



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

**FACULTAD DE BIOQUIMICA Y
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Instituto Nacional de Limnología
(CONICET – UNL)**

Laboratorio de Macrocrustáceos

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

Título

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador

Zilchiopsis collastinensis

(Decapoda, Trichodactylidae)

Autor: Lic. Carlos Leandro Negro

Director: Dr. Pablo Agustín Collins

-2013-

Carlos Leandro Negro
*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis**
(Decapoda, Trichodactylidae)

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, sede del Doctorado en Ciencias Biológicas

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas otorgadas, las cuales hicieron posible la realización de este doctorado

Al Instituto Nacional de Limnología

A Pablo, director de esta tesis, por todo

A Eloísa, compañera de aciertos y desaciertos, alegrías y tristezas durante esta tesis

A Fede, Vero, Vicky, Vale, Gabi, Geo, Debo y Alcides, compañeros que hicieron del Laboratorio de Macrocrustáceos un lugar agradable.

A Javier y Romina, por su amistad

A Lucre, Esteban, Elena, Gabriel, Liliana, Eduardo, Julieta y Fernanda, por su acompañamiento y colaboración.

A becarios, investigadores y personal de apoyo que integran el Instituto Nacional de Limnología.

A Eduardo Lorenzatti, con quien di mis primeros pasos en la investigación y me acompaña todavía.

A mis amigos de la vida y a mi familia

A Georgina, mi compañera

A mi madre, porque si algo soy en esta vida es gracias a ella

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	2
INDICE DE TABLAS	6
INDICE DE FIGURAS	7
RESUMEN	14
ABSTRACT	18
INTRODUCCIÓN	21
Explotación agrícola y utilización de biocidas en la región pampeana	21
Fauna de ecosistemas acuáticos. Crustáceos decápodos	26
Conquista del agua dulce y adaptaciones	27
Alimentación y funciones del hepatopáncreas	32
Desarrollo gonadal	36
Bioconcentración de plaguicidas en tejidos	38
Metabolismo	41
Crustáceos decápodos dulceacuícolas de América del sur y problemática regional	42
HIPÓTESIS	46
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	48
Procedencia de los animales de experimentación y condiciones de cría y aclimatación.	48
Ensayos de toxicidad aguda	50
Efectos subletales de endosulfán y clorpirifós sobre hepatopáncreas y gónadas de adultos.	55
Bioconcentración de plaguicidas en tejidos.	58

Efectos subletales de biocidas sobre embriones	61
Efectos de concentraciones similares a ambientales en embriones	62
Efectos de endosulfán sobre el metabolismo de juveniles.	63
RESULTADOS	66
Consideraciones generales	66
Toxicidad aguda de biocidas	67
Determinación de la concentración letal media	67
Curvas de supervivencia.	68
Efectos histopatológicos de plaguicidas en hepatopáncreas y gónadas.	73
Consideraciones generales.	73
Efectos histopatológicos de Endosulfán	75
Efectos histopatológicos de Clorpirifós	80
Bioconcentración de endosulfán en tejidos	87
Efectos subletales de biocidas sobre embriones	91
Efectos de endosulfán	91
Efectos de clorpirifós	95
Efectos de concentraciones similares a ambientales en embriones	97
Efectos de endosulfán	97
Efectos de clorpirifós	100
Efectos de endosulfán sobre el metabolismo de juveniles	103
DISCUSIÓN	107
Efectos letales	107
Efectos histopatológicos sobre hepatopáncreas y gónadas.	110
Bioconcentración de biocidas.	116
Efectos subletales en embriones.	121

Carlos Leandro Negro
*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis**
(Decapoda, Trichodactylidae)

Efectos en el metabolismo de juveniles	126
CONSIDERACIONES FINALES	130
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Concentraciones de endosulfán y clorpirifós nominales y medidas, media y (desvío estandard), utilizadas en la determinación de la concentración letal media.	54
Tabla 2: Concentraciones de endosulfán y clorpirifós utilizadas en ensayos subletales con embriones de <i>Zilchiopsis collastinensis</i>.	62
Tabla 3: Concentración letal media y límites de confianza de clorpirifós y endosulfán sobre adultos y embriones del cangrejo cavador <i>Zilchiopsis collastinensis</i> luego de 96 horas de exposición.	68
Tabla 4: Grupos homogéneos de supervivencia de adultos de <i>Z. collastinensis</i> expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán.	69
Tabla 5: Grupos homogéneos de supervivencia de embriones de <i>Z. collastinensis</i> expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán.	70
Tabla 6: Grupos homogéneos de supervivencia de adultos de <i>Z. collastinensis</i> expuestos a diferentes concentraciones de clorpirifós.	71
Tabla 7: Grupos homogéneos de supervivencia de embriones de <i>Z. collastinensis</i> expuestos a diferentes concentraciones de clorpirifós.	72
Tabla 8: Valores de R^2, p, pendiente e intercepción con el eje Y de la relación entre consumo de oxígeno y oxígeno disuelto.	105
Tabla 9: Concentración letal 50 de endosulfán y clorpirifós sobre distintos grupos de crustáceos (anfípodos y decápodos).	108

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Embrión muerto y embrión vivo de <i>Z. collastinensis</i>.	54
Figura 2: Supervivencia de adultos del cangrejo cavador <i>Z. collastinensis</i> expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán.	68
Figura 3: Supervivencia de embriones del cangrejo cavador <i>Z. collastinensis</i> expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán.	69
Figura 4: Supervivencia de adultos del cangrejo cavador <i>Z. collastinensis</i> expuestos a diferentes concentraciones de clorpirifós.	70
Figura 5: Supervivencia de embriones del cangrejo cavador <i>Z. collastinensis</i> expuestos a diferentes concentraciones de clorpirifós.	71
Figura 6: Corte histológico de túbulo hepatopancreático normal de <i>Zilchiopsis collastinensis</i>	73
Figura 7: Hembra madura de <i>Z. collastinensis</i>. Gónada en vitelogénesis exógena	74
Figura 8: Gónada de hembra madura de <i>Z. collastinensis</i>	74
Figura 9: Concentraciones de endosulfán en agua en cada tratamiento	75
Figura 10: Número de células R por túbulo hepatopancreático de <i>Z. collastinensis</i> expuestos endosulfán	76
Figura 11: Número de células B por túbulo hepatopancreático de <i>Z. collastinensis</i> expuestos a endosulfán	77
Figura 12: Número de células F por túbulo hepatopancreático de <i>Z. collastinensis</i> expuestos a endosulfán	77

Figura 13: Hepatopaneas de <i>Zilchiopsis collastinensis</i>, tanto expuestos a endosulfán como pertenecientes al grupo control	78
Figura 14: Índices gonadosomáticos de hembras del cangrejo cavador <i>Z. collastinensis</i> expuestas a endosulfán	79
Figura 15: Ovocito normal en vitelogénesis exógena de hembra de <i>Z. collastinensis</i>	80
Figura 16: Volumen de ovocitos de hembras de <i>Z. collastinensis</i> expuestas a endosulfán	80
Figura 17: Concentraciones de clorpirifós en agua en cada tratamiento	81
Figura 18: Número de células B por túbulo hepatopancreático de <i>Z. collastinensis</i> expuestos a clorpirifós	82
Figura 19: Número de células F por túbulo hepatopancreático de <i>Z. collastinensis</i> expuestos a clorpirifós	83
Figura 20: Índices gonadosomáticos de hembras del cangrejo cavador <i>Z. collastinensis</i> expuestas a clorpirifós	84
Figura 21: Ovocitos de hembra de <i>Z. collastinensis</i> en fresco	84
Figura 22: Volumen de ovocitos de hembras de <i>Z. collastinensis</i> expuestas a clorpirifós	85
Figura 23: Aspecto externo de gónadas de hembras expuestas a clorpirifós	86
Figura 24: Ovocitos normales y atrésicos	86
Figura 25: Porcentaje de ovocitos atrésicos de hembras de <i>Z. collastinensis</i> expuestas a clorpirifós.	87
Figura 26: Concentraciones de endosulfán en agua en cada tratamiento	88

Figura 27: Bioacumulación de α-endosulfán en hepatopáncreas del cangrejo cavador <i>Z. collastinensis</i>.	89
Figura 28. Bioacumulación de α-endosulfán en gónadas femeninas del cangrejo cavador <i>Z. collastinensis</i>.	90
Figura 29: Efectos de endosulfán en el período de incubación de los embriones de <i>Z. collastinensis</i>	91
Figura 30: Cangrejo en eclosión.	92
Figura 31: Efectos de endosulfán en la eclosión efectiva de los embriones de <i>Z. collastinensis</i>	93
Figura 32: Cangrejos eclosionados del grupo control y afectados por plaguicida	94
Figura 33: Efectos de clorpirifós en el período de incubación de los embriones de <i>Z. collastinensis</i>	95
Figura 34: Cangrejo expuesto a clorpirifos durante la eclosión.	96
Figura 35: Efectos de clorpirifós en la eclosión efectiva de los embriones de <i>Z. collastinensis</i>	96
Figura 36: Efectos de concentraciones asimilables a ambientales de endosulfán en el periodo de incubación de los embriones de <i>Z. collastinensis</i>	97
Figura 37: Efectos de concentraciones asimilables a ambientales de endosulfán en la eclosión efectiva de los embriones de <i>Z. collastinensis</i>	98
Figura 38: Neonato separado del corion expuesto a endosulfán.	99
Figura 39: Efectos de concentraciones asimilables a ambientales de endosulfán en la supervivencia de los neonatos de <i>Z. collastinensis</i>.	99

