



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Estudio de múltiples biomarcadores
en el gasterópodo nativo de agua dulce
Chilina gibbosa (Sowerby, 1841)
expuesto a plaguicidas utilizados en
Argentina**

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

en el área de Química Biológica

Lic. Lucila Thomsett Herbert

Directora de tesis: *Dra. Gisela Kristoff*

Director adicional de tesis: *Dr. Carlos M. Luquet*

Consejera de estudios: *Dra. María del Carmen Ríos de Molina*

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2020

Estudio de múltiples biomarcadores en el gasterópodo nativo de agua dulce *Chilina gibbosa* (Sowerby, 1841) expuesto a plaguicidas utilizados en Argentina

La presencia de plaguicidas de diferentes modos de acción en ecosistemas acuáticos y su impacto en especies no blanco es una problemática ambiental inherente al actual sistema agroindustrial de producción de alimentos. *Chilina gibbosa* es un gasterópodo de agua dulce endémico del sur de Argentina y Chile característico de los ecosistemas patagónicos. En trabajos previos se observó que, ante la exposición aguda al insecticida organofosforado metilazinfos (MAZ), presenta signos de neurotoxicidad conspicuos acompañados por alta sensibilidad de colinesterasas (ChE) y baja sensibilidad de carboxilesterasas (CE), que podrían utilizarse como señal de alarma temprana. En esta tesis se estudiaron los signos de neurotoxicidad y respuestas bioquímicas e inmunológicas de *Chilina gibbosa* a la exposición aguda a insecticidas de distintas clases: los organofosforados MAZ y clorpirifos (CPF), el carbamato carbarilo (CAR) y el neonicotinoide acetamiprid (ACP). En primer lugar, se evaluó la especificidad de biomarcadores de neurotoxicidad y enzimáticos, actividad de ChE, CE y glutatión S-transferasas (GST) en homogenatos de tejido blando total, mediante la exposición aguda a concentraciones crecientes de CPF, CAR y ACP. Luego, se evaluaron los efectos de mezclas binarias de CPF y CAR sobre los signos de neurotoxicidad y ChE, CE y GST en homogenatos de tejido blando total. Por último, en hemolinfa, se evaluaron ChE, CE y GST en individuos expuestos a MAZ y se estudió el efecto de MAZ, CPF, CAR y ACP sobre las respuestas del sistema inmune por exposición aguda a concentraciones ambientalmente relevantes de estos insecticidas. Se observaron efectos neurotóxicos severos (falta de adherencia y protrusión conspicua de la cabeza-pie) en individuos expuestos a bajas concentraciones de MAZ. Con CAR también se observaron estos signos, pero en menor proporción y a concentraciones más altas. En individuos expuestos a CPF, se encontró falta de adherencia a concentraciones altas, pero no protrusión de la cabeza-pie. En homogenatos de tejido blando total, se encontraron diferentes sensibilidades de ChE y CE a CPF y CAR, y

se observó un efecto aditivo de mezclas binarias de CPF y CAR sobre ChE. No se registraron efectos sobre la actividad de GST. La exposición aguda a ACP no afectó estos biomarcadores, aún a concentraciones superiores a las encontradas en el ambiente. En hemolinfa, las respuestas de ChE a una concentración ambientalmente relevante de MAZ fueron similares a las de homogenatos de tejido blando total. Las actividades de CE y GST en hemolinfa aumentaron de manera estadísticamente significativa, mientras que en homogenatos de tejido blando total no se vieron afectadas por la exposición a MAZ. La exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de MAZ, CPF, CAR y ACP tuvo efectos inmunotóxicos sobre *C. gibbosa*: alteró la proporción de los distintos tipos de hemocitos y redujo su viabilidad y su actividad fagocítica. Esta tesis aporta información relevante y novedosa sobre la biología de *C. gibbosa* y los efectos de su exposición a insecticidas utilizados en Argentina, que contribuye a la evaluación de esta especie como bioindicadora.

Palabras clave: *Chilina gibbosa*; B-esterasas; insecticidas anticolinesterásicos; neonicotinoide; inmunotoxicidad

A Study of Multiple Biomarkers in the Freshwater Native Gastropod *Chilina gibbosa* (Sowerby, 1841) Exposed to Pesticides Used in Argentina

The presence of pesticides with diverse mechanisms of action in aquatic ecosystems and their impact on non-target species is an environmental concern inherent in the current system of agro-industrial food production. *Chilina gibbosa* is a freshwater gastropod endemic to southern Argentina and Chile and characteristic of Patagonian ecosystems. Previous studies have shown that acute exposure to the organophosphate (OP) insecticide azinphos methyl (AZM) elicits conspicuous neurotoxic signs coupled with increased cholinesterase (ChE) and reduced carboxylesterase (CE) sensitivities, which could be used as early warning signals. This thesis describes the study of neurotoxic signs and biochemical and immunological responses of *C. gibbosa* to acute exposures to insecticides of different chemical nature; the organophosphates AZM and chlorpyrifos (CLP), the carbamate carbaryl (CAR) and the neonicotinoid acetamiprid (ACP). We first evaluated the specificity of neurotoxic signs and the enzymatic biomarkers ChE, CE and glutathion S-transferase (GST) activity in whole soft tissue homogenates, by means of acute exposure to increasing concentrations of CLP, CAR and ACP. We then studied the effects of binary mixtures of CLP and CAR on neurotoxic signs and ChE, CE and GST activity in whole soft tissue homogenates. Lastly, in haemolymph, we evaluated ChE, CE and GST activity in AZM-exposed individuals, and we studied the effect of acute exposure to environmentally relevant concentrations of AZM, CLP, CAR and ACP on the immune system of *C. gibbosa*. Our results confirm severe neurotoxic signs (lack of adherence and conspicuous protrusion of the head-foot region) in individuals exposed to low AZM concentrations. These signs were also found in CAR-exposed individuals albeit in a smaller proportion and at higher concentrations. CLP-exposed individuals showed lack of adherence at high concentrations, but did not exhibit the conspicuous protrusion of the head-foot region. In whole soft tissue homogenates, we found different sensitivities of ChE and CE to CLP and CAR and we observed an additive effect on ChE of the binary mixtures of CAR and CLP. No effects were found on GST activity. Acute exposure to ACP did not affect any of these biomarkers even at

concentrations higher than those found in the environment. In haemolymph, ChE response to an environmentally relevant concentration of AZM was similar to that seen in whole soft tissue homogenates. CE and GST activity in haemolymph was greatly increased by AZM exposure in contrast to whole soft tissue homogenate activity, which had remained unchanged. Exposure to environmentally relevant concentrations of AZM, CLP, CAR and ACP had immunotoxic effects on *C. gibbosa*. The ratio of hemocyte subpopulations was altered and their viability and phagocytic activity were greatly reduced. This thesis provides relevant and novel information about the biology of *C. gibbosa* and the effects of exposure to pesticides used in Argentina and contributes to the evaluation of this species as a bioindicator.

Key words: *Chilina gibbosa*; B-esterases; anticholinesterasic insecticides; neonicotinoid; immunotoxicity

Agradecimientos

Intentar agradecer en pocas palabras a la plétora de fueguitos que me acompañaron alumbrando este camino me resulta el desafío más complejo de todos. No me cabe ninguna duda de que los grandes logros son colectivos; sola no hubiera sido posible.

A Gise y a Carlos, gracias por invitarme a participar y guiarme en este trayecto de grandes aprendizajes profesionales y personales, y gracias por todas las palabras de aliento.

A Pau, amiga, cómo agradecerte toda la compañía y el apoyo de estos años. Sin vos, el día a día hubiera sido menos divertido, más solitario, y mucho más desafiante. Me hace inmensamente feliz nuestra amistad.

A Pau, Lis, Vicki, Marce y Gabi, gracias por estos años de convivencia laboratorial y de ayuda mutua. A María del Carmen, por tu calidez y por tener siempre un rato para charlar de lo que hiciera falta. Y a Gabi, Sebas, Tati, Rena y Daissy, por compartir conmigo pipetas, espectros, charlas, risas y tortas, todas muy necesarias. A Dana, Pame, Tincho, Marian, Flor, Fran, Eva y las chicas de bedelía, por todas las risas, mates y conversaciones profundas. A Aye, especialmente, me encanta compartir nuestra pasión por la lectura.

Al LEA, el mejor grupo adoptivo que una pudiera pedir. Vir, gracias por ser una gran codirectora de la vida. Fla, gracias por las interminables reflexiones y divagues existenciales que nos ayudan a soñar. Julio, gracias por la combinación justa de control y empatía, y por conocer el momento exacto en el que una birra puede salvarlo todo. A la gente del CEAN y a Cartucho, que también me adoptaron y que hacen que el ir a trabajar sea placentero.

A Anto y Pablito, que hicieron tan linda la adaptación a Junín, por las grandes sesiones de co-working y por más montañas juntas. A Nilda, Loli, Oscar y Omar (y obviamente Chacha, Chimi, Rita, Mustafás, Wilki y Tincho el tero rescatado) por tener siempre las puertas abiertas y recibirme con tanto cariño y tortas fritas. Y por qué no, a Junín de los Andes, con el Chimehuín y el Lanín omnipresente detrás, por darme aire y serenidad, agua y energía, colores y un hogar, cumbres y centenares de criaturas compañeras.

A les artropodianes, Pri, Caro, Andresito, Agus, Anita, por nuestras noches de juegos y por haber construido una red de apoyo hermosa. A Manu, gracias por nuestras charlas y caminatas, que tanto bien nos hacen. A Marian, amigota, te admiro y me maravillo de cómo crece nuestra relación a la par nuestra.

A Clau, papafrita querida, por enseñarme a apretar todos los botones que hagan falta y por haberme abierto la puerta al bachi. A toda la colectiva del bachi Simón Rodríguez, Juli Na, Car, Patri, Anto, Lu, Tati, Luis, Chelo, por enseñarme que puede existir un pedacito de utopía hecha realidad, y a luchar sin perder la ternura y la alegría. A Ro y Na, llevo sus sonrisas y su convicción para encarar la vida siempre presentes.

A las chichis. Mujeres fuertes y sensibles, gracias a ustedes aprendo día a día que la vida acomoda los melones, si seguimos tirando del carro con amor, y que nos puede sorprender con nuevas oportunidades y aventuras (y por qué no, uno que otro correctivo).

A mi hobbit querida, por las noches de pependorf con vos y Ati y por la mejor convivencia del mundo. Te adoro.

A Brian, gracias por tu eterna sonrisa y esa energía tan hermosa que irradiás que hace más fáciles los momentos difíciles y tan divertidos todo el resto.

A mi familia, incondicionales en su amor, compañía y ayuda, a quienes quiero enormemente y no agradezco lo suficiente. A mi tía Cuqui, que me alienta constantemente a perseverar en mis sueños. A Biyu, quien me enseñó que, a veces, hay cosas que hacen mucho ruido y asustan, pero que al fin y al cabo no son más que mucho meble. A Vicki, primamiga, por descubrir juntas que al alma hay que darle de comer un poco de risa y caramelo, y que de a un día a la vez podemos llegar muy lejos, cumpliendo sueños. A Ceci, gracias por ser no solamente mi hermana, sino también mi amiga y una compañera extraordinaria; me encanta seguir creciendo juntas. A mi papá, quien me sigue transmitiendo su pasión por la ciencia todos los días y que inspiró mi pasión por la naturaleza. A mi mamá, a quien admiro enormemente; sos una gran mujer, inteligente, reflexiva y amorosa.

Índice

Abreviaturas	ix
1 Introducción general	10
1.1 Contaminación ambiental por plaguicidas	10
1.1.1 Insecticidas organofosforados	21
1.1.2 Insecticidas carbamatos	27
1.1.3 Insecticidas neonicotinoides	30
1.1.4 Propiedades físico químicas y toxicológicas de los insecticidas estudiados en esta tesis	35
1.2 Herramientas de la ecotoxicología	36
1.2.1 Biomarcadores	38
1.2.2 Bioensayos.....	45
1.2.3 Especies bioindicadoras.....	48
1.3 <i>Chilina gibbosa</i>	49
Hipótesis general	62
Objetivo general.....	62
2 Metodología general	63
2.1 Reactivos	63
2.2 Ejemplares de <i>Chilina gibbosa</i>	63
2.3 Bioensayos de toxicidad	68
2.3.1 Condiciones generales.....	68
2.3.2 Soluciones de insecticidas	70
2.3.3 Registro de letalidad y signos de neurotoxicidad	72
2.4 Obtención de muestras	73
2.4.1 Homogenatos de tejido blando total	73
2.4.2 Extracción de hemolinfa.....	73
2.5 Determinaciones de respuestas enzimáticas.....	74
2.5.1 Actividad de ChE	74
2.5.2 Actividad de CE.....	75
2.5.3 Actividad de GST	76
2.6 Análisis estadístico.....	77
2.7 Higiene y seguridad.....	78
3 Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total..	79
3.1 Introducción	79
3.2 Metodología	83

3.2.1 <i>Diseño experimental</i>	83
3.2.2 <i>Análisis estadístico</i>	85
3.3 Resultados.....	87
<i>Clorpirifos</i>	87
<i>Carbarilo</i>	92
<i>Acetamiprid</i>	99
3.4 Discusión.....	103
4 Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total.....	127
4.1 Introducción	127
4.2 Metodología	131
4.2.1 <i>Diseño experimental</i>	131
4.2.2 <i>Análisis estadístico</i>	134
4.3 Resultados.....	136
4.5 Discusión.....	144
5 Respuestas enzimáticas en hemolinfa	152
5.1 Introducción	152
5.2 Metodología	156
5.2.1 <i>Diseño experimental</i>	156
5.2.2 <i>Análisis estadístico</i>	157
5.3 Resultados.....	158
5.5 Discusión.....	161
6 Respuestas celulares en hemolinfa	168
6.1 Introducción.....	168
6.2 Metodología	172
6.2.1 <i>Diseño experimental</i>	172
6.2.2 <i>Determinación de respuestas del sistema inmune</i>	175
6.2.3 <i>Análisis estadístico</i>	178
6.3 Resultados.....	179
<i>Metilazinfos</i>	179
<i>Tipos de hemocitos de Chilina gibbosa</i>	182
<i>Acetona</i>	184
<i>Clorpirifos, Carbarilo y Acetamiprid</i>	187
6.5 Discusión.....	193
7 Discusión general	202
8 Conclusiones generales	209
Referencias bibliográficas.....	212

Abreviaturas

ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterasa
ACP	acetamiprid
CAR	carbarilo
CE	carboxilesterasa
ChE	colinesterasa
CI₅₀	concentración que inhibe una respuesta dada en el 50 % de los individuos de un ensayo
CPF	clorpirifos
GST	glutación S-transferasa
LOEC	menor concentración a la que se registra efecto (<i>Lowest Observed Effect Concentration</i>)
MAZ	metilazinfos
nAChR	receptor nicotínico de acetilcolina
NOEC	mayor concentración a la que no se registra efecto (<i>No Observed Effect Concentration</i>)
OF	insecticida organofosforado
p-NFA	p-nitrofenil acetato
p-NFB	p-nitrofenil butirato

1 Introducción general

1.1 Contaminación ambiental por plaguicidas

La presencia de plaguicidas en el ambiente y el riesgo asociado para la salud humana y los ecosistemas representan una de las grandes problemáticas ambientales actuales (ONU, 2017). Ya en 1962, Rachel Carson expuso con claridad y visión, algunos de sus principales aspectos:

- El aire, la tierra, los ríos y los océanos se encuentran contaminados con plaguicidas y sus metabolitos.
- La evidencia de efectos nocivos e, incluso, letales, sobre especies no blanco.
- El continuo desarrollo de nuevos plaguicidas a una mayor velocidad que la capacidad para estudiar sus potenciales efectos adversos.
- La resistencia desarrollada por las especies, que conlleva al desarrollo de nuevos productos y al uso excesivo y, en muchos casos combinado, de plaguicidas.
- La persistencia en el ambiente de algunos plaguicidas.
- El potencial de bioacumulación y biomagnificación a través de las cadenas tróficas.
- Los efectos pueden observarse a distintos niveles de organización: celulares, individuales, poblacionales.
- La principal fuente de ingreso de plaguicidas al ambiente es la agricultura intensiva.
- El conocimiento sobre los efectos de los plaguicidas y el riesgo que representan para el ser humano y el ambiente es limitado.

Estos, continúan siendo casi 60 años después, los principales aspectos de esta problemática, lo que resalta su relevancia y complejidad. La ciencia tiene un rol transversal, ya que investiga la dinámica de los plaguicidas en el ambiente, sus efectos fisiológicos y ecológicos y los mecanismos mediante los cuales los ejercen. Esta información es un insumo tanto para la producción y aplicación de los plaguicidas como para su regulación y la evaluación de riesgo. El alcance de esta tesis se circunscribe a aportar evidencia experimental hacia el mejor entendimiento de los efectos que pueden ocasionar los plaguicidas sobre la biología de especies acuáticas no blanco, en particular, de los efectos de ciertos insecticidas sobre una especie de gasterópodo de agua dulce nativo de Argentina y Chile.

Los plaguicidas son compuestos (orgánicos, inorgánicos o microbiológicos) que se utilizan con el objetivo de combatir plagas, es decir, organismos considerados nocivos para los seres humanos, cultivos o frutos y animales domésticos. De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO, 2003), un plaguicida es “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan daño o que interfieran durante o de cualquier otra forma en la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, *commodities* agrícolas, madera y productos de madera, o alimentos para animales, o sustancias que puedan administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. Este término incluye las sustancias destinadas al uso como reguladores de crecimiento de plantas, defoliantes, desecantes o agentes para prevenir la caída prematura de la fruta, y sustancias aplicadas a cultivos tanto antes como después de la cosecha para protegerlos del deterioro durante el almacenamiento y el transporte”. En una primera instancia de clasificación, se los agrupa según el organismo blanco, es decir, el tipo

de plaga que se pretende controlar (**Tabla 1.1**). Los insecticidas, en particular, son plaguicidas diseñados para controlar insectos.

Tabla 1.1 Tipos de plaguicidas clasificados según su organismo blanco, es decir, el tipo de plaga que se pretende controlar con su aplicación.

Clasificación	Organismos blanco
Acaricidas	Ácaros
Bactericidas	Bacterias
Fungicidas	Hongos
Herbicidas	Malezas
Insecticidas	Insectos
Molusquicidas	Moluscos
Nematicidas	Nematodos
Rodenticidas	Roedores

A lo largo de los siglos, diferentes civilizaciones, como los sumerios y los antiguos egipcios, utilizaron sustancias naturales, inorgánicas y orgánicas, para el control de distintas plagas. Con el auge de la industrialización durante el siglo XX, en la década de 1930, la incipiente industria química comenzó a desarrollar los primeros compuestos orgánicos sintéticos con propiedades plaguicidas, los insecticidas de tiocianato de alquilo (Pretty y Bharucha, 2015). Poco después, alrededor de 1940, con el descubrimiento de la eficacia del dicloro difenil tricloroetano (DDT) para combatir los piojos vectores del tifus durante la Segunda Guerra Mundial, comenzó la verdadera revolución en el uso de productos químicos sintéticos para el control de plagas (Newman, 2014). En conjunto con el uso de DDT en la agricultura, la mecanización agraria y la revolución verde, surgió el modelo de producción de alimentos actual. Con la intención de incrementar la productividad agrícola y asegurar una fuente estable de alimentos, este modelo se basa en la producción de masivas cantidades de

alimento en poco tiempo y espacio, realizando fuertes inversiones en mecanización y tecnología, que ofrecen abundantes cosechas con poca mano de obra (Newman, 2014). Este sistema depende fuertemente de la aplicación intensiva de productos químicos que favorecen una gran productividad ya sea aumentando el rinde, acelerando procesos de abono o de tratamiento de la tierra entre cultivos, o combatiendo plagas perjudiciales para los cultivos.

En consecuencia, el empleo de plaguicidas en la producción de alimentos se incrementó exponencialmente. En 1990, el uso mundial de plaguicidas era de, aproximadamente, 2,3 millones de toneladas anuales y para 2017, había aumentado a 4,1 millones de toneladas anuales (FAO, 2019). En Argentina, los datos oficiales sobre consumo nacional de plaguicidas dependen de lo informado por la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE), que informó un crecimiento casi continuo en su comercialización desde el año 1997 hasta el año 2012, principalmente de herbicidas, seguido por insecticidas y luego fungicidas, alcanzando aproximadamente 317,2 millones de kg/L¹ en 2012 (CASAFE, 2012). A partir de 2012, los informes indican que el mercado se mantuvo estable, pero solo brindan datos porcentuales, sin cantidades absolutas, lo que dificulta establecer el volumen de uso actual (CASAFE, 2016, 2014). CASAFE nuclea a, aproximadamente, 30 de las empresas que concentran el mayor volumen de venta de plaguicidas en Argentina y representan entre el 80 y el 85 % del mercado, por lo que los valores de uso probablemente sean mayores que los presentados. Hoy en día, existen aproximadamente 2000 principios activos² registrados (G. Kristoff, comunicación personal, 2018).

Asimismo, los plaguicidas no son comercializados como principios activos, sino como formulaciones, líquidas (concentrados emulsionables, suspensiones concentradas, soluciones, emulsiones invertidas, microencapsulados), o sólidas (polvos, cebos, gránulos, pellets, polvos mojables, gránulos dispersables, polvos solubles). Estas formulaciones están compuestas por

¹ Unidad según CASAFE (2012)

² Parte biológicamente activa del plaguicida, responsable de su modo de acción (FAO, 2003).

el principio activo y diferentes excipientes. Estos últimos pueden incluir: sustancias que actúan como vehículo para incrementar la efectividad de aplicación y facilitar la manipulación y almacenamiento, coadyuvantes que incrementan y potencian la actividad plaguicida, surfactantes o tensioactivos para reducir la tensión superficial de las gotas, aceites para que las gotas penetren más fácilmente las membranas biológicas, adherentes para que las gotas se adhieran mejor a la planta, y también aditivos, como colorantes, esencias, espesantes y anticongelantes (Randall et al., 2008). Los diferentes excipientes tienen propiedades toxicológicas que, en algunos casos, pueden producir efectos adversos de mayor relevancia que los del ingrediente activo y que además pueden modificar la toxicidad del ingrediente activo (Mesnage et al., 2014; Rozman et al., 2010). Sin embargo, la composición de las formulaciones se considera confidencial, por lo que la identidad y concentración de muchos de los excipientes no se detalla en las etiquetas de los productos (Mesnage et al., 2014; Moses et al., 1993). Se conocen, aproximadamente, 6000 formulaciones comerciales (G. Kristoff, comunicación personal, 2018).

Por otro lado, las características de los métodos de producción intensiva de alimentos implican que múltiples plaguicidas de clases químicas y funcionales distintas son aplicados sobre una misma zona, alternando en diferentes épocas del año o, incluso, de manera combinada a partir de formulaciones comerciales que contienen mezclas químicas, o de mezclas realizadas en los tanques de aplicación (Hernández et al., 2017). Además, no solamente son utilizados en agricultura, sino que también son ampliamente utilizados en veterinaria y con otros fines, como ambientes domésticos, jardinería de espacios públicos, y en salud pública para la prevención, el control de enfermedades transmitidas por vectores, y otros usos domisanitarios³ generales (Hernández et al., 2017).

³ El INAL define como plaguicida de uso domiciliario o producto domisanitario a todas aquellas sustancias o preparaciones destinadas a la desinfección de superficies inanimadas y ambientes, así como la desinfectación (combate de insectos y roedores), formuladas para su utilización en el hogar, y/o ambientes

El ingreso de plaguicidas al ambiente desde fuentes no puntuales (difusas) en áreas agrícolas es considerado como una de las principales causas de contaminación acuática (**Figura 1.1**) (Bonmatin et al., 2015). Otras fuentes difusas incluyen los usos alternativos mencionados anteriormente. Además, pueden existir fuentes puntuales, por ejemplo, derrames en sitios de mezcla y descarga, manejo inadecuado de equipos de aplicación, filtraciones en sitios de limpieza o de almacenamiento, o inadecuada disposición de los envases (Bonmatin et al., 2015). Aproximadamente el 50 % de los plaguicidas aplicados se dispersa en el ambiente sin llegar a los blancos pretendidos (LIBIQUIMA-CITAAC, 2016). En consecuencia, diferentes programas de monitoreo en el mundo, han detectado frecuentemente la presencia de plaguicidas en ambientes acuáticos, a menudo en mezclas (Belden et al., 2009; Loewy et al., 2011; Macchi et al., 2018; Rodney et al., 2013). Se los puede encontrar en agua dulce, agua subterránea, e incluso en hielos continentales o el fondo de los océanos. Algunos plaguicidas que están prohibidos desde hace años son detectados hasta el día de hoy en distintos compartimientos ambientales (Newman, 2014). Un fenómeno denominado “destilación global” mueve plaguicidas volátiles y persistentes desde zonas donde son usados, hacia áreas donde hace décadas que están prohibidos o donde incluso jamás se utilizaron, como la Antártida (Newman, 2014). Se los ha detectado también en descargas de plantas de tratamiento de efluentes urbanos ya que, en muchos casos, son resistentes a los tratamientos secundarios y terciarios convencionales (Carra et al., 2014; Magdeburg et al., 2012).

colectivos públicos y/o privados tales como escuelas, hospitales y lugares de esparcimiento, entre otros (Pórfido, 2013).

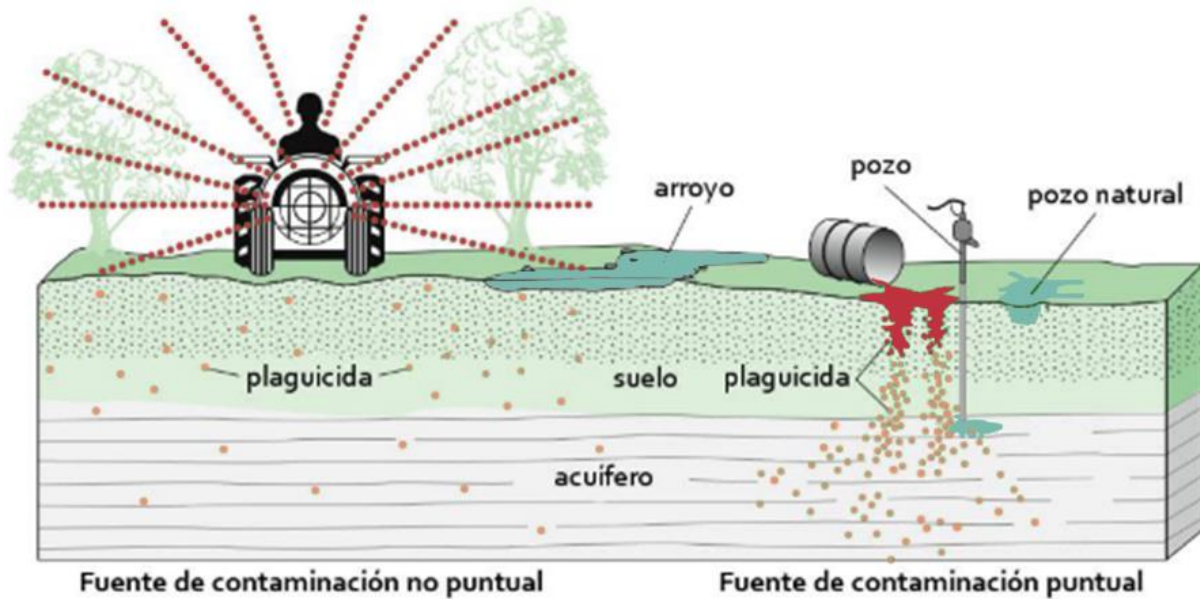


Figura 1.1 Fuentes puntuales y no puntuales (difusas) de contaminación por plaguicidas. Adaptado de Randall et al. (2008) por Cossi (2019).

El transporte, destino y persistencia en el ambiente de los plaguicidas luego de su aplicación (por fumigación, pulverización, espolvoreo o nebulización) depende de diversos factores. Como por ejemplo, las propiedades físico químicas de cada compuesto, el momento y frecuencia de su aplicación, el volumen de precipitación antes y después de las aplicaciones y el tipo de suelo (Bonmatin et al., 2015). Los plaguicidas se pueden distribuir por vía atmosférica mediante corrientes de aire (deriva), por sobre la superficie del suelo (escorrentía) o a través del suelo (lixiviación), y llegar a los acuíferos subterráneos y a las aguas superficiales (**Figura 1.2**) (Randall et al., 2008). Pueden degradarse debido a procesos físico químicos catalizados por factores abióticos como la temperatura, la luz solar (fotólisis), el pH o la hidrólisis, o por procesos biológicos mediados por microorganismos en el suelo o en el agua. Esta degradación puede derivar en su mineralización completa, resultando inocuos o, por el contrario, en muchos casos puede generar productos secundarios de mayor persistencia y toxicidad que los plaguicidas originales (Newman, 2014). Son un importante estresor y representan un riesgo para la biodiversidad y los bienes y servicios ecosistémicos.

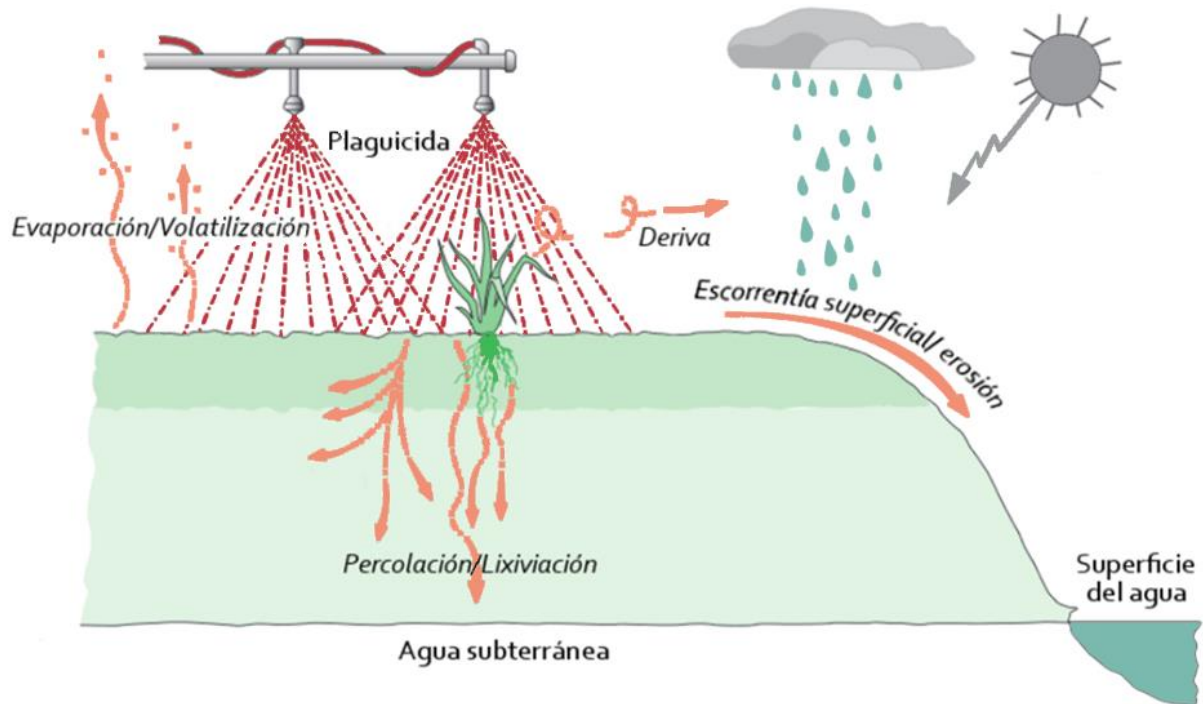


Figura 1.2 Dinámica de plaguicidas en el ambiente. Adaptado de Randall et al. (2008) por Cossi (2019).

Los insecticidas se pueden clasificar de acuerdo a diferentes criterios, dependiendo del foco de interés. Son especialmente relevantes las clasificaciones según su naturaleza química y su modo de acción, ya que determinan los efectos fisiológicos sobre la plaga de interés (IRAC, 2019). Los organoclorados, los organofosforados (OF), los carbamatos, los piretroides y los neonicotinoides, son consideradas las cinco clases químicas principales de insecticidas orgánicos (Newman, 2014). Los insecticidas organoclorados (entre ellos el DDT) se fueron reemplazando por OF y carbamatos debido a la recopilación de evidencias sobre sus efectos tóxicos, su capacidad de ser bioacumulados y biomagnificados en la cadena trófica, su persistencia en el ambiente y el desarrollo de resistencia de los insectos blanco (Newman, 2014). Los OF y carbamatos presentaban mayor degradabilidad y menor persistencia, pero también se comenzaron a reemplazar por otros insecticidas ya que producen mayor toxicidad aguda en mamíferos y los insectos blanco también desarrollaron resistencia (Satoh y Gupta, 2010). Los insecticidas más recientes en la búsqueda de productos

menos persistentes y menos tóxicos para mamíferos son los neonicotinoides (**Figura 1.3**) (Casarett y Doull, 2001; Tankiewicz et al., 2010).

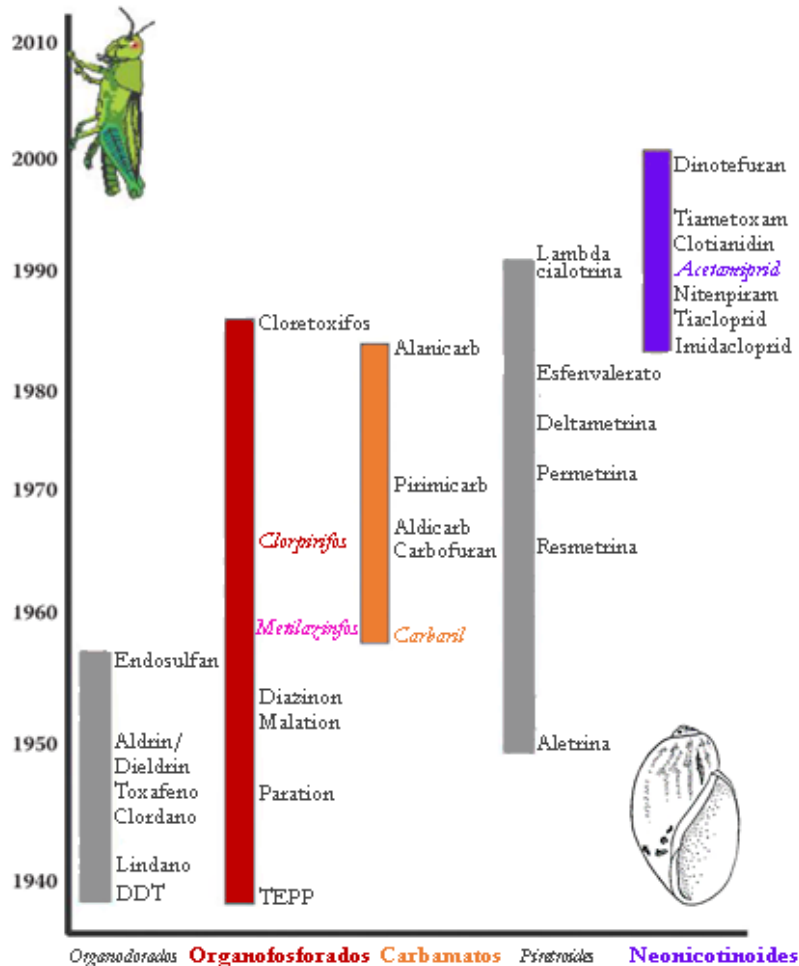


Figura 1.3 Cronología general del desarrollo de las cinco clases químicas principales de insecticidas orgánicos. Adaptado de Newman (2014).

La Agencia de Protección Ambiental de los EE. UU. (*United States Environmental Protection Agency*, US EPA) define modo de acción como una “serie de procesos clave que comienza con la interacción de un plaguicida con un sitio receptor y continua a través de cambios operacionales y anatómicos en un organismo que resultan en efectos letales o subletales” (US EPA, 2000). A partir del modo de acción, los carbamatos y OF se clasifican juntos, dado que ambas clases de insecticidas inhiben a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (**Tabla 1.2**). Los neonicotinoides, por otro lado, son moduladores competitivos del receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR).

Tabla 1.2 Clasificación de las cinco clases químicas principales de insecticidas orgánicos en función de su modo de acción según el *Insect Resistance Action Commitee (IRAC, 2019)*.

Modo de acción primario	Blanco fisiológico	Naturaleza química	Ingredientes activos (ejemplos)
1 Inhibidores de la acetilcolinesteras (AChE)	Nervios y músculos	1A Carbamatos	aldicarb, bendiocarb, benfuracarb, carbaril , carbofuran, carbosulfan, etiofencarb, fenobucarb, formetanato, furatiocarb, isoprocarb, metiocarb, metolcarb, oxamil, pirimicarb, propoxur, tiodicarb, triazamato, trimetacarb, xililcarb
		1B Organofosforados	azametifos, cadusafos, cloretoxifos, clorfenvinfos, clorpirifos , diazinon, diclorvós, dimetoato, etil azinfos, fenitrotión, fosmet, fosfamidon, malatión, mecarbam, metamidofos, metil azinfos , ometoato, paratión, triclofon
3 Moduladores de canales de sodio	Nervios y músculos	3A Piretroides Piretrinas	acrinatrina, bifentrina, bioresmetrina, cicloprotrina, ciflutrina, cialotrina, cipermetrina, <i>alfa</i> -cipermetrina, <i>beta</i> -cipermetrina, deltametrina, esfenvalerato, flumetrina, permetrina, praletrina, piretrinas, resmetrina, silafluofen, tetrametrina, transflutrina
		3B DDT Metoxicloro	DDT; metoxicloro
4 Moduladores competitivos del receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR)	Nervios y músculos	4A Neonicotinoides	acetamiprid , clotianidin, dinotefuran, imidacloprid, nitenpiram, tiacloprid, tiametoxan
		4B Nicotina	nicotina
		4C Sulfoximinas	sulfoxaflor
		4D Butenolidas	flupiradifurona
		4E Mesoionicos	triflumezopirim

En Argentina los insecticidas OF, carbamatos y neonicotinoides son ampliamente utilizados en muchas localidades. Se han detectado residuos de insecticidas de estas clases en distintas matrices (agua, suelo, sedimento y alimentos) y provincias, incluyendo Salta, Chaco,

Tucumán, Misiones, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba, Mendoza, Buenos Aires, La Pampa, Neuquén y Río Negro (Alvarez et al., 2019; Castañé et al., 2015; LIBIQUIMA-CITAAC, 2016; Loewy et al., 2011; Macchi et al., 2018; Sánchez et al., 2016; Tosi et al., 2009; VATOXA, 2018). Por ejemplo, en la región del Valle de Río Negro y Neuquén, Patagonia Norte, predomina el uso de OF como clorpirifos (CPF) y, anteriormente, metilazinfos (MAZ), los carbamatos como carbarilo (CAR) y carbofuran, y los neonicotinoides como tiacloprid y acetamiprid (ACP) (Cichón et al., 2013a; Sánchez et al., 2016). En esta región, la actividad frutihortícola es la segunda actividad económica más importante (Macchi et al., 2018). Allí se produce el 80 y el 90 %, respectivamente, de las manzanas y peras del país, que representan el 50 % de la exportación de frutas, el sexto producto exportado por la Argentina (Sánchez et al., 2016). Además, en los últimos años se han incorporado a la zona la producción de fruta fina, olivos, frutos secos y la horticultura (LIBIQUIMA-CITAAC, 2016). Esta actividad productiva intensiva depende de la aplicación anual, desde septiembre a febrero, de múltiples familias de plaguicidas, principalmente para combatir la carpocapsa (*Cydia pomonella*) (Loewy et al., 2011; Macchi et al., 2018). Originalmente, los piretroides eran los más utilizados para el control de esta plaga, hasta que, a fines del año 2000, se demostró la resistencia de poblaciones de *C. pomonella* a este insecticida y se reemplazó por el OF MAZ (LIBIQUIMA-CITAAC, 2016). Se estima que, desde el año 2000, se aplican 900 toneladas anuales de plaguicidas en la región, el 70 % de las cuales correspondió, hasta la década pasada, a MAZ, seguido por CAR y CPF (Villarreal et al., 2010). Actualmente, el uso de MAZ ha sido reemplazado principalmente por CPF y por otros insecticidas como el ACP, en menores cantidades (LIBIQUIMA-CITAAC, 2016; Loewy et al., 2011). Al monitorear el agua subterránea y superficial de esta región, se ha detectado la presencia de residuos de MAZ, CAR y CPF (Loewy et al., 2011, 1999).

1.1.1 Insecticidas organofosforados

Los OF son ésteres, amidas o derivados de tior de los ácidos fosfórico, fosfónico y fosfínico. La mayoría derivan del ácido fosfórico y presentan un átomo de fósforo con un grupo P=S (tiol) o P=O (oxón), completamente sustituido (**Figura 1.4**) (Gupta, 2006). R1 y R2 generalmente son sustituciones alcoxi (O-Metil o O-Etil) y X es el sustituyente más lábil a la hidrólisis, a la escisión oxidativa, o a ser desplazado en la fosforilación con la enzima blanco, también llamado “grupo saliente” (Galloway y Handy, 2003).

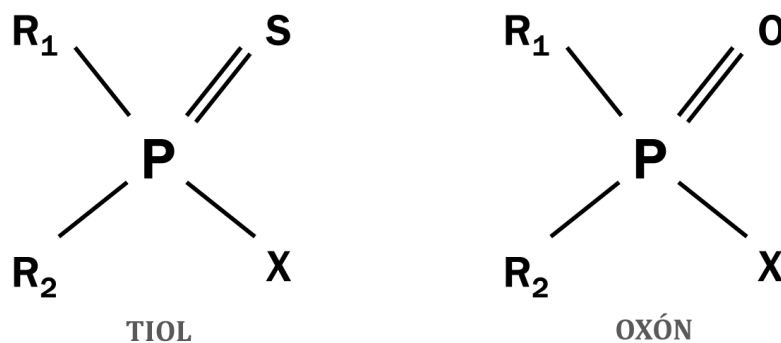


Figura 1.4 Estructura general de los insecticidas organofosforados en sus formas tiol y oxón.

El modo de acción de los insecticidas organofosforados es como agentes neurotóxicos a través de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Galloway y Handy, 2003). Esta enzima es una hidrolasa de serina que cataliza la hidrólisis de ésteres de colina como el neurotransmisor acetilcolina (ACh). La unión de la ACh a la AChE se produce por la interacción con el sitio activo de la AChE, formado por serina (sitio esterásico), histidina y glutamato (Galloway y Handy, 2003). El residuo de serina induce un ataque nucleofílico al carbono del grupo carbonilo de la ACh, la histidina estabiliza el intermediario de serina mediante puentes de hidrógeno y el glutamato cargado negativamente favorece la unión de la porción colina del sustrato cargado positivamente. Durante el ataque enzimático sobre el éster se forma un intermediario tetraédrico que colapsa dando un conjugado de acetil-enzima con la liberación concomitante de colina. La acetil-enzima es lábil a la hidrólisis, lo cual conduce

a la formación de acetato y enzima activa (Casarett y Doull, 2001). La reacción de la AChE con los OF es análoga la de ACh pero, en este caso, la enzima fosforilada (AChE-organofosforado), es más resistente a hidrólisis subsecuentes que la acetil-enzima, por lo que la inhibición de AChE es irreversible (Galloway y Handy, 2003).

En vertebrados, las AChE tienen un rol central en el funcionamiento normal del sistema nervioso central dado que catalizan la hidrólisis de ACh liberada en las terminales nerviosas pre-sinápticas, finalizando el estímulo sináptico que origina la ACh (**Figura 1.5 A, B**). La inhibición de la actividad de AChE provoca la acumulación de ACh en el espacio sináptico, en fibras simpáticas y parasimpáticas y en uniones neuromusculares (**Figura 1.5 C**) (Galloway y Handy, 2003). Esto causa la sobre-estimulación de los receptores colinérgicos (tanto nicotínicos -nAChR- como muscarínicos -mAChR-) y, subsecuentemente, depresión o parálisis de los nervios colinérgicos a través del sistema nervioso central y periférico que, eventualmente, pueden generar fallas respiratorias y la muerte (Costa, 2018). En invertebrados no blanco, esto es similar, pero se han observado efectos neurotóxicos variados por lo que el papel exacto de la ACh en la transmisión neural todavía no se ha determinado (Galloway y Handy, 2003).

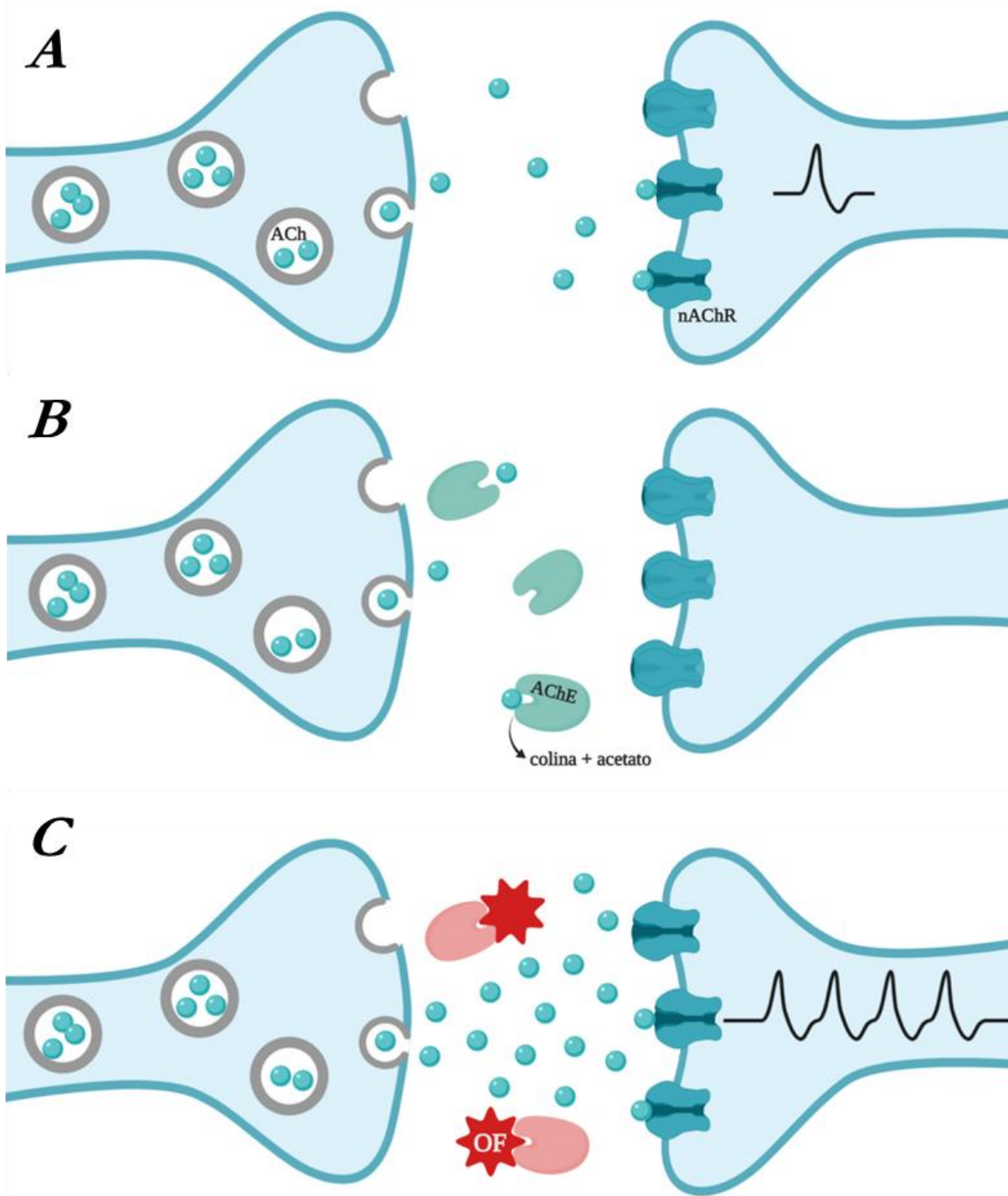


Figura 1.5 Neurotransmisión colinérgica normal y mecanismo de acción de insecticidas organofosforados. *A* El neurotransmisor acetilcolina (ACh) es liberado de la membrana pre-sináptica. Al unirse a los receptores colinérgicos (nAChR cuando son nicotínicos) en la membrana post-sináptica neuronal o muscular, genera un estímulo sináptico. *B* La enzima acetilcolinesterasa (AChE) detiene el estímulo, catalizando la hidrólisis de ACh en acetato y colina. *C* Los insecticidas organofosforados (OF), como metilazinfos (MAZ) y clorpirifos (CPF), inhiben AChE impidiendo la hidrólisis de ACh, lo que causa su acumulación en el espacio sináptico y la excitación prolongada del impulso nervioso post-sináptico. Esta unión es irreversible.

Si bien todos los OF comparten un mismo modo de acción, tienen efectos toxicológicos diversos, desde compuestos excepcionalmente tóxicos a otros para los cuales prácticamente no se ha encontrado evidencia de toxicidad (Galloway y Handy, 2003). La mayoría de los organofosforados son tiones, contienen un átomo de azufre unido al fósforo (P=S), ya que en esta forma son más resistentes a la degradación y atraviesan más fácilmente las membranas que los oxones. En su forma tión, son inhibidores pobres de la AChE y requieren de un proceso de activación metabólica para formar el oxón derivado (P=O) y poder unirse a la enzima. En la forma oxón, son potentes inhibidores de AChE y altamente reactivos, por lo que también pueden alterar la función de otras proteínas y enzimas (Pope et al., 2005). La activación metabólica, o biotransformación, de los OF tiones a su forma oxónica por parte de los organismos requiere de una desulfuración oxidativa, generalmente catalizada por oxidasas citocromo P450 (CYP) (Casarett y Doull, 2001; Costa, 2018; Mora et al., 2000). El metabolismo de los OF es complejo, e involucra diferentes enzimas y vías enzimáticas que determinan un balance entre activación y detoxificación particular para cada especie y, como consecuencia, efectos y sensibilidades muy variables (Galloway y Handy, 2003). Además de los efectos agudos neurotóxicos esperables, los OF pueden tener otros efectos indirectos, como interferencias en el desarrollo neurológico, la diferenciación y proliferación celular, y sobre respuestas del sistema inmune (Galloway y Handy, 2003).

Metilazinfos (MAZ)

MAZ es un tiofosfato orgánico que deriva de una 1,2,3-benzotriazina sustituida por un grupo oxo en la posición 4 y un grupo [(dimetoxifosforotioil)sulfanil]metil en la posición 3 cuyo nombre IUPAC es O,O-Dimetil S-[(4-oxo-1,2,3-benzotriazina-3(4H)-il)metil] fosforoditioato (**Figura 1.6**) (PubChem, 2019a; US EPA, 2019a). Al ser un organotiofosfato, requiere de una activación metabólica al oxón derivado (metilazinfos-oxón) para ejercer actividad anticolinesterásica.

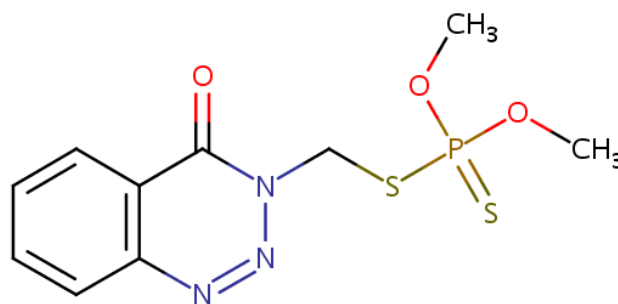


Figura 1.6 Estructura química del insecticida MAZ. Reproducido de US EPA (2019a).

En cuanto a sus propiedades físico químicas y toxicológicas (**Tabla 1.3;** subsección 1.1.4), MAZ tiene baja solubilidad en agua y alta en solventes orgánicos, volatilidad despreciable, bajo potencial de bioacumulación, es susceptible a la hidrólisis y a la degradación por temperaturas elevadas y exposición a la luz (PubChem, 2019a; US EPA, 2019a). La exposición aguda a MAZ es altamente tóxica para aves, abejas y anfibios y muy tóxica para mamíferos, peces e invertebrados de agua dulce (PubChem, 2019a; US EPA, 2019a).

Debido a su alta toxicidad aguda, en Argentina se prohibió su elaboración, importación y fraccionamiento a partir del 1 de julio de 2016, y su uso y comercialización a partir del 31 de marzo de 2017, según resolución 149/2016 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA, 2016). Hasta el momento de su retiro del mercado, además de para el control de *C. pomonella* en pera y manzana, se utilizaba en cultivos de frutales de carozo (duraznero, ciruelo, cerezo y damasco), nogales, y también contra el bicho de cesto, y psílidos (CASAFE, 2011).

El valor guía⁴ de MAZ para la protección de la vida acuática nacional es $\leq 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2003). Sin embargo, (Loewy et al., 2011, 1999) detectaron concentraciones máximas de MAZ de $79,30 \mu\text{g L}^{-1}$ (entre 1995 y 1997) y de $22,48 \mu\text{g L}^{-1}$ (entre 2008 y 2010) en aguas subterráneas del Alto Valle de Río Negro y

⁴ Concentración límite de ciertos compuestos tóxicos que se considera permite proteger a organismos acuáticos o mantener un cuerpo de agua para un uso específico (Morales, 2004).

Neuquén. Por su parte, entre 2008 y 2011 en la misma región, (Macchi et al., 2018) detectaron la presencia de MAZ en canales de drenaje habitados por macroinvertebrados acuáticos, en concentraciones de hasta $1,02 \mu\text{g L}^{-1}$. Tosi et al. (2009) registraron, en la misma región, concentraciones máximas de MAZ de $2,05 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,77 \mu\text{g L}^{-1}$ y $1,19 \mu\text{g L}^{-1}$ en muestras de agua de descargas de efluentes, canales de drenaje y río, respectivamente. En otras partes del mundo, se han reportado concentraciones de órdenes de magnitud mucho mayores, que alcanzaron en un caso los $3000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Mazandarán, Irán) (Shayeghi et al., 2001).

Clorpirifos (CPF)

CPF es un tiofosfato orgánico que deriva de un O,O-dietil hidrogeno fosforotioato en el cual el hidrógeno del grupo hidroxilo se encuentra sustituido por un grupo 3,5,6-tricloropiridin-2-il cuyo nombre IUPAC es O,O-Dietil O-(3,5,6-tricloropiridin-2-il) fosforotioato (**Figura 1.7**) (PubChem, 2019b; US EPA, 2019b). Como MAZ, es un organotiofosfato y también depende de una activación metabólica al oxón derivado (clorpirifos-oxón) para ejercer actividad anti-colinesterásica.

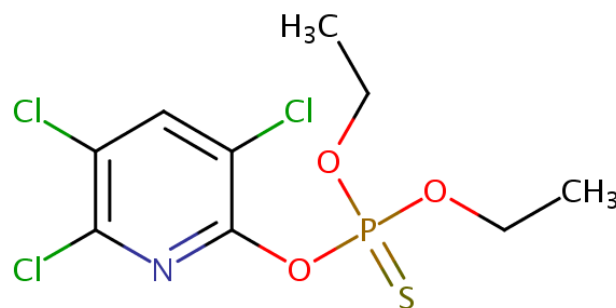


Figura 1.7 Estructura química del insecticida CPF. Reproducido de US EPA (2019b).

Algunas de sus propiedades físico químicas y toxicológicas se detallan en la **Tabla 1.3**; (subsección 1.1.4): baja solubilidad en agua y alta en solventes orgánicos, alta volatilidad, bajo potencial de bioacumulación, baja susceptibilidad a la hidrólisis y alta susceptibilidad a

la degradación por temperaturas elevadas y exposición a la luz (PubChem, 2019b; US EPA, 2019b). De forma aguda, es tóxico para aves en mayor grado que para la mayoría de los mamíferos, y es extremadamente tóxico para peces, organismos acuáticos y abejas (PubChem, 2019b; US EPA, 2019b).

CPF está recomendado en Argentina para el control de plagas como *C. pomonella*, bicho de cesto, psílido, cochinilla harinosa, chicharrita, piojo de San José, y pulgón lanífero, en pera y manzana y otros frutales de pepita (Cichón et al., 2017a). También se utiliza en cultivos hortícolas para gusanos cortadores, mosca de la semilla, gusano de suelo, gorgojos, y como insecticida de amplio espectro, para ajo, alcaucil, brócoli, cebolla, coliflor, haba, maíz, papa, batata, pimiento, repollo, tomate (Cichón et al., 2017b). En 2012, CPF era el principal principio activo de los insecticidas consumidos en el país (CASAFE, 2012).

Para CPF, el valor guía nacional para la protección de la vida acuática es $0,006 \mu\text{g L}^{-1}$ (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005a). En la región de Patagonia Norte, fue el insecticida detectado con mayor frecuencia (76 %), en concentraciones máximas de $1,45 \mu\text{g L}^{-1}$, que superan ampliamente el valor guía (Loewy et al., 2011, 1999). En otras zonas del mundo, se han registrado concentraciones de hasta $26,6 \mu\text{g L}^{-1}$ en aguas superficiales (Otieno et al., 2012).

1.1.2 Insecticidas carbamatos

Los carbamatos son ésteres del ácido carbámico que tienen un grupo carbonilo central completamente sustituido (**Figura 1.8**). X es el grupo saliente, R es un radical orgánico o un metal; R_1 y R_2 generalmente son radicales orgánicos, pero también pueden ser hidrógenos. Cuando R_2 es un hidrógeno y R_1 es un metilo, el carbamato tiene propiedades insecticidas. Si R_2 es un hidrógeno y R_1 es aromático, tiene propiedades herbicidas; y si R_1 es un benzimidazol, actúa como fungicida (Gupta, 2014).

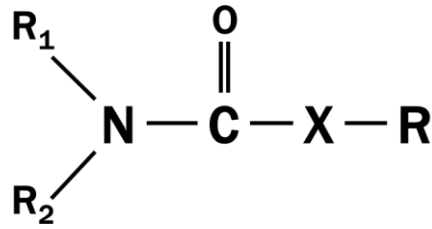


Figura 1.8 Estructura general de los insecticidas carbamatos.

El modo de acción de los insecticidas carbamatos es la inhibición de la enzima AChE y la subsecuente sobre estimulación de los receptores colinérgicos post-sinápticos, al igual que los OF (**Figura 1.5**). La diferencia radica en que para los carbamatos, la unión a la enzima es reversible y en la mayoría de los casos no requiere de un proceso de activación metabólica (Satoh y Gupta, 2010). Los insecticidas carbamatos son utilizados a nivel mundial principalmente en el ámbito agrícola y en el ámbito veterinario como antiparasitarios (Satoh y Gupta, 2010).

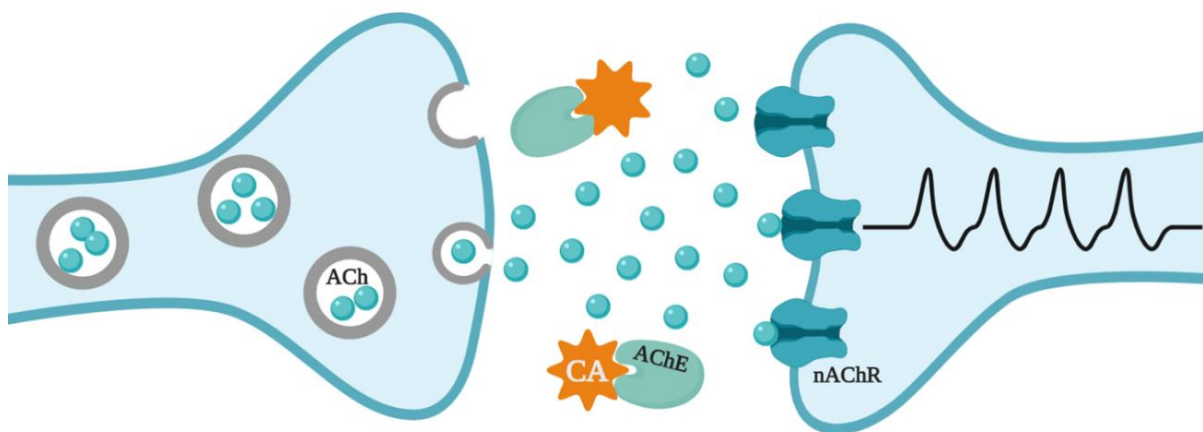


Figura 1.9 Mecanismo de acción de insecticidas carbamatos. Los insecticidas carbamatos (CB), como carbarilo (CAR) inhiben AChE impidiendo la hidrólisis de ACh, lo que causa su acumulación en el espacio sináptico y la excitación prolongada del impulso nervioso post-sináptico. A diferencia de los organofosforados, esta unión es reversible.

Carbarilo (CAR)

CAR se obtiene por la condensación formal de 1-naftol con ácido metilcarbámico (Figura 1.10); nombre IUPAC: naftaleno-1-il metilcarbamato (PubChem, 2019c; US EPA, 2019c).

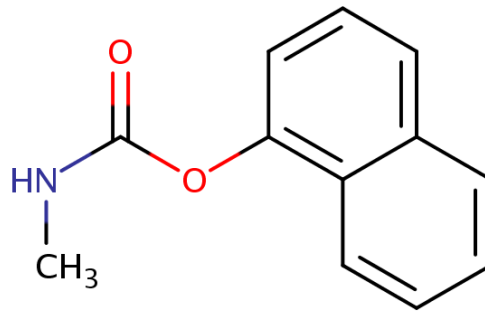


Figura 1.10 Estructura química del insecticida CAR. Reproducido de US EPA (2019c).

Este insecticida presenta baja solubilidad en agua, alta en solventes orgánicos, baja volatilidad, bajo potencial de bioacumulación, moderada susceptibilidad a la hidrólisis y a la fotólisis (Tabla 1.3; subsección 1.1.4) (PubChem, 2019c; US EPA, 2019c). Su toxicidad aguda es alta para invertebrados de agua dulce, extremada para abejas y peces de agua dulce, moderada para mamíferos, prácticamente nula para aves (PubChem, 2019c; US EPA, 2019c).

La EPA ha registrado los siguientes usos de CAR: en el control de plagas de cultivos de frutas, nueces, vegetales y granos; en jardinería para el cuidado de flores y plantas ornamentales; y en el cuidado de pastos en invernaderos, plantas de producción y canchas de golf (US EPA, 2008). Otros usos comunes son para el control de crustáceos predadores de mariscos y de malezas acuáticas en bahías y estuarios (Matos et al., 2007). En Argentina, SENASA aprobó su uso para una variedad de plagas y cultivos: lepidópteros, hemípteros y coleópteros en cultivos de algodón, avena, cebada, centeno, trigo, arroz, hortalizas, maíz, sorgo, tabaco, frutilla y frutales (cerezo, ciruelo, damasco, durazno, guindo y olivo). También está aprobado el uso para forestales y raleado de manzanos y perales (Cichón et al., 2013b; Curetti, 2017).

El nivel guía nacional para protección de la vida acuática para CAR, es $0,050 \mu\text{g L}^{-1}$ (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005b). En el Valle del Río Negro y Neuquén, Loewy et al. (2011) informaron una concentración máxima de $48 \mu\text{g L}^{-1}$ en aguas subterráneas y superficiales durante el período de aplicación, y Macchi et al. (2018), concentraciones de $1,45 \mu\text{g L}^{-1}$ en canales de drenaje. En EEUU, se han registrado concentraciones de CAR de $1700 \mu\text{g L}^{-1}$, aproximadamente, en canales de drenaje adyacentes a sitios donde se aplicó el insecticida, poco tiempo después de su aplicación (Walters et al., 2003).

1.1.3 Insecticidas neonicotinoides

Los neonicotinoides surgieron como resultado del desarrollo de insecticidas nicotínicos que tuvieran alta afinidad por los receptores nAChR de insectos (Ishaaya, 2001). Los insecticidas neonicotinoides actuales derivan de la nicotina y se componen de un grupo heterocíclico, un grupo farmacóforo, y distintos sustituyentes según si la estructura es de cíclica (imidacloprid, tiacloprid, y tiametoxan) o de cadena abierta (nitenpiram, acetamiprid, clotianidina, y dinotefuran) (Ishaaya, 2001). El farmacóforo se identifica como $[-\text{N}-\text{C}(\text{Z}) = \text{X}-\text{Y}]$, donde X-Y es un grupo captador de electrones y Z puede ser un sustituyente NH, NR', CH₂, O o S. Tiene una influencia importante sobre la actividad como insecticida, sobre propiedades físico químicas como la estabilidad a la fotólisis y a la degradación en suelo, y sobre la toxicidad de los neonicotinoides (Ishaaya, 2001). Por lo tanto, otra clasificación importante de los neonicotinoides es según su su farmacóforo: N-nitroguanidinas (imidacloprid, tiametoxan, clotianidina y dinotefuran), nitrometilenos (nitenpiram) y N-cianoamidinas (acetamiprid y tiacloprid) (**Figura 1.11**) (Jeschke et al., 2011).

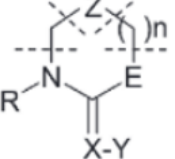
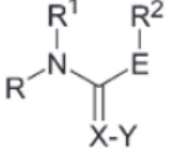
 <p>Neonicotinoides cíclicos</p>	<p>a Imidacloprid b Tiacloprid c Tiametoxan</p>	<p>R = CPM, n = 0, Z = CH₂, E = NH, X-Y = NNO₂ R = CPM, n = 0, Z = CH₂, E = S, X-Y = NCN R = CTM, n = 1, Z = O, E = NMe, X-Y = NNO₂</p>
 <p>Neonicotinoides de cadena abierta</p>	<p>d Nitenpiram e Acetamiprid f Clotianidina g Dinotefuran</p>	<p>R = CPM; R¹ = Et, E-R² = NHMe, X-Y = CHNO₂ R = CPM; R¹ = Me, E-R² = Me, X-Y = NCN R = CTM; R¹ = H, E-R² = NHMe, X-Y = NNO₂ R = TFM; R¹ = H, E-R² = NHMe, X-Y = NNO₂</p>

Figura 1.11 Estructura química de insecticidas neonicotinoides (a-c) cíclicos y (d-g) de cadena abierta. Me: metilo; Et: etilo; CPM: 6-cloro-pirid-3-ilmetil; CTM: 2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil; TFM: (±)-6-tetrahidrofuran-3-ilmetil. Adaptado de Jeschke et al. (2011) por Cossi (2019).

El modo de acción de estos insecticidas es a través de la unión agonista a los nAChR post-sinápticos del sistema nervioso central de los insectos (Ishaaya, 2001; Raby et al., 2018). No pueden ser hidrolizados por la AChE y la unión al receptor es irreversible. De este modo, compiten con el neurotransmisor natural ACh y generan una estimulación nerviosa constante, que lleva a la parálisis seguida de muerte u otros efectos tóxicos (**Figura 1.12**) (Cresswell, 2011; Morrissey et al., 2015; Raby et al., 2018). Tienen alta afinidad por los nAChR de insectos, en contraste con los de vertebrados, lo que les da mayor selectividad para estas plagas (Ishaaya, 2001). Esta afinidad está dada por la electronegatividad del farmacóforo nitro o ciano que se une a un sub-sitio catiónico único del receptor nicotínico de los insectos (Tomizawa y Casida, 2005). Dentro de los organismos, pueden ser biotransformados tanto por oxidaciones como por reducciones a través de mecanismos de activación y detoxificación (Tomizawa y Casida, 2005).

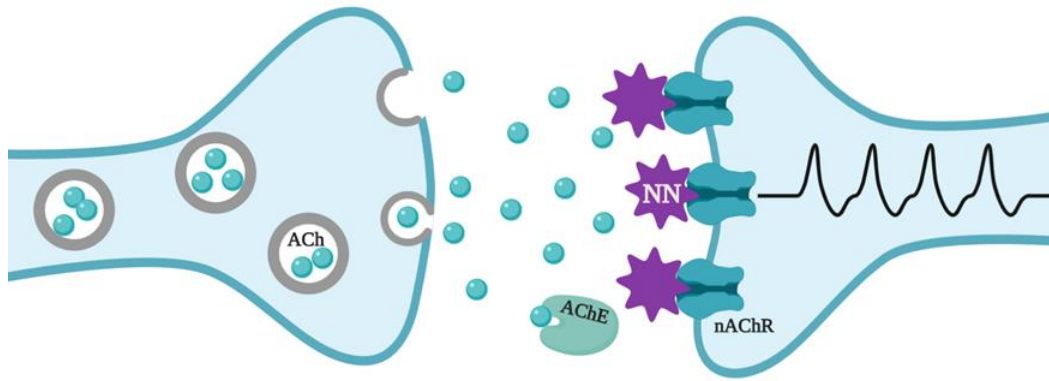


Figura 1.12 Mecanismo de acción de insecticidas neonicotinoides. Los insecticidas neonicotinoides (NN), como acetamiprid (ACP), se unen de manera agonista a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) causando la excitación prolongada del impulso nervioso post-sináptico.

Los neonicotinoides presentan ciertas características que los colocaron rápidamente entre los compuestos químicos más importantes para la protección de cultivos (Cresswell, 2011; Morrissey et al., 2015). Su afinidad selectiva por los nAChR de insectos los hace extremadamente efectivos como insecticidas y, además, les confiere baja toxicidad aguda para mamíferos y peces (Morrissey et al., 2015). Además, su alta solubilidad en agua facilita su aplicación (Cresswell, 2011). Hoy en día, los neonicotinoides representan la clase de insecticidas más vendida y utilizada en el mercado global (Simon-Delso et al., 2015). Tienen un amplio espectro de usos, desde el control de plagas succionadoras, como los áfidos y los tisanópteros, en cultivos de algodón, papa, maíz, tabaco, y hortalizas, hasta el uso veterinario para controlar pulgas en gatos y perros. También se utilizan en el ámbito doméstico para desinsectar jardines o eliminar termitas y hormigas (Kohl, 2015; Tomizawa y Casida, 2005).

