riego. Como resultado hallaron que los plaguicidas de uso agrícola fueron detectados en forma esporádica, en concentraciones que no se consideran un riesgo para la salud humana ni para el desarrollo de la vida acuática. Sin embargo, fueron encontradas trazas de aquellos compuestos más utilizados en el control fitosanitario en la región y asociados a la época de aplicación de los mismos, las que incluían al MAZ y al

carbaril. En el año 2011, Loewy *et al.* reportaron los residuos de pesticidas encontrados en el agua y drenajes superficiales en la región del Alto Valle (Tabla 1), encontrándose concentraciones máximas de 22,8 µg L^{-1} de MAZ y de 45,7 µg L^{-1} de carbaril durante el período de aplicación.

Tabla 1. Residuos de pesticidas encontrados en agua y drenajes superficiales en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén

		Compuesto		
		Metilazinfos	**Clorpirifos**	**Carbaril**
Frecuencia de detección (%)	Control	22	22	33
	Período de aplicación	76	73	41
Concentración máxima (µg L^{-1})	Control	0,25	0,16	1,47
	Período de aplicación	22,8	1,16	45,7
Concentración promedio (µg L^{-1})	Control	0,46 ± 0,055	0,023 ± 0,071	0,40 ± 0,44
	Período de aplicación	1,14 ± 3,70	0,054 ± 0,178	1,96 ± 5,94

Adaptado de Loewy *et al.*, 2011

Según Tosi *et al.* (2009) los residuos de MAZ y carbaril encontrados en aguas superficiales de esta región son potencialmente capaces de afectar la supervivencia de algunas especies en el Río Negro y en los drenajes adyacentes.

La concentración de MAZ recomendada para la protección de la vida acuática, por la Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, Argentina, en el año 2003, es de ≤ 0,02 µg L^{-1}. Hoy en día su uso se encuentra prohibido o restringido debido a su alta toxicidad aguda en organismos que no son el blanco de acción. En Argentina se prohibió su uso y comercialización a partir del 31 de marzo del año en curso (Res. SENASA 149/16) y está siendo desplazado por insecticidas menos tóxicos como los neonicotinoides. Sin embargo, a pesar de su prohibición tiene una etapa de retirada por lo cual se sigue todavía utilizando. En Argentina, a pesar de su uso restringido de los últimos años, se detectó también en las Provincia de Buenos Aires (Río Luján) y de Entre Ríos (Acosta, 2014; Castañé *et al.*, 2015).

El MAZ fue muy utilizado en varias partes del mundo y han sido reportadas concentraciones en el agua más altas que las determinadas en nuestro país: 420 µg L^{-1} (Klosterhaus *et al.*, 2003), 625 µg L^{-1} (Cárdenas y Reyes, 2014), 3000 µg L^{-1} (Shayeghi *et al.*, 2001).

En la comunidad europea la prohibición de MAZ fue durante el 2009 y además se reglamentó la disminución de la tolerancia de importación de 0,5 a 0,05 ppm y limitó su uso en la fruta fresca a 2-3 aplicaciones (Cichón y Garrido, 2012).

En Argentina, el carbaril está oficialmente aceptado (Res. SENASA 256/03) para cultivos de algodón, cereales, forestales, frutales, hortalizas, praderas y tabaco. Principalmente se lo usa en cultivos de manzana, frutos cítricos, ciruela, durazno, vid, papa, pepino, pera, zapallo y zanahoria entre otros (Res. SAGyP 507/2008). Es muy utilizado en la producción frutihortícola en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén. En esta región se usa como raleador de frutas y en el control de plagas en cultivos bajos (hortlizas) y frutales (pepita y carozo). Se lo usa principalmente para combatir al gusano del brote del duraznero, bicho del cesto (*Oiketicus platenses*), gusano de la pera y la manzana, psílido del peral (*Psylla pyricola*), cochinilla blanca del duraznero (*Pseudaulacaspis pentágona*) y piojo de San José (*Quadraspidiotus permiciosus*) (Boland *et al.*, 2007). La concentración recomendada en nuestro país para la protección de la vida acuática corresponde a ≤ 0,05 µg L^{-1}.

I.3.1.3- Antecedentes del efecto de MAZ y carbaril sobre la biota

Los efectos de MAZ y carbaril sobre distintos organismos han sido ampliamente estudiados en en vertebrados e invertebrados. Dentro de los vertebrados se evaluaron los efectos de uno o ambos pesticidas en peces (*O. mikiss, Carassius auratus*), anfibios (*Bufo arenarum*) (Beauvais *et al.*, 2001; Ferrari *et al.*, 2004 a y b, 2007 a y b, 2009, 2011; Lascano *et al.*, 2009, 2011 a y b) y ratas (Jorsaraei *et al.*, 2014). En invertebrados existen reportes en el camarón *Litopenaeus stylirostris* (Galindo-Reyes *et al.*, 2006), el anfípodo *Hyalella curvispina* (Anguiano *et al.*, 2008, 2012), el crustáceo *Armadillidium vulgare* (Salvio *et al.*, 2014), el zooplancton (Hanazato y Yasuno, 1989; Hanazato, 1991), microalgas como

Ankistrodesmus falcatus (Martínez-Tabche *et al.*, 1996), dermápteros como *Forficula auricularia* (Malagnoux *et al.*, 2014), el pulgón *Acyrthosiphon pisum* (McGregor y Mackauer, 1989), en el oligoqueto *Lumbriculus variegatus* (Kristoff *et al.*, 2006, 2010) y en los moluscos *Biomphalaria glabrata* (Kristoff *et al.*, 2006, 2010, 2012), *Planorbarius corneus* (Cacciatore *et al.*, 2013; Rivadeneira *et al.*, 2013; Otero y Kristoff, 2016), *Biomphalaria straminea* (Bianco *et al.*, 2014) y *Milax gagates* (Salvio *et al.*, 2014). La mayoría de estos estudios evalúan efectos sobre la actividad de enzimas colinérgicas o enzimas involucradas en mecanismos de estrés oxidativo. Algunos de estos estudios fueron realizados con especies de la región del Alto Valle que no son el blanco de acción de estos insecticidas.

I.4- BIOMARCADORES

Según Silbergeld y Davis (1994) los biomarcadores son señales inducidas por un xenobiótico que reflejan una exposición, una respuesta celular precoz o una susceptibilidad inherente o adquirida al mismo. Publicaciones más recientes sugieren que un biomarcador o marcador biológico se puede definir como la presencia de un xenobiótico o sus metabolitos en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra (Van der Oost *et al.*, 2003; Gil Hernández, 2000).

Los biomarcadores pueden ser de efecto, de exposición o de susceptibilidad (van der Oost *et al.*, 2003). Los biomarcadores de exposición comprenden la detección de un contaminante o de sus metabolitos en algún tejido biológico como sangre, orina, heces, pelos, etc. Además, los productos de la interacción entre el agente contaminante con alguna biomolécula blanco también están incluidos en esta clase (Verrengia Guerrero y Lombardi, 2009; Lombardi *et al.*, 2010). Los biomarcadores de efecto se definen como alteraciones bioquímicas, fisiológicas, conductuales, histológicas o de otra naturaleza que son medibles, las cuales conforme a su magnitud, pueden reconocerse como efectos negativos sobre la salud ya sean establecidos o potenciales. El tercer tipo de biomarcador, el de

susceptibilidad, indica que un determinado organismo es particularmente sensible al efecto de un contaminante, estos marcadores pueden ser heredados o adquiridos (van der Oost *et al.*, 2003).

En toxicología ambiental, los más utilizados son los biomarcadores de exposición y de efecto (Chambers *et al.*, 2002).

La inhibición de ChEs por acción de OPs o carbamatos se considera un biomarcador de alta especificidad (Thompson y Cosson, 1984). Un biomarcador es específico cuando está relacionado con la exposición a uno o a unos pocos contaminantes químicamente relacionados.

Ante los amplios problemas de contaminación que enfrenta el mundo en la actualidad ha sido necesario desarrollar estrategias para detectar tempranamente los efectos nocivos de la contaminación en el ambiente, con el objetivo de abordarlos antes de que alcancen proporciones irreversibles. La toxicología se focalizó, en los últimos años, en el desarrollo de pruebas toxicológicas rápidas que permitan detectar efectos subletales bioquímicos, fisiológicos o a nivel de organismo, cuando ha existido una exposición a contaminantes (Black *et al.*, 1997). De esta manera los biomarcadores juegan un papel importante porque pueden usarse como una herramienta de sondeo para detectar cuando un organismo ha sido expuesto a contaminantes ambientales, y también para cuantificar respuestas toxicológicas específicas en organismos expuestos (Huggett *et al.*, 1992). Mediante el estudio de biomarcadores se puede conocer la biodisponibilidad de los contaminantes, estudiar el riesgo para las especies y pueden ser utilizados como indicadores de la calidad del agua (Shugart *et al.,* 1992; Hill, 1994).

Los biomarcadores se pueden estudiar en los diferentes niveles de organización, desde el nivel subcelular hasta el nivel de organismo y del ecosistema. Primero ocurren los efectos a nivel molecular, seguidos por respuestas a nivel celular (bioquímico), tejido/órgano y luego de cuerpo completo. Se reconoce que las respuestas que ocurren a nivel individual, poblacional y ecosistémico poseen relevancia ecológica y tienden a ser menos reversibles y más dañinas que los efectos a niveles inferiores. Por lo tanto es importante la identificación y comprensión de

efectos tóxicos a nivel sub-organísmico (cambios moleculares, bioquímicos o fisiológicos) y el desarrollo de biomarcadores a este nivel para ser incorporados en programas de monitoreo rutinarios (Forbes y Forbes, 1994; Shugart y Theodorakis, 1996) pero además el estudio de efectos a niveles superiores que pueden predecir modificaciones del ecosistema.

I.4.1- B-esterasas y su uso como biomarcadores de contaminación por pesticidas

Las colinesterasas (ChEs) y las carboxilesterasas (CEs) corresponden a esterasas que toxicológicamente se encuentran en el grupo de las enzimas B-esterasas. Este grupo abarca enzimas que pueden ser inhibidas por los OPs. Estas enzimas presentan en su sitio activo un residuo serina al que el insecticida se une covalentemente provocando la inhibición enzimática. La inhibición producida por los insecticidas OPs resulta irreversible y la actividad enzimática solo se recupera por síntesis de novo de nueva enzima. La inhibición producida por los carbamatos revierte rápidamente una vez que termina la exposición.

Las ChEs son definidas por su capacidad para hidrolizar ésteres de colina (acetilcolina, butirilcolina, propionilcolina, etc.) y ser inhibidas por el alcaloide fisostigmina, también llamado eserina (Massoulié *et al.*, 1993).

Las CEs hidrolizan carboxilésteres y tienen muy baja especificidad de sustrato. Son una familia de múltiples isoenzimas que difieren en la afinidad a los distintos sustratos, según el órgano o el tejido analizado (Otero y Kristoff, 2016). Son esenciales en la hidrólisis y detoxificación de numerosos fármacos y pesticidas. Participan en la protección frente a la exposición a pesticidas por dos mecanismos diferentes: 1) la hidrólisis de carboxilésteres presentes en pesticidas piretroides, carbamatos y en algunos OPs que contienen carboxilésteres como el malatión y 2) siendo un blanco alternativo de inhibición de los OPs y carbamatos y de esta manera competir con las ChEs por la unión al pesticida. Las ChEs tienen una función esencial en el sistema nervioso y la inhibición de su actividad produce neurotoxicidad y distintos efectos tóxicos que pueden culminar en la muerte del organismo. A través

de los mecanismos mencionados, las CEs participan en la disminución de la neurotoxicidad causada por los insecticidas anticolinesterásicos (Caballero de Castro *et al.*, 1991; Jokanovic, 2001, Ferrari *et al.*, 2007a).

El uso conjunto de estas dos enzimas como biomarcadoras fue recomendado por varios autores (Wheelock *et al.*, 2005; Sánchez-Hernandez y Wheelock, 2009; Cossi *et al*, 2015) combinando una mayor especificidad (ChEs) con una mayor sensibilidad (CEs). En la mayoría de los organismos invertebrados estudiados las CEs resultan más sensibles a la inhibición por insecticidas anticolinesterásicos. La correlación entre inhibición de ChEs y signos de neurotoxicidad todavía no es clara. Algunos autores encontraron inhibiciones de ChEs acompañadas de signos de neurotoxicidad, como por ejemplo, en el oligoqueto de agua *L. variegatus* en el que se observa disminución de la movilidad, contracción, curvamiento de la cola o del organismo completo por exposición aguda al MAZ (Kristoff *et al.*, 2006). Por el contrario, otros autores observaron altas inhibiciones de estas enzimas sin ningún signo tóxico visible por ejemplo en *B. glabrata* y *P. corneus* expuestos a MAZ (Kristoff *et al.*, 2006; Cacciatore *et al.*, 2013; Otero y Kristoff, 2016). En general se observa que aquellos organismos en los cuales la inhibición de ChEs ocurre a menores concentraciones que la inhibición de CEs, o sea que la sensibilidad de ChEs es mayor que la de CEs, tienen efectos de neurotoxicidad visibles.

La unión irreversible de los insecticidas OPs a las ChEs y a las CEs trae como consecuencia una lenta recuperación de las actividades enzimáticas luego de que los organismos dejan de estar expuestos (Ferrari *et al.*, 2004a; Kristoff *et al*, 2006, 2012; Cossi *et al.*, 2015). Como la determinación química en el ambiente de la mayoría de los OPs es muy difícil porque su persistencia es relativamente baja, la lenta recuperación de la actividad hace de estas enzimas una manera adecuada de detectar la presencia de estos tóxicos aunque el pesticida ya no se encuentre en el agua (Sánchez-Hernández y Wheelock, 2009).

Con respecto a los carbamatos, la actividad de B-esterasas se recupera rápidamente una vez que el organismo deja de estar expuesto como se reportó, por ejemplo, en *B. glabrata* y *L. variegatus* expuestos a carbaril (Kristoff et al., 2010).

I.4.2- Otros biomarcadores: efectos subletales de los pesticidas sobre el comportamiento y la reproducción

En la naturaleza los pesticidas pueden producir distintos efectos subletales además de afectar su blanco primario de acción. En la actualidad muchos autores han volcado su interés en estudiar una amplia gama de biomarcadores en los organismos expuestos lo cual brinda mejores herramientas para detectar la contaminación y aumenta el conocimiento del modo de acción de los contaminantes.

Varios autores reportaron que los pesticidas pueden producir alteraciones en el comportamiento, (Kristoff *et al.*, 2006, 2010, 2012; Anguiano *et al.*, 2012; Bianco, 2013, 2014; Cossi *et al.*, 2015), efectos negativos en la reproducción (Triphati *et al.*, 2010; Rivadeneira *et al.*, 2013) y a nivel inmunológico (Jorsaraei *et al.*, 2014), entre otros. Desneux *et al.* (2007) publicaron una revisión de diferentes estudios, sobre distintos efectos subletales producidos en artrópodos benéficos por exposición a pesticidas. Dentro de estos efectos subletales se encontraron efectos en comportamientos tales como: orientación, motricidad, hábitos alimenticios, hábitos reproductivos y en la capacidad de aprendizaje. Los biomarcadores comportamentales tienen la ventaja de poder observarse a simple vista permitiendo la detección fácil y rápida. El estudio de biomarcadores comportamentales resulta útil tanto en organismos blanco como no blanco.

Según Haynes (1988), en general existen tres motivos principales para estudiar los efectos sobre el comportamiento de sustancias neurotóxicas en los insectos blanco:

1. Una observación detallada de signos de neurotoxicidad en los insectos afectados podría ayudar a comprender mejor los modos de acción de insecticidas nuevos y convencionales;

2. Todos los insecticidas interfieren con los patrones comportamentales considerados normales en organismos blanco, por lo que una mejor comprensión de estos efectos puede contribuir a optimizar el uso de los mismos para el manejo de poblaciones de organismos indeseables;

3. El potencial de evolución conductual, refiriéndose a la selección natural a favor de aquellos organismos que responden al material tóxico mediante una reducción de su contacto con el mismo, evitándolo y además adquiriendo resistencia produciéndose una generación con resistencia al pesticida, siendo un punto de alta relevancia para su estudio.

En relación a los pesticidas neurotóxicos seleccionados para el presente estudio, MAZ y carbaril, existen algunos antecedentes sobre efectos sobre el comportamiento que éstos pueden generar. Beauvais *et al.* (2001) encontraron que la exposición de la trucha arcoíris (*O. mykiss*) a carbaril reduce la actividad de ChEs cerebrales que se correlacionó con una reducción de la motricidad en el nado. En el año 2011, Jordaan *et al.*, observaron que juveniles de la lombriz de tierra *Eisenia andrei* expuestos a MAZ presentaban inhibición de ChEs y una reducción de su capacidad de alimentarse y de reproducirse. Por otro lado, Kristoff *et al.* (2006; 2010) mostraron que la exposición a MAZ y a carbaril producía en *L. variegatus* alta inhibición de ChEs y severos efectos de neurotoxicidad que afectaban el movimiento.

Otro de los efectos subletales más estudiados son aquellos que afectan a la reproducción de las especies. Las alteraciones en la reproducción tienen una alta relevancia ecológica ya que la supervivencia de las especies está determinada por el éxito reproductivo de sus individuos. La presencia de contaminantes en el ambiente puede causar alteraciones en la capacidad de reproducción y producir malformaciones en la descendencia y/o disminución del número de individuos de una población (van der Oost *et al.*, 2003).

Con respecto a efectos tóxicos del MAZ y del carbaril sobre la reproducción, existen también algunos antecedentes de estudios realizados en invertebrados acuáticos. Por ejemplo, Agrelo y Kristoff (2012) y Kristoff *et al.* (2011) reportaron que el MAZ producía una disminución de la capacidad reproductiva en adultos de *P. corneus* y *B. glabrata* expuestos. Los autores hallaron que los efectos negativos en la reproducción dependían de la concentración del insecticida y del tiempo de exposición. Por otro lado, Agrelo y Kristoff (2012) observaron que la exposición de ejemplares adultos de *P. corneus* a concentraciones ambientales de MAZ producía efectos adversos en la descendencia como alteraciones en el crecimiento, en el

tiempo para alcanzar la madurez sexual y la supervivencia. Al igual que MAZ, el carbaril también puede producir efectos sobre la reproducción. En un estudio realizado sobre los efectos de dosis subletales de carbaril (2, 5 y 8 mg L^{-1}) en gasterópodos de la especie *Lymnaea acuminata*, se encontró que la fecundidad podía verse muy reducida y hasta detenida (Tripathi y Singh, 2004).

Los parámetros reproductivos frecuentemente analizados en bioensayos toxicológicos con gasterópodos son el número de puestas (masas gelatinosas que contienen los huevos), el número de huevos por puesta, el número de huevos embrionados por puesta, el tiempo que tardan en eclosionar, el número de individuos que eclosionan por puesta y la supervivencia de las crías (Rivadeneira *et al.*, 2013).

Para realizar estudios sobre los efectos de un pesticida en la reproducción es necesario contar primero con un amplio conocimiento de la forma de reproducción y de supervivencia de esa especie tanto en el ambiente como en condiciones controladas de laboratorio.

Hasta el momento existen pocos estudios sobre los parámetros reproductivos de *C. gibbosa* y ninguno sobre su cría en el laboratorio.

I.4.3- Antecedentes de biomarcadores estudiados en *Chilina gibbosa*: estudios de exposición aguda, sub-cronica y crónica

Se denominan ensayos de exposición aguda, generalmente a aquellos que duran hasta las 96 horas. Los ensayos de exposición crónica tienen un tiempo de exposición mayor al 10 % del tiempo de vida de esa especie y los ensayos sub-crónicos presentan una duración entre los dos anteriores (Rivadeneira *et al.*, 2013).

Los bioensayos de exposición sub-crónica y crónica representan mejor las exposiciones ambientales en las cuales los organismos se encuentran naturalmente expuestos a bajas concentraciones de contaminantes por varios días. Además en estos ensayos se pueden evaluar efectos a plazos mayores como efectos en la reproducción y en la descendencia. Por otro lado, al aumentar el tiempo de

exposición algunos biomarcadores que no se ven modificados por exposiciones agudas resultan buenos indicadores a largo o mediano plazo (Rivadeneira *et al.*, 2013).

En *C. gibbosa* existen antecedentes de estudios de exposición aguda con MAZ sin embargo no existen antecedentes de estudios de exposición crónica o sub-crónica. Con respecto al carbaril, no se realizaron hasta el momento ningún estudio en esta especie.

I.4.3.1- Estudios de exposición aguda

En estudios previos en el laboratorio, se caracterizaron las actividades de ChEs y CEs de *C. gibbosa* y se expusieron ejemplares adultos a distintas concentraciones de MAZ por 48 horas (Bianco *et al.*, 2013). Se observó que la actividad de ChEs es muy sensible a la exposición encontrándose una CI_{50} (concentración de MAZ que causa el 50 % de la inhibición) de 0,02 µg L^{-1} que corresponde a la concentración propuesta para la protección de la vida acuática (Fig. 8).