Figura 40: Efectos de concentraciones asimilables a ambientales de clorpirifós en el periodo de incubación de los embriones de <i>Z. collastinensis</i>.	100
Figura 41: Efectos de concentraciones asimilables a ambientales de clorpirifós en la eclosión efectiva de los embriones de <i>Z. collastinensis</i>.	101
Figura 42: Efectos de concentraciones asimilables a ambientales de clorpirifós en la supervivencia de los neonatos de <i>Z. collastinensis</i>.	102
Figura 43: Neonato expuesto a clorpirifós.	102
Figura 44: Tasa de consumo de oxígeno de <i>Z. collastinensis</i> expuestos a endosulfán durante 4 horas.	103
Figura 45: Consumo de oxígeno promedio de <i>Z. collastinensis</i> expuestos a endosulfán durante 22 horas.	104
Figura 46: Tasa de consumo energético de <i>Z. collastinensis</i> expuestos a endosulfán durante 4 horas.	104
Figura 47: Gasto energético promedio de <i>Z. collastinensis</i> expuestos a endosulfan durante 22 horas.	105
Figura 48: Tasa de excreción de nitrógeno de <i>Z. collastinensis</i> expuestos durante 22 horas a endosulfán.	106
Figura 49: Relación oxígeno - nitrógeno de <i>Z. collastinensis</i> expuestos durante 22 horas a endosulfán.	106

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

CL₅₀: Concentración letal media

O:N: Razón atómica entre el oxígeno consumido y el nitrógeno excretado

INALI: Instituto Nacional de Limnología

SPE: Extracción en fase sólida (siglas en inglés)

MSPD: Matriz de dispersión de fase sólida (siglas en inglés)

GC: Cromatografía gaseosa (siglas en inglés)

RSD: Desvío Estandar Relativo (siglas en inglés)

LD: Límite de detección

LQ: Límite de cuantificación

ANOVA: Análisis de la varianza (siglas en inglés)

°C: Grados Celsius

Rpm: Revoluciones por minuto

µg: microgramo

mg: miligramo

g: gramo

µS: microsiemens

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

PRESENTACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS.

2009 – X Jornadas de Ciencias Naturales de Litoral (X JCNL) y II Reunión Argentina de Ciencias Naturales (II RACN)

Título: Lucha de titanes: comportamiento agonístico del cangrejo cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae)

Autores: Negro, C. L.; Senkman, L. E.

2010 - V congreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida. Quinto Congreso de Ambiente y Calidad de Vida. “El reto del desarrollo Sostenible. Estrategias y Acciones. Diálogos y Propuestas”. Línea Científica

Título “Concentraciones Ambientales de Endosulfan y Metabolismo del Cangrejo Dulciacuícola *Dilocarcinus pagei*”

Autores: C. L. Negro; L. E. Senkman; P. Collins

2011 – X Congreso de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental Latinoamericana (SETAC-LA). I Congreso Venezolano de Ecotoxicología “Un compromiso con la naturaleza”.

Título: “Efecto en Hepatopáncreas y Acumulación de Biocidas en el cangrejo dulceacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda; Trichodactylidae)”

Autores: Negro, C. L., Senkman, L. E., Vierling, J., Nocetti, M. F., Repetti, M. R., García, S. R., Collins, P.

2011 – 76° Reunión de Comunicaciones Científicas ACNL

Título: Respuestas metabólicas del cangrejo cavador *Zilchiopsis collastinensis* (decapoda: trichodactylidae) ante la presencia de biocidas.

Autores: Negro, C. L.; Senkman, L. E.; Collins, P.

2012 - XI Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral y III Reunión Argentina de Ciencias Naturales.

Título: Efectos de biocidas sobre huevos y adultos del cangrejo dulceacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda: Trichodactylidae).

Carlos Leandro Negro
*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis**
(Decapoda, Trichodactylidae)

Autores: Negro, C. L., Senkman, L. E., Collins, P.

2012- V Congreso Argentino de Limnología

Título: Efectos de concentraciones ambientales de biocidas en huevos y neonatos del cangrejo cavador *Zilchiopsis collastinensis*.

Autores: Negro C. L., Senkman, L. E. Marino, F, Lorenzatti, E., Collins, P.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS.

Publicaciones en revistas

Negro, C. L., Senkman, L. E., Marino, F., Lorenzatti, E., Collins, P. (2014). Effects of Chlorpyrifos and Endosulfan on Different Life Stages of the Freshwater Burrowing Crab *Zilchiopsis collastinensis* P.: Protective Role of Chorion. DOI: 10.1007/s00128-014-1239-0. (En prensa).

Negro, C. L.; Senkman, L. E.; Vierling, J.; Repetti, M. R.; Garcia, S. R.; Collins, P. (2012). Bioaccumulation in Freshwater Crabs. Endosulfan Accumulation in Different Tissues of *Zilchiopsis collastinensis* P. (Decapoda: Trichodactylidae). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 89: 1000 – 1003.

Negro, C. L.; Senkman, L. E.; Collins, P. (2012). Metabolic responses of burrowing and pleustonic freshwater crabs exposed to endosulfan. Fresenius environmental bulletin 12: 216 – 222.

Capítulos de libro

Negro, C. L., Senkman, L. E., Montagna, M. C., Collins, P. (2011). Freshwater decapods and pesticides, an unavoidable relation in the modern world. En: Stoycheva, M (ed.) “Pesticides in the Modern World – Risk and Benefits” ISBN 978-953-307-458-0. InTech Publisher. Viena. Austria.

RESUMEN

En los sistemas de cultivo modernos se utiliza una amplia gama de plaguicidas, compuestos químicos utilizados con el objetivo de minimizar los efectos perjudiciales producidos sobre los cultivos por animales, vegetales u hongos. Sin embargo, estos compuestos biocidas, diseñados para eliminar organismos vivos, no actúan solamente sobre aquellos que el hombre denomina plaga, sino que también pueden actuar sobre el resto de la biota existente. La región pampeana es una zona en la cual, debido a las condiciones edáficas y climáticas, se desarrollan actividades agrícolas. La masiva aplicación de biocidas provoca la contaminación de los sistemas acuáticos cercanos.

Entre los plaguicidas más utilizados en nuestro país encontramos a los insecticidas endosulfán y clorpirifós. El primero es un insecticida organoclorado de la familia de los ciclodienos. Su modo de acción se basa en el bloqueo de los canales de cloro en los receptores del ácido gamma-aminobutírico. Clorpirifós es un plaguicida organofosforado, cuyo modo de acción se basa en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa a nivel de sinapsis. Ambos son plaguicidas de amplio espectro, cuya acción no se restringe solamente a los insectos blanco. Luego de las aplicaciones, estos migran hacia los sistemas acuáticos cercanos, afectando a la biota allí presente.

El objetivo de esta tesis fue reconocer los efectos de los insecticidas más utilizados en la región, endosulfán y clorpirifós, sobre el cangrejo dulceacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda; Trichodactylidae), un integrante común y abundante de los sistemas acuáticos propios del tramo medio del río Paraná. Entre los efectos evaluados se encuentran la toxicidad de estos biocidas sobre adultos y sobre embriones de esta especie. Además, se evaluaron los efectos de concentraciones subletales de estos sobre hepatopáncreas y gónadas femeninas, así como también la bioconcentración de endosulfán en ambos tejidos. También se evaluaron los efectos de diferentes concentraciones subletales de estos plaguicidas sobre tiempo de incubación de los embriones, eclosión efectiva, supervivencia de las crías y metabolismo de juveniles.

La evaluación de la toxicidad de estos biocidas fue realizada a través de ensayos agudos de 96 horas, determinando la concentración letal media de cada plaguicida en cada estadio. Los efectos de concentraciones subletales de estos biocidas sobre gónadas

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

y hepatopáncreas fueron evaluados exponiendo a cangrejos hembra a una concentración inicial de plaguicidas con dilución posterior, simulando una aplicación en el ambiente, bajo condiciones ambientales de temperatura y fotoperíodo. Los parámetros evaluados en el caso de hepatopáncreas fueron las modificaciones en el tipo de células y las diversas histopatologías existentes. En el caso de las gónadas, se determinó el índice gonadosomático, el volumen de los ovocitos y el porcentaje de ovocitos atrésicos a diferentes días de exposición. La bioconcentración fue evaluada midiendo las concentraciones de estos biocidas en hepatopáncreas, gónadas y músculo de la quela.

Los efectos de concentraciones subletales de ambos insecticidas sobre días de incubación, eclosión efectiva y supervivencia de los neonatos fueron evaluados mediante ensayos *in vitro*. Los efectos producidos por concentraciones de estos biocidas sobre el metabolismo de juveniles fueron evaluados determinando las diferencias en el consumo de oxígeno y en la excreción de nitrógeno.