Su uso masivo, alta solubilidad en agua y relativa persistencia en el ambiente, han generado que se detecten residuos de neonicotinoides con frecuencia en aguas superficiales cercanas a áreas cultivadas (Raby et al., 2018). Sin embargo, en la mayoría de los países todavía se cuenta con escasos recursos de monitoreo ambiental para estos insecticidas en aguas superficiales y, hasta hace relativamente poco, las técnicas analíticas no contaban con la sensibilidad necesaria para cuantificar las concentraciones encontradas (en promedio en ng L^{-1} , con concentraciones máximas en $\mu\text{g L}^{-1}$) (Morrissey et al., 2015). Aun así, algunos

países han desarrollado guías para la protección de la biota acuática, con valores que van desde los 0,0083 a los 1,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ y distintos estudios han reportado concentraciones en el campo que superan estas guías, dentro de intervalos de 44,1 a 320 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Prosser et al., 2016).

Últimamente, la preocupación sobre los efectos extremadamente tóxicos de algunos neonicotinoides sobre especies emblemáticas como las abejas y los abejorros han generado gran preocupación pública y llevado a restricciones gubernamentales en Francia y en Alemania (Cresswell, 2011). En el ambiente acuático, algunos estudios sugieren que muchos invertebrados son considerablemente sensibles a los neonicotinoides, y que su presencia causa la declinación de la abundancia de macroinvertebrados y cambios en la composición de especies (Morrissey et al., 2015; Vehovszky et al., 2015). En moluscos, por ejemplo, se han observado diferentes efectos sobre la actividad de AChE (Prosser et al., 2016). En 2018, el servicio de ciencia y conocimiento de la Comisión Europea, incluyó a los neonicotinoides dentro de su lista de observación de sustancias que deben ser monitoreadas cuidadosamente por los países miembros de la UE, para evaluar el riesgo que representan para el ambiente acuático y considerar si se deberían definir normativas de calidad ambientales para ellas (Comisión Europea, 2018).

Acetamiprid (ACP)

ACP corresponde al grupo de las N-cianoamidinas de cadena abierta; una acetamidina en la cual los hidrógenos amino se encuentran sustituidos por un grupo (6-cloropiridin-3-il)metil y un grupo metilo, mientras que el hidrógeno acoplado al nitrógeno imino se encuentra sustituido por un grupo ciano (**Figura 1.13**) (PubChem, 2019d). Su nombre IUPAC es (1E)-N-[(6-Cloropiridin-3-il) metil]-N'-ciano-N-metiletanimidamida.

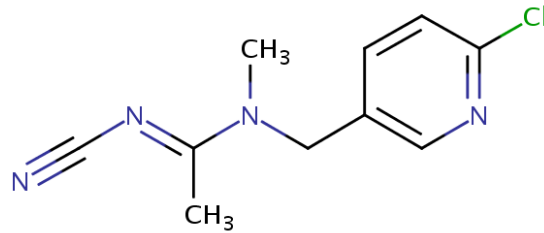


Figura 1.13 Estructura química del insecticida ACP. Reproducido de US EPA (2019d).

ACP es altamente soluble en agua y moderadamente en solventes orgánicos, tiene una volatilidad despreciable, posee un bajo potencial de bioacumulación, es estable a la hidrólisis y tiene baja susceptibilidad a la fotólisis (**Tabla 1.3**; subsección 1.1.4) (PubChem, 2019d; US EPA, 2019d). No se han reportado metabolitos tóxicos producto de la degradación de ACP en agua por hidrólisis ni fotólisis (Morrissey et al., 2015). En exposiciones agudas, es muy tóxico para algunos invertebrados acuáticos, moderadamente tóxico para mamíferos, aves, abejas y moluscos y prácticamente no tóxico para peces (US EPA, 2019d).

En Argentina, ACP está recomendado para el control de la arañuela en manzana, y la arañuela roja y el psílido del peral en pera (Cichón et al., 2017a). También se utiliza para controlar la mosca blanca y el pulgón, en cultivos de acelga, achicoria, albahaca, berro, escarola, espinaca, lechuga, papa, pimiento, poroto, radicheta, rúcula y tomate (Cichón et al., 2017b).

En nuestro país no existen valores guía para la protección de la vida acuática para este insecticida (L. Pertusi, comunicación personal, 2017, Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación) y, de nuestro conocimiento, aún no hay trabajos publicados que reporten concentraciones ambientales de ACP. En EE. UU., la EPA ha establecido $10,5 \mu\text{g L}^{-1}$ como nivel guía agudo para la biota acuática para ACP (Raby et al., 2018) si bien también en el mismo país se han detectado concentraciones de ACP mayores que este valor, hasta $44,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Anderson et al., 2013). Este insecticida es persistente a tratamientos biológicos, y se ha detectado en descargas de plantas de tratamiento de efluentes en concentraciones entre $0,050$ y $16 \mu\text{g L}^{-1}$ (Carra et al., 2014).

1.1.4 Propiedades físico químicas y toxicológicas de los insecticidas estudiados en esta tesis

Tabla 1.3 Propiedades físico químicas y toxicológicas los insecticidas MAZ, CPF, CAR y ACP.

	<i>Metilazinfos</i> [*]	<i>Clorpirifos</i>	<i>Carbarilo</i>	<i>Acetamiprid</i>
Clase	Organofosforado	Organofosforado	Carbamato	Neonicotinoide
Modo de acción	Inhibidor irreversible de acetilcolinesterasa	Inhibidor irreversible de acetilcolinesterasa	Inhibidor reversible de acetilcolinesterasa	Agonista de receptores nicotínicos de acetilcolina
Uso	En manzana y pera para el control de carpocasa, bicho de cesto, psílido	En manzana y pera para el control de carpocasa, chicharrita, psílido	En manzana para el raleo químico	En manzana y pera para el control de arañuela, psílido del peral, chicharrita
Solubilidad en agua (20 °C; µg L ⁻¹)	Baja (< 100)	Baja (< 100)	Baja (< 100)	Excelente (≥ 1000)
Volatilidad (Presión de vapor; 20 °C; mPa)	Baja (5 x 10 ⁻⁴)	Baja (0,0024)	Baja (0,0416)	Baja (1,73 x 10 ⁻⁴)
Fotólisis (Vida _{1/2} ; 20 °C; pH 7)	3 días	4,2 días	10 días	34 días
Hidrólisis (Vida _{1/2} ; 20 °C; pH 7)	50 días	53 días	12 días	Estable
log Kow (20 °C; pH 7)	2,96	4,69	2,36	0,8
Máxima concentración en agua en Argentina	79,30 µg L ⁻¹ ^a	1,16 µg L ⁻¹ ^a	48 µg L ⁻¹ ^a	No se encontraron registros
Máxima concentración en agua en el mundo	3.000 µg L ⁻¹ ^b	26,6 µg L ⁻¹ ^c	1.700 µg L ⁻¹ ^d	44,1 µg L ⁻¹ ^e
Nivel guía nacional protección biota acuática	0,02 µg L ⁻¹ ^f	0,006 µg L ⁻¹ ^g	0,05 µg L ⁻¹ ^h	Sin determinar

* Prohibido en Argentina por resolución 149/2016 de SENASA. ^a Loewy et al. (2011); ^b Shayeghi et al. (2001); ^c Otieno et al. (2012); ^d Walters et al. (2003); ^e Anderson et al. (2013); ^{f, g, h} Subsecretaría de recursos hídricos de la nación (2000, 2005, 2005). Datos físico químicos tomados de PubChem (2019) y base de datos Comptox de U.S. EPA (2019).

1.2 Herramientas de la ecotoxicología

La ecotoxicología puede definirse en pocas palabras como “la ciencia de los contaminantes en la biosfera y sus efectos sobre los constituyentes de la biosfera, incluyendo a los humanos” (Newman, 2014). La definición y los límites de la ecotoxicología se han modificado a lo largo de los años, a medida que se diferenció de la toxicología clásica, se abordaron nuevos desafíos ambientales e incorporaron nuevos objetivos (**Tabla 1.4**).

Tabla 1.4 Definiciones de la ecotoxicología a lo largo de los años. Adaptado de Newman (2014).

Definición de Ecotoxicología	Referencia
La rama de la toxicología que se ocupa del estudio de los efectos tóxicos, causados por contaminantes naturales y sintéticos, a los constituyentes de los ecosistemas, animales (incluyendo humanos), vegetales y microbianos, en un contexto integrado.	Truhaut (1977)
Extensión natural de la toxicología, la ciencia de los venenos sobre los organismos individuales, hacia los efectos ecológicos de los contaminantes.	Moriarty (1983)
La ciencia que busca predecir los impactos de compuestos químicos sobre los ecosistemas.	Levin et al. (1989)
El estudio del destino y el efecto de los agentes tóxicos en los ecosistemas.	Cairns and Mount (1990)
La ciencia de las sustancias tóxicas en el ambiente y su impacto sobre organismos vivos.	Jorgensen (1990)
El estudio de los efectos tóxicos sobre organismos, poblaciones y comunidades no humanas.	Suter (1993)
El estudio del destino y el efecto de un compuesto tóxico sobre un ecosistema.	Shane (1994)
El campo de estudio que integra los efectos ecológicos y toxicológicos de contaminantes químicos sobre poblaciones, comunidades y ecosistemas con el destino (transporte, transformación y degradación) de estos contaminantes en el ambiente.	Forbes and Forbes (1994)
La ciencia de predecir los efectos de agentes potencialmente tóxicos sobre ecosistemas naturales y especies no blanco.	Hoffman et al. (1995)
El estudio de las vías de exposición, adsorción y los efectos de agentes químicos sobre organismos, poblaciones, comunidades, y ecosistemas.	Connell (1990)
El estudio de los efectos nocivos de compuestos químicos sobre ecosistemas; los efectos nocivos de los compuestos químicos (toxicología) dentro del contexto de la ecología.	Walker et al. (2001)
El estudio de los efectos nocivos de compuestos químicos sobre ecosistemas e incluye los efectos sobre individuos y los efectos consecuentes a niveles poblacionales y superiores	Walker et al. (2012)
La ciencia de los contaminantes en la biosfera y sus efectos sobre los constituyentes de la biosfera, incluyendo a los humanos	Newman et al. (2014)

Es una ciencia relativamente joven que integra, y continuamente incorpora, diferentes disciplinas, con enfoques y metodologías particulares, como química inorgánica, química

biológica, fisiología, geología, inmunología, ecología de poblaciones y de comunidades. La integración de esta variedad de perspectivas presenta la ventaja de poder abarcar objetivos diferentes y así abordar aspectos complementarios de una misma problemática. Newman (2014) identifica tres grandes objetivos que se solapan continuamente en las preguntas que aborda la ecotoxicología: el científico, el tecnológico y el práctico. Un ejemplo de esta interacción pueden ser los niveles guía para la protección de la biota acuática: el conocimiento científico experimental sobre los modos de acción y los efectos de los compuestos es utilizado por las entidades reguladoras, con un objetivo aplicado, para desarrollar criterios y establecer estándares legales para estos compuestos, que luego pueden ser revisados frente a nueva evidencia científica (Newman, 2014). Esta integración es posible a través del uso de conceptos y herramientas comunes, en su mayoría derivadas de la toxicología clásica, además de las metodologías específicas de cada disciplina (Newman, 2014). Algunas herramientas ecotoxicológicas principales son los biomarcadores, los bioensayos y las especies bioindicadoras.

1.2.1 Biomarcadores

Un mismo contaminante puede tener una variedad verdaderamente amplia de efectos. En las décadas de 1960 y 1970, la letalidad aguda era el efecto de mayor preocupación para la toxicología acuática y ambiental, y los efectos subletales, más sutiles, eran considerados de importancia secundaria (Newman, 2014). En los años 1970 y posteriores, creció la evidencia de que las concentraciones que se determinaba que causaban letalidad frecuentemente excedían las concentraciones relevadas o esperadas en el ambiente (Sparling, 2016). Además, se encontró que concentraciones mucho más bajas podían tener efectos subletales⁵ que podían eventualmente, o indirectamente, llevar a la muerte de los organismos (Casarett y Doull,

⁵ Efectos que ocurren a concentraciones o dosis por debajo de aquellas que producen muerte somática directa (Newman, 2014).

2001; Newman, 2014; Sparling, 2016). Actualmente, está ampliamente aceptado que, para lograr una mejor evaluación del impacto de un contaminante sobre el ambiente, es importante contemplar efectos a diferentes niveles (Amiard-Triquet et al., 2015; Sparling, 2016). Por ejemplo, los insecticidas OF pueden tener efectos en un organismo a nivel bioquímico, que afecten eventualmente a su supervivencia y, a su vez, tengan consecuencias poblacionales que modifiquen la estructura de las comunidades de macroinvertebrados (Macchi et al., 2018). Cada nivel de organización biológica responde de manera particular y contribuye de distinto modo al entendimiento global de la toxicidad de un compuesto (Amiard-Triquet et al., 2015; Newman, 2014). En general, las respuestas bioquímicas tienden a ser más específicas, sensibles y a detectarse más rápidamente, pero su relevancia ecológica tiende a ser menor que las respuestas a otros niveles (**Figura 1.14**).

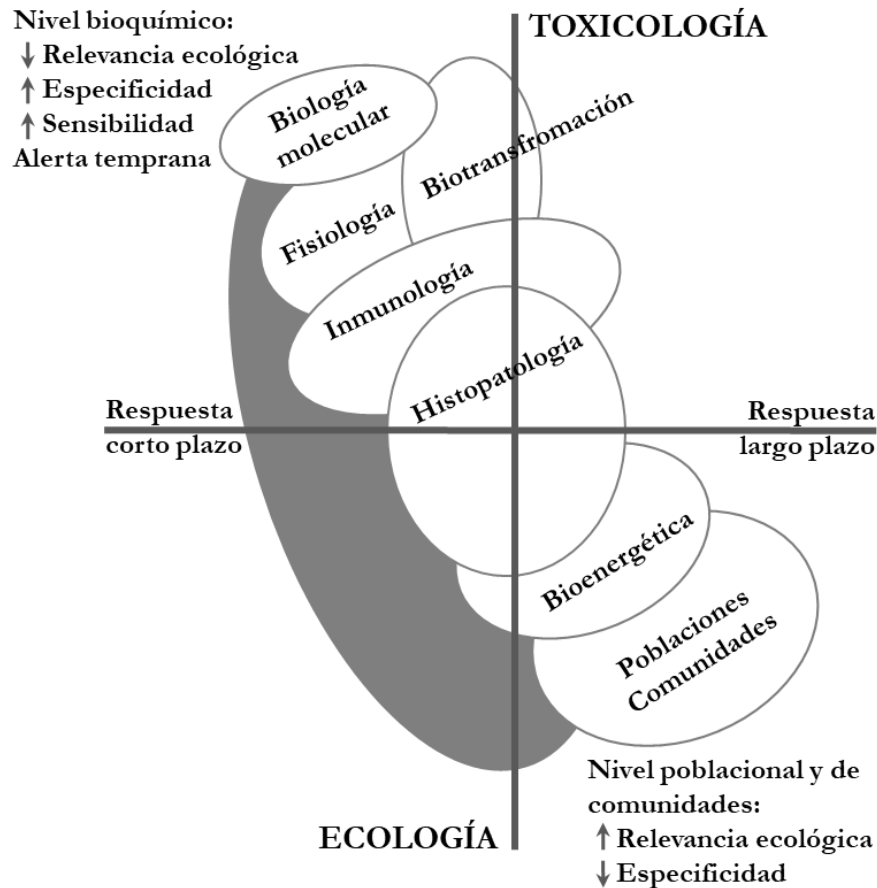


Figura 1.14 Características temporales y ecológicas de las respuestas de diferentes niveles de organización biológica ante el impacto ambiental de, por ejemplo, insecticidas. Adaptado de Amiard-Triquet et al. (2015).

Los biomarcadores se pueden definir como respuestas “bioquímicas, celulares, fisiológicas o comportamentales que pueden ser medidas en tejidos, muestras de fluidos corporales o a nivel de organismos enteros, que proveen evidencia de exposición a y/o efectos de, uno más contaminantes químicos (y/o radiación)” (Depledge, 1994) (**Figura 1.15**). Son considerados índices tempranos y sensibles de estrés químico (particularmente los que se detectan a niveles bajos de organización) y también pueden indicar que ocurrió una exposición durante una cantidad de tiempo y a una cantidad de tóxico suficiente como para generar una respuesta o un efecto (Amiard-Triquet et al., 2015; Newman, 2014). Dentro de la gran variedad de biomarcadores, además de los bioquímicos, se recomienda incorporar otros directamente relacionados con el bienestar de los individuos y la supervivencia de las

especies, como aquellos relacionados con alteraciones en el comportamiento, el sistema nervioso, el sistema inmune, o la reproducción (Amiard-Triquet et al., 2015).

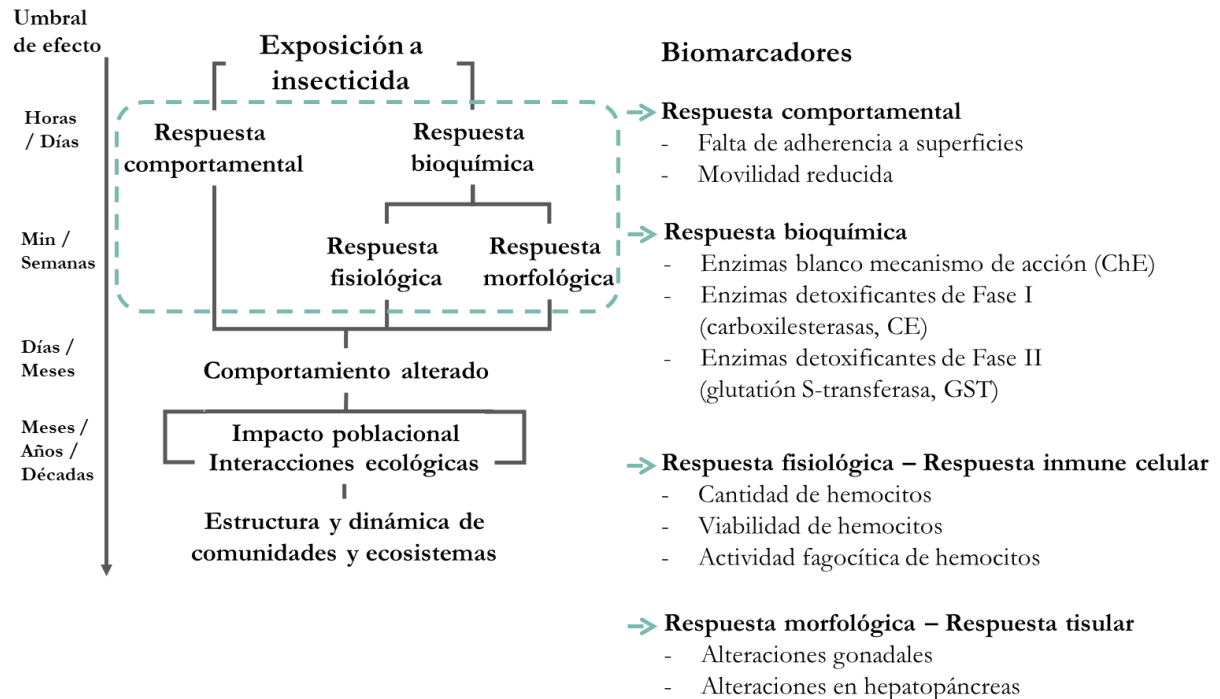


Figura 1.15 Ejemplos de biomarcadores utilizados comúnmente para evaluar respuestas a la exposición a insecticidas a diferentes escalas biológicas y temporales. Adaptado de Boudou y Ribeyre (1997).

Biomarcadores bioquímicos

Los biomarcadores bioquímicos son algunos de los más utilizados rutinariamente para evaluar los efectos de insecticidas, en gran parte debido a que pueden ser más sensibles, específicos y de alerta temprana que otros biomarcadores. Por otro lado, conocer los efectos a nivel bioquímico puede ayudar a explicar efectos observados en otros niveles de organización (Newman, 2014). Además, entender los mecanismos bioquímicos permite predecir, con menor grado de incertidumbre, los efectos de insecticidas que no han sido evaluados, pero que comparten modos de acción (Newman, 2014). Dentro de este tipo de biomarcadores, las enzimas B-esterasas -colinesterasas (ChE) y carboxilesterasas (CE)- y glutación S-transferasas (GST) son de especial relevancia.

Las esterasas son un grupo extenso de enzimas capaces de hidrolizar ésteres, tanto exógenos como endógenos, que difieren en su especificidad por el sustrato, su estructura proteica y su función biológica (Sato y Gupta, 2010; Wheelock et al., 2008). Aldridge (1953) clasificó a las B-esterasas como aquellas que son inhibidas por compuestos OF. Entre las B-esterasas, las ChE y las CE son utilizadas ampliamente en toxicología y ecotoxicología en una gran diversidad de especies, debido a que son el blanco del mecanismo de acción (ChE) y participan en la detoxificación (CE) de muchos insecticidas.

Las ChE son el biomarcador más utilizado para estudiar la exposición a OF y carbamatos debido a que son el blanco de acción primario de los insecticidas anticolinesterásicos (Amiard-Triquet et al., 2015). También han sido utilizadas para estudiar la neurotoxicidad de otros insecticidas, incluyendo los neonicotinoides (Prosser et al., 2016). Estas enzimas pueden encontrarse en otros órganos y tejidos además de los tejidos nerviosos, con distintas estructuras químicas, afinidades y sitios de unión por el sustrato (Carlock et al., 1999; Mora et al., 1999). En vertebrados, particularmente en mamíferos, se distinguen dos tipos principales de ChE según la especificidad por el sustrato: las “colinesterasas verdaderas” o acetilcolinesterasas (AChE) por su afinidad a la ACh y las “pseudocolinesteras” o butirilcolinesterasas (BuChE) por su afinidad a la butirilcolina (Carlock et al., 1999). En invertebrados, la distinción entre los distintos tipos de ChE no es tan clara, ya que para algunas especies se ha determinado una única forma de ChE, mientras que para otras se ha descrito más de una isoforma, algunas con propiedades similares a las AChE y otras con propiedades intermedias entre AChE y BuChE (Bocquené et al., 1997; Gagnaire et al., 2008; Galloway et al., 2002; Mora et al., 1999; Solé y Sanchez-Hernandez, 2018; Varò et al., 2003). Por lo tanto, en invertebrados se refiere normalmente a las colinesterasas como colinesterasas totales o ChE (Bocquené y Galgani, 1998; Galloway et al., 2002; Rickwood y Galloway, 2004).

Las CE participan en el metabolismo y en los mecanismos de detoxificación de diferentes xenobióticos, entre ellos plaguicidas y productos farmacéuticos (como drogas terapéuticas y pro-drogas anti-cáncer) (Potter y Wadkins, 2006; Solé et al., 2018; Wheelock et al., 2008, 2005). Interactúan con tres clases principales de plaguicidas: piretroides, OF y carbamatos a través de dos mecanismos (Wheelock et al., 2008, 2005). Uno de ellos es la catálisis de la hidrólisis de carboxilésteres, a través de la acilación reversible de un residuo de serina del sitio activo de la enzima, en sus correspondientes alcoholes y ácidos carboxílicos (Figura 1.16).

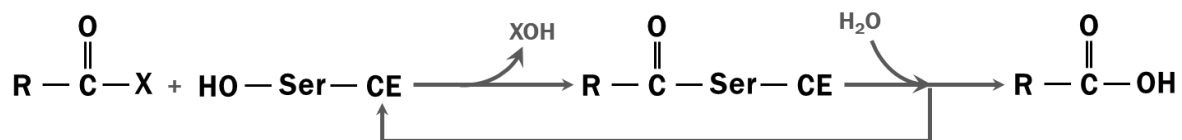


Figura 1.16 Mecanismo de la hidrólisis de carboxilésteres catalizada por CE. Reproducido de Singh (2014).

El otro mecanismo es la unión covalente a OF y carbamatos, en la mayoría de los casos irreversible, reconocido como un mecanismo no catalítico de detoxificación eficiente de estos compuestos (Casarett y Doull, 2001; Jokanović, 2001; Kao et al., 1985; Sanchez-Hernandez, 2007). La inhibición de CE ha sido caracterizada también para ciertos tipos de drogas terapéuticas, trifluorometil cetonas y sulfonamidas (Solé y Sanchez-Hernandez, 2018; Wheelock et al., 2005). Distintos autores han reportado una mayor afinidad de CE por sobre ChE para algunos OF y carbamatos, lo que ha llevado a postular que, en estos casos, las CE protegen a las ChE de la toxicidad de estos compuestos; una relación inversa entre la actividad CE y la susceptibilidad a OF (Cacciatore et al., 2013; Casarett y Doull, 2001; Otero y Kristoff, 2016; Wheelock et al., 2008, 2005). Por lo tanto, se recomienda el uso combinado de ChE y CE para una mejor evaluación del efecto de OF y carbamatos (Sanchez-Hernandez y Wheelock, 2009; Wheelock et al., 2008). Además, se recomienda el uso de diferentes sustratos para su determinación, ya que las CE son una familia con baja especificidad con

múltiples isoenzimas que varían en cuanto a afinidad al sustrato y presencia en los tejidos (Cacciatore et al., 2012; Wheelock et al., 2005).

Las GST son una importante familia de enzimas que participan en segunda instancia del metabolismo de xenobióticos con centros electrofílicos como OF, organoclorados, nitrocompuestos (Board y Menon, 2013). Catalizan la conjugación de los compuestos o sus metabolitos con glutatión (GSH) endógeno, dando como resultado un compuesto conjugado más polar, y por ende, más hidrofílico que el compuesto original, que puede ser eliminado más fácilmente (**Figura 1.17**) (Timbrell, 2000). Estos conjugados también pueden ser reconocidos por sistemas de transporte específicos, que facilitan aún más su eliminación (Newman, 2014).

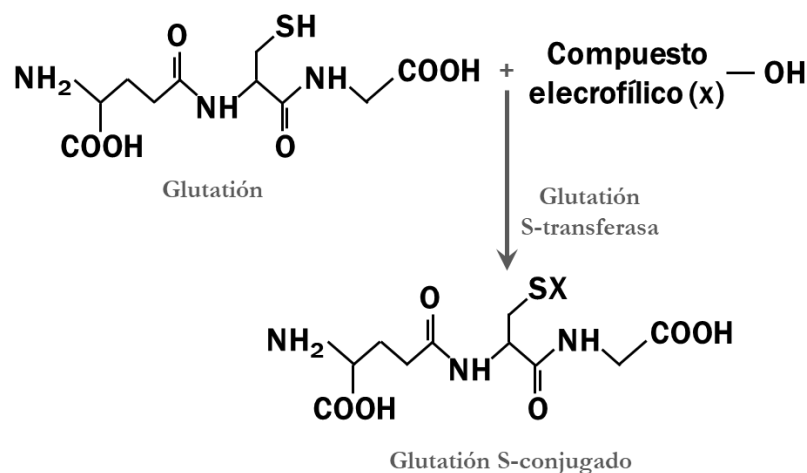


Figura 1.17 Conjugación de glutatión (GSH) con compuestos electrofílicos (X) catalizada por GST que resulta en un producto menos reactivo y más soluble en agua. Adaptado de Simic et al. (2009).

Las GST poseen muy baja especificidad por el sustrato electrofílico, por lo que pueden catalizar conjugaciones con una amplia variedad de compuestos (hidrocarburos policíclicos, plaguicidas) (Domingues et al., 2010). A pesar de que su actividad puede ser inducida, inhibirse o directamente no verse afectada por la exposición a xenobióticos, e, incluso, variar de manera tejido específica, son usadas frecuentemente en ensayos de laboratorio como

indicadores de estrés generado por contaminantes orgánicos (Domingues et al., 2010; Lagadic et al., 1994).

Biomarcadores del sistema inmune

Los contaminantes presentes en el ambiente pueden causar una mayor susceptibilidad (Fournier et al., 2000) y duración de enfermedades e infecciones (Auffret et al., 2006; Casarett y Doull, 2001; Fournier et al., 2000; Galloway y Depledge, 2001; Husmann et al., 2011). Los efectos sobre la inmunocompetencia de individuos de una especie influyen en la habilidad de los individuos de lidiar con enfermedades, infecciones, infestaciones o, incluso, cáncer, lo que puede tener consecuencias directas a nivel poblacional (Newman y Clements, 2007). El interés por este tipo de biomarcadores comenzó en humanos, pero rápidamente ha avanzado y se ha encontrado evidencia de inmunotoxicidad⁶ de diferentes compuestos en una gran variedad de especies (Newman y Clements, 2007). En el caso de invertebrados, hay amplia evidencia de la inmunotoxicidad de insecticidas (Galloway y Handy, 2003). Como biomarcadores, se utilizan parámetros característicos del sistema inmune, celular y/o humoral de cada especie.

1.2.2 Bioensayos

Los ensayos biológicos, o bioensayos de toxicidad, son utilizados para determinar el efecto de los contaminantes a través de la respuesta de ciertas especies de prueba, o de sistemas vivientes (como los micro y meso cosmos), bajo condiciones experimentales específicas y controladas (Morales, 2004). Estas respuestas pueden ser proporciones de organismos afectados (respuestas discretas), o el grado en que son afectados (respuestas continuas) por la exposición al contaminante evaluado, con respecto a un biomarcador elegido.

⁶ Efecto adverso sobre el sistema inmune o sus componentes, ya sea que el resultado sea o no una alteración en la resistencia del organismo (Galloway y Handy, 2003).

Al realizar un bioensayo, es necesario definir, además de las variables clásicas de un ensayo controlado de laboratorio (temperatura, número de unidades experimentales, ciclo de luz:oscuridad, etc.), otras que son características de los bioensayos, como las respuestas o biomarcadores a evaluar, el método de incorporación del tóxico (estático, semi-estático con renovación, o por flujo continuo), el número de grupos de prueba, la duración (agudos, subagudos, subcrónicos o crónicos) y la especie de prueba. Típicamente, los bioensayos cuentan con un control del medio de exposición, en el cual los sujetos no están expuestos al compuesto de prueba, y uno o más grupos tratados que difieren entre sí únicamente en la concentración del compuesto de prueba a la que los sujetos están expuestos, con todas las otras condiciones lo más iguales posibles (Green et al., 2018). La cantidad de grupos tratados dependerá del objetivo del ensayo: puede resultar de interés evaluar alguna concentración puntual por su relevancia ambiental o por comparación con los resultados de otros ensayos, con otros tóxicos u otras respuestas. En otros casos, si el objetivo es identificar el nivel de exposición del tóxico que causa un efecto adverso biológicamente significativo, se ensaya un único compuesto químico de exposición en una secuencia incremental de niveles de concentración o dosis (Green et al., 2018). A partir de estos ensayos, se pueden estimar ciertos puntos finales⁷ útiles para describir y comparar toxicidades, utilizados especialmente en el contexto regulatorio (Green et al., 2018).

La selección de la especie de prueba es una parte esencial del diseño de los bioensayos. Gran parte de la información ecotoxicológica proviene de ensayos estandarizados realizados en el marco regulatorio, basada principalmente en algunas especies modelo (Amiard-Triquet et al., 2015; Casarett y Doull, 2001; Newman, 2014). Las guías que detallan los procedimientos estandarizados de diferentes organizaciones regulatorias abarcan taxones variados de invertebrados acuáticos, incluyendo crustáceos (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*,

⁷ Un punto final puede ser la respuesta evaluada y, también, la medida o valor que expresa el resultado de un ensayo (Morales, 2004).

Gammarus fasciatus, *Gammarus pseudolimnaeus*), insectos (*Chironomus riparius*, *Chironomus dilutus*, larvas de efemerópteros y de tricópteros), anélidos (*Lumbriculus variegatus*) y moluscos (*Lymnaea stagnalis*, *Potamopyrgus antipodarum*, *Crassostrea virginica*) (OECD, 2016a, 2016b, 2011, 2008, 2007; US EPA, 2016a, 1996a, 1996b, 1996c). Sin embargo, la incorporación de guías con moluscos es relativamente reciente y su utilización es limitada. En 2010, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD-OCDE) identificó la falta de guías para la evaluación de la toxicidad de sustancias químicas sobre el ciclo de vida de los moluscos, reconociéndolos como un grupo muy importante ecológica y económicamente, con algunas especies singularmente sensibles, que no estaba siendo representado por las guías existentes en ese momento. Por lo tanto, la información sobre los efectos de contaminantes sobre los macroinvertebrados acuáticos se basaba principalmente en los efectos observados en crustáceos y larvas de insectos, en nematodos y anélidos.

La estandarización de ensayos y protocolos presenta numerosas ventajas, pero se recomienda fuertemente el uso de organismos silvestres para mejorar el realismo de los bioensayos acuáticos y el alcance de la extrapolación de los resultados a condiciones naturales (Amiard-Triquet, 2009; Amiard-Triquet et al., 2015; Galloway et al., 2004). Especialmente, si la selección de una especie de prueba tiene también como objetivo caracterizar las respuestas de esa especie para evaluar su uso como especie bioindicadora en estudios de monitoreo ambiental y en evaluaciones de riesgo ambiental (Amiard-Triquet et al., 2015). Aún más, con estos mismos propósitos, ciertos autores y autoridades como la EPA recomiendan o sugieren el uso de especies nativas (Amiard-Triquet et al., 2015; Buikema et al., 1982; Freitas y Rocha, 2011; Gagneten et al., 2012; Krull y Barros, 2010; US EPA, 1976). La relevancia del estudio de las respuestas de especies nativas radica en gran parte en su importancia ecológica, ya que suelen ocupar un rol clave dentro de los

ecosistemas. Además, en algunos casos, las especies modelo pueden resultar más tolerantes a la exposición a tóxicos que las especies nativas, sesgando así las conclusiones obtenidas sobre esos tóxicos, las evaluaciones de riesgo que derivan de ellas y, eventualmente, los criterios y normativas que se adopten (Buikema et al., 1982; Freitas y Rocha, 2011; Marigómez et al., 2013; Morrissey et al., 2015; Oliveira et al., 2015; US EPA, 1976)

Adicionalmente a la importancia reconocida por la OECD, los moluscos exhiben una gran variedad de estrategias de ciclos de vida y reproductivos, que permite estudiar efectos sobre diferentes etapas de vida (desde los huevos hasta los adultos sexualmente activos) y efectos de exposiciones de diferente duración (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003; Rittschof y McClellan-Green, 2005). Además, algunas vías de control de procesos químicos y biológicos en moluscos están altamente conservadas, lo que podría permitir un grado mayor de generalización de los resultados obtenidos con una especie de moluscos a otra, y a otros organismos (OECD, 2010; Rittschof y McClellan-Green, 2005). Los moluscos de agua dulce también se utilizan en evaluaciones neurotoxicológicas para estudiar los efectos de contaminantes ambientales sobre procesos neuronales y los mecanismos de acción de estas sustancias a un nivel celular (Núñez et al., 2010; Tallarico, 2015).

1.2.3 Especies bioindicadoras

Las especies bioindicadoras pueden ser consideradas como “cualquier especie que proporciona una advertencia de una disfunción o un desbalance en el ambiente o, de manera más restrictiva, una advertencia de los peligros de las sustancias a la salud humana y ambiental” (Amiard-Triquet et al., 2015). El uso de especies bioindicadoras como herramienta integral del monitoreo ambiental surgió al reconocer las limitaciones que presenta la cuantificación química en detalle de la presencia de los contaminantes para reflejar el riesgo real para el ambiente. El biomonitoreo permite obtener un acercamiento mayor a la presencia de contaminantes en un ambiente determinado, su biodisponibilidad

para los organismos y los impactos que pueden provocar (Amiard-Triquet et al., 2015; Casarett y Doull, 2001).

Una variedad de especies de moluscos de agua dulce, en particular bivalvos, se han utilizado exitosamente como bioindicadoras en estudios de biomonitoreo de diferentes ambientes y fuentes de contaminación (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003). Esto se debe a que son ubicuos y diversos, pasan la mayor parte de su ciclo de vida dentro del agua. Además, poseen reducida vagilidad y la ausencia de un exoesqueleto significan un mayor riesgo de exposición a contaminantes presentes en el agua, y su reducida capacidad para excretar contaminantes, metabolizar compuestos químicos orgánicos y para inactivar fisiológicamente compuestos tóxicos, implica que sus respuestas podrían ser más sensibles que las de las especies de artrópodos e insectos utilizadas rutinariamente (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003).

1.3 *Chilina gibbosa*

De las siete clases de moluscos, los gasterópodos constituyen más del 80 % de las especies (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003). Desde el punto de vista ecotoxicológico, se ha trabajado exitosamente con distintos gasterópodos como especies de prueba y bioindicadoras, como los gasterópodos de mar *Littorina littorea*, y otras especies de la misma familia, (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003) y los gasterópodos de agua dulce *Bithynia tentaculata*, *Physella gyrina*, *P. antipodarum*, y *Valvata piscinalis* (Gagnaire et al., 2008; Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003). Se han evaluado una gran variedad de efectos de insecticidas, y sus mezclas, incluyendo la inhibición, recuperación y caracterización B-esterasas, las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas y la peroxidación lipídica, el metabolismo general y las reservas de glucógeno, la biotransformación, la reproducción y supervivencia de juveniles, de diferentes especies de gasterópodos de agua dulce, como *Lymnaea acuminata*, *Planorbarius corneus*, *Biomphalaria glabrata* y *B. straminea* (Agrelo

et al., 2019; Ansaldo et al., 2006; Bianco et al., 2014; Cacciatore et al., 2018, 2015, 2013, 2012; Cossi et al., 2018; Kristoff et al., 2008, 2011, 2010; Otero y Kristoff, 2016; Rivadeneira et al., 2013; Tripathi y Singh, 2004; Verrengia Guerrero et al., 2002).

El gasterópodo pulmonado *Chilina gibbosa* (Sowerby 1841) (**Figura 1.18**) es un macroinvertebrado bentónico nativo y característico de los ecosistemas patagónicos.



Figura 1.18 Ejemplares adultos de *Chilina gibbosa* de talla utilizada en los ensayos de esta tesis ($1,50 \pm 0,08$ cm). Fotografías cortesía del Lic. Julio C. Painefilu.

Pertenece a la familia Chiliniidae (Dall, 1870; Gastropoda: Pulmonata), una de las familias de gasterópodos pulmonados más antiguas conocidas (Gutiérrez Gregoric y Rumi, 2008; Ovando y Gutiérrez Gregoric, 2012; Rumi et al., 2008). La familia Chiliniidae es endémica de América del Sur (**Figura 1.19**) y se extiende desde zonas subtropicales hasta zonas templadas y frías, desde Perú hasta el Cabo de Hornos y alcanza las Islas Malvinas. Ningún miembro del grupo, o traza del grupo se ha encontrado en otras tierras Australes vivo o fósil, fuera de estos límites (Castellanos y Gaillard, 1981; Gutiérrez Gregoric et al., 2010; Ovando y Gutiérrez Gregoric, 2012; Pilsbry, 1911; Rumi et al., 2008). En su distribución sur, en la Patagonia argentina, los valores más altos de riqueza se encuentran en el oeste, en los grandes lagos de los Andes (Rumi et al., 2006). Casi un 40 % de las especies de gasterópodos del país son endémicas, de las cuales, el 11 % pertenece a la familia Chiliniidae, lo que destaca la importancia de esta familia en la fauna de gasterópodos de Argentina; dentro de esta familia, a su vez, el 69 % de las especies son endémicas (Gutiérrez Gregoric, 2010; Rumi et al., 2006).

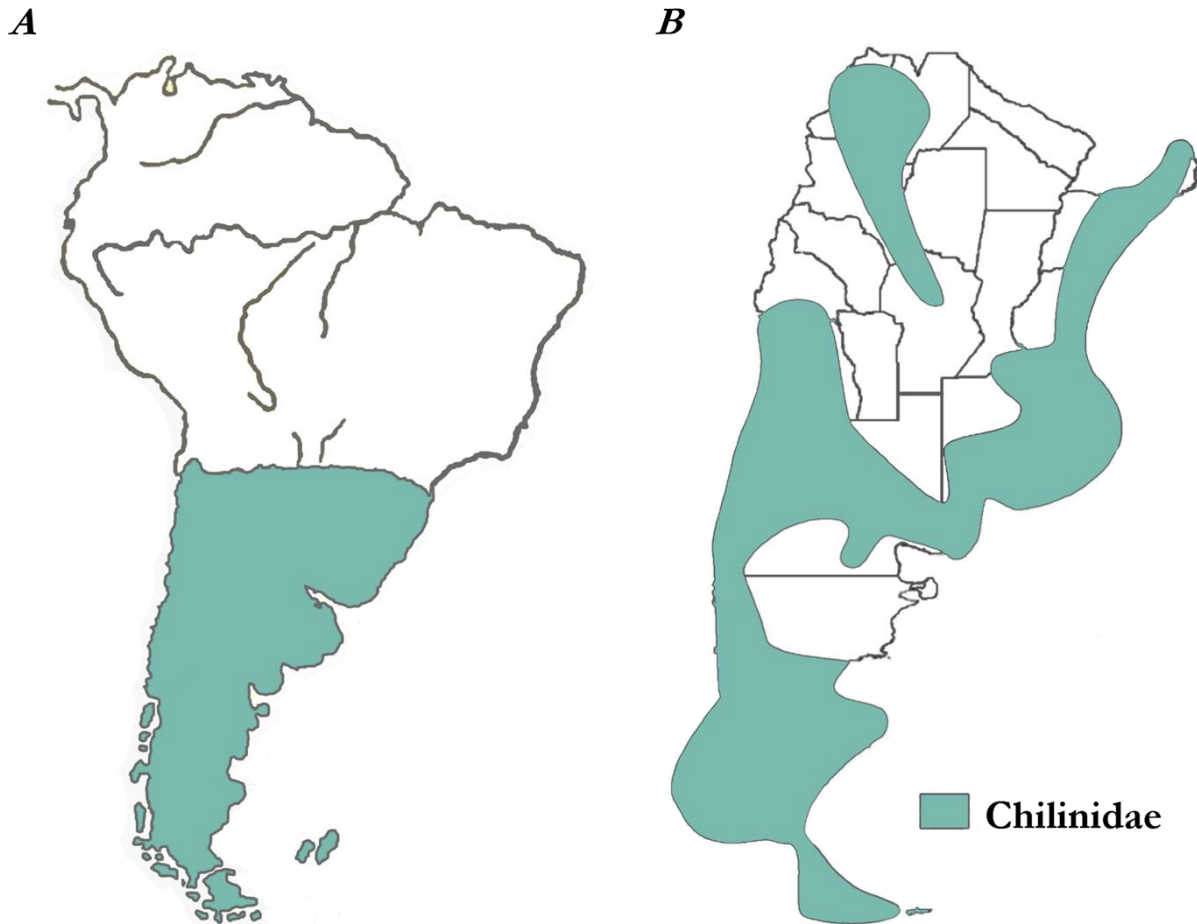


Figura 1.19 Distribución de la familia de gasterópodos de agua dulce Chiliniidae (Pulmonata) **A** en América del Sur y **B** en Argentina. Adaptado de Pilsbry (1911) y Rumi et al. (2008), respectivamente.

Chiliniidae consiste de un único género, *Chilina* Gray, 1828 (**Figura 1.18**), que conserva algunos caracteres generales primitivos como el pie ancho, los tentáculos achatados y la ausencia de branquias (Castellanos y Gaillard, 1981). La concha presenta ciertas características distintivas: es dextrógira, ovalada, con el último anfracto expandido, y es de color amarillo oliváceo, con bandas longitudinales en zigzag marrón oscuras (flámulas). Es característico de las especies de la Patagonia que este patrón se vea interrumpido durante períodos en los que se detiene el crecimiento de la concha y se vea reemplazado por rayas irregulares (Pilsbry, 1911). El género *Chilina* tiene alrededor de 32 especies, 17 de las cuales se han registrado en Argentina, mientras que el resto se distribuyen en Chile (Ovando y Gutiérrez Gregoric, 2012).



Figura 1.20 Ilustraciones de especies del género *Chilina* (Gray, 1828) catalogadas por Sowerby (1841). *Chilina gibbosa*: 4.

Chilina gibbosa es una de las especies de más amplia distribución (**Figura 1.21 A**) (Rumi et al., 2008). Es especialmente abundante en el sur de Chile y Argentina y puede encontrarse en zonas poco profundas y en los márgenes de los ríos Limay, Neuquén y Negro, así como en lagos y embalses de las provincias de Río Negro y Neuquén (Bosnia et al., 1990; Fuentealba et al., 2010; Gutiérrez Gregoric et al., 2010; Núñez et al., 2010; Rumi et al., 2008). Como es característico del género, el ambiente más apropiado para esta especie son las aguas bien oxigenadas y ambientes con sustrato limoso (**Figura 1.21 B, C, D**). Estos gasterópodos suelen encontrarse fuertemente adheridos por el pie al sustrato rocoso o a plantas acuáticas o desplazándose por el sustrato del fondo (Castellanos y Gaillard, 1981), en arroyos sombríos o bien en lagos de aguas frías del sur argentino (Cuezzo, 2009). Se desarrolla sobre cualquier sustrato: cantos rodados, sedimentos, hidrófitas e incluso resaca herbácea (Ferriz, 1994).

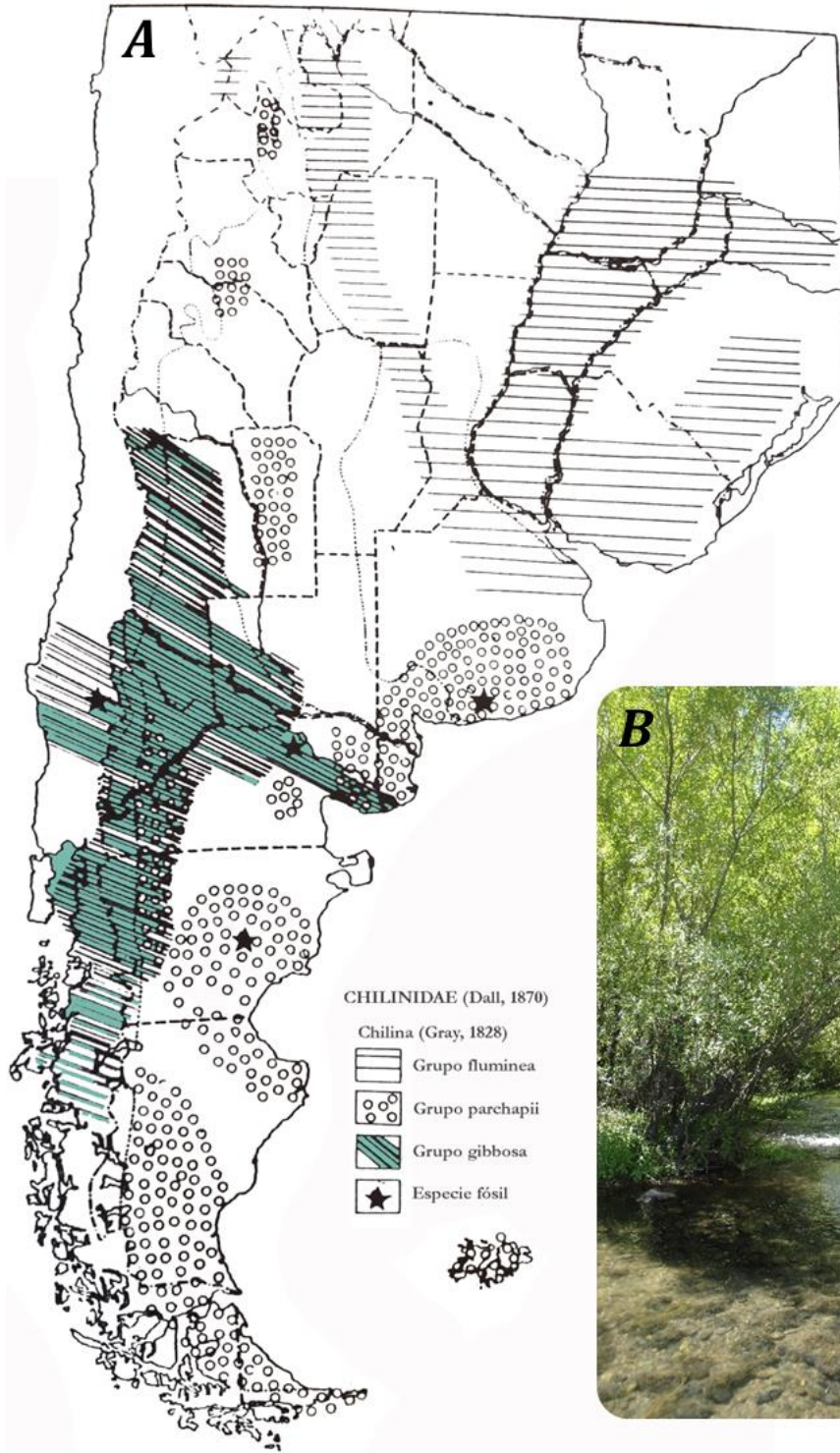




Figura 1.21 A Distribución del grupo gibbosa del género *Chilina*. *Chilina gibbosa* es la especie predominante del grupo gibbosa en la región suroeste. B, C y D Fotografías de ambientes característicos donde se encuentra *Chilina gibbosa*. Mapa adaptado de Castellanos y Gaillard (1981). Si bien la distinción en “grupos” ha caído en desuso, este es el registro más cercano a un mapa de la distribución de la especie. Las flechas en C indican individuos de *Chilina gibbosa* adheridos a las rocas.

Esta especie cumple un rol importante en las cadenas tróficas y los ensambles de los ecosistemas acuáticos de la Patagonia. Como ramoneadores detritívoros, se alimentan de perifiton (Aufwuchs) y de diatomeas bentónicas que se encuentran en lecho del río o sobre macrófitas (Bosnia et al., 1990). En algunos casos, este grupo funcional de macroinvertebrados puede tener efectos indirectos beneficiosos al reducir los efectos perjudiciales de microbiota epifítica y, además, pueden poseer celulasas que asisten en la degradación de algas y partículas de detrito provenientes de las plantas (Strong et al., 2008). *Chilina gibbosa* es parte de la dieta de especies del género de crustáceos anomuros *Aegla*, otro macroinvertebrado bentónico nativo característico de los ecosistemas patagónicos, cuya supervivencia también se encuentra en riesgo debido a la contaminación y rápida degradación de la calidad de sus ambientes naturales (Santos et al., 2017). A su vez, tanto estos crustáceos como este gasterópodo, son dos de los componentes más importantes de la dieta de los salmónidos introducidos *Salmo trutta* (trucha marrón) y *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris), de gran importancia económica en la Patagonia Argentina debido a que una de las principales industrias de la zona es el turismo nacional e internacional derivado de la pesca deportiva de truchas (Bosnia et al., 1990; Shimizu et al., 1999). Además, *C. gibbosa* es el alimento dominante de especies de peces que ocurren naturalmente en toda la cuenca del río Limay, como el pejerrey patagónico, *Odontesthes hatcheri*, y la perca, *Percichthys trucha* (Bosnia et al., 1990; Ferriz, 1994). También forma parte de la dieta de distintas aves de la zona, como los patos *Tachyeres patachonicus* y *Oxyura vitatta* y el tagua (*Fulica armillata*) (Bosnia et al., 1990). Por otro lado, se ha identificado que *C. gibbosa* puede ser hospedadora intermediaria de furcocercarias (estadios larvarios) de la familia Schistosomatidae (Trematoda: Digenea), que producen dermatitis esquistosómicas humanas (Rumi et al., 2008).

El conocimiento actual acerca de las especies de Chiliniidae de la Argentina es rudimentario. La mayoría de los registros derivan de expediciones exploratorias del principio

del siglo veinte (Cuezzo, 2009). Las descripciones originales se realizaron en su mayoría sobre la base de características de la concha (**Figura 1.22**) (Castellanos y Gaillard, 1981; Sowerby, 1841), y muy pocos trabajos se dedicaron a la anatomía interna de ciertas especies (Brace, 1983; Duncan, 1960, 1959; Haeckel, 1911; Harry, 1964; Ituarte, 1997). Recientemente se han realizado estudios morfo-anatómicos y poblacionales detallados de especies del noreste argentino (Gutiérrez Gregoric, 2010; Gutiérrez Gregoric et al., 2015, 2010; Gutiérrez Gregoric y Rumi, 2008; Ovando y Gutiérrez Gregoric, 2012). Al igual que para otras especies de la familia, se requiere de mayores estudios, morfológicos, sistemáticos, anatómicos, etc., para poder describir a *C. gibbosa* más adecuadamente, ya que su biología y estrategias ecológicas son prácticamente desconocidas (Rumi et al., 2006).

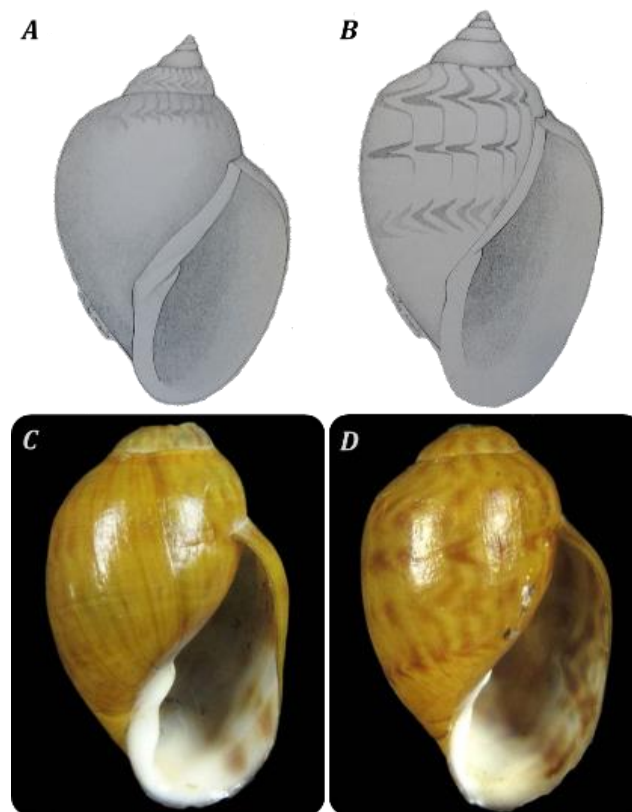


Figura 1.22 Diferentes morfologías de la concha de *Chilina gibbosa*. *A* y *B* Diagramas utilizados para la identificación de esta especie, según la clave de Castellanos y Gaillard (1981). *C* y *D* Fotografías de ejemplares con distintas morfologías de la concha encontrados en el lago Lácar, San Martín de los Andes, Neuquén (© 2015 – G. & Ph. Poppe. Conchology).

Bosnia et al. (1990) estudiaron aspectos poblacionales de *C. gibbosa* y concluyeron que la especie es semélpara, con un ciclo de vida anual, con pico poblacional en verano, prácticamente detenido en invierno, al igual que el crecimiento. Los huevos son evacuados desde la primavera hasta principios del otoño (Castellanos y Gaillard, 1981). Resultados preliminares histológicos confirman que es hermafrodita (sección 2.2 “Ejemplares de *Chilina gibbosa*” de la “Metodología general”), como es característico de su género (Gutiérrez Gregoric, 2010), pero la estrategia reproductiva exacta (protándricos, secuenciales, etc.) no se ha descrito aún. Una vez fertilizados, los huevos de forma ovalada son depositados dentro de masas (puestas), tubos sinuosos o filamentos gelatinosos doblados cuyas vueltas se tocan entre sí en forma de zigzag (Bosnia et al., 1990; Castellanos y Gaillard, 1981). Tienen desarrollo directo, por lo que de cada huevo emerge un único juvenil completamente formado.

En el EAIN⁸, Boburg (2017) logró determinar las condiciones necesarias para desarrollar el cultivo de esta especie en laboratorio. Observó que los individuos de *C. gibbosa* son capaces de reproducirse de manera continuada a lo largo del año, no una única vez, probablemente debido a las condiciones de temperatura y luz controladas. Las puestas presentaron en su mayoría aspecto similar a las descritas en la naturaleza, pero también se observaron otros morfotipos. Estas puestas fueron depositadas sobre distintos sustratos: piedras, paredes de los tanques y sobre la concha de otros individuos, y presentaron una gran variación en tamaño, en la disposición de los huevos (en una sola hilera o en doble hilera), y en la cantidad de huevos en cada una (desde 46 a 370 huevos por puesta). Además, debido a que las puestas resultaron resistentes a la manipulación, pudo realizar el seguimiento individualizado del desarrollo de los embriones hasta su eclosión como juveniles. Estos juveniles continúan creciendo bajo condiciones controladas en el EAIN, aún dos años

⁸ Laboratorio de Ecotoxicología Acuática: Invertebrados Nativos, dirigido por la Dra. Kristoff. Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (QB, FCEN, UBA), Instituto de Química Biológica (IQUIBICEN), CONICET.

después de su eclosión, y representan el primer grupo de individuos de *C. gibbosa* cultivados en el laboratorio que podrían ser utilizados con fines experimentales.

Chilina gibbosa es la primera especie en su género en haber sido incorporada en estudios ecotoxicológicos. Los primeros bioensayos con *C. gibbosa* como especie de prueba fueron llevados a cabo en el EAIN, por Bianco et al. (2013) con el objetivo de caracterizar las B-esterasas de esta especie y su respuesta a la exposición a MAZ. Definieron acetiltiocolina para medir actividad ChE, y p-nitrofenil acetato (p-NFA) y p-nitrofenil butirato (p-NFB) para medir actividad CE, como los sustratos óptimos en esta especie. Encontraron que tanto las ChE como las CE de *C. gibbosa* son inhibidas por MAZ (son B-esterasas), pero con sensibilidades con varios órdenes de magnitud de diferencia. Las ChE tienen una alta sensibilidad a MAZ, mientras que las CE son inhibidas únicamente a las concentraciones más altas del insecticida. Junto con esta combinación de alta sensibilidad de ChE y baja de CE, observaron signos de neurotoxicidad conspicuos (**Figura 1.23**). La región de la cabeza-pie se encontraba completamente protruida fuera de la concha, en contraste con los individuos del grupo control, que solamente mostraban partes pequeñas fuera de la concha. Además, los individuos expuestos carecían de adherencia a las superficies, movimiento espontáneo y prácticamente no respondían a estímulos mecánicos (Bianco et al., 2013). Estos signos de neurotoxicidad resultaron ser muy sensibles, ya que se presentaron a concentraciones tan bajas como $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ (debajo del nivel guía de protección de la vida acuática para MAZ: $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$; Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2003).



Figura 1.23 Región de la cabeza-pie de ejemplares adultos de *C. gibbosa* **A** en condiciones normales y **B** luego de una exposición de 48 h a MAZ. Adaptado de Cossi et al. (2015).

Bianco et al. (2013) también evaluaron las defensas antioxidantes de individuos de *C. gibbosa* expuestos a dos concentraciones ambientalmente relevantes de MAZ, 0,02 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, que ocasionan aproximadamente 50 y 85 % de inhibición de ChE, respectivamente, y no tienen efecto sobre la actividad de CE. La exposición a la menor de las dos concentraciones causó un aumento en niveles de glutatión (GSH) y en la actividad catalasa (CAT). La exposición a la concentración más alta aumentó únicamente los niveles de GSH. No registraron efectos sobre superóxido dismutasa (SOD) ni sobre GST.

En base a estos resultados, Cossi et al. (2015) llevaron a cabo una exposición aguda (48 h) a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MAZ y monitorearon la recuperación de individuos de *C. gibbosa* durante 21 días luego de transferirlos a agua sin plaguicida. Las actividades de ChE y CE se mantuvieron constantes en individuos del grupo control, mientras que en individuos del grupo expuesto, las ChE se inhibieron en un 85 % y se mantuvieron inhibidas, con ligera recuperación, hasta el día 21. La actividad de CE en individuos del grupo expuesto se mantuvo constante y sin inhibición durante el experimento. La neurotoxicidad se observó a 48 h, con la mayoría de los individuos mostrando adherencia débil o sin adherirse a los recipientes y exhibiendo la protrusión de la región de la cabeza-pie y ausencia de movimiento espontáneo. La mayoría recobró la capacidad de adherencia durante los 21 días posteriores y,

hacia el final del bioensayo, ninguno mostraba signos de protrusión de la cabeza- pie, pero la mortalidad aumentó al 30 %.

Boburg (2017) expuso individuos de *C gibbosa* de manera subcrónica durante 14 días a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de MAZ y a una concentración equivalente molar de CAR ($13 \mu\text{g L}^{-1}$). A las 48 h la actividad de ChE de los individuos expuestos a MAZ estaba inhibida en un 89 % y permaneció inhibida durante el resto del bioensayo, mientras que la actividad de CE medida usando p-NFB y p-NFA como sustrato solamente se inhibió luego de 14 días de exposición. Para el día 14, todos los individuos expuestos a MAZ presentaban la protrusión de la cabeza- pie. Por el contrario, la exposición subcrónica a CAR únicamente produjo inhibición de la actividad de CE medida con p-NFB.

Es importante mencionar que todas las respuestas enzimáticas evaluadas por Bianco et al. (2013), Cossi et al. (2015) y Boburg (2017) fueron determinadas en homogenatos de tejido blando total. Los antecedentes presentados por Bianco et al. (2013), Cossi et al. (2015) y Boburg (2017) permitirían considerar a MAZ como tóxico de referencia para esta especie, en particular para las respuestas de ChE y CE, es decir, un tóxico cuyos efectos han sido caracterizados en esta especie y contra los cuales pueden compararse los resultados de nuevos bioensayos con esta especie. La sensibilidad de las respuestas observadas ha promovido que se proponga a *C. gibbosa* como potencial especie bioindicadora (Bianco et al., 2013; Boburg, 2017; Cossi et al., 2015).

Hipótesis general

La exposición aguda a insecticidas utilizados en nuestro país, solos o en mezclas, produce efectos tóxicos sobre el comportamiento, la actividad enzimática y el sistema inmune de *C. gibbosa*.

Objetivo general

Estudiar múltiples respuestas de neurotoxicidad, bioquímicas e inmunológicas de *Chilina gibbosa* a la exposición aguda a metilazinfos, carbarilo, clorpirifos y acetamiprid, para evaluar su especificidad, identificar nuevos biomarcadores y aportar información sobre esta especie nativa como posible bioindicadora.

2 Metodología general

2.1 Reactivos

Los reactivos acetilcolina yoduro (AcSCh; ≥ 97 % pureza, CAS 2260-50-6), p-nitrofenil acetato (p-NFA; CAS 830-03-5), p-nitrofenil butirato (p-NFB; ≥ 98 % pureza, CAS 2635-84-9), 5,5-ditio-2-bis-nitrobenzoato (DTNB; ≥ 98 % pureza, CAS 69-78-3), carbarilo (CAR; 99,9 % pureza, CAS 63-25-2, Pestanal®), clorpirifos (CPF; 99,3 % pureza, CAS 2921-88-2, Pestanal®), acetamiprid (ACP; 99,9 % pureza, CAS 135410-20-7, Pestanal®), 2,4-dinitroclorobenceno (CDNB; 97 % pureza, CAS 97-00-7), metilazinfos (MAZ; 97,2 - 98,5 % pureza, CAS 85-50-0) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich de Argentina S.R.L. El reactivo de Folin-Ciocalteu fue adquirido de Sigma-Aldrich de Argentina S.R.L y de Sistemas Analíticos S.A. - Biopack®. Los reactivos Rojo Congo (RC; CAS 573-58-0), Trypan Blue (TB; CAS 72-57-1) y Solución de Giemsa (SG) fueron adquiridos de Sistemas Analíticos S.A. - Biopack®. La acetona (CAS 67-64-1) fue adquirida de Reagents S.A. y de Sistemas Analíticos S.A. - Biopack®. Todos los reactivos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico.

2.2 Ejemplares de *Chilina gibbosa*

Los ejemplares de *C. gibbosa* estudiados en esta tesis fueron recolectados del río Chimehuín, Junín de los Andes, Provincia del Neuquén. Este río se origina en el lago Huechulafquen, dentro del Parque Nacional Lanín, en el cual las actividades agrícolas intensivas están prohibidas (Ley Nacional 22.351, 1980). Desde allí, el río recorre un primer tramo dentro del Área Natural Protegida Provincial Boca del Chimehuín, zona de influencia

para la protección del paisaje y la conservación de la biodiversidad (Ley Provincial 2.345, 2000; Ley Provincial 2.594, 2008). El sitio de muestreo ($39^{\circ}54'58,0''\text{S}$ $71^{\circ}05'57,1''\text{O}$) se seleccionó río abajo del límite de esta Área Natural Protegida y río arriba de la ciudad de Junín de los Andes, de modo de evitar una posible exposición previa a contaminantes químicos por actividades antrópicas (**Figura 2.1**).

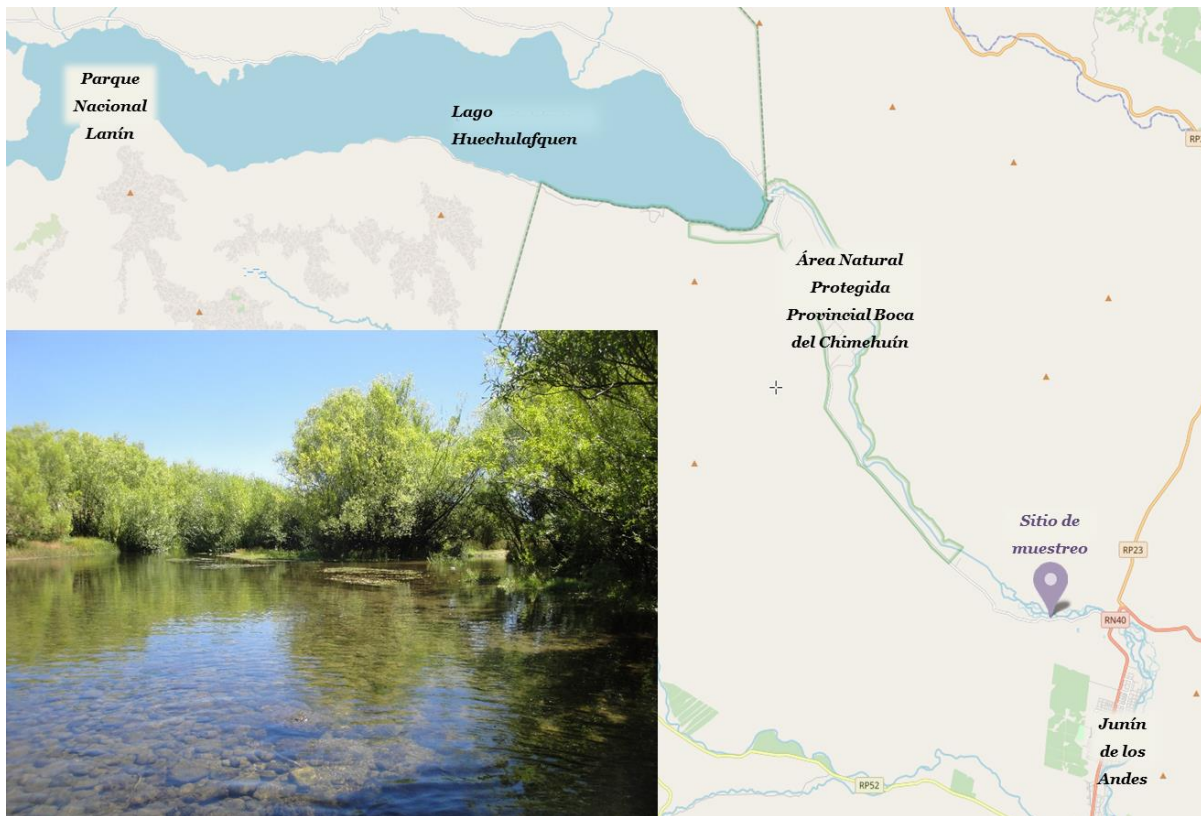


Figura 2.1 Foto del sitio de muestreo de *Chilina gibbosa* y mapa de su ubicación. Referencias: origen del río Chimehuín en el Lago Huechulafquen, dentro del Parque Nacional Lanín, Área Natural Protegida Provincial Boca del Chimehuín y la ciudad de Junín de los Andes.

La recolección se realizó de manera manual, a una profundidad de entre 20 y 50 cm, tomando los individuos que se encontraban adheridos a las superficies de las rocas. Se identificaron como *C. gibbosa* según la clave para la familia Chiliniidae en Argentina publicada por Castellanos y Gaillard (1981). Una vez muestreados, los ejemplares de

C. gibbosa fueron transportados hasta el LEA⁹, ubicado en el Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN), Junín de los Andes, Neuquén, y mantenidos en acuarios a temperatura ambiente y fotoperiodo natural, con agua y sustrato del río Chimehuín, hasta su utilización o traslado.

Para todos los bioensayos se seleccionaron individuos adultos de similar talla y masa, $1,50 \pm 0,08$ cm y $0,76 \pm 0,08$ g, respectivamente. Se realizaron estudios histológicos preliminares en colaboración con el Laboratorio de Biología de Invertebrados Marinos¹⁰ que permitieron confirmar que los individuos dentro de este intervalo de tallas son hermafroditas y sexualmente maduros. Brevemente, se anestesió a cada individuo en hielo entre 6 y 8 min, se le removió cuidadosamente la concha con pinzas de disección, también sobre hielo, se retiró el exceso de líquido del cuerpo con papel absorbente, se determinó la masa húmeda total y se fijó la masa visceral total de cada individuo en formol 4 % durante 12 h. Luego, se transfirió cada masa visceral a una solución de etanol 70 % durante 24 h, a partir de las cuales se deshidrataron en graduación creciente de etanol (80, 90 y 96 %) y se incluyeron en resina (Leica HistoResin®). Se realizaron cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo electrónico de rotación (Leica RM 2155®) sobre los cuales se realizaron coloraciones topográficas con Hematoxilina-Eosina (H-E). Los cortes coloreados con H-E se examinaron bajo microscopio óptico (Zeiss Axiostar) con cámara acoplada (Canon PowerShot G10) y se tomaron microfotografías de secciones de la gónada seleccionadas al azar.

En primer lugar, se identificó la gónada (ovotestis) inmersa en la glándula digestiva, como se encuentra reportado en bibliografía para otras especies de este género (**Figura 2.2**).

⁹ Laboratorio de Ecotoxicología Acuática (LEA), dirigido por el Dr. Luquet. Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA), CONICET.