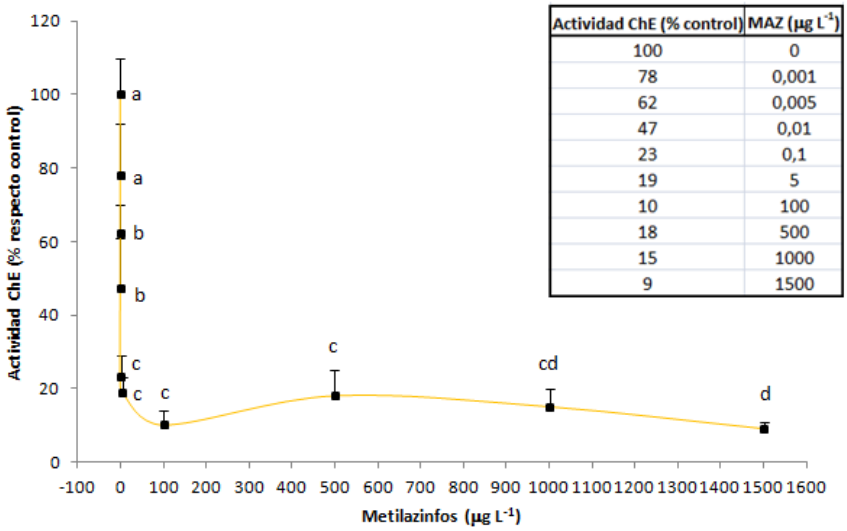

Figura 8. Figura extraída de Bianco (2014). Porcentaje de actividad de colinesterasas (ChE) respecto al control utilizando AcSCh como sustrato, luego de 48 horas de exposición a diferentes concentraciones de metilazinfos (MAZ), en organismos de *Chilina gibbosa*. Cada valor se expresa como promedio ± DS de 6 sobrenadantes. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por el contrario, la actividad de CEs determinada con dos sustratos: p-nitrofenil butirato (p-NFB) y p-nitrofenil acetato (p-NFA) se inhibió a concentraciones mucho más altas (Fig. 9) con una CI_{50} cercana a 1 mg L^{-1}.

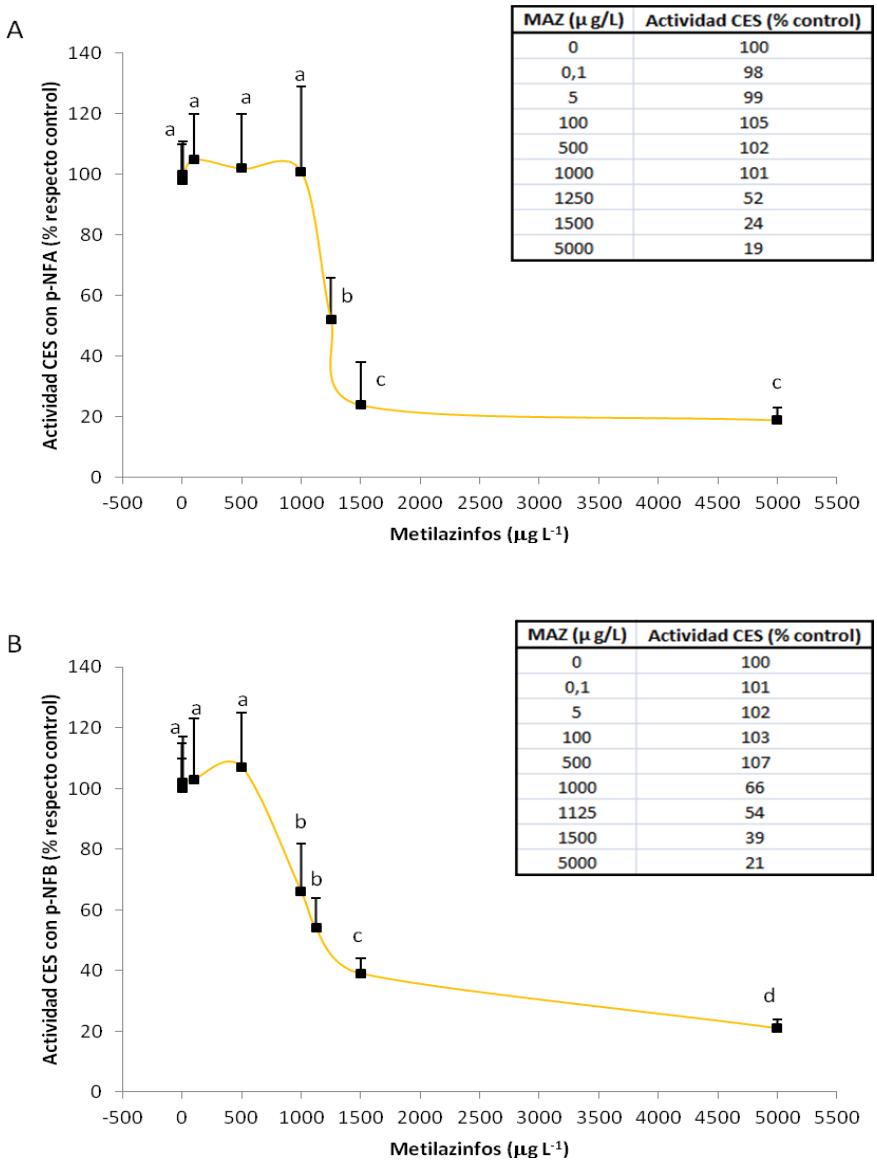

Figura 9. Figura extraída de Bianco, 2014. Porcentaje de actividad de carboxilesterasas (CES) respecto al control luego de 48 horas de exposición a diferentes concentraciones de metilazinfos (MAZ) en *Chilina gibbosa*. A. p-nitrofenil acetato como sustrato. B. p-nitrofenil butirato como sustrato. Cada valor se expresa como promedio ± DS. de 6 sobrenadantes. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Por otro lado, se observaron severos signos de neurotoxicidad correlacionados con la alta inhibición de ChEs. Se describió que la región céfalo-pedal de los organismos expuestos quedaba anormalmente fuera de la concha, sin movimiento y que carecían de la capacidad de adherirse a las paredes de los recipientes, luego de haber sido expuestos al pesticida por 48 horas. Por otro lado, al evaluar la recuperación de la actividad de ChEs y de signos de neurotoxicidad luego de la exposición a 20 $\mu g\ L^{-1}$ de MAZ no se observó recuperación de la actividad de ChEs luego de 21 días en agua aunque los signos de neurotoxicidad se recuperaron en algunos organismos (Cossi *et al.*, 2015).

I.5- OBJETIVOS E HIPÓTESIS

I.5.1- Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es:

Profundizar el conocimiento sobre parámetros bioquímicos, de comportamiento y reproductivos en el gasterópodo nativo de agua dulce, *Chilina gibbosa* para poder ser utilizado en ensayos ecotoxicológicos y ser propuesto o no como especie centinela.

I.5.2- Objetivos específicos e hipótesis

1. Establecer las condiciones para realizar los bioensayos sub-crónicos en *C. gibbosa*.

   Las condiciones para realizar ensayos sub-crónicos no son las mismas que para ensayos agudos.

2. Estudiar el efecto de una exposición sub-crónica a una concentración ambiental del insecticida MAZ sobre la supervivencia y los signos de neurotoxicidad.

   Luego de una exposición sub-crónica a MAZ se producen severos efectos neurotóxicos y mueren.

3. Estudiar el efecto de una exposición sub-crónica a una concentración ambiental de MAZ sobre la actividad de ChEs y CEs.

   Luego una exposición sub-crónica la inhibición de ChEs aumenta respecto a la exposición aguda y las CEs se inhiben a diferencia de lo ocurrido en el ensayo agudo.

4. Estudiar el efecto de una exposición aguda y sub-crónica a una concentración ambiental del carbaril sobre la supervivencia y los signos de neurotoxicidad.

   La exposición a carbaril produce signos de neurotoxicidad desde las 48 horas de exposición, y esto se acentúa hasta producir la muerte de los organismos.

5. Estudiar el efecto de una exposición aguda y sub-crónica a una concentración ambiental del carbaril sobre la actividad de ChEs y CEs.

   Las ChEs resultan más sensibles que las CEs a la inhibición por carbaril, las inhibiciones aumentan con el tiempo de exposición.

6. Comparar las respuestas a ambos pesticidas por exposición sub-crónica a la misma concentración molar.

   Ambos pesticidas producen similares efectos tóxicos.

7. Establecer las condiciones de mantenimiento del cultivo para lograr la reproducción en el laboratorio y analizar algunos parámetros reproductivos.

   La reproducción en el laboratorio es posible utilizando condiciones del agua semejantes a las de su ambiente natural.

II.- MATERIALES Y MÉTODOS

II.1- Materiales

II.1.1- Reactivos

Los siguientes reactivos: 5,5' -ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), ioduro de acetiltiocolina (AsCh), p-NFB, p-NFA, sero albúmina bovina, metilazinfos PESTANAL (97,2 % pureza) y el carbaril (99,0 % pureza) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Todos los otros reactivos usados fueron de grado analítico.

II.1.2- Equipo

Para realizar los homogenatos se utilizó un Potter Elvehjen con émbolo de teflón y una microcentrífuga refrigerada para eppendorf de Sigma para obtener los sobrenadantes.

Las determinaciones espectrofotométricas se hicieron con un espectrofotómetro UV-160A de doble haz.

Para observar las puestas se utilizó una lupa binocular (Nikon, Modal XN). Las fotos fueron sacadas con una cámara digital Cannon (Powershot Sx510 Hs 12,1mp 30x con Zoom Óptico), anexada a la lupa.

II.1.3- Organismos

Los organismos de la especie *C. gibbosa* fueron recolectados en noviembre del 2014 y febrero, octubre y noviembre del 2015.

Se recolectaron manualmente, a una profundidad de entre 5 y 70 cm, en un banco vegetado del río Chimehuin (39°54'57, 15" S; 71°06'23" O) (Fig. 10), aguas arriba de la localidad de Junín de los Andes, provincia de Neuquén, Argentina. El río Chimehuin se origina a 20 Km aguas arriba del sitio de recolección, en un lago glaciar llamado Lago Huechulafquen que pertenece al Parque Nacional Lanín. El área

de recolección puede considerarse libre de contaminación por agroquímicos debido a que no hay actividad agrícola río arriba (Bianco *et al.*, 2013; Ley Federal 22351, Argentina).

Figura 10. Mapa de la región patagónica donde se encuentran el río Chimehuín, lugar donde se recolectaron manualmente los individuos de *C. gibbosa*. La estrella indica aproximadamente el sitio de recolección, cuyas coordenadas son 39° 54’ 57, 15’’ S; 71° 06’ 23’’ O
.

Luego, los organismos fueron transportados a FCEN, UBA donde se aclimataran en tanques de vidrio aireados de diferentes capacidades según la cantidad de individuos (aproximadamente 25 organismos por cada 5 litros de agua). Se utilizó agua de red declorada pasivamente al menos por 48 horas. Los tanques permanecieron dentro de una cámara fría (cámara del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEN, UBA) donde el agua se mantuvo a una

temperatura de 12 ± 2°C, con un fotoperíodo de 12:12 horas (luz:oscuridad). El tiempo mínimo de aclimatación fue de 20 días, durante los cuales se cambió el agua 3 veces por semana. Se los alimentó con alimento especial para peces (TetraFin, Goldfish Flakes, Marca Tetra) finamente triturado, después de cada cambio de agua, con la intención de generar una asociación positiva con la manipulación y así reducir el estrés durante los bioensayos. El alimento utilizado es fabricado en Alemania por Tetra GmbH, y su composición es la siguiente: proteína cruda: 42,0 %, grasa cruda: 11,0 %, fibra cruda: 2 %, humedad: 6,5 %, Fósforo: 1,1 %, Vitamina C: 256 mg Kg^{-1}, Omega-3: 8000 mg Kg^{-1}, Niacina: 600 mg Kg^{-1}, Colina 1700 mg Kg^{-1}, Vitamina A: 15000 IU Kg^{-1}, Vitamina D3: 1300 IU Kg^{-1}, Vitamina E: 120 IU Kg^{-1}, Vitamina B12: 85 mg Kg^{-1} y Biotina: 1 mg Kg^{-1}.

Para todos los bioensayos se seleccionaron adultos de tamaño (1,6 ± 0,4 cm) y peso similar (0,27 ± 0,08 g).

II.2- Métodos

II.2.1- Bioensayos

Todos los bioensayos fueron llevados a cabo a una temperatura del agua de 12 ± 2°C y un fotoperíodo de 12:12 horas (luz:oscuridad) en la misma cámara fría donde se aclimataron. Se utilizó agua de red declorada pasivamente durante 72 horas. Los análisis químicos del agua declorada determinados por AySA dieron como resultado: alcalinidad = 44 mg de $CaCO_3$ L^{-1}; pH = 8 ± 2; conductividad = 246 µS cm^{-1}; turbiedad NTU = 1,6; Amonio = < 0,05 mg L^{-1}; Cloruros = 43 mg L^{-1}; Oxígeno consumido = 1,1 mg L^{-1}; Oxígeno disuelto = 8,8 mg L^{-1}; Cloro libre = negativo; Cloro total = negativo; Aluminio = < 0,05 mg L^{-1}; Calcio = 15 mg L^{-1}.

Las soluciones "madre" se prepararon solubilizando los insecticidas en acetona debido a que ambos son insolubles en agua. Las concentraciones de MAZ y de carbaril utilizadas en los bioensayos se obtuvieron diluyendo las soluciones "madre" con agua declorada. Durante los bioensayos todas las soluciones fueron renovadas cada 4 días (bioensayos con MAZ) y todos los días (bioensayos con

carbaril) siguiendo estudios previos de estabilidad de los insecticidas en el agua realizados con anterioridad en recipientes de vidrio y plástico en el laboratorio (Cacciatore, 2009; 2013) determinando las concentraciones de MAZ y de carbaril por HPLC en fase reversa (Bianco *et al.*, 2013; Cacciatore, 2013 y datos no publicados). La concentración molar de MAZ y de carbaril utilizada en los bioensayos fue 0,063 nM. Esta concentración molar corresponde a 20 µg L^{-1} de MAZ y a 13 µg L^{-1} de carbaril. Ambas concentraciones corresponden a concentraciones ambientales reportadas en aguas dulces de nuestro país en la región del Alto Valle (Loewy *et al,.* 1999; 2011).

Se realizaron tres bioensayos de exposición sub-crónica (hasta 14 días) como se muestra en la Figura 12. Dos con MAZ y uno con carbaril.

El primero (con MAZ) se realizó siguiendo la metodología de Bianco *et al.* (2013) descripta para ensayos de exposición aguda (48 horas), sin aireación y sin alimentación. Se utilizaron 6 recipientes de vidrio de 500 ml de capacidad con 400 ml de solución en cada uno: 3 con acetona al 0,05 % en agua (control solvente) y 3 con MAZ en una concentración de 0,063 nM. Se colocaron 5 o 6 individuos por recipiente de forma aleatoria. La exposición duró 14 días. En los días 7 y 14 de exposición se registró mortalidad y signos de neurotoxicidad y se realizaron los homogenatos según Kristoff *et al.* (2006) para las determinaciones bioquímicas.

Los siguientes dos bioensayos de exposición sub-crónica (uno con MAZ y el otro con carbaril), se realizaron con características semejantes entre sí. Estas condiciones fueron puestas a punto durante la realización de esta tesis de maestría. Ambos se desarrollaron con aireación y alimentando a los organismos cada 4 días, después de cada recambio de solución, con alimento para peces. En ambos casos se utilizaron 12 recipientes y se colocaron 7 individuos en cada uno aleatoriamente. Para MAZ se usaron recipientes de entre 500 ml y 1000 ml de capacidad, con volúmenes de solución equivalentes; para carbaril los recipientes fueron de 1000 ml de capacidad con el mismo volumen de solución por recipiente. Para cada bioensayo se prepararon 6 recipientes con acetona al 0,05% (control solvente) y 6 con una concentración de 20 µg L^{-1} de MAZ o 13 µg L^{-1} de carbaril según el caso (Fig. 11). En ambos bioensayos se registraron los signos de neurotoxicidad y se realizaron los

homogenatos a los 7 y 14 días de exposición de un individuo por cada recipiente. Los homogenatos se hicieron por separado por lo que se elaboró en cada período 6 de control y 6 tratados. En el bioensayo de carbaril también las observaciones y determinaciones bioquímicas se hicieron a las 48 hs de exposición ya que en este caso, a diferencia del MAZ, no se contaba previamente con ensayos de exposición aguda a carbaril. Para ello se extrajo un individuo de cada recipiente a las 48 horas de exposición (Fig. 11).

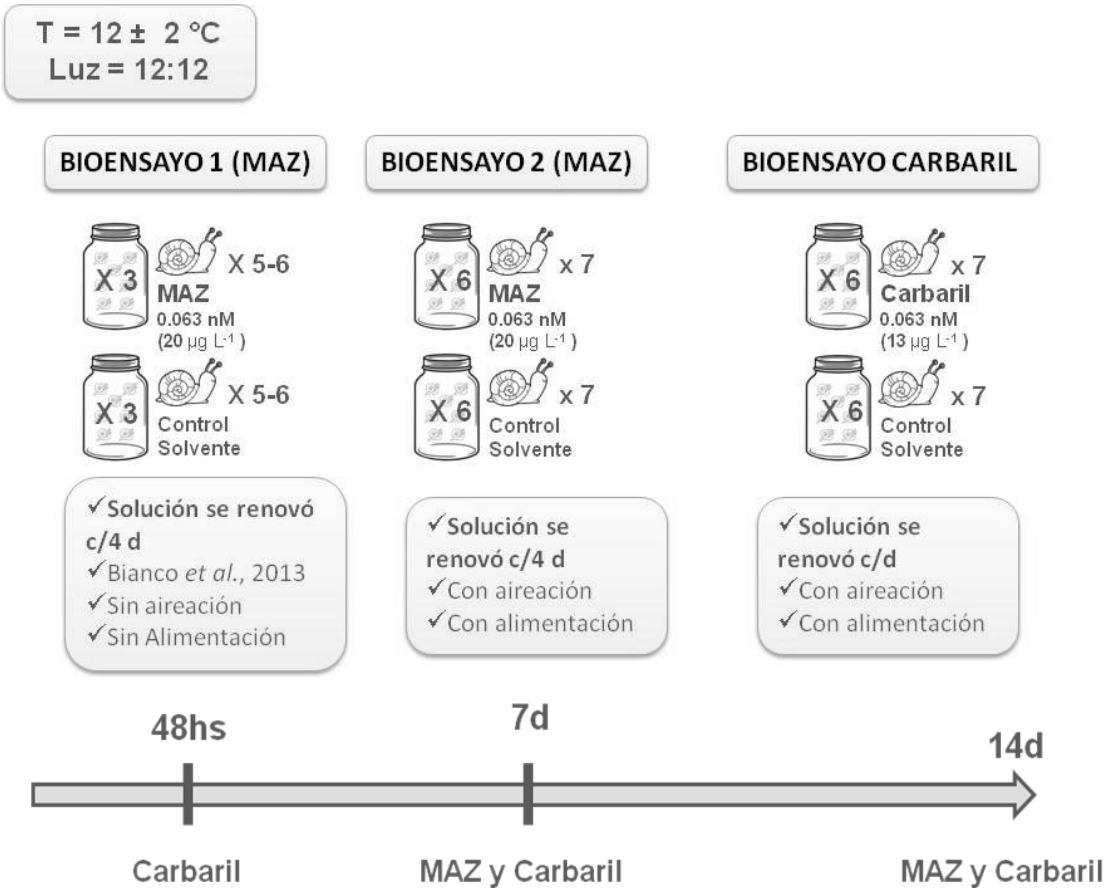

Figura 11. Esquema de los 3 bioensayos. Todos con la misma concentración molar (0,063 nM), mismas condiciones de temperadura (12 ± 2 °C), régimen luz:oscuridad (12:12) y duración (14 días). Con Metilazinfos se realizaron dos, uno (Bioensayo 1) sin aireación y sin alimentación y otro (Bioensayo 2) con aireación y alimentación. Un tercer bioensayo con Carbaril, en condiciones semejantes al Bioensayo 2, con aireación y alimentación, incluyó una toma de datos a las 48 horas para evaluar los efectos de la exposición aguda.

(a)

(b)

Figura 12. Bioensayos de metilazinfos (a) y carbaril (b).

Para la decontaminación de todo el material en contacto con los pesticidas se utilizó un baño de NaOH al 10 % en el cual se sumergió el material por 48 horas, luego se lavó con agua de la canilla y con agua destilada. El descarte de las soluciones y de los restos de los organismos se realizó siguiendo todos los protocolos del Servicio de Higiene y Seguridad de la FCEN, UBA. Para nuestro grupo de trabajo (Ecotoxicología Acuática: Invertebrados Nativos, Dpto. de Química Biológica, FCEN, UBA) contamos con un plan de trabajo aprobado por dicho Servicio.

II.2.2- Homogenatos

Los organismos fueron colocados en hielo durante unos minutos con fines de sedación, previo a proceder con la remoción de su concha. Se los pesó y luego se realizó la homogeneización con buffer Tris/HCL 20 mM, pH 7,5 conteniendo 0,5 mM EDTA, en una relación 1g de tejido/10 ml de buffer, en un tubo de vidrio y con un Potter Elvehjen con émbolo de teflón. Los homogenatos fueron centrifugados en una centrífuga para eppendorf, a 11,000 x g durante 20 minutos. Luego se reservaron

los sobrenadantes a -18 °C para ser utilizados posteriormente en las determinaciones.

II.2.3- Proteínas totales

El contenido de proteínas fue determinado de acuerdo al método de Lowry *et al.* (1951), utilizando seroalbúmina bovina como estándar. Para la curva de calibración se utilizó un rango de proteínas entre 0 y 0,125 mg L^{-1}. Para la determinación de las muestras se realizó una dilución 1/30 de los sobrenadantes con el buffer de homogenización. Las diluciones de la solución madre de seroalbúmina bovina utilizadas para la realización de la curva de calibración también se realizaron en el buffer de homogeneización. Todos los puntos de la curva y las muestras se determinaron por duplicado. La reacción consiste en el agregado de la solución alcalina (solución alcalina de carbonato de sodio, tartrato de sodio y potasio y sulfato de cobre) a las muestras y luego de la incubación por 10 minutos, el agregado del reactivo de Folin. La Absorbancia se lee a 660 nm luego de 30 minutos.