Los embriones fueron más resistentes que los adultos ante la exposición a ambos biocidas, lo cual se relaciona con la protección ofrecida por el corion engrosado que poseen los decápodos dulceacuícolas como mecanismo de adaptación al medio. Los cangrejos son un morfotipo de decápodos resistente en comparación con otros crustáceos. Clorpirifós posee una mayor toxicidad que endosulfán sobre ambos estadios. La exposición a endosulfán causó aumento en el número de células B del hepatopáncreas y disminución en el número de células F y células R. La exposición a clorpirifós causó aumento en el número de células B en algunos días observados, así como también aumentos en el número de células F. Además, se observaron algunas patologías como anormalidades en el lumen e infiltración hemocítica. Estas concentraciones de endosulfán no causaron modificaciones en el índice gonadosomático, mientras que se observaron algunas modificaciones aisladas en el volumen de los ovocitos. En el caso de clorpirifós, este no afectó el índice gonadosomático de las hembras y en general tampoco afectó el volumen de los ovocitos, aunque en algunos casos se observaron aumentos significativos. La exposición a este biocida en general provocó aumentos en el porcentaje de ovocitos atrésicos.

El aumento en las células B de hepatopáncreas en los expuestos a plaguicidas se relacionaría con los mecanismos de defensa que esta especie posee. La célula transicional F/B presenta glicoproteínas relacionadas con mecanismos de detoxificación de xenobióticos. Ante la exposición a biocidas se estimularía la transformación de

células F en células B, observándose un aumento de las últimas. La disminución en el número de ovocitos viables, relacionada con el aumento de ovocitos atrésicos, provocará un menor número de ovocitos disponibles para ser fecundados, disminuyendo el número de futuros integrantes de la población.

La bioconcentración de endosulfán fue mayor en hepatopáncreas que en gónadas, mientras que en los músculos en general no se detectaron concentraciones de este plaguicida. En el primer tejido la bioacumulación estuvo en general relacionada con las concentraciones en agua. En el caso de las gónadas, la bioconcentración no se relacionó con la concentración en agua ni disminuyó en el tiempo.

El hepatopáncreas es un órgano dinámico, el cual acumula y elimina plaguicidas en relación directa con las concentraciones de exposición. Las gónadas serían un sitio final de acumulación de biocidas, ya que no se reconocen mecanismos de detoxificación en estos órganos. La acumulación en este órgano tendría una doble vía de ingreso, tanto por contacto directo con el biocida presente en hemolinfa así como también por las diferentes concentraciones de biocidas adsorbidas a las vitelinas provenientes del hepatopáncreas durante la vitelogénesis exógena. La presencia de plaguicidas en hepatopáncreas estaría relacionada con concentraciones de exposición en un periodo cercano de tiempo, mientras que las concentraciones acumuladas en gónadas se relacionarían con algún evento de exposición durante el periodo de desarrollo gonadal.

La exposición de embriones a concentraciones subletales de ambos plaguicidas, similares a las utilizadas en la determinación de la CL_{50} en adultos, provocó en general el aumento en el tiempo de incubación, la disminución en la eclosión efectiva y en la supervivencia de las crías. En embriones expuestos a concentraciones subletales más bajas de estos biocidas, las cuales pueden encontrarse en el ambiente, el periodo de incubación fue similar al de los controles, así como también la eclosión efectiva. Sin embargo, la exposición a estas concentraciones disminuyó la supervivencia de los neonatos hasta el primer ciclo de muda.

El aumento en el periodo de incubación y la disminución de la eclosión efectiva de los embriones podrían relacionarse con la dificultad en la ruptura del corion, relacionada con los efectos que estos plaguicidas provocan, ya que aunque este sea una barrera efectiva, pequeñas concentraciones son capaces de atravesarlo. La exposición a bajas concentraciones de plaguicidas no altera estos parámetros pero afecta la

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
(Decapoda, Trichodactylidae)*

supervivencia de los neonatos, los cuales no serían tan resistentes sin la protección dentro del huevo.

La exposición de juveniles de 6 meses a concentraciones subletales de endosulfán no modificó el consumo de oxígeno pero sí causó una disminución en el nitrógeno excretado. Esta exposición aumentó la utilización de lípidos como sustrato energético, observado a través del aumento en la relación O:N.

Las modificaciones en el sustrato energético utilizado podrían relacionarse con la utilización de las proteínas en la producción de enzimas como mecanismo de detoxificación. Mecanismos de ajuste relacionados con el aumento en el consumo de oxígeno estarían limitados en cangrejos cavadores.

Zilchiopsis collastinensis es un cangrejo común y abundante en el tramo medio del río Paraná, de gran porte y de hábitos sedentarios. Presenta una alta resistencia a plaguicidas y múltiples variables de respuesta a concentraciones subletales, las cuales podrían ser utilizadas en biomonitoreos de calidad ambiental.

ABSTRACT

In modern agricultural systems there is a widely use of pesticides with the aim of minimize the adverse effects produced by pests (animals, plants or fungus). These biocides act over both target and non target organisms, affecting all the biota. Because of their soil and climatic conditions, the Pampean region is extensively used in agricultural activities. The massive use of biocides, typical of modern crop systems, causes the pollution of nearby water ecosystems.

Endosulfán and chlorpyrifos are the two most used insecticides in Argentina. Endosulfán is a cyclodiene organochlorine pesticide which inhibits neuronal function by blocking the GABA-gated chloride channels of the nervous systems. Chlorpyrifos is an organophosphorus insecticide that acts upon the biota by the inactivation of the acetylcholinesterase (AChE), whose primary function is to terminate the nerve impulse transmission at cholinergic synapses by hydrolyzing the neurotransmitter acetylcholine (Ach). They are both broad spectrum pesticides, which migrate after the applications.

The aim of the present work was to evaluate the toxicity of the most used insecticides in the Pampean region, endosulfan y chlorpyrifos, over the burrowing freshwater crab *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda; Trichodactylidae), a common crustacean occurring in aquatic ecosystem related with the Paraná river. The toxicity effects of these biocides over adults and embryos were observed. Also, sublethal toxicity effects in hepatopancreas and ovary and bioaccumulation in different tissues were evaluated. The sublethal effects in incubation time, effective hatching, neonate survival and juvenile metabolism were observed.

Acute toxicity tests (96 hours) were done according to USEPA methods. The LC₅₀ of each pesticide at each life stage were calculated. Sublethal effects over hepatopancreas and gonads were evaluated in a pulse system with controlled dilutions, emulating environmental applications, under natural conditions of temperature and photoperiod. In hepatopancreas the modifications in the number of cells and different histopathologies were evaluated. The gonadosomatic index, the oocyte volumes and the atretic oocyte proportion were measured in gonads. The endosulfan bioaccumulation was measured in gonads, hepatopancreas and muscle tissues

Sublethal effects over incubation time, effective hatching and neonate survival were evaluated by *in vitro* assays. The effects caused in juvenile metabolism were evaluated by the differences in oxygen consumption and ammonia excretion.

The embryos were less sensitive than the adults to biocides, related with the barrier effects caused by the thick chorion of freshwater crabs. The crabs are a resistant group, comparing with other decapods. Chlorpyrifos is more toxicant than endosulfán for both life stages.

The exposure to endosulfán caused an increase in B-cells and a decrease in F-cells and R-cells. Also, histopathologies as abnormalities in the lumen and hemocytic infiltration were observed. There were no modifications in the gonadosomatic index after the exposure to both pesticides. Some modifications were observed in oocyte volume. The exposure to chlorpyrifos caused increases in the atretic oocyte proportion. The increase in B-cells in the hepatopancreas of exposed to pesticide crabs would be related with the defense mechanisms of this crabs. In the transitional F/B cells there were observed glycoproteins related with xenobiotic detoxification mechanisms. Faced to the exposure to biocides, the transformation of F cells into B cell might be stimulated, observing an increase in the last ones. A decrease in the number of available oocytes, related with the increase in the atretic oocyte proportion, will cause a lower number of oocytes able to be fecundated, decreasing the number of the brood.

The endosulfán bioconcentration was higher in hepatopancreas than in gonads. There were almost no endosulfán concentrations detected in the muscles. Endosulfan concentrations in hepatopancreas had a close relation with their concentrations in water. In gonads, the bioconcentration was not related with their concentration in water. Also, concentration levels did not decrease with time. The hepatopancreas is a dynamic organ, which accumulates and eliminates pesticides in a close relation with exposure concentrations. The gonads may act as a sink of pesticides, where they are accumulated and might not be detoxification mechanisms. Bioaccumulation in gonads might have two different intake ways. In one hand, there might be a direct contact between the oocytes and the endosulfán concentrations in the haemolymph. On the other hand, the biocides might get into the oocytes attached with the vitellins synthesized in the hepatopancreas during secondary vitellogenesis. Pesticide accumulation in this organ might be related with the exposure in a short period of time, while pesticide

accumulation in gonads would be related with an exposure event in any time of the gonadial development.

Embryos exposure to sublethal concentrations of these pesticides, related with those used in adult toxicity tests, caused an increase incubation time and a decrease in both the effective hatching and the neonate survival. The exposure to lower concentrations of those biocides, which were close to those founded in the environment, caused no differences in incubation time or in effective hatching. Nevertheless, the exposure to those concentrations reduced the survival of the neonates. The increase in incubation time and the decrease in effective hatching could be related with the difficulties caused by these pesticides. Although the chorion may be an effective barrier against pesticides, some concentrations might get into the eggs and affect the embryos. The exposure to low pesticide concentrations did not modified the incubation time or the effective hatching, but caused a decrease in the survival. The neonates without the chorion protection might not be as a resistant as they were inside the eggs.