¹⁰ Laboratorio de Biología de Invertebrados Marinos, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (DBBE, FCEN, UBA), Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA), CONICET.

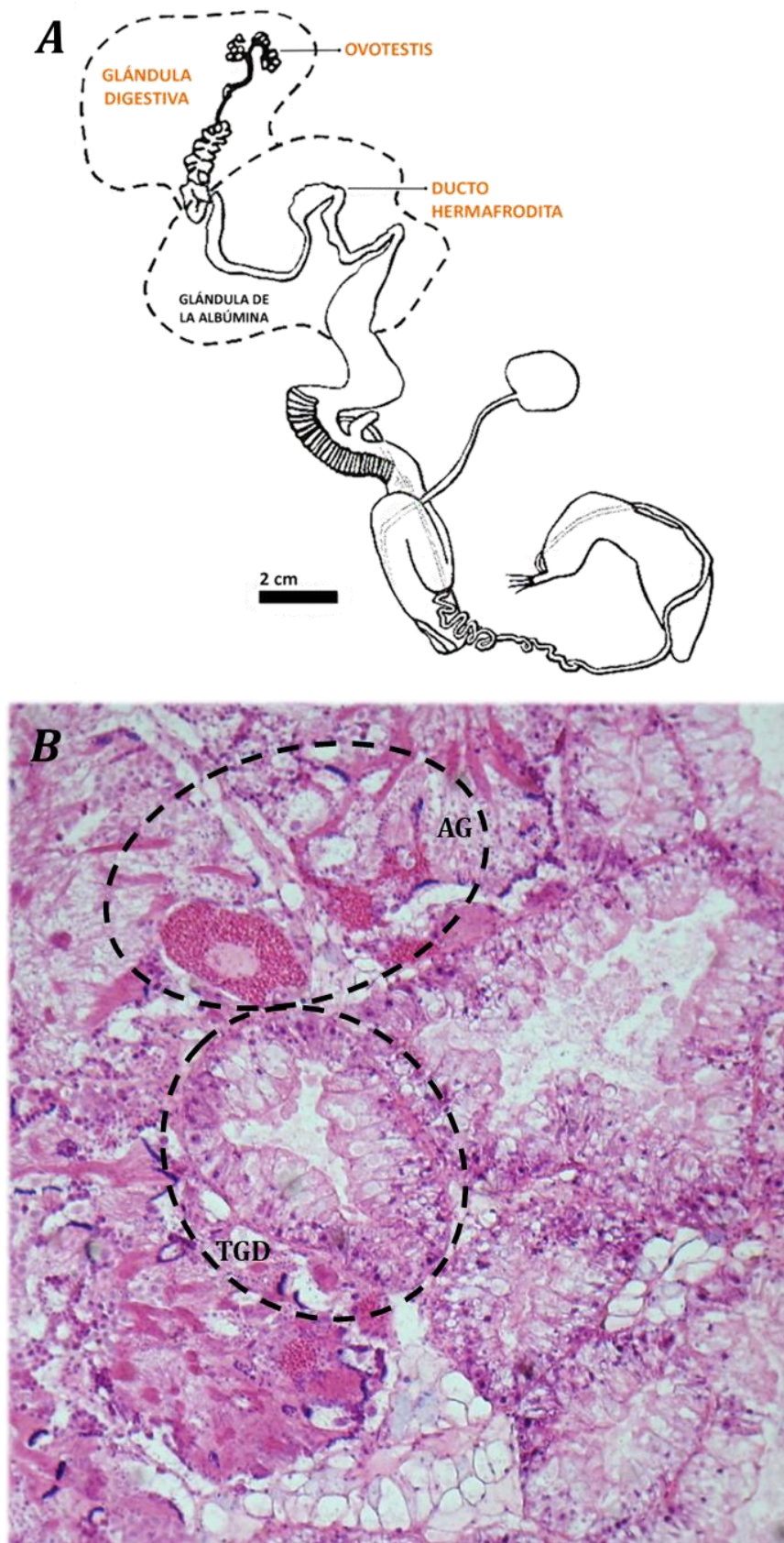


Figura 2.2 A Diagrama general del sistema reproductor del género *Chilina* adaptado de Gutiérrez Gregoric y Rumi (2008). B Histología del tejido localizado dentro de los últimos anfractos de la concha de individuos control de *Chilina gibbosa*, correspondiente a la zona de la glándula digestiva y gónada (40x). TGD: túbulo glándula digestiva; AG: acinos de la gónada.

En la **Figura 2.3** se observa un detalle de la gónada, organizada en acinos con ambos tipos de gametas en diferentes estadios de desarrollo, principalmente gametas masculinas. Se identifican espermatozoides en cúmulos agrupados desde los núcleos. También se identifican oocitos previtelogénicos, vitelogénicos tempranos y vitelogénicos tardíos, estos últimos hacia la periferia de los acinos.

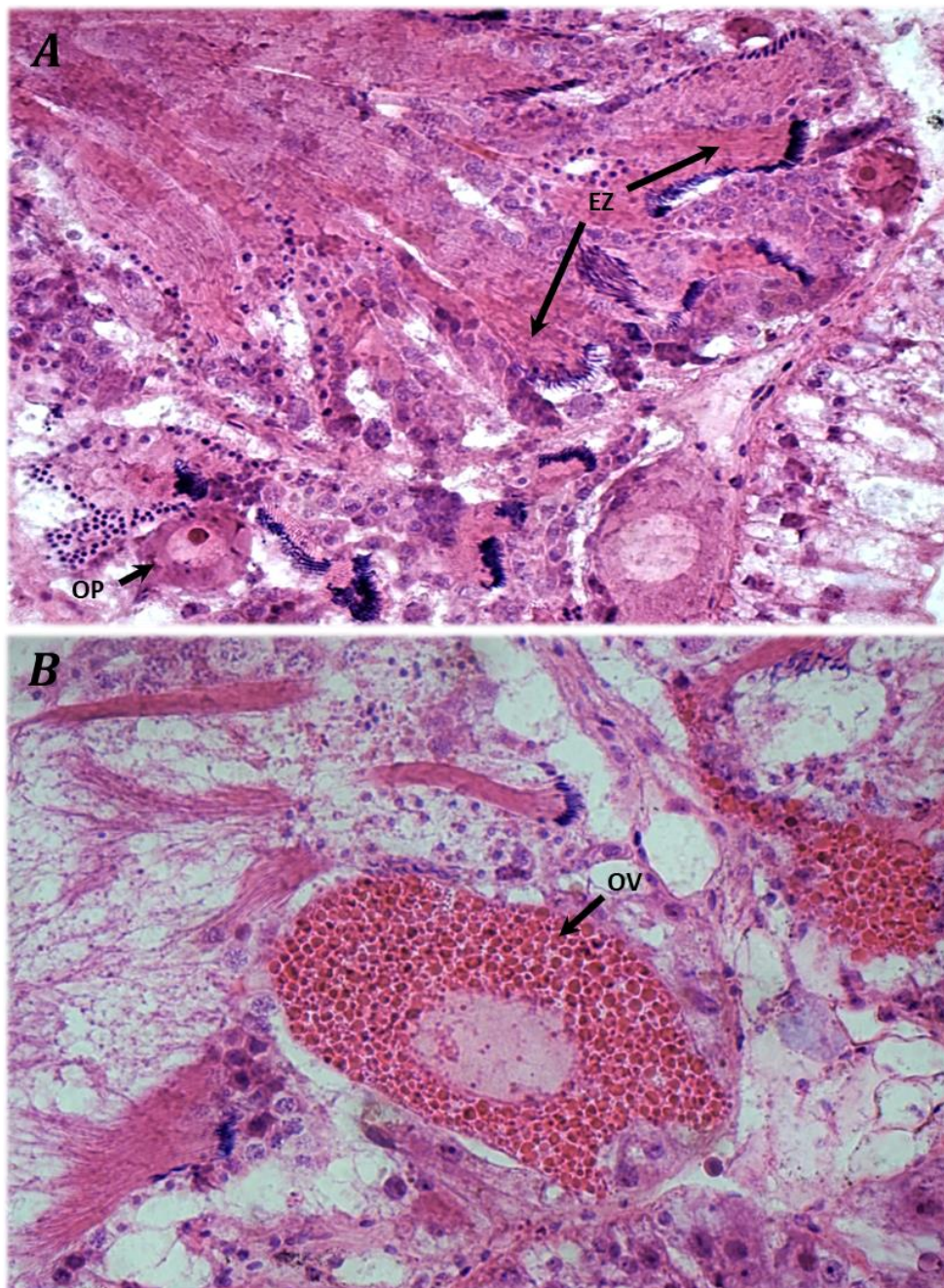


Figura 2.3 Detalle de la gónada de individuos control de *Chilina gibbosa* (400x). EZ: espermatozoides; OP: oocito previtelogénico; OV: oocito vitelogénico tardío.

2.3 Bioensayos de toxicidad

2.3.1 Condiciones generales

El diseño general de los bioensayos de toxicidad consistió en colocar a los individuos de *C. gibbosa* en recipientes de vidrio que contenían soluciones acuosas de los distintos insecticidas estudiados (medio de exposición). Los tratamientos consistieron en las soluciones de insecticidas y controles correspondientes de agua de clorada, para los insecticidas que se disolvieron directamente en agua, o de acetona, cuando fue necesario utilizar acetona como vehículo¹¹ (Green et al., 2018; Harris et al., 2014). En todos los casos se utilizaron diseños semiestáticos, en los cuales la periodicidad de los recambios de las soluciones se definió a partir de información bibliográfica sobre la estabilidad de cada insecticida. Esta información se detalla en la subsección 2.3.2 “Soluciones de insecticidas”. Los individuos del grupo control recibieron los mismos recambios de solución que los expuestos a insecticidas (Harris et al., 2014). Se utilizaron diseños completamente aleatorizados en los cuales los individuos se asignaron al azar a cada tratamiento y los tratamientos se entremezclaron en el laboratorio, con el objetivo de asegurar la aleatorización de posibles variaciones interindividuales y de las condiciones ambientales (Green et al., 2018; Harris et al., 2014). Si bien los individuos se asignaron al azar a cada tratamiento, se controló que su talla y su masa húmeda con concha no difirieran en más del 10 % entre los distintos tratamientos de un mismo ensayo (Harris et al., 2014).

La evaluación de respuestas enzimáticas se realizó en el EAIN, FCEN, UBA (CABA), bajo las condiciones experimentales puestas a punto anteriormente por Bianco et al. (2013) para estos estudios en *C. gibbosa*. Brevemente, los individuos utilizados fueron transportados desde el LEA en contenedores refrigerados rellenos con papel absorbente humedecido. Una vez en la FCEN, se los colocó en acuarios de vidrio, aproximadamente 50 individuos cada

¹¹ Disolvente en el que se encuentra disuelto el contaminante (Moreno Grau, 2003).

3 litros de agua de red previamente declorada de manera pasiva¹², dentro de la cámara fría del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental (DBBE) a 12 ± 2 °C, con aireación y fotoperiodo artificial de luz:oscuridad de 12:12 h (**Figura 2.4**). Se los alimentó *ad libitum* con alimento para peces en escamas (TetraFin[®]) triturado. Al menos una vez por semana se realizó una limpieza profunda de los acuarios, con barrido de fondo y recambio completo del agua y, cada vez que fue necesario, se recambió el agua de la columna. Los individuos se aclimataron en estas condiciones durante, al menos, 21 días antes de ser usados en bioensayos (Bianco et al., 2013; Cossi et al., 2015).



Figura 2.4 Acuarios de vidrio con ejemplares silvestres de *Chilina gibbosa* bajo aclimatación a condiciones de laboratorio previo a su uso en los ensayos de toxicidad.

Estos bioensayos se realizaron en las mismas condiciones bajo las cuales se encontraban aclimatizados los individuos, dentro de la cámara fría del DBBE a 12 ± 2 °C, con fotoperiodo artificial de luz:oscuridad de 12:12 horas, con una duración de 48 horas, durante las cuales no se alimentó a los individuos, ni se utilizaron aireadores.

¹² En adelante, “agua declorada”

La evaluación de las respuestas del sistema inmune se realizó por primera vez en esta especie en el LEA, bajo condiciones experimentales que se describen en la sección 6.2 “Metodología” del Capítulo 6 “Respuestas celulares en hemolinfa”. Las unidades experimentales, las réplicas, los niveles de exposición a los insecticidas, las variables y los puntos finales determinados en cada bioensayo se encuentran especificadas en las metodologías particulares de cada capítulo.

2.3.2 Soluciones de insecticidas

Las soluciones de insecticidas se prepararon a partir de una solución madre del insecticida sólido disuelto en agua de clorada o acetona, según la solubilidad de cada compuesto (**Tabla 2.1**). La acetona es uno de los vehículos sugeridos por la EPA (US EPA, 2016a) y la OECD (OECD, 2000) y fue utilizado por Bianco et al. (2013) en ensayos previos con *C. gibbosa*. CPF, CAR y MAZ se solubilizaron en acetona, dado que su solubilidad en este solvente es alta, mientras que en agua es moderada a baja. Por el contrario, ACP es altamente soluble tanto en agua como en acetona por lo que, siguiendo lo recomendado, se decidió evitar el uso del solvente y disolverlo directamente en agua de clorada (OECD, 2000; US EPA, 2016a). Las soluciones madre se diluyeron en agua de clorada para obtener las concentraciones de trabajo de los diferentes tratamientos a los cuales se expuso a los individuos.

Tabla 2.1 Solubilidad y estabilidad de CPF, CAR, ACP y MAZ y las resultantes selecciones de vehículo y periodicidad de recambio de soluciones para cada insecticida.

	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹)	Solubilidad en acetona (mg L ⁻¹)	Vehículo	Estabilidad (% concentración original)	Periodicidad recambio
CPF	0.64	5233	acetona	98-82 % a 24 h ^b	24 h
CAR	82.50	161000	acetona	> 93 % a 12 h ^a	24 h
ACP	6625.77	200000	agua	50 % a 812 días ^c	> 48 h
MAZ	14.67	250000	acetona	100-115 % a 96 h ^d	> 48 h

Solubilidad baja: < 10 mg L⁻¹; Solubilidad moderada: 10 - 1000 mg L⁻¹; Solubilidad alta: > 1000 mg L⁻¹ (Ney, 1995)

Datos de solubilidad calculados a partir de información de PubChem Database 2019, USEPA Chemistry Dashboard 2019, PPDB 2019

^a Cacciatore et al. 2018; ^b Cacciatore et al. 2013; ^c EU Comission 2004; ^d Cacciatore 2009

Las soluciones de trabajo se cambiaron durante el curso de los bioensayos con el objetivo de evitar la disminución de las concentraciones de los insecticidas con respecto a las del tiempo inicial. La periodicidad de los cambios se definió priorizando como referencia determinaciones de estabilidad de los insecticidas realizados previamente en ensayos con sistemas similares por investigadores del EAIN (**Tabla 2.1**). En los ensayos con CPF y CAR, los cambios se hicieron cada 24 h según Cacciatore et al. (2018) y Cacciatore et al. (2013), respectivamente. Con MAZ y ACP no se realizaron cambios de soluciones durante las 48 h de los bioensayos, según determinaciones realizadas por Cacciatore (2009) y datos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority* - EFSA, 2016), respectivamente. La periodicidad de los cambios de las soluciones de MAZ, CPF, CAR y ACP también coincide con otros trabajos realizados con estos insecticidas y gasterópodos en EAIN (Bianco et al., 2014, 2013; Cossi, 2019; Cossi et al., 2018, 2017, 2015; Kristoff et al., 2012, 2010, 2008, 2006; Rivadeneira et al., 2013). En el caso de los ensayos en los que se evaluó más de un insecticida por vez, las soluciones se cambiaron según el compuesto con menor tiempo de cambio, es decir, cada 24 h.

En los bioensayos con insecticidas para los cuales se utilizó la acetona como vehículo, se definieron concentraciones de trabajo de acetona iguales a o menores que 0,05 % y se utilizó como control un tratamiento con acetona. Bianco et al. (2013) determinaron que esta concentración de acetona no afecta la actividad de ChE, CE y GST de *C. gibbosa* con respecto a individuos del grupo control únicamente expuestos a agua deionada.

2.3.3 Registro de letalidad y signos de neurotoxicidad

En todos los bioensayos, una vez concluido el período de exposición, se realizó una inspección de cada individuo, registrando si estaba vivo y descartando aquellos que estaban muertos. Se consideraron como muertos aquellos no adheridos a los recipientes que no registraron movilidad luego de ser estimulados mecánicamente. La supervivencia por tratamiento se calculó como:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\sum \text{individuos vivos}}{\sum \text{individuos}} 100 \quad (2.1)$$

Para aquellos que estaban vivos, se registró también si estaban adheridos a las paredes de los recipientes y si su cabeza-pie se encontraba expuesto de manera conspicua sin movimiento espontáneo (signos de neurotoxicidad definidos en “1.3 *Chilina gibbosa*”). La adherencia y la exposición de la cabeza-pie por tratamiento se expresaron como:

$$\text{Adherencia (\%)} = \frac{\sum \text{individuos adheridos}}{\sum \text{individuos}} 100 \quad (2.2)$$

$$\text{Cabeza – pie expuesta (\%)} = \frac{\sum \text{individuos con cabeza – pie expuesta}}{\sum \text{individuos}} 100 \quad (2.3)$$

2.4 Obtención de muestras

2.4.1 Homogenatos de tejido blando total

Una vez terminados los registros de letalidad y signos de neurotoxicidad, se tomó cada individuo vivo y se lo anestesió en hielo durante 6 a 8 min antes de remover la concha cuidadosamente con pinzas de disección, también sobre hielo. Se retiró el exceso de fluidos del cuerpo con papel absorbente y se determinó la masa húmeda de los tejidos. La homogeneización se realizó en buffer Tris/HCl 20 mM, pH 7,5 con 0,5 mM EDTA, utilizando una proporción 1/10 (m/v) con un homogeneizador de tejido, tipo Potter-Elvehjem con émbolo de teflón adosado a un agitador rotativo (Precytec S.A.). Luego, se centrifugaron los homogenatos a 11.000 x g por 15 min a 4 °C, y se alicuotaron los sobrenadantes para su almacenamiento a -20 °C hasta el momento de realizar las determinaciones del contenido de proteínas y de las actividades enzimáticas.

2.4.2 Extracción de hemolinfa

Una vez terminados los registros de letalidad y signos de neurotoxicidad, se tomó cada individuo vivo y se lo anestesió en hielo durante 6 a 8 min. Con papel absorbente se lo limpió y se le retiró el exceso de fluidos previo a la extracción de hemolinfa. Luego, se perforó un pequeño agujero en la región anterior ventral de la concha, usando un bisturí con punta fina, bajo un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ645). En el agujero se insertó la aguja de una jeringa hipodérmica descartable (0,5 × 16 mm 25G 5/8) teniendo cuidado de no pinchar los órganos y se succionó la hemolinfa. Con este método, fue posible extraer, aproximadamente, 30 µL por individuo. La hemolinfa se mantuvo en hielo hasta finalizar la extracción. Para las determinaciones de contenido de proteína y de respuestas enzimáticas, se centrifugó la muestra a 5.000 x g durante 10 min a 4 °C y se almacenaron los sobrenadantes

resultantes a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para las respuestas del sistema inmune, la hemolinfa se utilizó inmediatamente finalizada la extracción.

2.5 Determinaciones de respuestas enzimáticas

Las determinaciones se realizaron utilizando técnicas espectrofotométricas con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A de doble haz. Todas las actividades enzimáticas se calcularon como actividades enzimáticas específicas, es decir, expresadas relativas a la concentración de proteínas (mg mL^{-1}) en los sobrenadantes de los homogenatos de muestras de tejido blando total o de las muestras de hemolinfa en los que fueron medidas (ver “2.4 Obtención de muestras”). Las actividades enzimáticas se presentan normalizadas a sus respectivos controles de agua o de acetona, según corresponde, como porcentajes. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método de Lowry et al. (1951) con seroalbúmina bovina como estándar y una dilución 1/30 de la muestra, según Bianco et al. (2013).

2.5.1 Actividad de ChE

Para determinar la actividad de ChE se utilizó el método de Ellman et al. (1961) (**Figura 2.5**). Este método se basa en la medición indirecta de la producción de tiocolina resultante de la hidrólisis de la acetiltiocolina (AsCh; sustrato) por parte de las ChE presentes en la muestra de interés. La tiocolina reacciona de manera continua con el reactivo 5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzoico (DTNB) presente en el medio y forma el dianión amarillo del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). La tasa de producción del TNB se estima a partir del cambio en absorbancia a 412 nm a lo largo del tiempo.

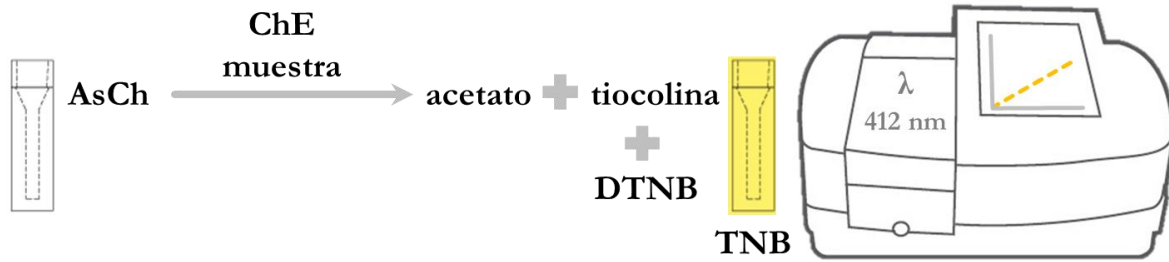


Figura 2.5 Esquema de la medición de la actividad de ChE utilizando el método de Ellman et al. (1961). AsCh: acetiltiocolina; DTNB: 5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzoico; TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzoico.

Las determinaciones en *C. gibbosa* se realizaron en las condiciones óptimas definidas por Bianco et al. (2013) para esta especie. En una microcubeta de plástico se colocaron 1,2 mL de buffer fosfato 100 mM (pH 8) con 0,2 mM de DTNB, 0,1 mL de AsCh 0,75 mM y 0,2 mL de sobrenadante de homogenato o 0,075 – 0,1 mL de sobrenadante de hemolinfa, según correspondiese. Se registró la absorbancia cada 10 s durante 60 s en simultáneo con una segunda cubeta que contenía la misma solución pero sin la muestra, lo que permitió corregir en el momento la posible hidrólisis espontánea del sustrato. La actividad se calculó a partir de la pendiente de la regresión de absorbancia vs tiempo utilizando el coeficiente de extinción molar del TNB, $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y se expresó como $\mu\text{moles}_{\text{TNB}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{proteína}}^{-1}$.

2.5.2 Actividad de CE

La actividad de CE se determinó utilizando el método descrito por Kristoff et al. (2010), basado en la hidrólisis de p-nitrofenil acetato (p-NFA) o p-nitrofenil butirato p-NFB por parte de las CE presentes en la muestra de interés. La tasa de formación del p-nitrofenol, compuesto amarillo producto de esta hidrólisis, se estimó a partir del cambio en absorbancia a 400 nm a lo largo del tiempo (**Figura 2.6**).

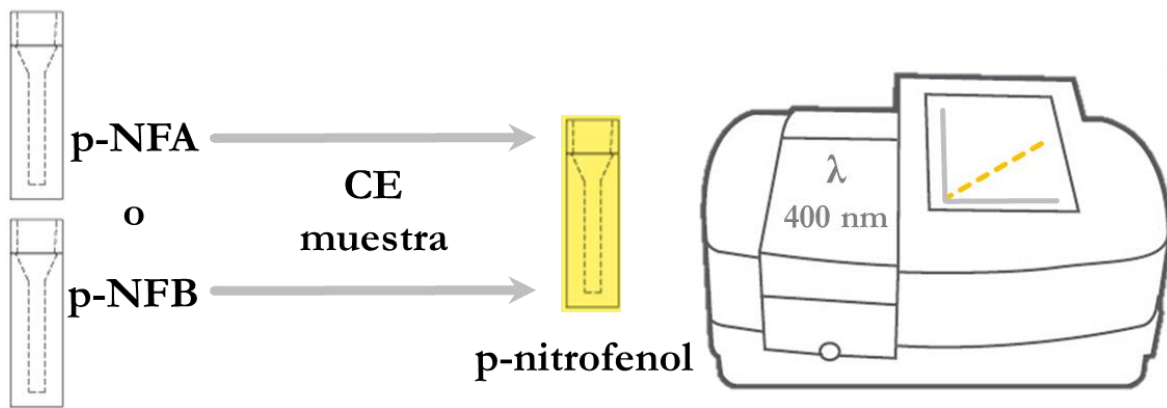


Figura 2.6 Esquema de la medición de la actividad de CE utilizando el método descrito por Kristoff et al. (2010). p-NFA: p-nitrofenil acetato; p-NFB: p-nitrofenil butirato.

Para *C. gibbosa*, las condiciones óptimas definidas por Bianco et al. (2013) y utilizadas en esta tesis fueron: 2,25 mL de buffer fosfato 100 mM (pH 8) con 5 % de acetona, 0,25 mL de p-NFA o 0,2 mL de p-NFB 1,5 mM y 0,15 mL de sobrenadante de homogenato o 0,075 – 0,1 mL de sobrenadante de hemolinfa, según correspondiese. La absorbancia se registró en macrocubeta de vidrio cada 10 s durante 60 s en simultáneo con otra cubeta sin la muestra (corrección de posible hidrólisis espontánea del sustrato). Se utilizó el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol, $18,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para calcular la actividad de CE a partir de la pendiente de la regresión de absorbancia vs tiempo, y expresarla como $\mu\text{moles}_{\text{p-nitrofenol}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{proteína}}^{-1}$.

2.5.3 Actividad de GST

Para la actividad de GST, se utilizó el método descrito por Habig et al. (1974), según el cual se mide la absorbancia a 340 nm del compuesto S-(2,4-dinitrofenil) glutatión (DNP-SG), producto de la conjugación del 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) con glutatión reducido (GSH) catalizada por las GST presentes en la muestra de interés (**Figura 2.7**).

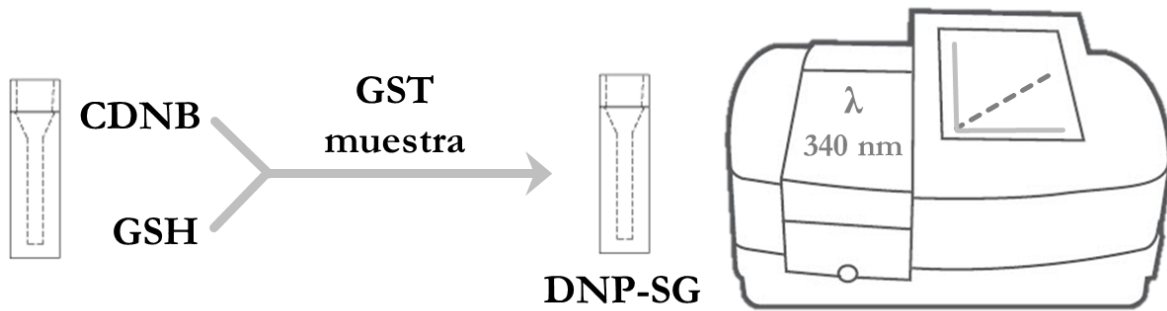


Figura 2.7 Esquema de la medición de la actividad de GST utilizando el método descrito por Habig et al. (1974). CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno; GSH: glutatión; DNP-SG: S-(2,4-dinitrofenil) glutatión.

Se siguieron las modificaciones al método descritas por Bianco et al. (2013). En cubeta de cuarzo, la reacción se realizó con 2,6 mL de buffer fosfato 100 mM (pH 6,5), 0,1 mL de CDNB 1 mM, 0,3 mL de GSH 1 mM y 0,01 mL de la muestra. La absorbancia se registró en macrocubeta de cuarzo cada 10 s durante 60 s en simultáneo con otra cubeta sin la muestra. Se utilizaron la pendiente de la regresión de absorbancia vs tiempo y el coeficiente de extinción molar del DNP-SG, $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, para calcular la actividad de GST, que luego se expresó como $\mu\text{moles}_{\text{DNP-SG}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{proteína}}^{-1}$.

2.6 Análisis estadístico

Para cada ensayo, se corroboró que la concentración de proteínas no difiriera significativamente entre los tratamientos mediante ANOVA de 1 factor, antes de calcular la actividad específica de cada enzima. Para todos los análisis realizados, se corroboró que los datos cumplieran los supuestos requeridos por las pruebas estadísticas utilizadas. Normalidad se corroboró con las pruebas de Shapiro-Wilks o Kolmogorov-Smirnov (para $N \leq 6$). Para la homogeneidad de varianzas se utilizaron las pruebas de Bartlett o F para comparación de varianzas (Green et al., 2018). En caso de no cumplirse los supuestos, se transformaron los datos con las funciones $\log(y)$ o $\arcseno(\sqrt{y})$, según correspondiese. Si los datos transformados tampoco cumplían con los supuestos, se utilizaron pruebas no paramétricas. El

nivel de significancia global se estableció en 0,05. Los análisis se realizaron con el programa estadístico GraphPad Prism versión 5.01 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

2.7 Higiene y seguridad

La manipulación de los insecticidas en su forma sólida se realizó bajo campana utilizando guantes y mascarilla. Las soluciones madre se utilizaron bajo campana. Todo el material de vidrio y no descartable que estuvo en contacto con las soluciones de insecticidas se descontaminó por degradación sumergiéndolo en una solución de NaOH al 10 %, pH 14, durante 48 h o una semana, según la estabilidad de cada compuesto. Las soluciones con insecticidas sobrantes, el agua de lavado de los instrumentos, los individuos expuestos a insecticidas y el material descartable utilizado se descartaron según los protocolos del Servicio de Higiene y Seguridad de la FCEN, UBA, en el EAIN, y del INIBIOMA, en el LEA.

3 Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

3.1 Introducción

El objetivo del primer estudio toxicológico llevado a cabo con *C. gibbosa* como especie de prueba realizado por Bianco et al. (2013) fue investigar los efectos de MAZ. El trabajo se basó en ensayos de toxicidad en los que se expuso a los individuos de *C. gibbosa* a concentraciones crecientes del insecticida en un intervalo entre 0 y 5.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ y se realizó la caracterización de las respuestas de las B-esterasas en tejido blando total. Como resultado, obtuvieron para las respuestas de ChE y CE, medida con p-NFA y p-NFB como sustratos, los siguientes puntos finales: la concentración que se estima afecta al 50 % de los individuos de un ensayo (CI_{50}), la mayor concentración a la que no se registra efecto (*No Observed Effect Concentration*, NOEC) y la menor concentración a la que se registra efecto (*Lowest Observed Effect Concentration*, LOEC). Estos son descriptores de toxicidad rutinariamente utilizadas en ecotoxicología para comparar la sensibilidad de una determinada respuesta de una especie a un tóxico con respecto a otras respuestas, otros tóxicos e incluso otras especies. Este tipo de bioensayos permite estudiar la relación concentración respuesta que refleja la variabilidad biológica, ya que para cada especie, cada contaminante, y cada biomarcador en particular, existen individuos con diferentes niveles de sensibilidad o tolerancia (Sparling, 2016).

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

El objetivo de la CI_{50} es el de estimar la concentración que produce un cambio porcentual específico (aumento o disminución, según corresponda) en la respuesta medida, en comparación con la respuesta media del grupo control (Green et al., 2018). En este caso, la concentración que produce una inhibición en el 50 % de los individuos expuestos. Se estima a partir de modelos de regresión que permiten identificar la forma matemática específica para la relación entre la respuesta media y la concentración que la produce, es decir entre exposición y respuesta. De esta manera, es posible identificar el nivel de exposición (concentración) que causa un efecto adverso biológicamente significativo (por ejemplo, inhibición de ChE) bajo las condiciones experimentales de cada ensayo (Green et al., 2018). Para *C. gibbosa* expuesto a MAZ, Bianco et al. (2013) estimaron la CI_{50} de ChE como $0,02 \pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, la de CE medida con p-NFB $1.300 \pm 100 \mu\text{g L}^{-1}$ y la de CE medida con p-NFA $1.290 \pm 40 \mu\text{g L}^{-1}$.

La NOEC es el descriptor de toxicidad más utilizado comúnmente tanto en la bibliografía, como en el marco regulatorio (Harris et al., 2014). Se define en función de la LOEC, la menor concentración ensayada que resulta en un efecto adverso significativo estadísticamente. La NOEC es la concentración más alta por debajo de la LOEC (Green et al., 2018). Es importante recordar, al utilizar los valores de NOEC o LOEC para comparar sensibilidades, que no son estimaciones, sino que se trata de concentraciones ensayadas. Por lo tanto, dependen del diseño experimental por el cual fueron determinadas. Bianco et al. (2013) determinaron la NOEC de ChE como $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$ y la de CE 500 y $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$, medida con p-NFB y p-NFA, respectivamente. Los puntos finales informados (CI_{50} y NOEC) permitieron concluir que las ChE de *C. gibbosa* son destacadamente más sensibles a MAZ que las CE. A su vez, que la sensibilidad de las CE de *C. gibbosa* es mayor medida con p-NFB que con p-NFA.

Esta combinación de alta sensibilidad de ChE (NOEC $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$; CI_{50} $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$) y baja sensibilidad de CE (p-NFB: NOEC $500 \mu\text{g L}^{-1}$, CI_{50} $1.300 \mu\text{g L}^{-1}$; p-NFA: NOEC

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, CI_{50} 1.290 $\mu\text{g L}^{-1}$) correlacionó con los severos signos de neurotoxicidad descritos en la sección de la sección 1.3 de la “Introducción general”. Bianco et al. (2013) identificaron y reportaron estos signos en el 100 % de los individuos expuestos a concentraciones de MAZ iguales o mayores que 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$. A raíz de esto, propusieron que la sensibilidad de los signos de neurotoxicidad en *C. gibbosa* podría estar relacionada con que las CE en esta especie tiene menor sensibilidad que ChE y, por lo tanto, no protegen a esta enzima de los efectos tóxicos de MAZ.

La sensibilidad y facilidad de detección de los signos de neurotoxicidad en *C. gibbosa*, en particular la conspicua protrusión de la cabeza-pie, sugieren que podrían utilizarse como señales de alarma temprana, y a esta especie como bioindicadora. Además, estos signos tienen una importante relevancia ecológica, ya que la falta de adherencia a superficies y de movimiento espontáneo en su hábitat natural, podría representar evidentes dificultades para *C. gibbosa* para evitar la deriva con la corriente, alimentarse o reproducirse, con las posibles consecuencias a niveles poblacionales y de estructura de comunidades de macroinvertebrados que esto podría tener. Por lo tanto, resulta importante establecer si estos signos de neurotoxicidad y su correlación con la alta sensibilidad de ChE y baja sensibilidad de CE son específicos para MAZ o son comunes a otros OF o a carbamatos y OF, ya que comparten el mismo mecanismo de acción, o si se trata de respuestas generalizadas de *C. gibbosa* frente a la exposición a tóxicos.

Hipótesis

CPF y CAR producen signos de neurotoxicidad y afectan la actividad de ChE, CE y GST en homogenatos de tejido blando total de *C. gibbosa*.

La inhibición de ChE en homogenatos de tejido blando total de *C. gibbosa* es un biomarcador específico para insecticidas anticolinesterásicos.

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

Los signos de neurotoxicidad y la actividad de CE y GST en homogenatos de tejido blando total de *C. gibbosa*, pero no la actividad de ChE, se ven afectados por la exposición a ACP y pueden usarse como biomarcadores de exposición.

Objetivo

Estudiar los signos de neurotoxicidad y las respuestas de ChE, CE y GST en homogenatos de tejido blando total de *C. gibbosa* frente a la exposición a los insecticidas CPF, CAR y ACP, y determinar su especificidad por comparación con los efectos reportados para el insecticida MAZ y entre los plaguicidas estudiados en esta tesis.

Predicciones

- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CPF disminuye su adherencia al sustrato y genera la protrusión conspicua de la cabeza-pie.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CPF inhibe la actividad de ChE en homogenatos de tejido blando total de manera concentración-dependiente.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CPF inhibe la actividad de CE (medida con p-NFB o con p-NFA) en homogenatos de tejido blando total.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CPF aumenta la actividad de GST en homogenatos de tejido blando total.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CAR disminuye su adherencia al sustrato y genera la protrusión conspicua de la cabeza-pie.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CAR inhibe la actividad de ChE en homogenatos de tejido blando total de manera concentración-dependiente.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CAR inhibe la actividad de CE (medida con p-NFB o con p-NFA) en homogenatos de tejido blando total.

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CAR aumenta la actividad de GST en homogenatos de tejido blando total.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a ACP disminuye su adherencia al sustrato y genera la protrusión conspicua de la cabeza-pie.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a ACP no inhibe la actividad de ChE en homogenatos de tejido blando total.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a ACP aumenta la actividad de CE (medida con p-NFB o con p-NFA) en homogenatos de tejido blando total.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a ACP aumenta la actividad de GST en homogenatos de tejido blando total.

3.2 Metodología

3.2.1 Diseño experimental

Los bioensayos consistieron en la exposición aguda a concentraciones crecientes de CPF, CAR y ACP, para cada uno por separado. Para cada insecticida, primero se realizó un bioensayo en el cual se evaluó un intervalo amplio de concentraciones. En este intervalo se incluyeron concentraciones bajas, intermedias y altas, utilizando como referencia las esperables en el ambiente, las recomendadas para la protección de la biota acuática en Argentina y los antecedentes de las respuestas de *C. gibbosa* a MAZ (Anderson et al., 2013; Bianco et al., 2013; Carra et al., 2014; Loewy et al., 2011; Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005b, 2000a). No se contaba con información previa sobre la toxicidad de CPF y ACP sobre las respuestas de interés en *C. gibbosa*. Para CAR, se incluyó $13 \mu\text{g L}^{-1}$ porque se contaba con resultados preliminares de toxicidad para esa concentración (Boburg, 2017). Según los resultados obtenidos en el primer ensayo, para cada insecticida se

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

realizaron ensayos sucesivos en los cuales se incorporaron, omitieron o repitieron concentraciones, para encontrar los puntos finales deseados, en particular las CI_{50} y NOEC de ChE y CE. En todos los casos se incluyó el tratamiento control correspondiente. Los resultados de los distintos ensayos para un mismo insecticida se combinaron para obtener la relación final de cada variable. Para CPF, el intervalo final luego de 3 ensayos fue de 10 a $7.500 \mu\text{g L}^{-1}$ (concentraciones evaluadas: 10, 50, 100, 500, 1.000, 5.000 y $7.500 \mu\text{g L}^{-1}$). En el caso de CAR, también se realizaron 3 ensayos y el intervalo final fue de 0,05 a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (concentraciones evaluadas: 0,5, 1, 5, 13, 25, 50, 100 y $500 \mu\text{g L}^{-1}$). Para ACP, fue de 1 a $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$ (2 ensayos; concentraciones evaluadas: 1, 10, 100, 500, 1.000, 1.500, $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$).

En cada bioensayo, los individuos se colocaron de manera individual en recipientes de vidrio de 250 mL de capacidad, con 150 mL de la solución correspondiente según el nivel de exposición asignado, con un total de ocho individuos por concentración de insecticida por ensayo (**Figura 3.1**). Luego de combinar los ensayos para un mismo insecticida, el número final de u.e. de cada concentración varió entre 6 y 32 individuos según la cantidad de veces que se repitió cada concentración y según la supervivencia en cada caso. Para CPF y CAR se usaron controles de acetona del 0,01 % y 0,05 %, respectivamente; para ACP se utilizó un control de agua deionada (según “2.3.2 Soluciones de insecticidas”).

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

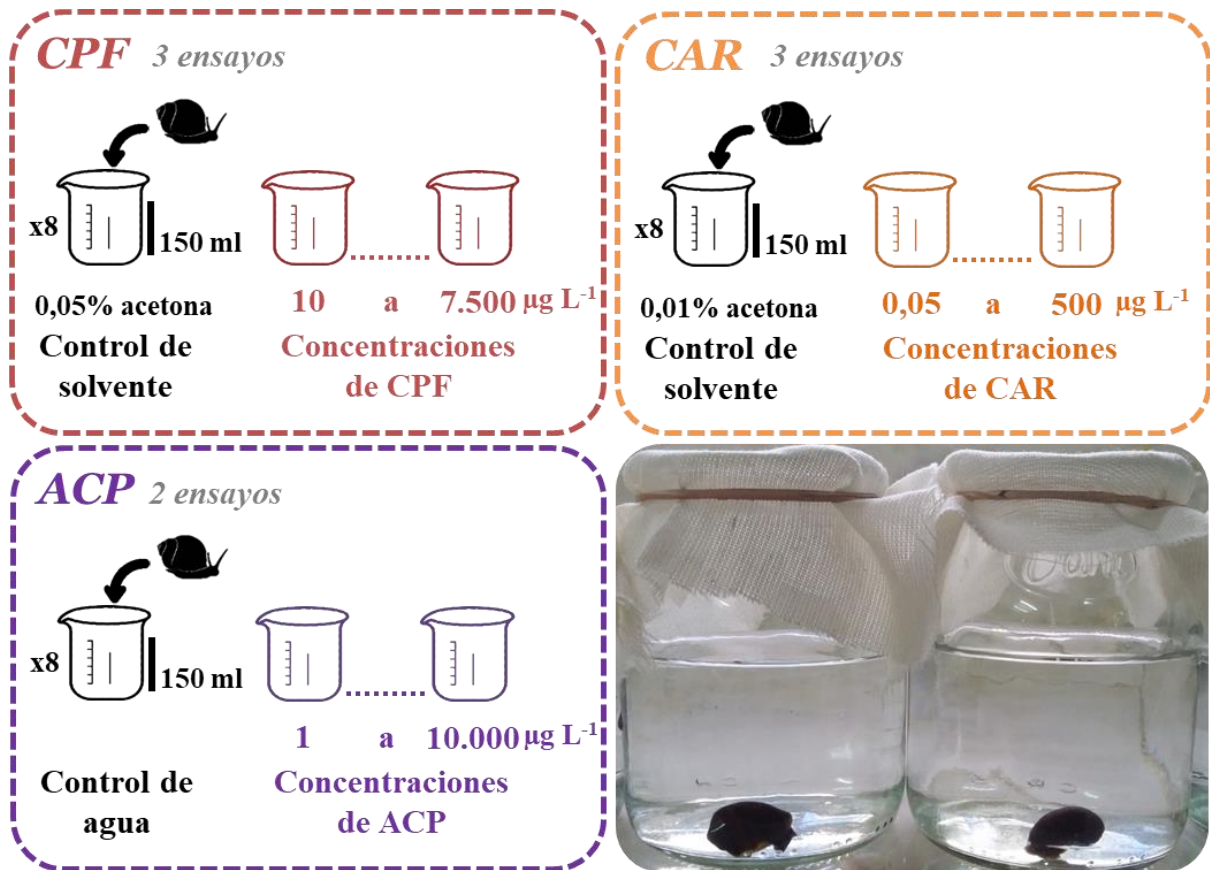


Figura 3.1 Esquemas y fotografía de la metodología utilizada para evaluar los signos de neurotoxicidad y las respuestas de ChE, CE, GST en homogenatos de tejido blando total de *Chilina gibbosa* a la exposición aguda a concentraciones crecientes de CPF, CAR y ACP.

Finalizadas las 48 h de exposición, se registraron la letalidad y los signos de neurotoxicidad y se realizó el homogenato de tejido blando total para cada individuo. En los sobrenadantes, se midieron las siguientes variables: contenido de proteínas y actividad de ChE, actividad de CE medida con p-NFA y con p-NFB y actividad de GST. En los casos en los que fue posible, se estimaron los siguientes puntos finales: CI_{50} , NOEC y LOEC. Las condiciones generales de estos bioensayos corresponden a las descritas para EAIN en el Capítulo 2 “Metodología general”.

3.2.2 Análisis estadístico

Antes de combinar los resultados de los diferentes ensayos para un mismo insecticida, se corroboró que no existieran diferencias entre los grupos control. Se utilizó una prueba t de

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

Student para muestras independientes o un ANOVA de 1 factor, según la cantidad de ensayos.

Con el objetivo de estimar los puntos finales LOEC y NOEC, se contrastaron los resultados de los grupos expuestos a las diferentes concentraciones contra los de los grupos control. Se utilizaron las pruebas estadísticas recomendadas por Green et al. (2018) y Newman (2013) a partir de guías de la EPA y la OECD, según si los datos cumplían los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas siguiendo el esquema de la **Figura 3.2**. La letalidad, adherencia y exposición de la cabeza-pie se evaluaron utilizando la Prueba exacta de Fisher (Green et al., 2018). El nivel de significancia de los contrastes se ajustó según la corrección de Bonferroni-Holm para mantener el nivel de significancia global en 0,05 (Green et al., 2018). Se informan los valores de P modificados.

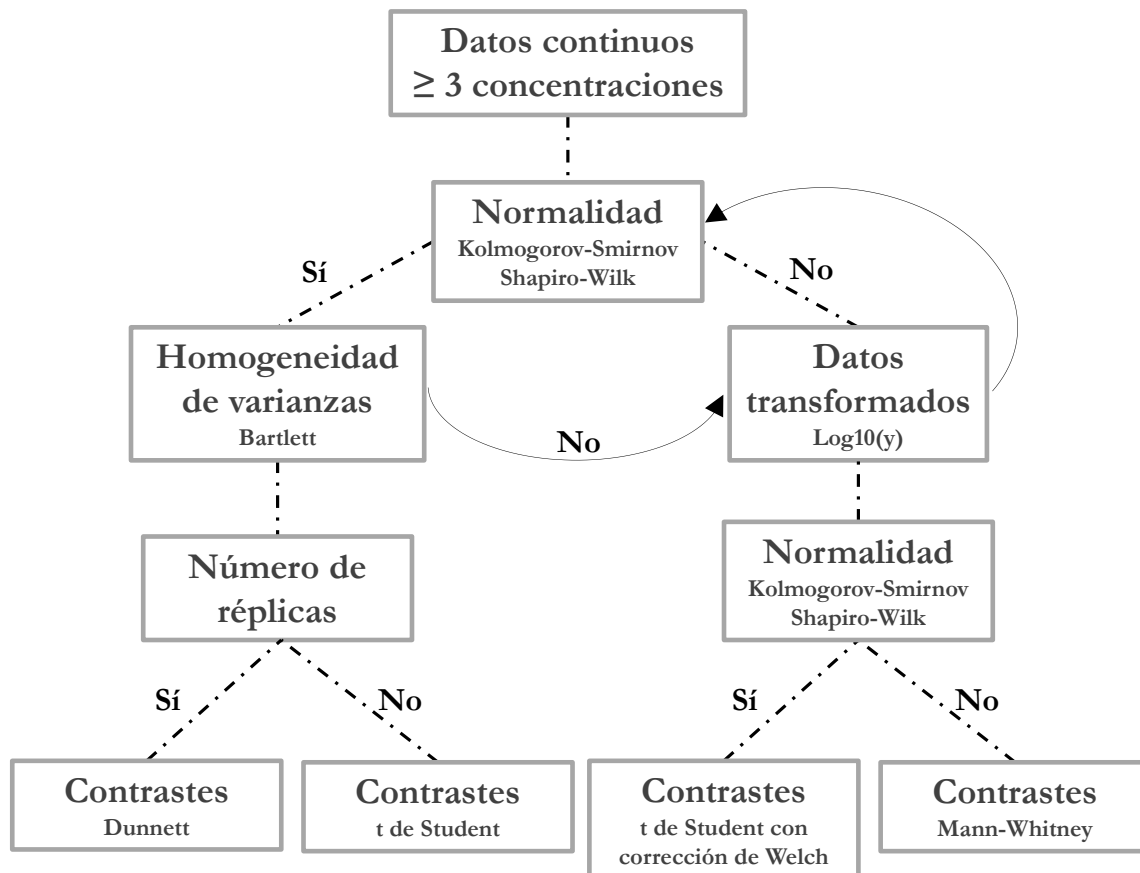


Figura 3.2. Esquema del análisis de datos utilizados para determinar LOEC y NOEC. Adaptado de Green et al. (2018a) y Newman (2013).

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

Para aquellas respuestas que mostraron un comportamiento concentración-dependiente para el intervalo de concentraciones evaluado, se estimaron las CI_{50} por medio de regresiones no lineales, ajustando los datos con un modelo log-logístico de cuatro parámetros según la siguiente ecuación:

$$y = \frac{100}{1 + 10^{(\log x_0 - x)p}} \quad (3.1)$$

donde y corresponde a la actividad de la enzima normalizada con respecto al promedio de la respuesta del grupo control, x es la concentración del insecticida, y p indica la inclinación de la curva concentración-respuesta; el parámetro x_0 corresponde a la concentración a la cual la respuesta está en el medio entre el límite inferior y el límite superior de la estimación (Motulsky y Christopoulos, 2003; Ritz, 2010). La CI_{50} absoluta se calculó con la ecuación (3.1) con los parámetros estimados, considerando $y = 50$, la concentración a la cual hay una respuesta exacta del 50 %. Se informa la estimación de cada CI_{50} obtenida junto con los correspondientes intervalos de confianza del 95 %.

3.3 Resultados

Clorpirifos

Para todas las concentraciones evaluadas de CPF, la supervivencia fue mayor que el 96 % (**Figura 3.3 A**). Por lo tanto, se trabajó sólo con concentraciones subletales de este insecticida para *C. gibbosa*.

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

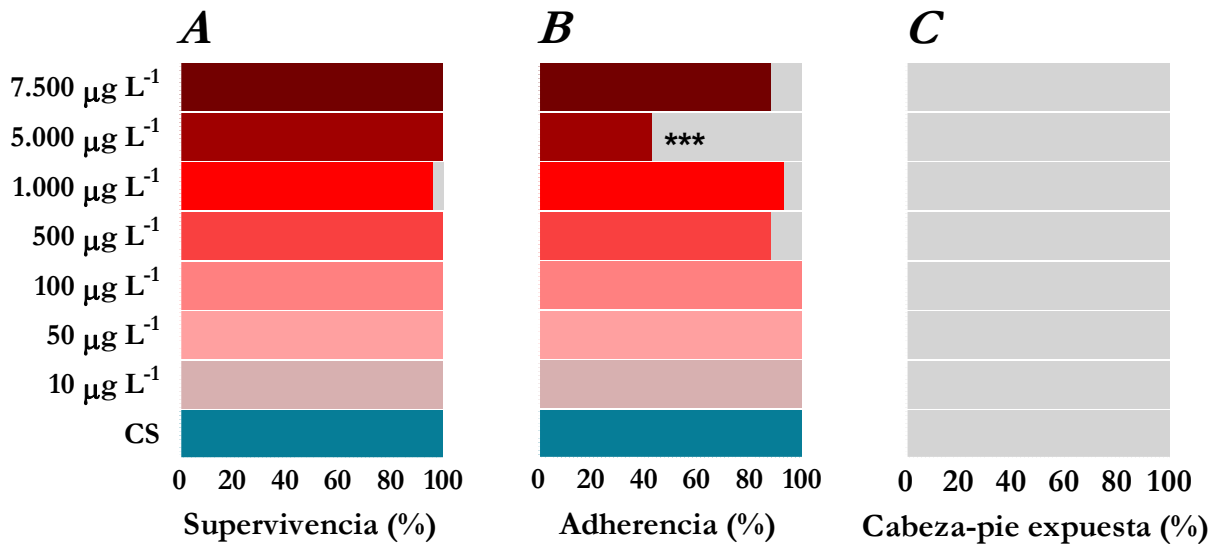


Figura 3.3 Porcentajes de supervivencia (A) y de los signos de neurotoxicidad adherencia (B) y exposición conspicua de la cabeza-pie (C), de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de CPF (entre 10 y 7.500 µg L⁻¹). CS: control de solvente; acetona 0,05 %. Asteriscos: diferencias con el grupo control; ***P < 0,001.

La adherencia disminuyó a concentraciones iguales o superiores a 500 µg L⁻¹ (**Figura 3.3 B**). En términos generales, esta disminución fue menor que el 15 % y no se encontraron diferencias con el grupo control, aunque a la concentración de 5.000 µg L⁻¹, la adherencia disminuyó aproximadamente 60 % con respecto al grupo control, de manera significativa (Prueba exacta de Fisher; P < 0,0001). No se registró exposición de la cabeza-pie a ninguna concentración (**Figura 3.3 C**).

Con respecto a las respuestas enzimáticas, CPF inhibió la actividad de ChE de manera concentración dependiente (**Figura 3.4**). La LOEC se determinó como 100 µg L⁻¹, con una actividad de 70 ± 15 % relativa al grupo control y la NOEC como 50 µg L⁻¹, con una actividad de 90 ± 18 % (**Figura 3.4 A**; contrastes contra el control con prueba t de Student sobre datos transformados log(y); LOEC P < 0,0001; NOEC P = 0,755).

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

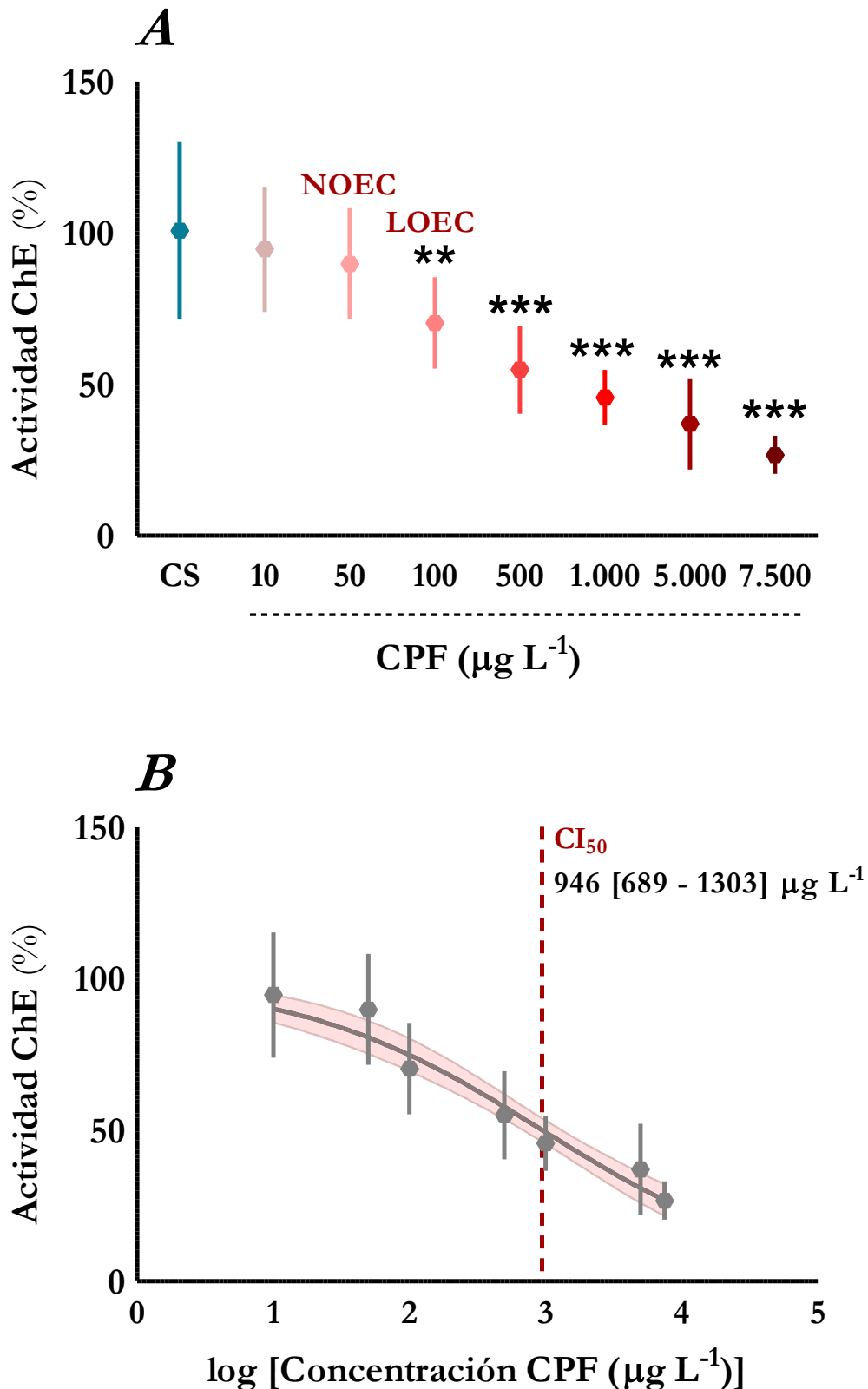


Figura 3.4 Respuesta de ChE en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de CPF (entre 10 y 7.500 µg L⁻¹). Porcentaje con respecto al control **A** en función de la concentración de CPF para la determinación de NOEC y LOEC y **B** en función del logaritmo de la concentración para la estimación de la CI₅₀ mediante regresión logística. CS: control de solvente; acetona 0,05 %. Puntos y líneas: media ± desvío estándar. Bandas alrededor de la curva: intervalo de confianza del ajuste. Corchetes: intervalo de confianza de la CI₅₀. Asteriscos: diferencias con el control; ***P < 0,001; **P < 0,01.

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

La respuesta de ChE se ajustó con una regresión logística de 4 parámetros (**Tabla 3.1**) y, a partir del modelo ajustado, se estimó la CI_{50} 946 [689 – 1.303] $\mu\text{g L}^{-1}$ (**Figura 3.4 B**).

Tabla 3.1 Valores de los parámetros ajustados con el modelo log-logístico de cuatro parámetros que estima la CI_{50} de la respuesta concentración dependiente de ChE de *Chilina gibbosa* a CPF.

Insecticida	Respuesta	x_0 log($\mu\text{g L}^{-1}$)	P	R^2
CPF	ChE	0,06939 [2,838 – 3,115]	-0,4843 [-0,5903 – -0,3783]	0,6882

En cuanto a la actividad de CE, no se observó una respuesta concentración dependiente con ninguno de los dos sustratos utilizados y la actividad no difirió entre los individuos de grupos expuestos y los del grupo control (**Figura 3.5 A** p-NFB **B** p-NFA; contrastes contra el control con prueba t de Student; $P > 0,05$). Bajo estas condiciones experimentales, las LOEC para estas respuestas se encontrarían a concentraciones de CPF mayores que $7.500 \mu\text{g L}^{-1}$.

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

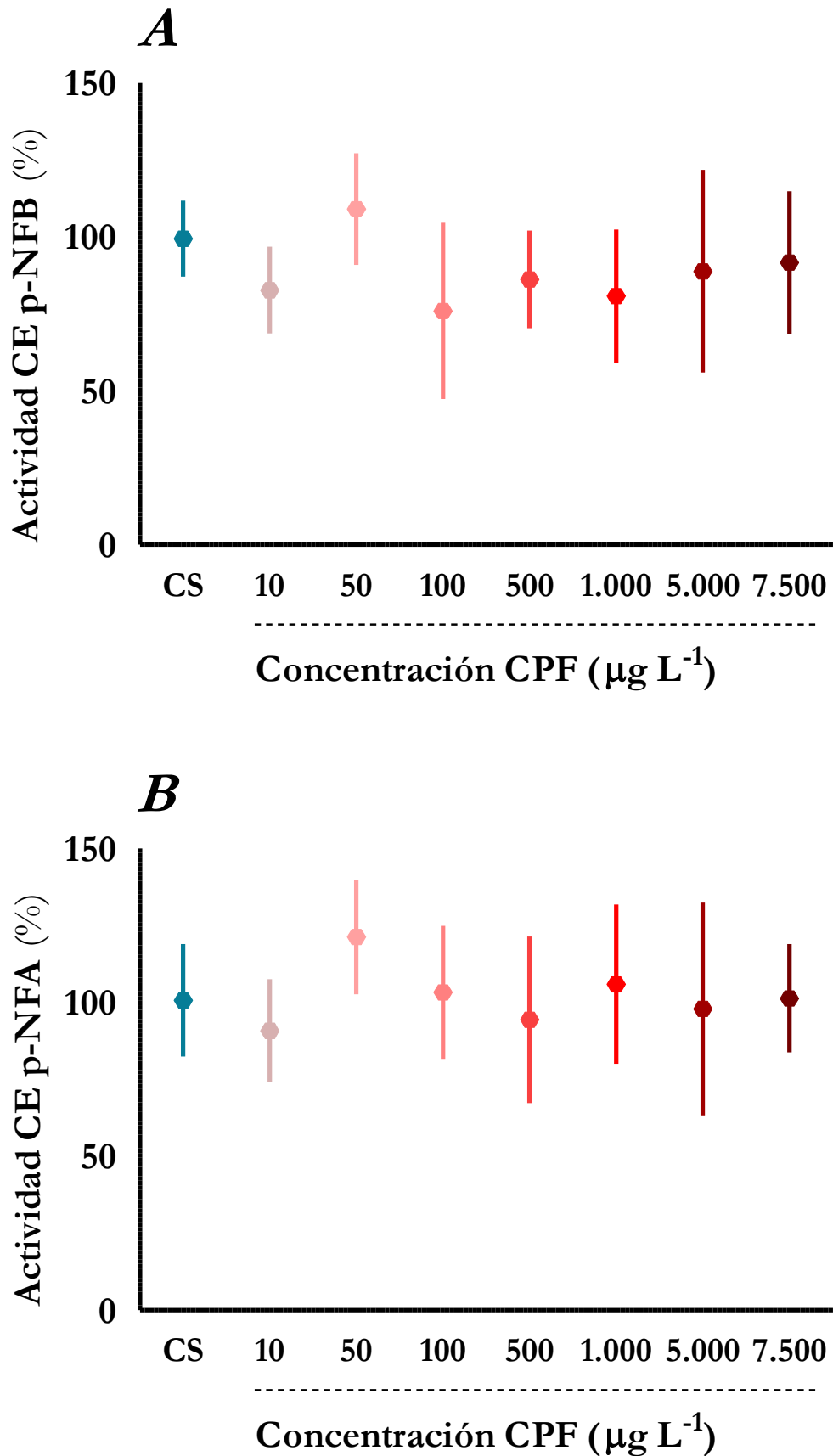


Figura 3.5 Respuesta de CE medida con A p-NFB y B p-NFA en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de CPF (entre 10 y 7.500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Porcentaje con respecto al control en función de la concentración de CPF. CS: control de solvente; acetona 0,05 %. Puntos y líneas: media \pm desvío estándar.

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

La respuesta de GST tampoco difirió entre los individuos expuestos a CPF y los del grupo control (**Figura 3.6**; contrastes contra el control con prueba de Mann Whitney; $P > 0,05$). La LOEC para esta respuesta también se encontraría a concentraciones de CPF mayores que $7.500 \mu\text{g L}^{-1}$.

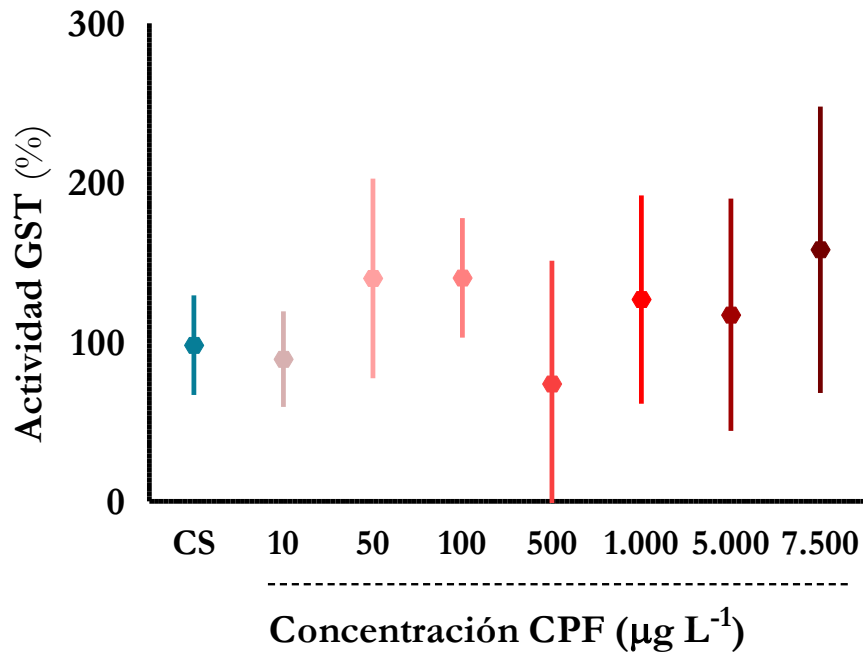


Figura 3.6 Respuesta de GST en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de CPF (entre 10 y $7.500 \mu\text{g L}^{-1}$). Porcentaje con respecto al control en función de la concentración de CPF. CS: control de solvente; acetona $0,05\%$. Puntos y líneas: media \pm desvío estándar. Asterisco: diferencias con el control; $*P < 0,05$.

Carbarilo

No se registró letalidad a ninguna de las concentraciones evaluadas de CAR, confirmando que las concentraciones dentro de este intervalo son subletales para *C. gibbosa*. (**Figura 3.7 A**). La adherencia fue mayor que el 85% , salvo a la concentración más alta ($500 \mu\text{g L}^{-1}$), a la cual fue del 75% , pero no difirió estadísticamente de la observada para el grupo control a ninguna concentración (**Figura 3.7 B**; Prueba exacta de Fisher; $P > 0,05$). La adherencia en el control de solvente fue del 91% . Con este insecticida, se observó un individuo con la cabeza-pie expuesta en el grupo expuesto a $25 \mu\text{g L}^{-1}$ y un 25% de

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

individuos con la cabeza-pie expuesta en los expuestos a $500 \mu\text{g L}^{-1}$, que coincidió con la falta de adherencia (**Figura 3.7 B**).

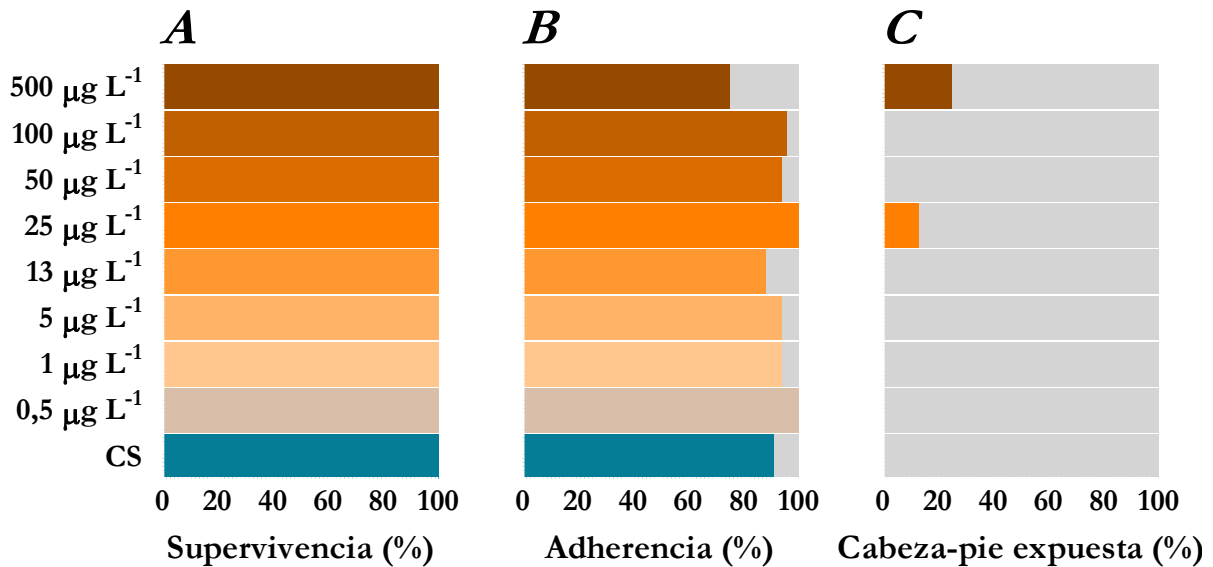
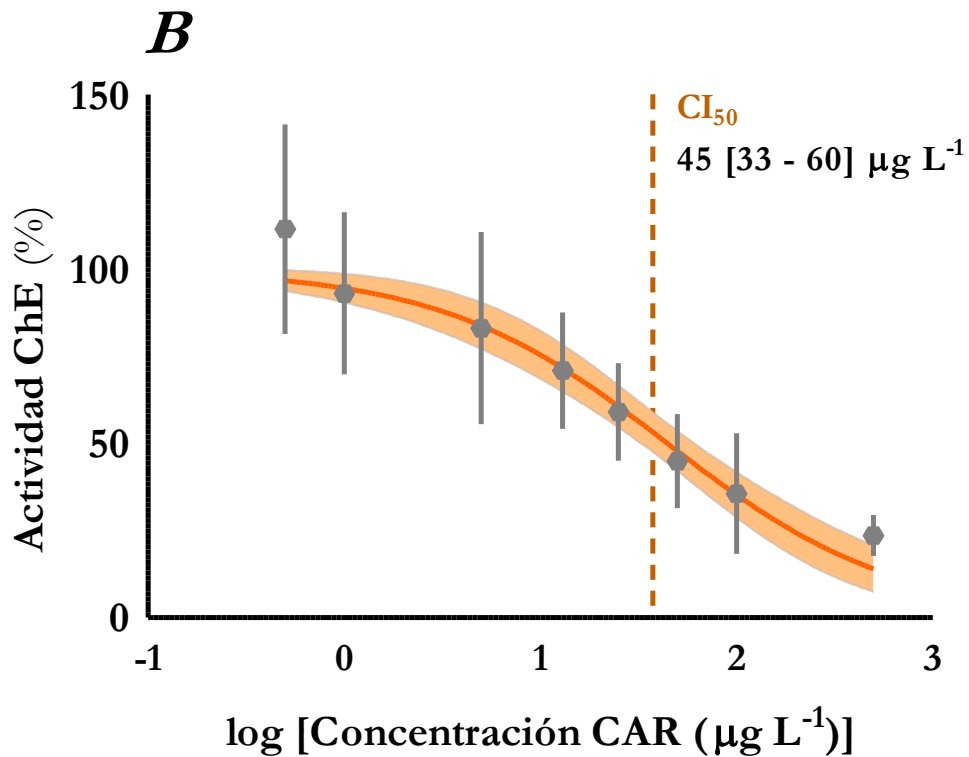
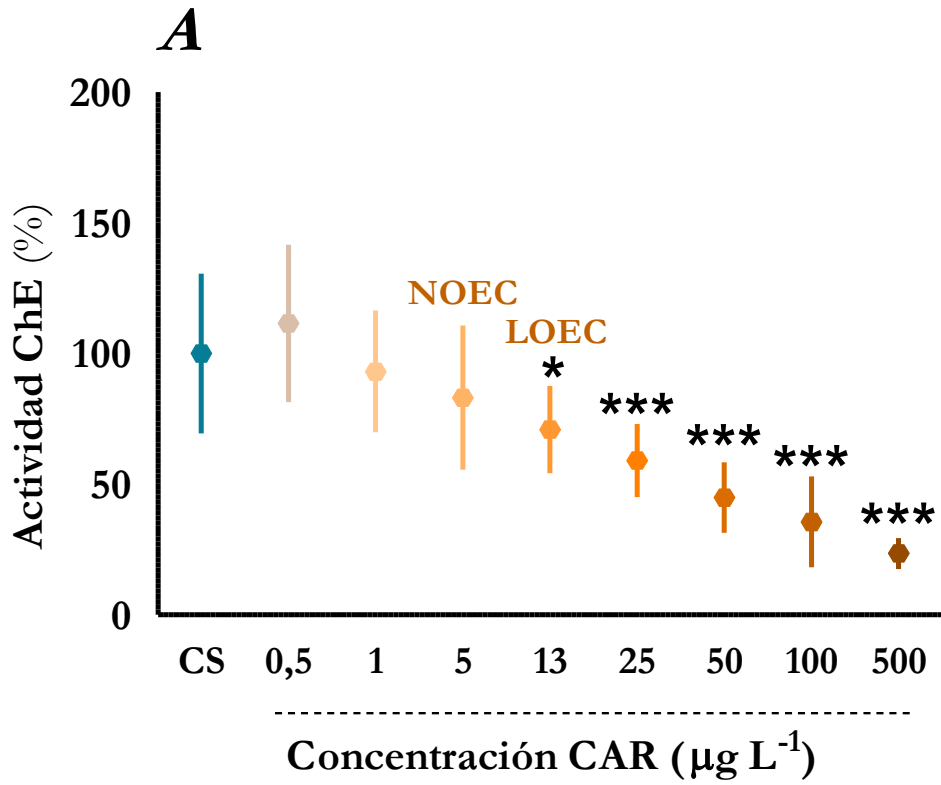


Figura 3.7 Porcentajes de supervivencia (A) y de los signos de neurotoxicidad adherencia (B) y exposición conspicua de la cabeza-pie (C), de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de CAR (entre $0,5$ y $500 \mu\text{g L}^{-1}$). CS: control de solvente; $0,01\%$ acetona. Asteriscos: diferencias con el control.