II.2.4- Actividad de colinesterasas

La actividad de ChEs fue medida en el sobrenadante, agregando directamente en la cubeta del espectrofotómetro 1,2 ml de DTNB (reactivo de coloración) 0,2 mM en buffer fosfato 100 mM, pH 8, 100 µl de AsCh como sustrato y 200 µl de cada sobrenadante según el método de Ellman *et al.* (1961). Se tuvo en cuenta la caracterización previa para esta especie realizada anteriormente en nuestro laboratorio (Bianco *et al.,* 2013) para utilizar la concentración del sustrato que permita trabajar a condiciones de sustrato saturante. La absorbancia se monitoreó a 412 nm durante 1 minuto, a intervalos de 10 segundos. Las lecturas se hicieron contra un blanco que contenía el buffer-cromógeno y el sustrato, corrigiendo de esta manera si hubiera hidrólisis espontánea del sustrato. La actividad específica de las enzimas se expresó como µmoles de sustrato hidrolizado por minuto por mg de

proteínas utilizando el coeficiente de extinción molar del producto coloreado (13,6 $mM^{-1}cm^{-1}$).

II.2.5- Actividad de carboxilesterasas

La actividad de CEs fue medida en el sobrenadante, utilizando como sustrato p-NFA y p-NFB de acuerdo al método puesto a punto por Kristoff *et al*. (2010). Se tuvo en cuenta la caracterización previa para esta especie (Bianco *et al.,* 2013). Se agregaron directamente en la cubeta del espectrofotómetro 2,5 ml de buffer fosfato 100 mM, pH 8,0 conteniendo 5% de acetona, 250 µL de p-NFA o de p-NFB en acetona con una concentración final de 1 mM y 150 µL de cada sobrenadante. Se monitoreó la absorbancia durante 1 minuto, a intervalos de 10 segundos a 400 nm. Las lecturas se hicieron contra un blanco que contenía el buffer y el sustrato corrigiendo de esta manera si hubiera hidrólisis espontánea del sustrato. La actividad específica se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar (18,6 $mM^{-1}cm^{-1}$) del p-nitrofenol que es el producto coloreado de la reacción. La actividad específica se expresó como µmoles de sustrato hidrolizado por minuto por mg de proteínas.

II.2.6- Mortalidad y signos de neurotoxicidad

Los criterios de mortalidad y signos de neurotoxicidad fueron los empleados por Kristoff *et al*. (2006) y Bianco *et al*. (2013).

II.2.7- Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.00 para Windows GraphPad Software, La Jolla California USA (www.graphpad.com). Se verificó si los datos eran paramétricos o no para definir la prueba a utilizar (Zar, 1999; Pulido Hernández, 2007; McDonald, 2014). Los supuestos de normalidad y homocedacea se verificaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnof y una distribución F, respectivamente. El efecto sobre las

enzimas se analizó utilizando la prueba t de Student no pareada para los datos paramétricos y la prueba de Mann Whitney para los datos no paramétricos. La mortalidad y neurotoxicidad se analizaron con el Test Exacto de Fisher. El nivel de significancia utilizado fue de 0,05 en todos los casos.

III.- Resultados

III.1- Ensayos sub-crónicos con pesticidas

Se realizaron un total de tres bioensayos, dos con MAZ y uno con carbaril. Con MAZ se realizó uno sin aireación (Bioensayo 1) y otro con aireación artificial (Bioensayo 2). Un tercer bioensayo, replicando las condiciones del Bioensayo 2, se realizó reemplazando el pesticida MAZ por carbaril.

III.1.1- Exposición sub-crónica a metilazinfos

Los Bioensayos 1 y 2, consistieron en realizar una exposición sub-crónica a MAZ con condiciones semejantes de temperatura, iluminación, concentración del insecticida y tiempo de exposición. El Bioensayo 1 se realizó siguiendo las pautas de la exposición aguda realizada por Bianco (2014), en cuanto a aireación, alimentación y recambio de soluciones. Al Bioensayo 2 se le agregó aireación artificial, recambio de las soluciones y alimentación. Para ambos, se observó la mortalidad, los signos de neurotoxicidad (falta de adherencia y exposición de la región céfalo-pedal) y se determinó la actividad de ChEs y CEs con p-NFA y p-NFB a los 7 y 14 días de exposición a 20 µg L^{-1} de MAZ.

III.1.1.1- Mortalidad

La Figura 13 muestra el porcentaje de mortalidad durante los Bioensayos 1 y 2. Se puede observar que luego de 7 días de exposición a MAZ no hubo mortalidad en el ensayo con aireación artificial y que a los 14 días sólo murió un organismo, mientras que en los controles no se observó mortalidad. Por el contrario, en el bioensayo sin aireación se observó una alta mortalidad (44 % de mortalidad a los 7 días y 87 % a los 14 días) en relación a la observada para los controles (7 % a los 7 y 14 días de exposición).

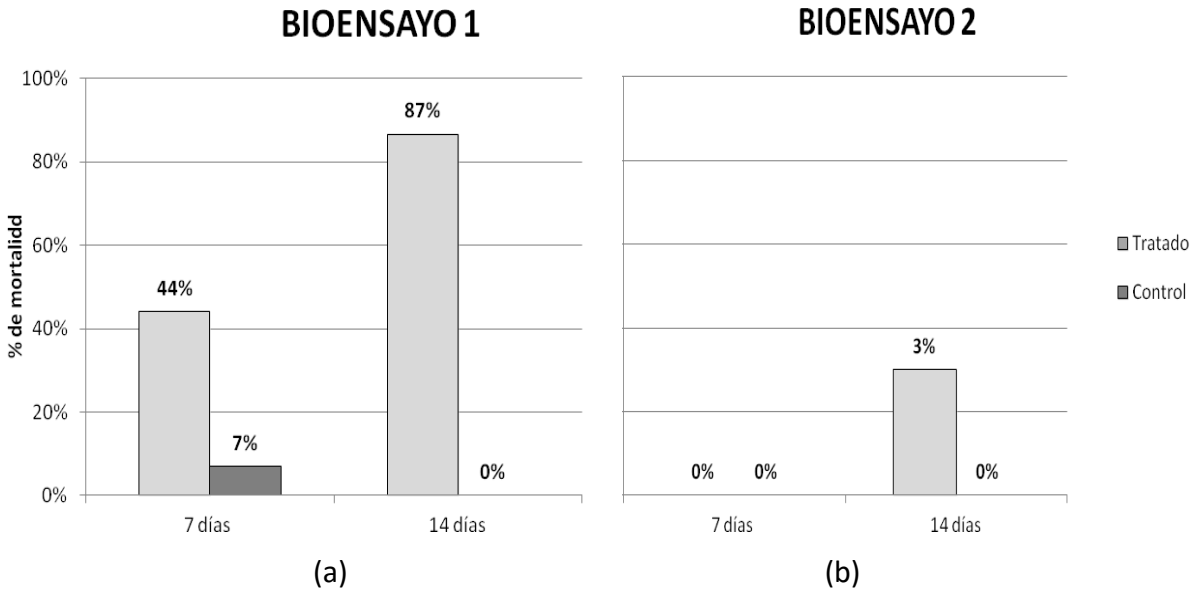

Figura 13. Porcentajes de mortalidad durante bioensayos de exposición sub-crónica de *Chilina gibbosa* expuestos a 20 μg L^{-1} de metilazinfos. (a) BIOENSAYO 1: sin aireación y sin alimentación, (b) BIOENSAYO 2: con aireación y alimentación, a 7 y 14 días de tratamiento. La estadística se realizó con el Test Exacto de Fischer. La mortalidad en el BIOENSAYO 1 resultó estadísticamente significativa respecto al control.

III.1.1.2- Signos de neurotoxicidad

Los dos signos de neurotoxicidad observados fueron la región céfalo-pedal expuesta y la adherencia de los organismos a las paredes de los recipientes que los contenían. La adherencia para los individuos expuestos del Bioensayo 1 fue del 50 %, a los 7 y 14 días, mientras que en el Bioensayo 2 presentaron una marcada disminución de esta capacidad siendo la falta de adherencia de un 90 % a los 7 días de exposición y del 100 % a los 14 días, como se puede apreciar en la Figura 14.

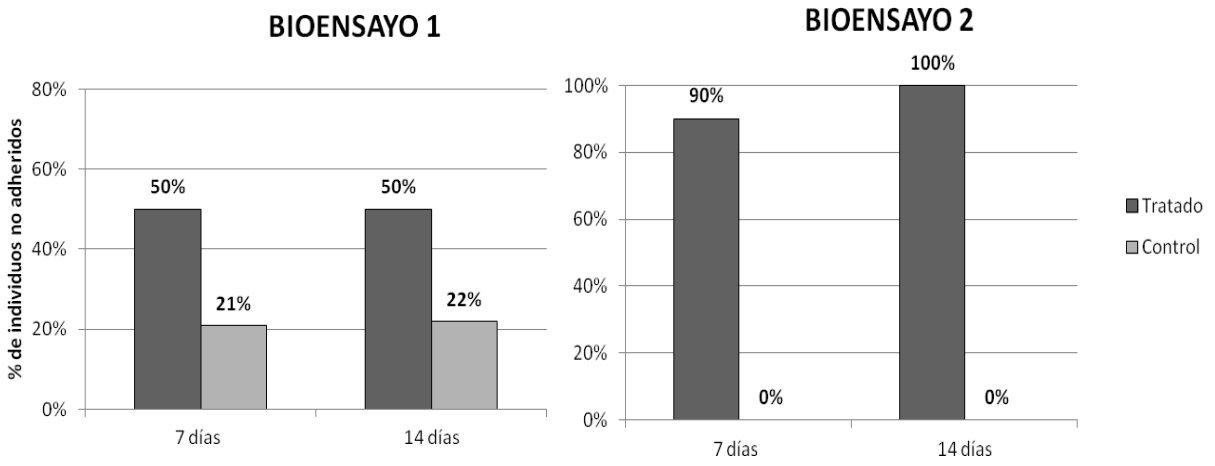

Figura 14. Porcentaje de organismos no adheridos a la pared de los recipientes, para bioensayos de exposición sub-crónica de *Chilina gibbosa* a 20µg L^{-1} de metilazinfos, sin aireación (BIOENSAYO 1) y con aireación artificial (BIOENSAYO 2), a 7 y 14 días de exposición. La estadística se realizó con el Test Exacto de Fischer, resultando diferentes los resultados de los grupos tratados respecto a sus controles.

En cuanto a la región céfalo-pedal expuesta, a los 7 días de exposición los individuos mostraron este signo en un 70 % en el Bioensayo 1 y en un 100 % en el Bioensayo 2. A los 14 días de exposición todos los organismoss, de ambos bioensayos, mostraron este signo de neurotoxicidad. En la Figura 15 se pueden observar un individuo del grupo control (Fig. 15c) y dos expuestos a MAZ (Fig. 15 a y b) que muestran la región céfalo pedal anormalmente expuesta.

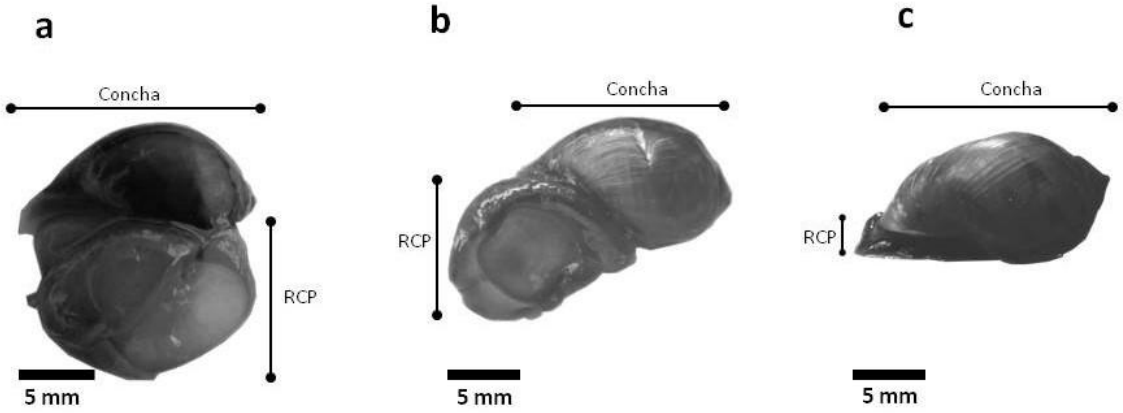

Figura 15. Exposición de la región céfalo-pedal de *Chilina gibbosa*. Los organismoss a y b con la región céfalo-pedal (RCP) expuesta, luego de 14 días de exposición a 20 µg L^{-1} de metilazinfos. El individuo c pertenece al grupo control en el mismo periodo.

En la Tabla 2, a continuación, se puede ver una comparación de los resultados para ambos bioensayos a los 7 y 14 días de exposición. Se muestran los porcentajes de efecto sobre la mortalidad y los biomarcadores evaluados: exposición de la región céfalo-pedal y falta de adherencia. Se puede observar que en el Bioensayo 1 existe una mayor mortalidad que en Bioensayo 2 pero los signos de neurotoxicidad se observan en un mayor % de organismos que en el Bioensayo 1. Estos resultados muestran que en el Bioensayo 1 el mayor porcentaje de los organismos mueren y los que sobreviven presentan menores signos de neurotoxicdad. En cambio en el Bioensayo 2 el efecto del tóxico es subletal mostrando severos efectos neurotóxicos.

Tabla 2. Mortalidad y signos de neurotoxicidad. Porcentajes de efecto para los signos de neurotoxicidad (adherencia y Región Céfalo-pedal expuesta), y de mortalidad para *Chilina gibbosa* luego de una exposición sub-crónica a 20 $\mu g\ L^{-1}$ de metilazinfos durante 7 y 14 días. La columna "DS" indica si se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el tratado ($p<0,05$).

			BIOENSAYO 1 (Sin aireación)		**Bioensayo 2 (con aireación)**	
Día	**Biomarcador**	**Efecto**	**Porcentaje**	***p***	**Porcentaje**	***p***
7	Adherencia	Ausente	50%	$p > 0,05$	90%	$p < 0,05$
	Región Céfalo-pedal	Expuesta	70%	$p < 0,05$	100%	$p < 0,05$
	Mortalidad	Muertos	44%	$P < 0,05$	0%	$p > 0,05$
14	Adherencia	Ausente	50%	$p > 0,05$	100%	$p < 0,05$
	Región Céfalo-pedal	Expuesta	100%	$p < 0,05$	97%	$p < 0,05$
	Mortalidad	Muertos	87%	$p < 0,05$	3%	$p > 0,05$

II.1.1.3- Actividad de colinesterasas

Los efectos de MAZ sobre la actividad enzimática de ChEs se pudieron observar únicamente para el Bioensayo 2 debido a la elevada mortalidad en el Bioensayo 1, con lo cual no se contó con suficientes individuos para realizar los análisis estadísticos.

En el Bioensayo 2, a los siete días de exposición la actividad de ChEs en los organismos expuestos a MAZ se inhibió en un 87 % con respecto al control (Fig. 16a).

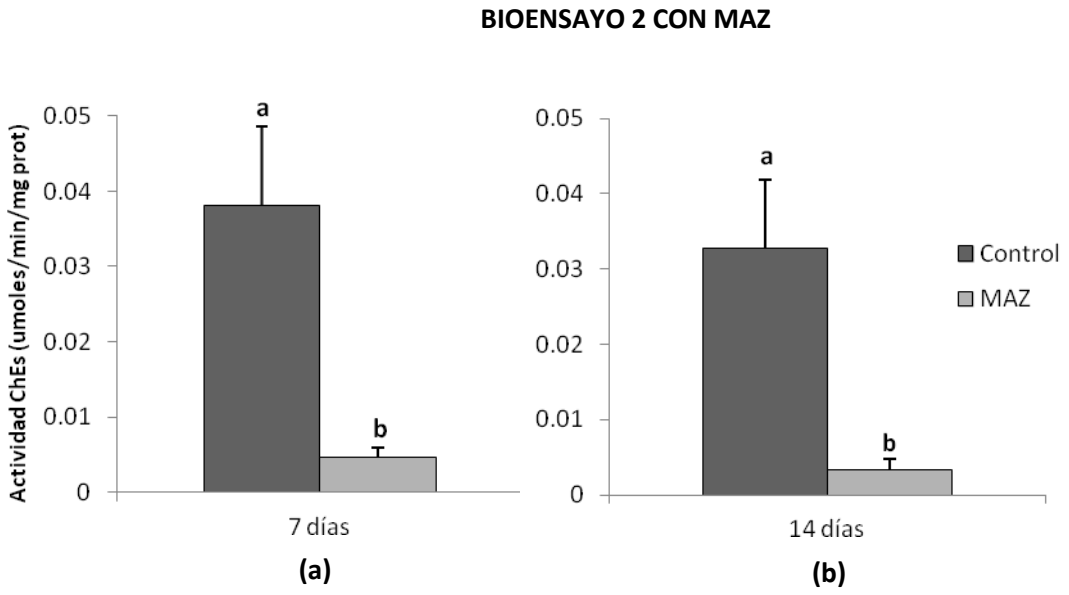

Figura 16. Actividad específica de colinesterasas [media ± d.e.] de *Chilina gibbosa* a 7 (a) y 14 (b) días de exposición a metilazinfos (MAZ). Letras diferentes corresponden a diferencias significativas ($p<0,05$) entre el grupo tratado y el control de cada día. La estadística se realizó con la prueba de Mann Witney, al encontrar que eran no paramétricos para ambos casos. No fue posible realizar un ANOVA de dos factores por incumplimiento de los supuestos.

La inhibición de ChEs se mantuvo en el tiempo observándose una inhibición del 89 % a los 14 días de exposición como puede observarse en la Fig. 16b.

III.1.1.4- Actividad de carboxilesterasas

Se pudieron determinar únicamente en el Bioensayo 2 debido a la alta mortalidad observada en el Bioensayo 1. Las CEs requirieron una exposición más prolongada para presentar efectos. Al séptimo día de exposición no se observaron diferencias significativas respecto al control ($p>0,05$), sin embargo tras 14 días de exposición las actividades específicas de CEs con p-NFA y con p-NFB mostraron inhibición. Las Fig. 17 y 18 muestran las actividades de CEs con ambos sustratos del grupo control y tratado luego de 7 y 14 días de exposición.

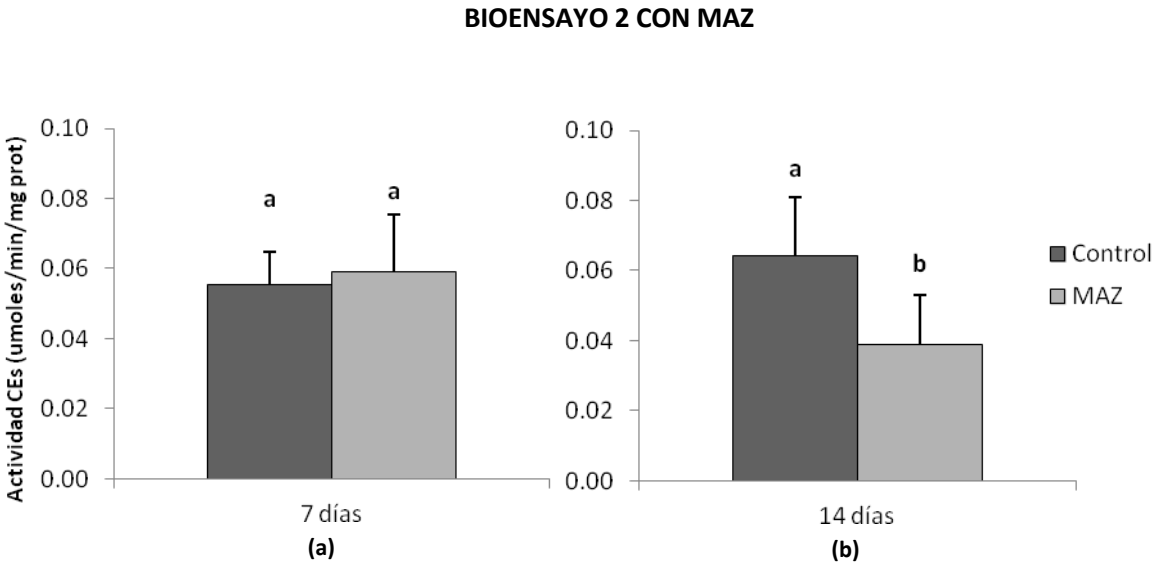

Figura 17. Actividad específica de carboxilesterasas [media ± d.e.], utilizando como sustrato p-nitrofenil acetato, expresada en µmoles/min/mg de proteínas, luego de 7 (a) y 14 (b) días de exposición de *Chilina gibbosa* a 20 µg L^{-1} de metilazinfos (MAZ). La estadística se realizó con la prueba de Mann Witney, al encontrar que eran no paramétricos para ambos casos.Letras distintas representan diferencias significativas (p<0,05) entre tratamientos.