The exposure of six month old juvenile crabs to sublethal concentrations of endosulfán caused no differences in oxygen consumption, but there was a decrease in the ammonia excretion. The use of lipids as an energetic substrate was increased by the exposure to this pesticide, observed by the increase in the O:N ratio. The modifications in the energy substrate could be related with the use of aminoacids in the production of enzymes related with detoxification mechanisms. Modifications in the oxygen consumption should not be a useful response in burrowing crabs.

Zilchiopsis collastinensis is a common crab occurring in the middle Paraná river. They have a high resistance to pesticides and multiple responses to pesticide exposure, which could be used in environmental biomonitoring.

INTRODUCCIÓN

Explotación agrícola y utilización de biocidas en la región pampeana

La región pampeana (Pampasia) es una inmensa llanura de construcción o acumulación de sedimentos, los cuales han ido colmando una gran fosa tectónica de hundimiento. Los pilares laterales están representados por bloques rocosos del macizo uruguayo-brasileño (Escudo de Brasilia) por un lado y el arco de las sierras pampeanas o peripampeanas por el otro (Manzi y Gallardo, 1970)

La constitución de esta zona marginal de Brasilia estuvo ampliamente influenciada por las intrusiones marinas durante el período Paleozoico inferior y posiblemente también durante el Devónico. El levantamiento y plegamiento del geosinclinal adyacente a esta meseta durante la orogénesis Caledoniana determinó el cierre de la cuenca. Desde ese momento geológico en adelante, el material sedimentario que recibió fue mayormente de carácter continental (eólico, fluvial, lacustre) producto del desbaste de las áreas montañosas que la circundan. Las fallas concéntricas fueron especialmente importantes en su hidrogeología y morfología, ya que los ríos Paraná y Uruguay se ubican sobre estas. El carácter predominantemente continental de la acumulación fue interrumpido en el Mioceno medio por la ingresión oceánica que, en forma de mares epicontinentales, avanzaron hasta el pie de los cordones serranos en la planicie pampeana y de los bosques andinos en la Patagonia (Manzi y Gallardo, 1970). La acumulación de grandes mantos sedimentarios tanto de origen continental como marino definió al espacio pampeano como una región fértil, cuyos suelos ricos en materia orgánica brindan excelentes posibilidades a la actividad agrícola. Las condiciones climáticas así como también las topográficas contribuyeron a la utilización de estas tierras para la producción agrícola o ganadera, encontrándose también zonas de explotación mixta. Estas cualidades favorecieron el crecimiento demográfico de la región así como también el crecimiento económico tanto de la región como del país (Capitanelli, 1992; Mercado y Coggiola de Panozzo, 1989).

Las prácticas agrícolas históricamente han incluido diversas metodologías tendientes a eliminar o repeler diversos organismos vivos, tanto animales como vegetales y hongos, que por su acción negativa hacia los cultivos el hombre considera plaga. Los primeros esfuerzos eran rudimentarios y poco efectivos, relacionados con el

uso de gatos para disminuir el número de roedores, espantapájaros, y herramientas manuales como el azadón para combatir hierbas (McEwen y Stephenson, 1979). A partir del siglo XX, luego del descubrimiento de las propiedades insecticidas del compuesto orgánico DDT, los plaguicidas se comenzaron a producir y comercializar en forma masiva. Los plaguicidas pueden describirse como compuestos químicos, naturales o sintéticos, utilizados para eliminar, repeler, regular o interrumpir el crecimiento de determinados grupos de organismos vivos, denominados plagas. La utilización de plaguicidas, junto con las nuevas técnicas de producción y la selección genética de semillas, originaron un masivo aumento de la producción durante la “revolución verde”. Los plaguicidas fueron mundialmente aceptados tanto en la actividad agrícola como en el control de plagas urbanas, ya que no solo contribuye al incremento en la productividad sino también al control de enfermedades transmitidas por estas, como malaria, paludismo, mal de Chagas, entre otras (Edwards, 1973; Brooks, 1974).

En las técnicas agrícolas actuales se utiliza una amplia gama de compuestos con el objetivo de minimizar los efectos perjudiciales que afectan a los cultivos, disminuyendo la producción. Los plaguicidas se encuentran entre los contaminantes ambientales derivados de la actividad humana más peligrosos debido a su naturaleza letal, ya que fueron creados con el objetivo de producir un efecto negativo sobre los organismos a los cuales pretende controlar (organismos blanco) (Brooks, 1974; Repetto y col., 1995). Sin embargo estos compuestos no actúan solamente sobre las especies que el hombre denomina plaga, sino sobre todos los organismos vivos, por lo cual son compuestos biocidas.

Los países en vías de desarrollo, especialmente los de regiones tropicales o subtropicales, poseen matrices económicas generalmente relacionadas con la producción de alimentos y su exportación hacia otros países (Ecobichon, 2001). Argentina, cuya actividad principal está relacionada con un modelo agroexportador, incrementó la superficie sembrada de cereales (maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, avena, mijo, alpiste, centeno) en la región pampeana en un 35% durante el período 1993/2001, aumentando la producción en un 63%. La superficie cultivada ascendió a 22,6 millones de hectáreas, obteniéndose 35 millones de toneladas de cereales y 27 millones de toneladas de oleaginosas. En los últimos 10 años, entre 2002 y 2012, la superficie cultivada con maíz se incrementó de 3.061.661 a 5.000.330 de hectáreas en todo el país,

mientras que la superficie de soja se incrementó de 11.639.240 a 18.670.937 de hectáreas en todo el país, siendo el cultivo más importante. Si bien otros cultivos como el trigo y el girasol redujeron su superficie cultivada, el balance general muestra un aumento de la superficie utilizada para la explotación agrícola (D'Angelo, 1991; CASAFE, 2010, 2012).

El incremento en la actividad agrícola acarrea consigo el aumento en la demanda de productos fitosanitarios. La inclusión de nuevas tecnologías, las cuales incorporan cultivos modificados genéticamente para resistir diferentes condiciones adversas, como la sequía, extiende la frontera agrícola aumentando la utilización de biocidas. Las tendencias generales indican en nuestro país un aumento en la utilización de estos compuestos, relacionado con el aumento en la superficie cultivada y la presión de aumentar la productividad. La venta total de plaguicidas se incrementó entre 2008 y 2010 de 225.218.268 a 313.471.723 Kg (CASAFE, 2010; 2012).

Los biocidas pueden ser agrupados de acuerdo al tipo de organismo blanco sobre los que fueron diseñados para actuar. De este modo podemos distinguir entre insecticidas, herbicidas, fungicidas y aquellos de menor utilización, como rodenticidas, nematocidas, entre otros (Repetto y col., 1995). Otro tipo de clasificación se basa en la "peligrosidad" de estos biocidas, los cuales son calificados desde "sumamente peligrosos" (I a) hasta "productos que normalmente no ofrecen peligro" (IV). Esta tipificación se basa en la estimación de los riesgos hacia los humanos, calculada a partir de la Dosis letal media (DL_{50}) calculada en ratas (en mg/Kg) (García Araya y Don, 2002).

Los insecticidas más utilizados en la actividad agrícola durante los periodos 2008-2011, de acuerdo a la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE), son el endosulfán y el clorpirifós. Endosulfán (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepina-3-óxido) es un plaguicida organoclorado de amplio espectro, utilizado para combatir insectos y ácaros en diversos cultivos (soja, alfalfa, algodón, arroz, girasol, lino, sorgo, florales, frutales, hortalizas, tabaco, entre otros) (Hose y Van den Brink, 2004; Wan y col., 2005, CASAFE, 2007). Este es un plaguicida neurotóxico considerado peligroso, de clase toxicológica Ib, que actúa por contacto e ingestión (García Araya y Don, 2002). Su modo de acción, inicialmente moderada y luego rápida y prolongada, se basa en el bloqueo de los canales de cloro en los receptores del ácido gamma-aminobutírico, causando excitación seguida

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

por un efecto narcótico, provocando finalmente la muerte del individuo (Hose y Van den Brink, 2004; Wan y col., 2005). Debido a sus características principalmente lipofílicas ($\log K_{ow} = 4,65$ para α -endosulfán y $4,34$ para β -endosulfán), endosulfán posee una baja solubilidad en agua (entre $0,33$ y $0,53 \text{ mg L}^{-1}$) (Jonsson y Toledo, 1993). Este compuesto posee una elevada vida media en agua, la cual puede variar entre algunos días hasta incluso meses de acuerdo a las condiciones ambientales (Lenardón y col., 2001). Su principal producto de hidrólisis es el endosulfán diol, mientras que el principal producto de degradación microbiana es el sulfato de endosulfán, el cual posee características tóxicas intrínsecas similares a los compuestos parentales (isómeros α - y β - Endosulfán), pero es aún más persistente que estos (Hose y Van den Brink, 2004).