CAR tuvo un efecto inhibitorio concentración dependiente sobre la actividad de ChE (**Figura 3.8**). Se pudieron determinar los puntos finales LOEC $13 \mu\text{g L}^{-1}$ y NOEC $5 \mu\text{g L}^{-1}$ con actividades relativas al grupo control de $71 \pm 17\%$ y $83 \pm 28\%$, respectivamente (**Figura 3.8 A**; contrastes contra el control con prueba de Mann Whitney; LOEC $P = 0,0388$; NOEC $P = 0,258$).

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total



Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

Figura 3.8 Respuesta de ChE en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de CAR (entre 0,5 y 500 µg L⁻¹). Porcentaje con respecto al control **A** en función de la concentración de CAR para la determinación de NOEC y LOEC y **B** en función del logaritmo de la concentración para la estimación de la CI₅₀ mediante regresión logística. CS: control de solvente; acetona 0,05 %. Puntos y líneas: media ± desvío estándar. Bandas alrededor de la curva: intervalo de confianza del ajuste. Corchetes: intervalo de confianza de la CI₅₀. Asteriscos: diferencias con el control; ***P < 0,001; *P < 0,05.

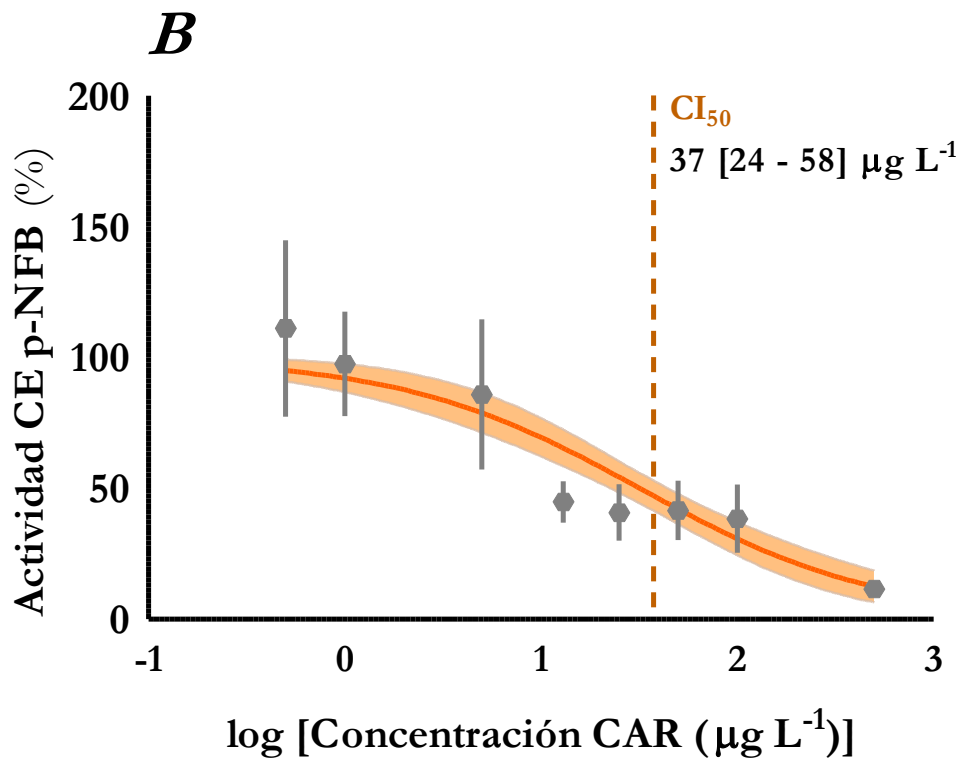
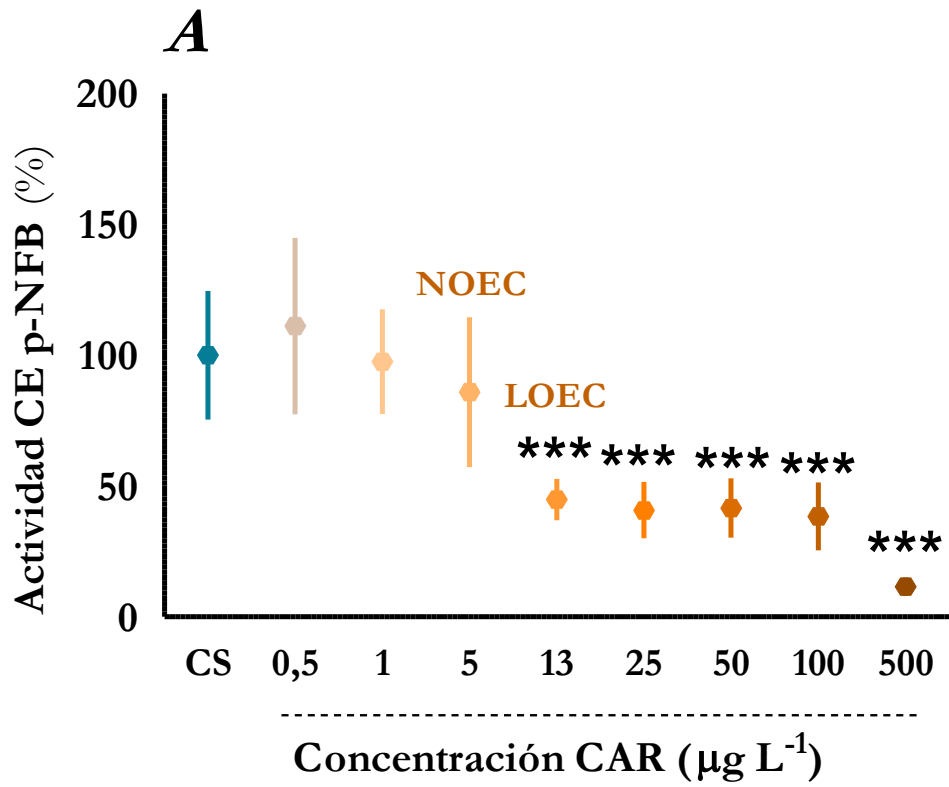
A partir del ajuste de los resultados de ChE mediante una regresión logística de 4 parámetros (**Tabla 3.2**), se estimó la CI₅₀ 45 [33 – 61] µg L⁻¹ (**Figura 3.8 B**).

Tabla 3.2 Valores de los parámetros ajustados del modelo log-logístico de cuatro parámetros que estima la CI₅₀ de la respuesta concentración dependiente de ChE de *Chilina gibbosa* a CPF.

Insecticida	Respuesta	x_0 log(µg L ⁻¹)	P	R^2
CAR	ChE	0,06716 [1,517 – 1,784]	-0,7669 [-0,9796 to -0,5541]	0,6343

En el caso de la actividad de CE medida con p-NFB, también se observó una inhibición que aumentó con la concentración de CAR (**Figura 3.9**). Se determinaron los puntos finales, LOEC 13 µg L⁻¹ (29 ± 8 % actividad relativa al control) y NOEC 5 µg L⁻¹ (86 ± 45 % actividad relativa al control) (**Figura 3.9 A**; prueba t de Student sobre datos transformados log(y); LOEC P < 0,0001; NOEC P = 0,387).

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total



Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

Figura 3.9 Respuesta de CE medida con p-NFB en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de CAR (entre 0,5 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Porcentaje con respecto al control **A** en función de la concentración de CAR para la determinación de NOEC y LOEC y **B** en función del logaritmo de la concentración para la estimación de la CI_{50} mediante regresión logística. CS: control de solvente; acetona 0,05 %. Puntos y líneas: media \pm desvío estándar. Bandas alrededor de la curva: intervalo de confianza del ajuste. Corchetes: intervalo de confianza de la CI_{50} . Asteriscos: diferencias con el control; ***P < 0,001.

También fue posible ajustar esta respuesta mediante una regresión logística de 4 parámetros y se estimó el punto final CI_{50} 37 [24 – 58] $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabla 3.3; Figura 3.9 B).

Tabla 3.3 Valores de los parámetros ajustados del modelo log-logístico de cuatro parámetros que estima la CI_{50} de la respuesta concentración dependiente de ChE de *Chilina gibbosa* a CPF.

Insecticida	Respuesta	x_0 log($\mu\text{g L}^{-1}$)	P	R^2
CAR	CE p-NFB	1,574 [1,383 to 1,764]	-0,887 [-1,277 to -0,4970]	0,5048

En el caso de la respuesta de CE medida con p-NFA, CAR inhibió la actividad enzimática $26 \pm 6\%$ a la concentración más alta evaluada ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) (Figura 3.10), y se determinaron NOEC $100 \mu\text{g L}^{-1}$ y LOEC $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (prueba t de Student con corrección de Welch; LOEC P < 0,0001; NOEC P = 0,387).

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

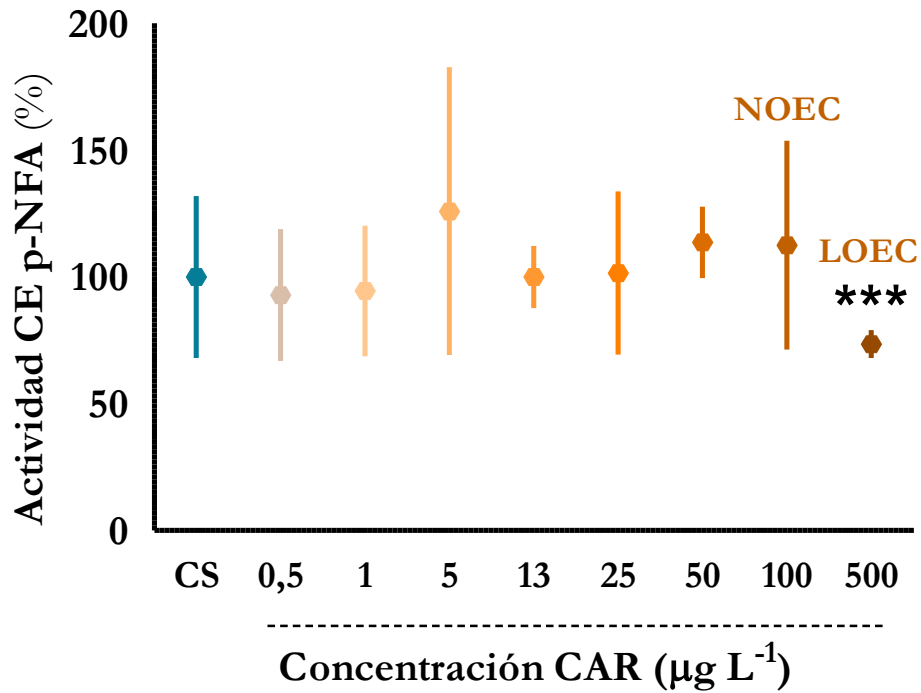


Figura 3.10 Respuesta de CE medida con p-NFA en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de CAR (entre 0,5 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Porcentaje con respecto al control en función de la concentración de CAR. CS: control de solvente; acetona 0,05 %. Puntos y líneas: media \pm desvío estándar. Asteriscos: diferencias con el control; **P < 0,01; ***P < 0,001.

La actividad de GST de los individuos de los grupos expuestos no difirió de la de los individuos del grupo control para ninguna de las concentraciones evaluadas (**Figura 3.11**; contrastes contra el control con prueba de Mann Whitney). Por lo tanto, las LOEC para esta respuesta se encontrarían a concentraciones de CAR mayores que 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

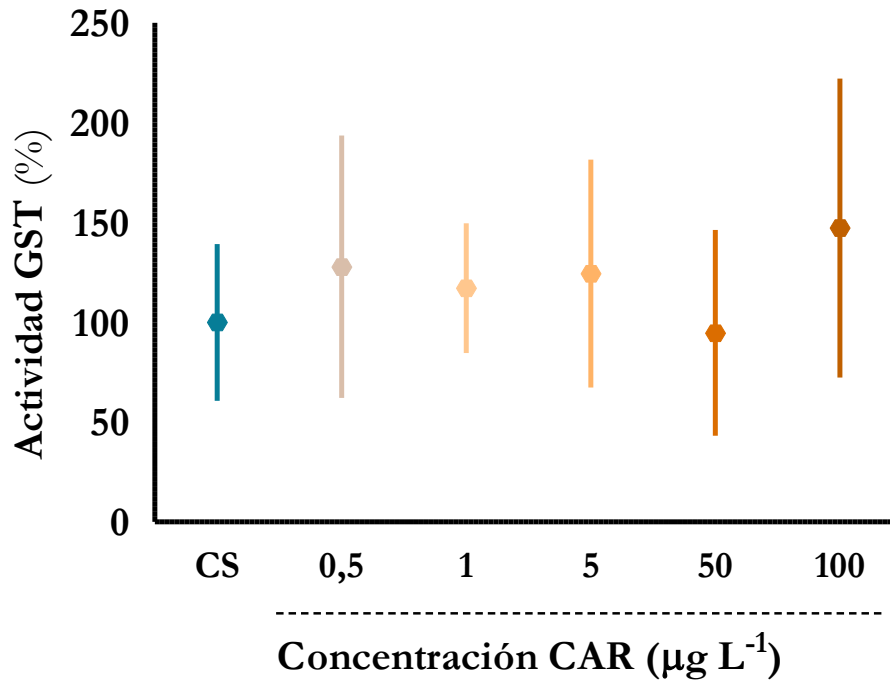


Figura 3.11 Respuesta de GST en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de CAR (entre 0,5 y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Porcentaje con respecto al control en función de la concentración de CAR. CS: control de solvente; acetona 0,05 %. Puntos y líneas: media \pm desvío estándar. No se encontraron diferencias entre los tratamientos y el control.

Acetamiprid

No se registró letalidad a ninguna de las concentraciones evaluadas de ACP; todas las concentraciones resultaron ser subletales para *C. gibbosa* (**Figura 3.12 A**). La adherencia fue mayor que 85 % en todos los casos y no difirió de la observada para el grupo control a ninguna concentración (**Figura 3.12 B**; Prueba exacta de Fisher; $P > 0,05$). La adherencia del grupo control de agua declorada fue del 94 %. No se registró exposición de la cabeza-pie a ninguna concentración (**Figura 3.12 C**).

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

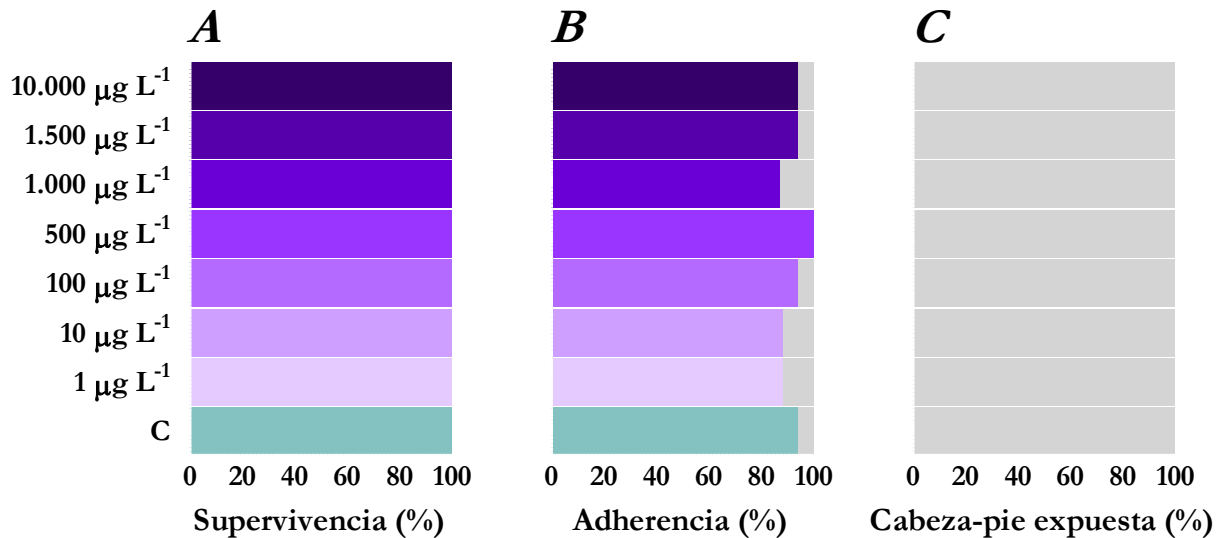
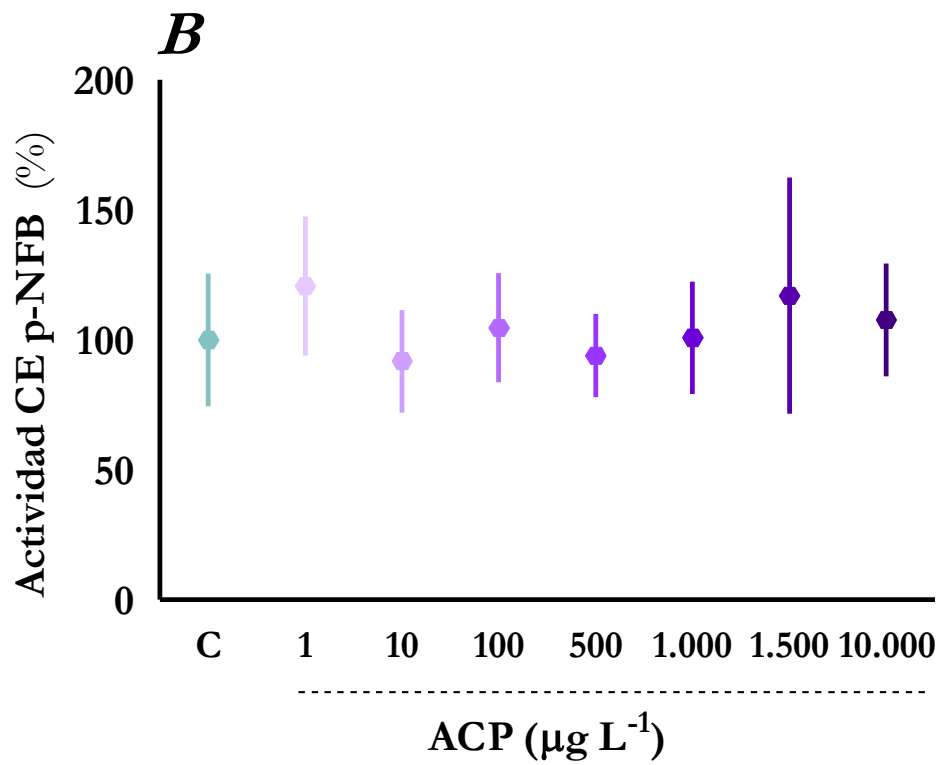
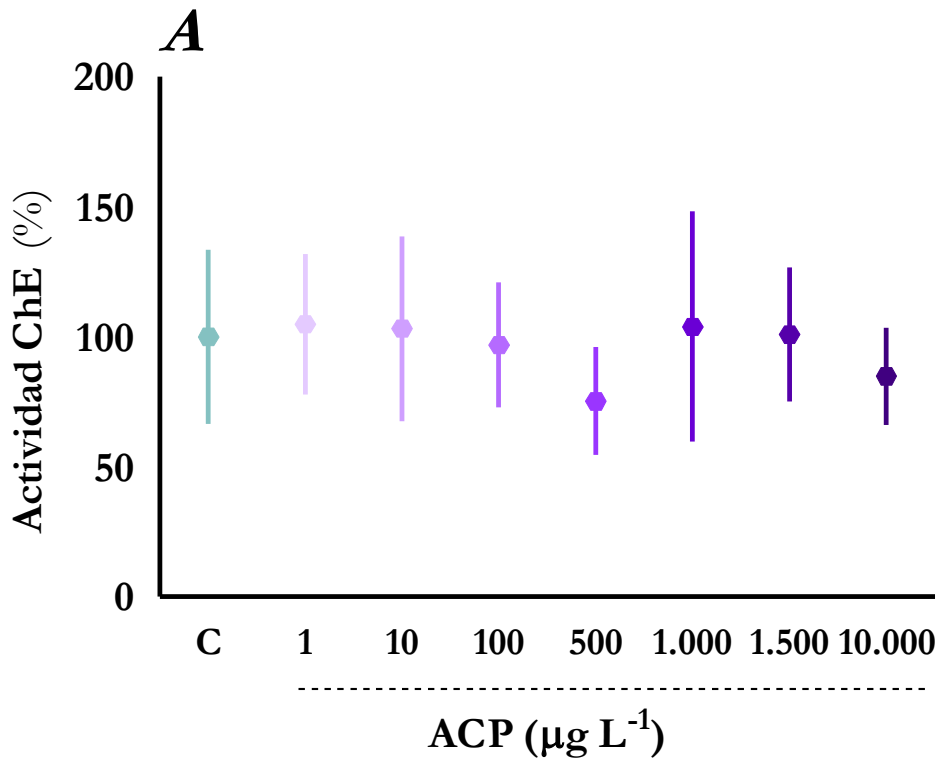


Figura 3.12 Porcentajes de supervivencia (A) y de los signos de neurotoxicidad adherencia (B) y exposición conspicua de la cabeza-pie (C), de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de ACP (entre 1 y 10.000 µg L⁻¹). C: control de agua declarada.

Las concentraciones de ACP evaluadas no tuvieron un efecto concentración dependiente sobre las actividades enzimáticas. Las actividades de ChE, CE medida con p-NFB, CE medida con p-NFA y GST de los individuos de los grupos tratados no difirieron de las de los individuos del grupo control (**Figura 3.13**; **A** ChE, contrastes contra el control con prueba de Mann Whitney; **B** CE p-NFB, contrastes contra el control con prueba t de Student sobre datos transformados log(y); **C** CE p-NFA, contrastes contra el control prueba t de Student con corrección de Welch sobre datos transformados log(y); **D** GST, contrastes contra el control con prueba t de Student sobre datos transformados log(y); $P > 0,05$). Por lo tanto, las LOEC para estas respuestas se encontrarían a concentraciones de ACP mayores a 1.000 µg L⁻¹.

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total



Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

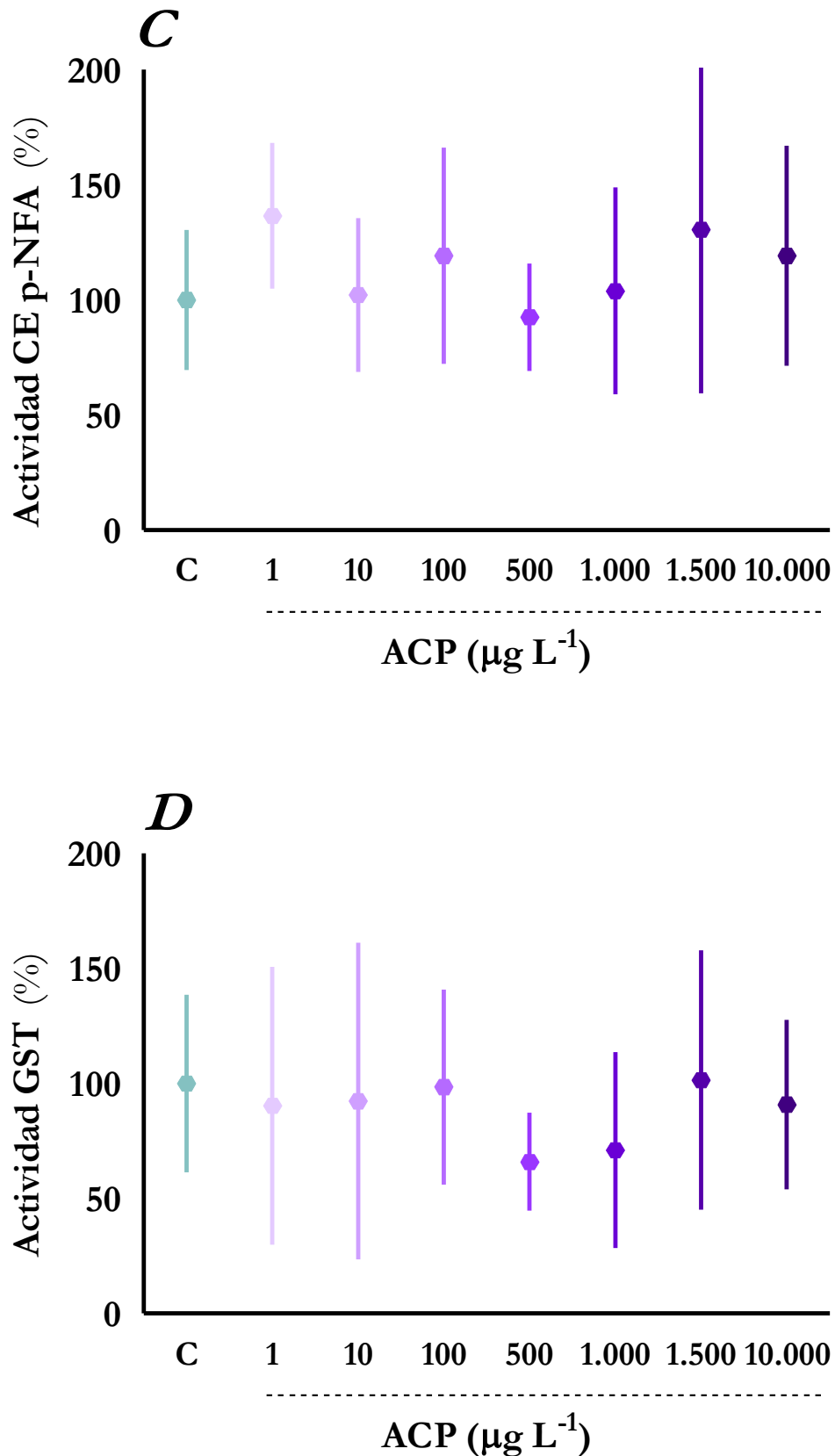


Figura 3.13 Respuestas enzimáticas en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de ACP (entre 1 y 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Porcentaje con respecto al control en función de la concentración de ACP de *A* ChE, *B* CE medida con p-NFB, *C* CE medida con p-NFA y *D* GST. Puntos y líneas: media \pm desvío estándar. No se encontraron diferencias entre los tratamientos y el control para ninguna de las enzimas.

3.4 Discusión

Los efectos neurotóxicos de los insecticidas pueden tener consecuencias indirectas sobre el comportamiento y la supervivencia de los individuos de una especie. Concentraciones subletales de insecticidas neurotóxicos como los OF, carbamatos y neonicotinoides pueden promover la deriva de macroinvertebrados, al causar que se desprendan de las superficies y sean transportados por la corriente en ambientes loticos (Beketov y Liess, 2008). Por lo tanto, signos de neurotoxicidad tan sensibles como los observados en *C. gibbosa* por Bianco et al. (2013) son de especial interés. Además de que podrían utilizarse como biomarcadores de exposición, también podrían sugerir posibles efectos a niveles supra-individuales. Sin embargo, las relaciones entre los modos de acción de los insecticidas con acción neurotóxica, la manifestación de signos de neurotoxicidad y los mecanismos que los originan, son complejas y variables (Beketov y Liess, 2008; Newman y Clements, 2007). Los resultados del presente capítulo refuerzan esto, ya que la manifestación (o ausencia) de los signos de neurotoxicidad en *C. gibbosa* y su relación con las actividades de ChE, CE y GST variaron de acuerdo al insecticida estudiado (CPF, CAR o ACP), y también difirieron de lo esperado a partir de lo observado en individuos expuestos a MAZ y de los modos de acción de estos insecticidas (**Tabla 3.4**).

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

Tabla 3.4 Resumen de puntos finales determinados para los signos de neurotoxicidad y las respuestas enzimáticas de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de CPF, CAR y ACP (esta tesis) y MAZ (Bianco et al., 2013). Puntos finales CPF, CAR y ACP: media [intervalo de confianza]; puntos finales MAZ: media ± desvío estándar. NR: no reportado. ND: no determinado. *n.s.* no significativo estadísticamente con respecto al grupo control.

Respuesta	Punto final ($\mu\text{g L}^{-1}$)	<i>Metilazinfos</i> ^a	<i>Clorpirifos</i>	<i>Carbarilo</i>	<i>Acetamiprid</i>
Falta de adherencia		A partir de 0,01	< 10 % a ≥ 500 <i>n.s.</i> 60 % a 5000	25 % a 500 <i>n.s.</i>	< 15 % <i>n.s.</i>
Exposición cabeza-pie		A partir de 0,01	No se observó	12,5 % a 25 <i>n.s.</i> 25 % a 500 <i>n.s.</i>	No se observó
Actividad ChE	CI ₅₀	0,02 ± 0,01	946 [689 – 1303]	45 [33 – 61]	ND
	LOEC	0,005	100	13	> 10.000
	NOEC	0,001	50	5	≥ 10.000
Actividad CE p-NFB	CI ₅₀	1.300 ± 100	ND	37 [24 – 58]	ND
	LOEC	1.000	> 7.500	13	> 10.000
	NOEC	500	≥ 7.500	5	≥ 10.000
Actividad CE p-NFA	CI ₅₀	1.290 ± 40	ND	ND	ND
	LOEC	1.250	> 7.500	500	> 10.000
	NOEC	1.000	≥ 7.500	100	≥ 10.000
Actividad GST	NOEC	NR	≥ 7.500	≥ 100	≥ 10.000
Intervalo evaluado ($\mu\text{g L}^{-1}$)		0,0001 – 5.000	10 – 7.500	0,05 – 500	10 – 10.000

^a Bianco et al. (2013)

En el caso de CPF, se esperaba similar toxicidad sobre *C. gibbosa* a la observada con MAZ, por ser ambos insecticidas OF. Sin embargo, las respuestas de *C. gibbosa* difirieron en varios aspectos. En primer lugar, la protrusión conspicua de la cabeza-pie se registró en todos los individuos de *C. gibbosa* expuestos a concentraciones de MAZ iguales o mayores que $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ (Bianco et al., 2013), mientras que con CPF este signo de neurotoxicidad no se registró aún en individuos expuestos a $7.500 \mu\text{g L}^{-1}$. Con respecto a la adherencia, la exposición a CPF resultó en una disminución menor que 15 % a partir de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (sin diferencias significativas con respecto al grupo control). Únicamente se encontró una

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

disminución significativa a $5.000 \mu\text{g L}^{-1}$, con un efecto máximo del 60 %. MAZ, por el contrario, suscitó una falta de adherencia en el 100 % de los individuos expuestos a partir de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ (Bianco et al., 2013).

Los efectos de CPF sobre respuestas comportamentales relacionadas con neurotoxicidad han sido observados y estudiados principalmente en vertebrados. En particular, ha resultado de especial controversia el riesgo asociado con efectos sobre el desarrollo nervioso, incluso en etapas de desarrollo intrauterinas en humanos (Eaton et al., 2008). En invertebrados acuáticos, la información disponible depende ampliamente del grupo taxonómico, siendo los insectos y artrópodos los más estudiados y, en menor medida, los gasterópodos. En general, la sensibilidad a los efectos neurotóxicos de CPF, como la inmovilidad, difiere ampliamente entre phyla y también entre especies, con sensibilidades que pueden diferir en más de 1 millón de veces (Barron y Woodburn, 1995; Giddings et al., 2014; Rubach et al., 2011, 2010). La toxicidad aguda de CPF (definida como CL_{50} , concentración letal 50, o CE_{50} , concentración efectiva 50) en la mayoría de los invertebrados acuáticos varía entre $0,1$ y $10 \mu\text{g L}^{-1}$, con valores extremos como $12.000 \mu\text{g L}^{-1}$ reportados para una especie de rotífero (Barron y Woodburn, 1995). A pesar de este espectro amplio de sensibilidades, surgen algunos patrones a partir de las curvas de sensibilidad de distintas especies, que sugieren que los crustáceos y larvas de insectos se encuentran dentro de las especies más sensibles y los rotíferos y moluscos dentro de las más tolerantes a CPF (Alvarez et al., 2019; Barron y Woodburn, 1995; Giddings et al., 2014; van Wijngaarden et al., 1993). Los moluscos en general se consideran poco sensibles a CPF, debido a que los valores de CL_{50} o CE_{50} variaron entre 154 y $> 806 \mu\text{g L}^{-1}$ (Giddings et al., 2014). Los resultados de esta tesis también sugieren que los signos de neurotoxicidad de *C. gibbosa* son muy poco sensibles a CPF. La exposición de la cabeza-pie no ocurrió aún a $7.500 \mu\text{g L}^{-1}$ y la adherencia disminuyó ligeramente a partir de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ y significativamente únicamente a $5.000 \mu\text{g L}^{-1}$. Si bien esta baja sensibilidad coincide con lo reportado en forma general para otros moluscos,

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

los signos de neurotoxicidad de *C. gibbosa* frente a la exposición a CPF son mucho menos sensibles que los de otras especies de gasterópodos. Van Wijngaarden et al. (1993) describieron que la exposición aguda (96 h) a CPF tuvo efectos inmovilizantes sobre los gasterópodos acuáticos *Anisus vortex*, *B. tentaculata* y *L. stagnalis*, con $CE_{50} > 94 \mu\text{g L}^{-1}$. De manera complementaria, Rivadeneira et al. (2013) no observaron signos de neurotoxicidad en individuos de *P. corneus* expuestos a $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ y $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de manera subcrónica durante 14 días.

Con respecto a la actividad enzimática, la actividad de ChE de *C. gibbosa* fue inhibida en forma concentración-dependiente por la exposición aguda a CPF, como era esperado para este insecticida por su modo de acción anticolinesterásico (CI_{50} $946 [689 - 1.303] \mu\text{g L}^{-1}$; LOEC $100 \mu\text{g L}^{-1}$; NOEC $50 \mu\text{g L}^{-1}$; **Tabla 3.4**). Cuando se compara con las respuestas de otras especies a CPF, las ChE de *C. gibbosa* resultan poco sensibles. Este insecticida ha sido considerado un potente inhibidor de la actividad colinesterasa en otros invertebrados acuáticos, tanto en insectos y crustáceos como en moluscos (Gagnaire et al., 2008). En el gasterópodo terrestre *Xeropicta derbentina*, Laguerre et al. (2009) estimaron *in vitro* una CI_{50} de $13,3 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF para ChE. En especies de agua dulce, Gagnaire et al. (2008) describieron efectos dependientes de la concentración de CPF sobre la actividad de ChE de *P. antipodarum* en un intervalo de concentraciones de CPF entre $0,05$ y $5 \mu\text{g L}^{-1}$. La exposición aguda (96 h) a CPF $5 \mu\text{g L}^{-1}$ inhibió más del 60 % la actividad de ChE en esta especie. La sensibilidad de la respuesta de ChE a la exposición a CPF también fue de este orden en *P. corneus*, tanto *in vivo* como *in vitro*, CI_{50} $5 \mu\text{g L}^{-1}$ y $35 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Cacciatore et al., 2013, 2012).

Por otro lado, los puntos finales determinados en esta tesis indicarían que las ChE de *C. gibbosa* son menos sensibles a CPF que a MAZ (**Tabla 3.4**). Sin embargo, como en el caso de los signos de neurotoxicidad, se esperaba una sensibilidad de las ChE de *C. gibbosa* a CPF similar a la reportada para MAZ, para esta especie. Bianco et al. (2013) reportaron que

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

la exposición aguda a MAZ inhibe la actividad de ChE en *C. gibbosa* a partir de $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ (LOEC), con CI_{50} de $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$, lo que podía sugerir una alta sensibilidad de las ChE de *C. gibbosa* a insecticidas anticolinesterásicos como otros OF o carbamatos. Otros autores también informaron diferencias en la sensibilidad de ChE de una misma especie ante diferentes insecticidas OF. Por ejemplo, en *P. corneus*, las ChE resultaron mucho más sensibles a CPF que a MAZ en exposiciones agudas *in vivo* e *in vitro*. La CI_{50} de ChE de CPF fue de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ y la de MAZ fue $1750 \mu\text{g L}^{-1}$, es decir, 350 veces más sensibles a CPF *in vivo* (Cacciatore et al., 2013). En el caso de la exposición *in vitro*, esta relación se mantuvo; CPF resultó ser un inhibidor 250 veces más potente que MAZ de la actividad de ChE (CI_{50} CPF $35 \mu\text{g L}^{-1}$ y CI_{50} MAZ $8.393 \mu\text{g L}^{-1}$) (Cacciatore et al., 2012). Comparativamente, en *C. gibbosa* las sensibilidades a CPF y MAZ se invierten y la diferencia es aún mayor, ya que más MAZ produce una inhibición de la actividad de ChE 47.000 veces más fuerte que CPF.

En cuanto al resto de los biomarcadores enzimáticos evaluados, la exposición aguda de *C. gibbosa* a CPF no afectó la actividad de CE (medida con cualquiera de los dos sustratos, p-NFA y p-NFB) ni de GST, aún a $7.500 \mu\text{g L}^{-1}$, la concentración más alta evaluada. Por lo tanto, las actividades de CE (p-NFA y p-NFB) y de GST de *C. gibbosa* también resultaron poco sensibles a CPF. En el caso de CE, generalmente se considera que su respuesta a la inhibición de OF es especie-específica (Wheelock et al., 2008). En otros gasterópodos, se encontró alta sensibilidad de la actividad de CE a CPF. Por ejemplo, en *X. derbentina*, se estimó una CI_{50} $13 \mu\text{g L}^{-1}$ para la actividad de CE medida *in vitro* con p-NFA como sustrato (Laguerre et al., 2009). De manera similar, en *P. corneus*, se encontró que la exposición aguda a CPF inhibe la actividad de CE, en homogenatos de tejido blando total, a menores concentraciones que las evaluadas con *C. gibbosa*, si bien los resultados variaron según el sustrato. Cuando se usó p-NFA como sustrato, la inhibición de CE por CPF fue parcial, de modo que no se pudo estimar el punto final CI_{50} , pero *in vitro* se encontró un 50 % de inhibición a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e *in vivo* se registró una inhibición significativa con respecto al control

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

de aproximadamente 20 % a concentraciones menores o iguales a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cacciatore et al., 2013, 2012). Cuando se usó p-NFB como sustrato, se estimó una CI_{50} de $39 \mu\text{g L}^{-1}$ *in vitro*, y de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ *in vivo* (Cacciatore et al., 2013, 2012).

La baja sensibilidad de las CE de *C. gibbosa* a la inhibición por insecticidas OF también fue observada por Bianco et al. (2013) luego de la exposición a MAZ (p-NFA $1290 \mu\text{g L}^{-1}$ y p-NFB $1300 \mu\text{g L}^{-1}$). Sin embargo, a diferencia de CPF, la exposición a MAZ sí produjo una inhibición concentración-dependiente de la actividad medida tanto con p-NFA como con p-NFB, indicando que estas enzimas pueden participar en la detoxificación no catalítica de MAZ. En el caso de CPF, los resultados de esta tesis sugieren que las CE de *C. gibbosa* no participan de manera principal en los mecanismos de detoxificación de CPF, ni por unión covalente al insecticida, ni catalizando su hidrólisis, al menos dentro del intervalo de concentraciones evaluado.

La actividad de GST de *C. gibbosa* tampoco fue afectada por la exposición aguda a CPF. Hay pocos trabajos que hayan evaluado los efectos de CPF, y de otros OF, sobre la actividad de GST en invertebrados acuáticos. A partir de ellos, algunos autores sugieren que la sensibilidad de GST en estas especies, y en moluscos en particular, es baja para insecticidas OF (Cacciatore et al., 2015; Domingues et al., 2010; Kristoff et al., 2008). En el bivalvo *Scapharca inaequivalvis*, Antognelli et al. (2006) reportaron que la exposición aguda (96 h) a CPF $100 \mu\text{g L}^{-1}$ no tuvo efecto sobre la actividad de GST en la mayoría de los órganos o tejidos evaluados, salvo por un leve aumento en el pie. En gasterópodos, Cacciatore et al. (2015) observaron un leve aumento del 15 % en la actividad de GST de *P. corneus* luego de la exposición aguda (48 h) a CPF $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo, Rivadeneira et al. (2013) no detectaron un efecto en la misma especie luego de 14 días de exposición a $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ o $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF. Kristoff et al. (2008) tampoco encontraron efectos de exposiciones agudas (48 o 96 h) a MAZ $5.000 \mu\text{g L}^{-1}$ sobre la actividad de GST de dos fenotipos diferentes de *B. glabrata*. Los resultados obtenidos en esta tesis sobre las GST de

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

C. gibbosa y CPF coinciden con la baja sensibilidad de GST a OF sugerida para moluscos. Para *C. gibbosa*, Bianco et al. (2013) también informaron resultados similares para MAZ, ya que exposiciones agudas (48 h) a 0,02 y a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ no afectaron la actividad de GST, y sugirieron que estas enzimas no son parte del principal mecanismo de detoxificación de MAZ. Por lo tanto, se podría sugerir que GST tampoco forma parte principal del metabolismo agudo de CPF, ni de OF en general, en *C. gibbosa*.

La toxicidad de CAR, el otro insecticida anticolinesterásico estudiado en esta tesis, también difirió de la reportada para MAZ y, a su vez, de la de CPF (**Tabla 3.4**). A diferencia de CPF, la exposición a CAR sí provocó una protrusión de la cabeza-pie, como la descrita por Bianco et al. (2013) para MAZ, pero con una sensibilidad 4 órdenes de magnitud menor. Esta respuesta aumentó a concentraciones más elevadas de CAR, si bien no se pudo describir una respuesta concentración-dependiente típica y no se detectaron diferencias significativas con respecto a los individuos control. La protrusión conspicua de la cabeza-pie en *C. gibbosa* es un ejemplo de un efecto biológicamente significativo que, independientemente de la significancia estadística, con estar presente indica que existe toxicidad de un xenobiótico, ya que no se observa en individuos control. En el caso de la exposición a CAR, este signo de neurotoxicidad se observó primero a una concentración de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, a diferencia de la exposición a MAZ, en la que se observó a partir de 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$. Además, CAR causó esta respuesta como máximo en el 25 % de los individuos evaluados, luego de una exposición a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, en contraposición al 100 % provocado por MAZ 0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Bianco et al., 2013). Con respecto a la adherencia, estadísticamente no se observaron diferencias significativas, pero la mayor falta de adherencia (25 %) se observó a la concentración más alta evaluada 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, acompañando lo observado para la exposición de la cabeza-pie. Debido a que el mayor efecto para ambos signos de neurotoxicidad se observó a la concentración más alta evaluada en esta tesis, no se puede descartar que a concentraciones mayores los efectos de CAR sobre estas respuestas sean más pronunciados.

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

Los efectos neurotóxicos motores de insecticidas carbamatos, como los observados en *C. gibbosa*, han sido considerablemente caracterizados en humanos y otros vertebrados. En esas especies, se ha descrito cómo los efectos sobre el funcionamiento del sistema nervioso central y del periférico correlacionan con perturbaciones de la actividad motora (Satoh y Gupta, 2010). En ratas y ratones, por ejemplo, respuestas comportamentales, como el comportamiento de evitación o la disminución de la actividad motora general, se consideran como indicadores tempranos de toxicidad que reflejan efectos sutiles de carbarilo (Satoh y Gupta, 2010). Esto se ha observado también en vertebrados acuáticos como *O. mykiss* y *Carassius auratus*, en los que concentraciones de CAR a partir de 188 y 13,9 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, causan disminución en la velocidad de nado, nado errático, pérdida de equilibrio y locomoción reducida. En invertebrados acuáticos, sin embargo, pocos trabajos han estudiado de manera combinada respuestas comportamentales y bioquímicas a CAR. En el crustáceo anfípodo *Hyalella curvispina*, se observaron distintos cambios comportamentales, desde alteraciones en el nado hasta inmovilidad generalizada, por exposición a concentraciones de CAR tan bajas como 1 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Anguiano et al., 2017). Estas alteraciones y su sensibilidad dependieron de la población de anfípodos estudiada y, en otros casos, se observó hiperactividad a 300-400 $\mu\text{g L}^{-1}$ e inmovilidad a concentraciones mucho más altas (9.000-15.000 $\mu\text{g L}^{-1}$). En *L. variegatus* y en el bivalvo marino *Mytilus edulis*, concentraciones de CAR de 50 y 33,9 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, suscitaron desórdenes motores y de alimentación que empeoraron de forma concentración-dependiente (Donkin et al., 1997; Kristoff et al., 2010). En gasterópodos, hay pocos trabajos que informen sobre efectos subletales, ya que en general se centran en letalidad como punto final, por lo que es difícil establecer una relación clara entre la exposición a CAR y efectos neurotóxicos a nivel comportamental. Entre los trabajos que sí informaron efectos subletales, se ha reportado que la exposición aguda (48 h) a concentraciones de CAR de hasta 1.460 y 5.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ no afecta el comportamiento ni la locomoción en los gasterópodos de agua dulce

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

Pomacea patula (Mora et al., 2000) y *B. glabrata* (Kristoff et al., 2010), respectivamente. Sin embargo, en coincidencia con lo observado en *C. gibbosa*, Elias y Bernot (2017) también registraron alteraciones en el comportamiento de gasterópodos de agua dulce por exposición a CAR $100 \mu\text{g L}^{-1}$, que se manifestaron como una reducción significativa en las tasas de egestión de *Physa acuta* y una disminución (aunque no estadísticamente significativa) en los movimientos de *Helisoma anceps*.

La exposición aguda a CAR inhibió de manera concentración-dependiente la actividad de ChE de *C. gibbosa*, como se podía esperar para este insecticida por su modo de acción anticolinesterásico (CI_{50} $45 [33 - 61] \mu\text{g L}^{-1}$; LOEC $13 \mu\text{g L}^{-1}$; NOEC $5 \mu\text{g L}^{-1}$; **Tabla 3.4**). Las ChE de *C. gibbosa* resultan más sensibles a CAR que las de especies de oligoquetos, bivalvos e incluso otros gasterópodos. Kristoff et al. (2010) estimaron para *L. variegatus* una CI_{50} aguda (48 h) de CAR de $170 \mu\text{g L}^{-1}$. De manera similar, Donkin et al. (1997) y Mora et al. (1999) estimaron en 89, 190 y $200 \mu\text{g L}^{-1}$, las CI_{50} agudas de CAR para ChE de los bivalvos marinos *Mytilus galloprovincialis*, *Corbicula fluminea* y *M. edulis*, respectivamente. Con respecto a otros gasterópodos de agua dulce, las ChE de *C. gibbosa* resultan especialmente sensibles a CAR. En *P. patula*, por ejemplo, se obtuvo una inhibición del 73 % luego de la exposición aguda (24 h) a $1.460 \mu\text{g L}^{-1}$ (Mora et al., 2000). Las CI_{50} de CAR para las ChE obtenidas para otros dos gasterópodos, *P. corneus* y *B. glabrata* resultaron del mismo orden, 1.400 y $2.500 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Cacciatore et al., 2018; Kristoff et al., 2010).

Por otro lado, las ChE de *C. gibbosa* resultan varios órdenes de magnitud menos sensibles a CAR que a MAZ (**Tabla 3.4**). Donkin et al. (1997) indicaron que incluso aquellas especies altamente sensibles a insecticidas anticolinesterásicos OF, como algunos peces y crustáceos, pueden ser menos sensibles a carbamatos. Sin embargo, esto no se cumpliría al comparar la sensibilidad de ChE de *C. gibbosa* a CAR con respecto a CPF. En ese caso, la actividad de ChE resulta mucho más sensible al carbamato que al OF. Mora et al. (2000)

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

reportaron algo similar para *M galloprovincialis* y *C. fluminea*, para los cuales la sensibilidad de ChE fue mayor a CAR que al OF metil paratió. Lo mismo se encontró para *B. glabrata*, dado que 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MAZ causó una inhibición del 26 %, mientras que la misma concentración de CAR causó una inhibición del 50 % (Kristoff et al., 2012, 2010). Por otro lado, (Laguerre et al., 2009) informaron sensibilidades de ChE similares para CAR y CPF en la exposición *in vitro* de homogenatos de *X. derbentina*. En el caso de *P. corneus*, la sensibilidad de ChE a CAR y a MAZ fue similar (CI_{50} 1.400 y 1.750 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), y mucho menor que a CPF (CI_{50} 5 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Cacciatore et al., 2018, 2013). Por lo tanto, la sensibilidad relativa entre distintos OF y entre OF y carbamatos parecería depender de la identidad de cada insecticida y de la especie de interés.

Los efectos bioquímicos de la exposición aguda a CAR sobre las CE de *C. gibbosa* dependieron del sustrato usado para medir la actividad de estas enzimas. Cuando se usó p-NFB como sustrato, se encontró una inhibición dependiente de la concentración de CAR (CI_{50} 37 [24 – 58] $\mu\text{g L}^{-1}$; LOEC 13 $\mu\text{g L}^{-1}$; NOEC 5 $\mu\text{g L}^{-1}$; **Tabla 3.4**). En *P. corneus*, se obtuvieron resultados semejantes: concentraciones crecientes de CAR inhibieron de forma creciente la actividad de CE p-NFB y se estimó una CI_{50} de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cacciatore et al., 2018). Sin embargo, esta respuesta de CE medida con p-NFB no siempre se observa en invertebrados acuáticos. En *B. glabrata*, se observó una inhibición de CE p-NFB del 41 % a partir de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CAR (Kristoff et al., 2010), pero este porcentaje de inhibición se mantuvo sin aumentar inhibición a concentraciones más altas del insecticida. En *L. variegatus*, concentraciones de CAR de hasta 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ no inhibieron la actividad de CE medida con p-NFB como sustrato (Kristoff et al., 2010).

Cuando se usó p-NFA como sustrato, la actividad de CE de *C. gibbosa* resultó menos sensible a CAR que la de CE medida con p-NFB, ya que únicamente se encontró inhibición a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, la concentración más alta evaluada (**Tabla 3.4**). La sensibilidad a CAR de CE medida con p-NFA también resulta baja en comparación con otras especies. Por ejemplo, en

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

P. corneus, se encontró una inhibición concentración dependiente de CE p-NFA para la que se estimó una CI_{50} de $180 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cacciatore et al., 2018). Los resultados obtenidos tanto para *C. gibbosa* como para *P. corneus* sí, coinciden en que en ambos casos se observa una diferencia en la sensibilidad de CE a la inhibición por CAR según el sustrato utilizado para su medición y en que la sensibilidad resultó mayor con p-NFB que con p-NFA. La variación en la respuesta de CE a un mismo tóxico según el sustrato utilizado también se ha observado para CAR en *L. variegatus* y *B. glabrata*. En el caso de *L. variegatus*, si bien con p-NFB no se observó inhibición de CE, con 1-naftil acetato (1-NA) ni 2-naftil acetato (2-NA) se registró un 50 % de inhibición a $500 \mu\text{g L}^{-1}$, que aumentó a ~ 80 % a $2.000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Kristoff et al., 2010). En el caso de *B. glabrata*, la inhibición de CE se observó a mayores concentraciones de CAR (entre 2.500 y $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$) con 1-NA o 2-NA que con p-NFB ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) (Kristoff et al., 2010). La diferencia en la respuesta de CE de *C. gibbosa* a CAR según el sustrato con el que se midió, sustenta la recomendación realizada por otros autores de medir con diferentes sustratos cada vez que se utilice CE como biomarcador, debido a que las CE comprenden un grupo de enzimas con baja especificidad por el sustrato (Cacciatore et al., 2018, 2012; Kristoff et al., 2010; Sanchez-Hernandez y Wheelock, 2009). Más allá de la diferencia en la respuesta de CE según el sustrato utilizado, en *C. gibbosa* tanto con p-NFB como con p-NFA se observó inhibición de CE por exposición aguda a CAR, lo que sugeriría que estas enzimas pueden participar de la detoxificación no catalítica de CAR en esta especie, como sugieren Bianco et al. (2013) para MAZ.

Como se observó en esta tesis para CPF y por Bianco et al. (2013) para MAZ, la actividad de GST de *C. gibbosa* tampoco fue afectada por la exposición aguda a CAR. Hay verdaderamente escasos trabajos que hayan evaluado los efectos de CAR sobre la actividad de GST en invertebrados acuáticos. Basopo y Naik (2016) y Norah et al. (2014) concluyeron que en los gasterópodos de agua dulce *Helisoma duryi* y *Lymnaea natalensis* la detoxificación de CAR ocurre en parte por la conjugación catalizada por GST, a partir del

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

aumento que observaron en la actividad de GST luego de la exposición aguda a $25 \mu\text{g L}^{-1}$ CAR. Por otro lado, Cossi (2019) reportó que exposiciones subcrónicas (14 días) a 13 y $130 \mu\text{g L}^{-1}$ CAR (como principio activo o como formulado con 85 % del principio activo) no afectaron la actividad de GST en *B. straminea*. Los resultados obtenidos en esta tesis sobre la actividad de GST luego de la exposición a CAR sugerirían que estas enzimas no forman parte principal de la detoxificación aguda de CAR, en *C. gibbosa*.

En el caso de ACP, ninguno de los biomarcadores evaluados en *C. gibbosa* en este capítulo fue alterado de manera estadísticamente significativa por la exposición aguda a este insecticida. Empezando por los signos de neurotoxicidad, no se observó la protrusión de la cabeza-pie en ninguno de los individuos expuestos a ACP. La adherencia en individuos expuestos disminuyó a partir de $1 \mu\text{g L}^{-1}$, pero en ningún caso disminuyó más del 9 % con respecto a la de los individuos del grupo control de agua declorada.

En este sentido, se ha reportado que los neonicotinoides pueden causar distintos grados de inmovilidad y, por lo tanto, promover la deriva en insectos y crustáceos acuáticos, pero que la sensibilidad de esta respuesta varía según la especie estudiada (Beketov y Liess, 2008; Raby et al., 2018). En algunos casos, se presentó a concentraciones consideradas ambientalmente relevantes, como 0,5, 3 y $12 \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que en otras especies las CE_{50} se acercaron a los $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Raby et al., 2018). En *C. gibbosa*, no se observaron efectos sobre la adherencia ni la exposición de la cabeza-pie aún a concentraciones de ACP de $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$. Esta variabilidad se ha atribuido a que existe una gran diversidad de subclases de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en insectos y en invertebrados en general (Vehovszky et al., 2015). La naturaleza de la interacción de los neonicotinoides con el receptor puede estar determinada por el tipo y número de subunidades de los nAChR de una especie, y por la estructura molecular de cada insecticida (Morrissey et al., 2015; Raby et al., 2018). En gasterópodos, Tomizawa et al. (2008) concluyeron que los receptores de *L. stagnalis* presentaban baja afinidad por los neonicotinoides, de manera homóloga a los de

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

los vertebrados. Sin embargo, también reportaron diferencias de afinidad de los neonicotinoides por los nAChR de diferentes especies: menor afinidad de los nAChR de *L. stagnalis* y *Plesiophysa pilsbryi* que la de los de *Aplysia californica* (Prosser et al., 2016; Tomizawa y Casida, 2005). En *C. gibbosa*, la ausencia de signos de neurotoxicidad luego de la exposición a ACP parecería coincidir con lo encontrado para *L. stagnalis* y *P. pilsbryi*. Complementariamente, Vehovszky et al. (2015) reportaron que ACP y otros neonicotinoides actúan de manera inhibitoria sobre los nAChR en el sistema nervioso central de *L. stagnalis*, en contraposición al efecto agonista observado en insectos. En preparaciones *ex vivo* de interneuronas clave en el control de comportamientos respiratorios y de alimentación, observaron que concentraciones entre 10.000 y 100.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de los neonicotinoides no tenían efectos agonistas, por lo que sugirieron que podría existir mecanismos y sitios de acción diferentes entre los nAChR del sistema nervioso central de insectos y gasterópodos. Es necesario llevar a cabo otros estudios para confirmar estas hipótesis y dilucidar la naturaleza de las interacciones de los neonicotinoides en el sistema nervioso de moluscos (Prosser et al., 2016).

Con respecto a la actividad de ChE en *C. gibbosa*, la falta de inhibición concentración-dependiente, aún a concentraciones de ACP de 10.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, coincide con lo esperado según el modo de acción de este insecticida en insectos, que no presenta una inhibición directa de estas enzimas. Cossi (2019) tampoco encontró inhibición de ChE en *B. straminea*, luego de una exposición subcrónica de 14 días a 150 y 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ACP, ni con el principio activo ni con un formulado que contenía 70 % del principio activo. Sin embargo, se han reportado diferentes respuestas de esta enzima en moluscos ante la exposición a neonicotinoides, incluso dentro de una misma especie. Concentraciones subletales de imidacloprid causaron una inhibición de ChE mayor que 70 % en el gasterópodo terrestre *Helix aspersa* (Radwan y Mohamed, 2013). En branquias del bivalvo *M. galloprovincialis*, Dondero et al. (2010) describieron que luego de una exposición subcrónica (4 días) a tiacloprid, se observó una

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

estimulación a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, pero no a concentraciones más bajas ni más altas, mientras que una exposición de la misma duración a imidacloprid tuvo el efecto inverso, ya que produjo inhibición a 100 y $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$, pero no a concentraciones más altas. En otro bivalvo, *Saccostrea* sp., la exposición a imidacloprid durante 96 h resultó en una inhibición de ChE a la concentración más alta evaluada ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) únicamente en branquias, mientras que no hubo efecto en glándula digestiva y músculo (Moncaleano-Niño et al., 2018). El mecanismo exacto mediante el cual los neonicotinoides pueden inhibir o activar las ChE en moluscos no se conoce aún, si bien se ha sugerido que puede estar relacionado con cambios en la expresión de estas enzimas (Moncaleano-Niño et al., 2018).

La exposición aguda de *C. gibbosa* a concentraciones crecientes de ACP tampoco afectó la actividad de CE (medida tanto con p-NFA como con p-NFB como sustratos) ni la de GST. Se ha sugerido que los neonicotinoides ciano sustituidos, como ACP, tienen mayor potencial de detoxificación (Morrissey et al., 2015). En el gasterópodo *B. straminea*, la actividad de CE medida con p-NFA no se vio afectada por la exposición subcrónica (14 días) a ACP a 150 o a $1500 \mu\text{g L}^{-1}$ (Cossi, 2019). Sin embargo, la actividad de CE medida con p-NFB aumentó significativamente con la exposición a $1500 \mu\text{g L}^{-1}$ del principio activo y con 150 y $1500 \mu\text{g L}^{-1}$ de ACP de un formulado al 70 %. La actividad de GST también aumentó luego de la exposición a ambas concentraciones del formulado. Por lo tanto, se concluyó que en *B. straminea* tanto CE como GST participarían de mecanismos de detoxificación de ACP. Radwan y Mohamed (2013) también reportaron un aumento en la actividad de GST en *H. aspersa* expuesto a imidacloprid. A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se podría sugerir que ni las CE ni las GST participan activamente en los mecanismos de detoxificación aguda de ACP en *C. gibbosa*.

Retornando a la primera hipótesis planteada al comienzo de este capítulo, los resultados encontrados muestran que no es posible generalizar las respuestas de ChE, CE y GST y los signos de neurotoxicidad de *C. gibbosa* observados para MAZ a otros insecticidas

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

anticolinesterásicos como CPF y CAR, y que el uso de estas respuestas como biomarcadores varía con cada insecticida. En el caso de CPF, todas las respuestas evaluadas superan ampliamente las concentraciones ambientalmente relevantes además del nivel guía nacional para este insecticida, por lo que no calificarían como señales de alarma temprana. Para los signos de neurotoxicidad, no se observó la protrusión conspicua de la cabeza-pie aún a la concentración más alta evaluada ($7500 \mu\text{g L}^{-1}$), y la falta de adherencia comenzó a partir de $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Para CE y GST, se determinaron NOEC iguales o mayores que $7500 \mu\text{g L}^{-1}$. Estas concentraciones son varios órdenes de magnitud más altas que el nivel guía nacional para la protección de la biota acuática ($0,006 \mu\text{g L}^{-1}$), la concentración máxima registrada en la región del Alto Valle ($1,16 \mu\text{g L}^{-1}$) e, incluso, la máxima encontrada en otras partes del mundo ($26,6 \mu\text{g L}^{-1}$) (Loewy et al., 2011; Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005a); Otieno et al. 2012, respectivamente). Por lo tanto, no se esperaría que estas respuestas de *C. gibbosa* se encuentren afectadas en el ambiente. En el caso de ChE, la NOEC se determinó experimentalmente en $50 \mu\text{g L}^{-1}$, por lo que existe la posibilidad de que se vea afectada por la exposición accidental a concentraciones más altas que las reportadas en la bibliografía. Además, encontró una respuesta inhibitoria claramente concentración-dependiente de ChE, por lo que sería de interés tenerla en cuenta como biomarcador de exposición de *C. gibbosa* a CPF.

En el caso de CAR, si bien no se encontró la misma sensibilidad de *C. gibbosa* que en el caso de MAZ, las respuestas de ChE, CE y GST y los signos de neurotoxicidad sí podrían utilizarse como biomarcadores a concentraciones de CAR que podrían encontrarse en el ambiente. Tomando como referencia la concentración de CAR de $48 \mu\text{g L}^{-1}$ detectada por Loewy et al. (2011) en el Alto Valle, en *C. gibbosa* se podrían encontrar efectos sobre la protrusión de la cabeza-pie (se observó a $25 \mu\text{g L}^{-1}$), la actividad de ChE (CI_{50} $45 \mu\text{g L}^{-1}$; LOEC $13 \mu\text{g L}^{-1}$) y sobre la actividad de CE medida con p-NFB como sustrato (CI_{50} $37 \mu\text{g L}^{-1}$; LOEC $13 \mu\text{g L}^{-1}$). Además, casos extremos de exposición, como $1.700 \mu\text{g L}^{-1}$ de CAR

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

(Walters et al. 2013), podrían tener mayores efectos sobre *C. gibbosa*. Por ejemplo, a $500 \mu\text{g L}^{-1}$, se observó mayor protrusión de la cabeza-pie, y una inhibición de aproximadamente 30 % de la actividad de CE medida con p-NFA (LOEC $500 \mu\text{g L}^{-1}$).

Con respecto a la hipótesis sobre ACP, se confirmó lo que se esperaba para la respuesta de ChE de *C. gibbosa*, ya que no se vio afectada por este insecticida. Sin embargo, contrariamente a lo que se postuló, los signos de neurotoxicidad y las respuestas de CE y GST tampoco se vieron afectadas por ACP. El intervalo de concentraciones de ACP evaluado en este capítulo (1 a $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$) incluyó concentraciones que superan ampliamente la máxima reportada para aguas dulces superficiales a nivel global ($44,1 \mu\text{g L}^{-1}$; (Anderson et al., 2013)). Por lo tanto, ninguna de estas respuestas (signos de neurotoxicidad y respuestas de ChE, CE y GST) podrían usarse como biomarcadores para ACP en *C. gibbosa*.

La actividad GST en homogenatos de tejido blando total como biomarcador en *C. gibbosa* no difirió en individuos de *C. gibbosa* expuestos con respecto a los individuos de los grupos control, para ninguno de los insecticidas evaluados en esta tesis (CPF, CAR y ACP) (**Tabla 3.4**). Bianco et al. (2013) tampoco detectaron efectos de MAZ sobre la actividad GST en homogenatos de tejido blando total de *C. gibbosa* y concluyeron que GST no es un mecanismo principal de detoxificación de insecticidas OF en esta especie. Es importante mencionar que en los resultados de este capítulo se observan desvíos estándar considerables en la medición de la actividad de este biomarcador. Esto podría atribuirse a la variabilidad que puede existir entre individuos de una misma especie en cuanto a una respuesta a un tóxico (Moreno Grau, 2003; Sparling, 2016), en particular con GST que puede resultar poco específica y poco sensible. Además, GST cataliza la conjugación de compuestos electrofílicos con GSH, por lo que su actividad depende de los niveles de GSH presentes, que a su vez dependen del balance de actividades de múltiples otras enzimas (Antognelli et al., 2006). En consecuencia, algunos autores sugieren que los efectos sobre GST no siempre son inmediatos y pueden depender del tiempo de exposición (Domingues et al., 2010). Por

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

ejemplo, en el caso del *S. inaequalvis* expuesto a CPF, mencionado anteriormente, no se encontró un efecto agudo importante (96 h) sobre GST, pero luego de 15 días el aumento en actividad GST fue significativo en todos los tejidos analizados (Antognelli et al., 2006). De manera inversa, en *P. corneus* se detectó un aumento en la actividad de GST por exposición aguda (48 h) a CPF, que no se observó luego de 14 días de exposición (Cacciatore et al., 2015; Rivadeneira et al., 2013). En el caso de *L. natalensis* expuesto a CAR, la actividad de GST aumentó ligeramente a las 72 h, pero el mayor aumento, para el cual se registraron diferencias significativas, ocurrió a las 96 h de exposición (Basopo et al., 2014; Basopo y Naik, 2016). En conjunto, sería importante profundizar el análisis sobre la respuesta de GST de manera temporal, con respecto a factores físico-químicos, en distintos tejidos y en relación con otros procesos de detoxificación o defensas antioxidantes para optimizar su uso como biomarcador en *C. gibbosa*.

Por último, se esperaban respuestas tóxicas comunes de *C. gibbosa* sensibles a CPF y CAR como las observadas para MAZ, que permitieran su uso como biomarcadores para insecticidas con un modo de acción común. Los resultados discutidos hasta este punto evidencian los distintos efectos tóxicos que pueden tener insecticidas que comparten un mismo modo de acción, CPF y CAR (evaluados en este capítulo) y MAZ (Bianco et al., 2013), sobre una misma especie, *C. gibbosa*. Las diferencias halladas restringen el uso de las respuestas que se evaluaron como biomarcadores, pero pueden ayudar a elucidar los mecanismos específicos de toxicidad de estos insecticidas sobre *C. gibbosa*. La comprensión de estos mecanismos es una de las principales herramientas para poder prevenir los efectos adversos de los agentes tóxicos en especies no blanco (Moreno Grau, 2003). MAZ, CPF y CAR son tres insecticidas anticolinesterásicos, cuyo principal modo de acción es la neurotoxicidad derivada de la inhibición de la enzima blanco ChE. Sin embargo, los signos de neurotoxicidad observados por Bianco et al. (2013) en *C. gibbosa* por exposición aguda a

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

MAZ correlacionaron con la sensibilidad de ChE, pero no se manifestaron de la misma forma luego de exposiciones agudas a CPF y a CAR.

El potencial de inhibición de ChE de los insecticidas anticolinesterásicos puede depender de distintos factores, entre ellos, de la capacidad de metabolización de cada especie. Existen otras enzimas además de CE y GST que pueden estar involucradas en la detoxificación de OF y carbamatos, como oxidasas citocromo P450 (CYP), favin monooxigenasas, A-esterasas o paraoxonasas (Casarett y Doull, 2001; Mora et al., 2000). Diferencias en sensibilidad o en la respuesta de estas enzimas a MAZ, CPF o CAR podrían afectar los efectos tóxicos que tienen estos insecticidas. Además, es importante recordar que tanto MAZ como CPF requieren de la activación metabólica *in vivo* desde su forma tiólica a su forma oxónica, mientras que CAR no. Esta activación generalmente es catalizada por CYP que pueden presentar diferencias en afinidad o sensibilidad a distintos insecticidas (Casarett y Doull, 2001; Galloway y Handy, 2003). De este modo, la inhibición de ChE en *C. gibbosa* a bajas concentraciones de MAZ comparado con CPF, podría deberse también a una metabolización más rápida o eficaz de MAZ a su forma oxónica. Existe poca información sobre la metabolización de OF por CYP en gasterópodos.