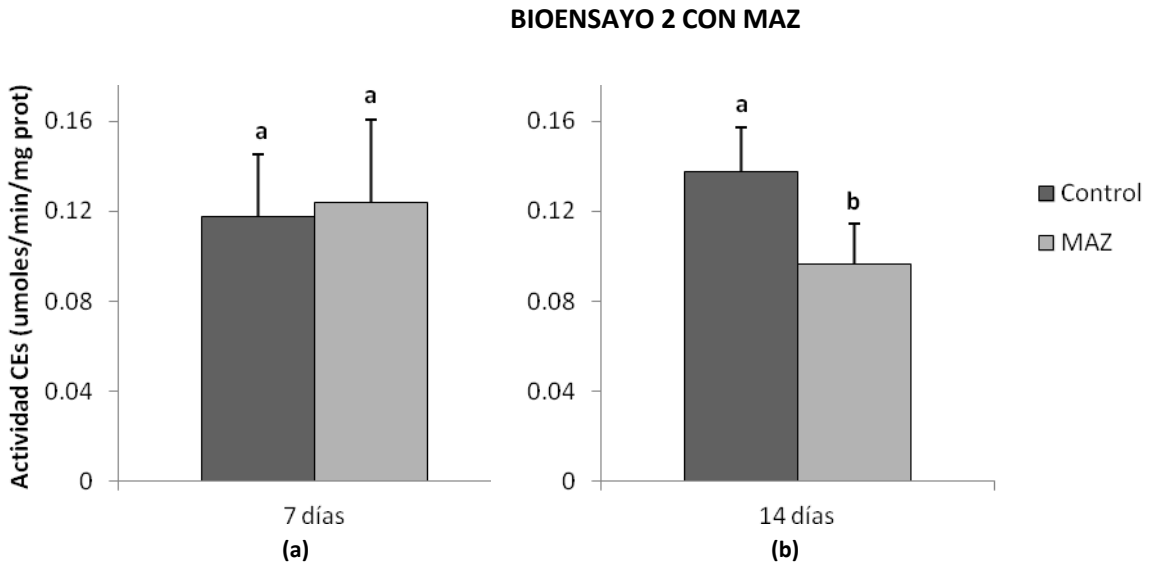

Figura 18. Actividad específica de carboxilesterasas [media ± d.e.], utilizando como sustrato p-nitrofenil butirato, expresada en µmoles/min/mg de proteínas, luego de 7 (a) y 14 (b) días de exposición de *Chilina gibbosa* a 20 µg L^{-1} de metilazinfos (MAZ). La estadística se realizó con la prueba de Mann Witney, al encontrar que eran no paramétricos para ambos casos.Letras distintas representan diferencias significativas (p<0,05) entre tratamientos.

III.1.1.5- Resumen de los efectos de metilazinfos sobre las enzimas β-esterasas

La Tabla 3 muestra un resumen de las actividades específicas de los grupos tratados con MAZ y sus respectivos controles, para ambas enzima estudiadas en los dos períodos de tiempo (7 y 14 días) analizados durante el tratamiento. Para CEs se muestran los resultados para ambos sustratos empleados (p-NFA y p-NFB).

Tabla 3. Actividad enzimática. Actividad específica de colinesterasas (ChEs) y carboxilesterasas con p-nitrofenil butirato (CEs p-NFB) y p-nitrofenil acetato (CEs p-NFA), expresada en µmoles min^{-1} mg de $proteínas^{-1}$, a 7 y 14 días de exposición de los organismos a metilazinfos (MAZ) 20 µg L^{-1} y sus respectivos controles, representada como la media ± la desviación estándar.

		ChEs	CEs p-NFA	CEs p-NFB
7 días	Control	0,038 ± 0,010	0,055 ± 0,009	0,117 ± 0,028
	MAZ	0,005 ± 0,001	0,059 ± 0,016	0,124 ± 0,036
14 días	Control	0,033 ± 0,009	0,064 ± 0,017	0,138 ± 0,020
	MAZ	0,003 ± 0,001	0,039 ± 0,014	0,097 ± 0,018

III.1.1.6- Resumen de efectos de una exposición sub-crónica a MAZ

Los efectos de la exposición sub-crónica a MAZ sobre los parámetros observados se resumen en la Tabla 4. Estos correspondieron a inhibición de las ChEs y signos de neurotoxicidad a los 7 días de exposición a lo que se suma la inhibición de CEs para ambos sustratos utilizados (p-NFA y p-NFB) a los 14 días de exposición.

Tabla 4. Resumen de efectos de metilazinfos. Porcentajes de efectos sobre los biomarcadores observados, a 7 y 14 días de exposición de los organismos a metilazinfos. Los porcentajes se obtuvieron respecto al control.

Día	Biomarcador	Efecto	Porcentaje	*p*
7	ChEs	Inhibición	87%	p < 0,05
	CEs p-NFA	Activación	107%	p > 0,05
	CEs p-NFB	Activación	106%	p > 0,05
	Adherencia	Ausente	90%	p < 0,05
	Región Cefalo-pedal	Expuesta	100%	p < 0,05
	Mortalidad	Muertos	0%	p > 0,05
14	ChEs	Inhibición	89%	p < 0,05
	CEs p-NFA	Inhibición	40%	p < 0,05
	CEs p-NFB	Inhibición	30%	p < 0,05
	Adherencia	Ausente	100%	p < 0,05
	Región Cefalo-pedal	Expuesta	97%	p < 0,05
	Mortalidad	Muertos	3%	p > 0,05

III.1.2- Exposición aguda y sub-crónica a carbaril

El bioensayo de exposición sub-crónica con carbamato carbaril tuvo una duración de 14 días. La concentración empleada fue 0,063 nM siendo la misma utilizada con MAZ. Se utilizaron las mismas concentraciones molares para comparar los efectos de ambos pesticidas.

En este período se observó la mortalidad, los signos de neurotoxicidad y la actividad enzimática de ChEs y CEs luego de 2, 7 y 14 días de exposición. Los signos de neurotoxicidad observados fueron adherencia y exposición de la región céfalo-pedal. En el caso del carbaril, se estudiaron también los efectos a las 48 horas de exposición ya que, a diferencia de MAZ, no se había evaluado anteriormente en nuestro laboratorio.

III.1.2.1- Mortalidad

No se observó mortalidad durante los 14 días que duró el bioensayo.

III.1.2.2- Signos de neurotoxicidad

Los efectos observados (región céfalo-pedal expuesta o no expuesta, adherencia o no adherencia a las paredes del recipiente) no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control durante todo el bioensayo.

III.1.2.3- Actividad de colinesterasas

La actividad de ChEs no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y el control. Se obtuvieron % de actividad del 76, 75 y 65 % a los 2, 7 y 14 días pero no resultaron diferentes estadísticamente respecto al control ya que los D.S. fueron muy elevados.

III.1.2.4- Actividad de carboxilesterasas con p-nitrofenil acetato

La actividad de CEs detterminadas con p-NFA no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y el control. A los 14 días de tratamiento se observó una actividad del 78 % pero no se observaron diferencias respecto al control ya que los D.S. fueron muy grandes.

III.1.2.5- Actividad de carboxilesterasas con p-nitrofenil butirato

A los 2 días de exposición la disminución de la actividad fue del 26 % sin embargo no resultó tener diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control. Al séptimo día de exposición las CEs determinadas con p-NFB fueron inhibidas en un 59 %, condición que se mantuvo hasta el día 14 cuando se observó

un 62 % de inhibición. La Figura 19 muestra la actividad específica de las CEs con p-NFB y su respectivo control, a los días 7 (Fig. 19a) y 14 (Fig. 19b) de exposición de los organismos al pesticida. En ambos días presentaron diferencias significativas entre el control y el tratado.

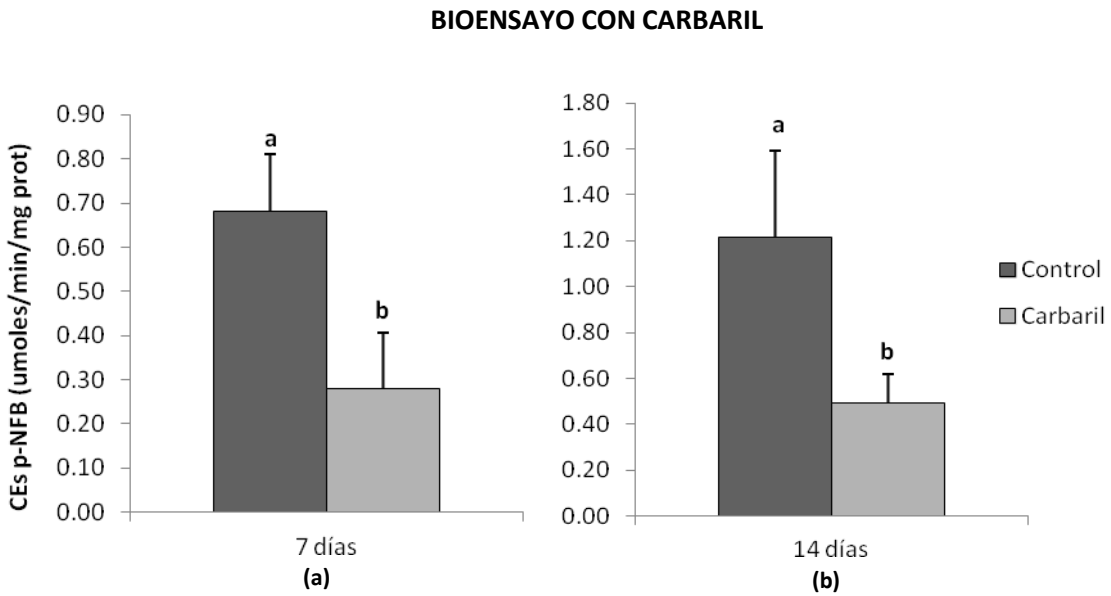

Figura 19. Actividad específica de carboxilesterasas [media ± d.e.], utilizando como sustrato p-nitrofenil butirato (CEs p-NFB), expresada en µmoles min^{-1} mg de $proteínas^{-1}$, luego de 7 (a) y 14 (b) días de exposición de *Chilina gibbosa* a 0,063 nM de carbaril. La estadística se realizó con Prueba de t (7 días) y Mann Whitney (14 días). Letras diferentes representan diferencias significativas ($p<0,05$) entre el grupo tratado y control de cada día. No fue posible realizar un ANOVA de dos factores por incumplimiento de los supuestos.

III.1.2.6- Resumen de los efectos de carbaril sobre las enzimas β-esterasas

La tabla 5 muestra un resumen de las actividades específicas de los grupos tratados con carbaril y sus respectivos controles, para ambas enzima estudiadas en los tres períodos de tiempo (48 hs, 7 y 14 días) analizados durante el tratamiento. Para CEs se muestran los resultados para ambos sustratos empleados (p-NFA y p-NFB).

Tabla 5. Actividad enzimática. Actividad específica de colinesterasas (ChEs) y carboxilesterasas con p-nitrofenil butirato (CEs p-NFB) y p-nitrofenil acetato (CEs p-NFA), expresada en µmoles min^{-1} mg de $proteínas^{-1}$, a 7 y 14 días de exposición de los organismos a carbaril (13 µg L^{-1}) y sus respectivos controles, representada como la media ± la desviación estándar.

		ChEs	CEs p-NFA	CEs p-NFB
48 hs	Control	0,388 ± 0,119	0,261 ± 0,063	0,779 ± 0,218
	Carbaril	0,294 ± 0,124	0,229 ± 0,064	0,575 ± 0,225
7 días	Control	0,431 ± 0,127	0,386 ± 0,110	0,682 ± 0,128
	Carbaril	0,325 ± 0,145	0,370 ± 0,091	0,279 ± 0,128
14 días	Control	0,438 ± 0,195	0,762 ± 0,228	1,213 ± 0,381
	Carbaril	0,287 ± 0,138	0,592 ± 0,214	0,491 ± 0,129

III.1.3- Efectos de metilazinfos vs efectos de carbaril

La Tabla 6 muestra para cada biomarcador los porcentajes obtenidos respecto al grupo control. Ninguno de los dos pesticidas produjo mortalidad a lo largo del experimento (MAZ ensayo 2 y carbaril). A las 48 horas de exposición al carbamato no produjo efectos sobre ninguno de los parámetros estudiados, mientras que resultados de Bianco *et al*. (2013) muestran que la exposición a 0,01 µg L^{-1} MAZ produjo en el 100 % de los individuos la salida anormal de la región céfalo-pedal y falta de adherencia e inhibición de ChEs.

Luego de 7 días de exposición con MAZ fue posible observar una marcada disminución de la actividad de ChEs (87%) no así para las CEs. Por otro lado, se observaron severos efectos de neurotoxicidad (falta de adherencia y exposición de la región céfalo-pedal); por lo contrario ni las ChEs, ni el comportamiento se vieron afectados por el carbaril, pero sí las CEs evaluadas con p-NFB que se mostraron inhibidas (59%).

En el día 14 todos los parámetros observados, a excepción de la mortalidad, presentaron efectos significativos ante la exposición a MAZ, sin embargo ante la exposición a carbaril el único efecto visible fue la inhibición de CEs con p-NFB.

Tabla 6. Comparación de efectos de ambos pesticidas. Porcentajes de efecto en organismos expuestos a metilazinfos y a carbaril durante 48 horas y durante 7 y 14 días. Los porcentajes son respecto al control. Los datos de metilazinfos para 48 horas de exposición fueron obtenidos de Bianco *et al.* (2013), los asteriscos (*) indican la concentración utilizada de metilazinfos: *0,02 μgL^{-1}, ** 0,1 μgL^{-1}, *** 0,01 μgL^{-1} por Bianco *et al.* (2013). Los demás resultados corresponden a esta tesis.

			MAZ		CARBARIL	
Día	**Biomarcador**	**Efecto**	**Porcentaje**	***p***	**Porcentaje**	***p***
48 hs	ChEs	Inhibición	50%*	p < 0,05	24%	p > 0,05
	CEs p-NFA	Inhibición	-2%**	p > 0,05	12%	p > 0,05
	CEs p-NFB	Inhibición	-1%**	p > 0,05	26%	p > 0,05
	Adherencia	Ausente	100%***	p < 0,05	5%	p > 0,05
	Región Céfalo-pedal	Expuesta	100%***	p < 0,05	12%	p > 0,05
	Mortalidad	Muertos	0%***	p > 0,05	0%	p > 0,05
7	ChEs	Inhibición	87%	p < 0,05	25%	p > 0,05
	CEs p-NFA	Inhibición	-7%	p > 0,05	4%	p > 0,05
	CEs p-NFB	Inhibición	-6%	p > 0,05	59%	p < 0,05
	Adherencia	Ausente	90%	p < 0,05	0%	p > 0,05
	Región Céfalo-pedal	Expuesta	100%	p < 0,05	0%	p > 0,05
	Mortalidad	Muertos	0%	p > 0,05	0%	p > 0,05
14	ChEs	Inhibición	89%	p < 0,05	35%	p > 0,05
	CEs p-NFA	Inhibición	40%	p < 0,05	22%	p > 0,05
	CEs p-NFB	Inhibición	30%	p < 0,05	62%	p < 0,05
	Adherencia	Ausente	100%	p < 0,05	0%	p > 0,05
	Región Céfalo-pedal	Expuesta	97%	p < 0,05	0%	p > 0,05
	Mortalidad	Muertos	3%	p > 0,05	0%	p > 0,05

En organismos de *C. gibbosa* expuestos a MAZ la alta inhibición de ChEs y la menor inhibción de CEs se relacionan con la neurotoxicidad observada. Las CEs no estarían ejerciendo su efecto protector. Por el contrario, a pesar de tener el mismo mecanismo de acción ante la exposición al carbaril las CEs resultaron más sensibles que las ChEs y la falta de inhibición de ChEs se relaciona con falta de neurotoxicidad visible.

III.2- Experimento de mantenimiento y reproducción de los organismos

Anteriormente en el laboratorio se había trabajado con *C. gibbosa* únicamente en ensayos agudos (48 hs), éstos individuos llegaban al laboratorio y se aclimataban durante 20 días previo a los ensayos, luego eran utilizados en su totalidad, por lo que no era necesario mantenerlos por períodos más prolongados. Los bioensayos sub-crónicos que pretendíamos realizar (21 días) obligaron al ajuste de las condiciones favorables para prolongar los períodos de mantenimiento. Se ajustaron las prácticas, logrando la supervivencia de los organismos en cautiverio por un período superior a los 16 meses; e inesperadamente esto llevó a una primera experiencia de reproducción en cautiverio de la especie. Habiendo logrado la reproducción en cautiverio, se decidió realizar un ensayo de reproducción para recabar información que permitiera aumentar el conocimiento sobre la especie y el cultivo en laboratorio de la misma.

III.2.1- Ajuste de las prácticas de mantenimiento

Al hablar de mantenimiento nos referimos a los cuidados que permitieron mantener con vida a una población de más de 100 individuos en cautiverio por un período superior a 3 meses. Algunos individuos fueron utilizados para bioensayos,

sin embargo otros continúan a la fecha con vida y reproduciéndose, lo que representa un período superior a los 16 meses.

El espacio y el tiempo que se dedica al mantenimiento, pueden ser una limitante cuando se quiere tener un gran número de éstos organismos en cautiverio. Los bioensayos que realizamos regularmente en nuestro laboratorio requieren un gran número de individuos para producir datos estadísticamente procesables, en este sentido la cantidad de tanques y la cantidad de individuos que se puede tener en cada tanque es importante para la optimización del tiempo dedicado al mantenimiento así como del espacio que ocupan.

Fue posible mantener una densidad máxima de 12 individuos L^{-1} durante 4 meses, pasado este período se destinó algunos ejemplares para ensayos. Mientras mayor sea la densidad poblacional, mayor será el esfuerzo necesario para el mantenimiento, ya que la limpieza y los cambios de agua se deberán realizar con mayor frecuencia para evitar la acumulación de residuos orgánicos que pueden resultar letales debido a los productos de su descomposición.

La frecuencia de alimentación, renovación de agua y limpieza fue determinante para lograr la supervivencia a largo plazo de los organismos. Para los tanques con mayor densidad (12 individuos L^{-1}) se renovó el agua completamente cada 15 días, y se acompañó con una limpieza completa de los filtros. Cada 3 días se realizó una limpieza del fondo para retirar los desechos y renovar el 50 % del agua. Para los tanques con menor densidad (4 individuos L^{-1}) se observó que renovar el agua completamente una vez por mes y realizar la limpieza del fondo 1 vez por semana fue suficiente. La frecuencia de alimentación fue de cada 3 o 4 días independiente de la densidad.

III.2.2- Estudio de algunos parámetros de reproducción

Se observó que las puestas de *C. gibbosa* son masas gelatinosas alargadas en cuyo interior se encuentran los huevos con forma ovalada. Las puestas se pueden

manipular sin que se rompan o pierdan su forma. Son resistentes a distintas acciones mecánicas, como por ejemplo, se pueden sostener con una pinza o las manos sin dañarlas, sin embargo si se aplica un poco de presión es posible partirlas. En la Figura 20 se observa una puesta dentro del agua, adherida de uno de sus extremos a la pared del tanque. Se distinguen claramente los huevos como puntitos blancos dentro de la masa gelatinosa.

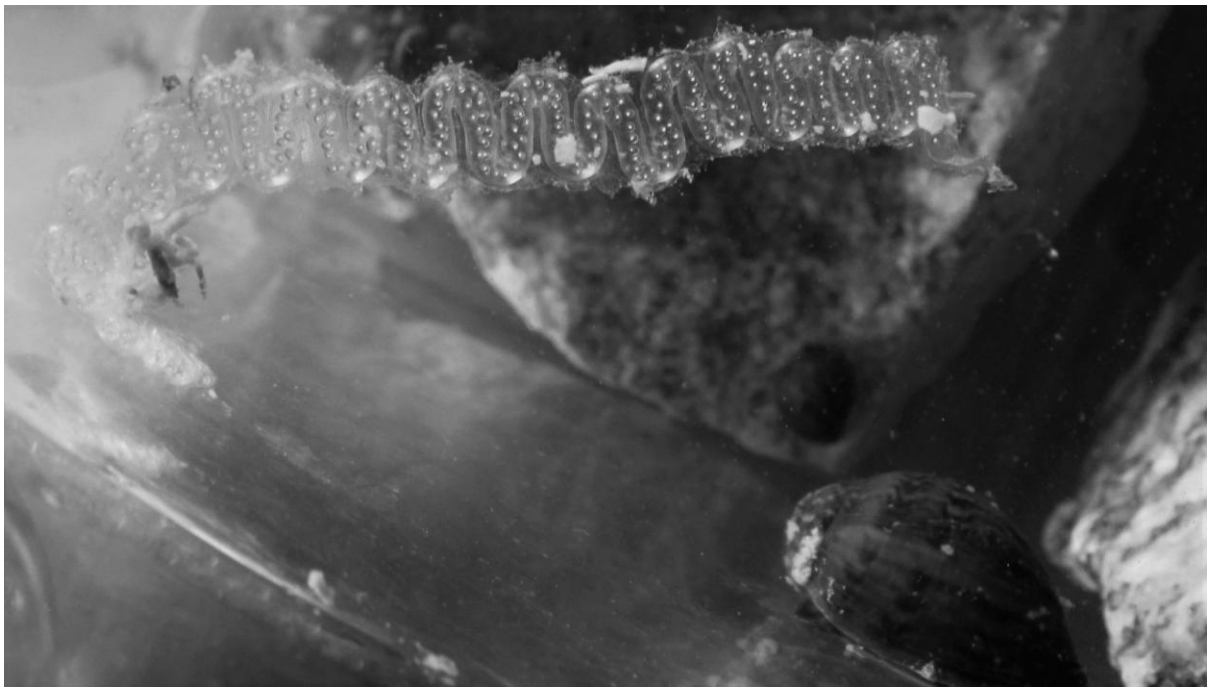

Figura 20. Puesta de *Chilina gibbosa*, dentro del tanque con ejemplares adultos.