Clorpirifós (0,0-dietilfosforotioato de 0-(3, 5, 6-tricloro-2-piridilo)) es un insecticida y acaricida organofosforado de amplio espectro utilizado para combatir insectos en diversos cultivos como soja, maíz, girasol, sorgo, alfalfa, algodón, tabaco, cítricos, frutales, entre otros (CASAFE, 2007). Este es considerado un plaguicida moderadamente tóxico, clase toxicológica III, que actúa por contacto, inhalación e ingestión (García Araya y Don, 2002, Agroquim, 2013). Su modo de acción se basa en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa a nivel de sinapsis, la cual tiene la función de catalizar la hidrólisis de la proteína que rige las transmisiones de los impulsos nerviosos (acetilcolina), provocando la excesiva estimulación de los receptores sinápticos y los movimientos musculares incontrolados. Clorpirifós es un plaguicida de naturaleza lipofílica ($\log K_{ow} = 4.7$) y poco soluble en agua (entre $1,5$ y 2 mg l^{-1} a 25 °C) (Murty y Ramani, 1992; Traas y col, 1998; Varó y col, 2002).

Estos insecticidas no atacan solamente a las especies blanco hacia las cuales son destinados, sino que por su amplio espectro de acción ejercen su efecto sobre todas las especies con las cuales entran en contacto. Debido a esto, los plaguicidas utilizados son un peligro potencial para todo el resto de la comunidad biótica, máxime si se tiene en cuenta que en general menos del 0,1% de los plaguicidas aplicados alcanzan las plagas que pretenden diezmar, es decir, más del 99% de tales productos se dispersan en el ambiente (Repetto y col, 1995).

Una vez liberados al ambiente, estos compuestos pueden migrar hacia arroyos, ríos y lagos cercanos. El ingreso de los plaguicidas en los ambientes acuáticos puede producirse a través de la deriva aérea durante la aplicación, volcado directo accidental o premeditado, lavado de equipos de aplicación, disposición final de envases en cuerpos

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
(Decapoda, Trichodactylidae)*

de agua y escurrimiento superficial de los campos tratados luego de las lluvias, donde no solo se arrastran plaguicidas en disolución sino también los adsorbidos al material particulado arrastrado (Repetto y col., 1995; Walker y col., 2001). Mientras que las primeras son fuentes puntuales esporádicas, la última (contaminación por “lavado de campos”) es una fuente difusa de contaminación, cuya periodicidad está relacionada con el régimen de lluvias. En la región subtropical los mayores niveles de lluvia coinciden con los períodos de mayor temperatura y actividad agrícola y, por ende, con la mayor utilización de plaguicidas, aumentando el riesgo de contaminación por escorrentía (Rodríguez y Amin, 1991; CASAFE, 2007).

La migración de plaguicidas de uso agrícola hacia sistemas lóticos y leníticos, detectada a partir de la cuantificación de estos tanto en agua como en sedimentos, es un fenómeno que se repite en todo el mundo, alcanzando concentraciones entre $0,06 \mu\text{g l}^{-1}$ y $1,72 \text{mg l}^{-1}$ en el caso de endosulfán; y entre 31 y 200ng l^{-1} en el caso de clorpirifós (Ernst y col., 1991; Kuivila y Foe, 1995; Leonard y col., 2001; Schulz, 2001; Weston y Lydy, 2010). Argentina no es una excepción a esto. Luego de las aplicaciones y de las lluvias los plaguicidas migran hacia los sistemas acuáticos, encontrándose concentraciones de estos en agua y sedimentos en diversos muestreos ambientales. Si bien los relevamientos todavía son escasos, se han detectado en agua concentraciones de endosulfán de $13,5 \mu\text{g l}^{-1}$ en los Esteros del Iberá; y concentraciones de clorpirifós que varían entre $0,21$ y $10,8 \mu\text{g l}^{-1}$ en ríos y arroyos de la región pampeana (Menone y col., 2000; 2004; 2006; Miglioranza y col., 2004; Jergentz y col., 2004; 2005; Silva y col., 2005; Marino y Ronco, 2005). El tramo medio del río Paraná, y especialmente los sistemas hídricos relacionados con su llanura de inundación, están afectados por la contaminación relacionada con las actividades agrícolas. En ríos y lagunas se han encontrado diferentes concentraciones de estos plaguicidas, detectándose concentraciones de endosulfán entre $7,95$ y $16,88 \text{ng l}^{-1}$ (Lenardón y Enrique, 1998; Lenardón y col., 1998).

Una vez que estos compuestos alcanzan el medio acuático comienzan las interacciones con la comunidad biótica. Esta interacción puede causar efectos a distintos niveles de organización, los cuales dependerán de diversos factores intrínsecos al compuesto (modo de acción, persistencia), ambientales (biodisponibilidad, concentración de exposición) e intrínsecos al organismo (especie, estado nutricional, edad, sexo, entre otros).

Fauna de ecosistemas acuáticos. Crustáceos decápodos

La unidad taxonómica Decapoda incluye más de 10.000 especies que en su mayoría están restringidas al sistema marino. Algunas de ellas conquistaron los sistemas de agua salobre y agua dulce, encontrándose hoy en sistemas acuáticos continentales en todo el mundo y algunas incluso son consideradas terrestres (Brusca y Brusca, 1990; Ruppert y Barnes, 1994).

Dentro de los crustáceos decápodos podemos encontrar cuatro grupos morfológicamente diferentes: camarones, langostas, pseudocangrejos y cangrejos. Los camarones, entre los cuales se encuentran los decápodos más primitivos, poseen un cuerpo cilíndrico o comprimido lateralmente, con abdomen bien desarrollado y exoesqueleto fino y flexible. La mayor parte de los camarones son bentónicos, utilizando los pleópodos para nadar ocasionalmente, aunque este grupo de decápodos posee integrantes netamente pelágicos, los cuales utilizan los pereiópodos en la natación. El resto de los crustáceos decápodos son netamente bentónicos, con patas caminadoras más fuertes, cuerpos aplastados dorsoventralmente y con exoesqueletos más duros (Brusca y Brusca, 1990; Ruppert y Barnes, 1994).

Las langostas (infraorden Astacidae y Palinuridae) poseen un cuerpo más largo que ancho, con abdomen extendido. El primer par de pereiópodos está modificado conformando un quelípodo. El resto de los pereiópodos son utilizados para caminar, aunque también se pueden observar movimientos rápidos ocasionales que se producen al flexionar el abdomen, como mecanismo de huida ante el peligro. Los pleópodos son utilizados por las hembras en la ventilación de los huevos.

Los pseudocangrejos (infraorden Anomura) son crustáceos decápodos con forma de cangrejo, aunque con abdomen extendido, todavía no replegado completamente. Este abdomen puede ser asimétrico, como en el caso de los cangrejos ermitaños, o simétrico, corto y replegado parcialmente por debajo del cefalotórax como en el caso de los cangrejos porcelánidos. El primer par de pereiópodos está modificado conformando un quelípodo, mientras que el quinto par está reducido y no tiene función caminadora, por lo que usualmente no se observa exteriormente.

De acuerdo a la teoría de la carcinización de Morrison y col. (2002), estos grupos representan diferentes etapas evolutivas en el camino hacia los cangrejos verdaderos. En al menos cinco grupos de cangrejos anomuros diferentes ocurrieron

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

modificaciones evolutivas de manera independiente hacia el morfotipo cangrejo brachiuro. Además, no existen casos de reversión de grupos con morfotipo “cangrejo” hacia morfotipos “camarón” o “langosta”, sugiriendo que la evolución hacia la forma de cangrejo sería irreversible (Morrison y col., 2002).

Los cangrejos verdaderos (infraorden Braquiura) poseen cuerpos cortos altamente especializados y, de acuerdo al número de especies (más de 4.500 especies dentro del infraorden Brachyura de acuerdo a Ruppert y Barnes, 1994; más de 10.000 especies de acuerdo a Morrison y col. (2002) son los decápodos más exitosos. El cefalotórax está aplanado dorsoventralmente y se expande lateralmente. El primer par de pereiópodos está modificado formando quelípedos. El resto de los pereiópodos son utilizados como patas caminadoras. En algunas especies, el quinto par puede estar modificado para la natación ocasional. Los machos carecen del tercer, cuarto y quinto par de pleópodos. Los dos primeros pares están modificados cumpliendo funciones reproductivas. En las hembras, los pleópodos están modificados y son utilizados para acomodar los huevos. El abdomen simétrico y reducido se pliega sobre el cefalotórax. En general el urópodo es inexistente, excepto en algunas formas primitivas. La reducción y flexión del abdomen se reconoce como una posible adaptación relacionada con la locomoción, ya que el centro de gravedad es trasladado hacia un punto debajo de los apéndices caminadores (Brusca y Brusca, 1990; Ruppert y Barnes, 1994; Scholtz y col., 2009).

Conquista del agua dulce y adaptaciones

Los crustáceos decápodos son originarios de los sistemas marinos (Brusca y Brusca, 1990). Estos poseen características físicas y químicas diferentes a los sistemas dulceacuícolas, sobre todo en los relacionados con la estabilidad y concentración de sales. Los sistemas dulceacuícolas poseen una baja concentración de sales disueltas, más baja que la concentración osmótica interna de los animales.

Durante la conquista de los sistemas acuáticos continentales, los crustáceos decápodos desarrollaron una serie de adaptaciones que les permitieron habitar los ambientes hiposmóticos, soportando el estrés causado sobre todo por el desbalance generado por el ambiente dulceacuícola (Barnes y col., 1993).