Otro factor que puede influir sobre el potencial de inhibición de ChE de los insecticidas anticolinesterásicos es la interacción de los OF y carbamatos con otras B-esterasas además de ChE. En esta línea, trabajos con distintas especies, desde vertebrados a invertebrados acuáticos, reportaron que la ausencia de manifestación de signos de neurotoxicidad frente a exposiciones a OF o a carbamatos coincide con CE más sensibles que ChE (Anguiano et al., 2008; Barata et al., 2004; Bianco et al., 2014; Cacciatore et al., 2013; Casarett y Doull, 2001; Galloway et al., 2002; Kristoff et al., 2012; Ochoa et al., 2013; Otero y Kristoff, 2016; Sanchez-Hernandez, 2007; Sanchez-Hernandez y Wheelock, 2009; Wheelock et al., 2008, 2005). Como consecuencia, algunos autores sugirieron que, dado que tanto las ChE como las CE pueden ser inhibidas por OF o carbamatos, en las especies en las cuales las CE tienen

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

similar o mayor sensibilidad que las ChE a estos insecticidas, las CE se unen al insecticida, protegiendo a las ChE de la inhibición y, de esta forma protegen al organismo de los efectos neurotóxicos (Anguiano et al., 2008; Barata et al., 2004; Cacciatore et al., 2013; Cossi et al., 2015; Kristoff et al., 2012; Otero y Kristoff, 2016; Sanchez-Hernandez, 2007). En el caso opuesto, se observarían signos de neurotoxicidad en casos en los que las CE tuvieran menor sensibilidad que ChE y no ejercieran este efecto protector. Por ejemplo, en *L. variegatus* Kristoff et al. (2010) observaron severos signos de neurotoxicidad y ChE mucho más sensibles que las CE a la exposición a CAR, ya que determinaron una CI_{50} de CAR de $170 \mu\text{g L}^{-1}$ para la actividad de ChE, mientras que la actividad de CE medida con p-NFB no se inhibió aún a $5.000 \mu\text{g L}^{-1}$ y medida con 1- o 2- NA se encontró 50 % de inhibición a una concentración de CAR de $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

En *C. gibbosa*, los signos de neurotoxicidad se manifestaron en todos los individuos expuestos a MAZ a partir de concentraciones bajas ($0,01 \mu\text{g L}^{-1}$), y coincidieron con una alta sensibilidad de ChE (CI_{50} $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$) y una sensibilidad de CE varios órdenes de magnitud menor que la de ChE (CI_{50} CE p-NFA $1290 \mu\text{g L}^{-1}$; CI_{50} CE p-NFB $1300 \mu\text{g L}^{-1}$) (Bianco et al., 2013). Bianco et al. (2013) postularon que la alta sensibilidad de ChE, junto con una relación alta sensibilidad de ChE/baja sensibilidad de CE a MAZ podría explicar los fuertes signos de neurotoxicidad encontrados en *C. gibbosa*. Sin embargo, los resultados reportados en este capítulo reflejan que, para CPF, la relación de sensibilidades ChE/CE es similar a la registrada para MAZ, pero los signos de neurotoxicidad no se manifestaron del mismo modo ni con la misma sensibilidad. No se observó la protrusión de la cabeza-pie y, si bien se observó falta de adherencia, esta ocurrió a partir de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF, aún con una sensibilidad de ChE (CI_{50} $946 \mu\text{g L}^{-1}$) mucho mayor que la de CE ($NOEC \geq 7.500 \mu\text{g L}^{-1}$). En el caso de CAR, para el cual la sensibilidad de CE (CI_{50} p-NFB $37 \mu\text{g L}^{-1}$) fue similar a la de ChE (CI_{50} $45 \mu\text{g L}^{-1}$), la manifestación de los signos de neurotoxicidad fue más parecida a la producida por exposición a MAZ (se observó la protrusión de la cabeza-pie), pero a

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

concentraciones mucho más altas. En conjunto, estos resultados permitirían concluir que la manifestación de todos los signos de neurotoxicidad a bajas concentraciones de insecticida, estaría más relacionada con la sensibilidad de ChE que con la falta de efecto protector de CE. De todos modos, la diferencia en la sensibilidad de ChE y en la relación sensibilidad de ChE/sensibilidad de CE a MAZ, CPF y CAR no serían suficientes para explicar las diferencias en la manifestación de los signos de neurotoxicidad entre los tres insecticidas anticolinesterásicos.

La ausencia de una correlación inequívoca entre el grado de inhibición de ChE y la manifestación de signos de neurotoxicidad, su severidad, el tiempo hasta su manifestación y su duración, es un tema que ha sido informado y discutido para una variedad de especies (Casarett y Doull, 2001; Costa, 2018; Kristoff et al., 2006; Pope et al., 2005; Pope, 1999; Richardson, 1995). En algunas especies, los signos de neurotoxicidad ocurren a bajos niveles de inhibición de ChE, mientras que en otras especies pueden no manifestarse aún a niveles altos de inhibición de ChE. Además, como en el caso de *C. gibbosa*, esta relación puede variar dentro de una misma especie, según el insecticida estudiado. De este modo, el patrón de los signos de exposición a OF y carbamatos puede diferir entre insecticidas y no se puede explicar únicamente a través de la inhibición de ChE (Costa, 2018)

En el caso *C. gibbosa*, con MAZ la protrusión conspicua de la cabeza-pie y la falta total de adherencia se manifestaron a partir de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, coincidiendo con una inhibición de ChE del 53 %. En el caso de CPF, no se observó la protrusión de la cabeza-pie, aún a $7.500 \mu\text{g L}^{-1}$ y 70 % de inhibición de ChE y la adherencia disminuyó ligeramente a partir de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, salvo a $5.000 \mu\text{g L}^{-1}$ donde disminuyó 60 % y coincidió con 63 % de inhibición de ChE. En el caso de CAR, la máxima manifestación de la protrusión de la cabeza-pie y de la falta de adherencia fueron de 25 % a $500 \mu\text{g L}^{-1}$, con una inhibición de ChE del 83 %. Se podría sugerir que la falta de adherencia representa un indicio de neurotoxicidad, reflejada en un estado general alterado de *C. gibbosa* y que la exposición conspicua de la cabeza-pie con

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

falta de movilidad espontánea sería un grado máximo de neurotoxicidad colinérgica. En vertebrados, se han descrito síntomas distintos asociados con diferentes grados de neurotoxicidad, como la toxicidad colinérgica aguda y la neurotoxicidad retrasada (Costa, 2018). En invertebrados, por ejemplo *L. variegatus*, Kristoff et al. (2010) describieron un aumento en la severidad de los síntomas de neurotoxicidad con el aumento en la concentración de MAZ y de CAR, comenzando por movimientos descoordinados y culminando en rigidez corporal, dificultad motriz y, en algunos casos, curvamiento del cuerpo entero.

Alternativamente, para explicar las diferencias entre inhibición de ChE y manifestación de signos de neurotoxicidad, Pope (1999) propuso que la modulación de los procesos involucrados luego del paso inicial de inhibición de ChE hasta la manifestación de la respuesta tóxica contribuyen a la toxicidad diferencial de OF y carbamatos. Para que se manifieste la toxicidad colinérgica, luego de la inhibición inicial de ChE tendría que ocurrir también la acumulación de ACh en las sinapsis, la estimulación excesiva de receptores colinérgicos post-sinápticos y la consecuente alteración de funciones celulares. La modulación de cualquiera de estos procesos podría influir en la progresión de eventos desde la exposición a un OF o carbamato y la expresión de la toxicidad (Pope, 1999). En este sentido, en vertebrados existe amplia evidencia de que algunos OF y carbamatos pueden interactuar con blancos del sistema nervioso adicionales a ChE, en particular, con receptores muscarínicos y nicotínicos tanto post como pre sinápticos (Costa, 2018; Pope et al., 2005; Pope, 1999; Richardson, 1995; Satoh y Gupta, 2010). Se sugiere incluso, que los receptores muscarínicos son blancos de OF y carbamatos más relevantes que los nicotínicos, y que la modulación pre-sináptica de por unión a los receptores muscarínicos podría contribuir a la neurotoxicidad diferencial entre OF y carbamatos (Pope, 1999). ¿De qué manera? Por ejemplo, la activación de receptores muscarínicos pre-sinápticos reduce la síntesis de ACh y su liberación. Algunos OF, entre ellos CPF, se unen a estos receptores, por lo que podrían

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

limitar la acumulación de ACh en la sinapsis luego de la inhibición de ChE (**Figura 3.14**; Pope 1999). Esta retroalimentación negativa significaría que, aunque CPF inhiba la actividad de ChE, la acumulación de ACh en la sinapsis se vea reducida y, con ella, la estimulación de receptores colinérgicos post-sinápticos y, probablemente los síntomas colinérgicos. La afinidad por los receptores muscarínicos y nicotínicos varía entre OF y carbamatos (Pope et al., 2005; Satoh y Gupta, 2010).

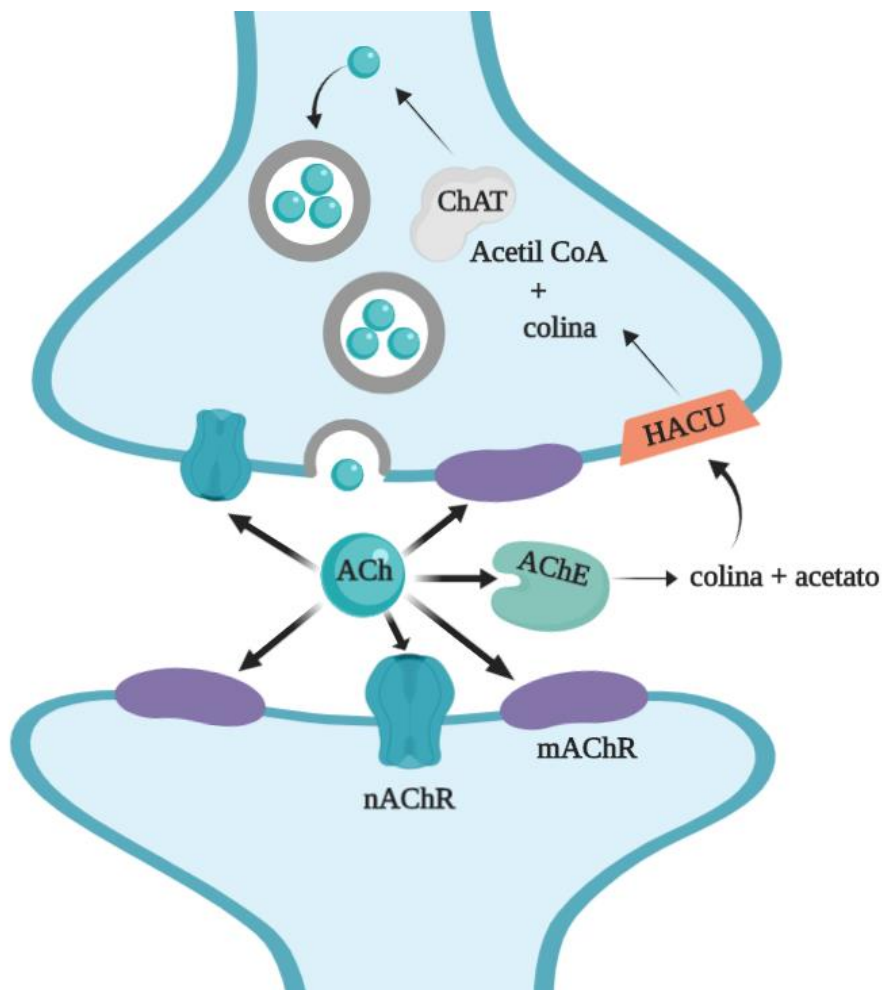


Figura 3.14 Ejemplo de sinapsis colinérgica y posibles sitios adicionales de acción de plaguicidas OF y carbamatos en vertebrados. La acetilcolinesterasa (AChE), el sitio de acción primario para la mayoría de estos plaguicidas, hidroliza el neurotransmisor acetilcolina (ACh). La colina que se libera es transportada dentro de la neurona pre-sináptica por el sistema de incorporación de colina de alta afinidad (HACU). La acetilcolina es sintetizada por la acetiltransferasa de colina (ChAT) usando acetil coenzima A (acetil CoA) como cofactor. Cuando ocurre la despolarización, las vesículas sinápticas con ACh se fusionan con la membrana plasmática y se libera ACh a la sinapsis. La ACh puede unirse a receptores pre-sinápticos o post-sinápticos muscarínicos (mAChR) o nicotínicos (nAChR) y alterar las funciones celulares. Además de ChE, otros blancos directos o que pueden ser modulados por algunos plaguicidas OF y carbamatos incluyen nAChR, mAChR, HACU y el sitio de unión de las vesículas de ACh con la membrana plasmática. Adaptado de Pope (1999).

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

En moluscos, el mecanismo exacto de neurotransmisión por ACh no ha sido definido claramente todavía, pero sí se sabe que ACh actúa como neurotransmisor y como compuesto modulador, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico de moluscos, que se encuentra presente en neuronas colinérgicas, no colinérgicas y en los ganglios nerviosos centrales (Rickwood y Galloway, 2004; Vehovszky et al., 2015). Incluso se han establecido distintos receptores colinérgicos, incluyendo nAChR, que pueden mediar efectos post-sinápticos tanto excitatorios (catiónicos) como inhibitorios (aniónicos) (Vehovszky et al., 2015). ACh puede generar contracción en los músculos de gasterópodos y, también, la neurotransmisión mediada por AChR está presente en las redes centrales de generación de patrones que controlan comportamientos vitales como el respiratorio y la alimentación (Chase 2002; Vehovszky et al., 2015). Se podría proponer entonces que las diferencias observadas en los signos de neurotoxicidad en *C. gibbosa* por la exposición a MAZ, CPF y CAR dependen de la sensibilidad diferencial de la actividad de ChE, la sensibilidad diferencial de la actividad de CE y, posiblemente también, en modulaciones diferenciales de procesos de la neurotransmisión mediada por ACh regulados por los receptores colinérgicos. Por ejemplo, la alta sensibilidad de las ChE de *C. gibbosa* llevaría a una rápida acumulación de ACh y un fuerte estímulo colinérgico post-sináptico que derive en la máxima manifestación de los signos de neurotoxicidad aguda (protrusión de la cabeza-pie y falta de adherencia total), a bajas concentraciones de MAZ. Dada la alta afinidad de ChE de esta especie por MAZ, la acumulación de ACh y sus efectos ocurrirían antes de que ocurra cualquier interferencia mediada por la unión de MAZ a los receptores, aún a altas concentraciones de MAZ. En el otro extremo, la baja sensibilidad de las ChE de *C. gibbosa* a CPF podría llevar a una acumulación del OF en el espacio sináptico previa o simultánea a la inhibición de ChE, y la posible unión de OF a receptores moduladores de procesos de síntesis pre-sinápticos de ACh y/o la interferencia con receptores post-sinápticos (como sugirió Pope (1999) en vertebrados). Si bien la actividad de ChE se vería inhibida eventualmente por CPF,

Respuestas enzimáticas en función de la concentración de clorpirifos, carbarilo y acetamiprid en tejido blando total

la disminución en la síntesis de ACh reduciría la estimulación colinérgica post-sináptica y, con ella, la manifestación de los signos (no se observó la protrusión de la cabeza-pie, pero sí disminución de la adherencia). En el caso de CAR, la sensibilidad de las ChE de *C. gibbosa* resultó intermedia entre MAZ y CPF y, a la vez la sensibilidad de las CE resultó similar que la de las ChE. Por lo tanto, existiría una competencia entre ChE y CE por CAR, con las CE participando en la detoxificación del carbamato, que reduciría la acumulación de ACh y los signos de neurotoxicidad. En este caso, también podría estar participando la unión de CAR a los receptores, como otro elemento en la modulación de la toxicidad colinérgica. Es importante aclarar que se trata simplemente de una hipótesis *a posteriori* que se propone para explicar los resultados obtenidos, y que debe realizarse una variedad de ensayos diferentes para corroborarla. De este modo, se abren nuevos interrogantes sobre la especificidad de la respuesta de *C. gibbosa* (y de las especies no blanco en general) a plaguicidas anticolinesterásicos y sobre qué determina las diferencias en los efectos de estos insecticidas.

4 Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

4.1 Introducción

La evaluación de la toxicidad de los compuestos químicos y el análisis de riesgo para la salud humana y ambiental, generalmente se llevan a cabo para cada compuesto de manera individual, incluso con fines regulatorios (Rodney et al., 2013). Sin embargo, los contaminantes raramente se encuentran de forma independiente en el ambiente, si no que están presentes como parte de mezclas complejas, combinados con múltiples compuestos de distinta naturaleza (Green et al., 2018). Por ejemplo, en programas de monitoreo de aguas superficiales se han encontrado más de siete plaguicidas o sus compuestos de degradación (Rodney et al., 2013). En Argentina, en canales de drenaje de la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Loewy et al. (2011) detectaron la coexistencia de MAZ, CPF y CAR. Macchi et al. (2018) informaron que el 44 % de las muestras analizadas de la misma zona presentaban dos de estos plaguicidas en conjunto y, el 18 %, tres. Como consecuencia, los organismos en ambientes acuáticos se encuentran continuamente expuestos a mezclas de plaguicidas. Por lo tanto, la predicción de los efectos conjuntos de compuestos tóxicos ha sido y continúa siendo un objetivo importante para la ecotoxicología (Newman, 2013).

El comportamiento de los contaminantes en una mezcla, entre ellos los plaguicidas, puede ser diferente al observado para los compuestos puros, debido a interferencias de los compuestos entre sí o de sus efectos. Un compuesto puede influir en la toxicocinética

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

(absorción, distribución, metabolismo o eliminación) de otro o en la toxicodinámica (Hernández et al., 2017; Newman, 2013). Las interacciones biológicas entre diferentes compuestos dentro de una mezcla pueden variar según sus concentraciones relativas, vías de ingreso, tiempo y duración de la exposición y blancos biológicos. La integración de las posibles interacciones entre compuestos químicos a la evaluación de su toxicidad es uno de los desafíos actuales para lograr evaluaciones de riesgo más realistas, ya que la evaluación por separado de la toxicidad de químicos individuales puede no estimar adecuadamente sus efectos combinados (Cedergreen, 2014). El abordaje más común es evaluar la toxicidad de los compuestos individuales seguido por un modelado matemático de los efectos combinados predichos cuando se cuenta con información sobre la relación concentración respuesta para puntos finales de toxicidad específicos (Hernández et al., 2017).

Para estudiar los efectos combinados de compuestos en una mezcla, en general se definen tres tipos básicos de acción entre los compuestos: adición de concentraciones (*Concentration Addition*, CA), basada en el supuesto de modos de acción similares; acción independiente (AI), basada en modos de acción distintos; e interacciones (**Figura 4.1**; Hernández et al., 2017). Se considera que los compuestos tóxicos tienen modos de acción conjunta similar si actúan a través del mismo mecanismo y “un componente puede ser sustituido por una proporción equivalente del otro y la toxicidad de la mezcla se puede predecir directamente a partir de la de sus componentes si sus proporciones relativas se conocen” (Finney, 1947; Newman, 2014). El modelo de CA se basa sobre este supuesto y asume que la magnitud de la respuesta biológica a una mezcla química puede predecirse de la suma de las concentraciones de sustancias que actúan de forma similar (Hernández et al., 2017). Por otro lado, el modelo de AI se utiliza cuando se asume que el efecto de cada compuesto es independiente de los otros, es decir, cuando los compuestos tienen diferentes blancos y producen el mismo efecto de manera independiente; se suman los efectos y no las concentraciones (Hernández et al., 2017). CA y AI son modelos aditivos que asumen que los

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

compuestos no interactúan entre sí, ni en un nivel físico químico ni en su toxicocinética o toxicodinámica. Las interacciones se refieren a todas las formas de acción de los compuestos individuales que hacen que los efectos de sus mezclas desvíen de las esperadas por los modelos CA y AI (Hernández et al., 2017). Cuando ocurren interacciones, la toxicidad de la mezcla puede categorizarse como antagónica (menor que la esperada por aditividad) o sinérgica (mayor que la esperada por aditividad) (Hernández et al., 2017). El esquema de trabajo del Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas de la OMS para la evaluación de riesgo de mezclas propone el uso de CA como modelo por defecto para la evaluación de nivel cero (Cedergreen, 2014). Además, algunos autores han demostrado que el modelo de CA es un buen predictor de la toxicidad de mezclas de compuestos con modos de acción distintos (Rodney et al., 2013). Bajo este modelo, las concentraciones de los tóxicos se ajustan según su potencia relativa (generalmente representada por su CI_{50}) y luego pueden sumarse para predecir efectos bajo el supuesto de aditividad.

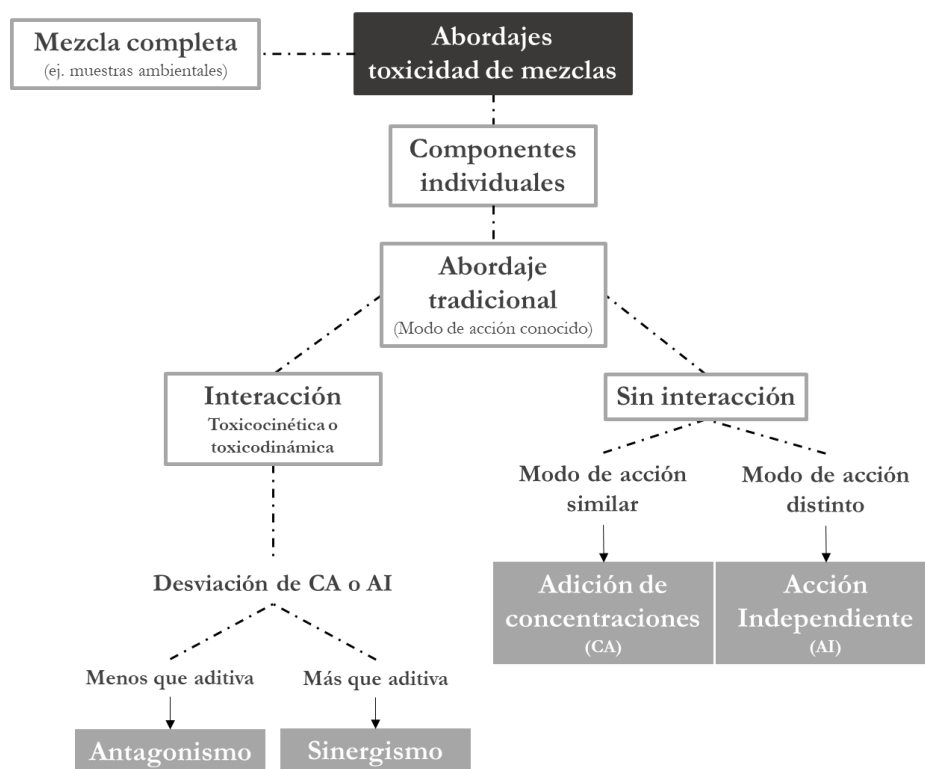


Figura 4.1 Abordajes tradicionalmente utilizados para la evaluación de mezclas químicas. Adaptado de Hernández et al. (2017).

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

Los plaguicidas pertenecen a uno de los grupos químicos mejor estudiados en ecotoxicología de mezclas (Hernández et al., 2017). Generalmente se utilizan métodos simples de adición para mezclas binarias (Rodney et al., 2013). La EPA recomienda el modelo de CA para la evaluación de riesgo de plaguicidas OF y N-metilcarbamatos en humanos, ya que comparten un mismo modo de acción, y este abordaje se ha extendido a la ecotoxicología acuática (Belden et al., 2009; Laetz et al., 2009; Rodney et al., 2013). Sin embargo, también se han encontrado efectos sinérgicos de algunos OF y/o N-metilcarbamatos, más allá de tener el mismo modo de acción y que se esperara CA (Cacciatore et al., 2013, 2012; Cedergreen, 2014; Hernández et al., 2017; Laetz et al., 2013, 2009).

La toxicidad de mezclas se ha estudiado en especies acuáticas pertenecientes a distintos grupos taxonómicos, como peces, anfibios, bivalvos, insectos, crustáceos, plantas y algas, pero la mayoría de las evaluaciones se realizaron sobre unas pocas especies dentro de estos grupos. Belden et al. 2007 concluyeron que el 77 % de los experimentos realizados bajo el modelo CA, fueron realizados con las mismas cinco especies y el 90 % con las mismas diez especies. Por lo tanto, resulta de interés evaluar las respuestas de *C. gibbosa* a la exposición a mezclas binarias de CPF y CAR, para conocer los efectos de la exposición conjunta a insecticidas que pueden encontrarse en el ambiente que habita. Además, aportará al conocimiento general sobre la ecotoxicología de mezclas de insecticidas en especies acuáticas.

Hipótesis

La exposición conjunta a dos plaguicidas anticolinesterásicos afecta los signos de neurotoxicidad y la actividad de ChE y CE medida con p-NFB como sustrato de manera aditiva con respecto a los efectos de los insecticidas individuales, pero no afecta la actividad de CE medida con p-NFA ni de GST, en homogenatos de tejido blando total de *C. gibbosa*.

Objetivo

Estudiar los signos de neurotoxicidad y las respuestas de ChE, CE y GST en homogenatos de tejido blando total de *C. gibbosa* expuesto a mezclas binarias de CPF y CAR.

Predicciones

- La exposición aguda de *C. gibbosa* a mezclas binarias de CPF y CAR disminuye la adherencia y genera la protrusión conspicua de la cabeza-pie de manera aditiva con respecto a los efectos de los insecticidas individuales.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a mezclas binarias de CPF y CAR inhibe la actividad de ChE de manera aditiva con respecto a los efectos de los insecticidas individuales.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a mezclas binarias de CPF y CAR inhibe la actividad de CE p-NFB en homogenatos de tejido blando total de manera aditiva con respecto a los efectos de los insecticidas individuales.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a mezclas binarias de CPF y CAR no afecta la actividad de CE p-NFA en homogenatos de tejido blando total.
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a mezclas binarias de CPF y CAR no afecta la actividad de GST en homogenatos de tejido blando total.

4.2 Metodología

4.2.1 Diseño experimental

Los efectos agudos de mezclas binarias de CPF y CAR se estudiaron usando tres combinaciones en las cuales los insecticidas se encontraban en una proporción 50:50. Se eligió estudiar mezclas con efectos crecientes esperados según CA y fijar las concentraciones de los insecticidas en las mezclas en una proporción a la cual las desviaciones de CA (antagonismo o sinergia) pueden ser más detectables (De Laender et al., 2009). La

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

concentración de cada insecticida en las mezclas se basó en los valores de CI_{50} para ChE (CI_{50}^{ChE}) en homogenatos estimados para los insecticidas individuales en el Capítulo 3 y se normalizó a su respectiva CI_{50}^{ChE} , según la ecuación (4.1).

$$Equivalentes\ CI_{50}^{ChE} = \frac{Concentración\ insecticida\ A}{CI_{50}^{ChE}\ insecticida\ A} \quad (4.1)$$

Por ejemplo, considerando para CPF $CI_{50}^{ChE} = 940\ \mu g\ L^{-1}$, una concentración evaluada de CPF de $470\ \mu g\ L^{-1}$ corresponde a 0,5 equivalentes CI_{50}^{ChE} (0,5 CI_{50}^{ChE}).

Tabla 4.1 Equivalentes de CI_{50}^{ChE} y concentraciones de CPF y CAR correspondientes a los tratamientos con insecticidas individuales y sus mezclas.

Equivalentes CI_{50}^{ChE}	CPF			CAR			CPF+CAR		
	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1	1,5
CPF ($\mu g\ L^{-1}$)	470	940	1410	-	-	-	235	470	705
CAR ($\mu g\ L^{-1}$)	-	-	-	20	40	60	10	20	30

En un primer ensayo, se estudió la combinación $0,5\ CI_{50}^{ChE}\ CPF + 0,5\ CI_{50}^{ChE}\ CAR$ (identificada como $1\ CI_{50}^{ChE}\ CPF+CAR$) (**Figura 4.2 Ensayo 1**). En un segundo ensayo, se estudiaron las combinaciones $0,25\ CI_{50}^{ChE}\ CPF + 0,25\ CI_{50}^{ChE}\ CAR$ (identificada como $0,5\ CI_{50}^{ChE}\ CPF+CAR$) y $0,75\ CI_{50}^{ChE}\ CPF + 0,75\ CI_{50}^{ChE}\ CAR$ (identificada como $1,5\ CI_{50}^{ChE}\ CPF+CAR$) (**Figura 4.2 Ensayo 2**). En la **Tabla 4.1** se detallan las concentraciones de cada insecticida para las mezclas estudiadas. Además, para cada ensayo, se incluyeron exposiciones a los insecticidas individuales en concentraciones correspondientes a la adición de las concentraciones de las mezclas, según CA. Es decir, para el primer experimento, se incluyó un tratamiento con $1\ CI_{50}^{ChE}\ CPF$ y otro con $1\ CI_{50}^{ChE}\ CAR$ y, en el segundo, se incluyeron tratamientos con $0,5\ CI_{50}^{ChE}\ CPF$, $0,5\ CI_{50}^{ChE}\ CAR$, $1,5\ CI_{50}^{ChE}\ CPF$ y $1,5\ CI_{50}^{ChE}\ CAR$ (**Tabla 4.1**).

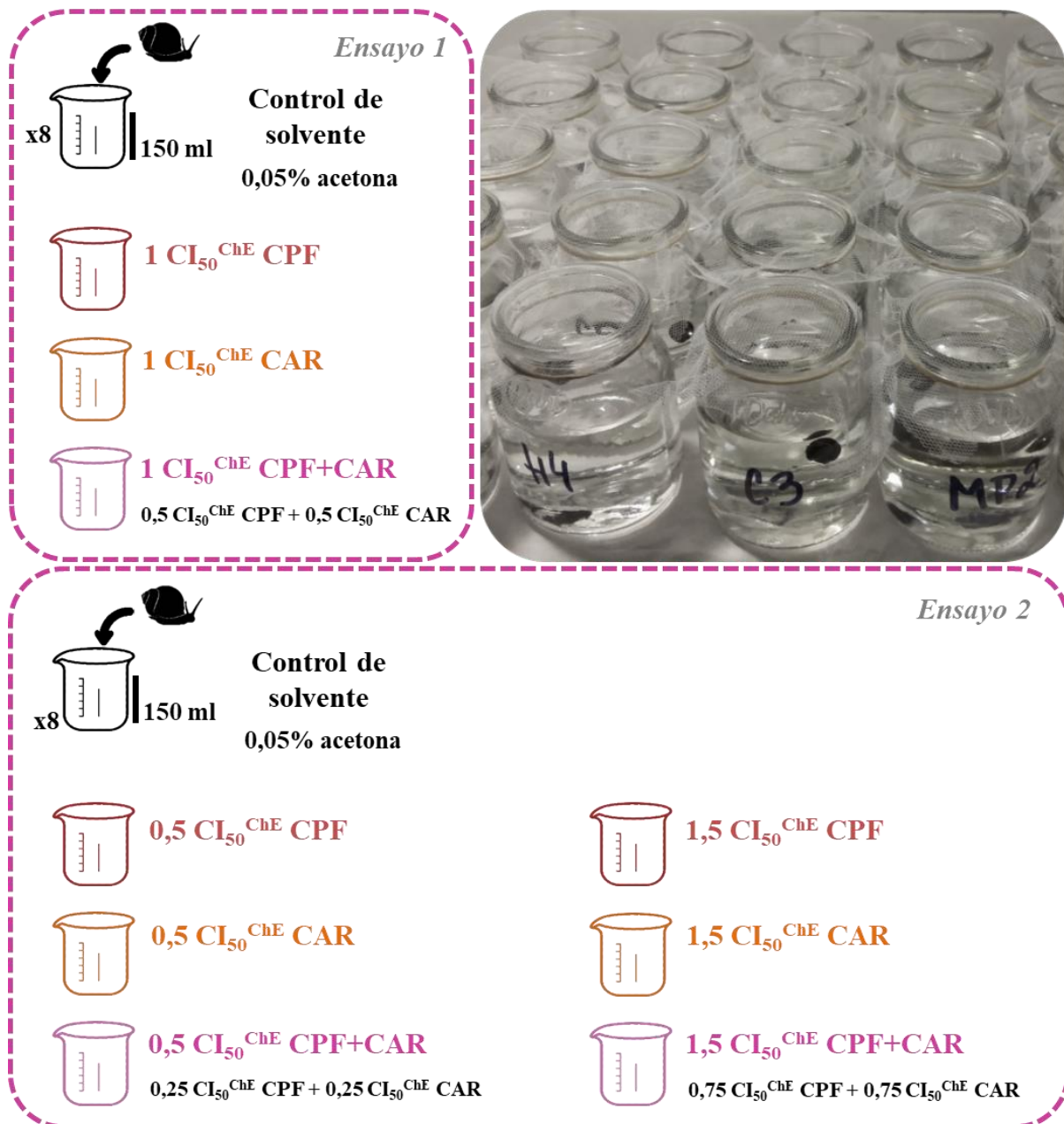


Figura 4.2 Esquema y fotografía de la metodología utilizada en los ensayos realizados para evaluar los signos de neurotoxicidad y las respuestas de ChE, CE, GST en homogenatos de tejido total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 a mezclas binarias de CPF y CAR.

Los tratamientos con los insecticidas individuales son considerados importantes para evitar falsos positivos o falsos negativos a la hora de evaluar la acción de las mezclas como aditiva, sinérgica o antagónica, ya que permiten diferenciar las desviaciones reales del modelo CA de la variabilidad que puede ocurrir entre los resultados de las pruebas realizadas con los compuestos individuales para determinar la relación concentración respuesta y las pruebas con mezclas (De Laender et al., 2009). Por lo tanto, en cada ensayo, las exposiciones

al control de solvente (acetona 0,05 %), a las mezclas binarias y a los insecticidas individuales se llevaron a cabo de manera simultánea.

Para los bioensayos, los individuos se colocaron de manera individual en recipientes de vidrio de 250 mL de capacidad, con 150 mL de la solución correspondiente según el tratamiento asignado, con un total de ocho individuos por concentración de insecticida por ensayo (**Figura 4.2**). Finalizadas las 48 h de exposición, se registraron la letalidad y los signos de neurotoxicidad y se realizó el homogenato de tejido blando total para cada individuo. En los sobrenadantes, se midieron las siguientes variables: contenido de proteínas y actividad de ChE y actividad de CE medida con p-NFA y con p-NFB. La actividad de GST se midió únicamente para el primer ensayo. Las condiciones generales de estos bioensayos corresponden a las descritas para EAIN en el Capítulo 2 “Metodología general”.

4.2.2 Análisis estadístico

Los resultados de los dos ensayos se analizaron en conjunto, luego de corroborar que no existieran diferencias entre los grupos control, utilizando la prueba t de Student para muestras independientes. Para analizar si el efecto de las mezclas de CPF y CAR era aditivo, antagónico o sinérgico, se utilizó el método descrito por (Laetz et al., 2013, 2009), según el cual se definen interacciones aditivas como aquellas que no se desvían de los efectos esperados según CA y las interacciones antagónicas y sinérgicas como aquellas desviaciones significativas. De acuerdo a este método, las concentraciones evaluadas para definir las curvas concentración respuesta de cada insecticida individual (Capítulo 3) se normalizaron con respecto a la CI_{50}^{ChE} de su respectivo insecticida, según la ecuación (4.1). Luego, los datos normalizados con CI_{50}^{ChE} para los insecticidas individuales se combinaron y ajustaron con una única regresión logística no lineal del mismo modo que las curvas originales, mediante la ecuación (3.1). De esta manera, se obtuvo una única curva con una banda de predicción del 95 % para resultados esperados según CA. La banda de predicción del 95 %

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

representa el área donde se espera encontrar el 95 % de datos futuros (resultados experimentales de mezclas). Bajo el supuesto de que las curvas de concentración respuesta de los dos insecticidas sean paralelas, la curva combinada puede usarse para detectar interacciones entre ambos (**Figura 4.3**). De esta manera, si la inhibición de ChE de una mezcla cae en la curva o dentro de la banda de predicción del 95 %, se concluye que los insecticidas interaccionan de manera aditiva. Si la mezcla cae significativamente arriba de la curva (la mezcla causa menor inhibición que la esperada), la interacción se considera menos que aditiva, es decir, antagónica. Si cae significativamente por debajo de la curva (la mezcla causa mayor inhibición que la esperada), se considera que la interacción es más que aditiva, es decir, sinérgica.

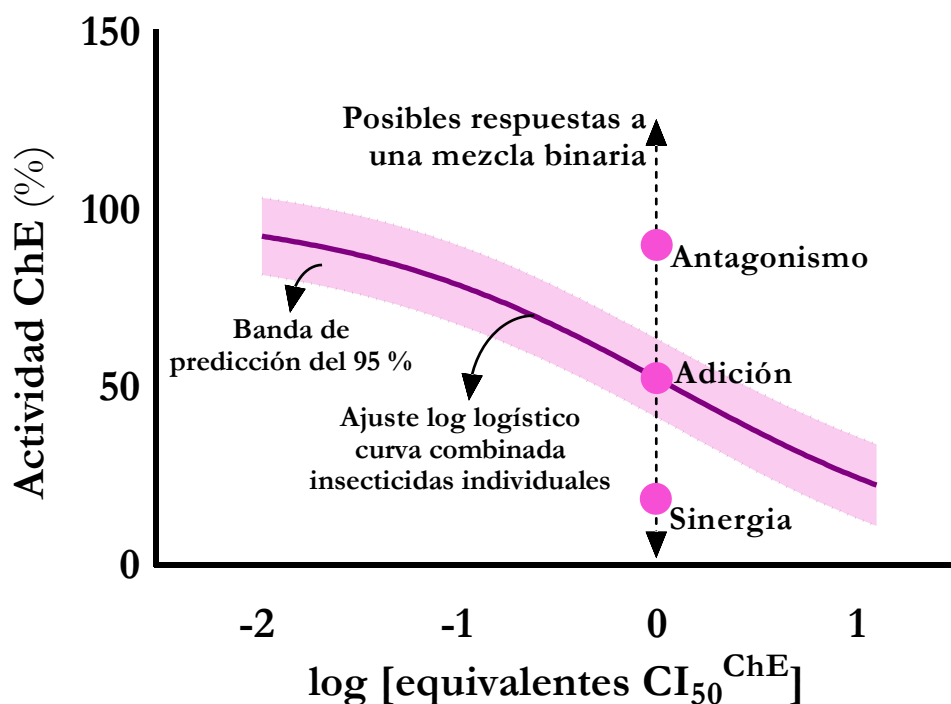


Figura 4.3 Diagrama hipotético de las tres respuestas toxicológicas posibles a la exposición a una mezcla binaria de insecticidas bajo el modelo CA. La curva representa el ajuste log-logístico mediante un modelo de cuatro parámetros a los datos normalizados y combinados de las exposiciones a insecticidas individuales. La banda de predicción del 95 % representa el área donde se espera encontrar el 95 % de los resultados experimentales de las mezclas según el modelo CA. Adaptado de Laetz et al. (2009).

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

El método descrito se utilizó para evaluar el efecto de las mezclas sobre ChE, ya que se habían obtenido curvas concentración respuesta para ambos insecticidas en el Capítulo 3. En el caso de CE medida con p-NFB como sustrato, en el Capítulo 3 únicamente se pudo describir la relación concentración respuesta para CAR. En el caso de CPF, no se encontró una respuesta inhibitoria sobre CE a las concentraciones evaluadas en ese capítulo. Por lo tanto, los resultados de los efectos de las mezclas sobre CE medida con p-NFB se evaluaron sobre la curva normalizada de CAR. Para aquellas variables en las que no se encontró una respuesta concentración dependiente, se contrastaron los resultados de los diferentes tratamientos contra los del control de solvente utilizando prueba t de Student para muestras independientes. La actividad de CE medida con p-NFA se transformó mediante log10 para cumplir con el supuesto de homogeneidad de varianzas. La letalidad, adherencia y exposición de la cabeza-pie se evaluaron utilizando la Prueba exacta de Fisher (Green et al., 2018). El nivel de significancia de los contrastes se ajustó según la corrección de Bonferroni-Holm para mantener el nivel de significancia global en 0,05 (Green et al., 2018). Se informan los valores de P modificados.

4.3 Resultados

No se registró letalidad para ninguno de los tratamientos; tanto para los insecticidas individuales como para las mezclas la supervivencia fue del 100 % (**Figura 4.4 A**). La adherencia fue del 100 % en los individuos expuestos a las diferentes concentraciones de CAR y a la concentración más alta de CPF ($1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}} 1410 \mu\text{g L}^{-1}$) (**Figura 4.4 B**). Los individuos expuestos a $0,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}} \text{ CPF}$ ($470 \mu\text{g L}^{-1}$) y a $1 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}} \text{ CPF}$ ($940 \mu\text{g L}^{-1}$) mostraron menor adherencia (71 y 63 %, respectivamente), si bien no difirió del grupo control en ningún caso (**Figura 4.4 B**; Prueba exacta de Fisher; $P = 0,0948$ y $P = 0,1818$). En el caso de las mezclas, los individuos expuestos tanto a $1 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}} \text{ CPF-CAR}$ como a $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}} \text{ CPF-CAR}$ se encontraban adheridos en un 100 %, únicamente en los individuos

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

expuestos a $0,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ CPF-CAR ($235 \mu\text{g L}^{-1}$ CPF y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CAR) se encontró un 75 % de adherencia, que no difirió de la observada para el grupo control (Prueba exacta de Fisher; $P = 0,1107$). Los individuos no presentaron exposición de la cabeza-pie en ninguno de los tratamientos evaluados (**Figura 4.4 C**).

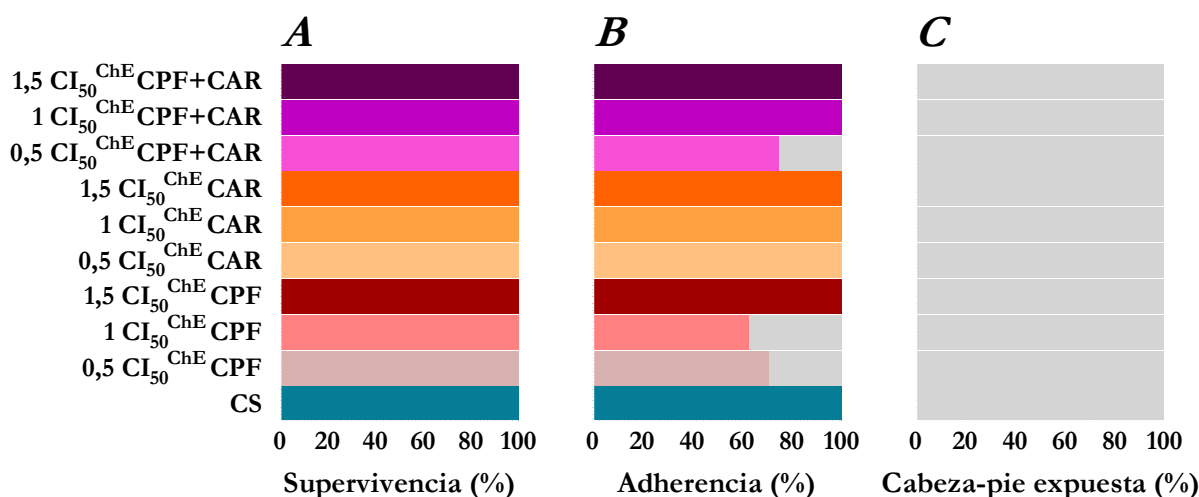


Figura 4.4 Porcentajes de supervivencia (A) y de los signos de neurotoxicidad adherencia (B) y exposición conspicua de la cabeza-pie (C), de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a mezclas binarias de CPF y de CAR y a los insecticidas individuales. $0,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$, $1 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ y $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ corresponden a concentraciones equivalentes a 0,5, 1 y 1,5 veces las respectivas $\text{CI}_{50}^{\text{ChE}}$ de ChE para CPF y CAR de manera individual y a combinaciones de 0,5, 1 y 1,5 $\text{CI}_{50}^{\text{ChE}}$ según el modelo de adición de concentraciones para mezclas binarias 50:50 de CPF y de CAR. CS: control de solvente, acetona 0,05 %.

La inhibición de ChE en individuos expuestos a CPF y CAR de manera individual (**Figura 4.5**) no difirió de la esperada según las curvas concentración-respuesta obtenidas en el Capítulo 3. Tanto en el caso de CPF (**Figura 4.5 A**) como en el de CAR (**Figura 4.5 B**), las inhibiciones de ChE luego de exposiciones agudas a $0,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$, $1 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ y $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ cayeron dentro de las bandas de predicción del 95 % de las curvas determinadas previamente. De este modo, se corroboró que la relación de la concentración-respuesta para cada insecticida no varió sustancialmente con lo determinado en experimentos previos.

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

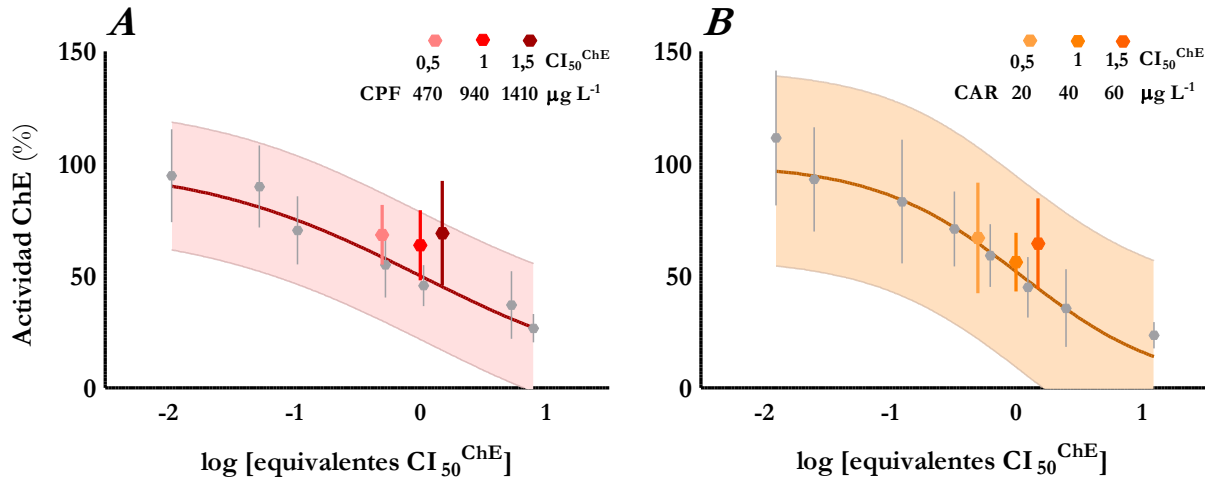


Figura 4.5 Respuestas de ChE en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a los insecticidas individuales, **A** CPF y **B** CAR, superpuestas sobre las respectivas curvas concentración respuesta de ChE, normalizadas a los correspondientes CI_{50}^{ChE} de cada insecticida. Puntos grises y líneas: media \pm desvío estándar de los datos de las curvas originales. Línea oscura: ajuste log lineal de cuatro parámetros. Banda alrededor de la línea media: banda de predicción del 95 %. Puntos de color: media \pm desvío estándar de los datos de las exposiciones a insecticidas individuales realizadas en simultáneo con las mezclas para confirmar que las relaciones concentración respuesta no cambiaron sustancialmente con respecto a las definidas en el Capítulo 3.

Las pendientes de las curvas concentración-respuesta de ChE individuales para CPF y CAR normalizadas no difirieron significativamente (Prueba de F; $P = 0,0646$). Por lo tanto, se combinaron para obtener la curva esperada para la relación concentración-respuesta para mezclas binarias de CPF y CAR según un modelo CA. Los datos se ajustaron con una única regresión logística de 4 parámetros (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Valores estimados de los parámetros del modelo log-logístico de cuatro parámetros utilizado en la regresión no lineal de los datos conjuntos de la inhibición concentración dependiente de ChE por la exposición aguda a CPF y a CAR de manera individual.

Respuesta	x_0 $\log(\text{eq.}CI_{50}^{ChE})$	P	R^2
CPF+CAR ChE	0,02601 [-0,06622 - 0,1182]	-0,602 [-0,6990 - -0,5050]	0,6673

La curva conjunta y su banda de predicción del 95 % (Figura 4.6 A) se utilizaron como base para determinar si los efectos de las mezclas ensayadas eran aditivos, sinérgicos o antagonicos. La mezcla $0,5 CI_{50}^{ChE}$ inhibió 25 ± 15 % la actividad de ChE de los individuos

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

expuestos con respecto a los individuos del grupo control, la mezcla 1 CI_{50}^{ChE} inhibió la actividad $56 \pm 18 \%$ y la mezcla 1,5 CI_{50}^{ChE} inhibió $58 \pm 15 \%$. Estos resultados yacen dentro de la curva combinada o dentro de la banda de predicción del 95 % (**Figura 4.6 B**).

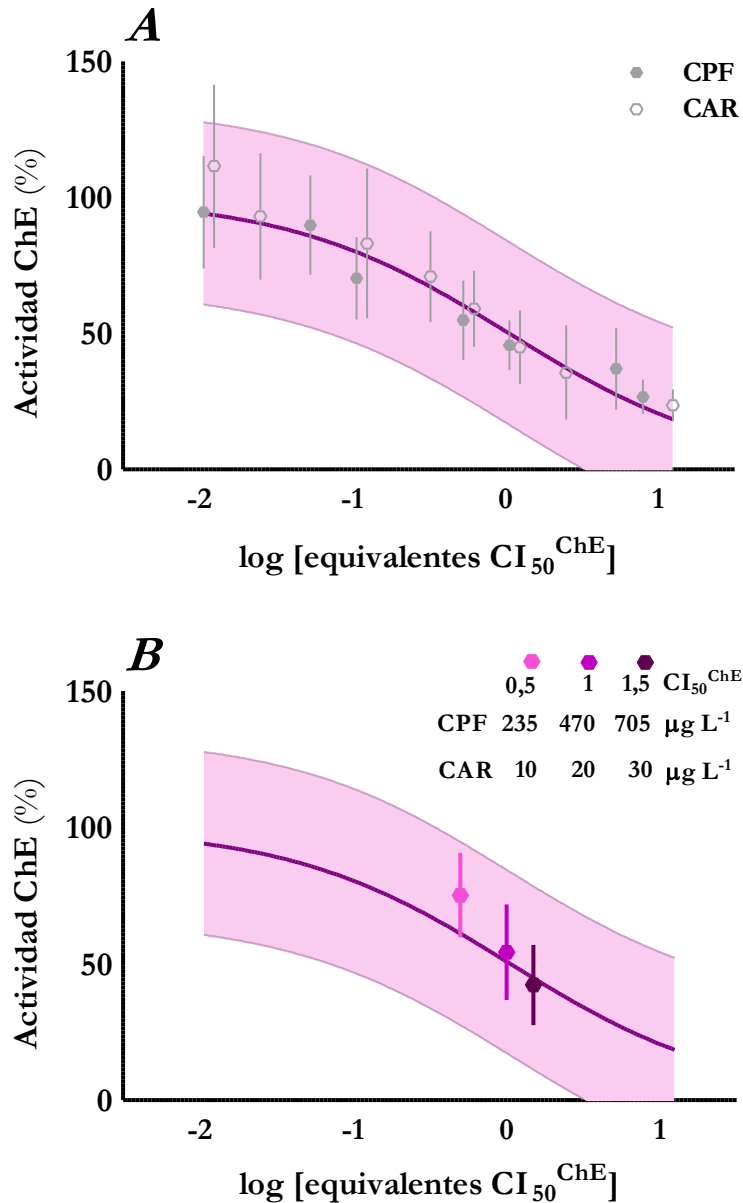


Figura 4.6 Respuesta de ChE en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a mezclas binarias 50:50 de CPF y CAR. **A** Curva combinada de concentración respuesta de ChE obtenida a partir de las curvas de exposición a los insecticidas individuales del Capítulo 3 normalizadas a sus respectivas CI_{50}^{ChE} . **B** Efectos de las mezclas binarias 50:50 de CPF y CAR ($0,5 CI_{50}^{ChE}$, $1 CI_{50}^{ChE}$ y $1,5 CI_{50}^{ChE}$) sobre la actividad de ChE. $0,5 CI_{50}^{ChE}$, $1 CI_{50}^{ChE}$ y $1,5 CI_{50}^{ChE}$ corresponden a combinaciones de 0,5, 1 y 1,5 CI_{50}^{ChE} según el modelo de adición de concentraciones para mezclas binarias 50:50 de CPF y de CAR. Puntos grises y líneas: media \pm desvío estándar de los datos curvas originales. Línea oscura: ajuste log lineal de cuatro parámetros. Banda alrededor de la línea media: banda de predicción del 95 %. Puntos de color: media \pm desvío estándar de los datos de las exposiciones a las mezclas.

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

En el caso de la actividad de CE medida con p-NFB como sustrato, la actividad en individuos expuestos a CPF y CAR de manera individual en los ensayos de mezclas (**Figura 4.7**) no difirió de la esperada según los resultados del Capítulo 3. Para CPF, la actividad de los individuos expuestos al insecticida en concentraciones correspondientes a $0,5 CI_{50}^{ChE}$, $1 CI_{50}^{ChE}$ y $1,5 CI_{50}^{ChE}$ no difirió de la de individuos expuestos al control (**Figura 4.7 A**; contrastes contra el control con prueba t de Student; $P > 0,05$). Para CAR, se contaba con la curva concentración respuesta para esta enzima, por lo que se analizaron los resultados de las exposiciones con respecto a la curva normalizada (**Figura 4.7 B**). Las inhibiciones de CE medida con p-NFB cayeron dentro de las bandas de predicción del 95 %. De este modo, se corroboró que la relación concentración-respuesta de esta enzima a cada insecticida no varió sustancialmente con respecto a lo determinado anteriormente.

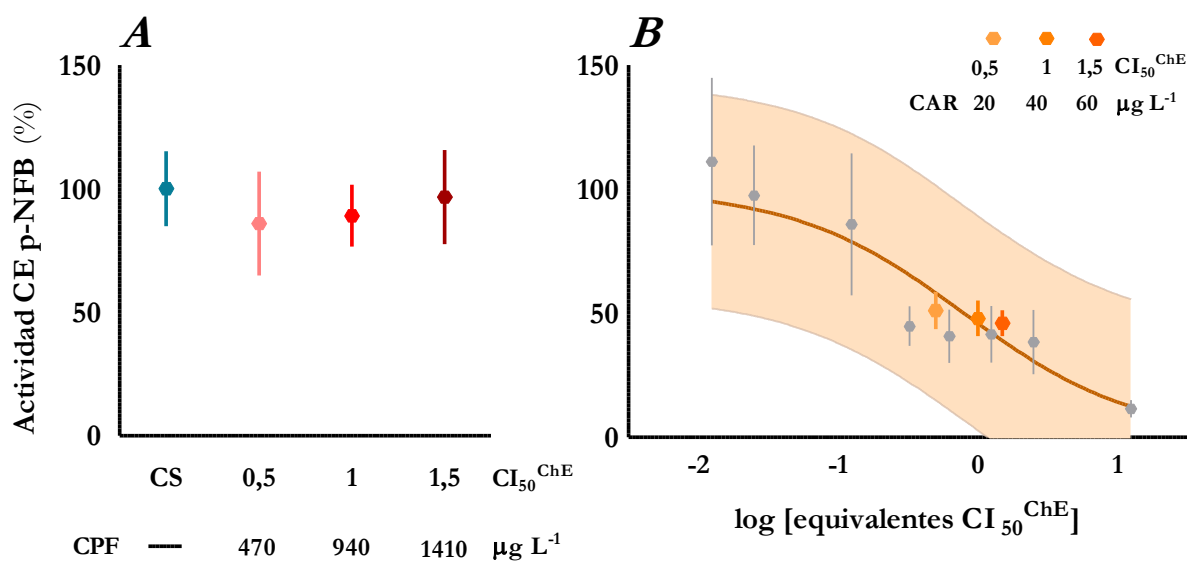


Figura 4.7 Respuestas de CE medida con p-NFB como sustrato en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a los insecticidas individuales, **A** CPF y **B** CAR superpuestas sobre las curvas concentración respuesta de CE p-NFB, normalizada a la correspondiente CI_{50} . Puntos grises y líneas: media \pm desvío estándar de los datos de las curvas originales. Línea oscura: ajuste log lineal de cuatro parámetros. Banda alrededor de la línea media: banda de predicción del 95 %. Puntos de color: media \pm desvío estándar de los datos de las exposiciones a insecticidas individuales realizadas en simultáneo con las mezclas para confirmar que las relaciones concentración respuesta no cambiaron sustancialmente con respecto a las definidas en el Capítulo 3. CS: control de solvente, acetona 0,05 %.

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

Las tres mezclas también inhibieron la actividad de CE medida con p-NFB como sustrato. La mezcla $0,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ inhibió $48 \pm 13 \%$ la actividad de los individuos expuestos con respecto a los individuos del grupo control, la mezcla $1 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ inhibió la actividad $63 \pm 7 \%$ y la mezcla $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ inhibió $53 \pm 4 \%$. Estos resultados yacen dentro de la curva concentración respuesta de CE p-NFB normalizada para CAR y su banda de predicción del 95 % (Figura 4.8).

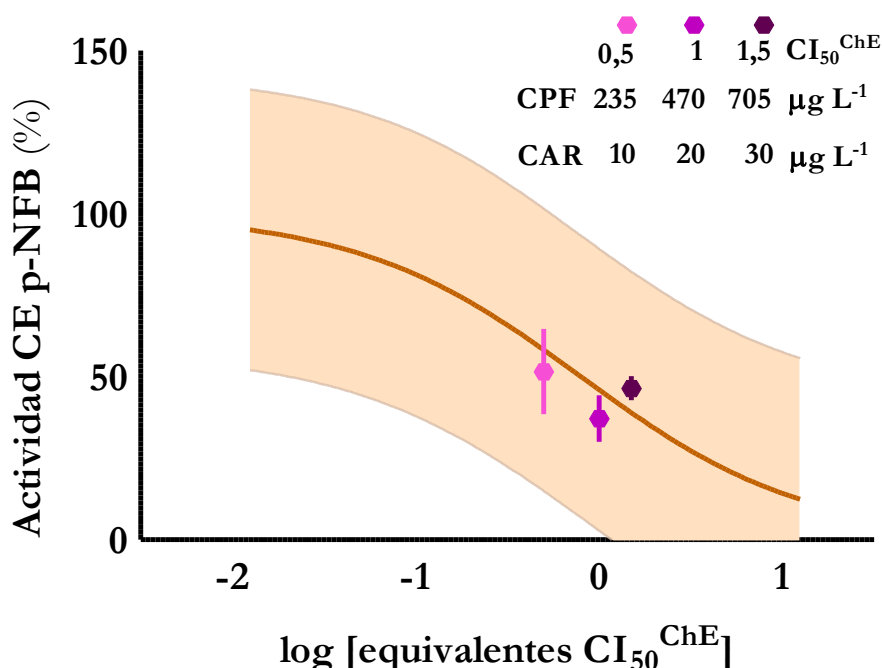


Figura 4.8 Respuesta de CE medida con p-NFB como sustrato en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a mezclas binarias 50:50 de CPF y CAR. Efectos de las mezclas binarias 50:50 de CPF y CAR ($0,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$, $1 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ y $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$) sobre la actividad de CE p-NFB. $0,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$, $1 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ y $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ corresponden a combinaciones de $0,5$, 1 y $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ según el modelo de adición de concentraciones para mezclas binarias 50:50 de CPF y de CAR. Línea oscura: ajuste log lineal de cuatro parámetros. Banda alrededor de la línea media: banda de predicción del 95 %. Puntos de color: media \pm desvío estándar de los datos de las exposiciones a las mezclas.

Las mezclas de CPF y CAR no tuvieron efecto sobre la actividad de CE medida con p-NFA (Figura 4.9; contrastes contra el control con prueba t de Student sobre datos transformados $\log(y)$; $P > 0,05$). Únicamente se observaron actividades aumentadas relativas a las de los individuos del grupo control, en los individuos expuestos a $0,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ CPF y $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ CAR (contrastos contra el control con prueba t de Student sobre datos

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

transformados $\log(y)$; $P = 0,0009$ y $P = 0,0424$, respectivamente). Sin embargo, estas diferencias con respecto al grupo control no son consistentes con lo observado en las exposiciones del Capítulo 3, en las que no se encontró un efecto de CPF ni de CAR sobre CE medida con p-NFA como sustrato para ninguna de las concentraciones evaluadas.

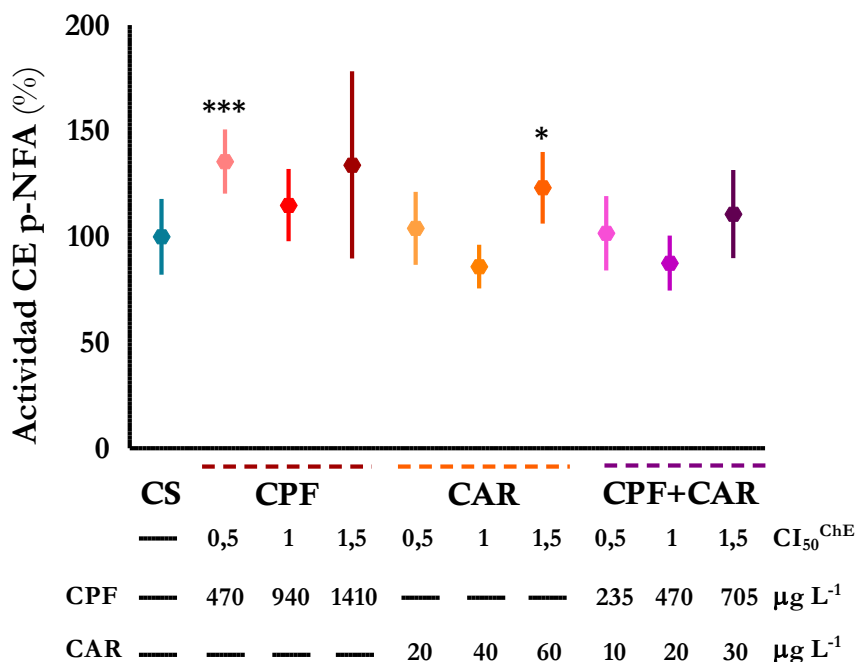


Figura 4.9 Respuesta de CE medida con p-NFA como sustrato en tejido blando total de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a mezclas binarias 50:50 de CPF y CAR. Efectos de las mezclas binarias 50:50 de CPF y CAR ($0,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$, $1 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ y $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$) sobre la actividad de CE p-NFA. $0,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$, $1 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ y $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ corresponden a combinaciones de 0,5, 1 y 1,5 $\text{CI}_{50}^{\text{ChE}}$ según el modelo de adición de concentraciones para mezclas binarias 50:50 de CPF y de CAR. Puntos: media \pm desvío estándar de los datos de las exposiciones a las mezclas. CS: control de solvente, acetona 0,05 %.

En el *Ensayo 1*, se determinó que la actividad de GST de los individuos tratados, tanto aquellos expuestos a los insecticidas individuales como aquellos expuestos a la mezcla $1 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$, no difirió de la actividad de los individuos del grupo control (**Figura 4.10**; contrastes contra el control con prueba t de Student; $P > 0,05$). Dado que la actividad de GST de los individuos tratados no difirió de la de los individuos del grupo control en los ensayos de exposición a intervalos amplios de concentraciones de CPF y de CAR (Capítulo 3) ni en el

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

primer ensayo de mezclas, no se midió la actividad de GST para el segundo ensayo de mezclas.

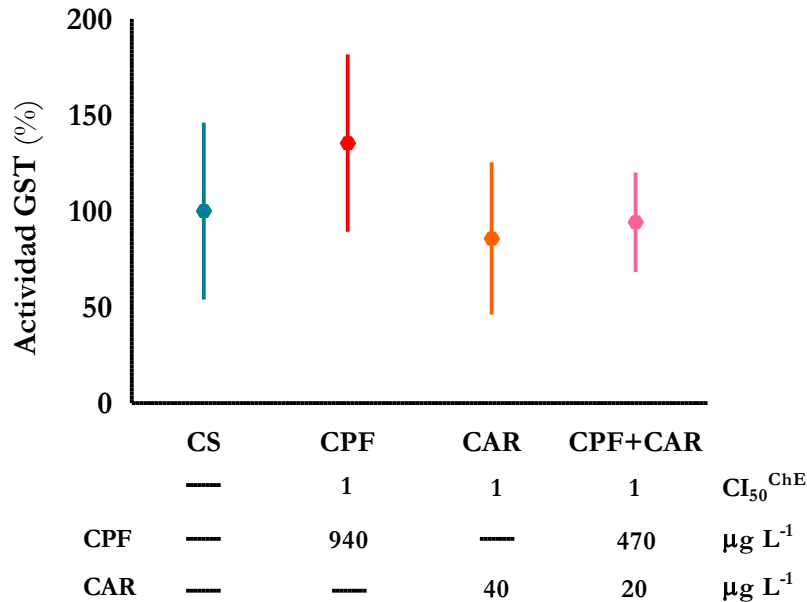


Figura 4.10 Respuesta de GST en tejido blando total de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a una mezcla binaria 50:50 de CPF y CAR. Efectos de la mezcla binaria 50:50 de CPF y CAR $1 CI_{50}^{ChE}$ y $1,5 CI_{50}^{ChE}$ sobre la actividad de GST. $1 CI_{50}^{ChE}$ corresponde a combinaciones de $1 CI_{50}^{ChE}$ según el modelo de adición de concentraciones para mezclas binarias 50:50 de CPF y de CAR. Punto: media \pm desvío estándar de los datos de las exposiciones a las mezclas. CS: control de solvente, acetona 0,05 %.

4.5 Discusión

Los plaguicidas se encuentran en el ambiente en simultáneo, como mezclas que podrían tener efectos neurotóxicos o bioquímicos en especies no blanco, de tipo aditivo, antagónico o incluso sinérgico, con respecto a los compuestos individuales. Sin embargo, el gran número de compuestos químicos que pueden estar presentes en el medio, patrones de exposición e interacciones complejas hace que sea imposible evaluar todas las posibles combinaciones. A partir de estudios realizados a campo, algunos autores han concluido que gran parte de la toxicidad observada se debe principalmente a algunos componentes dentro de las mezclas, por lo que la evaluación en laboratorio de mezclas simples, entre ellas las mezclas binarias, es un abordaje pertinente e importante para esta problemática (Belden et al., 2009). Por lo tanto, en este capítulo se realizó la evaluación de las respuestas de *C. gibbosa* a la exposición a mezclas binarias de CPF y CAR, cuyas respuestas tóxicas fueron previamente caracterizadas en esta especie en el Capítulo 3, con el objetivo de obtener un primer acercamiento hacia comprender lo que podría sucederle a esta especie frente a la acción conjunta de insecticidas de igual modo de acción.

En primer lugar, la evaluación de los signos de neurotoxicidad muestra, en términos generales, resultados similares a los observados en el capítulo anterior con CAR y CPF puros. Además, muestran que las mezclas binarias de CAR y CPF no producen efectos mayores que los de los compuestos puros sobre estas respuestas, es decir, no actúan de manera sinérgica sobre la manifestación de signos de neurotoxicidad en *C. gibbosa*. Por un lado, no se observó la protrusión conspicua de la cabeza-pie en los tratamientos con los insecticidas individuales, ni en ninguna de las mezclas. En el caso de CPF, esto coincide con lo observado en el Capítulo 3, en el cual este signo de neurotoxicidad no se manifestó aún a concentraciones más altas que las evaluadas en este capítulo. En el caso de CAR, los tratamientos del insecticida individual se realizaron a concentraciones de 20, 40 y 60 $\mu\text{g L}^{-1}$. Si bien en el

Capítulo 3 la protrusión conspicua de la cabeza-pie se había observado a una concentración de CAR de $25 \mu\text{g L}^{-1}$, únicamente se registró en un individuo, no difirió estadísticamente del grupo control, y no se registró a otras concentraciones excepto a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (en un 25 % de individuos). Esto podría explicar por qué no se registró en este capítulo en los individuos tratados con CAR solo ni en los de las mezclas.

Por otro lado, los resultados de la pérdida de adherencia son más variables, pero como se discutió en el capítulo anterior, esta respuesta puede manifestarse de manera más sutil y variable que la exposición de la cabeza-pie. Salvando algunas diferencias, los individuos tratados con los insecticidas individuales se comportaron mayoritariamente como en el Capítulo 3. Con CPF, los grupos expuestos a las menores concentraciones (470 y $940 \mu\text{g L}^{-1}$) fueron los que presentaron disminución en la adherencia (29 y 37 %, respectivamente), mientras que en el otro grupo ($1.410 \mu\text{g L}^{-1}$) todos los individuos estaban adheridos. En el Capítulo 3, se había registrado disminución de la adherencia menor que 15 % con 500 y $1.000 \mu\text{g L}^{-1}$, en ninguno de los dos casos estadísticamente significativa con respecto al grupo control. Con CAR en este capítulo, se registró 100 % de adherencia en todos los grupos tratados con el insecticida individual (concentraciones de 20 , 40 y $60 \mu\text{g L}^{-1}$). En el Capítulo 3, la adherencia a concentraciones dentro de este intervalo fue similar, 100 y 94 % con 25 y $50 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. La variabilidad en la falta de adherencia como efecto neurotóxico también se vio reflejada en las mezclas. En la mezcla con concentraciones más bajas de ambos insecticidas se registró una disminución de la adherencia de 25 %, mientras que en las dos mezclas con concentraciones más altas, la adherencia fue del 100 %. La falta de adherencia no sería un signo inequívoco de neurotoxicidad, por lo que es importante su registro para conocer el estado general de los individuos, pero no es un biomarcador confiable por sí solo para la evaluación de neurotoxicidad y menos aún en el caso de mezclas de insecticidas.

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

En vertebrados acuáticos, como el salmón *Oncorhynchus kisutchi*, Laetz et al. (2013, 2009) reportaron que mezclas binarias de OF y de OF y carbamatos producen signos de neurotoxicidad (reducciones en la velocidad de nado, pérdida de equilibrio, aumento de producción de mucus) de manera aditiva e incluso sinérgica (por ejemplo, mortalidad fuera de lo esperado). En especies de invertebrados acuáticos, como *Chironomus tentans* y *Ceriodaphnia dubia* se ha observado aditividad en respuestas como letalidad e inmovilidad a mezclas binarias de OF y carbamatos, (Domingues et al., 2010), pero pocos trabajos informan sobre otros signos de neurotoxicidad o neurotoxicidad en moluscos y gasterópodos en particular, para esta clase de insecticidas.