Fue posible observar en los tanques los distintos sustratos elegidos por esta especie para depositar las puestas: piedras, paredes de los tanques y sobre la concha de otros individuos, como se puede observar en la Figura 21. Si bien muchas puestas estaban adheridas a estos sustratos, también se observaron puestas libres flotando en el agua.

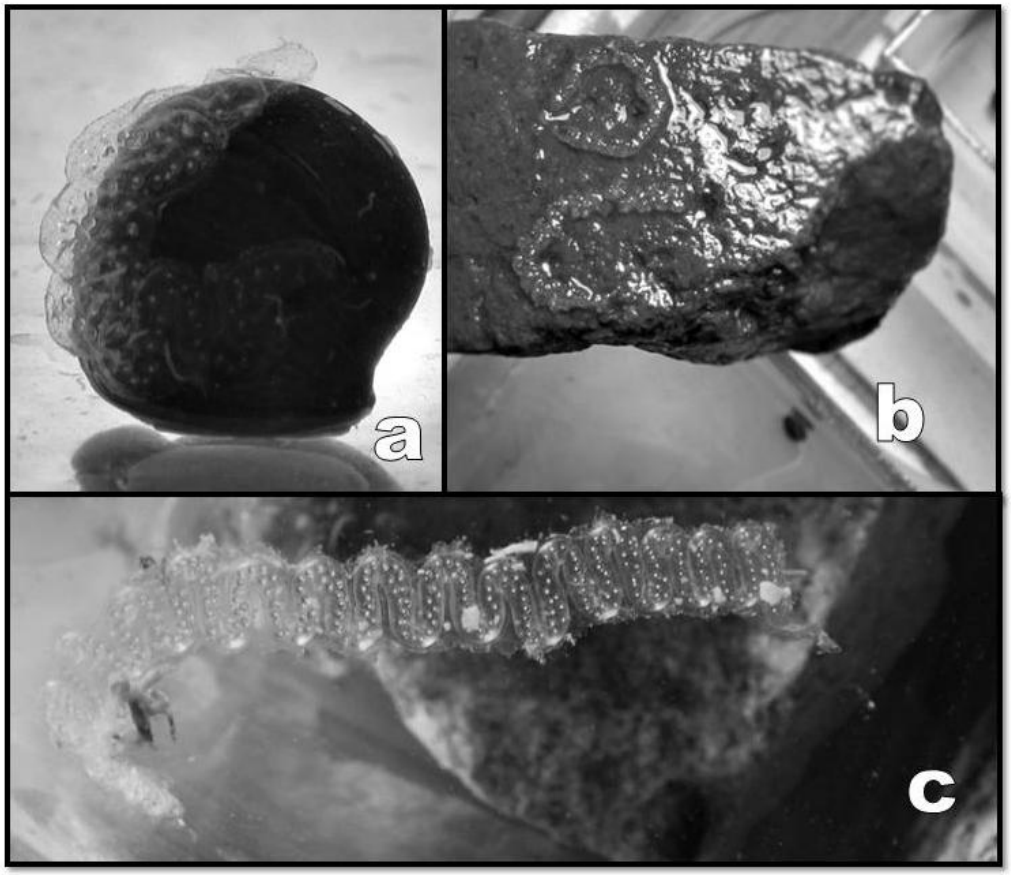

Figura 21. Puestas de *Chilina gibbosa* en diferentes sustratos. (a) Puesta sobre un ejemplar adulto de la misma especie; (b) puestas sobre una piedra; y (c) puesta adherida por un extremo a la pared del tanque.

III.2.2.1- Bioensayo de reproducción

A lo largo del tiempo se observó un incremento en la actividad reproductiva, posiblemente dada por las condiciones favorables de mantenimiento que se estaban logrando en el laboratorio, por lo que decidimos realizar un ensayo de reproducción. Inicialmente se pensó realizar el bioensayo en la cámara fría con temperaturas semejantes a las utilizadas para los estudios con MAZ y carbaril, sin embargo, notamos una diferencia en el tiempo de eclosión entre las puestas de los tanques

que estaban en la cámara fría (12 ± 2°C) y las puestas depositadas en un tanque en un cuarto a temperatura ambiente (25 ± 3°C). Las puestas a temperatura ambiente eclosionaban más rápidamente. En el año 2017 los tanques destinados a reproducción se mantuvieron en un cuarto con una temperatura estable a (24 ± 2°C), logrando la supervivencia de los juveniles eclosionados en el laboratorio.

En la Figura 22, se muestra el bioensayo de reproducción, se utilizaron 12 frascos con 1 L de agua y 2 individuos en cada uno. El bioensayo tuvo una duración de 5 semanas y se realizó en condiciones estandarizadas de luz, con un fotoperíodo artificial de 12:12 (luz:oscuridad), con aireación, alimento y recambio del agua día por medio. El agua utilizada fue agua declorada pasivamente.

Figura 22. Bioensayo de reproducción de *Chilina gibbosa*.

Durante el bioensayo de reproducción se registró la temperatura al inicio, el día en el que se depositaba cada puesta y durante la limpieza de los tanques que se realizó día de por medio, las mismas oscilaron en un promedio de 25 ± 3 °C, en ese momento no se contaba con condiciones de temperatura controlada.

Durante el bioensayo se observó diariamente si habían depositado puestas y en cada puesta se registró el tamaño y la forma, la cantidad de huevos por puesta y de ser posible los tiempos de eclosión por observación bajo la lupa binocular. Esto último no fue posible en todos los casos dado que un elevado número de las puestas

no llegaron a eclosionar por motivos indeterminados. Para cada frasco se registró la cantidad de puestas por pareja. Realizamos un registro fotográfico del desarrollo de los embriones dentro de los huevos. Una vez eclosionados los organismos fueron alimentados con TetraFin.

III.2.2.1.1- Cantidad de puestas

Durante las 5 semanas, que duró el bioensayo, 8 de las 12 parejas depositaron puestas, de las cuales 3 pusieron más de una, y el número máximo de puestas por pareja observadas en ese período fue de tres. Sin embargo, el número máximo de puestas registradas para una misma pareja de *C. gibbosa* en nuestro laboratorio fueron 12 sobre un período de cuatro semanas entre el 02 y el 25 de diciembre de 2015. Esta pareja de individuos había sido separada y colocada en un tanque fuera de la cámara fría, previo a realizar el ensayo de reproducción, con las mismas condiciones de temperatura y luz que tendría el ensayo, a modo de prueba piloto. Es posible que el mayor número de puestas responda a una mayor disponibilidad de espacio, el tanque utilizado para la prueba piloto fue aproximadamente de 6 litros.

III.2.2.1.2- Tamaño y forma de las puestas

Se observó que las puestas pueden presentarse plegadas, con pliegues de mayor o menor definición, o directamente sin plegamientos visibles (Figura 23). No se observó un número fijo de plegamientos, estos fueron muy variados como se evidencia en la imagen (a) de la Figura 23 que presenta únicamente 8 plegamientos a diferencia de la Figura 20 donde se ven al menos 14 plegamientos.

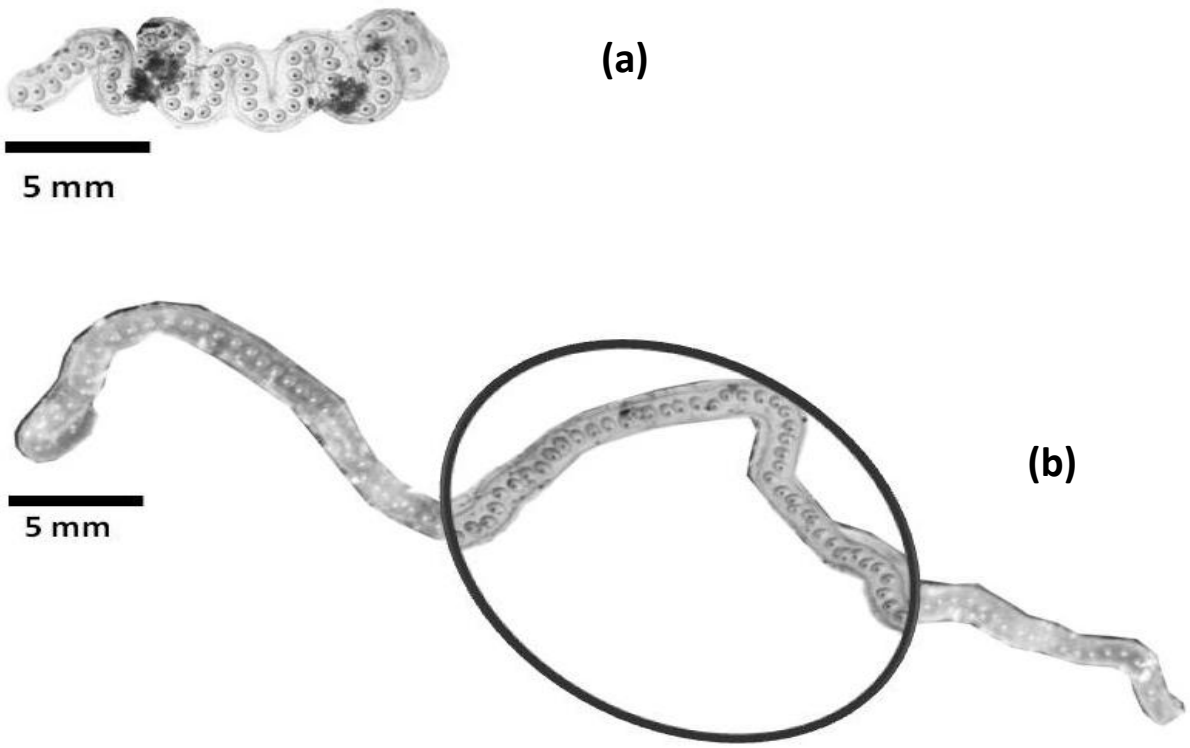

Figura 24. Puestas de *Chilina gibbosa*. (a) Puesta de largo total 15 mm, con plegamientos visibles. Aumento 2X. (b) Puesta de largo total 44 mm sin plegamientos visibles, fotografía tomada sin aumento. El círculo muestra fragmento de imagen con mayor definición como es visto en la lupa, fotografía tomada con cámara anexada a una lupa, con un aumento de 0,8X.

Además de las variaciones de forma, la Figura 24 muestra también las variaciones de tamaño. Los largos observados fueron muy diversos, aún proviniendo de la misma pareja de organismos. La Figura 24a presenta una puesta de 15 mm de largo mientras que la 24b una de 44 mm de largo habiendo una diferencia de 29 mm entre ellas.

La mayoría de puestas observadas presentó los huevos en una sola hilera a lo largo de la misma (Figura 24), sin embargo, se observaron varios casos con huevos dispuestos en doble hilera a lo largo de la puesta como se puede apreciar en la Figura 25. Esta disposición se presentó en puestas con plegamiento pronunciado (Fig. 25a) al igual que en puestas no plegadas (25b).

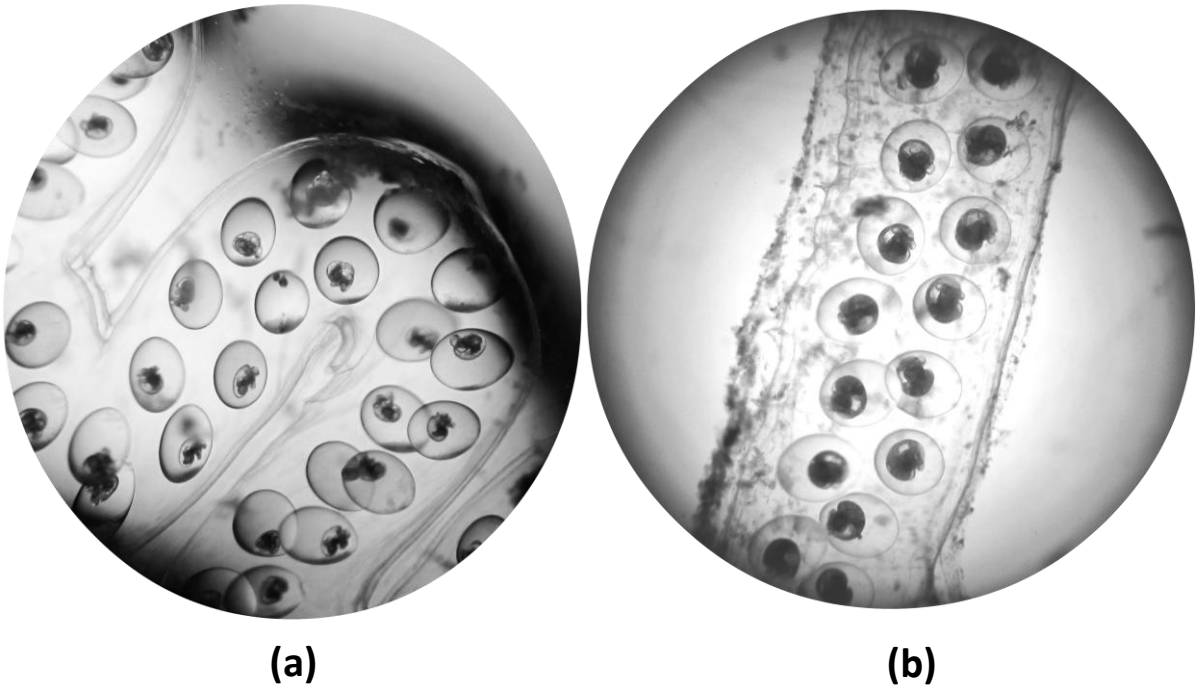

Figura 25. Puestas de *Chilina gibbosa*. (a) Puesta con doble hilera de huevos y plegamiento pronunciado. (b) Puesta con doble hilera de huevos sin plegamiento visible. Fotografías tomadas con cámara anexada a lupa con aumento combinado de 180X.

III.2.2.1.3- Cantidad de huevos por puesta

La cantidad de huevos presentes en cada puesta es sumamente variable. La Tabla 7 muestra los datos observados en el bioensayo. El máximo de huevos presentes en una misma puesta fue de 370 y el mínimo de 46. No se encontró correlación entre el tamaño de los individuos y el número de huevos en la puesta. Incluso se observó que la misma pareja puso huevos con cantidades muy disímiles. Los datos No. 4, 6 y 10 de la Tabla 7 corresponden a 3 puestas provenientes de la misma pareja de individuos y como se puede ver existe una diferencia de 230 huevos entre las puestas 4 y 6 y una diferencia de 31 huevos entre las puestas 4 y 10. Las tres fueron puestas en un período de 12 días.

Tabla 7. Datos de Reproducción *Chilina gibbosa.* Los tamaños corresponden a cada uno de los dos individuos en el frasco. Los tiempos de eclosión faltantes corresponden a puestas que no eclosionaron por motivos indeterminados.

No.	Tamaño 1 (cm)	Tamaño 2 (cm)	Cantidad de huevos	Tiempo de la primera eclosión (días)
1	1,6	1,6	320	-
2	1,6	1,6	61	21
3	2,2	1,1	158	-
4	1,9	1,8	46	18
5	2,2	1,1	162	17
6	1,9	1,8	236	14
7	1,6	1,6	222	18
8	1,2	1,1	63	21
9	1,8	1,7	97	-
10	1,9	1,8	165	-
11	1,9	1,8	153	-
12	1,9	1,8	370	-

Fue posible determinar el día de eclosión para 6 de las 12 puestas estudiadas, éstas tardaron entre 14 y 21 días para comenzar a eclosionar con un promedio de 18,2 ± 2,6 días a una temperatura de 25 ± 3 °C. El proceso de eclosión total o sea hasta que salen todos los organismos de sus huevos y posteriormente de la capa gelatinosa que los recubre, dura más de un día por lo cual fue imposible determinar los tiempos exactos para todo el proceso. Se consideró entonces el día de eclosión cuando se pudo observar al primer juvenil fuera del huevo, aunque éste no se encontrara fuera de la puesta. Por ejemplo, la Figura 26 muestra a un juvenil eclosionado que aún no salió de la puesta.a los seis días posteriores al comienzo de la eclosión (24 días después de ser depositada).

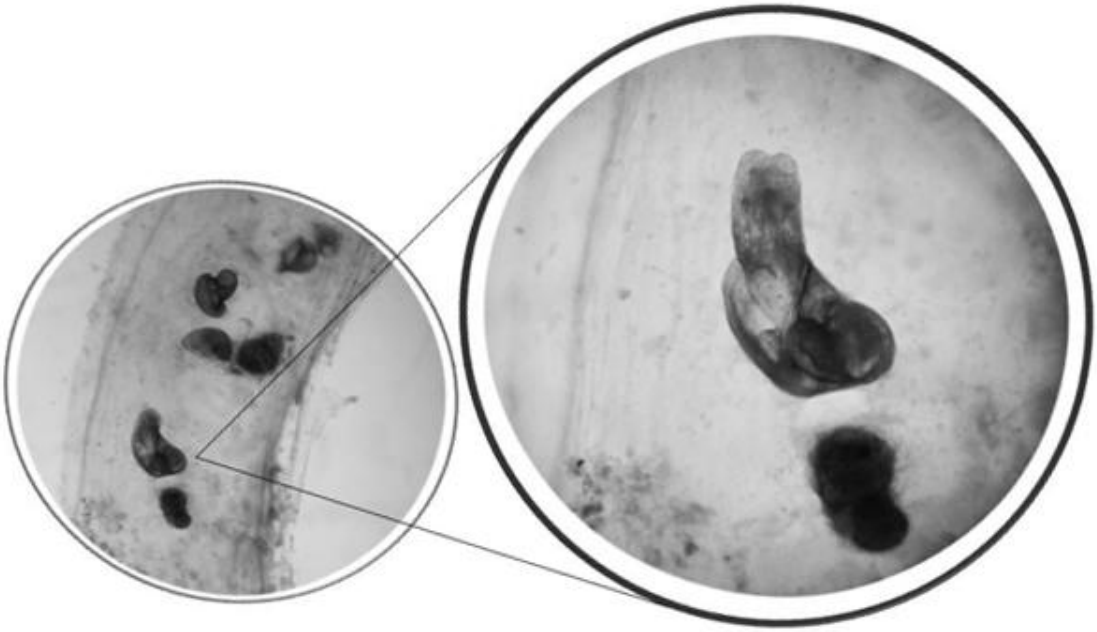

Figura 26. Juvenil de *Chilina gibbosa*, dentro de la puesta de 24 días, seis días después del inicio de la eclosión. Fotografías tomadas con cámara anexada a una lupa. (a) aumento combinado de 108X; (b) aumento combinado de 180X.

También se observó que en algunas puestas no eclosionan todos los huevos. Fue imposible determinar el número de crías eclosionadas debido al alto contenido de huevos embrionados en las puestas.

III.2.2.1.4- Registro fotográfico del desarrollo de los embriones

Se observó el desarrollo de los embriones de *C. gibbosa.* La Figura 27 muestra diferentes momentos en el desarrollo de los embriones. En las condiciones que se realizó el bioensayo, se observó a los individuos formados casi por completo a los 14 días.

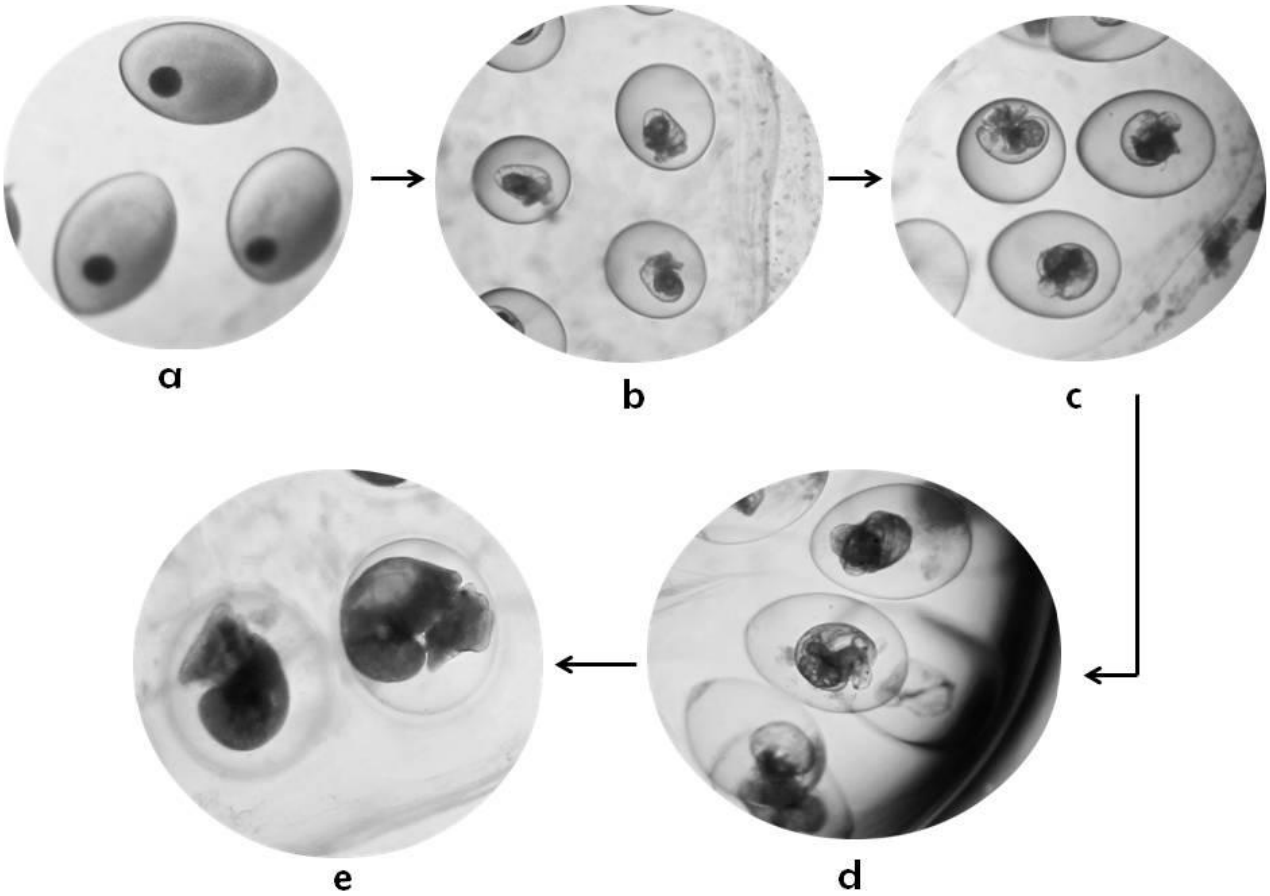

Figura 27. Diferentes momentos en el desarrollo embrionario de *Chilina gibbosa*. Fotografías tomadas con cámara anexada a una lupa, con aumento combinado de 180X. Las imágenes corresponden a: (a) 1, (b) 5, (c) 7, (d) 10 y (e) 14 días de desarrollo.