Un animal hiperosmótico en comparación con su ambiente enfrenta dos problemas fisiológicos. Por un lado el agua tiende a ingresar en el animal ya que hay una mayor concentración de sales en el interior. Por otro lado, los solutos tienden a perderse debido a que la concentración interna es mayor y el agua excretada (orina) arrastra altas concentraciones de estos hacia el exterior (Barnes y col., 1993; Schmidt-Nielsen, 1997).

El exoesqueleto duro y altamente impermeable de los cangrejos durante el período de intermuda disminuye el ingreso de agua. Sin embargo, durante los períodos de pre-muda y post-muda el tegumento es más fino y blando, permitiendo el ingreso de agua desde el ambiente. Uno de los mecanismos de adaptación en los cangrejos dulceacuícolas es el alargamiento de los períodos de intermuda con respecto a los crustáceos marinos, como mecanismo para disminuir los momentos de pre y posmuda y el intercambio de sales relacionado con estas etapas (Robertson, 1961).

Los crustáceos poseen mecanismos fisiológicos que les permiten regular activamente la concentración interna de sales, tolerando ambientes con diferentes concentraciones osmóticas. Uno de los ajustes o adaptaciones de los crustáceos dulceacuícolas se relaciona con cambios en los órganos o sistemas que regulan las concentraciones de sales en las excreciones. La glándula excretora situada en la base de la antena, cuya función primaria es regular el volumen de fluidos y concentración de sales, posee un canal nefridial alargado en comparación con los decápodos netamente marinos. Su función estaría relacionada con la reabsorción de sales, produciendo excreciones hipotónicas comparadas con la hemolinfa, de aproximadamente una tercera parte de la concentración. De esta manera se disminuye la pérdida de sales a través de las excreciones (Robertson, 1961; Schmidt-Nielsen, 1997).

Algunos crustáceos que habitan el agua dulce tienen una independencia parcial del mar, como el cangrejo *Eriocheir sinensis*. Este es capaz de penetrar en los sistemas de agua dulce y vivir en ellos. Sin embargo la independencia del sistema marino no es completa ya que en los momentos de reproducción debe retornar a los sistemas estuariales o marinos para la eclosión de los huevos, ajustándose a las diferentes concentraciones de sales (Robertson, 1961; Schmidt-Nielsen, 1997). Otros grupos de crustáceos decápodos son netamente dulceacuícolas, completamente independientes del sistema marino. En estas especies no solamente se tuvieron que producir adaptaciones

que permitan la supervivencia sino que también los procesos reproductivos sufrieron modificaciones que les permitieron desarrollarse con éxito en estos sistemas.

En los crustáceos decápodos, los espermatozoides no son liberados al medio sin protección, sino que son empaquetados en espermatóforos y traspasados a la hembra de diferentes maneras de acuerdo a los diferentes grupos. En los camarones, aeglidos y langostas los machos adhieren el espermatóforo en la zona ventral del cefalotórax de la hembra, cercano a los gonóporos. En el caso de los cangrejos Braquiuros, los espermatóforos son introducidos en la hembra a través de la utilización de pleópodos modificados. El intercambio de material genético requiere, en todos los casos, el apareamiento directo entre los progenitores (cópula) (Bauer y Martín, 1991; McLay y López Greco, 2011).

Los espermatozoides son almacenados hasta el momento de la ovipostura. Este evento, durante el cual se produce la fertilización de los huevos, puede ocurrir inmediatamente luego de la cópula, en el transcurso de horas o luego de días e incluso meses. En el caso de los camarones, donde los espermatozoides son protegidos solo por el espermatóforo, la ovipostura ocurre en un corto período de tiempo. En algunas especies de cangrejos las hembras poseen una modificación en el oviducto, denominado “receptáculo seminal”, que les permite su almacenamiento, por lo cual los eventos de cópula y ovipostura pueden ocurrir en momentos diferentes (McLay y López Greco, 2011). Estos cangrejos pueden regular la ovipostura de acuerdo a las condiciones ambientales existentes, lo cual representa una importante ventaja en sistemas donde las condiciones abióticas y bióticas son variables, como en los sistemas dulceacuícolas (Brusca y Brusca, 1990; Collins y col., 2007; Williner y col., 2009).

Una vez que los ovocitos están desarrollados y que los estímulos ambientales son los adecuados se produce la ovipostura. Los ovocitos migran por el oviducto, se fertilizan en el receptáculo seminal y continúan su migración por la vagina hasta ser exteriorizados a través de los gonóporos, los cuales se ubican cercanos a la coxa del tercer par de pereiópodos (McLay y López Greco, 2011). Una vez en el exterior, los huevos quedan adheridos a las setas de la madre dentro de la cavidad conformada por el cefalotórax y el abdomen (McLay y López Greco, 2011). Luego de la ovipostura, los huevos son acarreados por la hembra en su abdomen hasta el momento de la eclosión, lo cual entorpece sus movimientos y la convierte en una presa potencialmente más vulnerable o fácil de ser capturada (Li y col., 2006).

Los invertebrados bentónicos, en general, poseen una serie de estados previos desde la eclosión hasta la forma de vida adulta. Los brachiuros marinos en general siguen este modelo, produciendo un alto número de huevos pequeños desde los cuales eclosionan pequeñas larvas planctívoras (Barnes y col., 1993). Esta existencia de larvas de vida libre, permite que se distribuyan con el movimiento de las corrientes marinas, favoreciendo el intercambio de material genético entre las poblaciones. La distribución de los individuos disminuye la competencia por recursos y favorece la expansión hacia nuevos territorios. Los ambientes dulceacuícolas presentan fuertes desafíos fisiológicos a los estadios inmaduros de los crustáceos, especialmente relacionados con la capacidad de balancear concentraciones de sales y de agua. Las larvas de cangrejo poseen rudimentarios mecanismos de regulación de agua e iones, los cuales no les posibilitan la supervivencia y desarrollo en este tipo de medio (Barnes y col., 1993). Las estrategias utilizadas por los organismos netamente dulceacuícolas que les permiten sortear este inconveniente están relacionadas con la reducción e incluso desaparición de los estadios larvales libres, eclosionando como larvas más desarrolladas o juveniles (Barnes y col., 1993; Anger, 1995; 2013).

La membrana de los huevos de los crustáceos decápodos dulceacuícolas es más gruesa que la de los decápodos marinos, aumentando el aislamiento de los embriones en desarrollo y protegiéndolos contra la pérdida de agua y estrés osmótico. Los embriones están aislados mediante una o incluso más de una capa celular (Glas y col., 1997). Estos “envoltorios embrionarios” están conformados por varias capas morfológicamente distinguibles, que generalmente aparecen juntas como una unidad, llamada “saco embrionario”. Este a su vez puede estar recubierto por el “saco de cementación”, mediante el cual los huevos quedan adheridos a la hembra. Los diferentes sacos aíslan al huevo del medio en el cual la madre vive (Glas y col., 1997).

Los sistemas dulceacuícolas presentan también una pobre o impredecible productividad de plancton en la zona pelágica. Los juveniles eclosionados atraviesan en general una etapa lecitotrófica, alimentándose durante un tiempo de las reservas de vitelo que poseen e independizándose de la alimentación exógena. Estas adaptaciones no son exclusivas de los ambientes dulceacuícolas sino que también pueden observarse en otros ambientes extremos como los terrestres y subpolares (Vance, 1973; Bliss, 1982; Anger, 1995; 2013).

La reducción de los estadios larvales libres provoca que esas etapas de desarrollo deban ocurrir dentro del huevo, aumentando el tiempo de incubación. Al pasar mayor tiempo dentro del huevo, los embriones necesitan mayores cantidades de vitelo, el cual incluso debe ser mayor si luego de la eclosión los neonatos atraviesan una etapa lecitotrófica (Barnes y col., 1993).

El aumento en el tamaño de los huevos de los cangrejos dulceacuícolas permite almacenar mayor cantidad de vitelo (reservas energéticas). Esto requiere también una mayor inversión energética por parte de las hembras. Este aumento de tamaño reduce el número de huevos que una hembra puede producir o cargar luego de la ovipostura. En los cangrejos dulceacuícolas se observa una reducción en el número de huevos, alrededor de 500 en promedio en contraste con los miles y hasta millones de huevos que pueden desovar los decápodos marinos. Los huevos de cangrejos dulceacuícolas son más grandes, y desde ellos eclosionan juveniles totalmente desarrollados y con forma similar a la de los adultos (desarrollo directo). Esto lleva a una disminución en el número de la progenie en los organismos dulceacuícolas (Barnes y col., 1993).

Dentro del huevo, los embriones pasan a través de distintos estadios de desarrollo hasta el momento previo a la eclosión. Yavar y Dupré (2007) describieron siete etapas que se suceden dentro del huevo en el camarón *Cryphiops caementarius* (Decapoda: Palaemonidae). La primera comienza en el momento de la fecundación. Luego, el embrión atraviesa una serie de transformaciones, desde la mórula en el comienzo del estadio II hasta el momento en que todas las estructuras han sido conformadas en el final del estadio VII, momento en el que se produce la eclosión.