En el caso de la actividad de ChE, se validaron los resultados de los tratamientos de CPF y CAR individuales a partir de las curvas concentración-respuesta obtenidas en el Capítulo 3 y sus bandas de predicción. A su vez, esto da soporte a los resultados del Capítulo 3 y demuestra cierta robustez porque, a pesar de ser ensayos realizados en diferentes años y con individuos de distintas cohortes, los modelos obtenidos resultaron aplicables. Adicionalmente, las pendientes de las curvas de CPF y CAR normalizadas a la CI_{50} de cada compuesto no difirieron estadísticamente, lo que indica que a pesar de que puedan existir diferencias en la toxicocinética o en la toxicodinámica de estos insecticidas, ambos inhiben la actividad de ChE de forma comparable. Esto permitió utilizar un modelo CA para evaluar los efectos de tres mezclas binarias de CPF y CAR. Los resultados de inhibición de la actividad de ChE ajustaron muy bien al modelo CA, por lo que mezclas binarias de iguales proporciones de CPF y CAR en concentraciones $0,25 CI_{50}^{ChE}$, $0,5 CI_{50}^{ChE}$ y $0,75 CI_{50}^{ChE}$ de cada compuesto inhiben la actividad de ChE *C. gibbosa* de manera aditiva. Es decir, en *C. gibbosa* la inhibición de ChE por parte de CPF y CAR en la mezcla ocurre del mismo modo que si se tratara de la exposición a cada insecticida por separado, sin interacción entre los insecticidas o sus efectos.

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

Son escasos los trabajos en los que se estudiaron los efectos de mezclas de insecticidas sobre respuestas enzimáticas (Domingues et al., 2010) y, en general, muestran aditividad y en algunos casos sinergia. Entre ellos, (Laetz et al., 2013, 2009) demostraron que mezclas de insecticidas OF y carbamatos inhiben de manera aditiva la actividad AChE del cerebro de *O. kisutch*. Estos autores también encontraron sinergia sobre la inhibición de ChE a las concentraciones más altas evaluadas, pero principalmente en mezclas de dos OF y no de un OF y un carbamato. En el gasterópodo *P. corneus*, se informaron resultados similares, ya que con mezclas de dos OF (MAZ y CPF), la inhibición de ChE siguió un modelo CA a concentraciones más bajas ($0,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$), pero con mezclas con concentraciones más altas (1 y $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$), los efectos fueron sinérgicos (Cacciatore et al., 2013). En cambio, con mezclas de un OF y un carbamato (MAZ y CAR), se encontró aditividad en la inhibición de ChE en los efectos de todas las mezclas evaluadas (1 y $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$). Estos resultados coinciden con los encontrados para la actividad de ChE *C. gibbosa* expuesto a mezclas de CPF y CAR en esta tesis.

Los efectos de las mezclas de CPF y CAR sobre la actividad de CE en *C. gibbosa* difirieron según el sustrato utilizado para su medición, del mismo modo que se encontró en el Capítulo 3. En el caso de la actividad de CE medida con p-NFB, también se validaron los resultados de los tratamientos con CPF y CAR individuales. La actividad CE de los individuos expuestos a CPF no difirió de la observada en los del grupo control, al igual que en el Capítulo 3. Con CAR, la inhibición de CE en los individuos expuestos al insecticida coincidió con lo esperado a partir de la curva concentración-respuesta obtenida en el Capítulo 3 y su banda de predicción. Como se mencionó para ChE, estos resultados también validan los resultados del Capítulo 3. Las mezclas binarias de CPF y CAR inhibieron la actividad de CE medida con p-NFB coincidiendo con los resultados esperados a partir de la curva concentración-respuesta de CAR del Capítulo 3 y su banda de predicción. Por lo tanto, la inhibición de CE medida con p-NFB de las mezclas binarias de iguales proporciones de

Respuestas enzimáticas a mezclas binarias de clorpirifos y carbarilo en tejido blando total

CPF y CAR, a concentraciones de $0,25 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$, $0,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ y $0,75 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ de cada compuesto sobre CE p-NFB de *C. gibbosa*, se debe al efecto inhibitorio individual de CAR. Se podría sugerir entonces, que en el caso de mezclas binarias de CPF y CAR, las CE de *C. gibbosa* afines a p-NFB participan activamente en la detoxificación no catalítica de CAR, del mismo modo que si se tratara de una exposición a CAR puro, y esta respuesta no se ve afectada por la presencia de CPF. Por otro lado, las mezclas de CPF y CAR no afectaron la actividad de CE medida con p-NFA, en coincidencia con los resultados obtenidos con concentraciones similares de cada insecticida aplicado por separada en el Capítulo 3. Por lo tanto, estos resultados podrían indicar que, en el intervalo de concentraciones evaluado, las CE afines a p-NFA no participan de manera principal en los mecanismos de detoxificación de mezclas de CPF y CAR. Como en *C. gibbosa*, en *P. corneus* los efectos de mezclas binarias de MAZ y CAR sobre las respuestas de CE con los dos sustratos que se utilizaron (p-NFB y p-NFA) tampoco difirieron de los efectos de los insecticidas puros (Cacciatore et al., 2018). Sin embargo, en dicho trabajo, tanto MAZ como CAR de manera individual inhibieron la actividad de CE p-NFB y p-NFA entre 75 y 88 %, y las mezclas de 1 y $1,5 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ de MAZ y CAR también.

Es relevante mencionar que los resultados de la exposición a los tratamientos con los insecticidas individuales sobre la actividad de CE medida con p-NFA realizados en este capítulo no se corresponden con los resultados del Capítulo 3. En el Capítulo 3, la actividad de CE p-NFA no difirió con respecto al control a ninguna de las concentraciones evaluadas de CPF, mientras que, en este capítulo, dicha actividad aumenta de manera significativa con respecto al control a $470 \mu\text{g L}^{-1}$. En el caso de CAR, la actividad de CE p-NFA en el Capítulo 3 fue inhibida únicamente por la concentración más alta ($500 \mu\text{g L}^{-1}$), mucho más alta que las de los tratamientos con CAR individual de este capítulo ($20, 40$ y $60 \mu\text{g L}^{-1}$). En este capítulo, la actividad de CE p-NFA aumentó de manera significativa con respecto a la actividad del grupo control a $60 \mu\text{g L}^{-1}$. No obstante, estas diferencias se registraron

únicamente en estos casos puntuales y, observando los resultados, tanto del Capítulo 3 como de este capítulo, se puede ver que existe una gran variabilidad en la respuesta de esta enzima a la exposición a CPF y a CAR. Esta variabilidad se aprecia no solamente en el desvío estándar de la actividad de CE p-NFA a una misma concentración (como a $1410 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPF individual en este capítulo), sino también en aumento o disminución de la actividad media a distintas concentraciones, sin ningún patrón observable, que se ven al evaluar intervalos más amplios de concentraciones (como para CPF en el Capítulo 3).

La actividad de GST se midió únicamente en individuos expuestos a la mezcla $1 \text{ CI}_{50}^{\text{ChE}}$ y no se encontró efecto alguno. Estos resultados también coincidieron con la falta de efecto de CPF y CAR sobre la actividad de GST encontrada en el Capítulo 3 en todo el intervalo de concentraciones evaluado y, nuevamente para esta variable, se encontró mucha dispersión en los resultados, con desvíos estándar grandes. Como se discutió en el Capítulo 3, las GST de *C. gibbosa*, parecerían no estar relacionadas directamente con la detoxificación, ni con el efecto tóxico de estos insecticidas de forma individual ni en mezclas. La variabilidad en los resultados de las actividades de CE p-NFA y GST en homogenatos de tejido blando total en este capítulo y en el Capítulo 3 sugiere que no pueden considerarse como buenos biomarcadores en *C. gibbosa*. De manera opuesta, la reproducibilidad en los resultados de las respuestas de ChE y CE p-NFB en homogenatos de tejido blando total entre este capítulo y en el Capítulo 3 resaltan la robustez de las actividades de ChE y CE p-NFB como biomarcadores en *C. gibbosa*.

En conjunto, los resultados obtenidos estarían parcialmente en línea con la hipótesis original para este capítulo. La exposición conjunta de *C. gibbosa* a dos plaguicidas anticolinesterásicos (CPF y CAR) inhibe las respuestas de ChE y CE medida con p-NFB. En el caso de ChE, esta inhibición es aditiva con respecto a los efectos de los insecticidas individuales y sigue un modelo CA. En el caso de CE p-NFB, esta inhibición se debe a la acción de CAR solamente. No se puede decir lo mismo con respecto a los signos de

neurotoxicidad ni las respuestas de CE p-NFA y GST, los que no fueron afectados por las mezclas de CPF y CAR estudiadas.

La aditividad de la toxicidad de CPF y CAR sobre la respuesta de ChE de *C. gibbosa* según el modelo CA, coincide con la mayoría de los trabajos de mezclas binarias de plaguicidas y muestran que el modelo CA es adecuado para estudiar los efectos de mezclas binarias de compuestos OF en *C. gibbosa*. En la mayoría de las mezclas estudiadas (de insecticidas, metales o agentes *antifouling*) los efectos tóxicos son aditivos y se pueden predecir en el 90 % de los casos mediante el modelo CA (Deneer, 2000; Rodney et al., 2013). Por lo tanto, distintos autores han concluido que “el modelo CA puede utilizarse como un modelo ligeramente conservativo, pero aplicable ampliamente con una probabilidad relativamente baja de subestimar los efectos debido a interacciones” (Belden et al., 2009; Rodney et al., 2013). En algunas especies se han encontrado efectos sinérgicos de insecticidas con el mismo modo de acción, particularmente en mezclas de un carbamato y un OF o dos OF, pero estos resultados representan menos del 5 % de los trabajos reportados y en general las concentraciones evaluadas no son ambientalmente relevantes (Rodney et al., 2013). (Cedergreen, 2014; Green et al., 2018; Rodney et al., 2013; Tanaka y Tada, 2017).

En el caso de la actividad de GST, resulta difícil comparar con otros trabajos, ya que el efecto conjunto de CPF y CAR sobre esta enzima se ha estudiado en pocos casos. Como comparación con efectos de mezclas de insecticidas anticolinesterásicos, en *P. corneus* se evaluó el efecto de la mezcla binaria de MAZ y CPF y se registró un aumento de la actividad de GST ligero, pero significativo con respecto al grupo control, similar al que también se había registrado por exposición a CPF de manera individual (Cacciatore et al., 2015). Esos resultados coincidirían con lo encontrado en este capítulo, en tanto que la mezcla no presentó efectos adicionales a los observados (o no observados) para los compuestos puros.

Para estudiar los efectos de las mezclas de CPF y CAR sobre *C. gibbosa* en este capítulo se eligió, como primera aproximación, trabajar con equivalentes de las CI_{50} de ChE

para cada insecticida. Por lo tanto, las mezclas contenían concentraciones de CAR dentro del intervalo de concentraciones encontradas en agua dulce, pero concentraciones de CPF que no se esperaba encontrar en ambientes acuáticos, salvo en casos excepcionales de fuentes puntuales de ingreso del insecticida al ambiente, como derrames accidentales o manejos inadecuados. En el caso de CAR, las mezclas contenían 10, 20 o 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ y las concentraciones máximas determinadas en el Alto Valle de Neuquén y Río Negro y a nivel global son 48 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 1700 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Loewy et al., 2011; Walters et al., 2003). En el caso de CPF, en las mezclas se utilizaron 235, 470 y 705 $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que en aguas superficiales se registraron concentraciones de 1,16 $\mu\text{g L}^{-1}$ en el Alto Valle, y 26,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ a nivel global (Loewy et al., 2011; Otieno et al., 2012). Por lo tanto, sería poco probable que individuos de *C. gibbosa* se vieran expuestos en su hábitat natural a las mezclas de CPF y CAR que se estudiaron en este capítulo.

Aun así, los resultados de este capítulo son relevantes para la discusión general sobre los efectos y los modos de acción de mezclas en especies no blanco, ya que aportan evidencia para dilucidar qué tipos de compuestos pueden interactuar, de qué manera, en qué concentraciones y en qué especies. Para algunos autores, si bien la mayoría de las evaluaciones de los efectos de mezclas de compuestos se han realizado con mezclas de plaguicidas, el conocimiento de estos efectos es aún limitado en comparación con la cantidad de mezclas que pueden ocurrir en el ambiente y sugieren que se necesitan más trabajos que estudien la toxicidad de mezclas de plaguicidas, sobre todo sobre puntos finales diferentes a los tradicionalmente evaluados (letalidad e inmovilidad) y en más especies no blanco acuáticas (Belden et al., 2009). Pocas especies de gasterópodos han sido utilizadas en bioensayos de toxicidad para evaluar efectos de mezclas de insecticidas, entre ellas, *Lymnaea acuminata* (Sahay y Agarwal, 1997; Tripathi y Agarwal, 1998), *P. corneus* (Cacciatore et al., 2018, 2015, 2013, 2012), *Physa acuta* y *Helisoma anceps* (Elias y Bernot, 2017).

5 Respuestas enzimáticas en hemolinfa

5.1 Introducción

Tanto ChE y CE, como GST, comprenden familias de isoenzimas polimórficas y multifuncionales (Board y Menon, 2013; Domingues et al., 2010; Galloway y Handy, 2003; Wheelock et al., 2008, 2005). Las distintas isoformas pueden tener funciones fisiológicas y patrones de inhibición o activación diferentes (Board y Menon, 2013; Galloway et al., 2002; Galloway y Handy, 2003). A su vez, su expresión y actividad pueden ser órgano específicas, con niveles de expresión y actividades basales que varían ampliamente (Board y Menon, 2013; Cacciatore et al., 2012; Domingues et al., 2010; Galloway et al., 2002; Wheelock et al., 2008). De este modo, en conjunto con la actividad basal, las respuestas de ChE, CE y GST y su sensibilidad frente a un mismo tóxico pueden variar en relación con la región anatómica que se estudie (Casarett y Doull, 2001; Domingues et al., 2010; Galloway y Handy, 2003; Laguerre et al., 2009; Sanchez-Hernandez y Wheelock, 2009).

Algunos autores han estudiado la distribución y respuestas de ChE en relación a los distintos órganos de invertebrados acuáticos, y los resultados en moluscos varían entre grupos, incluso entre especies. En bivalvos, en general, se encontró que la actividad basal de ChE es mayor en branquias, en algunos cuatro a seis veces mayor, que en otros órganos (Bonacci et al., 2009; Brown et al., 2004; Escartín y Porte, 1997; Mora et al., 1999). En gasterópodos, se encontró que en *P. corneus* la actividad basal de ChE de la región pulmonar era la más alta y la de la glándula digestiva la más baja, mientras que en *B. glabrata*, la

actividad basal más baja también se encontró en la glándula digestiva, pero la más alta fue en la región de la cabeza-pie (Kristoff et al., 2012; Otero y Kristoff, 2016). La sensibilidad de ChE a MAZ también difirió según la fuente de enzima: en *P. corneus* fue mayor en homogenatos de tejido blando total que en glándula digestiva y que en la región pulmonar, mientras que en *B. glabrata* la sensibilidad en homogenatos de tejido blando total fue menor que en la región pulmonar (Kristoff et al., 2012; Otero y Kristoff, 2016).

Las CE, por su parte, pueden estar distribuidas en prácticamente todos los órganos y tejidos, incluyendo hígado, intestinos, corazón, músculos, gónadas, pulmones y tejidos respiratorios (Wheelock et al., 2008, 2005). La distribución de las diferentes isoformas, con sus diferencias en especificidad de sustrato, y sus funciones fisiológicas puede variar entre especies y muchas veces se desconoce (Galloway et al., 2002; Wheelock et al., 2008). En *P. corneus* y *B. glabrata*, la actividad basal de CE varió según el órgano estudiado, siendo mayor en la glándula digestiva que en el resto, en ambas especies (Kristoff et al., 2012; Otero y Kristoff, 2016). En otros órganos, difirió entre las dos especies, en *P. corneus* la actividad basal fue mayor en la región pulmonar que en la cabeza-pie (Otero y Kristoff, 2016), y sucedió lo inverso en *B. glabrata* (Kristoff et al., 2012). Al estudiar la sensibilidad a MAZ, se encontró que, en ambos gasterópodos, la actividad CE era más sensible en homogenatos de tejido blando total que los de glándula digestiva y región pulmonar (Kristoff et al., 2012; Otero y Kristoff, 2016). Con respecto a la especificidad de sustrato, en todos los casos, en ambos gasterópodos, la actividad basal de CE fue mayor medida con p-NFA que con p-NFB. Sin embargo, en el caso de *P. corneus* la sensibilidad de CE a MAZ fue mayor cuando fue medida con p-NFB que con p-NFA, en la mayoría de los órganos, mientras que en *B. glabrata* se registró la relación inversa (Kristoff et al., 2012; Otero y Kristoff, 2016).

Existe poca información sobre la distribución de GST en distintos órganos de en moluscos. En los bivalvos marinos *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*, se ha reportado mayor actividad GST en branquias que en glándula digestiva (Solé y Sanchez-

Hernandez, 2018). Además, se encontraron diferencias entre ambas especies, ya que la actividad basal general fue mayor en los órganos de *R. decussatus* (Solé y Sanchez-Hernandez, 2018). En el bivalvo de agua dulce, *Diplodon chilensis*, también se describieron diferencias órgano dependientes entre branquias y glándula digestiva, con respecto a la respuesta de GST a dietas con diferentes especies de algas (Bianchi et al., 2015). No tenemos conocimiento de estudios que evalúen la actividad GST en distintos órganos en gasterópodos.

Los moluscos, con la excepción de los cefalópodos, poseen un sistema circulatorio abierto, en el cual la hemolinfa¹³ ocupa la cavidad corporal, en contacto directo con órganos y tejidos (Barker, 2001). De este modo, en la hemolinfa se movilizan desde y hacia los tejidos, hemoproteínas con hemoglobina o hemocianina como pigmentos respiratorios, estructuras tipo plaquetas, hormonas, agua, iones, calcio para la reproducción, y para el crecimiento y reparación de la concha, células relacionadas con la respuesta inmune, y distintas enzimas (Barker, 2001). La presencia de ChE en la hemolinfa de moluscos se conoce desde los años 1940, sin embargo, existen relativamente pocos trabajos en bivalvos sobre el uso de la actividad de ChE en hemolinfa como biomarcador (Galloway et al., 2002), y menos aún en gasterópodos de agua dulce (Otero y Kristoff, 2016). En *M. edulis*, la actividad de ChE resultó ser mayor en la hemolinfa que en homogenatos de tejido blando total, y fue inhibida de forma concentración dependiente por insecticidas OF y carbamatos (Galloway et al., 2002; Rickwood y Galloway, 2004). En gasterópodos, Cacciatore et al (2013) informaron que la actividad de ChE en la hemolinfa de *P. corneus* es más sensible a MAZ que en homogenatos de tejido blando total. Contrariamente, Kristoff (2010) informó que la inhibición de ChE de *B. glabrata*, debido a la exposición a MAZ es menor en hemolinfa que en homogenato de tejido blando total.

La actividad y sensibilidad a tóxicos de las CE también han sido estudiadas en la hemolinfa de moluscos, en comparación con otras fuentes de enzimas. En *M. edulis*,

¹³ Tejido circulatorio de invertebrados, análogo a la sangre de los vertebrados (Barker, 2001).

M. galloprovincialis y *C. fluminea*, por ejemplo, se encontró que la actividad basal de CE en hemolinfa es menor que la de homogenatos de tejido blando total o glándula digestiva (Basack et al., 1998; Galloway et al., 2002; Solé y Sanchez-Hernandez, 2018). En *M. galloprovincialis*, además, se encontraron diferencias en la afinidad por el sustrato usado para la medición de la actividad de CE; los sustratos que presentaron hidrólisis preferencial en glándula digestiva y branquias, fueron los que presentaron la menor actividad hidrolítica en hemolinfa (Solé y Sanchez-Hernandez, 2018). En *P. corneus*, también se observaron diferencias en la sensibilidad a MAZ de las CE en hemolinfa en relación con las CE de homogenatos de tejido blando total, que dependieron del sustrato utilizado (Cacciatore et al., 2013).

En base a estos resultados, se ha sugerido la medición de biomarcadores enzimáticos en hemolinfa como una metodología confiable y no destructiva para determinar los efectos de exposición a xenobióticos, como los insecticidas OF, en bivalvos y, potencialmente, en otros invertebrados (Galloway et al., 2002). Para gasterópodos, Kristoff (2010) y Cacciatore et al. (2013) encontraron que, en *B. glabrata* y *P. corneus*, respectivamente, la hemolinfa es fácil de muestrear y podría ser un abordaje conveniente para adicionar a las evaluaciones toxicológicas. La extracción de hemolinfa en lugar de la disección de diferentes órganos podría ser especialmente beneficiosa cuando se trabaja con individuos con poca masa corporal, o para realizar estudios de biomonitoreo sin sacrificar a los individuos. Para esto, es necesario realizar más estudios que permitan comprender cómo se relacionan las respuestas de estos biomarcadores en hemolinfa con la toxicidad a los organismos (Galloway et al., 2002; Rickwood y Galloway, 2004).

En *C. gibbosa*, todos los estudios ecotoxicológicos hasta el momento se basaron en homogenatos de tejido blando total (Bianco et al., 2013; Boburg, 2017; Cossi et al., 2015). La evaluación de las respuestas de ChE, CE y GST en la hemolinfa de *C. gibbosa* permitirá complementar la caracterización de estos biomarcadores realizadas en homogenatos de tejido

blando total. Además, aportará hacia ampliar el conocimiento sobre la distribución y respuesta de estas enzimas en gasterópodos.

Hipótesis

La exposición aguda a MAZ afecta la actividad de ChE, CE y GST en la hemolinfa de *C. gibbosa* con distinta sensibilidad a la del tejido blando total, y estas respuestas pueden utilizarse como biomarcadores.

Objetivos

Estudiar las respuestas de ChE, CE y GST en hemolinfa de *C. gibbosa* a una exposición aguda a MAZ a una concentración que inhibe ChE, pero no afecta CE ni GST en homogenatos de tejido blando total.

Comparar las respuestas enzimáticas de ChE, CE y GST en hemolinfa de *C. gibbosa* a una exposición aguda a MAZ con las registradas en homogenatos de tejido blando total.

Predicciones

- La exposición aguda de *C. gibbosa* a MAZ inhibe la actividad de ChE en hemolinfa
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a MAZ no afecta la actividad de CE (medida con p-NFB o con p-NFA) en hemolinfa
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a MAZ no afecta la actividad de GST en hemolinfa

5.2 Metodología

5.2.1 Diseño experimental

El bioensayo consistió en la exposición aguda a una concentración puntual de MAZ (**Figura 5.1**). Los individuos se colocaron de a 12 en recipientes de vidrio de 1 L de capacidad, con 500 mL de una solución de MAZ 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ o acetona 0,002 % (CS, control de solvente). Cada tratamiento contó con 6 recipientes de vidrio.

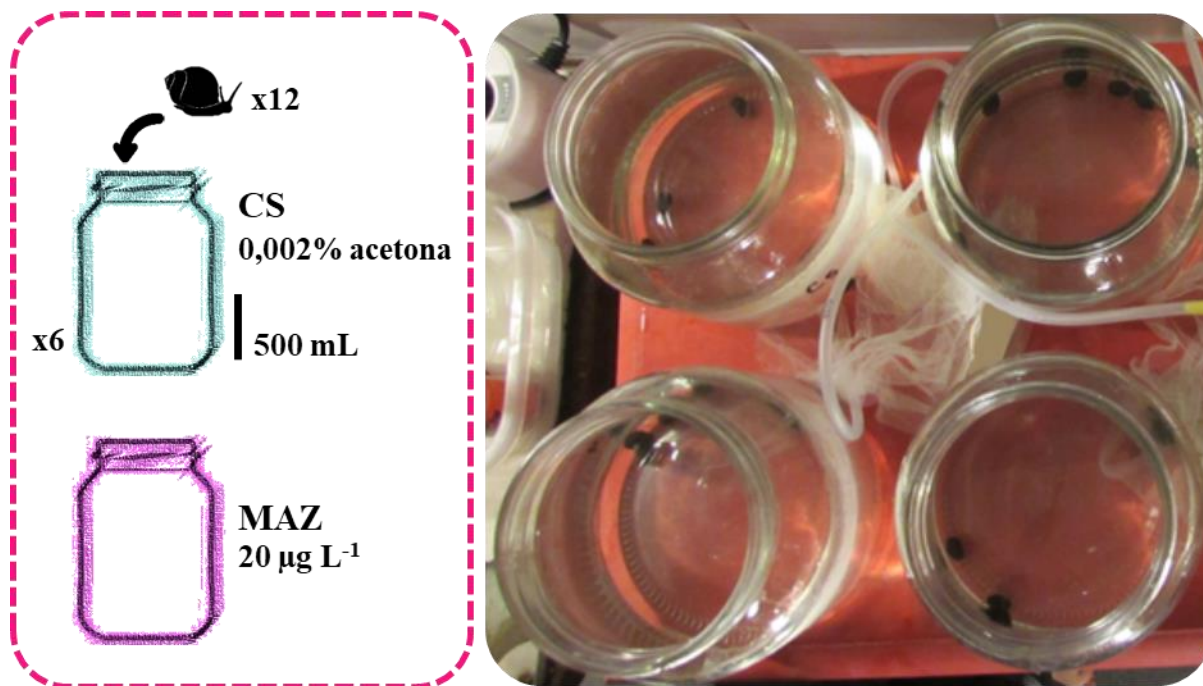


Figura 5.1 Esquema y fotografía de la metodología utilizada para evaluar la respuesta de ChE, CE y GST en hemolinfa de individuos de *Chilina gibbosa* expuestos de manera aguda (48 h) a MAZ.

Finalizada la exposición, se registraron la letalidad y los signos de neurotoxicidad para cada individuo. Luego, se obtuvieron las muestras de hemolinfa como se explicó en la subsección 2.4.2 “Extracción de hemolinfa” de la “Metodología general”. La hemolinfa de los 12 individuos de un mismo recipiente se juntó en una única muestra (6 u.e.). Posteriormente se midieron las siguientes variables: contenido de proteínas, actividad de ChE, actividad de CE medida con p-NFA y con p-NFB y actividad de GST. Las condiciones generales de estos bioensayos corresponden a las descritas para EAIN dentro del Capítulo 2 “Metodología general”.

5.2.2 Análisis estadístico

Las actividades enzimáticas se compararon entre individuos expuestos al control de acetona e individuos expuestos a MAZ mediante una prueba de t de Student para muestras independientes. Se comprobó normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Homogeneidad de varianzas se comprobó por medio de la prueba de F para comparación de varianzas; la actividad de ChE se transformó mediante log10 para cumplir con este supuesto.

5.3 Resultados

No se observó mortalidad en los individuos expuestos al control de acetona ni en los individuos expuestos a MAZ. Como se esperaba según los resultados de Bianco et al. (2013), todos los individuos expuestos a MAZ mostraron signos de neurotoxicidad. El contenido de proteínas no difirió entre tratamientos (prueba de t de Student; $t = 0,9976$; $gl = 10$; $P = 0,342$). El contenido promedio de proteína en hemolinfa fue de $9,58 \pm 2,15 \text{ mg mL}^{-1}$ en individuos del grupo control y $8,23 \pm 2,51 \text{ mg mL}^{-1}$ en individuos expuestos.

La actividad de ChE se vio fuertemente inhibida en la hemolinfa de los individuos expuestos a MAZ, con una inhibición promedio de 94 % con respecto a los individuos del grupo control (**Figura 5.2**; prueba de t de Student; $t = 10,17$; $gl = 10$; $P < 0,0001$).

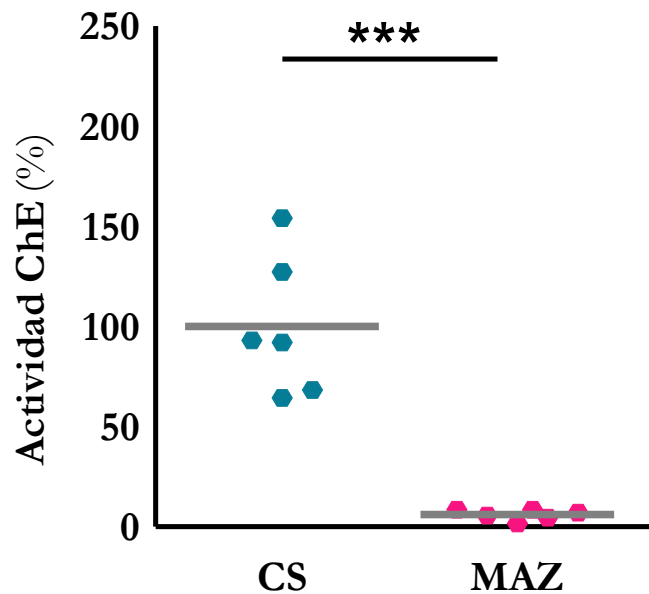


Figura 5.2 Respuesta de ChE en hemolinfa de individuos de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a una concentración puntual de MAZ. %: porcentaje de actividad de ChE con respecto al promedio de actividad del control. CS: control de solvente; acetona 0,002 %. MAZ: $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Cada hexágono corresponde a una unidad experimental, es decir la hemolinfa conjunta de 12 individuos. Línea gris: media. *** $P < 0,001$.

La respuesta de CE en la hemolinfa de los individuos expuestos varió según el sustrato utilizado. Cuando se utilizó p-NFB como sustrato, la actividad de CE fue 47 % más alta en la hemolinfa de individuos expuestos en comparación con la de los individuos del grupo control

(Figura 5.3 A; prueba de t de Student; $t = -2,926$; $gl = 10$; $P = 0,0151$). Sin embargo, cuando se usó p-NFA como sustrato, la actividad de CE no varió entre individuos del grupo control e individuos expuestos (Figura 5.3 B; prueba de t de Student; $t = 0,004845$; $gl = 10$; $P = 0,9962$).

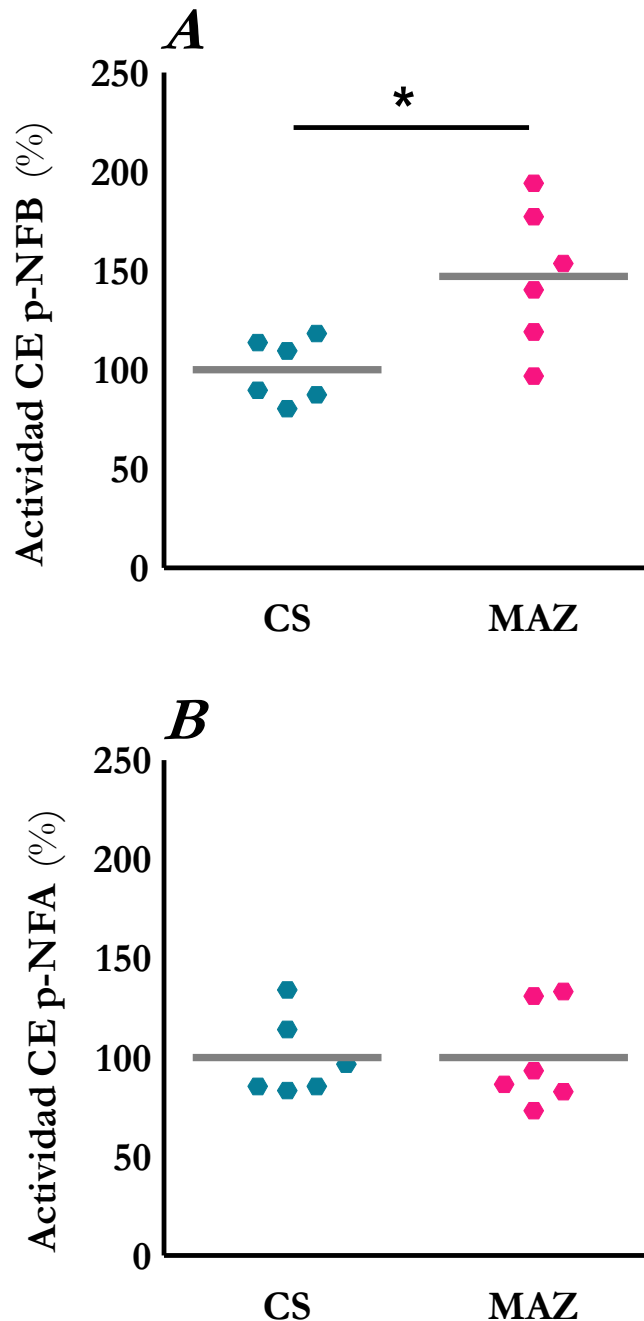


Figura 5.3 Respuesta de CE, medida con A p-NFB y con p-NFA B como sustratos, en hemolinfa de individuos de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a una concentración puntual de MAZ. %: porcentaje de actividad de ChE con respecto al promedio de actividad del control. CS: control de solvente; acetona 0,002 %. MAZ: $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Cada hexágono corresponde a una unidad experimental, es decir la hemolinfa conjunta de 12 individuos. Línea gris: media. * $P < 0,05$.

En la hemolinfa de individuos expuestos a MAZ, la actividad de GST aumentó 89 % comparada con individuos del grupo control (**Figura 5.4**; prueba de t de Student; $t = 4,382$; $gl = 9$; $P = 0,0018$).

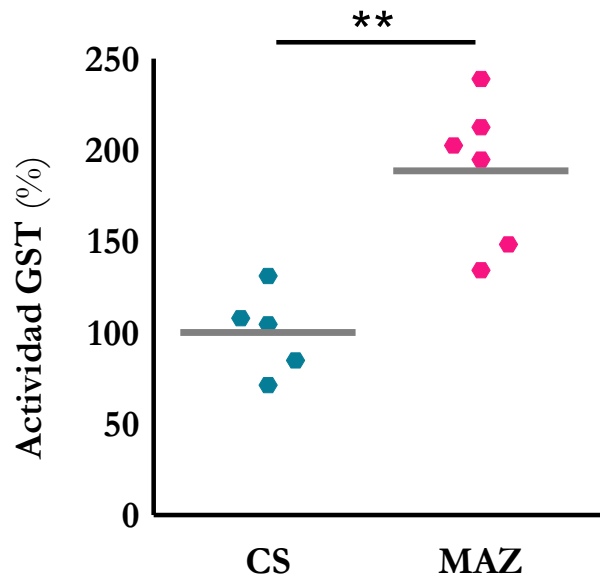


Figura 5.4 Respuesta de GST en hemolinfa de individuos de *Chilina gibbosa* a una exposición de 48 h a una concentración puntual de MAZ. %: porcentaje de actividad de ChE con respecto al promedio de actividad del control. CS: control de solvente; acetona 0,002 %. MAZ: $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Cada hexágono corresponde a una unidad experimental, es decir la hemolinfa conjunta de 12 individuos. Línea gris: media. ** $P < 0,01$

5.5 Discusión

Los factores que pueden influir sobre la respuesta de los biomarcadores bioquímicos son múltiples, incluyendo factores físico-químicos como la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto, y factores biológicos como la regulación genética o la estructura molecular. Las variaciones intra e inter específicas en las actividades basales y en las sensibilidades o afinidades de las enzimas son uno de los factores que pueden afectar sus respuestas a xenobióticos. La forma en que estos factores influyen sobre la actividad enzimática es variable, especialmente en invertebrados, y no se han encontrado patrones claros entre actividad enzimática y tejido, órgano o región anatómica analizada (Domingues et al., 2010). Los resultados de este capítulo muestran que las respuestas de ChE, CE y GST medidas en la hemolinfa de *C. gibbosa* expuestos a MAZ varían con respecto a las estudiadas en homogenatos de tejido blando total (**Tabla 5.1**)

Tabla 5.1 Comparación de los signos de neurotoxicidad y de las respuestas de ChE, CE y GST medidas en hemolinfa (esta tesis) y en homogenatos de tejido blando total (Bianco et al., 2013; Cossi et al., 2015) de individuos de *Chilina gibbosa* expuestos durante 48 h a 20 µg L⁻¹ MAZ.

Respuesta	Hemolinfa	Tejido blando total ^a
Falta de adherencia	100 %	100 %
Exposición cabeza-pie	100 %	100 %
Actividad ChE	↓ 94 %	↓ 85 %
Actividad CE p-NFA	Sin diferencias	Sin diferencias
Actividad CE p-NFB	↑ 47 %	Sin diferencias
GST	↑ 89 %	Sin diferencias

Concentración evaluada: *metilazinfos* 20 µg L⁻¹

^a Bianco et al. (2013); Cossi et al. (2015)

La inhibición de ChE en hemolinfa de *C. gibbosa* coincide con los resultados de Cossi et al. (2015), quienes informaron una inhibición del 85 % en la actividad de ChE en homogenatos de tejido blando total de *C. gibbosa* luego del mismo tiempo de exposición a la misma concentración de MAZ que este ensayo. La inhibición (94 %) en hemolinfa fue ligeramente más pronunciada con respecto a la medida en tejido blando total (85 %). Esto concuerda con resultados observados para otros gasterópodos, tales como *P. corneus* (Cacciatore et al., 2013), cuya sensibilidad de ChE a MAZ resultó más alta en hemolinfa que en homogenatos de tejido blando total. En bivalvos, Galloway et al. (2002) sugirieron que los pocos estudios que utilizan la actividad ChE en hemolinfa como biomarcador para OF reflejan cierta menor sensibilidad que en órganos o en tejido blando total. Esta diferencia de sensibilidad de ChE en hemolinfa con respecto a otras fuentes de esta enzima confirma que las respuestas de ChE en cuanto a su distribución pueden variar entre grupos de moluscos.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, en un mismo órgano o tejido coexisten múltiples isoformas de ChE cuyas sensibilidades varían y esto, a su vez, puede

variar según la región anatómica que se utilice como fuente de enzima (Sanchez-Hernandez, 2009). Por lo tanto, podrían obtenerse resultados contradictorios al comparar las respuestas de ChE en homogenatos de tejido blando total con las de un órgano o tejido específico o, en este caso, con la hemolinfa. En vertebrados, las diferentes isoformas de ChE y su ubicación se encuentran bien caracterizadas. Las acetilcolinesterasas (AChE) se encuentran principalmente en el sistema nervioso central, y su función es la ya conocida finalización de la transmisión del estímulo nervioso. En plasma y otros órganos o tejidos (como hígado y corazón), se encuentran predominantemente las butirilcolinesterasas (BChE), cuya función no se conoce con certeza (Carlock et al., 1999). En invertebrados, generalmente la clasificación de las distintas isoformas de ChE es dificultosa, y se conoce aún menos sobre la función que pueden tener en hemolinfa (Rickwood y Galloway, 2004). En *C. gibbosa*, no se realizó una caracterización del tipo de ChE presente en hemolinfa, pero la reproducibilidad en los resultados de la inhibición de la actividad de ChE entre hemolinfa y homogenatos de tejido blando total indicaría que, independientemente del tipo de ChE que esté respondiendo, la actividad de ChE en *C. gibbosa* es un biomarcador robusto de exposición a MAZ que puede medirse tanto en homogenatos de tejido blando total como en hemolinfa.

Con respecto a la actividad de CE en hemolinfa, la respuesta a la exposición aguda a MAZ difirió según el sustrato utilizado. No se encontraron diferencias entre individuos expuestos a MAZ e individuos del grupo control cuando se utilizó p-NFA como sustrato, pero cuando se utilizó p-NFB, se observó un aumento del 47 % en la actividad de CE en la hemolinfa de individuos expuestos a MAZ. Este resultado contrasta con los de Cossi et al. (2015), quienes no encontraron diferencias en la actividad de CE (ni con p-NFA ni con p-NFB) en homogenatos de tejido blando total luego de una exposición a la misma concentración de MAZ y durante el mismo tiempo que en esta tesis (**Tabla 5.1**). La distribución de isoenzimas de CE en diferentes órganos y tejidos, y su variabilidad en cuanto a niveles basales, abundancia relativa y respuesta a xenobióticos dependen de cada especie y

contribuyen a la toxicidad diferencial observada entre especies (Wheelock et al., 2008). En *P. corneus*, también se encontró que la respuesta de CE difirió entre hemolinfa y tejido blando total, ya que resultó más sensible a MAZ en tejido blando total que en hemolinfa Cacciatore et al. (2013). Sin embargo, a diferencia de la respuesta de CE en hemolinfa de *C. gibbosa* (aumento de actividad), MAZ inhibió la actividad de CE en hemolinfa de *P. corneus*. El aumento en actividad de CE como consecuencia de la exposición a MAZ encontrado en esta tesis, sugeriría que en *C. gibbosa*, ocurre una inducción de los mecanismos de detoxificación catalizados por CE, como la hidrólisis de carboxilésteres (Jokanović y Kosanović, 2010; Kao et al., 1985; Sanchez-Hernandez, 2007; Wheelock et al., 2008). El aumento en la actividad de CE en hemolinfa como resultado de la exposición a diferentes contaminantes también ha sido reportado para otros invertebrados, incluyendo abejas, mosquitos y bivalvos y también se ha registrado en homogenatos de tejido blando total de *C. gibbosa* expuesto a agua contaminada con hidrocarburos (Carvalho et al., 2013; Cossi, 2019; Herbert et al., 2015; McAbee et al., 2004; Solé y Sanchez-Hernandez, 2018).

Las diferencias en la actividad basal y la respuesta a xenobióticos de CE observadas entre tejido blando total y hemolinfa u órganos y tejidos específicos, se podría atribuir al hecho de que, en homogenatos de tejido blando total, se mide de manera simultánea la respuesta de CE en múltiples tejidos, cada uno con diferentes abundancias de isoenzimas de CE que, a su vez, tienen sus propias actividades basales y afinidades a sustratos o xenobióticos. En *C. gibbosa* expuesto a MAZ, la diferencia observada entre el aumento de actividad de CE en hemolinfa y la ausencia de respuesta de CE en tejido blando total también se podría explicar por la preponderancia de tejidos con baja sensibilidad de CE a MAZ. . En otro gasterópodo, *P. corneus*, la sensibilidad de CE a MAZ (usando p-NFA y p-NFB como sustratos) difirió entre regiones anatómicas, con mayor sensibilidad en la región pulmonar que en tejido blando total o glándula digestiva (Otero y Kristoff, 2016). Para obtener una mejor comprensión de la participación de CE en los mecanismos detoxificantes de

insecticidas y xenobióticos en general, sería interesante caracterizar la actividad de CE en otros órganos de *C. gibbosa*, particularmente en la glándula digestiva, el principal órgano detoxificante en gasterópodos.

La variación en la afinidad al sustrato utilizado para medir la actividad de CE puede resultar órgano-específica. Esto se ha atribuido a que las CE son un grupo de enzimas con baja especificidad de sustrato y con múltiples isoenzimas cuya presencia varía entre órganos (Sanchez-Hernandez y Wheelock, 2009). Por ejemplo, Kristoff et al. (2012) encontraron que la actividad más alta de CE en tejido pulmonar se obtuvo utilizando p-NFB como sustrato, mientras que en la glándula digestiva la actividad más alta se obtuvo usando 1-NA y 2-NA como sustratos. Además de las diferencias entre órganos/tejidos en la afinidad de las CE por los distintos sustratos, existen también diferencias entre las respuestas de CE en distintos órganos/tejidos a insecticidas según el sustrato utilizado. Por ejemplo, tanto Kristoff et al. (2012) en *B. glabrata*, como Otero y Kristoff (2016) en *P. corneus*, informaron diferencias entre las respuestas de CE medidas con p-NFB y p-NFA a exposiciones de 48 h a MAZ, dependiendo de la región anatómica analizada. En *C. gibbosa*, Bianco et al. (2013) no encontraron efecto sobre la respuesta de CE a bajas concentraciones de MAZ en homogenatos de tejido blando total cuando se midió esta actividad con p-NFB ni con p-NFA. En la hemolinfa, sin embargo, en esta tesis se registró un aumento significativo de la actividad de CE medida con p-NFB, pero con p-NFA. Esto confirma nuevamente la importancia de medir con distintos sustratos a la hora de utilizar la actividad de CE como biomarcador.

El efecto de una exposición aguda a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ MAZ sobre la actividad de GST de la hemolinfa de *C. gibbosa* también fue diferente al observado en homogenatos de tejido blando total (**Tabla 5.1**). Bianco et al. (2013) no encontraron diferencias en la actividad de esta enzima en tejido blando total entre individuos del grupo control e individuos expuestos a la misma concentración de MAZ que la utilizada en esta tesis, y concluyeron que los

mecanismos de detoxificación mediados por GST no son los principales para la detoxificación de insecticidas OF en *C. gibbosa*. Sin embargo, el notable aumento en la actividad de GST que se registró en hemolinfa en esta tesis (89 %), sugiere que las GST sí podrían estar involucradas en los mecanismos de defensa de *C. gibbosa* contra MAZ, pero de manera diferencial en distintos órganos o tejidos. En invertebrados, se han informado diferentes respuestas de GST a insecticidas anticolinesterásicos. Por ejemplo, se encontró que una exposición de 96 h a CPF inhibe la actividad GST en *Hyaella azteca* Steevens y Benson (1999). En gasterópodos, Kristoff et al. (2008) y Rivadeneira et al. (2013) no encontraron efectos de MAZ ni de CPF sobre GST en *B. glabrata* y *P. corneus*, respectivamente. Alternativamente, y de manera coincidente con los resultados de esta tesis, Castro et al. (2017) informaron que la actividad de GST aumentó en la hemolinfa de *D. chilensis* luego de la exposición aguda a MAZ. Oneto et al. (2005) también describieron un aumento en la actividad de GST luego de la exposición al OF fenitrotión, en *C. fluminea*. El aumento en la actividad de GST se ha asociado con la resistencia o tolerancia a plaguicidas, tanto anticolinesterásicos (Domingues et al., 2010; Sanchez-Hernandez, 2007) como otros con distinto modo de acción (Domingues et al., 2010). Los resultados de este capítulo permiten concluir que la conjugación de xenobióticos electrofílicos con GSH catalizada por GST podría ser un mecanismo principal de detoxificación de OF en *C. gibbosa*. A primera vista, esto parecería contradecir los resultados observados en los capítulos anteriores de esta tesis y los informados por Bianco et al. (2013) en los que la actividad de GST no se vio afectada por MAZ, CPF, CAR, ACP ni por mezclas binarias de CPF y CAR. Sin embargo, estos resultados se obtuvieron utilizando homogenatos de tejido blando total. Debido a que la presencia, la actividad basal y la respuesta a xenobióticos de GST también pueden variar de manera órgano o tejido específica, dependiendo del requerimiento de detoxificación del mismo (Domingues et al., 2010), se podrían encontrar resultados diferentes si se estudiaran órganos o tejidos individuales de *C. gibbosa*. Por lo tanto, de manera similar a lo propuesto

para la actividad de CE, medir GST en tejido blando total podría enmascarar respuestas órgano o tejido específicas de GST como la encontrada en la hemolinfa de *C. gibbosa*.

En conjunto, los resultados de este capítulo corroboran la relación entre inhibición de ChE en hemolinfa y signos de neurotoxicidad en *C. gibbosa*, muestran que las respuestas de CE y GST medidas en la hemolinfa de *C. gibbosa* expuestos a MAZ difieren de las encontradas en homogenatos de tejido blando total y sugieren que tanto las CE como las GST están involucradas en los mecanismos de defensa de *C. gibbosa*. Además, las actividades de ChE, CE y GST en hemolinfa son biomarcadores sensibles a concentraciones de MAZ ambientalmente relevantes.

Es importante mencionar que, si bien los resultados sugieren que la evaluación de estos biomarcadores en la hemolinfa de *C. gibbosa* podría resultar más sensible que en homogenatos de tejido blando total, no es viable actualmente incluirlos en estudios de monitoreo. La metodología de extracción de hemolinfa puesta a punto actualmente para *C. gibbosa* permite obtener volúmenes reducidos de hemolinfa (30 µL por caracol), lo que implica que sea necesaria una gran cantidad de individuos para llevar a cabo las mediciones enzimáticas. Se han probado otras metodologías de extracción utilizadas en otras especies de gasterópodos mediante las cuales se registran mayores volúmenes, pero estas no resultaron aplicables debido a que la hemolinfa de *C. gibbosa* coagula rápidamente al momento de tomar las muestras. Como sugirieron Kristoff et al. (2010) y Cacciatore et al. (2013), resulta de interés optimizar la metodología de obtención de hemolinfa y adaptar los protocolos de medición de enzimas para poder realizar la evaluación de estos biomarcadores de manera no invasiva y estudiar la exposición a OF y otros plaguicidas en gasterópodos tanto en el laboratorio como en estudios a campo.¹⁴

¹⁴ Los resultados de este capítulo se encuentran publicados en el artículo “Effects of azinphos-methyl on enzymatic activity and cellular immune response in the hemolymph of the freshwater snail *Chilina gibbosa*” Lucila Thomsett Herbert*, Juan Manuel Castro*, Virginia Angélica Bianchi, Paula Fanny Cossi, Carlos Marcelo Luquet, Gisela Kristoff. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 150, 71-77. doi: 10.1016/j.pestbp.2018.07.005 *ambos autores contribuyeron de igual manera a este trabajo

6 Respuestas celulares en hemolinfa

6.1 Introducción

El sistema inmune de los invertebrados es considerado como un buen modelo para estudios de inmunotoxicología al ser relativamente menos complejo que el sistema inmune de otros phyla (**Figura 6.1**; Galloway y Handy, 2003; Renault, 2015). Si bien existe una amplia variedad de estrategias de defensa entre las distintas especies de invertebrados, las mismas están basadas principalmente en la respuesta inmune innata mediada por fagocitosis por parte de células de libre circulación como los hemocitos o celomocitos (Crossley, 1983; Matricón-Gondran y Letocart, 1999; Ratcliffe, 1985; Rowley et al., 1984). Ciertos componentes de la respuesta inmune innata, como la cantidad, calidad, viabilidad y actividad fagocítica, son clave para la inmunocompetencia de las especies y se encuentran conservados en todos los phyla, por lo que representan posibles blancos de inmunotoxicidad y pueden considerarse como potenciales biomarcadores de exposición a plaguicidas (Aliko et al., 2015; Belanger et al., 2017; Burgos-Aceves et al., 2018; Galloway y Depledge, 2001; Pagano et al., 2017). En gasterópodos, los hemocitos son el grupo celular circulante en hemolinfa mejor caracterizado en cuanto a su función en el sistema inmune y la fagocitosis mediada por hemocitos es esencial para la defensa contra patógenos (Galloway y Depledge, 2001).

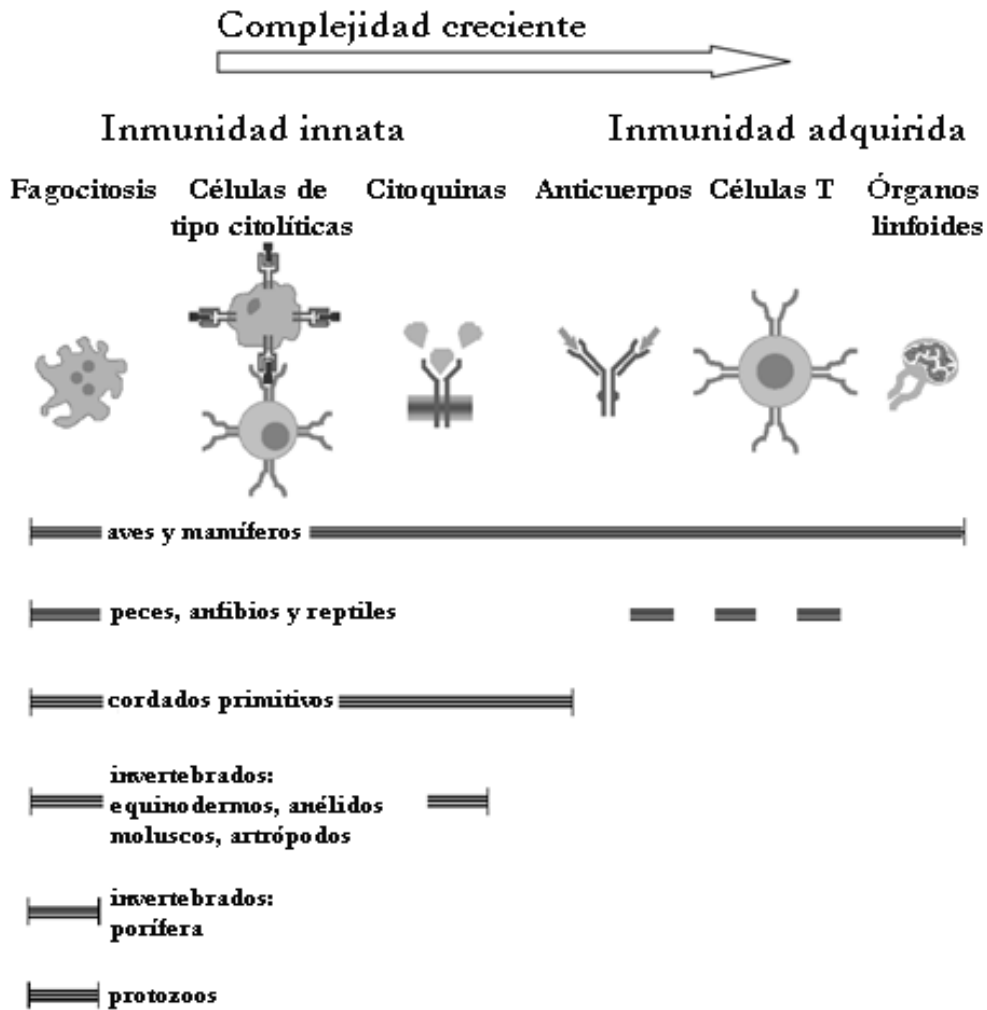


Figura 6.1 Diagrama simplificado que destaca las principales funciones del sistema inmune en los distintos phyla. Adaptado de Galloway y Handy (2003).

Actualmente, está claro que los contaminantes en el ambiente pueden afectar de manera substancial la inmunocompetencia de los individuos, y cada vez son más frecuentes los trabajos que informan efectos tóxicos sobre el sistema inmune de distintas especies (Newman 2014). Específicamente, se ha demostrado que compuestos OF y carbamatos pueden deteriorar la actividad o la integridad lisosomal e inhibir la fagocitosis en diferentes invertebrados (Eason et al., 1999; Ray et al., 2013b; Ville et al., 1997). Se han observado efectos sobre la respuesta fagocítica de la langosta marina *Homarus americanus* (De Guise et al., 2004), y alteraciones lisosomales relacionadas con estrés oxidativo en células de la glándula digestiva de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (Moore et al., 2007). En particular, MAZ resultó ser un importante modulador de las respuestas de los sistemas inmune y

detoxicante en el bivalvo de agua dulce de la Patagonia *D. chilensis*, cuando fue desafiado con *Escherichia coli* (Castro et al., 2017). Además, se han descrito múltiples efectos de neonicotinoides sobre el sistema inmune de distintas especies (Brandt et al., 2016; Mondal et al., 2009; Pisa et al., 2015) e incluso se ha llegado a vincular la declinación en biodiversidad al efecto inmunosupresor de los neonicotinoides (Mason et al., 2013).

La mayoría de los trabajos ecotoxicológicos que abordan esta problemática están enfocados en los efectos sobre el sistema inmune tanto celular como humoral de vertebrados (Newman y Clements, 2007). Hay pocos trabajos en los que se hayan estudiado los efectos de los contaminantes sobre los mecanismos de defensa de invertebrados en general, y de gasterópodos acuáticos en particular. Existe una gran cantidad de trabajos sobre el sistema inmune de gasterópodos, pero tradicionalmente se han enfocado en los efectos que tienen las interacciones con parásitos trematodos, y no en los efectos inmunotóxicos de xenobióticos (Galloway y Handy, 2003). No obstante, debido a que diferentes especies de gasterópodos han demostrado potentes respuestas inmunológicas ante la exposición a plaguicidas, resultan un grupo prometedor para el estudio de biomarcadores del sistema inmune para el monitoreo de ambientes acuáticos de agua dulce (Russo et al., 2007; Russo y Lagadic, 2004, 2000). Hasta el momento no se han realizado estudios de este tipo de biomarcadores en *C. gibbosa* y no se cuenta con información sobre su sistema inmune.

Hipótesis

Las respuestas celulares del sistema inmune de *C. gibbosa* son potenciales biomarcadores de exposición a insecticidas.

Objetivo

Aportar información básica sobre la respuesta inmune celular en la hemolinfa de *C. gibbosa*, identificar y evaluar posibles biomarcadores de inmunotoxicidad en individuos expuestos a insecticidas y estudiar los efectos de MAZ, CPF, CAR y ACP sobre los mismos.

Predicciones

- El sistema inmune de *C. gibbosa* contiene hemocitos identificables cuyas respuestas pueden estudiarse con protocolos utilizados en otras especies de moluscos
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a MAZ aumenta el número de hemocitos totales
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a MAZ disminuye la viabilidad de los hemocitos
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a MAZ disminuye la actividad fagocítica de los hemocitos

- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CPF aumenta el número de hemocitos totales
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CPF disminuye la viabilidad de los hemocitos
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CPF disminuye la actividad fagocítica de los hemocitos

- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CPF afecta la proporción de tipos de hemocitos

- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CAR aumenta el número de hemocitos totales
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CAR disminuye la viabilidad de los hemocitos
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CAR disminuye la actividad fagocítica de los hemocitos

- La exposición aguda de *C. gibbosa* a CAR afecta la proporción de tipos de hemocitos

- La exposición aguda de *C. gibbosa* a ACP aumenta el número de hemocitos totales
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a ACP disminuye la viabilidad de los hemocitos
- La exposición aguda de *C. gibbosa* a ACP disminuye la actividad fagocítica de los hemocitos

- La exposición aguda de *C. gibbosa* a ACP afecta la proporción de tipos de hemocitos

6.2 Metodología

6.2.1 Diseño experimental

En este capítulo, se llevaron a cabo tres bioensayos (**Figura 6.2**). En el primer bioensayo, se identificaron los componentes de la respuesta inmune celular de *C. gibbosa* y se evaluó el efecto de MAZ sobre estos componentes. El bioensayo consistió en la exposición aguda a una concentración puntual de MAZ (**Figura 6.2 Metilazinfos**). Los individuos se colocaron de a 9 en recipientes de vidrio de 1 L de capacidad, con 500 mL de una solución de MAZ $20 \mu\text{g L}^{-1}$, acetona 0,002 % en agua del río Chimehuín (CS, control de solvente) o directamente en agua del río Chimehuín (C, control). Cada tratamiento contó con 2 recipientes de vidrio. Finalizada la exposición, se obtuvieron las muestras de hemolinfa y se juntó la hemolinfa de a 3 individuos dentro un mismo recipiente en una única muestra (6 u.e. por tratamiento). Inmediatamente terminada la extracción de hemolinfa (según se describió en la subsección 2.4.2 “Extracción de hemolinfa” de la “Metodología general”), se realizaron las determinaciones de las siguientes variables: hemocitos totales, viabilidad celular y actividad fagocítica.

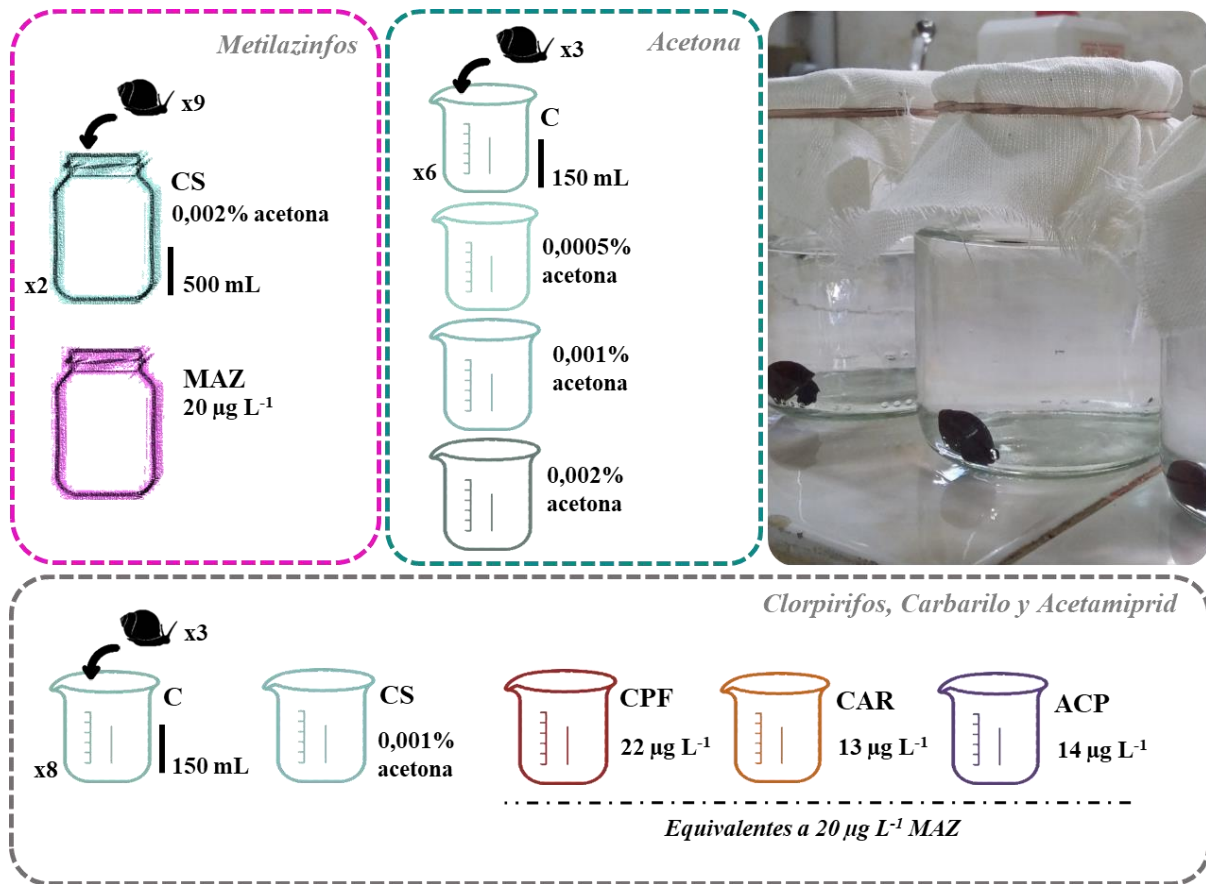


Figura 6.2 Esquemas y fotografía de la metodología utilizada para evaluar la respuesta inmune celular en hemolinfa de individuos de *Chilina gibbosa* expuestos durante 48 h a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de MAZ (*Metilazinfos*), concentraciones crecientes de acetona (*Acetona*), y a concentraciones de CPF, CAR y ACP equivalentes molares a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de MAZ (*Clorpirifos*, *Carbarilo* y *Acetamiprid*).

Si bien la concentración de acetona era menor que la concentración recomendada para ensayos agudos (0,01 %) e, incluso, igual a la recomendada para puntos finales más sensibles (0,002 %; EPA, (2016b); OECD, (2000)), los resultados de los individuos expuestos a acetona para una de las variables difirieron estadísticamente de los individuos del grupo control (presentados en la sección 6.3 “Resultados” de este capítulo). Por lo tanto, se realizó un segundo bioensayo de exposición aguda a concentraciones crecientes de acetona para estudiar si el efecto observado de la acetona sobre la viabilidad celular se trataba de un efecto biológico del solvente o si era únicamente un efecto estadístico y definir la concentración de acetona a utilizar en ensayos posteriores (**Figura 6.2 Acetona**). Los individuos se colocaron de a 3 en recipientes de vidrio de 250 mL de capacidad, con 150 mL de una solución de acetona de 0,0005 %, 0,001 % o 0,002 % en agua del río Chimehuín o directamente en agua

del río Chimehuín (C), con un total de seis recipientes por concentración. Finalizada la exposición, se extrajo y se combinó la hemolinfa de todos los individuos de un mismo recipiente que se encontraban vivos. De esta forma, se obtuvo una única muestra de hemolinfa por recipiente y un total de 6 u.e. por tratamiento. Se determinaron las mismas variables que para el ensayo *Metilazinfos* y, además, se determinó la proporción de distintos tipos de hemocitos en hemolinfa.

Luego, se realizó un tercer bioensayo para estudiar el efecto de CPF, CAR y ACP sobre la respuesta inmune celular de *C. gibbosa* (**Figura 6.2 Clorpirifos, Carbarilo y Acetamiprid**). En este caso, se utilizó el mismo diseño que para el ensayo *Acetona* y se colocó a los individuos de a 3 en recipientes de vidrio de 250 mL de capacidad, con 150 mL de una solución correspondiente de CPF $22 \mu\text{g L}^{-1}$, CAR $13 \mu\text{g L}^{-1}$ o ACP $14 \mu\text{g L}^{-1}$ (concentraciones equivalentes molares a MAZ $20 \mu\text{g L}^{-1}$; **Tabla 6.1**), 0,001 % o 0,001 % acetona en agua del río Chimehuín (CS) o directamente en agua del río Chimehuín (C), con un total de ocho recipientes por tratamiento. Luego de la exposición, se extrajo y se combinó la hemolinfa de los individuos vivos dentro de cada recipiente. Se obtuvo una única muestra por recipiente, con un total de 8 u.e. por tratamiento, y se determinaron las mismas variables que para el ensayo *Acetona*.

Tabla 6.1 Concentraciones de CPF, CAR y ACP equivalentes molares a una concentración de MAZ de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizadas para evaluar la respuesta inmune celular de *Chilina gibbosa* a estos insecticidas.

	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Peso molecular (g mol^{-1})
MAZ	20	317,324
CPF	22	350,580
CAR	13	201,220
ACP	14	222,670

Datos de pesos moleculares obtenidos de PPDB (2019)

Estos bioensayos se llevaron a cabo en el LEA, en condiciones lo más cercanas posibles a las del entorno natural de *C. gibbosa* para la época del año en que fueron muestreados los individuos, ya que las variables del sistema inmune pueden ser sensibles a cambios de temperatura y de las condiciones del agua (Amiard-Triquet et al., 2015). Los bioensayos se llevaron a cabo siempre en la misma época (febrero-marzo) con agua del río Chimehuín, a una temperatura similar a la del agua de las zonas poco profundas del río en esa época, 22 ± 2 °C, y bajo fotoperiodo natural. Tuvieron una duración de 48 h, durante las cuales no se alimentó a los individuos, ni se utilizaron aireadores.

6.2.2 Determinación de respuestas del sistema inmune

En el ensayo *Metilazinfos* se observaron en la hemolinfa de *C. gibbosa* células claramente identificables como hemocitos. Posteriormente, con modificaciones a la metodología de fijación y coloración, se corroboró que se podían identificar claramente distintos tipos de hemocitos. Para que fueran reproducibles entre experimentos, las variables de hemocitos totales, viabilidad celular y actividad fagocítica se determinaron con respecto a los hemocitos observados en las muestras, sin discriminar según el tipo celular, pero se incluyó la variable proporción de tipos de hemocitos en los ensayos *Acetona* y *Clorpirifos*, *Carbarilo* y *Acetamiprid*.

Hemocitos totales y viabilidad celular

Inmediatamente terminada la extracción de hemolinfa, se incubaron 30 μL de la muestra con 15 μL de Trypan Blue 0,2 % en solución anticoagulante isosmótica estéril (3 g L^{-1} de citrato trisódico y $0,363 \text{ g L}^{-1}$ de glucosa, pH 7, concentración final 60 mOsm) durante 5 min a 4 °C (Akaishi et al., 2007). Finalizada la incubación, se colocó una gota de 15 μL por celda en una cámara de Neubauer y se contó el número de células, por cuadruplicado, bajo un microscopio Leica DM 500 a 400 X. El número de hemocitos totales se expresó por mL de hemolinfa.

La viabilidad celular se determinó en simultáneo con la cantidad de hemocitos totales. Las células muertas no son capaces de excluir el colorante vital Trypan Blue, por lo tanto, se ven azules; aquellas células que aparecen sin color son consideradas viables (**Figura 6.3**).

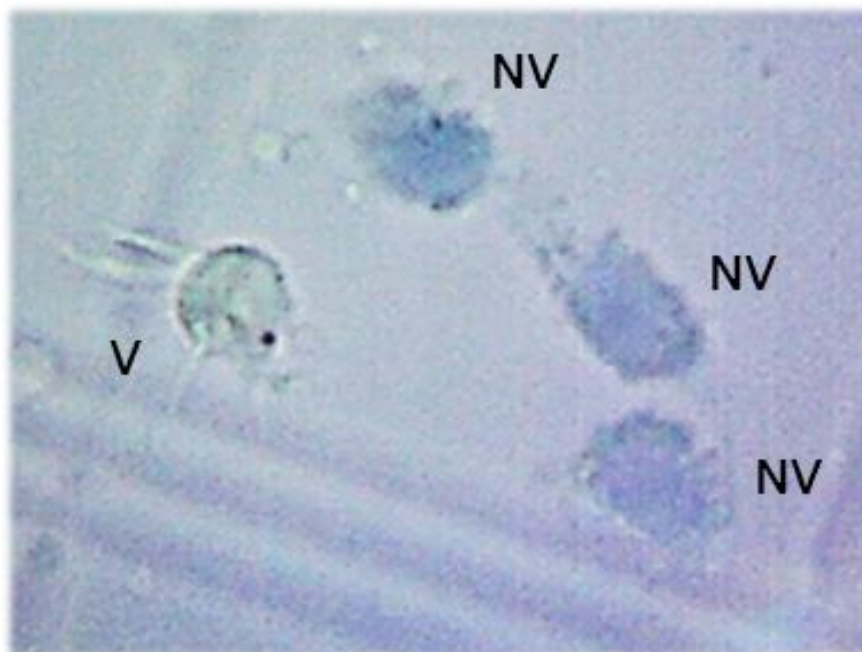


Figura 6.3 Células en hemolinfa de *Chilina gibbosa*. Luego de incubar la hemolinfa con el colorante vital Trypan Blue, se contaron la cantidad de células vivas (sin color, viables, **V**) y de células muertas (azules, no viables, **NV**) en cámara de Neubauer, bajo un microscopio Leica DM 500 a 400 X.