El desarrollo de estos organismos es directo. Al eclosionar el juvenil es semejante a un organismo adulto, como se observa en la Figura 28.

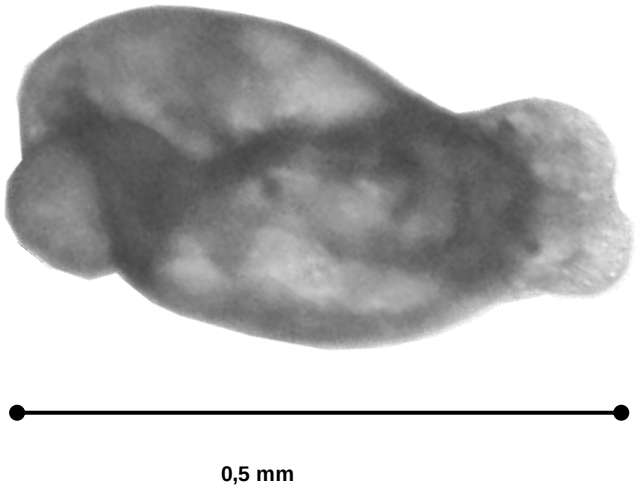

Figura 28. Juvenil de *Chilina gibbosa*, 15 días posteriores a la eclosión. Ampliación de fotografía tomada con cámara anexada a una lupa con aumento combinado de 180X.

Al terminar el bioensayo los juveniles fueron colocados en un tanque de 6 litros, junto con otras puestas para que continuaran su desarrollo, pero no se siguió observando detalles del mismo. Es una observación personal que los juveniles no se desarrollan si son dejados en los tanques saturados de adultos, un motivo de ello puede ser la competencia por espacio y alimento. Es por ello que las puestas fueron sacadas de los tanques de los adultos y pasadas a un tanque vacío destinado únicamente a juveniles. De esta manera hemos logrado la primera población de organismos de *C. gibbosa* cultivados en el laboratorio y que han sobrevivido más de un año posterior a su eclosión. En ese año alcanzaron un tamaño semejante a los más pequeños que han sido utilizados para bioensayos, lo que permite pensar que en poco más de un año de desarrollo se puede contar con individuos aptos para el propósito experimental.

IV.- DISCUSIÓN

La agricultura es sin duda la actividad humana que utiliza los mayores volúmenes de agua dulce para su desarrollo (Ongley, 1996). En Argentina en el año 2000 el 75% de las aguas superficiales de uso eran destinadas a la agricultura. El uso de productos químicos en las actividades agrícolas ha supuesto un beneficio sustancial en la producción agraria, incrementándose el rendimiento de las cosechas a la vez que se ha elevado la calidad de los alimentos. No obstante, frente al beneficio que supone la destrucción sistemática de plagas que afectan a la salud de las plantas, animales y a la salud humana se debe tener presente la interacción de los distintos principios activos con las especies animales, vegetales y con el propio hombre (Olea *et al.*, 1996).

Los insecticidas OPs y carbamatos han sido y son utilizados en nuestro país para la producción de frutas, hortalizas y para la producción agrícola. Tienen una alta toxicidad aguda produciendo severos efectos tóxicos en los seres humanos y en distintos organismos debido a que su blanco de acción primario (acetilcolinesterasa) se encuentra ampliamente distribuida en los organismos cumpliendo en todos ellos funciones vitales.

Los efectos crónicos de pesticidas sobre organismos acuáticos fueron mucho menos estudiados que los efectos agudos. Los efectos de bajas concentraciones de pesticidas por períodos prolongados pueden causar mortalidad, neurotoxicidad, cambios de comportamiento, inmunotoxicidad, alterar la reproducción, teratogénesis y genotoxicidad. Estos efectos pueden conducir a la declinación de organismos de una especie. Los gasterópodos representan el 20 % de las extinciones reportadas de moluscos (Strong *et al.*, 2008) siendo Chilinidae una familia considerada vulnerable (Valdovinos, 2006).

Este trabajo de tesis es el primer reporte sobre las condiciones óptimas de cultivo para *C. gibbosa*, de los efectos sub-crónicos de MAZ y de efectos agudos y sub-crónicos del carbaril. Por otro lado, es un pequeño aporte al conocimiento sobre

algunos parámetros de la reproducción en condiciones de laboratorio, como por ejemplo, el tiempo de eclosión de las puestas y la cantidad de huevos por puesta, que servirán para futuras investigaciones en las que se quieran estudiar los efectos tóxicos de contaminantes sobre la reproducción de esta especie.

La literatura sugiere que, trabajando con éstos organismos, la realización de ensayos agudos (48 a 96 horas) de exposición a concentraciones subletales de MAZ, no necesitan aireación ni alimentación y de esta manera se favorece la utilización de ensayos estáticos o semi-estáticos. Por ejemplo, en organismos de *B. glabrata*, *P. corneus* y *B. straminea* expuestos a diferentes concentraciones de MAZ durante 48 o 96 horas sin aireación ni alimento, no se observó mortalidad ni en los organismos controles ni en los tratados (Kristoff, et al., 2006; Cacciatore *et al*., 2013; Bianco *et al*., 2014). Para *C. gibbosa* existen antecedentes parecidos, Bianco *et al.* (2013), realizaron un estudio de exposición aguda a diferentes concentraciones de MAZ durante 48 horas sin aireación ni alimentación y en este período no observaron ningún incidente letal y Cossi *et al.* (2015), con las mismas condiciones, observaron solamente un 4% de mortalidad.

Al realizar ensayos sub-crónicos en *B. glabrata* y *P. corneus* sin aireación, no se observó mortalidad ni en el grupo control ni en los expuestos a MAZ y a otro OP, el clorpirifos (Kristoff *et al.*, 2011; Agrelo, 2012; Rivadeneira *et al.*, 2013). Sin embargo, Bianco *et al.* (2014) observaron que individuos de *B. straminea* expuestos a MAZ durante 21 días sin aireación presentaron un 27% de mortalidad mientras que no se obtuvo mortalidad en el grupo control. Es evidente que cada especie tiene requerimientos particulares para su uso en el laboratorio y *C. gibbosa* no es la excepción. Durante este trabajo de tesis se realizó una exposición sub-crónica (14 días) a una concentración ambiental de MAZ (20 µg L^{-1}), concentración también utilizada por Bianco *et al.* (2013) en los ensayos de exposición aguda y utilizando las mismas condiciones de aireación y alimentación. En estas condiciones se observó un 87% de mortalidad en el grupo tratado sin observarse mortalidad en el grupo control. Debido a que la mortalidad solamente se registró en el grupo expuesto se podría atribuir a que una mayor duración del período de exposición al pesticida genera mortalidad. Sin embargo, al realizar con *C. gibbosa* el mismo ensayo pero

aplicando aireación y alimentación se observó únicamente un 3% de mortalidad. Esto sugiere que los organismos de *C. gibbosa*, en los ensayos sin aireación y sin alimentación están sumando dos tipos de estrés: el estrés generado por el pesticida y el estrés generado por las condiciones desfavorables de aireación y alimentación, a las cuales estos organismos resultan poco tolerantes. Con respecto a esto, algunos autores han sugerido que hay que tener en cuenta al analizar la susceptibilidad de una especie a un contaminante, las interacciones con factores ambientales como la falta de alimento, de oxígeno, cambios de temperatura, etc. (US EPA, 2000; Hope, 2006). A partir de estos resultados se decidió trabajar, en los ensayos sub-crónicos, con aireación y alimentación, luego de cada recambio de soluciones, para disminuir el estrés que pueden generar un aumento de las respuestas observadas por exposición al pesticida y así un sesgo importante en la interpretación de los resultados.

En trabajos anteriores, *C. gibbosa* ha mostrado ser una especie muy sensible a MAZ. Al exponer a los organismos por 48 horas a concentraciones muy bajas (0,005 µg L^{-1}), se observó una inhibición del 38% de la actividad de ChEs y la aparición de signos de neurotoxicidad (falta de adherencia, reducción de la respuesta a estímulos y región céfalo-pedal expuesta). Sin embargo, las CEs no se inhibieron hasta elevar la concentración a 1 mg L^{-1} (Bianco *et al.*, 2013). En el presente trabajo se propuso estudiar la respuesta de estos biomarcadores luego de una exposición más prolongada a una concentración ambiental que ha sido reportada en nuestro país. El estudio de efectos tóxicos luego de exposiciones sub-crónicas y crónicas resulta muy importante ya que, en el medio natural, los organismos se encuentran por lo general expuestos por largos períodos a bajas concentraciones de los contaminantes. La exposición aguda a 20 µg L^{-1} produjo severos signos de neurotoxicidad e inhibición de ChEs de aproximadamente un 50% mientras que las CEs no fueron afectadas (Bianco *et al.*, 2013). En este trabajo de tesis se observó que al prolongar la exposición hasta 14 días, los signos de neurotoxicidad permanecieron sin observarse un incremento en la mortalidad, las ChEs aumentaron su inhibición (89%) y las CEs se inhibieron. Algunos autores, coincidiendo con los resultados de esta tesis, reportaron variaciones de

biomarcadores luego de exposiciones sub-crónicas que no se veían modificados por exposiciones agudas. Por ejemplo, Rivadeneira *et al.* (2013) observaron una disminución de la actividad de CEs en *P. corneus* expuestos al OP clorpirifos luego de 14 días de exposición, la cual no se veía modificada a las 48 hs.

Tanto Bianco *et al*. (2013) como Cossi *et al*. (2015) observaron que las ChEs de *C. gibbosa* resultan más sensibles que las CEs a la exposición aguda a MAZ. En la exposición sub-crónica se observó la misma respuesta. En la mayoría de los invertebrados estudiados la actividad de CE es un biomarcador más sensible que la actividad de ChEs, sin embargo, en el oligoqueto *L. variagatus* se obtuvieron resultados similares a *C. gibbosa.* En estos organismos la actividad de ChEs mostró inhibición desde 0,004 mg L^{-1} de MAZ, a la cual no se observó inhibición de CEs. Estas últimas enzimas solo se inhibieron a concentraciones muy altas (Kristoff *et al*., 2006). Varios autores coinciden en que aquellos organismos en los cuales la sensibilidad de ChEs es mayor, las CEs no estarían protegiendo a los organismos y se producen severos efectos neurotóxicos. El mecanismo de protección de las CEs se lleva a cabo por una competencia por el sitio de unión al OP o carbamato (Maxwell 1992; Wheelock *et al.*, 2005; Potter y Wadkins, 2006). En este trabajo de tesis se observó que en una exposición de 14 días las CEs también se inhiben. Sin embargo, la inhibición de ChEs continúa siendo mayor que la de CEs (87 %-ChEs; 40 %-CEs con p-NFA y 30 % con p-NFB) y los organismos continúan con severos signos de neurotoxicidad.

Algunos autores reportaron efectos en la actividad de B-esterasas en caracoles acuáticos luego de exposiciones sub-crónicas a MAZ. Por ejemplo, Bianco *et al.* (2014) estudiaron distintas respuestas luego de la exposición a 0,02 y 0,2 mg L^{-1} de MAZ en *B. straminea*. Los autores reportaron que la actividad de ChEs no se vio modificada mientras que las CEs con p-NFB como sustrato fueron fuertemente inhibidas por la exposición sub-crónica a 0,2 mg L^{-1} de MAZ. Agrelo (2012) estudio en *P. corneus* los efectos de la exposición por 14 días a 0,4 mg L^{-1} y 1,75 mg L^{-1} de MAZ sobre la actividad de B-esterasas. La actividad de CEs fue más sensible inhibiéndose a partir de las 48 horas con ambos sustratos y con ambas concentraciones. Estos resultados y los de la presente tesis muestran respuestas

muy variables según la especie estudiada evidenciando que en biomonitoreos ambientales es necesario estudiar más de una especie.

Luego de los resultados obtenidos con MAZ se quiso estudiar si otro insecticida anticolinesterásico producía efectos similares sobre las actividades enzimáticas y neurotoxicidad. Nuestra hipótesis fue que dado que el mecanismo de acción primario para MAZ y carbaril es la inhibición de ChEs, los efectos iban a ser similares. Sin embargo, la misma concentración molar de carbaril no produjo efectos neurotóxicos y las respuestas de las ChEs y CEs fueron diferentes a las obtenidas luego de la exposición a MAZ. A las 48 horas de exposición a carbaril no se observó inhibición de ChEs ni de CEs, y únicamente las CEs se inhibieron al ser determinadas con p-NFB, a los 7 días, condición que se mantuvo con un ligero aumento hasta los 14 días. Esto podría explicar la falta de signos de neurotoxicidad durante la exposición a carbaril debido a que en este caso las CEs estarían cumpliendo un rol protector.

La actividad de ChEs fue más inhibida por MAZ, con un 89 % de inhibición comparado con el 35% que produjo el carbaril a los 14 días. Con respecto a las CEs, estas enzimas determinadas con p-NFB fueron más inhibidas por el carbaril que por el MAZ. Por el contrario, Ferrari *et al.* (2007 a y b) describieron en la trucha arcoíris (*O. mykiss*), una mayor sensibilidad de las CEs a la exposición a MAZ con respecto a carbaril.

Luego de la exposición a carbaril se observó una gran diferencia respecto al sustrato utilizado ya que con p-NFA no se vio inhibición significativa durante todo el bioensayo. Este resultado reafirma lo expuesto por otros autores que proponen medir la actividad de CEs con más de un sustrato debido a que estas enzimas son una familia de isoenzimas con baja especificidad de sustrato y cuya sensibilidad depende del sustrato utilizado en la determinación (Otero y Kristoff, 2016).

Hasta el momento no existen reportes en la bibliografía acerca de ensayos sub-crónicos utilizando carbaril que evaluén la actividad de B-esterasas en caracoles de agua dulce, con lo cual los resultados de esta tesis serían los primeros.

Nuestros resultados y los de otros autores confirman que existe una gran variabilidad de respuestas dependiendo de la especie y del tóxico estudiado aunque tengan el mismo mecanismo de acción primario como es el caso de los OPs y carbamatos. Esto evidencia la necesidad de estudiar en detalle las respuestas particulares de cada especie a un determinado tóxicos y en la misma especie evaluar las respuestas a distintos tóxicos.

Los parámetros de reproducción pueden ser utilizados como biomarcadores. En gasterópos acuáticos los parámetros frecuentemente estudiados son el número de puestas, el número de huevos por puesta, el tiempo que tardan en eclosionar los huevos, la cantidad de los huevos eclosionados y la supervivencia de las crías. Sin embargo, existen pocos estudios sobre los efectos crónicos de pesticidas sobre la reproducción y la descendencia. Tripathi y Singh (2004) expusieron al caracol de agua dulce *L. acuminata* a concentraciones subletales de carbaril (2, 5 y 8 mg L^{-1}) para observar los efectos sobre algunos parámetros de reproducción y bioquímicos. Los períodos de exposición para el estudio de los parámetros bioquímicos fueron de 96 h, pero para los parámetros de reproducción fueron hasta el momento de la oviposición para los adultos (24 y 96 h), luego hasta la eclosión para las puestas (entre 10 y 14 días) y para la progenie durante 28 días posteriores a la eclosión, para observar la supervivencia. Los efectos crónicos observados durante este estudio sugieren que la supervivencia se ve reducida en la progenie al aumentar el tiempo de exposición (7, 14, 21 y 28 días) y que el pesticida disminuye la cantidad de huevos que eclosionan. Con respecto a MAZ, Agrelo (2012) y Agrelo y Kristoff (2012) observaron que según la concentración del pesticida y el tiempo de exposición se observaron efectos diferentes sobre la reproducción de *P. corneus*. La exposición sub-crónica a 1,75 mg L^{-1} disminuyó el porcentaje de eclosión y la supervivencia alcanzando a los 2 meses la mortalidad total de las crías. En cambio, la exposición a una concentración ambiental (0,4 mg L^{-1}) tuvo un efecto menor en la supervivencia. Las crías que lograron sobrevivir, sin embargo, tuvieron una disminución del crecimiento y tardaron más tiempo en comenzar a depositar puestas. Estos resultados muestran que los efectos de estos pesticidas pueden afectar a la especie más allá de los efectos puntuales sobre los individuos expuestos,

trascendiendo el nivel de individuo y llevando el problema al nivel de población y ecosistema.

Para poder estudiar el efecto de diferentes tóxicos sobre parámetros reproductivos es necesario primero conocer algunos aspectos de la reproducción de la especie con la que se quiere trabajar. Existen muy pocos estudios sobre la reproducción de *C. gibbosa*. Castellanos y Gaillard (1981), propusieron una clave taxonómica y en la descripción de la especie mencionaron que ésta pone sus huevos desde la primavera y verano hasta principios del otoño, lo cual coincide con Bosnia *et al.* (1990) y Gutierrez Gregoric *et al.* (2004) quienes afirman que la reproducción de esta especie tiene su pico en el verano. Nuestros hallazgos coinciden con ambas afirmaciones ya que observamos puestas durante todo el año, siendo el período de mayor oviposición durante el verano. Estos autores también realizaron las primeras descripciones de las puestas de esta especie que según Castellanos y Gaillard (1981) son un tubo sinuoso, cuyas vueltas se tocan entre sí y son de aspecto gelatinoso; y según Bosnia *et al.* (1990), son huevos ovalados dentro de un filamento gelatinoso con dobleces en zig-zag. En este trabajo se realizó una descripción un poco más extensa de las puestas acompañada de imágenes, donde se observa que las mismas pueden presentar diferentes largos, formas y número de huevos, aún proviniendo del mismo individuo. Bosnia *et al.* (1990) concluye que *C. gibbosa* es una especie semelpara, lo que se contradice con lo observado en nuestro laboratorio, donde los individuos luego de poner sus huevos continuaban viviendo y reproduciéndose. Es posible que esta diferencia en las observaciones esté justificada por las diferencias en condiciones ya que el estudio de Bosnia *et al.* (1990) se realizó en un ambiente natural mientras que el nuestro fue en condiciones de laboratorio.

Los parámetros de reproducción analizados en esta especie difieren notablemente de los de otras especies de gasterópodos estudiados en nuestro laboratorio. Por ejemplo, las puestas de *B. straminea* y *B. glabrata* son amarillentas, redondeadas y presentan una cantidad variable de huevos que rara vez exceden la docena (Fig. 29) (Kristoff *et al.*, 2011; Cossi *et al.*, 2017) mientras que las puestas de *C. gibbosa* son filamentos de longitud y cantidad de huevos también variable, en cuyo caso rara vez presentan cifras inferiores al centenar y de color blanco. Las

puestas de *C. gibbosa* son más resistentes a la manipulación en el laboratorio. Las crías de las Biomphalarias estudiadas crecen muy rápido mientras que las crías de *C. gibbosa* tienen un crecimiento muy lento.

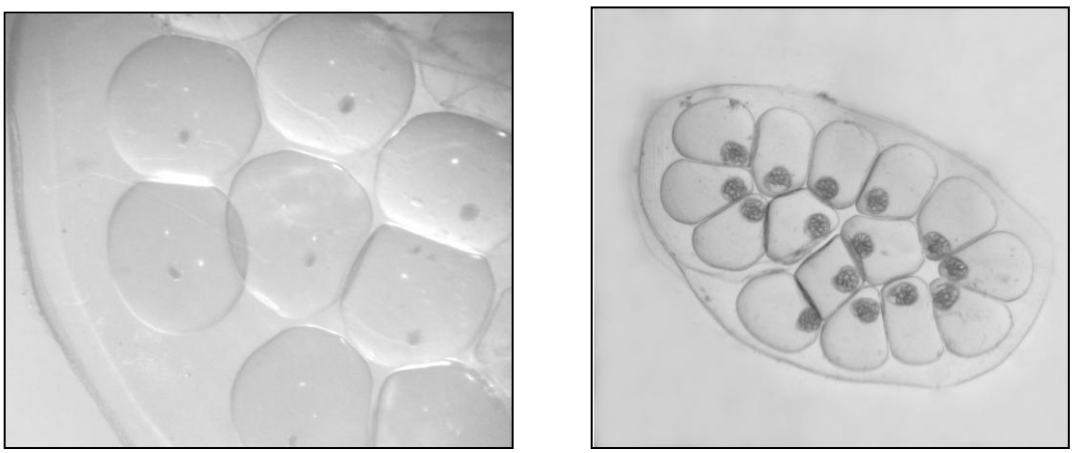

Figura 29. Puestas de (a) *Biomphalaria glabrata* y (b) *Biomphalaria straminea*.