A medida que el embrión va desarrollándose dentro del huevo, el corion disminuye su espesor, lo que facilita la eclosión (Glas y col., 1997). Una vez fuera del huevo, los neonatos no son directamente liberados a la zona pelágica, como ocurre en los decápodos marinos con estadios larvales libres. Estos permanecen relacionados a la madre durante un tiempo, en el telicum de los camarones o en la cavidad que se forma entre el abdomen y la zona ventral del cefalotórax en el caso de los cangrejos. Luego de un tiempo, las crías abandonan a la madre, comenzando el periodo de vida libre. Este cuidado parental extendido no es una adaptación exclusiva de los decápodos, ya que otros crustáceos dulceacuícolas también mantienen a sus crías durante horas en el saco incubatriz, como los anfípodos *Hyaella curvispina* y *H. pampeana*, (Lopretto, 1983).

Alimentación y funciones del hepatopáncreas

Los crustáceos decápodos ocupan una posición central en las redes tróficas. Entre los ítems que consume se puede encontrar material vegetal, restos de peces e invertebrados acuáticos. Algunos cangrejos, como los de la familia Trichodactylidae, pueden alimentarse también en la zona terrestre, favoreciendo el intercambio de materia entre el sistema terrestre y acuático. A lo largo de su ontogenia los crustáceos decápodos pueden ser presas de invertebrados, peces, aves, reptiles, mamíferos y otros crustáceos decápodos, incluso de la misma especie. Esta posición central los convierte en un eslabón fundamental en el traspaso de materia y energía dentro de las redes tróficas (Collins y col., 2006; 2007).

El alimento es ingerido con ayuda de los quelípedos, pereiópodos con modificaciones en el propodio y dactilo, conformando una “pinza” con dedo móvil (dactilo) y dedo fijo (propodio). Estos quelípedos son utilizados capturando o tomando los ítems alimenticios y luego llevándolos a la boca, donde es ingerido con ayuda de las mandíbulas, maxilas y maxilulas. En este momento comienza su recorrido por el sistema digestivo. Este sistema está diferenciado en tres zonas: anterior o “foregut”, media o “midgut” y posterior o “hindgut” (Icely y Nott, 1992). La zona anterior (foregut) incluye boca, esófago, estómago cardíaco y pilórico, entre otras estructuras. Las funciones principales de la zona anterior incluyen la disgregación física del material ingerido por masticación, inicio de la disgregación química del material producido por enzimas digestivas, separación de los materiales finos y fluidos de los materiales gruesos a través de filtración y transporte de las partículas finas a su posterior tratamiento. La zona media (midgut) está compuesta por hepatopáncreas e intestino. Entre las funciones principales de esta zona se encuentran las de completar la disgregación del alimento recibido desde la zona anterior, producir y enviar enzimas digestivas a esta, absorber y procesar los productos digestivos, transportarlos a la hemolinfa o reservarlos y remover el material residual (producción de heces). La zona posterior (Hindgut) transporta el material de desecho proveniente de la zona media hacia el exterior. Es un tubo circular simple que conecta a la zona posterior del intestino con el ano (Icely y Nott, 1992).

La zona media está dominada por el hepatopáncreas, el órgano más importante tanto en volumen como en complejidad y funcionalidad. Este es un órgano grande

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
(Decapoda, Trichodactylidae)*

distribuido a ambos lados de la línea central de la región del cefalotórax de los animales ubicado dorsalmente de manera simétrica. El conducto primario que proviene del estómago pilórico se divide en su parte posterior en dos ductos secundarios, uno hacia cada lado del individuo. Este se ramifica en ductolos, cada uno de los cuales termina en un complejo de túbulos ciegos bañados en hemolinfa. Cada túbulo está compuesto de una capa simple de epitelio envuelta en una lámina basal, soportadas por un entramado muscular (Icely y Nott, 1992; Vogt, 2002). A través de los túbulos circula el alimento, siendo procesado y digerido por las células del epitelio, las cuales poseen microvellosidades en la zona de contacto con el lumen (zona apical), aumentando la superficie de contacto.

En los túbulos del hepatopáncreas se encuentran cinco tipos de células diferentes, con funciones específicas en cada una de ellas. Las células E son células no especializadas donde el núcleo ocupa la mayor parte del volumen. Su función fundamental estaría relacionada con la reproducción celular, ya que es la única donde se han observado los procesos de mitosis. Las células F presentan un extenso retículo endoplasmático rugoso con numerosos ribosomas y mitocondrias distribuidas a través de toda la célula. Los complejos de Golgi son comunes y presentan generalmente cisternas dilatadas. Las células B, están dominadas por una gran vacuola rodeada por una fina capa de citoplasma. El núcleo está restringido a la región basal. Las células R son las más numerosas. En ellas el retículo endoplasmático rugoso y los ribosomas son escasos pero existe una alta densidad de mitocondrias principalmente en la zona apical del citoplasma. Estas células son los sitios de acumulación de lípidos y glucógeno. Las células M son las menos numerosas. El núcleo ocupa la mayor parte de la célula, estando confinado a un sector de esta debido al denso complejo de Golgi que ocupa el resto del volumen celular. No tienen contacto con el lumen (Icely y Nott, 1992).

Las células E, relativamente indiferenciadas y las únicas donde se observa mitosis, son identificadas como la fuente de todo el resto de las células. Sin embargo existe cierta disparidad acerca de los pasos posteriores en la secuencia de diferenciación celular. De acuerdo al esquema propuesto por Hirsch y Jacobs, el cual es avalado por diversos trabajos acerca de la citología del hepatopáncreas, las células E dan lugar separadamente tanto a las células R como a las células F, derivando de estas últimas las células B. Este esquema está soportado por las siguientes observaciones: las células R y F están localizadas adyacentes a las células E, las cuales son la única fuente de división

celular; las estructuras finas de las células B presentan mayores similitudes con las células F que con las células R; existen células con estructuras intermedias entre las células F y B; el número de células B a través de los túbulos es inversamente proporcional al número de células F; y la degeneración de las células R y B está descrita en las regiones proximales del túbulo, pero existen pocos trabajos describiendo la degeneración de la célula F; la mayoría de los trabajos sugiere que la célula F es un estadio en el desarrollo de la célula B (Icely y Nott, 1992). Sin embargo este esquema no es el único, ya que de acuerdo al esquema de Ogura propuesto en 1959 cada célula se desarrolla independientemente desde la célula E, sin existir transformaciones de una célula en otra (Vogt, 1985; 2002; Icely y Nott, 1992)

Las funciones principales del hepatopáncreas son las de producir enzimas digestivas y asimilar nutrientes. Cada uno de los tipos celulares desarrolla en este órgano una función diferenciada. Las enzimas digestivas son producidas por las células F y almacenadas en las vacuolas supranucleares, las cuales se expanden formando una gran vacuola de la célula B (de acuerdo al esquema de Hirsch y Jacobs). Las enzimas en esta vacuola son liberadas periódicamente luego de la ingestión de alimento. Algunos nutrientes y fluidos son absorbidos en las células F y B por pinocitosis y otros son asimilados en la célula R por contacto directo con las microvellosidades y el consecuente transporte molecular hacia el interior de la célula. Los productos finales de la digestión son transferidos hacia el hemocele o almacenados como lípidos y glucógeno en las células R (Icely y Nott, 1992).

Además de las funciones de digestión en el hepatopáncreas se desarrollan otros procesos vitales, como el mantenimiento del equilibrio osmótico y la producción de vitelo (vitelogenesis). El hepatopáncreas posee también funciones relacionadas con la remoción de cuerpos extraños, excreción de metabolitos de desecho de la hemolinfa (función inmunológica), y de detoxificación de metales y otras sustancias orgánicas (Icely y Nott, 1992; Vogt, 2002).

De acuerdo a Vogt (2002), los sitios de acumulación están relacionados también con los sitios de detoxificación, particularmente si el mecanismo de detoxificación es la excreción de reservas lisosomales. El hepatopáncreas de los crustáceos es un sitio de acumulación de metales y ciertos contaminantes orgánicos (Menone y col., 2000; 2004; 2006; Marchese y col., 2008; Gagneten y col., 2008; 2012). En este órgano se han detectado también sistemas de detoxificación que estarían relacionados con la

eliminación de compuestos orgánicos e inorgánicos, tales como el citocromo P450, lisosomas y proteínas similares a metalotioneinas, las cuales se relacionan con la captación metales que luego son eliminados. El sistema citocromo P450 y las metalotioneinas son parte integral de procesos fisiológicos normales como el metabolismo de esteroides y del cobre, respectivamente. Estos mismos mecanismos pueden ser incrementados por la exposición a contaminantes, los cuales serían detoxificados por estos medios (Vogt, 2002).