De este modo, se contaron las células vivas (viables) y las muertas (no viables). La viabilidad celular se expresó como la proporción de hemocitos viables por número de hemocitos totales en la muestra según la ecuación (6.1).

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\sum \text{hemocitos viables}}{\text{hemocitos totales}} \quad (6.1)$$

Proporción de tipos de hemocitos

Para determinar la proporción de los diferentes tipos de hemocitos identificados en la hemolinfa de *C. gibbosa* (hialinocitos, granulocitos y blastocitos), se dejaron adherir dos gotas de 30 μL de hemolinfa fresca en un porta objetos durante 30 min a temperatura ambiente, dentro de una cámara húmeda. Luego, se agregó a cada gota 50 μL de solución de colorante de Wright disuelto en PBS en una proporción 5:3, y se dejó actuar durante 1 min. El preparado se lavó cuidadosamente con agua destilada y se contaron aproximadamente 70 células por muestra por duplicado, bajo microscopio óptico a 400 X. Los tipos de hemocitos se identificaron de acuerdo a la clasificación propuesta por Ray et al. (2013) para otros gasterópodos de agua dulce. La proporción de cada tipo de hemocito se expresó como número células de un tipo celular por total de hemocitos observados según la ecuación (6.2).

$$\text{Proporción de tipos de hemocitos} = \frac{\sum \text{tipo de hemocito}}{\text{hemocitos totales}} \quad (6.2)$$

Actividad fagocítica

La metodología de determinación de la actividad fagocítica se adaptó del método de Kuchel et al. (2010) para *C. gibbosa*. Se incubaron, a temperatura ambiente durante 30 min, dos gotas de 20 μL de hemolinfa fresca con un volumen de suspensión de levaduras previamente coloreadas con Rojo Congo que contenía el doble del número de células que el número de hemocitos viables de la muestra. Finalizada la incubación, se colocaron 30 μL de

la mezcla sobre un portaobjetos limpio y se dejó adherir a las células durante 30 min a temperatura ambiente, dentro de una cámara húmeda. Luego, se agregó 1 mL de Solución de Giemsa 10 % a cada gota, se dejó actuar durante 10 min, y se lavó el preparado cuidadosamente con agua destilada. Bajo microscopio óptico a 400 X se identificaron los núcleos de los hemocitos en azul claro o violeta y las levaduras en negro. Se consideró que una levadura había sido fagocitada si se encontraba dentro de los límites del citoplasma de un hemocito al que se le podía identificar el núcleo.

Para cada muestra, se contaron cuántos hemocitos habían fagocitado y cuantos no, de un total de aproximadamente 90 células por muestra. Este recuento se realizó bajo microscopio y por duplicado. La actividad fagocítica se expresó como número de hemocitos que fagocitaron por número total de hemocitos evaluados según la ecuación (6.3).

$$\text{Actividad fagocítica} = \frac{\sum \text{hemocitos que fagocitaron}}{\text{hemocitos evaluados}} \quad (6.3)$$

6.2.3 Análisis estadístico

Para todos los ensayos, los resultados de las respuestas del sistema inmune entre los individuos de los diferentes tratamientos se evaluaron mediante ANOVA de 1 factor y las proporciones de los tipos de hemocitos se analizaron mediante ANOVA de 2 factores. En los casos en los que se encontraron diferencias, se utilizó la prueba de contrastes múltiples de Tukey. Se comprobó normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Brown-Forsythe. La homogeneidad de varianzas se comprobó por medio de la prueba de Bartlett y la prueba de Spearman en los ANOVA de 2 factores. Para cumplir con los supuestos, la viabilidad celular y la actividad fagocítica del ensayo *Metilazinfos* se transformaron mediante $\arcseno(\sqrt{\quad})$ y las proporciones de tipos de hemocitos del ensayo *Acetona* y *Clorpirifos*, *Carbarilo* y *Acetamiprid* se transformaron mediante $\arcseno(\sqrt{\quad})$.

Supervivencia y adherencia no cumplieron con los supuestos aún luego de transformar, por lo que se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

6.3 Resultados

Metilazinfos

No se observó mortalidad en el grupo control, el grupo expuesto a acetona, ni en el grupo tratado. Como era esperado, luego de la exposición a MAZ $20 \mu\text{g L}^{-1}$ todos los individuos mostraron los signos de neurotoxicidad.

El número total de hemocitos en la hemolinfa de *C. gibbosa* no difirió entre los individuos de los grupos control ni aquellos expuestos a MAZ (**Figura 6.4 A**; ANOVA de una vía; $F = 0,34$; $gl = 2$; $P > 0,05$).

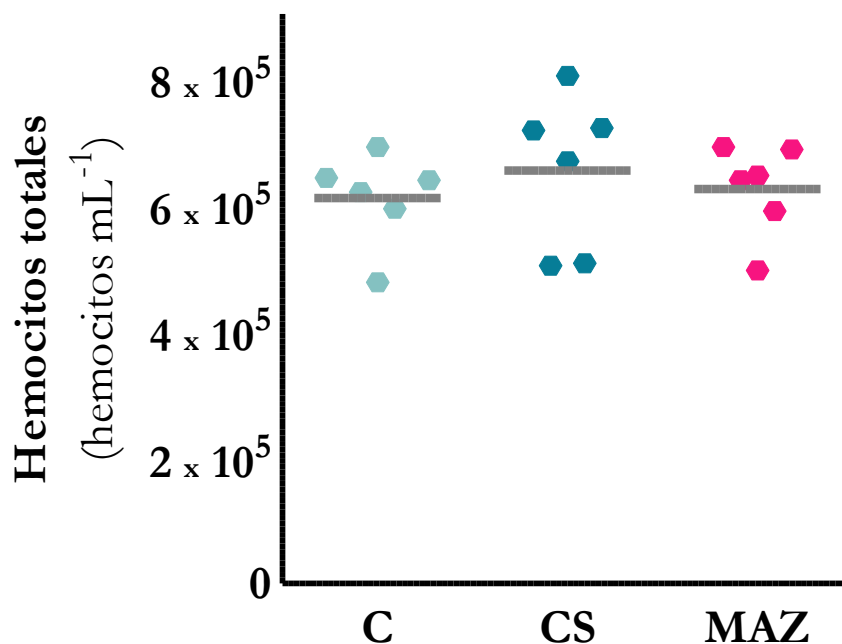


Figura 6.4 Número total de hemocitos por mL de hemolinfa de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a una concentración puntual de MAZ. C: control; agua del río Chimehuín. CS: control de solvente; acetona 0,002 % en agua del río Chimehuín. MAZ: $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Cada hexágono corresponde a una unidad experimental, es decir la hemolinfa conjunta de 3 individuos. Línea gris: media.

Por otro lado, la exposición a MAZ redujo en 28 % la viabilidad celular con respecto a los individuos del grupo control (Figura 6.5; ANOVA de una vía, $F = 162,99$, $gl = 2$, Prueba de contrastes múltiples de Tukey, $P < 0,001$). El solvente, acetona, tuvo un efecto menor pero significativo sobre esta variable, causando una reducción del 4 % en la viabilidad de los hemocitos de individuos expuestos a acetona con respecto a los individuos no expuestos (comparaciones múltiples de Tukey; $P < 0,05$).

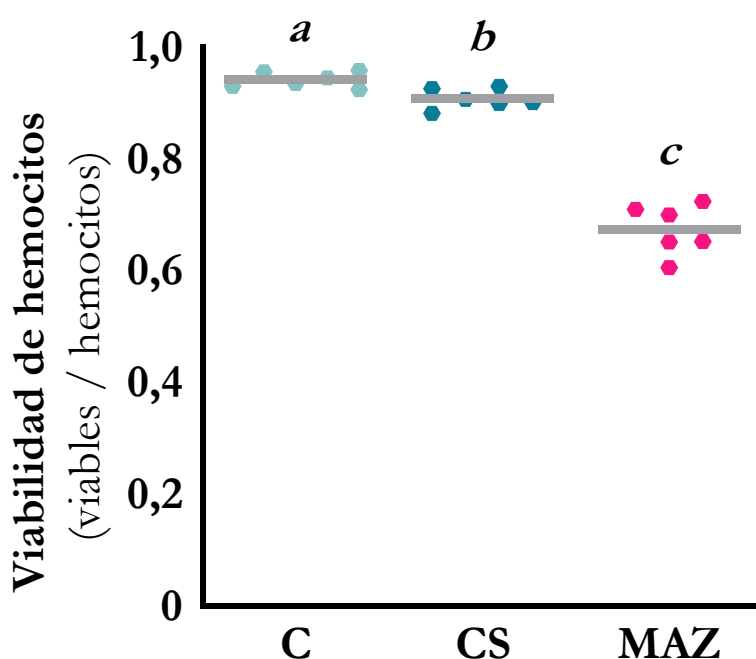


Figura 6.5 Viabilidad celular de hemocitos en hemolinfa de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a una concentración puntual de MAZ. C: control; agua del río Chimehuín. CS: control de solvente; acetona 0,002 % en agua del río Chimehuín. MAZ: $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Cada hexágono corresponde a una unidad experimental, es decir la hemolinfa conjunta de 3 individuos. Línea gris: media. Letras diferentes: diferencias entre los tratamientos; $P < 0,05$.

La hemolinfa de *Chilina gibbosa* contenía células claramente diferenciadas capaces de ingerir levadura coloreada con RC. La actividad fagocítica en los hemocitos de *C. gibbosa* se observó en todos los tratamientos. La **Figura 6.6** muestra un ejemplo de hemocitos en la hemolinfa de individuos control **A** sin fagocitar y **B** fagocitando levaduras.

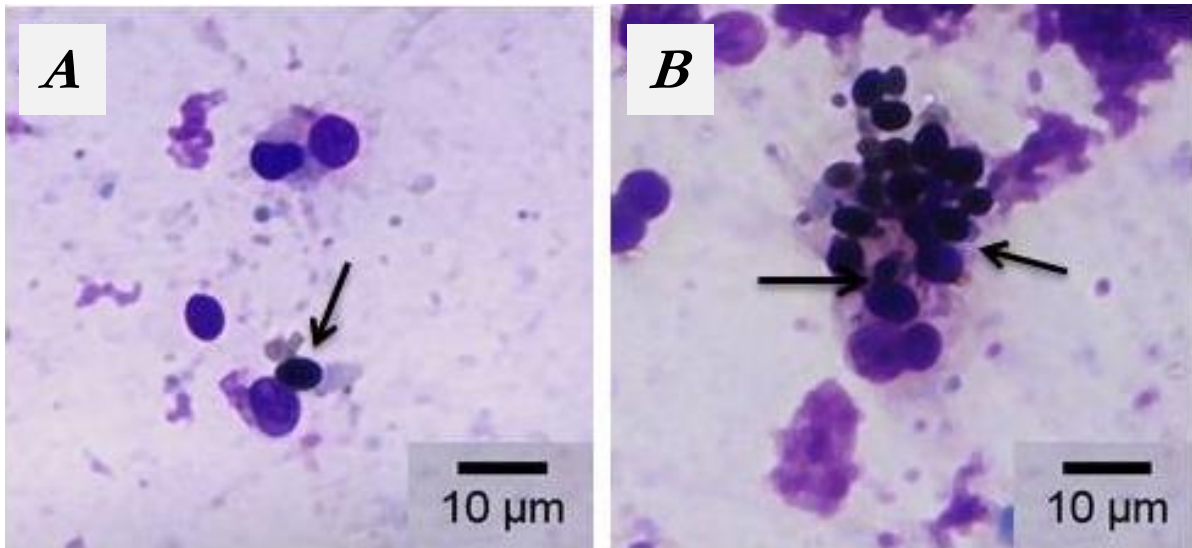


Figura 6.6 Fagocitosis de células de levadura coloreadas con RC por parte de hemocitos en hemolinfa de *Chilina gibbosa* coloreados con GS 10 % (400 X). Las flechas indican las células de levadura.

La exposición a MAZ redujo la actividad fagocítica de los hemocitos en un 72 % con respecto a los hemocitos de los individuos del grupo control (Figura 6.7; ANOVA de una vía, $F = 29,11$, $gl = 2$, $P < 0,001$; Prueba de contrastes múltiples de Tukey, $P < 0,05$). La acetona no tuvo efecto sobre esta variable.

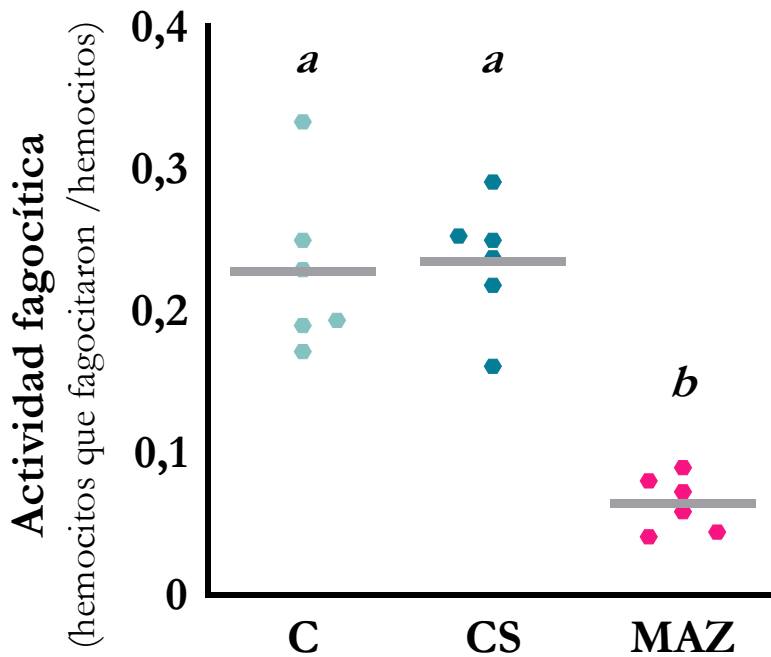


Figura 6.7 Actividad fagocítica de hemocitos en hemolinfa de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a una concentración puntual de MAZ. C: control; agua del río Chimehuín. CS: control de solvente; acetona 0,002 % en agua del río Chimehuín. MAZ: 20 µg L⁻¹. Cada hexágono corresponde a una unidad experimental, es decir la hemolinfa conjunta de 3 individuos. Línea gris: media. Letras diferentes: diferencias entre los tratamientos; P < 0,001.

Tipos de hemocitos de *Chilina gibbosa*

Utilizando el esquema morfológico de clasificación para poblaciones de hemocitos de moluscos propuesto por Ray et al. (2013b), se identificaron tres tipos de hemocitos en *C. gibbosa*: hialinocitos, granulocitos y blastocitos (*blast like cells*) (**Figura 6.8**). Los hialinocitos se reconocieron como células principalmente redondas, y algunas veces ovaladas, con citoplasma carente de gránulos. El núcleo celular era basófilo y no centrado y redondeado o polimórfico. Los granulocitos se reconocieron como células principalmente redondas con núcleo basófilo no centrado redondeado o polimórfico, cuyo citoplasma de aspecto rugoso presentaba una elevada densidad de gránulos. En estos dos tipos de hemocitos se pudieron reconocer dos tipos de proyecciones: pseudópodos¹⁵ y filopodios¹⁶. En los hialinocitos, se observaron pocos (en general no más de dos) pseudópodos de variada

¹⁵ Extensiones del citoplasma celular que engloban materiales o partículas externas y tienen funciones locomotoras, alimentarias o de defensa.

¹⁶ Proyecciones citoplasmáticas delgadas que forman adhesiones locales con el sustrato.

longitud y escasos filopodios. Los granulocitos presentaron similar cantidad de pseudópodos, pero los filopodios resultaron mucho más abundantes. Los blastocitos se identificaron como hialinocitos redondos carentes de proyecciones celulares con núcleos centrales grandes y una relación núcleo:citoplasma elevada.

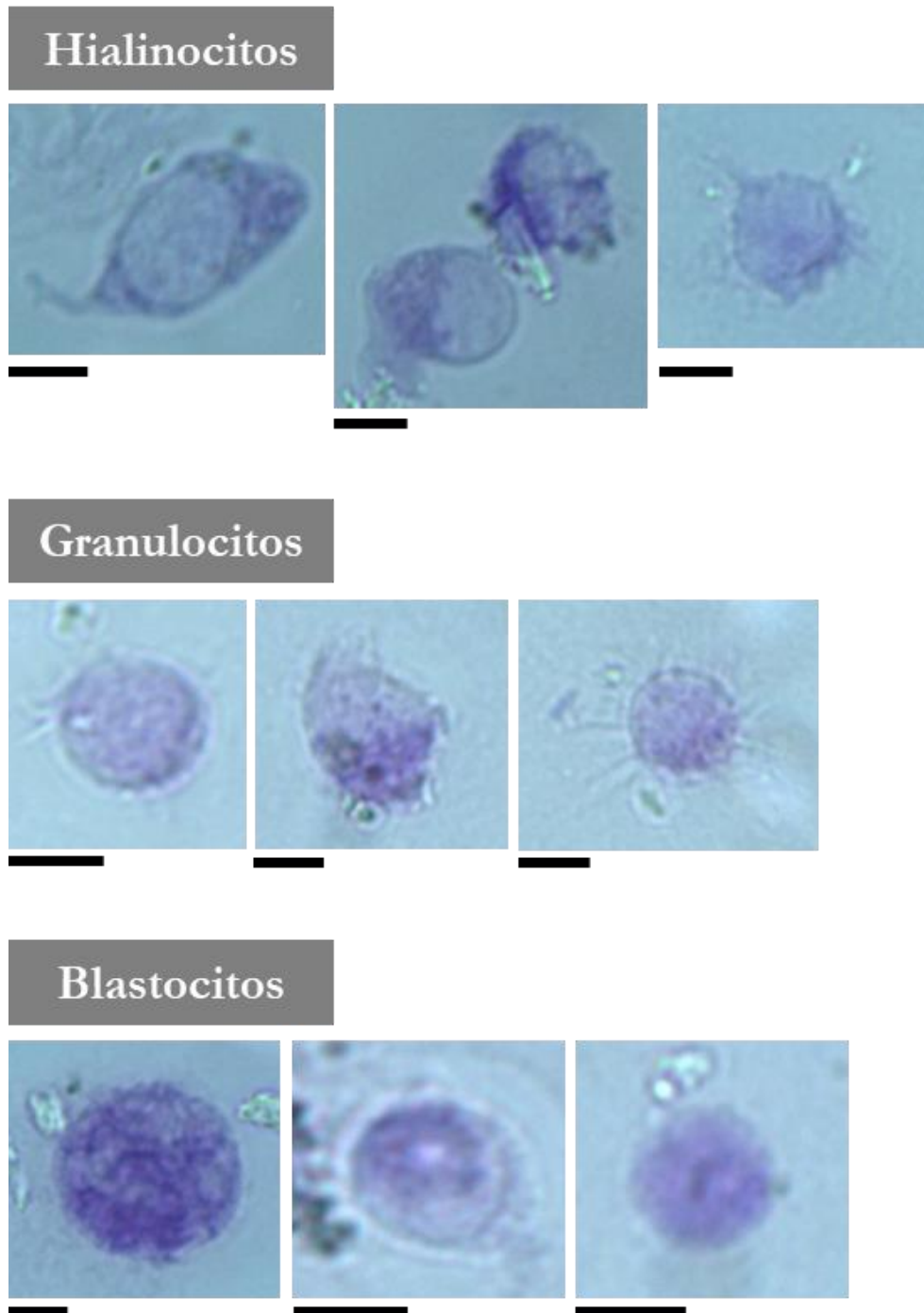


Figura 6.8 Tipos de hemocitos de *Chilina gibbosa*, identificados como hialinocitos, granulocitos o blastocitos (1000 X). Colorante de Wright 5:3 en PBS. Para la identificación de los tipos de hemocitos, se utilizó el esquema de clasificación para poblaciones de hemocitos de moluscos propuesto por Ray et al. (2013b). Escala: 10 μ m.

Acetona

Para todos los tratamientos, la supervivencia fue mayor que 85 % y no difirió entre ellos (**Figura 6.9 A**; prueba de Kruskal-Wallis; $P = 0,5473$). La adherencia también fue mayor que el 85 % (**Figura 6.9 B**; prueba de Kruskal-Wallis; $P = 0,5125$). El promedio de adherencia de los individuos del grupo control fue de $94 \pm 14\%$. Ninguno de los individuos de ninguno de los tratamientos evaluados presentó exposición de la cabeza-pie (**Figura 6.9 C**).

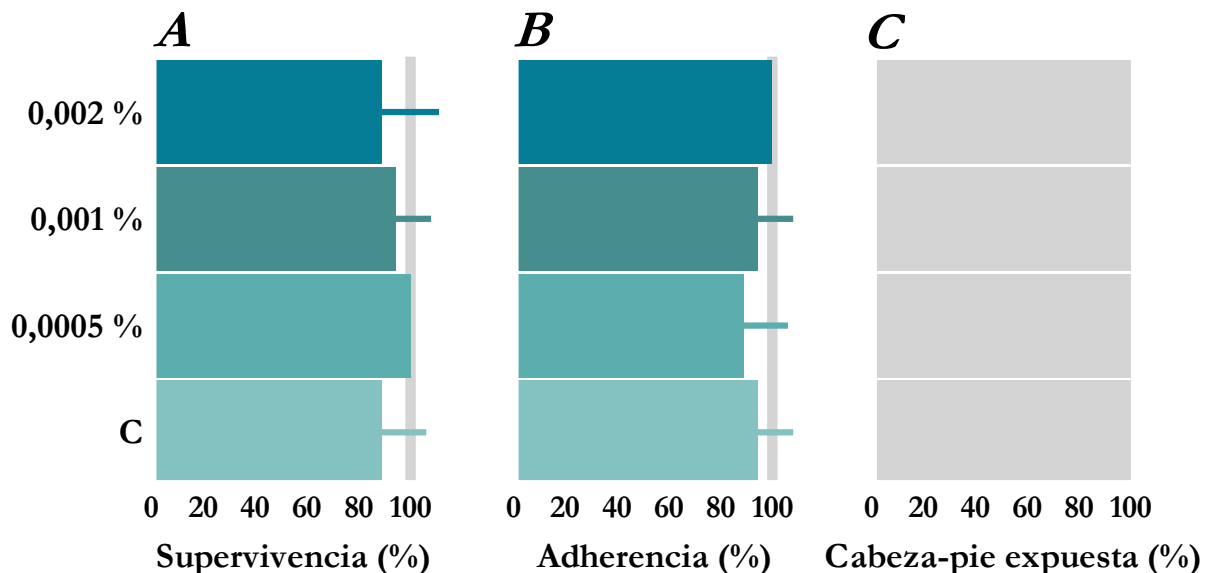
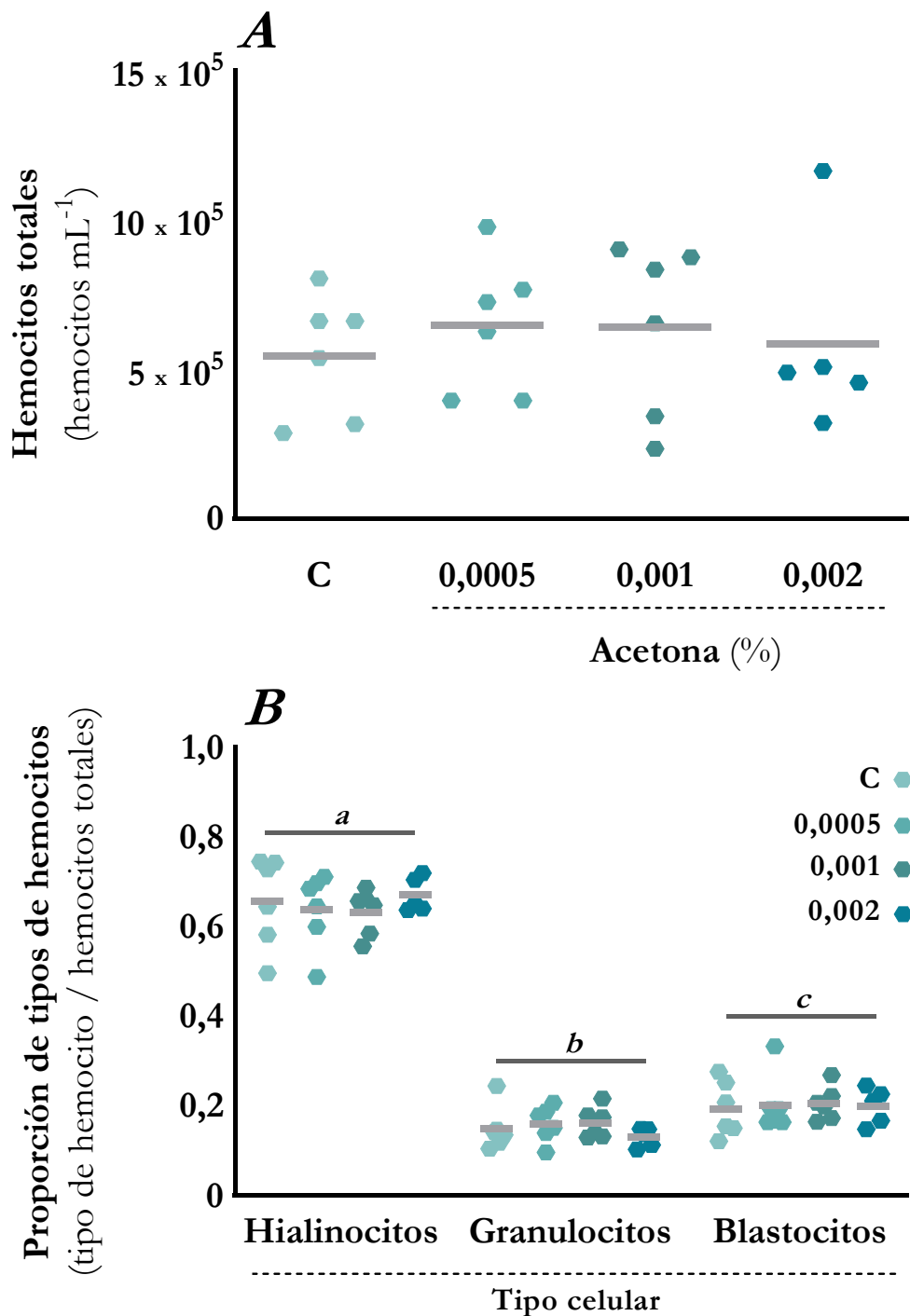


Figura 6.9 Porcentajes de supervivencia (**A**) y de los signos de neurotoxicidad, adherencia (**B**) y exposición conspicua de la cabeza-pie (**C**), de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de acetona. C: control; agua del río Chimehuín. Cada barra: media \pm desvío estándar de los recipientes de cada tratamiento. Línea gris vertical: 100 %.

Las concentraciones de acetona evaluadas no afectaron la respuesta inmune celular en *C. gibbosa*. Los hemocitos totales (**A**), la proporción de los tipos de hemocitos (**B**), la viabilidad celular (**C**) y la actividad fagocítica (**D**) de los individuos tratados no difirieron de las de los individuos del grupo control ni entre sí (**Figura 6.10**; ANOVA de 1 factor **A** $P = 0,8950$, **C** $P = 0,7394$ y **D** $P = 0,6895$; ANOVA de 2 factores, **B** Factor concentración de acetona $P = 0,9974$). En todos los tratamientos, la proporción de hialinocitos predominó por sobre la de granulocitos y esta a su vez fue mayor que la de blastocitos (**B** ANOVA de 2

factores, Factor tipo celular $P < 0,0001$; prueba de contrastes múltiples de Tukey, $P < 0,05$ para todos los contrastes). Se concluyó que el efecto de la acetona sobre esta variable observado en el *Ensayo 1* se debió principalmente a un efecto estadístico, y no biológico. De todos modos, se decidió usar acetona 0,001 % para el siguiente ensayo para disminuir la concentración lo más posible metodológicamente.



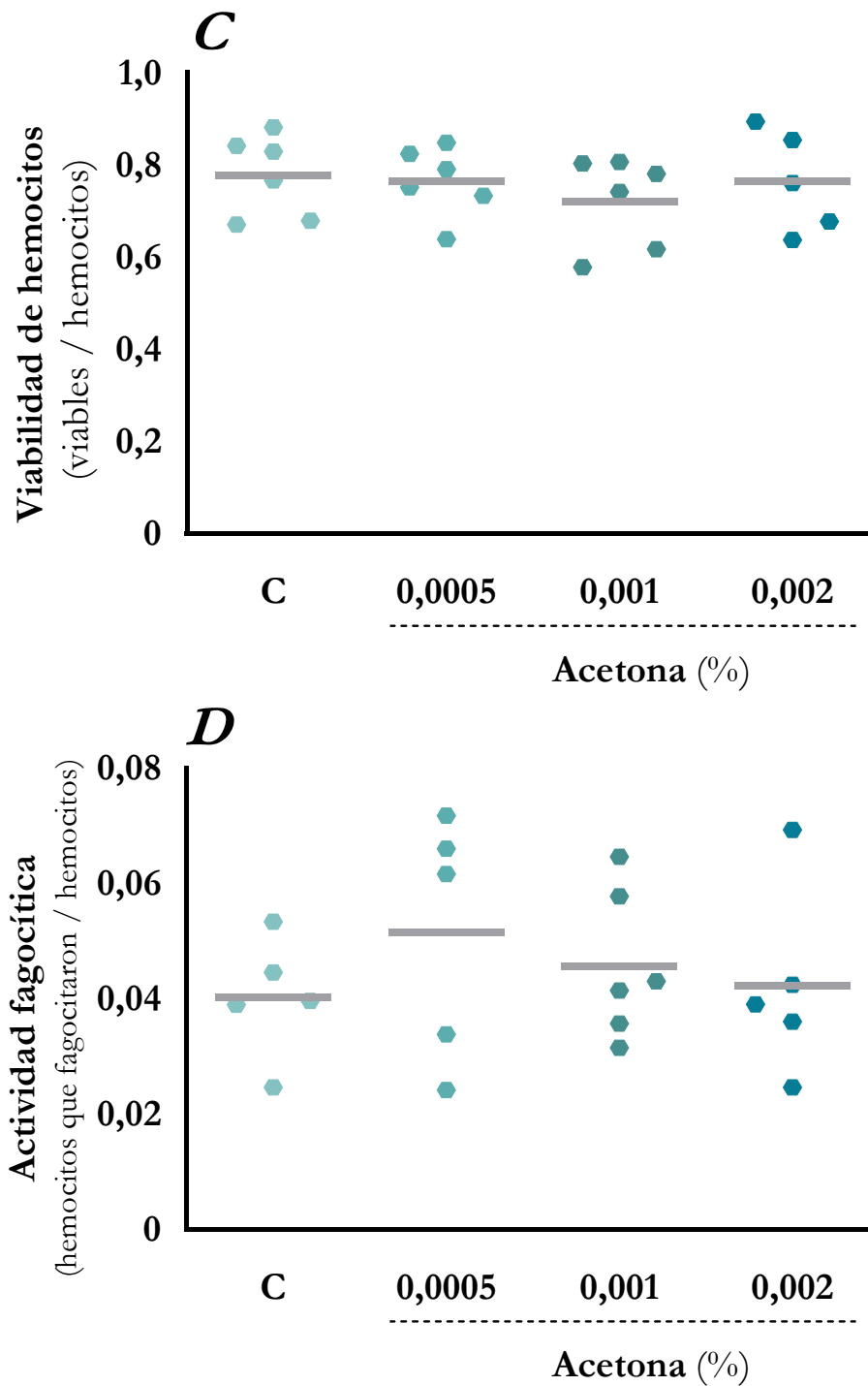


Figura 6.10 A Número total, B proporción de tipos de hemocitos, C viabilidad celular y D actividad fagocítica de hemocitos observados en hemolinfa de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a concentraciones crecientes de acetona. Cada hexágono corresponde a una unidad experimental, es decir la hemolinfa conjunta de 3 individuos. Línea gris: media.

Clorpirifos, Carbarilo y Acetamiprid

La supervivencia fue mayor que 75 % para todos los tratamientos y no difirió entre ellos (**Figura 6.11 A**; prueba de Kruskal-Wallis; $P = 0,5824$). La adherencia fue del 100 % para los individuos del grupo control, los expuestos a la acetona y los expuestos a CPF y disminuyó ligeramente a 95 ± 13 % en los expuestos a CAR y a 96 ± 12 % en los expuestos a ACP, sin diferir estadísticamente entre los tratamientos (**Figura 6.11 B**; prueba de Kruskal-Wallis; $P = 0,5073$). Ninguno de los individuos de ningún tratamiento evaluados presentó exposición de la cabeza-pie (**Figura 6.11 C**).

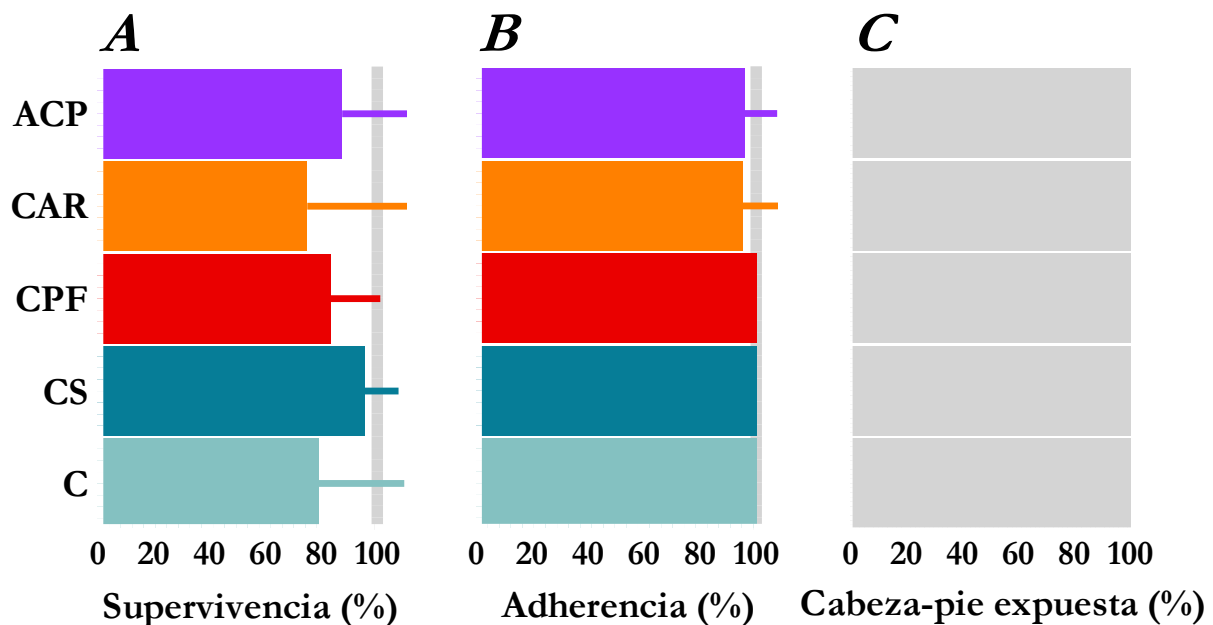


Figura 6.11 Porcentajes de supervivencia (A) y de los signos de neurotoxicidad, adherencia (B) y exposición conspicua de la cabeza-pie (C), de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a concentraciones puntuales de CPF, CAR y ACP equivalentes molares a una concentración de MAZ de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. C: control; agua del río Chimehuín. CS: control de solvente; acetona 0,001 % en agua del río Chimehuín. CPF: $22 \mu\text{g L}^{-1}$. CAR: $13 \mu\text{g L}^{-1}$. ACP: $14 \mu\text{g L}^{-1}$. Cada barra: media \pm desvío estándar de los recipientes de cada tratamiento. Línea gris vertical: 100 %.

El número de hemocitos totales tendió a aumentar en la hemolinfa de los individuos tratados con CPF (543.281 ± 158.725 hemocitos mL^{-1}), CAR (513.214 ± 121.541 hemocitos mL^{-1}) y ACP (506.719 ± 133.585 hemocitos mL^{-1}) con respecto a los individuos del grupo control (388.125 ± 71.602 hemocitos mL^{-1}) y a los expuestos a acetona (381.094 ± 94.230

hemocitos mL^{-1}). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (**Figura 6.12**; prueba de contrastes múltiples de Tukey; $P > 0,05$).

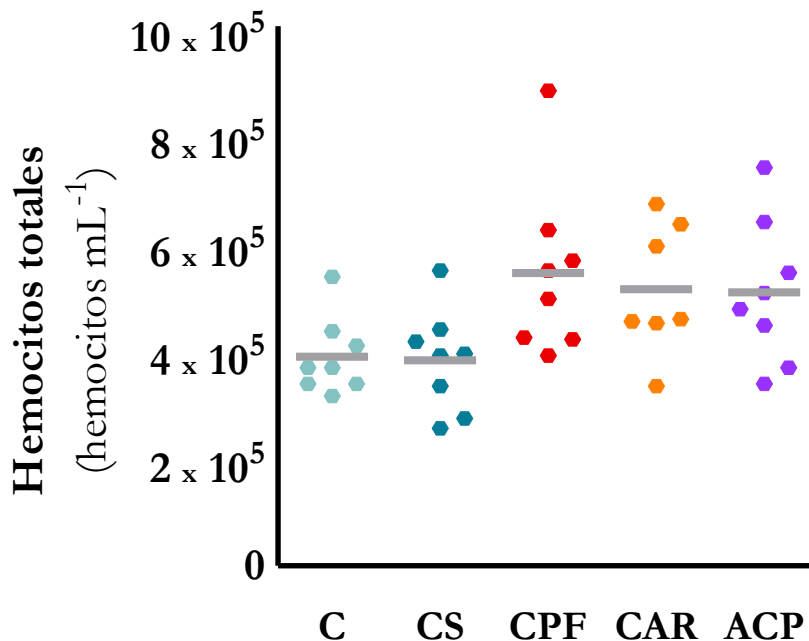


Figura 6.12 Número total de hemocitos por mL de hemolinfa de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a concentraciones puntuales de CPF, CAR y ACP equivalentes molares a una concentración de MAZ de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. C: control; agua del río Chimehuín. CS: control de solvente; acetona 0,001 % en agua del río Chimehuín. CPF: $22 \mu\text{g L}^{-1}$. CAR: $13 \mu\text{g L}^{-1}$. ACP: $14 \mu\text{g L}^{-1}$. Cada hexágono corresponde a una unidad experimental, es decir la hemolinfa conjunta de 3 individuos. Línea gris: media.

Los insecticidas afectaron las proporciones de los tipos de hemocitos presentes en la hemolinfa de *C. gibbosa* de manera diferencial según cada tipo (**Figura 6.13**; ANOVA de 2 factores, Interacción $P < 0,0001$). La proporción de hialinocitos no difirió entre individuos del grupo control de agua e individuos expuestos al solvente, pero disminuyó con cualquiera de los insecticidas (**Figura 6.13 Hialinocitos**; prueba de contrastes múltiples de Tukey sobre los efectos simples, $P = 0,9988$ para el contraste C – CS y $P < 0,005$ para los contrastes de cada insecticida y C o CS). CPF causó una disminución de 13 %, CAR de 16 % y ACP de 19 % en relación al control de agua, pero no difirieron de manera estadísticamente significativa entre ellos (prueba de contrastes múltiples de Tukey sobre los efectos simples, $P > 0,005$ para los contrastes entre insecticidas). De forma inversa, la exposición a los

insecticidas generó un aumento en la proporción de granulocitos con respecto a los individuos de ambos grupos control (**Figura 6.13 Granulocitos**; prueba de contrastes múltiples de Tukey sobre los efectos simples, $P = 0,9996$ para el contraste C – CS y $P < 0,005$ para los contrastes de cada insecticida y C o CS). CPF causó un aumento de 10 %, CAR de 9 % y ACP de 9 % en relación al control de agua, pero no difirieron de manera estadísticamente significativa entre ellos (prueba de contrastes múltiples de Tukey sobre los efectos simples, $P > 0,005$ para los contrastes entre insecticidas). Las proporciones de blastocitos en la hemolinfa de los individuos de los grupos control tampoco difirieron entre sí, y no fueron afectadas por la exposición a CPF (**Figura 6.13 Blastocitos**; ANOVA de 2 factores; prueba de contrastes múltiples de Tukey sobre los efectos simples, $P = 0,9953$ para el contraste C – CS, $P > 0,05$ para los contrastes CPF – C o CS). En el caso de ACP, la proporción de ACP tendió a aumentar (6 %), pero únicamente difirió de la proporción en individuos del grupo control de solvente, no del grupo control de agua ni de los otros insecticidas (ANOVA de 2 factores; prueba de contrastes múltiples de Tukey sobre los efectos simples, $P = 0,0261$ para el contraste ACP – CS, $P > 0,05$ para los contrastes ACP – C, CPF o CAR). La exposición a CAR aumentó la proporción de blastocitos en con respecto a la de los individuos de ambos grupos control (7 %), pero no con respecto a la de los individuos expuestos a los otros dos insecticidas (ANOVA de 2 factores; prueba de contrastes múltiples de Tukey sobre los efectos simples, $P = 0,0117$ para el contraste CAR – C, $P = 0,0036$ para el contraste CAR – CS y $P > 0,05$ para los contrastes CAR – CPF o ACP).

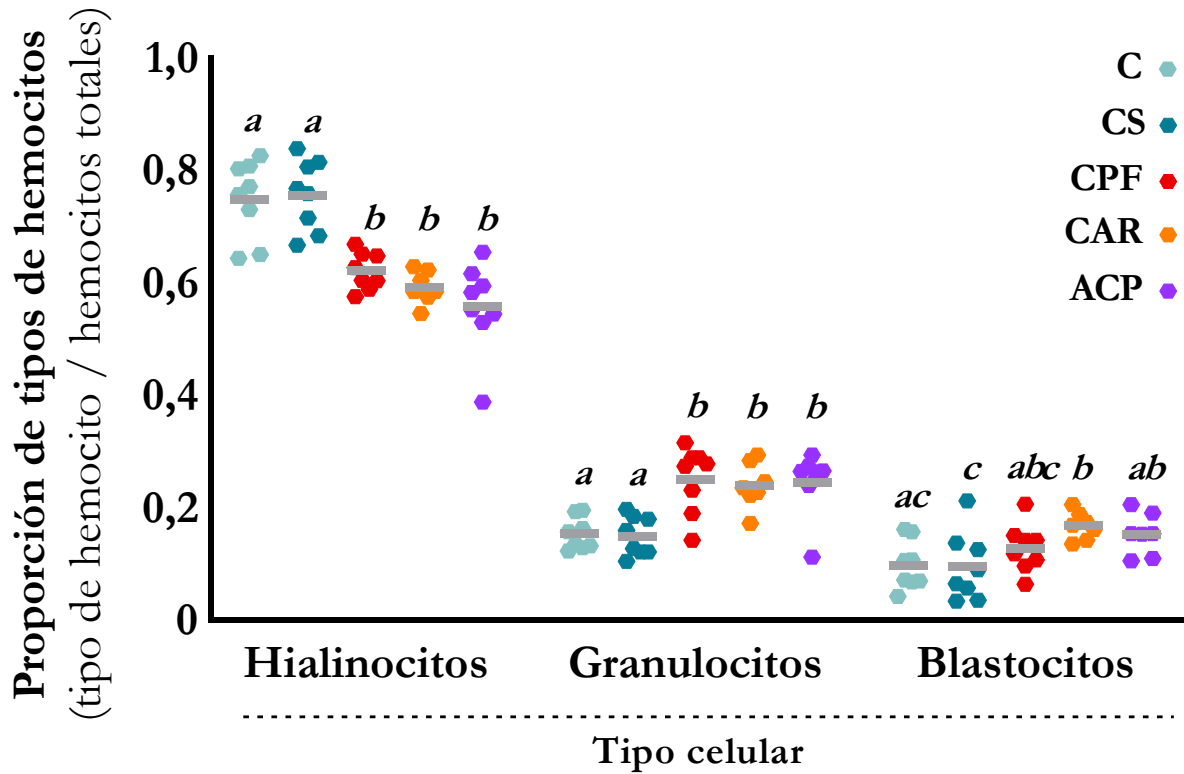


Figura 6.13 Proporción de tipos de hemocitos en hemolinfa de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a concentraciones puntuales de CPF, CAR y ACP equivalentes molares a una concentración de MAZ de 20 µg L⁻¹. C: control; agua del río Chimehuín. CS: control de solvente; acetona 0,001 % en agua del río Chimehuín. CPF: 22 µg L⁻¹. CAR: 13 µg L⁻¹. ACP: 14 µg L⁻¹. Cada hexágono corresponde a una unidad experimental, es decir la hemolinfa conjunta de 3 individuos. Línea gris: media. Letras diferentes: diferencias entre los tratamientos, por tipo celular; P < 0,05.

La viabilidad celular no difirió entre los individuos del grupo control y aquellos expuestos a acetona, pero sí se vio afectada por la exposición a los insecticidas (Figura 6.14; prueba de contrastes múltiples de Tukey). CPF, CAR y ACP redujeron la viabilidad 26 %, 24 % y 24 % relativo al control, respectivamente, y no difirieron entre sí (prueba de contrastes múltiples de Tukey).

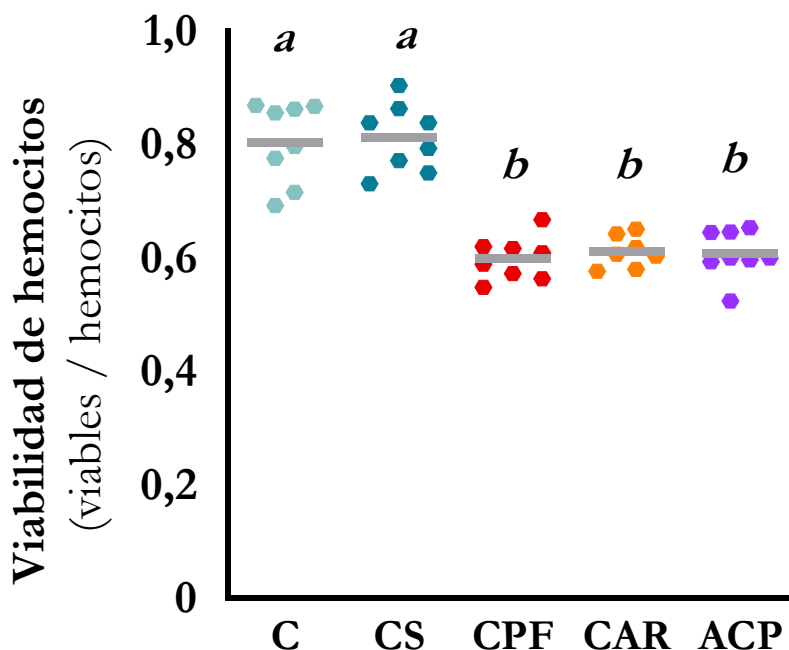


Figura 6.14 Viabilidad de hemocitos por mL de hemolinfa de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a concentraciones puntuales de CPF, CAR y ACP equivalentes molares a una concentración de MAZ de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. C: control; agua del río Chimehuín. CS: control de solvente; acetona 0,001 % en agua del río Chimehuín. CPF: $22 \mu\text{g L}^{-1}$. CAR: $13 \mu\text{g L}^{-1}$. ACP: $14 \mu\text{g L}^{-1}$. Cada hexágono corresponde a una unidad experimental, es decir la hemolinfa conjunta de 3 individuos. Línea gris: media. Letras diferentes: diferencias entre los tratamientos; $P < 0,0001$.

Con respecto a la actividad fagocítica, tampoco se encontraron diferencias entre los individuos del grupo control y los expuestos a acetona, pero la exposición a CPF, CAR y ACP afectó negativamente esta variable (**Figura 6.15**; prueba de contrastes múltiples de Tukey). Los individuos expuestos a CPF presentaron 51 % menos actividad fagocítica que los individuos del grupo control y, los individuos expuestos a CAR, 41 % menos. En los individuos expuestos a ACP, la reducción en actividad fagocítica fue de 36 %. El efecto de los insecticidas no difirió entre sí (prueba de contrastes múltiples de Tukey).

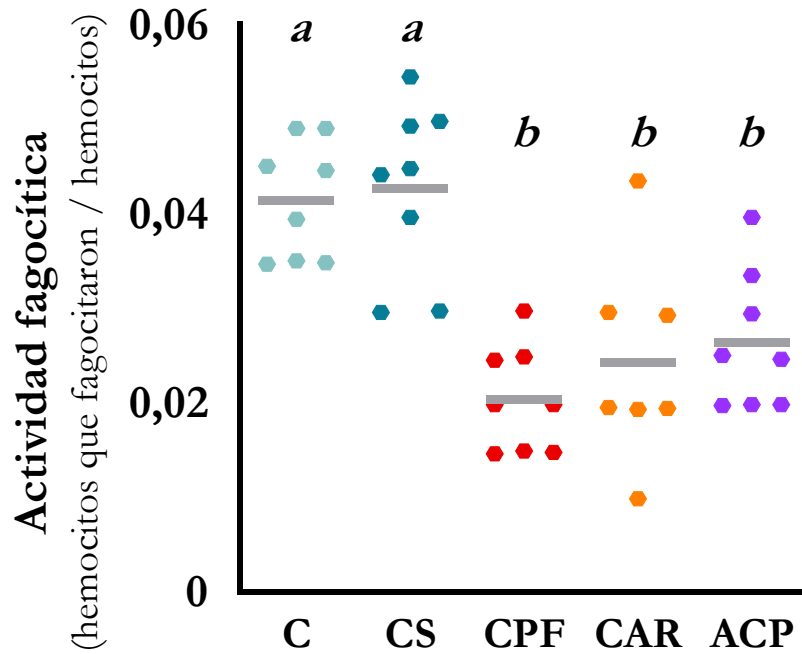


Figura 6.15 Actividad fagocítica de hemocitos por mL de hemolinfa de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a concentraciones puntuales de CPF, CAR y ACP equivalentes molares a una concentración de MAZ de $20 \mu\text{g L}^{-1}$. C: control; agua del río Chimehuín. CS: control de solvente; acetona 0,001 % en agua del río Chimehuín. CPF: $22 \mu\text{g L}^{-1}$. CAR: $13 \mu\text{g L}^{-1}$. ACP: $14 \mu\text{g L}^{-1}$. Cada hexágono corresponde a una unidad experimental, es decir la hemolinfa conjunta de 3 individuos. Línea gris: media. Letras diferentes: diferencias entre los tratamientos; $P < 0,001$.

6.5 Discusión

La exposición a plaguicidas puede producir inmunosupresión a través de efectos tóxicos directos o indirectos que causan deficiencia funcional o daño celular (Galloway y Handy, 2003) y se ha encontrado una gran variedad de respuestas diferentes para distintos modelos animales y plaguicidas. Dentro de nuestro conocimiento, en este capítulo se describen, por primera vez, los tipos celulares del sistema inmune de *C. gibbosa* y se evalúan sus respuestas como biomarcadores de exposición a insecticidas. Se caracterizaron los distintos tipos de hemocitos de *C. gibbosa*, se cuantificaron los hemocitos totales en hemolinfa y la proporción de cada tipo y se determinaron la viabilidad celular y la actividad fagocítica. Se encontró que las exposiciones agudas a MAZ, CPF, CAR y ACP tienen efectos tóxicos severos sobre la viabilidad celular, la actividad fagocítica y la proporción de tipos de hemocitos de la hemolinfa de *C. gibbosa* (**Tabla 6.2**).

Tabla 6.2 Resumen de los signos de neurotoxicidad y de las respuestas celulares en hemolinfa (cantidad de hemocitos totales, viabilidad celular, actividad fagocítica y proporción de tipos de hemocitos) de *Chilina gibbosa* luego de una exposición de 48 h a una concentración de MAZ de 20 µg L⁻¹ y a concentraciones de CPF, CAR y ACP equivalentes molares a MAZ 20 µg L⁻¹. ND no determinado. n.s. no significativo estadísticamente con respecto al grupo control de agua.

Respuesta	<i>Metilazinfos</i>	<i>Clorpirifos</i>	<i>Carbarilo</i>	<i>Acetamiprid</i>
Falta de adherencia	100 %	No se observó	5 % n.s.	4 % n.s.
Exposición cabeza-pie	100 %	No se observó	No se observó	No se observó
Hemocitos totales	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias	Sin diferencias
Viabilidad celular	↓ 28 %	↓ 26 %	↓ 24 %	↓ 24 %
Actividad fagocítica	↓ 72 %	↓ 51 %	↓ 41 %	↓ 36 %
Proporción de hialinocitos		↓ 13 %	↓ 16 %	↓ 19 %
granulocitos	ND	↑ 10 %	↑ 9 %	↑ 9 %
blastocitos		↑ 3 % n.s.	↑ 7 % n.s.	↑ 6 % n.s.
Concentración evaluada (µg L ⁻¹)	20	22	13	14
(µmol L ⁻¹)	0,063	0,063	0,063	0,063

En general, los efectos tóxicos de MAZ, CPF, CAR y ACP sobre las respuestas del sistema inmune de *C. gibbosa* presentaron el mismo patrón. En primer lugar, el número total de hemocitos en la hemolinfa no fue afectado por la exposición por 48 h a ninguno de los insecticidas estudiados. Con CPF, CAR y ACP se observó una tendencia al aumento del número total de hemocitos posterior a la exposición, si bien este aumento no resultó estadísticamente significativo. El aumento del número total de hemocitos en hemolinfa causado por exposición a contaminantes de distinta naturaleza es la respuesta que más comúnmente se encuentra en moluscos, especialmente en bivalvos (Russo y Lagadic, 2004). Por ejemplo, esta respuesta se encontró en *D. chilensis* expuesto durante 72 h a una concentración de MAZ de 200 µg L⁻¹ (Castro et al., 2017) y en *Lamellidens marginalis* luego de exposiciones de 48 y 72 h a concentraciones crecientes del insecticida piretroide fenvalerato (Ray et al., 2013a). También se ha encontrado en gasterópodos de agua dulce como *Bellamyia bengalensis* tras exposiciones agudas de 24, 72 y 96 h al insecticida

piretroide cipermetrina (Ray et al., 2013a). En *Lymnaea palustris*, la exposición aguda (6 h) al insecticida organoclorado hexaclorobenzeno también aumentó el número total de hemocitos en hemolinfa (Russo y Lagadic, 2000). Sin embargo, en otros invertebrados el efecto de plaguicidas sobre la cantidad de hemocitos totales varió según la especie y el tiempo de exposición. Por ejemplo, en *B. glabrata* la exposición durante 48 h a MAZ no produjo efecto significativo sobre la cantidad de hemocitos totales, como en *C. gibbosa*, aun a concentraciones mucho más altas que las aplicadas en esta tesis ($5.000 \mu\text{g L}^{-1}$ de MAZ) (Kristoff, 2010). Sin embargo, luego de 96 h, la cantidad de hemocitos en hemolinfa disminuyó fuertemente (72 %) En *M. edulis*, Rickwood y Galloway (2004) describieron como la cantidad de hemocitos en hemolinfa puede aumentar, disminuir o permanecer estable frente a la exposición al OF clorfenvinfos, dependiendo de la concentración o del tiempo de exposición. Algunos autores sugieren que la migración de hemocitos desde la hemolinfa a los tejidos y *viceversa* podría explicar los números de hemocitos circulantes, más que un aumento en la proliferación celular (hematopoyesis), por la exposición a corto plazo a plaguicidas (Russo et al., 2007; Russo y Lagadic, 2000). Esto podría explicar la variabilidad de esta respuesta entre especies y que también se encuentra reflejada en la alta variabilidad que se encontró en este capítulo en la determinación del número de hemocitos totales entre individuos de *C. gibbosa*. La variabilidad interindividual en esta respuesta se puede encontrar también en otros estudios con otras especies de moluscos (Bianchi et al., 2015, 2014; Castro et al., 2017).

No obstante, que el número total de hemocitos en hemolinfa permanezca estable no significa que la estructura de la población de hemocitos no sea afectada. En *C. gibbosa*, CPF, CAR y ACP disminuyeron la proporción de hialinocitos, aumentaron la de granulocitos y, en menor medida, la de blastocitos. El cambio en las sub poblaciones de hemocitos es un efecto común de los contaminantes sobre el sistema inmune (Galloway y Handy, 2003) y principalmente el aumento en la proporción de granulocitos se ha documentado para

diferentes contaminantes orgánicos sobre distintas especies de moluscos, generalmente bivalvos (Russo y Lagadic 2004). En particular, la exposición a MAZ aumentó la proporción de granulocitos y disminuyó la de hialinocitos en *D. chilensis* (Castro et al., 2017). En el caso de gasterópodos, existe menos información, pero se describió el aumento de granulocitos por exposición aguda a cadmio en *Littorina littorea* (Marigómez et al., 1990) y a atrazina en *L. stagnalis* Russo y Lagadic 2004).

A pesar de que la cantidad de hemocitos totales permaneció relativamente estable en *C. gibbosa* frente a los distintos insecticidas, se encontraron efectos importantes sobre la viabilidad y la actividad fagocítica, que reducirían su inmunocompetencia. La viabilidad celular de los hemocitos de *C. gibbosa*, disminuyó de forma pareja (entre 24 y 28 %) con la exposición a MAZ, CPF, CAR y ACP. Otros insecticidas como clorfenvinfos, fenvalerato y cipermetrina también redujeron la viabilidad celular en moluscos (*M. edulis*, *B. bengalensis* y *L. marginalis*; Ray et al., 2013a; Rickwood y Galloway 2004). Todos los insecticidas evaluados en este capítulo causaron una disminución sustancial de la actividad fagocítica de los hemocitos de *C. gibbosa*. Este efecto fue mayor para los insecticidas OF (72 % con MAZ y 51 % con CPF), ligeramente menor para CAR (41 %) y menor para ACP (36 %). De manera similar, la exposición aguda a clorfenvinfos, hexaclorobenzeno y a atrazina inhibió de manera significativa la actividad fagocítica en *M. edulis*, *L. palustris* y *L. stagnalis*, respectivamente (Rickwood y Galloway, 2004; Russo y Lagadic, 2004, 2000). En el caso de *L. palustris*, Russo y Lagadic (2000) sugirieron que la reducción de la actividad fagocítica podía deberse o a la pérdida de viabilidad celular de los hemocitos (si bien no la midieron), o a un efecto sobre la sensibilidad de los procesos de fagocitosis. En *C. gibbosa*, la disminución en la viabilidad de los hemocitos solo explicaría parcialmente el efecto de MAZ, CPF, CAR y ACP sobre la actividad fagocítica, ya que la inhibición de la actividad fagocítica fue mucho mayor que la pérdida de viabilidad. Por lo tanto, existirían otros efectos tóxicos de estos insecticidas sobre los procesos fagocíticos de los hemocitos de *C. gibbosa*. Si bien pueden

existir mecanismos que compensen los efectos sobre variables puntuales del sistema inmune e influyan sobre la inmunocompetencia final, en general se sugiere que se debe considerar cualquier efecto estadísticamente significativo como un riesgo potencial de inmunosupresión (Galloway y Depledge, 2001). En este caso, dado que en invertebrados la fagocitosis por hemocitos en hemolinfa es la estrategia principal de defensa contra patógenos y es la base del sistema inmune (Galloway y Depledge, 2001; Galloway y Handy, 2003; Russo y Lagadic, 2004), los efectos tóxicos de concentraciones ambientalmente relevantes de MAZ, CPF, CAR y ACP sobre la viabilidad de los hemocitos y su actividad fagocítica podrían tener consecuencias sobre la habilidad de *C. gibbosa* de enfrentar infecciones en su hábitat natural.

En invertebrados, se conoce poco sobre cómo se integran los diferentes componentes del sistema inmune para interpretar los efectos inmunotóxicos de los contaminantes y entender las consecuencias sobre la inmunocompetencia global, y además, las respuestas pueden resultar poco homogéneas entre especies (Galloway y Handy, 2003; Loker et al., 2004). Russo y Lagadic (2004) argumentan que el aumento en la densidad de hemocitos (cantidad de hemocitos por mL de hemolinfa) es una de las estrategias que permite mantener constante el nivel global de actividad fagocítica cuando la fagocitosis celular individual se ve inhibida por un xenobiótico. Por ejemplo, (Castro et al., 2017) sugirieron que en *D. chilensis* expuesto durante 72 h a una concentración de MAZ diez veces mayor ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) que la usada en este capítulo ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), el número total de hemocitos aumentó, manteniendo la homeostasis contra un posible daño tisular, y que esto se vio reflejado en un aumento en la actividad fagocítica, mientras que la viabilidad celular no se vio alterada, a pesar de que registró menor estabilidad de la membrana lisosomal (Castro et al., 2017). Considerando que la cantidad de hemocitos totales en la hemolinfa de *C. gibbosa* se mantuvo estable ante la exposición a MAZ, CPF, CAR y ACP, esta no parecería ser la estrategia principal de la respuesta de *C. gibbosa* a estos insecticidas, especialmente en el caso de MAZ. En el caso de CPF, CAR y ACP, la tendencia al aumento de los hemocitos totales sí podría sugerir que esta

es, al menos de manera parcial, una respuesta en *C. gibbosa*. Como se mencionó para otras especies, esta respuesta podría ser más evidente a mayores concentraciones de los insecticidas o a tiempos de exposición más prolongados. En la exposición aguda a las concentraciones evaluadas, no parecería ser suficiente para contrarrestar el efecto de estos insecticidas sobre la viabilidad y la actividad fagocítica de los hemocitos. El aumento en la proporción de granulocitos con respecto a la proporción de hialinocitos, también podría ser una estrategia para incrementar la capacidad fagocítica del sistema inmune. En gasterópodos, las distintas poblaciones de los tipos de hemocitos pueden diferir en sus funciones y los granulocitos en particular suelen estar principalmente involucrados en la fagocitosis (Galloway y Depledge, 2001; Russo y Lagadic, 2004). En este capítulo, se identificaron fagocitosis de células de levadura por hemocitos de *C. gibbosa*, de acuerdo a la fagocitosis de distintos agentes foráneos mediada por granulocitos descrita para otras especies de gasterópodos como *L. stagnalis*, *L. palustris*, *B. glabrata*, *Pila globosa*, *Indoplanorbis exustus*, *Trachea vittata* y *B. bengalensis* (Mahilini y Rajendran, 2008; Ray et al., 2013b; Russo y Lagadic, 2004, 2000; van der Knaap et al., 1993; van der Knaap y Loker, 1990).

Existen pocos antecedentes relacionados con los efectos inmunotóxicos de los plaguicidas en invertebrados y, en términos generales, los mecanismos específicos que relacionan las consecuencias neurotóxicas e inmunotóxicas merecen más atención, particularmente en gasterópodos. En este sentido, los insecticidas OF y carbamatos pueden interferir sobre el sistema inmune de manera indirecta al afectar la modulación del sistema nervioso (por su acción anticolinesterásica) o generar toxicidad crónica (Galloway y Handy, 2003). Adicionalmente, se ha descrito que los insecticidas OF y carbamatos pueden producir efectos inmunotóxicos de manera directa a través de la inhibición de hidrolasas de serina o esterases de componentes del sistema inmune, (Galloway y Handy, 2003; Rickwood y Galloway, 2004). Las hidrolasas de serina, por ejemplo, se encuentran en el sistema de

complemento de proteínas de algunas especies, asociadas a procesos fagocíticos (Galloway y Handy, 2003). Los OF y carbamatos también pueden afectar el sistema inmune de manera directa interfiriendo con la modulación de vías de señalización de funciones del sistema inmune o a través de daño oxidativo en órganos del sistema inmune (Galloway y Handy, 2003; Rickwood y Galloway, 2004). En vertebrados, se ha reportado daño oxidativo en tejido linfático y en células sanguíneas que podría afectar el desarrollo y la viabilidad de los linfocitos (Galloway y Handy, 2003). En este contexto, es importante recordar que Bianco et al. (2013) informaron que la exposición aguda a MAZ puede afectar las defensas antioxidantes de *C. gibbosa*. En otros invertebrados, como *B. straminea*, por ejemplo, Cossi et al. (2018) y Cossi (2019) concluyeron que los principales efectos tóxicos de MAZ, CAR y ACP estaban relacionados con la desestabilización de las defensas antioxidantes. Castro et al. (2017) estudiaron las respuestas del sistema inmune celular y de las defensas antioxidantes en la hemolinfa de *D. chilensis* y describieron como MAZ puede modular de manera importante ambas respuestas.

Además, se ha sugerido que los contaminantes orgánicos lipofílicos, tales como MAZ y CPF, probablemente afecten la fagocitosis a través de la disrupción de la membrana celular (Dyrynda et al., 1998). Russo et al. (2007) evaluaron el daño a membranas en caracoles de agua dulce expuestos a fomesafen y reportaron menor actividad fagocítica a menor estabilidad lisosomal. Estos autores sugieren que el herbicida alteró las membranas, haciéndolas menos receptivas a la estimulación externa que promueve la fagocitosis. En *M. galloprovincialis*, Dondero et al. (2010) reportaron que los neonicotinoides imidacloprid y tiacloprid disminuyen la estabilidad de la membrana lisosomal de tejido gonadal de manera concentración dependiente. Esto, junto con posibles cambios celulares morfológicos asociados, tales como redondeado (Huang et al., 2016), pérdida de adherencia (Kristoff, 2010), menores proyecciones citoplasmáticas y desintegración de membranas celulares/lisomales (Ray et al., 2013b), se ha asociado con los mecanismos de

inmunotoxicidad que podrían explicar la disminución de la viabilidad y de la actividad fagocítica en hemocitos por exposición a plaguicidas que se informó para distintas especies además de *C. gibbosa*. Es interesante mencionar que ACP también afectó de manera adversa la inmunidad humoral en ratas, que Mondal et al. (2009) relacionaron con otra evidencia que sugiere que los compuestos que tienen un anillo benceno pueden compartir un mecanismo de toxicidad común sobre los leucocitos de vertebrados y de este modo, afectar la fagocitosis (Benjamin, 1978). Todos los insecticidas evaluados en este capítulo sobre el sistema inmune de *C. gibbosa* MAZ, CPF, CAR y ACP, tienen un anillo benceno, lo que podría explicar que los efectos sobre la viabilidad y la actividad fagocítica de los hemocitos hayan sido equiparables entre los distintos insecticidas a pesar de las diferencias entre sus principales modos de acción.

Es de interés mencionar que, en el ensayo realizado para evaluar el efecto inmunotóxico de MAZ se observó una reducción menor de la viabilidad, pero estadísticamente significativa, en individuos expuestos a acetona 0,002 % con respecto a los individuos control. Este efecto fue mínimo comparado con el causado por MAZ. Es importante notar que la concentración de acetona usada en este ensayo (0,002 %) fue 5 veces más baja que la usada por (Castro et al., 2017), quienes no detectaron efecto de MAZ sobre la viabilidad de hemocitos de *D. chilensis*, e igual a la recomendada para puntos finales más sensibles por distintos organismos regulatorios internacionales (0,002 %; EPA, 2016b; OECD, 2000). Por lo tanto, si bien la concentración usada fue baja, se decidió evaluar exclusivamente el efecto de distintas concentraciones de acetona sobre las respuestas celulares en *C. gibbosa* antes de realizar otros ensayos. No se volvió a observar el efecto de acetona 0,002 % sobre la viabilidad de los hemocitos de *C. gibbosa*, y tampoco se detectaron efectos de esta concentración ni concentraciones menores de acetona sobre la viabilidad ni sobre el resto de las variables celulares. No obstante, el hecho de que se haya encontrado efecto de acetona en uno de los ensayos, sugiere que los biomarcadores del sistema inmune

de *C. gibbosa* podrían ser más sensibles a este solvente que los biomarcadores bioquímicos y que esto debería ser tomado en cuenta para futuros ensayos inmunotoxicológicos en esta especie.

En conjunto, los resultados de este capítulo sustentan la idea de considerar las variables inmunológicas de *C. gibbosa*, específicamente la viabilidad celular y la actividad fagocítica, como buenos biomarcadores sensibles, pero no específicos, a bajas concentraciones de MAZ, CPF, CAR y ACP en ambientes acuáticos. Resultaría interesante realizar más estudios con diferentes concentraciones de insecticidas, tiempos de exposición y otras variables del sistema inmune (por ejemplo, estabilidad de la membrana lisosomal, actividad de fosfatasa y estrés oxidativo) para entender mejor los mecanismos mediante los cuales los insecticidas afectan el sistema inmune *C. gibbosa* y las estrategias de esta especie ante estos efectos.¹⁷

¹⁷ Los resultados de este capítulo relacionados a MAZ se encuentran publicados en el manuscrito “Effects of azinphos-methyl on enzymatic activity and cellular immune response in the hemolymph of the freshwater snail *Chilina gibbosa*”. Lucila Thomsett Herbert*, Juan Manuel Castro*, Virginia Angélica Bianchi, Paula Fanny Cossi, Carlos Marcelo Luquet, Gisela Kristoff. Pesticide Biochemistry and Physiology. doi: 10.1016/j.pestbp.2018.07.005 *ambos autores contribuyeron de igual manera a este trabajo. También se mencionan en el capítulo “Aquatic ecotoxicology: native freshwater gastropods from Argentina” del libro Ecotoxicology in Latin America. Paula Cossi, Lucila Herbert, Beverly Boburg y Gisela Kristoff. C.V.M. Araújo y C. Shinn (Eds.), pp. 23–36. New York: Nova Science Publishers, Inc.

7 Discusión general

El incremento global en el uso de plaguicidas que sostiene el actual sistema agroindustrial de producción de alimentos, genera grandes controversias a nivel público y científico debido a sus efectos adversos sobre la salud humana y ambiental. A lo largo de los años se han adoptado distintas prácticas para reducir el uso de plaguicidas, como avances en los métodos de aplicación (Pórfido, 2013), Buenas Prácticas Agrícolas, manejo integrado de plagas (Cichón y Garrido, 2012) y se han sancionado normativas más estrictas relacionadas con el uso, la aplicación y los límites permisibles (Morrissey et al., 2015). Sin embargo, la presencia de plaguicidas en ambientes acuáticos en concentraciones que pueden afectar a especies no blanco continúa siendo una problemática de preocupación a nivel mundial (ONU, 2017). En la Unión Europea, recientemente se concluyó que el 87 % de los casos en los que la presencia de contaminantes orgánicos en ríos excedía los valores umbrales de riesgo para invertebrados acuáticos correspondían a plaguicidas (Morrissey et al., 2015).