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis fue posible lograr la reproducción de esta especie bajo condiciones controladas de laboratorio. Muchas de las crías eclosionadas continúan creciendo en el laboratorio hasta el día de hoy. Gracias a este aporte se podrá contar con un cultivo propio en el laboratorio para las futuras investigaciones.

Muchos programas de biomonitoreos ambientales utilizan especies centinelas o bioindicadoras. Hay especies estandarizadas mundialmente, sin embargo, el uso de especies nativas presentan varias ventajas. Por ejemplo, al estar distribuidas naturalmente en un determinado hábitat y al estar adaptadas a las condiciones climáticas sirven para realizar bioensayos a campo lo que permite realizar biomonitoreos más significativos y ecológicamente relevantes (Baird *et al.*, 2007; Krull y Barros, 2010; Gagneten *et al.*, 2012). Además, estos ensayos permiten establecer o rever los límites establecidos de contaminantes en el agua para la protección de la vida acuática. Algunos trabajos incluso han demostrado que ciertas especies nativas, son menos tolerantes a tóxicos en el ambiente, que especies

exógenas (Piola y Johnston, 2009; Lenz *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2015; Varó *et al.*, 2015) resultando buenos centinelas de la contaminación.

Los resultados de esta tesis contribuyen a conocer un poco más algunos aspectos biológicos y bioquímicos de esta especie nativa poco estudiada. En futuros trabajos en el laboratorio se pretenderá aportar información histológica, de defensa, reproducción y de otros parámetros bioquímicos así como evaluar las respuestas a otros contaminantes encontrados en cuerpos de agua de Argentina.

Los resultados de esta tesis muestran que esta especie resulta muy sensible a MAZ y a carbaril. A las concentraciones reportadas en cuerpos de agua de la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, ambos pesticidas muestran efectos tóxicos por exposiciones sub-crónicas. El MAZ resultó más tóxico produciendo severos efectos neurotóxicos que dificultarían a un tiempo de exposición más prolongado la supervivencia ya que se altera, por ejemplo, la adherencia a las superficies y la movilidad.

Esta especie podría ser utilizada en programas de biomonitoreos ambientales ya que presenta efectos visibles y detectables sin la necesidad de instrumentos especiales. Estos efectos aparecen, en el caso de MAZ, a muy bajas concentraciones, y según Cossi *et al.* (2015) luego de exposiciones agudas permanecen durante aproximadamente una semana, lo que permitiría detectar la contaminación en una etapa temprana y así tomar medidas para detener, corregir o mitigarla. *C. gibbosa* cumpliría, de esta manera, con el concepto propuesto de especie centinela por su alta sensibilidad, sus signos de fácil detección, su distribución y su capacidad de brindar una alerta temprana a la contaminación.

V.- CONCLUSIONES

- ✓ Los resultados de esta tesis permitieron determinar que, para la especie *C. gibbosa*, las condiciones para realizar estudios de exposición sub-crónica a pesticidas son distintas a las de estudios de exposiciones agudas. En particular las exposiciones sub-crónicas requieren aireación y alimentación, que no son imprescindibles en exposiciones de 48 hs.
- ✓ En ensayos sub-crónicos sin aireación ni alimento en esta especie se suman los efectos por exposición al pesticida con el estrés por falta de aireación y alimentación.
- ✓ *C. gibbosa* puede estar expuesta durante varios días (14) a concentraciones de MAZ que producen severos signos de neurotoxicidad, sin que ello produzca mortalidad.
- ✓ Una exposición sub-crónica a MAZ produce un aumento de la inhibición de ChEs respecto de la inhibición que se produce luego de 48 horas de exposición. La actividad de CEs requiere de una exposición superior a 7 días para presentar efectos por el pesticida.
- ✓ La exposición de *C. gibbosa* a concentraciones ambientales del insecticida carbamato carbaril durante 48 hs no produce signos neurotóxicos visibles ni mortalidad. Esto no cambia si la exposición se prolonga en el tiempo hasta 14 días.
- ✓ La exposición de *C. gibbosa* a concentraciones ambientales del carbamato carbaril durante 48 horas no produce inhibición sobre las ChEs o CEs.
- ✓ Las CEs de *C. gibbosa* se inhiben luego de 7 días de exposición a concentraciones ambientales del carbamato carbaril, mientras que las ChEs no se inhiben aún luego de 14 días de exposición.

- ✓ La concentración ambiental 0.063 nM tanto de MAZ como de carbaril, resulta subletal para *C. gibbosa* aún luego de una exposición de 14 días.
- ✓ La respuesta de *C. gibbosa* a la misma concentración molar de dos pesticidas anticolinesterásicos, difiere. Las ChEs de *C. gibbosa* son más sensibles a MAZ que a carbaril, mientras que las CEs son más sensibles a carbaril que a MAZ. En el caso del carbaril, las CEs ejercerían un rol protector y el organismo no presenta signos de neurotoxicidad.
- ✓ La reproducción de *C. gibbosa* en el laboratorio es posible bajo las condiciones establecidas.
- ✓ La especie nativa *C. gibbosa* resulta muy sensible a la exposición a dos insecticidas utilizados en Argentina. Ambos producen respuestas tóxicas a concentraciones ambientales. El MAZ resulta más tóxico que el carbaril para esta especie.
- ✓ Esta especie podría utilizarse como centinela en nuestro país debido a su sensibilidad a los pesticidas utilizados, su rol ecológico, la fácil detección de los signos neurotóxicos y su distribución. Sin embargo es necesario investigar las respuestas a otros tóxicos y a campo.

VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta, G., 2014. Arándanos y agroquímicos en Blueberries S.A. Diario Junio Digital. http://www.diariojunio.com.ar/noticia.php?noticia=64236

2. Agrelo, M., 2012. Alteraciones en la reproducción y en la actividad de B-esterasas de *Planorbarius corneus* expuestos a metilazinfos. Análisis de malformaciones, reproducción, crecimiento y supervivencia de su descendencia. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

3. Agrelo, M. y Kristoff, G., 2012. Efectos de las concentraciones ambientales del pesticida metilazinfos sobre la reproducción y descendencia de una población de gasterópodos de agua dulce. Revista da XX Jornadas de Jovens Pesquisadores da AUGM, 416-422.

4. Aly, D.M y El-Dib M.A., 1971. Studies on the persistence of some carbamate insecticides in the aquatic environment. Hydrolysis of sevin, baygon, pyrolan and dimetilan in water. Water Res. 5(12), 1191-1205.

5. Anguiano, O. L., Castro, C., Venturino, A., Ferrari, A., 2012. Acute toxicity and biochemical effects of azinphos metthyl in the amphipod *Hyalella curvispina*. Environ. Toxicol. 29, 1043-1053.

6. Anguiano, O. L., Pechén de D'Angelo, A. M., 2007. Provincia de Río Negro y Provincia de Neuquén. En: La problemática de los agroquímicos y sus envases, la incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y ambiente. Ministerio de Salud de la Nación, OPS/OMS, Buenos Aires, Argentina, 181-201.

7. Anguiano. O. L., Ferrari, A., Soleño, J., Martínez, M. C., Venturino., A., Pechen de D´Angelo, A. M., Montagna, C. M., 2008. Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms. Environ. Toxicol. Chem. 27, 2117-2123.

8. Ansaldo, M., Nahabedian, D. E., Holmes-Brown, E., Agote, M., Ansay, C. V., Verrengia Guerrero, N. R., Wider, E. A., 2006. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. Toxicology 224, 119-127.

9. Baird, D. J., Brown, S. S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira-Santos, M., Schulz, R., Scott, G. I., 2007. In situ–based effects measures: determining the ecological relevance of measured responses.

10. Barba Ho, L.E., 2002. Conceptos básicos de la contaminación del agua y parámetros de medición. Universidad del Valle. Escuela de Ingeniería y de Recursos Naturales y del Ambiente. Santiago de Cali, Colombia. 48p.

11. Basu N., Scheuhammer, A. M., Bursian, S. J., Elliott, J., Rouvinen-Watt, K. y Chan, H.M., 2007. Mink as a sentinel species in environmental health. Environmental Research 103, 130–144.

12. Basu, N., Head, J., Scheuhammer, A.M., Bursian, S.J., Rouvinen-Watt, K. y Chan, H.M., 2009. The mink is still a reliable sentinel species in environmental health. Environmental Research 109, 940–941.

13. Beauvais, S. L., Jones, S. B., Parris, J. T., Brewer, S. K. y Little, E. E., 2001. Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 49, 84-90.

14. Beeby, A. y Richmond, L., 2002. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. Ecological Indicators 1, 261–270.

15. Beeby, A., 2001. "What do sentinels stand for?" Environmental Pollution, vol. 112, no. 2, pp. 285–298, 2001.

16. Berthet, B., 2012. Sentinel Species. En Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C., y Rainbow, P. S. (Eds.). Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects. (155-186). Boca Ratón, FL: CRC Press.

17. Bianco, K., 2014. Caracterización de B-esterasas en dos gasterópodos de agua dulce de Argentina: *Chilina gibbosa y Biomphalaria straminea* y su respuesta a la exposición al organofosforado metilazinfos. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

18. Bianco, K., Otero, S., Balazote Oliver, A., Nahabedian, D., Kristoff, G., 2014. Resistance in cholinesterase activity after an acute and subchronic exposure to azinphos-methyl in the freshwater gastropod *Biomphalaria straminea*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 109, 85-92.

19. Bianco, K., Yusseppone, M. S., Otero, S., Luquet, C., Ríos de Molina, M. C., Kristoff, G., 2013. Cholinesterases and neurotoxicity as highly sensitive biomarkers for an organophosphate insecticide in a freshwater gastropod (*Chilina gibbosa*) with low sensitivity carboxylesterases. Aquatic Toxicology 144-145, 26-35.

20. Biziuk, M., Pryjazny, A., Czerwinski, J. & Wiergowski, M., 1996. Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. Journal of Chromatography A, 754 (1-2), 103-123.

21. Black, M., Westerfield, S., Belin, J., Vreede, K. B. V., 1997. Biomarker assessment of environmental contamination: in-situ studies with freshwater bivalves. Proceedings of the 1997 Georgia Water Resources Conference, 20–22.

22. Boland, H. P., Gil, M.I., Labollita, H.A., Laurenzano, B., Novelli, M., Ramos, J. y Reyes, P., 2007. Monitoreo de Agroquímicos en áreas bajo riego de los Ríos Limay, Neuquén y Negro. Tucumán, Congreso Nacional del Agua.

23. Bosnia, A.S., Kaisin, F.J., Tablado, A., 1990. Population dynamics and production of the freshwater snail *Chilina gibbosa* Sowerby, 1841 (Chilinidae, Pulmonata) in a North-Patagonian reservoir. Hydrobiologia 190, 97–110

24. Bossart G. D., 2006. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. Oceanography 19, 134–37.

25. Boyce, W.M., Lawler, S.P., Schultz, J.M., McCauley, S.J., Kimsey, L.S., Niemela, M.K., Nielsen, C.F. y Reisen, W.K., 2007. Non target effects of the mosquito adulticide Permethrin applied aerially during a West Nile Virus outbreak in an urban California environment. Journal of the American Mosquito Control Association, 23, 335–339.

26. Caballero de Castro, A. C., Rosenbaum, E. A., Pechén de D´Angelo, A. M., 1991. Effect of malathion on *Bufo arenarum* Hensel development. Esterase inhibition and recovery. Biochem. Pharmacol. 41, 491-495.

27. Cacciatore, L. C., 2009. Investigación de procesos toxicocinéticos del pesticida metil azinfos en dos especies de invertebrados acuáticos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

28. Cacciatore, L. C., 2013. Evaluación de la toxicidad de insecticidas anticolinesterásicos, solos o en mezclas binarias, en el invertebrado de agua dulce *Planorbarius corneus.* Estudio de parámetros biomarcadores de exposición y efecto. Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

29. Cacciatore, L. C., Kristoff, G.; Verrengia Guerrero, N. R., Cochón, A. C., 2012. Binary mixtures of azinphos-methyl oxon and chlorpyrifos oxon produce in vitro synergistic cholinesterase inhibition in *Planorbarius corneus*. Chemosphere, 88, 450-458, 2012.

30. Cacciatore, L. C., Verrengia, G. y Cochón, A. C., 2013. Cholinesterase and carboxylesterase inhibition in *Planorbarius corneus* exposed to binary mixtures of azinphos-methyl and chlorpyrifos. Aquatic Toxicology, 128-129, 2013, 124-134.

31. Cañete, J.I., G. Leighton y E. Soto., 2000. Proposición de un índice de vigilancia ambiental basado en la variabilidad temporal de la abundancia de dos especies de poliquetos bentónicos de bahía Quintero, Chile. Revista de Biología Marina y Oceanografía 35(2), 185-194.

32. Castañé, P.M., Sánchez-Caro, A., Salibián, A., 2015. Water quality of the Luján river, a lowland watercourse near the metropolitan area of Buenos Aires (Argentina). Environ. Monit. Assess. 187(10), 645.

33. Castellanos, Z. A. de y Gaillard, M. C., 1981. Chilinidae. Fauna de agua dulce de la República Argentina 15(4), 21-51.

34. Castellanos, J. y Galvis, J. A., 2015. Rutas de degradación del plaguicida N-metilcarbamato carbaril. Revista 13+, 2(2), 134-147.

35. Chambers, H. W., Boone, J. S., Carr, R. L., Chambers, J. E., 2001. Chemistry of organophosphorus insecticides. En R. I. Krieger, (Ed.), Handbook of Pesticide Toxicology, Academic Press, San Diego, USA. Vol 2, pp 913-917.

36. Chambers, J.E., Boone, J.S., Carr, R.L., Chambers, H.W. y Straus, D.L., 2002. Biomarkers as Predictors in Health and Ecological Risk Assessment. Human and Ecological Risk Assessment. 8(1), 165-176.

37. Cichón, L., Garrido, S., 2012. Implicancia de los cambios en el manejo sanitario de las frutas de pepita en el Alto Valle. Revista F & D; 67, 8-15.

38. Conn, D.B., Conn, D.A., y Graczyk, T.K., 2013. Invasive freshwater molluscs as sentinel biomonitors to predict movement of euryhaline human-infectious pathogens into estuarine mollusc aquaculture sites. Abstracts of Aquaculture 2013. Nashville, Tennessee, USA. p. 210.

39. Contador, T., Kennedy, J., Ojeda, J., Feinsinger, P. y Rozzi, R., 2014. Ciclos de vida de insectos dulceacuícolas y cambio climático global en la ecorregión subantártica de Magallanes: investigaciones ecológicas a largo plazo en el Parque Etnobotánico Omora, Reserva de Biosfera Cabo de Hornos (55° S). Bosque (Valdivia) 35 (3), 429-437. ISSN 0717-9200.

40. Cossi, P., Boburg, B., Luquet, C., Kristoff, G., 2015. Recovery study of cholinesterases and neurotoxic signs in the non-target freshwater invertebrate *Chilina gibbosa* after an acute exposure to an environmental concentration of azinphos-methyl. Aquat. Toxicol., 167, 248-256.

41. Cossi, P., Herbert, L., Boburg, B., Kristoff, G., 2017. Aquatic ecotoxicology: native freshwater gastropods from Argentina" in "Ecotoxicology in Latin America". Nova Science Publishers.

42. Del Pilar Díaz, M., Antolini, L., Eandi, M., Gieco, M., Iohanna, F., y Ortiz, P., 2015. Valoración de la exposición a plaguicidas en cultivos extensivos del Argentina y su potencial impacto sobre la salud. Informe para la Comisión Nacional Salud Investiga. Ministerio de Salud, Argentina. 37p.

43. Desneux, N., Decourtye, A., y Delpuech, J., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annu Rev Entomology 52, 81-106.

44. Druart, C., Millet, M., Scheifler, R., Delhomme, O., Reppel, C., y de Vaufleury, A., 2011. Snails as indicators of pesticide drift, deposit, transfer and effects in the vine yard. *Science of Total Environment, 409*(20), 4280–4288.

45. Ellman, G. L., Courtney K. D., Andres, V.Jr., Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95.

46. Escolástico León, C. y Cabildo Miranda, M.P., 2003. Química y Salud Pública: Pesticidas. En Didáctica de la Química y Vida Cotidiana. Editor Pinto Cañon, G. Universidad Politécnica de Madrid. 293-302.

47. Ferrari, A., Anguiano, O.L., Soleno, J., Venturino, A., Pechen de D´ Angelo, A. M., 2004b. Different susceptibility of two aquatic vertebrates (*Oncorhynchus mykiss* and *Bufo arenarum*) to azinphos methyl and carbaryl. Comp. Biochem. Physiol, 139, 239-243.

48. Ferrari, A., Lascano, C., Anguiano, O. L., Pechén de D´Angelo, A. M., Venturino, A., 2009. Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embriogenic development of the toad *Rhinella* (Bufo) *arenarum* Hensel. Aquat. Toxicol., 93, 37-44.

49. Ferrari, A., Lascano, C., Pechen de D'Angelo, A. y Venturino, A., 2011. Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and ntioxidant enzymes. Comparative Biochemestry and Physiology 153, 34-39.

50. Ferrari, A., Venturino, A., Pechen de D´ Angelo, A. M., 2004a. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphos methyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 57, 420-425.

51. Ferrari, A., Venturino, A., Pechén de D´Angelo, A. M., 2007a. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. Pestic. BioFm. Phys. 88, 134-142.

52. Ferrari, A., Venturino, A., Pechén de D'Angelo, A.M., 2007b. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry and Physiology 146, 308-313.

53. Ferriz, R., y Aramburu, W. (1994). Relaciones troficas de los peces de un embalse patagónico, Provincia del Neuquén, Argentina. Bioikos*,* 8(1/2), 7-19. Recuperado de http://revistas.bvs-vet.org.br/bioikos/article/view/10081

54. Ferriz, R.A., 1988. Relaciones tróficas de trucha marrón, *Salmo fario* Linné, y trucha arco iris, *Salmo gairdneri* Richardson (Osteichthyes, Salmoniformes) en un embalse norpatagónico. Studies on Neotropical Fauna and Environment 23, 123–131.

55. Flores, V., Brant, S.V., Loker, E.S., 2015. Avian Schistosomes from the South American endemic gastropod genus *Chilina* (Pulmonata: Chilinidae), with brief review of South American Schistosome species. Journal of Parasitology, 101(5), 565-576. DOI: 10.1645/14-639.

56. Flores, V.R. y Semenas, L.G., 2008. Larval digenean community parasitizing the freshwater snail, *Chilina dombeyana* (Pulmonata: Chilinidae) in Patagonia, Argentina, with special reference to the notocotylid *Catatropis chilinae*. The Journal of Parasitology 94(2), 305–313.

57. Forbes, V.E. y Forbes, T.L., 1994. Ecotoxicology in Theory and Practice.. London: Chapman and Hall. In Hamza-Chaffai, A., 2014. Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. International Journal of Biotechnology for Wellnesss Industries, 3, 19-26.

58. Fu, J., Wang, Y., Zhang, A., Zhang, Q., Zhao, Z., Wang, T., Jiang, G., 2011. Spatial distribution of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyl ethers (PBDEs) in an e-waste dismantling region in Southeast China: use of apple snail (Ampullariidae) as a bioindicator. Chemosphere 82, 648–655.

59. Fulton, M. H. y Key, P. B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorous insecticide exposure and effects. Environmental Toxicology and Chemistry 20 (1), 37-45.

60. Gagnaire, B., Geffard, O., Xuereb, B., Margoum, C., Garric, J., 2008. Cholinesterase activities as potential biomarkers: characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889), *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). Chemosphere Elsevier 71(3), 553–560.

61. Gagneten, A.M., Georgina, T., Imhof, A., Gervasio, S., 2012. Comparative study of lead accumulation in different organs of the freshwater crab *Zilchiopsis oronensis*. Water Air Soil Pollut 223:617-624.

62. Galindo-Reyes, J.G., Leyva-Rivas, N., Millán-Aguilar, O.G. y Lazcano-Alvarez, M.G., 2006. Efectos de los plaguicidas en el ADN y proteínas de larvas de camarón azul *Litopenaeus stylirostris* (STIMPSON, 1874) del golfo de California. III Encuentro: Participación de la mujer en la ciencia. En: http://congresos.cio.mx/3_enc_mujer/files/extensos/ext_extemp/EXT04.doc

63. Galloway, T., Handy, R., 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. Ecotoxicology 12, 345-363.

64. Gerhardt, A., 2002. Bioindicator species and their use in biomonitoring. In: Environmental Monitoring Vol. I- UNESCO Encyclopedia of Life Support Systems. UNESCO-EOLSS e-Books and Prints Library, Paris, pp. 77–123.

65. Gil Hernández, F., 2000. El papel de los biomarcadores en toxicología humana. Revista de Toxicología, 17(1): 19-26, 68 ref.

66. Gomot-de Vaufleury, A. y Pihan, F., 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere* 40, 275–284.

67. Gormley, K. L., Teather, K. L., Guignion, D. L., 2005. Changes in salmonid communities associated with pesticide runoff events. Ecotoxicology. 14, 671-678.

68. Grove, R. A., Henny, C. J. y Kaiser, J. L., 2009. Osprey: worldwide sentinel species for assessing and monitoring environmental contamination in rivers, lakes, reservoirs and estuaries. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 12, 25–44.

69. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina, 2009. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Argentina, 175-176; 180-181; 735-736; 482-485.

70. Gutiérrez Gregoric, D.E., 2010a. Redescription of two endemic species of Chilinidae (Gastropoda: Basommatophora) from Del Plata basin (South America) Journal of Conchology 40(3):321-332.

71. Gutiérrez Gregoric, D.E., Núñez, V., Rumi, A., 2010b. Populational studies in a endemic gastropod species of waterfalls environment. American Malacological Bulletin 28(1–2):159-165.

72. Gutiérrez Gregoric, D.E., Ciocco, N.F., Rumi, A., 2014. Two new species of Chilina Gray from Cuyo Malacological Province, Argentina (Gastropoda: Hygrophila: Chilinidae). Molluscan Research. 34(2):84-97.

73. Hanazato, T. y Yasuno, M., 1989. Effects of Carbaryl on the spring zooplankton communities in ponds. Environ. Pollut. 56(1):1-10.

74. Hanazato, T., 1991. Effects of Repeated Application of Carbaryl on Zooplankton Communitites in Experimental Ponds With or Without the Predator *Chaoborus*. Environmental Pollution 74, 309-324.

75. Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A. y Vonk, A., 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. Proceedings of the National Acadademy of Science of USA 99(8), 5476–5480.

76. Hill, I. R., 1994. Guidance Document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments: From the Workshop on Sediment Toxicity Assessment, Held at Slot Moermond Congrescentrum, Renesse, The Netherlands, 8-10 November 1993. P. Matthiessen, & F. Heimbach (Eds.). SETAC.

77. Howard, P. H., 1991. Handbook of environmental fate and exposure data: for organic chemicals, volume III pesticides (Vol. 3). Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Michigan. 684 p. http://www.bvsde.paho.org/bvsaar/e/fulltext/gestion/conceptos.pdf

78. Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Jr., y H.L., Bergman., 1992. Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress, Lewis Publishers, Boca Raton, FL. Environmental Toxicology and Chemistry, 347 pp.

79. Jardine, T.D., Al, T.A., MacQuarrie, K.T.B., Ritchie, C.D., Arp, P.A., Maprania, A., Cunjak, R.A., 2005. Water striders (family Gerridae): mercury sentinels in small freshwater ecosystems. Environ Pollut 134, 164–171.

80. Jokanovic, M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. Toxicology 166, 139-160.

81. Jordaan, M.S., Reinecke, S.A. y Reinecke, A.J., 2011. Acute and sublethal effects of sequential exposure to pesticide azinphos-methyl on juvenile earthworms (*Eisenia Andrei*). Ecotoxicology 21, 649-661.

82. Jorsaraei, A., Maliji, G., Azadmehr, A., Moghadamnia, A. y Faraji, A., 2014. Immunotoxicity effects of carbaryl in vivo and in vitro. Environmental Toxicology and Chemestry 38(3), 838-844.

83. Klosterhaus, S. L., Di Pinto, L. M., Chandler, G. T., 2003. A comparative assessment of azinphosmethyl bioaccumulation and toxicity in two estuarine meiobenthic harpacticoid copepods. Environ. Toxicol. Chem. 22, 2960-2968.

84. Kristoff, G., Cacciatore, L.C., Noemí, R.V.G., Cochón, A.C., 2011. Effects of the organophosphate insecticide azinphos-methyl on the reproduction and cholinesterase activity of *Biomphalaria glabrata*. Chemosphere 84, 585-591.

85. Kristoff, G., Chiny Barrionuevo, D., Cacciatore, L.C., Guerrero, N.R.V., Cochón, A.C., 2012. In vivo studies on inhibition and recovery of B-esterase activities in *Biomphalaria glabrata* exposed to azinphos-methyl: analysis of enzyme, substrate and tissue dependence. Aquat. Toxicol. 112-113, 19-26.

86. Kristoff, G., Guerrero, N.R.V., Cochón, A.C., 2010. Inhibition of cholinesterases and carboxylesterases of two invertebrate species, *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*, by the carbamate pesticide carbaryl. Aquatic Toxicology, 96(2), 115-123.

87. Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N. R., Pechén de D'Angelo, A.M., Cochón, A.C., 2006. Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. Toxicology 222, 185-194.

88. Krull, M., Barros, F., 2010. Key issues in aquatic ecotoxicology in Brazil: a critical review. J. Braz. Soc. Ecotoxicol. 7, 57-66.

89. Lartigues, S.B. y Garrigues, P.P., 1995. Degradation kinetics of organophosphorus and organonitrogen pesticides indifferent waters under various environmental conditions. Environental Science and Technology 29(5), 1246-1254.

90. Lascano, C. I., Ferrari, A., Gauna, L. E., Cocca, C., Cochón, A. C., Verrengia Guerrero, N., Venturino, A., 2011a. Organophosphorus insecticides affect normal polyamine metabolism in amphibian embryogenesis. Pest. Biochem. Physiol. 101, 240-247.

91. Lascano, C.I., Ferrari, A. y Venturino, A., 2011b. Sublethal concentrations of azinphos-methyl induce biochemical and morphological alterations in *Rhinella arenarum* embryos. Chemisty and Ecology 27(6), 557-568.

92. Lascano, C.I., Sotomayor, V., Ferrari, A. y Venturino, A., 2009. Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*. Acta Toxicol. Argent. 17(1), 8-19.

93. Legierse, K., Sejm, D., van Leeuwen, c. j., Selvea, W., Hermens, J. C. M., 1998. Bioconcentration kinetics of chlorobenzenes and the organophosphorus pesticide chlorthion in the pond snail *Lymnaea stangalis* a comparison with the guppy *Poecilla reticulata*. Aquat. Toxicol. 41, 301-323.

94. Lenz, M., da Gama, B.A.P., Gerner, N.V., Gobin, J., Gröner, F., Harry, A., Jenkins, S.R., Kraufvelin P., Mummelthei C., Sareyka, J., Xavier, E.A., Wahl, M., 2011.

Non-native marine invertebrates are more tolerant towards environmental stress than taxonomically related native species: Results from a globally replicated study. Environ. Res. 111(7), 943-952.

95. Ley 22351. Poder Ejecutivo Nacional. PARQUES NACIONALES. Boletín Oficial de la República Argentina No. 24 564, Buenos Aires, Argentina 12 de diciembre de 1980. http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/15000-19999/16299/norma.htm

96. Li, B., Stribley, J. A., Ticu, A., Xie, W., Schopfer, L. M., Hammond, P., Brimijoin, S., Hinorichs, S. H., Lockridge, O., 2000. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. J. Neurochem. 75, 1320-1331.

97. Lloyd R., 1992. Pollution and freshwater fish. Fishing News Books, Oxford, UK., pp. 192.

98. Loewy, M., Kirs, V., Carbajal, G., Venturino, A., Pechén de D´Angelo, A. M., 1999. Groundwater contamination by azinphos-methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina). Science Tot. Environ. 225, 211-218.

99. Loewy, R. M., Carvajal, L. G., Novelli, M., Pechen de D´Angelo, A. M., 2006. Azinphos-methyl residues in shallow groundwater from the fruit production region of northern Patagonia, Argentina. J. Environ. Sci. Health B. 41, 869-881.

100. Loewy, R.M., Monza, L.B., Kiers, V.E., Savini, M.C., 2011. Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. J Environ Sci Health B, 46, 662-670.

101. Lombardi, P.E., Peri, S.I. y Verrengia Guerrero, N.R., 2010. ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 1704-1711.

102. Lower, W. R., y Kendall, R. J., 1990. Sentinel species and sentinel bioassay. En Biomarkers of environmental contamination, eds. J. F. McCarthy y L. R. Shugart, pp. 309–331. Boca Raton, FL: Lewis. From: Grove, R.A., Henny, C.J., Kaiser, J.L., 2009. Osprey: worldwide sentinel species for assessing and monitoring environmental contamination in rivers, lakes, reservoirs and estuaries. Journal Toxicology Environmental Health Part B 12, 1–20.

103. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

104. Malagnoux, L., Capowiez, Y. y Rault, M., 2014. Tissue distribution, characterization and in vitro inhibition of B-esterases in the earwig *Forficula auricularia*. Chemosphere 112, 456-464.

105. Mallory, M.L., Robinson, S.A., Hebert, C.E. y Forbes, M.R., 2010. Seabirds as indicators of aquatic ecosystem conditions: a case for gathering multiple proxies of seabird health. Marine Pollution Bulletin 60, 7–12.

106. Martínez-Tabche, L., Germán-Faz, C., Galar-Castelán, I., Ramírez-Mora, B. y Cardona-Hinojosa, G., 1996. Efecto tóxico del carbaril y del plomo sobre los lípidos, la clorofila y los azúcares reductores de la microalga *Ankistrodesmus falcatus*. Rev. Int. Contam. Ambien. 12(2), 61-67.

107. Maselli, V., Polese, G., Rippa, D., Ligrone, R., Kumar Rastogi, R., Fulgione, D., 2010. Frogs, sentinels of DNA damage induced by pollution in Naples and the neighbouring Provinces. Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 1525- 9.

108. Massoulié J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F. M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. Prog. Neurobiol. 41, 31-91.

109. Maxwell, D.M., 1992. The specificity of carboxylesterase protection against thetoxicity of organophosphorus compounds. Toxicol. Appl. Pharmacol. 114 (2),306–312.

110. McDonald, J.H., 2014. Handbook of Biological Statistics. Sparki House Publishing. Maryland, U.S.A. 299pp.

111. McGregor, R. y Mackauer, M., 1989. Toxicity of carbaryl to the pea-aphid parasite *Aphidius smithi* : influence of behavior on pesticide uptake. Crop Protection, 8, 193-196.

112. Milinkovitch, T., Bustamante, P., Huet, V., Reigner, A., Churlaud, C., Thomas-Guyon, H., 2015. In situ evaluation of oxidative stress and immunological parameters as ecotoxicological biomarkers in a novel sentinel species (*Mimachlamys varia*). Aquatic Toxicology 161, 170–175.

113. Moore, S. E., 2008. Marine mammals as ecosystem sentinels. Journal Mammalogy 89(3), 534–540.

114. O'Brien, D. J., Kaneene, J. B., y Poppenga, R. H., 1993. The use of mammals as sentinels for human exposure to toxic contaminants in the environment. Environmental Health Perspectives 99, 351–368.

115. Oehlmann, J., Dy Benedetto, P., Tillman, M., Duft, M., Oetken, M., Schulte-Oehlman, U., 2007. Endocrine disruption in prosobranch mollucs: evidence and ecological relevance. Ecotoxicology 16, 29-43.

116. Olea, N., Molina, M.J., Garcia-Martin, M., y Olea-Serrano M.F., 1996. Modern agricultural practices: The human price: Comments on Toxicology 5(4-5), 455-474.

117. Oliveira, P., Lopes-lima, M., Machado, J., Guilhermino, L., 2015. Comparative sensitivity of European native (*Anodonta anatina*) and exotic (Corbicula fluminea) bivalves to mercury. Estuar. Coast. Shelf Sci. 167, 1-8.

118. Ongley, E. D., 1996. Control of water pollution from agriculture. FAO Irrigation and Drainage Paper No. 55. FAO, Roma.

119. Orlando, E. F., Kolok, A. S., Binzcik, G. A., Gates, J. L., Horton, M. K., Lambright, C. S., Gray, L. E., Jr., Soto, A. M., y Guillette, L. J., Jr., 2004. Endocrine-

disrupting effects of cattle feedlot effluent on an aquatic sentinel species, the fathead minnow. Environmental Health Perspectives 112(3), 353–358.

120. Otero, S. y Kristoff, G., 2016. *In vitro* and *in vivo* studies of cholinesterases and corboxylesterases in *Planorbarius corneus* exposed to a phosphorodithioate insecticide: Findng the most sensitive combination of enzymes, substrates, tissues and recovery capacity. Aquatic Toxicology 180, 186-195.

121. Patiño, Y., Díaz, E. y Ordóñez, S., 2014. Microcontaminantes emergentes en aguas: tipos y sistemas de tratamiento. Avances en Ciencia e Ingeniería 5(2), 1-20.

122. Pérez, A. y Batres, D., 2010. Algunas consideraciones sobre la explotación de moluscos en la Localidad Arqueológica Meliquina (Parque Nacional Lanín), provincia de Neuquén, República Argentina. Werken 13, 175-194.

123. Piola, R.F., Johnston, E.L., 2009. Comparing differential tolerance of native and non-indigenous marine species to metal pollution using novel assay techniques. Environ. Pollut. 157(10), 2853-2864.

124. Potter, P.M., Wadkins, R.M., 2006. Carboxylesterases: detoxifying enzymes andtargets for drug therapy. Curr. Med. Chem. 13, 1045–1054.

125. Pulido Hernández, A., 2007. Estadística para la Biología y Ecología. Estadística descriptiva, univariada y multivariada. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. 26pp.

126. Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, Bocchetti, R., Benedetti, M., y Piva, F., 2006. Use of the Land Snail Helix aspersa as Sentinel Organism for Monitoring Ecotoxicologic Effects of Urban Pollution: An Integrated Approach. Environmental Health Perspectives, 114(1), 63-69. En: http://www.jstor.org/stable/3436629

127. Resolución SAGyP 10/1991. SANIDAD VEGETAL (PLAGUICIDAS). Boletín Oficial de la República de Argentina No. 27 123, Buenos Aires, Argentina, 25 de abril de 1991. http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/20000-24999/20412/norma.htm

128. Resolución SAGyP 507/2008. PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS AROPECUARIOS (MODIFICACION RESOLUCIÓN 256/03). Boletín Oficial de la República de Argentina No. 31 546, Buenos Aires, Argentina, 04 de diciembre de 2008. http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/145000-149999/148029/norma.htm

129. Resolución SENASA 149/16. MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA (PROHIBICIÓN DE METILAZINFOS, METAMIDOFOS Y SUS PRODUCTOS FORMULADOS). Boletín Oficial de la República de Argentina No. 33 357, Buenos Aires, Argentina, 14 de abril de 2016. http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/260000-264999/260396/norma.htm

130. Resolución SENASA 256/03. PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS AGROPECUARIOS (RESIDUOS PLAGUICIDAS – TOLERANCIAS MÁXIMAS). Boletín Oficial de la República de Argentina No. 30 183, Buenos Aires, Argentina, 02 de julio de 2003. http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/85000-89999/86520/norma.htm

131. Rittschof, D. y McClellan-Green, P., 2005. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. Marine Pollution Bulletin 50, 369-373.

132. Rivadeneira, P. R., Agrelo, M., Otero, S., Kristoff G., 2013. Different effects of subchronic exposure to low concentrations of the organophosphate insecticide chlorpyrifos in a freshwater gastropod. Ecotoxicol. Environ. Saf., 90, 82-88.

133. Roméo, M., y Giambérini, L., 2013. History of biomarkers. En Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects. pp. 15-44. CRC Press Boca Raton, USA.

134. Rubio Cárdenas, M. y Vallejo Reyes, A., 2014. Evaluación del grado de contaminación por plaguicidas organofosforados en cultivos de cebolla (*Allium fistolosum)* en suelo y agua de escorrentía en el corregimiento de la florida de la ciudad de Pereira. Trabajo de tesis para optar el título de Química Industrila, Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología, Escuela de Química, Pereira, Colombia.

135. Rumi, A., Gutiérrez Gregoric, D.E., Núñez, V., César, I.I., Roche, M.A., Tassara, M.P., Martín, S.M. y López Armengol, M.F., 2006. Freshwater Gastropoda from Argentina: Species richness, distribution patterns, and an evaluation of endangered species. Malacología, 49(1):189-208.

136. Rumi, A., Gutiérrez Gregoric, D. E., Núñez, V. y Darrigran, G. A., 2008. Malacología latinoamericana. Moluscos de agua dulce de la República Argentina. Revista Biología Tropical, 56(1), 77–111.

137. Rumi, A., Gutiérrez Gregoric, D.E., Núñez, V., Tassara, M.P., Martín, S.M., López Armengol, M.F. y Roche, A., 2004. Biodiversidad de moluscos de agua dulce de la Región Mesopotámica, Argentina. En: Aceñolaza (ed.) Temas de la Biodiversidad del Litoral fluvial argentino. Miscelánea, INSUGEO 12: 211-216.

138. Salvio, C., Manetti, P.L., Clemente, N.L. y López, A.N., 2014. Efectos de Carbaryl y Metaldehído sobre *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda) y *Milax gagates* (Mollusca: Pulmonata) en soja bajo siembra directa. Agrociencia Uruguay 18(2), 82-89.

139. Sánchez-Hernández, J. C. y Wheelock, C. E., 2009. Tissue distribution, isozyme abundance and sensitivity to chorpyrifos-oxon of carboxylesterases in the earthworm *Lumbricus terrestris*. Environ. Pollut. 157, 264-272.

140. Sardi Sulvarán, A.E., 2008. Biomarcadores de hidrocarburos en el bivalve (Tivela mactroides) expuestos a sedimentos contaminados. Trabajo especial de Grado. Universidad Sión Bolívar. http://159.90.80.55/tesis/000139492.pdf

141. Schwarzenbach, R.P., Egli, T., Hofstetter, T.B., von Gunten, U. y Wehrli, B., 2010. Global Water Pollution and Human Health. Annual Review of Environment and Resources 35, 109-136.

142. Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., von Gunten, U. y Wehrli, B., 2006. The Challenge of micropollutants in aquatic systems. Science 314:1072-77.

143. Sedeño-Díaz, J. E. y López-López, E., 2012. Freshwater Fish as Sentinel Organisms: From the Molecular to the Population Level, a Review, New Advances and Contributions to Fish Biology. Prof. Hakan Turker (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/54825. En: http://www.intechopen.com/books/new-advances-and-contributions-to-fish-biology/fish-as-sentinel-organisms-from-the-molecular-to-the-population-level-a-review.

144. Shayeghi., M., Shahtaheri, S. J. y Selsele, M., 2001. Phosphorus insecticides residues in Manzandaran River waters, Iran (2000). Iranian J. Publ. Health, 30, 115-118.

145. Shugart, L.R. y Theodorakis, C., 1996. Genetic Ecotoxicology: The Genotypic Diversity Approach. Comp. Biochem. Physiol. 113C(2), 273-276.

146. Shugart, L.R., McCarthy, J.F. y Halbrook, R.S., 1992. Biological Markers of Environmental and Ecological Contamination: An Overview. Risk Analysis 12(3), 353-360.

147. Silbergeld, E.K. y Davis, D.L., 1994. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. Clinical Chemistry 40(7), 1363-1367.

148. Smits, J.E.G. y Fernie, K.J., 2013. Avian wildlife as sentinels of ecosystem health. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 36, 333–342.

149. Sogorb, M.A. y Vilanova, E., 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. Toxicology Letters 128, 215–228.

150. Strong, E. E., Garcominy, O., Ponder, W. F., Bouchet, P., 2008. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. Hydrobiología 595, 149-166.

151. Sturm, A. y Hansen, P. D., 1999. Altered cholinesterase and monooxigenase levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* exposed to environmental pollutants. Ecotoxicol. Environ. Saf. 42, 9-15.

152. Tabor, G.M. y Aguirre A.A., 2004. Ecosystem health and sentinel species: adding an ecological element to the proverbial 'canary in the mineshaft'. EcoHealth., 1, 226-228. 10.1007/s10393-004-0092-8.

153. Thompson, J. A. J. y Cosson, R.P., 1984. An improved electrochemical method for the quantification of metallothionein in marine organisms. Mar Environ Res, 11: 137-52.

154. Timbrell, J. A., 2000. Principles of Biochemical Toxicology. Taylor y Francis (Ed.), London, England.

155. Tosi, A.P., Pechen de D'Angelo, A.M., Savini, M.C. y Loewy, R.M., 2009. Evaluación de Riesgo por Plaguicidas sobre Agua Superficiales de la Región Norpatagónica Argentina. Acta Toxicológica Argentina 17(1), 1-6.

156. Tripathi, P. K. y Singh, A., 2004. Carbaryl induced alterations in the reproduction and metabolism of the freshwater snail *Lymnaea acuminata*. Pest. Biochem. Physiol., 79, 1-9.

157. US EPA, United States Environmental Protection Agency, 2000. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, 600/R-94/024. US EPA Washington, DC.

158. US EPA, United States Environmental Protection Agency, 2001. Interim registration eligibility decision for azinphos-methyl. Case no. 0235. https://www3.epa.gov/pesticides/REDs/azm_red.pdf

159. US EPA, United States Environmental Protection Agency, 2003. Revised EFED Risk Assessment of Carbaryl in Support of the Reregistration Eligibility Decision (RED). http:// www3.epa.gov/pesticides/endanger/litstatus/effects/carb-riskass.pdf

160. Valdovinos, C., 2006. Estado de conocimiento de los gasterópodos dulceacuícolas de Chile. Gayana 70, 88-95.

161. van der Oost, R., Beyer, J. y Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology 13, 57-149.

162. Varó, I., Navarro, J. C., Amat, F. y Guilhermino, L., 2002. Characterization of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. Chemosphere 48, 563-569.

163. Varó, I., Redón, S., Garcia-Roger, E.M., Amat, F., Guinot, D., Serrano, R., Navarro, J.C., 2015. Aquatic pollution may favor the success of the invasive species A. franciscana. Aquat. Toxicol. 161, 208-220.

164. Verrengia Guerrero, N. R., Lombardi, P. E., 2009. Is Ala-D activity a useful biomarker of lead exposure for field monitoring programs? En: G. H. Narine (Ed.) Aquatic Ecosystem Research Trends, Nova Science Publishers, New York, USA.

165. Verrengia Guerrero, N. R., Taylor, M.G., Davies, N. A., Lawrence, M. A. M., Edwards, P. A., Simkiss, K.,Wider, E. A., 2002. Evidence of differences in the biotransformation of organic contaminants in three species of freshwater invertebrates. Environ. Pollut. 117, 523–530.

166. Wheelock, C. E., Shan, G., Ottea, J., 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. J. Pest. Sci. 30, 75-83.

167. Zar, J. H., 1999. Biostatistical analysis. Pearson Education India. 663pp.