En Argentina, numerosos trabajos han detectado la presencia de plaguicidas de una amplia variedad de modos de acción en las aguas superficiales y subterráneas del país (De Gerónimo et al., 2014; Jergentz et al., 2005; Loewy et al., 1999; Loewy et al., 2011; Pérez et al., 2017). En particular, en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, se han encontrado trazas de insecticidas OF como MAZ y CPF, y carbamatos como CAR en aguas subterráneas y superficiales, en concentraciones máximas de $79,30 \mu\text{g L}^{-1}$, $1,16 \mu\text{g L}^{-1}$ y $48 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Loewy et al., 2011). Resulta interesante destacar que estas concentraciones superan ampliamente las concentraciones de $0,02$, $0,006$ y $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$, establecidas como niveles guía nacionales para la protección de la biota acuática para dichos insecticidas

(Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005b, 2003, 2000a). Si bien en menor cantidad, en esta región también se utilizan insecticidas neonicotinoides como ACP, para el cual a nivel nacional todavía no se encuentran registros de concentraciones en el ambiente y no se han establecido valores guía para la protección de la vida acuática, pero que en otras partes del mundo se ha detectado en aguas superficiales en concentraciones de hasta $44,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Anderson et al., 2013).

Bianco et al. (2013) informaron que concentraciones de MAZ mucho más bajas que las encontradas en el ambiente pueden tener efectos tóxicos importantes sobre el gasterópodo nativo no blanco *Chilina gibbosa* ya que inhiben la actividad de ChE en homogenatos de tejido blando total y suscitan signos de neurotoxicidad conspicuos. Los resultados de esta tesis complementan los estudios realizados previamente con MAZ y muestran por primera vez cómo CPF, CAR y ACP también pueden causar diferentes efectos tóxicos sobre *C. gibbosa*, en algunos casos a concentraciones a las que podría encontrarse expuesto en su hábitat. Además de los efectos de MAZ sobre la actividad de ChE medida en homogenatos de tejido blando total reportados por Bianco et al. (2013), concentraciones de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de MAZ pueden inhibir prácticamente por completo la actividad de ChE medida en hemolinfa y aumentar la actividad de CE medida con p-NFB y la actividad de GST. En el caso de CAR, concentraciones como las documentadas por Loewy et al. (2011) podrían producir signos de neurotoxicidad en *C. gibbosa* e inhibir la actividad de ChE y CE p-NFB en homogenatos de tejido blando total. Además, todos los insecticidas evaluados en esta tesis, MAZ, CPF, CAR y ACP, podrían afectar la viabilidad celular, la actividad fagocítica y la proporción de tipos de hemocitos de la respuesta inmune celular de *C. gibbosa*, a las concentraciones registradas en el ambiente.

La evaluación de los biomarcadores bioquímicos en hemolinfa y la descripción y evaluación de biomarcadores de la respuesta inmune celular de *C. gibbosa* son aportes

novedosos de esta tesis. Los trabajos anteriores realizados con *C. gibbosa* se enfocaron principalmente en las respuestas bioquímicas medidas en homogenatos de tejido blando total y en los signos de neurotoxicidad. Al analizar las respuestas bioquímicas en hemolinfa, se encontró que pueden diferir de las medidas en homogenatos de tejido blando total (por ejemplo, en el caso de la actividad de CE medida con p-NFB como sustrato y en el caso de la actividad de GST). Este resultado permitió concluir que las CE y GST estarían involucradas en los mecanismos de detoxificación de OF como MAZ en *C. gibbosa*, contrariamente a lo concluido por Bianco et al. (2013), a partir de las actividades enzimáticas medidas en homogenatos de tejido blando total.

Por otro lado, estudiar el sistema inmune celular de *C. gibbosa* complementó los resultados de los biomarcadores enzimáticos. En el caso de MAZ y de CAR, se encontró que concentraciones ambientales de estos insecticidas además de producir signos de neurotoxicidad en *C. gibbosa* e inhibir la actividad de ChE (y CE sólo en el caso de CAR), también podrían afectar su sistema inmune. En el caso de CPF y ACP, podrían causar efectos inmunotóxicos sobre *C. gibbosa*, aún si la actividad de ChE, CE y GST no se viera afectada. En conjunto, estos resultados refuerzan la recomendación de distintos autores de realizar evaluaciones ecotoxicológicas basadas en una batería de biomarcadores. Por un lado, el estudio de otros biomarcadores directamente relacionados con el bienestar de los individuos y la supervivencia de las especies, en conjunto con los biomarcadores enzimáticos, es especialmente adecuado para obtener resultados con mayor relevancia ambiental (Amiard-Triquet et al., 2015). Por otro lado, los procesos tóxicos no ocurren aislados en un único nivel (bioquímico, celular o comportamental, por ejemplo), sino que son el resultado de la integración de los mecanismos que ocurren a un nivel y las consecuencias que tienen sobre otro, de manera retroalimentativa (Newman, 2014). Por lo tanto, la evaluación de distintos biomarcadores a diferentes niveles, como los signos de neurotoxicidad, las actividades

bioquímicas en homogenatos de tejido blando total y hemolinfa, y las respuestas celulares, estudiados en esta tesis, permite una evaluación ecotoxicológica más potente.

No obstante, es importante destacar que la extrapolación de los resultados obtenidos en un bioensayo a posibles escenarios naturales es limitada, ya que existen múltiples factores que pueden influir sobre los efectos que tienen los insecticidas y que no pueden ser controlados en el campo. De este modo, efectos que se ven en bioensayos de laboratorio a ciertas concentraciones (como los signos de neurotoxicidad de *C. gibbosa* generados por CAR) pueden no verse en la exposición a campo. De manera inversa, insecticidas como CPF o ACP que parecerían presentar menor toxicidad en el laboratorio, podrían tener otros efectos en la naturaleza, como efectos sobre el sistema reproductor. En esta tesis, se definieron como signos de neurotoxicidad en *C. gibbosa*, la falta de adherencia y la exposición conspicua de la cabeza-pie. Sin embargo, la neurotoxicidad podría manifestarse de otros modos que no fueron detectados o medidos con esta definición. En gasterópodos, Elias y Bernot (2017) utilizan la tasa de egestión y los movimientos y Mora et al. (2000) la velocidad de locomoción como medidas comportamentales.

Entre los factores que pueden influir sobre la toxicidad, la duración de la exposición es de gran importancia. Por ejemplo, una concentración de un compuesto que solamente tiene efectos subletales luego de un día, podría resultar en una mortalidad del 100 % al final de una semana (Sparling, 2016). En el ambiente, la exposición a insecticidas puede ocurrir de manera aguda por exposición periódica a pulsos de concentraciones altas al momento de la aplicación, o de manera prolongada por su permanencia en el ecosistema. En Estados Unidos, Giddings et al. (2014) describen que la exposición a CPF en aguas superficiales ocurre de manera episódica y las concentraciones altas duran menos de dos días. En el Alto Valle del Río Negro y Neuquén, los insecticidas se aplican cada 15 días principalmente mediante sopladores de niebla, contaminando las aguas superficiales con picos de concentraciones que

comienzan a declinar luego de algunas horas (LIBIQUIMA-CITAAC, 2016). Dentro del marco regulatorio, los bioensayos agudos han sido y continúan siendo los más utilizados para la evaluación de toxicidad acuática (Sparling, 2016). En este sentido, los niveles guía de protección acuática se derivan, en muchos casos, de información de efectos agudos sobre la biota y lo mismo ocurre con las evaluaciones de riesgo (LIBIQUIMA-CITAAC, 2016; Macchi et al., 2018; Morrissey et al., 2015; Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005a, 2000b). Dado que los insecticidas pueden permanecer en el ambiente durante largos períodos de tiempo, es innegable la importancia de evaluar los efectos de la exposición prolongada y, por ende, de los ensayos subcrónicos o crónicos. Por lo tanto, en trabajos futuros sería importante complementar los resultados encontrados en esta tesis con estudios sobre los efectos subcrónicos de MAZ, CPF, CAR y ACP sobre *C. gibbosa*.

Los macroinvertebrados acuáticos son considerados excelentes modelos para el estudio del impacto de las actividades humanas, ya que son ubicuos y diversos, pasan la mayor parte de su ciclo de vida dentro del agua y, en el caso de los bentónicos, su fidelidad con el sustrato y su reducida capacidad para migrar determinan que su riesgo de exposición a cambios o a sustancias tóxicas en el ambiente sea alto (Macchi et al., 2018). Además, el impacto sobre una especie en particular puede alterar la estructura de las comunidades de macroinvertebrados y, como consecuencia, la integridad de los cuerpos de agua. En ecotoxicología regulatoria, los trabajos sobre los efectos de contaminantes sobre invertebrados acuáticos se han enfocado principalmente en crustáceos, larvas de insectos, nematodos y anélidos (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003). En particular, algunas especies, como *D. magna*, están sobrerrepresentadas en los estudios de toxicidad, aun cuando diferentes autores han informado que pueden presentar menos sensibilidad que otras (Beketov et al., 2013; Beketov y Liess, 2008; Morrissey et al., 2015). Entre los macroinvertebrados bentónicos, los moluscos de agua dulce, particularmente los

gasterópodos, han sido poco estudiados como bioindicadores de efectos biológicos (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003). Por ejemplo, no se encuentran representados en las distribuciones de sensibilidad de especies utilizadas en las evaluaciones de riesgo de neonicotinoides (Prosser et al., 2016).

Chilina gibbosa reúne muchas de las principales características recomendadas para la selección de especies de prueba para bioensayos y para la selección de especies bioindicadoras (Amiard-Triquet et al., 2015; Morales, 2004). Tiene alta disponibilidad y abundancia (Bosnia et al., 1990) y es una especie representativa de su nivel trófico, especialmente en ecosistemas patagónicos (Bosnia et al., 1990; Di Prinzio et al., 2015; Macchi et al., 2018; Miserendino et al., 2008). Es netamente sedentaria, lo que asegura su exposición a los contaminantes presentes en el ambiente que se busque monitorear (Bosnia et al., 1990). Además, es una especie importante dentro de las cadenas tróficas de los ecosistemas patagónicos, por ser una fuente de alimento para diversas aves y peces, algunos de los cuales tienen valor comercial (Bosnia et al., 1990). Otros criterios generalmente considerados importantes son que la especie de prueba o bioindicadora tenga una amplia distribución, facilidad de identificación y biología y ecología conocidas (Amiard-Triquet et al., 2015; Morales, 2004). Si bien *C. gibbosa* es endémica, pertenece al género *Chilina* que tiene una amplia distribución en América del Sur y que incluye otras especies que también están cobrando relevancia en estudios ecotoxicológicos, como *Chilina parchappii* (Girones et al., 2018; Recabarren et al., 2018). Por lo tanto, *C. gibbosa* y otras especies del género podrían representar especies bioindicadoras nativas que se utilicen en conjunto con especies exóticas, o las reemplacen. Para utilizar estas especies nativas en bioensayos de laboratorio, es esencial la facilidad de cultivo y adaptabilidad a las condiciones de laboratorio (Morales, 2004). Los avances realizados en nuestro laboratorio sobre las condiciones de cría de *C. gibbosa* (Boburg, 2017) son prometedores para implementar cultivos de laboratorio. Esta

tesis contribuye al conocimiento sobre la biología y ecología de *C. gibbosa* previamente documentado en el trabajo de Bosnia et al. (1990), mediante la caracterización de las respuestas del sistema inmune celular.

Por último, en ecotoxicología comúnmente se busca que las especies de prueba o bioindicadoras presenten alta sensibilidad a los tóxicos y que se conozcan las relaciones concentración-respuesta (Amiard-Triquet et al., 2015; Morales, 2004). Los trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron la alta sensibilidad de *C. gibbosa* al insecticida MAZ (Bianco et al., 2013; Cossi et al., 2015). Esta tesis presenta las curvas concentración-respuesta de distintos biomarcadores enzimáticos de *C. gibbosa* correspondientes a exposiciones agudas a CPF, CAR y ACP. Además, demuestra que el sistema inmune de *C. gibbosa* es sensible a estos insecticidas y a MAZ. Finalmente, los resultados aportados por esta tesis podrían ser utilizados como insumos en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico, distribuciones de sensibilidad de especies o elaboraciones de niveles guía para la protección de la biota acuática que incorporen especies nativas y sustentan la hipótesis de considerar a *C. gibbosa* como potencial especie bioindicadora para estudios de monitoreo en Argentina.

8 Conclusiones generales

Los resultados de esta tesis muestran que insecticidas que comparten un mismo modo de acción, como los insecticidas anticolinesterásicos MAZ, CPF y CAR difieren en los efectos tóxicos que producen en *C. gibbosa*. Además, los resultados de todos los insecticidas evaluados, incluyendo ACP, muestran que los efectos tóxicos exceden los esperados por sus modos de acción.

La protrusión conspicua de la cabeza-pie de *C. gibbosa* como signo de neurotoxicidad es específico y sensible para los insecticidas anticolinesterásicos MAZ y CAR, pero no se observa luego de la exposición aguda a CPF ni a ACP. La falta de adherencia de *C. gibbosa* no sería un signo de neurotoxicidad inequívoco.

La actividad de ChE en homogenatos de tejido blando total de *C. gibbosa* es un biomarcador específico de exposición a insecticidas anticolinesterásicos en esta especie ya que se inhibe de manera concentración-dependiente por exposición a MAZ, CPF y CAR, pero no a ACP. La sensibilidad de la actividad de ChE en homogenatos de tejido blando total de *C. gibbosa* es mucho mayor a MAZ que a CAR y a CPF, y también es mucho mayor a CAR que a CPF. Es un biomarcador robusto, ya que la respuesta de ChE a MAZ es reproducible en homogenatos de tejido blando total y hemolinfa. Además, la actividad de ChE fue inhibida de manera aditiva por la exposición conjunta de *C. gibbosa* a CPF y CAR, por lo que este biomarcador puede ser utilizado para estudiar los efectos de mezclas binarias de insecticidas.

La actividad de CE medida con p-NFB en homogenatos de tejido blando total de *C. gibbosa* resultó ser un biomarcador sensible a CAR, pero no a CPF ni a ACP. También

resultó sensible a MAZ cuando se midió en hemolinfa. Además, fue inhibida por la exposición conjunta de *C. gibbosa* a CPF y CAR. La actividad de CE de *C. gibbosa* medida con p-NFA no es un biomarcador sensible ni en homogenatos de tejido blando total ni en hemolinfa.

La actividad de GST de *C. gibbosa* resultó ser un biomarcador sensible únicamente en hemolinfa. En homogenatos de tejido blando total no se vio afectada por CPF, CAR, ACP ni mezclas binarias de CPF y CAR y presentó mucha variabilidad.

Esta tesis presenta los primeros estudios sobre el sistema inmune de *C. gibbosa* e identifica la viabilidad, actividad fagocítica y proporción de tipos de hemocitos de *C. gibbosa* como biomarcadores sensibles a MAZ, CPF, CAR y ACP. Los resultados sugieren que MAZ, CPF, CAR y ACP pueden causar inmunotoxicidad en *C. gibbosa* a concentraciones a las que esta especie podría estar expuesta en su ambiente natural.

De los insecticidas evaluados, MAZ presentó la mayor toxicidad para *C. gibbosa*, seguido por CAR, CPF y, por último ACP. La exposición aguda a una concentración ambientalmente relevante de MAZ inhibió fuertemente la actividad de ChE, aumentó las actividades de CE p-NFB y GST en hemolinfa y disminuyó la viabilidad y actividad fagocítica de los hemocitos de *C. gibbosa*. La exposición aguda de *C. gibbosa* a CAR afectó la normal protrusión de la cabeza-pie, inhibió la actividad de ChE y CE p-NFB y disminuyó la viabilidad y actividad fagocítica de los hemocitos en la hemolinfa de *C. gibbosa* a bajas concentraciones. Las exposiciones agudas de *C. gibbosa* a concentraciones ambientalmente relevantes de CPF y ACP no afectaron los signos de neurotoxicidad, ni la actividad de ChE, CE p-NFB, CE p-NFA y GST en homogenatos de tejido blando total, pero sí alteraron la proporción de los tipos de hemocitos y disminuyeron la viabilidad y actividad fagocítica de los hemocitos.

Finalmente, se concluye que la viabilidad, actividad fagocítica y proporción celular de hemocitos de *C. gibbosa* y la actividad de ChE, CE p-NFB y GST en hemolinfa son biomarcadores sensibles a concentraciones ambientales de insecticidas que pueden utilizarse junto con los signos de neurotoxicidad y la actividad de ChE y CE en homogenatos de tejido blando total para obtener una evaluación integral de los efectos de la exposición a insecticidas utilizados en Argentina.

Para futuros trabajos con *C. gibbosa*, proponemos incorporar la evaluación de biomarcadores de estrés y daño oxidativo, indagar en los efectos subcrónicos de distintos plaguicidas y optimizar la medición de biomarcadores en hemolinfa. Estos estudios potenciarían el uso de *C. gibbosa* como especie de prueba en bioensayos de toxicidad y como bioindicadora en estudios de monitoreo ambiental.

Referencias bibliográficas

- Agrelo, M., Rivadeneira, P.R., Cossi, P.F., Cacciatore, L.C., Kristoff, G., 2019. Azinphosmethyl causes in *Planorbarius corneus* toxic effects on reproduction, offspring survival and B-esterases depending on the exposure time. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 217, 114-121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.12.002>
- Akaishi, F.M., St-Jean, S.D., Bishay, F., Clarke, J., da S Rabitto, I., de Oliveira Ribeiro, C.A., 2007. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquat. Toxicol.* 82, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.01.008>
- Aldridge, W.N., 1953. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.* 53, 110-117. <https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1560>
- Aliko, V., Hajdaraj, G., Caci, A., Faggio, C., 2015. Copper induced lysosomal membrane destabilisation in haemolymph cells of mediterranean green crab (*Carcinus aestuarii*, Nardo, 1847) from the Narta Lagoon (Albania). *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 58, 750-756. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132015050244>
- Alvarez, M., Du Mortier, C., Jaureguiberry, S., Venturino, A., 2019. Joint probabilistic analysis of risk for aquatic species and exceedence frequency for the agricultural use of chlorpyrifos in the Pampean region, Argentina. *Env. Toxicol Chem* 38, 1748-1755. <https://doi.org/10.1002/etc.4441>
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral disturbances: The missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 87-110. <https://doi.org/10.1080/10807030802615543>
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Mouneyrac, C., 2015. Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-15592-4>
- Anderson, T.A., Salice, C.J., Erickson, R.A., McMurry, S.T., Cox, S.B., Smith, L.M., 2013. Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. *Chemosphere* 92, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.054>
- Anguiano, O.L., Ferrari, A., Soleño, J., Martinez, 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. <https://doi.org/10.1897/07-655.1>
- Anguiano, O.L., Vacca, M., Rodriguez Araujo, M.E., Montagna, M., Venturino, A., Ferrari, A., 2017. Acute toxicity and esterase response to carbaryl exposure in two different

- populations of amphipods *Hyalella curvispina*. *Aquat. Toxicol.* 188, 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.04.013>
- Ansaldo, M., Nahabedian, D.E., Holmes-Brown, E., Agote, M., Asnay, 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.04.037>
- Antognelli, C., Francesca, B., Andrea, P., Roberta, F., Vincenzo, T., Elvio, G., 2006. Activity changes of glyoxalase system enzymes and glutathione-S-transferase in the bivalve mollusc *Scapharca inaequivalvis* exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 86, 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.01.007>
- Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguya, A., Baron, J., Moraga, D., Duchemin, M., 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotox Env. Safe* 63, 393-405. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.10.016>
- Barata, C., Solayan, A., Porte, C., 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 66, 125-39. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.07.004>
- Barker, G.M., 2001. The biology of terrestrial molluscs. <https://doi.org/10.1079/9780851993188.0000>
- Barron, M.G., Woodburn, K.B., 1995. Ecotoxicology of chlorpyrifos, en: Reviews of environmental contamination and toxicology. Springer, New York, NY, pp. 1-93.
- Basack, S., Oneto, M., Fuchs, J., Wood, E., Kesten, E., 1998. Esterases of *Corbicula fluminea* as Biomarkers of Exposure to Organophosphorus Pesticides. *Environ. Contam. Toxicol.* 61, 569-576. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/s001289900799>
- Basopo, N., Langton, T.M., Dumisani, M., Yogeshkumar, S.N., 2014. Pollutant mixtures as stressors of selected enzyme activities of the aquatic snail *Helisoma duryi*. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 6, 27-37. <https://doi.org/10.5897/jece2013.0319>
- Basopo, N., Naik, Y.S., 2016. Carbaryl and dimethoate induced alterations of the antioxidant defense system in two freshwater pulmonate snails *Helisoma dury* and *Lymnaea natalensis*. *Ann. Biol. Res.* 7, 1-8.
- Beketov, M.A., Kefford, B.J., Schäfer, R.B., Liess, M., 2013. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11039-11043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305618110>
- Beketov, M.A., Liess, M., 2008. Potential of 11 Pesticides to Initiate Downstream Drift of Stream Macroinvertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 247-253. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9104-3>
- Belanger, S., Barron, M., Craig, P., Dyer, S., Galay-Burgos, M., Hamer, M., Marshall, S., Posthuma, L., Raimondo, S., Whitehouse, P., 2017. Future needs and recommendations in the development of species sensitivity distributions: Estimating toxicity thresholds for

- aquatic ecological communities and assessing impacts of chemical exposures. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 13, 664-674. <https://doi.org/10.1002/ieam.1841>
- Belden, J.B., Gilliom, R.J., Lydy, M.J., 2009. How Well Can We Predict the Toxicity of Pesticide Mixtures to Aquatic Life? *Integr. Environ. Assess. Manag. An Int. J.* 3, 364-372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ieam.5630030307>
- Benjamin, M.M., 1978. Outline of Veterinary Clinical Pathology, 3era ed. The Iowa State University Press, Iowa USA.
- Bianchi, V.A., Castro, J.M., Rocchetta, I., Bieczynski, F., Luquet, C.M., 2014. Health status and bioremediation capacity of wild freshwater mussels (*Diplodon chilensis*) exposed to sewage water pollution in a glacial Patagonian lake. *Fish Shellfish Immunol.* 37, 268-277. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.02.013>
- Bianchi, V.A., Castro, J.M., Rocchetta, I., Nahabedian, D.E., Conforti, V., Luquet, C.M., 2015. Long-term feeding with *Euglena gracilis* cells modulates immune responses, oxidative balance and metabolic condition in *Diplodon chilensis* (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) exposed to living *Escherichia coli*. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 367-378. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.11.022>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.038>
- Bianco, K., Yusseppone, M.S., Otero, S., Luquet, C., Ríos de Molina, M. del 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. *Aquat. Toxicol.* 144-145, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.025>
- Board, P.G., Menon, D., 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 3267-3288. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.019>
- Boburg, B., 2017. *Chilina gibbosa* como especie centinela de la contaminación acuática por insecticidas utilizados en Argentina. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Bocquené, G., Galgani, F., 1998. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds, ICES Techniques in Marine Environmental Sciences. Copenhagen, Denmark.
- Bocquené, G., Roig, A., Fournier, D., 1997. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS Lett.* 407, 261-266. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00339-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00339-6)
- Bonacci, S., Corsi, I., Focardi, S., 2009. Cholinesterases in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*: Characterization and sensitivity to pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1481-1488. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.01.002>

- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Env. Sci Pollut Res* 22, 35-67. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00014100>
- Boudou, A., Ribeyre, F., 1997. Aquatic ecotoxicology: From the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environ. Health Perspect.* 105, 21-35. <https://doi.org/10.2307/3433395>
- Brace, R.C., 1983. Observations on the Morphology and Behaviour of *Chilina fluctuosa* Gray (Chilinidae), with a Discussion on the Early Evolution of Pulmonate Gastropods. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 300, 463-491. <https://doi.org/10.1098/rstb.1983.0017>
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., Büchler, R., 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 86, 40-47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.001>
- Brown, M., Davies, I.M., Moffat, C.F., Redshaw, J., Craft, J.A., 2004. Characterisation of choline esterases and their tissue and subcellular distribution in mussel (*Mytilus edulis*). *Mar. Environ. Res.* 57, 155-169. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(03\)00067-9](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(03)00067-9)
- Buikema, A.L., Niederlehner, B.R., Cairns, J., 1982. Biological monitoring part IV-Toxicity testing. *Water Res.* 16, 239-262. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(82\)90188-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(82)90188-9)
- Burgos-Aceves, M.A., Cohen, A., Smith, Y., Faggio, C., 2018. A potential microRNA regulation of immune-related genes in invertebrate haemocytes. *Sci. Total Environ.* 621, 302-307. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.285>
- Cacciatore, L.C., 2009. Investigación de procesos toxicocinéticos del pesticida metilazinfos en dos especies de invertebrados acuáticos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.069>
- Cacciatore, L.C., Nemirovsky, S., Guerrero, N.R.V., Cochón, A.C., 2015. Azinphos-methyl and chlorpyrifos, alone or in a binary mixture, produce oxidative stress and lipid peroxidation in the freshwater gastropod *Planorbarius corneus*. *Aquat. Toxicol.* 167, 12-19. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.009>
- Cacciatore, L.C., Verrengia Guerrero, N., Cochón, A.C., 2013. Cholinesterase and carboxylesterase inhibition in *Planorbarius corneus* exposed to binary mixtures of azinphos-methyl and chlorpyrifos. *Aquat. Toxicol.* 128-129, 124-34. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.005>

- Cacciatore, L.C., Verrengia Guerrero, N.R., Cochón, A.C., 2018. Toxicokinetic and toxicodynamic studies of carbaryl alone or in binary mixtures with azinphos methyl in the freshwater gastropod *Planorbarius corneus*. *Aquat. Toxicol.* 199, 276-284. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.04.005>
- Carlock, L.L., Chen, W.L., Gordon, E.B., Killeen, J.C., Manley, A., Meyer, L.S., Mullin, L.S., Pendino, K.J., Percy, A., Sargent, D.E., Seaman, L.R., Svanborg, N.K., Stanton, R.H., Tellone, C.I., Van Goethem, D.L., 1999. Regulating and assessing risks of cholinesterase-inhibiting pesticides: divergent approaches and interpretations. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part B Critical Rev.* 2, 105-160. <https://doi.org/10.1080/109374099281197>
- Carra, I., Sánchez Pérez, J.A., Malato, S., Autin, O., Jefferson, B., Jarvis, P., 2014. Performance of different advanced oxidation processes for tertiary wastewater treatment to remove the pesticide acetamiprid. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 72-81. <https://doi.org/10.1002/jctb.4577>
- Carvalho, S.M., Belzunces, L.P., Carvalho, G.A., Brunet, J.L., Badiou-Beneteau, A., 2013. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2117-2124. <https://doi.org/10.1002/etc.2288>
- CASAFE, 2016. Informe del Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes 2016.
- CASAFE, 2014. Estudio de Mercado 2014 de Productos de Protección de Cultivos. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes 2014.
- CASAFE, 2012. Informe del Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes 9.
- CASAFE, 2011. Guía de productos fitosanitarios 2011. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes.
- Casarett, Doull, 2001. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6th ed. Mc Graw-Hill Professional. <https://doi.org/10.1036/0071470514>
- 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). *Env. Monit Assess* 187, 645. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10661-015-4882-y>
- Castellanos, Z.A. de, Gaillard, M.C., 1981. Mollusca, Gasteropoda, Chiliniidae, en: R.A. Ringuelet (ed.) (Ed.), Fauna de agua dulce de la República Argentina. FECIC Fundación para la Educación la Ciencia y la Cultura, Buenos Aires, pp. 21-53.
- Castro, J.M., Bianchi, V.A., Pascual, M., Venturino, A., Luquet, C.M., 2017. Modulation of immune and antioxidant responses by azinphos-methyl in the freshwater mussel *Diplodon chilensis* challenged with *Escherichia coli*. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 1785-1794. <https://doi.org/10.1002/etc.3612>
- Cedergreen, N., 2014. Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. *PLoS One* 9, e96580.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>

- Cichón, L., Araque, L., Garrido, S., Lago, J., 2017a. Residuos y tolerancias de insecticidas para el control de plagas de frutales de pepita en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA.
- Cichón, L., Garrido, S., 2012. Implicancia de los cambios en el manejo sanitario de frutales de pepita en el Alto Valle. Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA.
- Cichón, L., Garrido, S., Lago, J., Ciccioli, J., López, M., Vasquez, P., Di Masi, S., 2017b. Guía De Productos Fitosanitarios Para Cultivos Hortícolas. Ediciones INTA, Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA.
- Cichón, L., Rossini, M., Garrido, S., 2013a. Guía para el diseño de programas fitosanitarios en perales - Temporada 2012-2013. Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA.
- Cichón, L., Rossini, M., Garrido, S., 2013b. Guía para el diseño de programas fitosanitarios en manzanos - Temporada 2012-2013. Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA.
- Comisión Europea, 2018. Decisión de Ejecución (UE) 2018/840 de la Comisión de 5 de junio de 2018, por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, Diario Oficial de la Unión Europea.
- Cossi, P.F., 2019. Efectos de la exposición subcrónica a concentraciones ambientales de contaminantes de relevancia en un gasterópodo nativo de agua dulce: *Biomphalaria straminea*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Cossi, P.F., Boburg, B., Luquet, C.M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.014>
- Cossi, P.F., Herbert, L.T., Boburg, B., Kristoff, G., 2017. Aquatic ecotoxicology: Native freshwater gastropods from Argentina, *Ecotoxicology in Latin America*.
- Cossi, P.F., Herbert, L.T., Yusseppone, M.S., Pérez, A.F., Kristoff, G., 2018. Environmental concentrations of azinphos-methyl cause different toxic effects without affecting the main target (cholinesterases) in the freshwater gastropod *Biomphalaria straminea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 162, 287-295. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.091>
- Costa, L.G., 2018. Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. *Toxicol. Sci.* 162, 24-35. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx266>
- Cresswell, J.E., 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology* 20, 149-157. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0566-0>

- Crossley, A.C.S., 1983. Haemolymph colloid control – The role of nephrocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 673-678. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(83\)90091-5](https://doi.org/10.1016/0145-305X(83)90091-5)
- Cuezzo, M.G., 2009. Mollusca: Gastropoda, en: Domínguez, E., Fernández, H.R. (Eds.), *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos. Sistemática y biología*. Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina, pp. 595-629.
- Curetti, M., 2017. Raleo químico en manzanos y perales. Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA.
- De Gerónimo, E., Aparicio, V.C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., Costa, J.L., 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere* 107, 423-431. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.039>
- De Guise, S., Maratea, J., Perkins, C., 2004. Malathion immunotoxicity in the American lobster (*Homarus americanus*) upon experimental exposure. *Aquat. Toxicol.* 66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.005>
- De Laender, F., Janssen, C.R., De Schamphelaere, K.A.C., 2009. Non-simultaneous ecotoxicity testing of single chemicals and their mixture results in erroneous conclusions about the joint action of the mixture. *Chemosphere* 76, 428-432. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.027>
- Deneer, J.W., 2000. Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest Manag. Sci.* 56, 516-520. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200006\)56:6<516::AID-PS163>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200006)56:6<516::AID-PS163>3.0.CO;2-0)
- Depledge, M.H., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools, en: Fossi, M.C., Leonzio, C. (Eds.), *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 261-285.
- Di Prinzio, C.Y., Omad, G., Miserendino, M.L., Casaux, R., 2015. Selective foraging by non-native rainbow trout on invertebrates in patagonian streams in argentina. *Zool. Stud.* 54. <https://doi.org/10.1186/s40555-015-0108-9>
- Domingues, I., Agra, A.R., Monaghan, K., Soares, A.M.V.M., Nogueira, A.J.A., 2010. Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 5-18. <https://doi.org/10.1002/etc.23>
- Dondero, F., Negri, A., Boatti, L., Marsano, F., Mignone, F., Viarengo, A., 2010. Transcriptomic and proteomic effects of a neonicotinoid insecticide mixture in the marine mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lam.). *Sci. Total Environ.* 408, 3775-3786. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.040>
- Donkin, P., Widdows, J., Evans, S. V, Staff, F.J., Yan, T., 1997. Effect of Neurotoxic Pesticides on the Feeding Rate of Marine Mussels (*Mytilus edulis*). *Pestic Sci* 49, 196-209. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199702\)49:2<196::AID-PS495>3.0.CO;2-C](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199702)49:2<196::AID-PS495>3.0.CO;2-C)
- Duncan, C.J., 1960. The Genital Systems of the Freshwater Basommatophora. *Proc. Zool. Soc. London* 135, 339-356. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1960.tb05851.x>

- Duncan, C.J., 1959. The evolution of the Pulmonate Genital System. *Dep. Zool. Univ. Liverpool* 601-609. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1960.tb05602.x>
- Dyrynda, E.A., Pipe, R.K., Burt, G.R., Ratcliffe, N.A., 1998. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. *Aquat. Toxicol.* 42, 169-185. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00095-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00095-7)
- Eason, C.T., Svendsen, C., O'Halloran, K., Weeks, J.M., 1999. An assessment of the lysosomal neutral red retention test and immune function assay in earthworms (*Eisenia andrei*) following exposure to chlorpyrifos, benzo-a-pyrene (BaP), and contaminated soil. *Pedobiologia (Jena)*. 43(6), 641-645.
- Eaton, D.L., Daroff, R.B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L.G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W.C., Lynn, N., Neubert, D., Schulte-Hermann, R., Spencer, P.S., 2008. Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 1-125. <https://doi.org/10.1080/10408440802272158>
- EFSA, 2016. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance acetamiprid, EFSA Journal. European Food Safety Authority. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5595>
- Elias, D., Bernot, M., 2017. Effects of Individual and Combined Pesticide Commercial Formulations Exposure to Egestion and Movement of Common Freshwater Snails, *Physa acuta* and *Helisoma anceps*. *Am. Midl. Nat.* 178, 97-111. <https://doi.org/10.1674/0003-0031-178.1.97>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Escartín, E., Porte, C., 1997. The use of Cholinesterase and Carboxylesterase Activities From *Mytilus Galloprovincialis* in Pollution Monitoring. *Environ. Toxicol.* 16, 2090-2095. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1997\)016<2090:TUOCAC>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1997)016<2090:TUOCAC>2.3.CO;2)
- FAO, 2019. FAOSTAT Pesticides Use Dataset [WWW Document]. *Organ. las Nac. Unidas para la Aliment. y la Agric. Organ. las Nac. Unidas*. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>
- FAO, 2003. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organización de las Naciones Unidas, Roma.
- Ferriz, R.A., 1994. Algunos aspectos de la dieta de cuatro especies ícticas del río Limay (Argentina). *Rev. Ictiol.* 2/3, 1-7.
- Finney, D.J., 1947. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge university press, Cambridge, 1952.
- Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Brousseau, P., 2000. Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics. *Am. Zool.* 40, 412-420. <https://doi.org/10.1668/0003->

1569(2000)040[0412:PAABOI]2.0.CO;2

- Freitas, E., Rocha, O., 2011. Acute and chronic toxicity of chromium and cadmium to the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa* and the implications for ecotoxicological studies. *Env. Toxicol* 29, 176-186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/tox.20784>
- Fuentealba, C., Figueroa, R., Morrone, J.J., 2010. Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 83, 289-298. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2010000200009>
- 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) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). *Chemosphere* 71, 553-560. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.09.048>
- Gagneten, A.M., Tumini, G., 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.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. A Multibiomarker Approach to Environmental Assessment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1723-1731. <https://doi.org/10.1021/es030570+>
- Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance. *Ecotoxicology* 10, 5-23. <https://doi.org/10.1023/A:1008939520263>
- Galloway, T.S., Handy, R., 2003. Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides. *Ecotoxicology* 12, 345-363. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00051-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00051-6)
- Galloway, T.S., Millward, N., Browne, M. a, Depledge, M.H., 2002. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc. *Aquat. Toxicol.* 61, 169-180.
- Giddings, J.M., Williams, W.M., Solomon, K.R., Giesy, J.P., 2014. Risks to Aquatic Organisms from Use of Chlorpyrifos in the United States. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 231. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0_5
- Girones, L., Oliva, A.L., Carbone, M.E., López, G., Marcovecchio, J.E., Arias, A.H., 2018. Distribución de pesticidas organoclorados en caracoles dulceacuícolas en una cuenca del suroeste bonaerense y su relación con el uso del suelo, en: VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC ARG, Capítulo Argentina). San Luis.
- Green, J.W., Springer, T.A., Holbech, H., 2018. Statistical Analysis of Ecotoxicity Studies, First. ed. John Wiley & Sons.
- Gupta, R., 2014. Biomarkers in Toxicology. Elsevier Inc. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00023-3>

- Gupta, R.C., 2006. Classification and uses of organophosphates and carbamates, en: Gupta, R.C. (Ed.), *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Elsevier Academic Press, Cambridge, EEUU, pp. 5-24.
- Gutiérrez Gregoric, D.E., 2010. Redescription of two endemic species of Chiliniidae (Gastropoda: Hygrophila) from Del Plata basin (South America). *J. Conchol.* 40, 321-332.
- Gutiérrez Gregoric, D.E., Núñez, V., Rumi, A., 2010. Population Studies of an Endemic Gastropod from Waterfall Environments Population studies of an endemic gastropod from waterfall environments. *Am. Malacol. Bull.* 28, 159-165. <https://doi.org/https://doi.org/10.4003/006.028.0210>
- Gutiérrez Gregoric, D.E., Plata, L., Plata, L., 2015. Population Dynamics of Freshwater Gastropod *Chilina fluminea* (Chiliniidae) in a Temperate Climate Environment in Argentina. *The Veliger* 51, 109-116.
- Gutiérrez Gregoric, D.E., Rumi, A., 2008. *Chilina iguazuensis* (Gastropoda: Chiliniidae), New Species From Iguazú National Park, Argentina. *Malacologia* 50, 321-330. <https://doi.org/10.4002/0076-2997-50.1-2.321>
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Haeckel, W., 1911. Beiträge zur Anatomie der Gattung Chilina. *Zool. Jahrbücher* 13, 89-136.
- Harris, C.A., Scott, A.P., Johnson, A.C., Panter, G.H., Sheahan, D., Roberts, M., Sumpter, J.P., 2014. Principles of sound ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3100-3111. <https://doi.org/10.1021/es4047507>
- Harry, H.W., 1964. The anatomy of *Chilina fluctuosa* Gray reexamined, with prolegomena on the phylogeny of the higher limnic Basommatophora (Gastropoda: Pulmonata). *Malacologia* 1, 355-385.
- Herbert, L.T., Leggieri, L.R., De Anna, J.S., Luquet, C.M., Kristoff, G., 2015. Induction of carboxylesterase activity in *Chilina gibbosa* after a short term exposure to river water polluted by a natural petroleum spill, en: SETAC Latin America 11th Biennial Meeting. Buenos Aires, Argentina.
- Hernández, A.F., Gil, F., Lacasaña, M., 2017. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Arch. Toxicol.* 91, 3211-3223. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2043-5>
- Huang, Q., Zhang, L., Yang, C., Yun, X., He, Y., 2016. The competence of hemocyte immunity in the armyworm *Mythimna separata* larvae to sublethal hexaflumuron exposure. *Pestic. Biochem. Physiol.* 130, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.12.003>
- Husmann, G., Philipp, E., Rosenstiel, P., Vazquez, S., Abele, D., 2011. Immune response of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* to physical stress and microbial exposure. *J Exp Mar Biol Ecol* 398, 83-90. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.12.013>

- IRAC, 2019. IRAC Mode of Action Classification Scheme, Versión 9. ed. Insecticide Resistance Action Committee.
- Ishaaya, I., 2001. Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance. Springer, Springer Science & Business Media. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-59549-3>
- Ituarte, C., 1997. *Chilina megastoma* Hylton Scott, 1958 (Pulmonata: Basommatophora): a study on topotypic specimens. *Am. Malacol. Bull.* 14, 9-15.
- Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C., Schulz, R., 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61, 817-826. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.04.036>
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A., 2011. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897-2908. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf101303g>
- Jokanović, M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166, 139-160. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2)
- Jokanović, M., Kosanović, M., 2010. Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29, 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.01.006>
- Kao, L.R., Motoyama, N., Dauterman, W.C., 1985. Multiple forms in mouse, rat, and rabbit liver, and their role in hydrolysis of organophosphorus and pyrethroid insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 23, 66-73. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0048-3575\(85\)90079-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0048-3575(85)90079-3)
- Kohl, K.L., 2015. Neonicotinoid Insecticides: Agricultural Use, Runoff and Invertebrate Toxicity. Texas Tech University.
- Kristoff, G., 2010. Estudio comparativo de biomarcadores en los invertebrados acuáticos *Biomphalaria glabrata* y *Lumbriculus variegatus* expuestos a pesticidas de relevancia ambiental. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Kristoff, G., Barrionuevo, D.C., 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.016>
- Kristoff, G., Cacciatore, L.C., Verrengia Guerrero, N.R., Cochón, A.C., 2011. Effects of the organophosphate insecticide azinphos-methyl on the reproduction and cholinesterase activity of *Biomphalaria glabrata*. *Chemosphere* 84, 585-591. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.058>
- 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. *Aquat. Toxicol.* 96, 115-123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.10.001>

- Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N., de D'Angelo, A.M.P., Cochón, A.C., 2006. Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Toxicology* 222, 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.02.018>
- Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N.R., Cochón, A.C., 2008. Effects of azinphos-methyl exposure on enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Chemosphere* 72, 1333-1339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.026>
- Krull, M., Barros, F., 2010. Key Issues in Aquatic Ecotoxicology in Brazil: A Critical Review. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* v 7027, 57-66. <https://doi.org/10.5132/jbse.2012.02.009>
- Kuchel, R.P., Raftos, D.A., Birch, D., Vella, N., 2010. Haemocyte morphology and function in the Akoya Pearl Oyster, *Pinctada imbricata*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 36-48. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.04.011>
- Laetz, C.A., Baldwin, D.H., Collier, T.K., Hebert, V., Stark, J.D., Scholz, N.L., 2009. The Synergistic Toxicity of Pesticide Mixtures: Implications for Risk Assessment and the Conservation of Endangered Pacific Salmon. *Environ. Health Perspect.* 117, 348-353. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800096>
- Laetz, C.A., Baldwin, D.H., Hebert, V., Stark, J.D., Scholz, N.L., 2013. Interactive Neurobehavioral Toxicity of Diazinon, Malathion, and Ethoprop to Juvenile Coho Salmon. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2925-2931. <https://doi.org/doi:10.1021/es305058y>
- Lagadic, L., Caquet, T., Ramade, F., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3, 193-208. <https://doi.org/10.1007/BF00117084>
- Laguerre, C., Sanchez-Hernandez, J.C., Köhler, H.R., Triebkorn, R., Capowiez, Y., Rault, M., Mazzia, C., 2009. B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: an enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure. *Environ. Pollut.* 157, 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.07.003>
- Ley Nacional 22.351, 1980. Parques Nacionales, Monumentos Naturales y Reservas Nacionales.
- Ley Provincial 2.345, 2000. Creación del área natural protegida Boca del Chimehuin. Legislatura de la Provincia del Neuquén.
- Ley Provincial 2.594, 2008. Sistema provincial de áreas naturales protegidas. Legislatura de la Provincia del Neuquén.
- LIBIQUIMA-CITAAC, 2016. Situación ambiental por agroquímicos e hidrocarburos en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas y Químicas del Medio Ambiente (LIBIQUIMA)-Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue (CITAAC), Universidad Nacional del Comahue - CONICET.
- Loewy, R.M., Kirs, V., Carvajal, G., Venturino, A., Pechen De D'Angelo, A.M., 1999.

- Groundwater contamination by azinphos methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina). *Sci. Total Environ.* 225, 211-218. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00365-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00365-9)
- Loewy, R.M., Monza, L.B., Kirs, V.E., Savini, M.C., 2011. Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *J. Environ. Sci. Health. B.* 46, 662-670. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.592051>
- Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M., Kepler, T.B., 2004. Invertebrate immune systems - Not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol. Rev.* 198, 10-24. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x>
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis Farr, A., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Macchi, P., Loewy, R.M., Lares, B., Latini, L., Monza, L., Guñazú, N., Montagna, C.M., 2018. The impact of pesticides on the macroinvertebrate community in the water channels of the Río Negro and Neuquén Valley, North Patagonia (Argentina). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1330-x>
- Magdeburg, A., Stalter, D., Oehlmann, J., 2012. Whole effluent toxicity assessment at a wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation using aquatic key species. *Chemosphere* 88, 1008-1014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.017>
- Mahilini, H.M., Rajendran, A., 2008. Categorization of hemocytes of three gastropod species *Trachea vittata* (Muller), *Pila globosa* (Swainson) and *Indoplanorbis exustus* (Dehays). *J. Invertebr. Pathol.* 97, 20-26. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.007>
- Marigómez, I., Zorita, I., Izaguirre, U., Ortiz-Zarragoitia, M., Navarro, P., Etxebarria, N., Orbea, A., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2013. Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. *Aquat. Toxicol.* 136-137, 32-48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.008>
- Marigómez, J.A., Cajaraville, M.P., Angulo, E., 1990. Cellular cadmium distribution in the common winkle, *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochemistry* 94, 191-199. <https://doi.org/doi:10.1007/BF02440187>
- Mason, R., Tennekes, H., Sánchez-Bayo, F., Jepsen, P.U., 2013. Immune Suppression by Neonicotinoid Insecticides at the Root of Global Wildlife Declines. *J. Environ. Immunol. Toxicol.* 1, 3-12.
- Matos, P., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Carrola, J., Rocha, E., 2007. Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pestic. Biochem. Physiol.* 89, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.03.002>
- Matricón-Gondran, M., Letocart, M., 1999. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata* I. Characterization of Hemocytes and Fixed Phagocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 74, 248-254. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4878>

- McAbee, R.D., Kang, K.D., Stanich, M.A., Christiansen, J.A., Wheelock, C.E., Inman, A.D., Hammock, B.D., Cornel, A.J., 2004. Pyrethroid tolerance in *Culex pipiens pipiens* var *molestus* from Marin County, California. *Pest Manag. Sci.* 60, 359-368. <https://doi.org/10.1002/ps.799>
- Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux De Vendômois, J., Séralini, G.E., 2014. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *Biomed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/179691>
- Miserendino, M.L., Brand, C., Di Prinzio, C.Y., 2008. Assessing urban impacts on water quality, benthic communities and fish in streams of the Andes mountains, Patagonia (Argentina). *Water. Air. Soil Pollut.* 194, 91-110. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9701-4>
- Moncaleano-Niño, A.M., Luna-Acosta, A., Gómez-Cubillos, M.C., Villamil, L., Ahrens, M.J., 2018. Cholinesterase activity in the cup oyster *Saccostrea* sp. exposed to chlorpyrifos, imidacloprid, cadmium and copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 151, 242-254. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.057>
- Mondal, S., Ghosh, R.C., Mate, M.S., Karmakar, D.B., 2009. Effects of Acetamiprid on Immune System in Female Wistar Rats. *Proc zool Soc* 62, 109-117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12595-009-0012-6>
- Moore, M.N., Viarengo, A., Donkin, P., Hawkins, A.J.S., 2007. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquat. Toxicol.* 84, 80-97. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.06.007>
- Mora, B.R., Martínez-Tabche, L., Sánchez-Hidalgo, E., Hernández, G.C., Ruiz, M.C.G., Murrieta, F.F., 2000. Relationship between toxicokinetics of carbaryl and effect on acetylcholinesterase activity in *Pomacea patula* snail. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 234-239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1911>
- Mora, P., Michel, X., Narbonne, J.F., 1999. Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 7, 253-260. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(99\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(99)00019-8)
- Morales, G.C., 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Idrc.
- Moreno Grau, M.D., 2003. Toxicología ambiental. Evaluación de riesgos para la salud humana. Mc Graw-Hill Professional.
- Morrissey, C.A., Mineau, P., Devries, J.H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., Liber, K., 2015. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environ. Int.* 74, 291-303. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.024>
- Moses, M., Johnson, E.S., Anger, W.K., Burse, V.W., Horstman, S.W., Jackson, R.J., Lewis, R.G., Maddy, K.T., McConnell, R., Meggs, W.J., Zahm, S.H., 1993. Environmental equity and pesticide exposure. *Toxicol. Ind. Health* 9, 913-959.
- Motulsky, H., Christopoulos, A., 2003. Fitting models to biological data using linear and

- nonlinear regression . A practical guide to curve fitting. *Fitting Model. to Biol. data using linear nonlinear Regres. . A Pract. Guid. to curve fitting* 1-351. <https://doi.org/10.1002/pst.167>
- Newman, M.C., 2014. *Fundamentals of Ecotoxicology. The Science of Pollution*, Fourth. ed. CRC Press.
- Newman, M.C., 2013. *Quantitative Ecotoxicology*, Second. ed. CRC Press.
- Newman, M.C., Clements, W.H., 2007. *Ecotoxicology - A Comprehensive Treatment*. CRC Press.
- Núñez, V., Gregoric, D.E.G., Rumi, A., 2010. Freshwater Gastropod Provinces from Argentina. *Malacologia* 53, 47-60. <https://doi.org/https://doi.org/10.4002/040.053.0103>
- Ochoa, V., Riva, C., Faria, M., Barata, C., 2013. Responses of B-esterase enzymes in oysters (*Crassostrea gigas*) transplanted to pesticide contaminated bays from the Ebro Delta (NE, Spain). *Mar. Pollut. Bull.* 66, 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.09.032>
- OECD, 2016a. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 242: *Potamopyrgus antipodarum* Reproduction Test. Organisation for Economic Cooperation and Development. <https://doi.org/10.1787/9789264264311-en>
- OECD, 2016b. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test. Organisation for Economic Cooperation and Development 1-31. <https://doi.org/10.1787/9789264264335-en>
- OECD, 2011. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 235: *Chironomus sp.*, Acute Immobilisation Test. Organisation for Economic Cooperation and Development 1-4. <https://doi.org/10.1787/9789264067394-eng>
- OECD, 2010. OECD Series on Testing and Assessment No. 121. Detailed Review Paper (DRP) on Molluscs Life-Cycle Toxicity Testing. Organisation for Economic Cooperation and Development. [https://doi.org/ENV/JM/MONO\(2007\)10](https://doi.org/ENV/JM/MONO(2007)10)
- OECD, 2008. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. Organisation for Economic Cooperation and Development. <https://doi.org/10.1787/9789264070127-en>
- OECD, 2007. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Test No. 225: Sediment-Water *Lumbriculus* Toxicity Test Using Spiked Sediment. Organisation for Economic Cooperation and Development 1-31.
- OECD, 2000. OECD Series on Testing and Assessment No. 23 (second edition): Guidance Document on Aqueous-Phase Aquatic Toxicity Testing of Difficult Test Chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development 23, 1-81. [https://doi.org/ENV/JM/MONO\(2000\)6/REV1](https://doi.org/ENV/JM/MONO(2000)6/REV1)
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., 2003. Bioindicators & Biomonitoring - Principles, Concepts and Applications. *Trace Met. other Contam. Environ.* 6, 577-635. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80147-9](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80147-9)

- 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, 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.06.014>
- Oneto, M., Basack, S., Casabe, N., Fuchs, J., Kesten, E., 2005. Biological responses in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* and the earthworm *Eisenia fetida* exposed to fenitrothion. *Fresenius Env. Bull* 14, 716–720.
- ONU, 2017. Organización de las Naciones Unidas, Consejo de Derechos Humanos. Informe de la Relatora Especial sobre el derecho a la alimentación. 24 de enero. A/HRC/34/48.
- Otero, S., Kristoff, G., 2016. *In vitro* and *in vivo* studies of cholinesterases and carboxylesterases in *Planorbarius corneus* exposed to a phosphorodithioate insecticide: Finding the most sensitive combination of enzymes, substrates, tissues and recovery capacity. *Aquat. Toxicol.* 180, 186-195. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.002>
- Otieno, P.O., Schramm, K.-W., Pfister, G., Lalah, J.O., Ojwach, S.O., Virani, M., 2012. Spatial distribution and temporal trend in concentration of carbofuran, diazinon and chlorpyrifos ethyl residues in sediment and water in Lake Naivasha, Kenya. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 526-532. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00128-012-0529-7>
- Ovando, X.M.C., Gutiérrez Gregoric, D.E., 2012. Systematic Revision of Chilina Gray (Gastropoda: Pulmonata) from Northwestern Argentina and Description of a New Species. *Malacologia* 55, 117-134. <https://doi.org/https://doi.org/10.4002/040.055.0108>
- Pagano, M., Porcino, C., Briglia, M., Fiorino, E., Vazzana, M., Silvestro, S., Faggio, C., 2017. The Influence of Exposure of Cadmium Chloride and Zinc Chloride on Haemolymph and Digestive Gland Cells from *Mytilus galloprovincialis*. *Int. J. Environ. Res.* 11, 207-216. <https://doi.org/10.1007/s41742-017-0020-8>
- Pérez, D.J., Okada, E., De Gerónimo, E., Menone, M.L., Aparicio, V.C., Costa, J.L., 2017. Spatial and Temporal Trends and Flow Dynamics of Glyphosate and Other Pesticides Within an Agricultural Watershed in Argentina. *Environ. Toxicol. Chem.* <https://doi.org/10.1002/etc.3897>
- Pilsbry, H.A., 1911. Non-Marine Mollusca of Patagonia. The University.
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van der Sluijs, J.P., Van Dyck, H., Wiemers, M., 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Env. Sci Pollut Res* 22, 68-102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>
- Pope, C., Karanth, S., Liu, J., 2005. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: Uses and misuses of a common mechanism of action. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 433-446. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.12.048>
- Pope, C.N., 1999. Organophosphorus pesticides: Do they all have the same mechanism of toxicity? *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part B Crit. Rev.* 2, 161-181. <https://doi.org/10.1080/109374099281205>

- Pórfido, O.D., 2013. Los Plaguicidas en la República Argentina. Departamento de Salud Ambiental, Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación. Ministerio de Salud de la Nación, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Potter, P.M., Wadkins, R.M., 2006. Carboxylesterases: Detoxifying Enzymes and Targets for Drug Therapy. *Curr. Med. Chem.* 13, 1045-1054. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/092986706776360969>
- Pretty, J., Bharucha, Z.P., 2015. Integrated pest management for sustainable intensification of agriculture in Asia and Africa. *Insects* 6, 152-182. <https://doi.org/10.3390/insects6010152>
- Prosser, R.S., de Solla, S.R., Holman, E.A.M., Osborne, R., Robinson, S.A., Bartlett, A.J., Maisonneuve, F.J., Gillis, P.L., 2016. Sensitivity of the early-life stages of freshwater mollusks to neonicotinoid and butenolide insecticides. *Environ. Pollut.* 218, 428-435. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.022>
- PubChem, 2019a. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Azinphos-methyl, CID=2268, [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Azinphos-methyl> (accedido 11.10.19).
- PubChem, 2019b. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Chlorpyrifos, CID=2730, [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorpyrifos> (accedido 11.17.19).
- PubChem, 2019c. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Carbaryl, CID=6129, [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbaryl> (accedido 11.18.19).
- PubChem, 2019d. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Acetamiprid, CID=213021, [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetamiprid> (accedido 11.18.19).
- Raby, M., Nowierski, M., Perlov, D., Zhao, X., Hao, C., Poirier, D.G., Sibley, P.K., 2018. Acute Toxicity of Six Neonicotinoid Insecticides to Freshwater Invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 1430-1445. <https://doi.org/10.1002/etc.4088>
- Radwan, M.A., Mohamed, M.S., 2013. Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.019>
- Randall, C., Hock, W., Crow, E., Hudak-Wise, C., Kasai, J., 2008. National Pesticide Applicator Certification Core Manual. National Association of State Departments of Agriculture Research Foundation. Washington, DC.
- Ratcliffe, N.A., 1985. Invertebrate immunity — A primer for the non-specialist. *Immunol. Lett.* 10, 253-270. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(85\)90100-2](https://doi.org/10.1016/0165-2478(85)90100-2)
- Ray, M., Bhunia, A.S., Bhunia, N.S., Ray, S., 2013a. Density shift, morphological damage, lysosomal fragility and apoptosis of hemocytes of Indian molluscs exposed to pyrethroid pesticides. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 499-512. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.008>

- Ray, M., Bhunia, N.S., Bhunia, A.S., Ray, S., 2013b. A comparative analyses of morphological variations, phagocytosis and generation of cytotoxic agents in flow cytometrically isolated hemocytes of Indian molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 244-253. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.006>
- Recabarren, T., Ronda, A., Arias, A., 2018. Relación entre el estrés oxidativo y parámetros biológicos en *Chilina parchapii* del arroyo Napostá Grande, en: VII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC ARG, Capítulo Argentino). San Luis.
- Renault, T., 2015. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.011>
- Richardson, R.J., 1995. Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: A critical review of the literature. *J. Toxicol. Environ. Heal. Curr. Issues* 44, 135-165. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/15287399509531952>
- Rickwood, C.J., Galloway, T.S., 2004. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect. A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquat. Toxicol.* 67, 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.11.004>
- Rittschof, D., McClellan-Green, P., 2005. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 369-373. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.008>
- Ritz, C., 2010. Toward a unified approach to dose-response modeling in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 220-229. <https://doi.org/10.1002/etc.7>
- Rivadeneira, P., 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.013>
- Rodney, S.I., Teed, R.S., Moore, D.R.J., 2013. Estimating the Toxicity of Pesticide Mixtures to Aquatic Organisms: A Review. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 19, 1557-1575. <https://doi.org/10.1080/10807039.2012.723180>
- Rowley, A.F., Rhodes, C.P., Ratcliffe, N.A., 1984. Protochordate leucocytes: a review. *Zool. J. Linn. Soc.* 80, 283-295. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1984.tb01978.x>
- Rozman, K.K., Doull, J., Hayes, W.J., 2010. Dose and Time Determining, and Other Factors Influencing Toxicity. *Hayes' Handb. Pestic. Toxicol.* 3-101. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00001-X>
- Rubach, M.N., Ashauer, R., Maund, S.J., Baird, D.J., Van den Brink, P.J., 2010. Toxicokinetic variation in 15 freshwater arthropod species exposed to the insecticide chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2225-2234. <https://doi.org/10.1002/etc.273>
- Rubach, M.N., Crum, S.J.H., Van den Brink, P.J., 2011. Variability in the Dynamics of Mortality and Immobility Responses of Freshwater Arthropods Exposed to Chlorpyrifos.

- Arch Env. Contam Toxicol* 60, 708-721. [https://doi.org/DOI 10.1007/s00244-010-9582-6](https://doi.org/DOI%2010.1007/s00244-010-9582-6)
- Rumi, A., Gregoric, D.E.G., Núñez, V., César, I.I., Roche, A.M., Tassara, M.P., Martín, S.M., Armengol, M.F.L., 2006. Freshwater Gastropoda from Argentina: Species Richness, Distribution Patterns, and an Evaluation of Endangered Species. *Malacologia* 49, 189-208. <https://doi.org/https://doi.org/10.4002/1543-8120-49.1.189>
- Rumi, A., Gregoric, D.E.G., Núñez, V., Darrigran, G.A., 2008. Malacología Latinoamericana. Moluscos de agua dulce de Argentina. *Rev Biol Trop* 56, 77-111. <https://doi.org/https://doi.org/10.15517/rbt.v56i1.5510>
- Russo, J., Lagadic, L., 2004. Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ. Pollut.* 127, 303-311. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00269-0](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00269-0)
- Russo, J., Lagadic, L., 2000. Effects of parasitism and pesticide exposure on characteristics and functions of hemocyte populations in the freshwater snail *Lymnaea palustris* (Gastropoda, Pulmonata). *Cell Biol. Toxicol.* 16, 15-30. <https://doi.org/10.1023/A:1007640519746>
- Russo, J., Lefeuvre-Orfila, L., Lagadic, L., 2007. Hemocyte-specific responses to the peroxidizing herbicide fomesafen in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environ. Pollut.* 146, 420-427. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.06.032>
- Sahay, N., Agarwal, R.A., 1997. MGK-264-pyrethroid synergism against *Lymnaea acuminata*. *Chemosphere* 35, 1011-1021. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00084-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00084-2)
- Sanchez-Hernandez, J., 2007. Ecotoxicological perspectives of b-esterases in the assessment of pesticide contamination., en: Plattenberg, R.H. (Ed.), Environmental Pollution: New Research. Nova Science Publishers, Inc., pp. 1-45.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Wheelock, C.E., 2009. Tissue distribution, isozyme abundance and sensitivity to chlorpyrifos-oxon of carboxylesterases in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environ. Pollut.* 157, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.06.041>
- Sánchez, V.G., Gutiérrez, C.A., Gomez, D.S., Loewy, M., Guiñazú, N., 2016. Residuos de plaguicidas organofosforados y carbamatos en aguas subterráneas de bebida en las zonas rurales de Plottier y Senillosa, Patagonia Norte, Argentina. *Acta Toxicol. Argent.* 24, 48-57.
- Santos, S., Bond-Buckup, G., Gonçalves, A.S., Bartholomei-Santos, M.L., Buckup, L., Jara, C.G., 2017. Diversity and conservation status of *Aegla* spp. (Anomura, Aeglidae): an update. *Nauplius* 25. <https://doi.org/10.1590/2358-2936e2017011>
- Satoh, T., Gupta, R.C., 2010. Anticholinesterase Pesticides. John Wiley & Sons, New Jersey.
- SENSA, 2016. Resolución 149/2016 Sustancias activas Metil Azinfos y Metamidofos y sus productos formulados. Prohibición. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Argentina.

- Shayeghi, M., Shahtaheri, S., Selsele, M., 2001. Phosphorous Insecticides Residues in Mazandaran River Waters, Iran (2000). *Iran. J. Publ. Heal.* 30, 115-118.
- Shimizu, I., Espinós, A.C., Roa, R., Mendoza, J.L., Sakai, M., 1999. Informe Técnico. Carga de nutrientes de criaderos de peces y el ambiente biológico en el río Chimehuín. Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN), Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA), Junín de los Andes.
- Simic, T., Savic-Radojevi, A., Pljesa-Ercegovac, M., Matic, M., Mimic-Oka, J., 2009. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nat Rev Urol* 6, 281-289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrurol.2009.49>
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.-M., Chagnon, M., Downs, C.A., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L.W., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Env. Sci Pollut Res* 22, 5-34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>
- Singh, B., 2014. Review on microbial carboxylesterase: general properties and role in organophosphate pesticides degradation. *Biochem Mol Biol* 2, 1-6.
- Solé, M., Bonsignore, M., Rivera-Ingraham, G., Freitas, R., 2018. Exploring alternative biomarkers of pesticide pollution in clams. *Mar. Pollut. Bull.* 136, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.08.062>
- Solé, M., Sanchez-Hernandez, J.C., 2018. Elucidating the importance of mussel carboxylesterase activity as exposure biomarker of environmental contaminants of current concern: An *in vitro* study. *Ecol. Indic.* 85, 432-439. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.10.046>
- Sowerby, G.B., 1841. The Conchological Illustrations.
- Sparling, D.W., 2016. An Introduction to Ecotoxicology. *Ecotoxicol. Essentials* 3-20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801947-4.00001-9>
- Steevens, J.A., Benson, W.H., 1999. Toxicological Interactions of Chlorpyrifos and Methyl Mercury in the Amphipod, *Hyalella azteca* 177, 168-177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/toxsci/52.2.168>
- Strong, E.E., Gargominy, O., Ponder, W.F., Bouchet, P., 2008. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 149-166. <https://doi.org/10.1007/S10750-007-9012-6>
- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005a. Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a clorpirifos.
- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005b. Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a carbaril.

- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2003. Desarrollos de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a metilazinfos.
- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2000a. Establecimiento de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente.
- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2000b. Nivel guía de calidad de agua ambiente para protección de la biota acuática correspondiente a clorpirifos (aplicable a agua dulce).
- Tallarico, L. de F., 2015. Freshwater Gastropods as a Tool for Ecotoxicology Assessments in Latin America. *Am. Malacol. Bull.* 33, 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.4003/006.033.0220>
- Tanaka, Y., Tada, M., 2017. Generalized concentration addition approach for predicting mixture toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 265-275. <https://doi.org/10.1002/etc.3503>
- Tankiewicz, M., Fenik, J., Biziuk, M., 2010. Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 29, 1050-1063. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.05.008>
- Timbrell, J., 2000. Principles of Biochemical Toxicology. Taylor and Francis, London.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247-268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>
- Tosi, A., Pechen de D'angelo, A.M., Savini, M., Loewy, R.M., 2009. Evaluación de riesgo por plaguicidas sobre aguas superficiales de la región norpatagónica argentina. *Acta Toxicol. Argent.* 17 1-6 17, 1-6.
- Tripathi, A.M., Agarwal, R.A., 1998. Molluscicidal and Anti-AChE Activity of Tertiary Mixtures of Pesticides. *Arch Env. Contam Toxicol* 34, 271-274. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s002449900317>
- Tripathi, P.K., Singh, A., 2004. Carbaryl induced alterations in the reproduction and metabolism of freshwater snail *Lymnaea acuminata*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 79, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2003.11.003>
- US EPA, 2019a. Azinphos-methyl [WWW Document]. *U.S. Environ. Prot. Agency. Chem. Dashboard*. URL <https://comptox.epa.gov/dashboard/DTXSID3020122> (accedido 11.10.19).
- US EPA, 2019b. Chlorpyrifos [WWW Document]. *U.S. Environ. Prot. Agency. Chem. Dashboard*. URL <https://comptox.epa.gov/dashboard/DTXSID4020458> (accedido 11.17.19).
- US EPA, 2019c. Carbaryl [WWW Document]. *U.S. Environ. Prot. Agency. Chem. Dashboard*. URL <https://comptox.epa.gov/dashboard/DTXSID9020247> (accedido 11.17.19).
- US EPA, 2019d. Acetamiprid [WWW Document]. *U.S. Environ. Prot. Agency. Chem.*

- Dashboard*. URL //comptox.epa.gov/dashboard/DTXSID0034300 (accedido 11.17.19).
- US EPA, 2016a. EPA - OCSPP 850.1010: Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids. *United States Environ. Prot. Agency* OCSPP 850., 1-17.
- US EPA, 2016b. Ecological Effects Test Guidelines Background and Special with Terrestrial and Aquatic Plants , Cyanobacteria , and Terrestrial Soil-Core Microcosms. *Environ. Prot. Agency*.
- US EPA, 2008. Amended Reregistration Eligibility Decision (RED) for Carbaryl. *Environ. Prot. Agency*.
- US EPA, 2000. Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. <https://doi.org/10.1080/00206814.2017.1362672>
- US EPA, 1996a. Microbial Pesticide Test Guidelines Aquatic Invertebrate Range Testing , Tier III. *Environ. Prot. Agency*.
- US EPA, 1996b. Ecological Effects Test Guidelines Oyster Acute Topxicity Test (Shell Deposition). *Environ. Prot. Agency*.
- US EPA, 1996c. Ecological effects test Guidelines: OPPTS 850.1020 Gammarid acute toxicity test. *Environ. Prot. Agency*.
- US EPA, 1976. Quality Criteria for Water (EPA-440/9-76-023). Washington DC.
- van der Knaap, W.P.W., Adema, C.M., Sminia, T., 1993. Invertebrate blood cells: Morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Haematol. Int.* 3, 20-26. <https://doi.org/10.1007/BF00394923>
- van der Knaap, W.P.W., Loker, E.S., 1990. Immune mechanisms in trematode-snails interactions. *Parasitol. Today* 6, 175-182.
- van Wijngaarden, R., Leeuwangh, P., Lucassen, W.G.H., Romijn, K., Runday, R., van der Velde, R., Willigenburg, W., 1993. Acute toxicity of chlorpyrifos to fish, a newt, and aquatic invertebrates. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 716-723. <https://doi.org/10.1007/BF00201650>
- Varò, I., Navarro, J.C., Amat, F., Guilhermino, L., 2003. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 75, 61-72. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(03\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00019-1)
- VATOXA, 2018. Vademécum Toxicológico Alimentario Argentino [WWW Document].
- Vehovszky, Á., Farkas, A., Ács, A., Stoliar, O., Székács, A., Mörtl, M., Gyori, J., 2015. Neonicotinoid insecticides inhibit cholinergic neurotransmission in a molluscan (*Lymnaea stagnalis*) nervous system. *Aquat. Toxicol.* 167, 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.009>
- 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. *Env. Pollut* 117, 523-

530. [https://doi.org/https://doi.org/110.1016/s0269-7491\(01\)00132-4](https://doi.org/https://doi.org/110.1016/s0269-7491(01)00132-4)

Villarreal, P., Mattei, S., Villegas Nigra, M., Forchetti, G., 2010. Evaluación del impacto del Programa Nacional de Supresión de Carpocapsa en la fruticultura de pepita de los valles irrigados de la Norpatagonia.

Ville, P., Roch, P., Cooper, E.L., Narbonne, J.-F., 1997. Environmental Contamination and Toxicology Immuno-Modulator Effects of Carbaryl and 2,4D in the Earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Crit. Rev.* 297, 291-297. <https://doi.org/10.1007/s002449900187>

Walters, J., Goh, K.S., Li, L., Feng, H., Hernandez, J., White, J., 2003. Environmental monitoring of carbaryl applied in urban areas to control the glassy-winged sharpshooter in California. *Env. Monit Assess* 82, 265-280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1021942301187>

Wheelock, C.E., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Miller, J.L., Miller, M.J., Hammock, B.D., 2008. Applications of Carboxylesterase Activity in Environmental Monitoring and Toxicity Identification Evaluations (TIEs), en: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. pp. 117-178. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77030-7>

Wheelock, C.E., Shan, G., Ottea, J., 2005. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *J. Pestic. Sci.* 30, 75-83. <https://doi.org/10.1584/jpestics.30.75>