La exposición a metales, plaguicidas y toxinas naturales como la microcistina puede producir modificaciones en el hepatopáncreas tanto a nivel histológico como a nivel celular (Bhavan y Geraldine, 2000; 2009; Kutlu y col., 2005; Bianchini y Monserrat 2007; Yang y col., 2007; Wu y col., 2008). La exposición a plaguicidas puede producir el aumento de las células F, las cuales están encargadas de producir proteínas (enzimas) capaces de degradar estos compuestos. El aumento de células B también podría estar relacionado con procesos de detoxificación, ya que en las grandes vacuolas típicas de este tipo de célula se pueden encontrar enzimas digestivas, como la catepsina L, las cuales podrían también atacar a los compuestos orgánicos (Collins, 2010). Kölher y col. (1998), observaron P-glicoproteínas (P-gp) en células transicionales F/B del cangrejo *Carcinus maenas*. De acuerdo a estos autores, las células F serían los sitios donde se sintetizan las enzimas que actúan sobre los compuestos tóxicos orgánicos, cuyos productos degradados son eliminados al lumen por la célula B originada a partir de aquella célula. Los compartimentos de lisosomas se fusionan en una gran vacuola antes de que esta célula sea eliminada al lumen. En estos compartimentos de la célula transicional F/B se observan las P-glicoproteínas, sin observarse ni en la células F ni en las células B. Los transportadores MXR presentes en las membranas lisosomales podrían funcionar tomando los compuestos tóxicos desde el citoplasma y encerrándolos en el compartimento lisosomal que luego será eliminado al lumen al “envejecer” la célula B, incorporándose a las heces. De este modo, el hepatopáncreas podría estar cumpliendo las funciones de detoxificación (Kölher y col., 1998).

Además de producir diferencias en la composición celular, la exposición a plaguicidas y a metales puede provocar diversas histopatologías. Entre las patologías observadas en el hepatopáncreas de crustáceos decápodos se encuentran las modificaciones en las microestructuras celulares, anormalidades en el lumen, el cual

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

generalmente pierde su aspecto de estrella, delaminación del epitelio, infiltración de hemocitos, entre otros (Vogt, 1987; Bhavan y Geraldine, 2000; 2009; Kutlu y col., 2005; Bianchini y Monserrat 2007; Yang y col., 2007; Wu y col., 2008; Abad-Rosales y col., 2010).

Los efectos histopatológicos producidos en el hepatopáncreas por la exposición a plaguicidas puede afectar a las funciones de digestión de alimentos que posee este órgano. Además de las funciones digestivas en el hepatopáncreas se desarrollan otros procesos relacionados con la producción de hormonas y lipoproteínas (vitelinas). las cuales influyen en el desarrollo gonadal (Harrison 1990; Lubzens y col., 1995; Rodríguez y col., 2000). De acuerdo a Icely y Nott (1992), cualquier efecto producido por un contaminante en el hepatopáncreas tendrá su correlato tanto en la alimentación de los crustáceos decápodos como en el ciclo de muda y la reproducción.

Desarrollo gonadal

En el desarrollo gonadal de las hembras de crustáceos decápodos pueden diferenciarse dos etapas. La primera se denomina previtelogénesis o vitelogénesis temprana (Jonshon, 1980; Charniaux-Cotton, 1985; Meusy y Payen, 1988; Krol y col., 1992), mientras que la segunda se denomina etapa de vitelogénesis. Esta a su vez se subdivide en otras dos etapas, vitelogénesis primaria o endógena y secundaria o exógena. En esta última, el hepatopáncreas cumple un rol fundamental ya que este órgano sería el sitio de producción del material nutricional exógeno ajeno al ovario (Charniaux- Cotton, 1985; Krol y col., 1992; Tsukimura, 2001).

La previtelogénesis está caracterizada por el incremento en la actividad de las organelas citoplasmáticas, acumulación de ribosomas y desarrollo de retículo endoplásmico rugoso, el cual produce glicoproteínas granulares que se almacenan en las vesículas (Charniaux-Cotton, 1980). La vitelogénesis es una etapa de producción y acumulación de vitelo en el ovocito en desarrollo. Este vitelo está compuesto por agua, proteínas, lípidos y otros nutrientes necesarios en el desarrollo de los embriones, tanto materiales estructurales como compuestos utilizados como sustrato energético. La lipovitelina es la proteína principalmente identificada en la mayoría de los ovocitos, cuyo precursor molecular es la vitelogenina, una carotenoglicoproteína que solo

ocurre en hembras en maduración (similar a las proteínas femeninas específicas de los insectos) (Browdy y col., 1990; Harrison, 1990).

La producción del vitelo, si bien existe cierto debate, tendría un origen mixto. En un primer momento ocurriría producción de vitelogenina dentro del ovario (vitelogénesis endógena), como se ha observado en los decápodos como *Homarus americanus*, *Uca pugilator*, *Penaeus japonicus*, entre otros (Krol y col., 1992). El sitio de síntesis podría ser las células foliculares, las cuales secretan vitelogenina a la hemolinfa captada luego por los ovocitos en desarrollo (Yano y Chinzei, 1987). En algunas especies incluso se propone a los ovarios como el único sitio de síntesis de vitelogenina. Durante la etapa de vitelogénesis primaria o endógena, donde las glicoproteínas del vitelo son producidas dentro del retículo endoplásmico rugoso y complejos de Golgi del citoplasma, el crecimiento de tamaño de los ovocitos es lento (Krol y col., 1992).

En la segunda etapa la producción de vitelogenina se realizaría fuera de los ovarios (vitelogénesis exógena). El sitio extraovárico donde se ha detectado la producción de vitelinas y vitelogeninas es el hepatopáncreas, en estructuras denominadas vitelogenocitos, aunque también existe evidencia de que la vitelogenina es producida por los hemocitos, en los tejidos conectivo subepidérmico y adiposo subepidérmico. La vitelogenina producida en el hepatopáncreas es transportada por la hemolinfa hacia los ovocitos. Estos poseen abundantes microvellosidades, las cuales son desarrolladas durante esta etapa facilitando el ingreso de material exógeno por micropinocitosis (Krol y col., 1992). Paulus y Laufer (1987) demostraron que la máxima síntesis de vitelogenina en el hepatopáncreas se corresponde con el período de micropinocitosis en los ovocitos de *Carcinus maenas*, la cual declina a medida que el ovocito madura y disminuye la tasa de pinocitosis. En la etapa de vitelogénesis exógena se observa una rápida acumulación de vitelinas y un rápido crecimiento gonadal. (Paulus y Laufer, 1987; Harrison, 1990; Krol y col., 1992). A medida que se produce la maduración de los ovarios se observa un aumento en su tamaño, mientras que se observa una reducción en los lípidos del hepatopáncreas debido a la migración que se produce desde un órgano a otro, la cual está influenciada también por el aumento en la actividad biosintética durante la maduración (Harrison, 1990). Una vez completado el desarrollo gonadal y producida la ovipostura pueden observarse niveles de vitelogenina circulantes en hemolinfa, los cuales son atribuidos a la reabsorción de los ovarios, es

decir, de las lipovitelinas que componen los ovocitos en degeneración luego de la ovipostura. Estas lipovitelinas circulan desde el ovario al hepatopáncreas donde ocurren la reabsorción y eliminación o la acumulación y reutilización en el nuevo ciclo gonadal (Harrison 1990).

Los procesos reproductivos están regulados por complejos procesos hormonales, principalmente la hormona inhibitoria de la gónada o de la vitelogenina (GIH o VIH por sus siglas en inglés), la cual es producida en el complejo órgano X – glándula del seno ubicado en el pedúnculo ocular, y la hormona estimuladora de la gónada (GSH), sintetizada en el cerebro y el ganglio torácico (Vogt, 2002; Zapata y col., 2003).

Bioconcentración de plaguicidas en tejidos

El término bioconcentración se refiere a la acumulación neta de un compuesto en un organismo o parte de este a partir de su presencia en el medio que lo rodea. Los efectos producidos por los contaminantes están íntimamente relacionados con la capacidad de bioconcentración de estos en los diferentes tejidos (Newman y Unger, 2003).

Los contaminantes presentes en el ambiente pueden ingresar a los organismos acuáticos a través del tegumento, las branquias y el sistema digestivo. Estas son las tres vías de ingreso reconocidas como las más importantes (Newman y Unger, 2003). Los contaminantes ingresados, cualquiera sea la vía de ingreso, alcanzan la hemolinfa y a través de esta, se distribuyen hasta otros compartimentos dentro del organismo. Luego del ingreso en cada individuo, los contaminantes pueden ser eliminados por branquias, orina, heces o vía dermal, ya sea del mismo compuesto ingresado o como metabolito, luego de su transformación biológica (Rand y Petrocelli, 1985; Newman y Unger, 2003).

Cuando un organismo se encuentra expuesto a un contaminante comienzan los procesos de ingreso (“uptake”), los cuales en los primeros momentos tienen mayor preponderancia que los procesos de eliminación. A medida que las concentraciones del contaminante acumuladas en los individuos aumentan, lo mismo ocurre con las cantidades eliminadas. Finalmente, cuando las concentraciones internas son similares a las concentraciones de contaminante presentes en el ambiente se produce un equilibrio entre ingreso y eliminación. Este estado, denominado estado estacionario, se mantendrá

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
(Decapoda, Trichodactylidae)*

siempre y cuando se mantengan constantes las concentraciones en el ambiente (Newman y Unger, 2003). Así, una vez alcanzado el estado estacionario, las concentraciones de contaminantes medidas en los tejidos o en los individuos completos podrían ser un buen indicador de las concentraciones existentes en los compartimentos ambientales (agua, sedimentos, etc.).

Una vez que los contaminantes ingresan a un individuo están disponibles para su biotransformación, es decir, su transformación mediada biológicamente desde un compuesto hacia otro. Esta puede incrementar la tasa de eliminación, detoxificación e incluso redistribución. Los contaminantes lipofílicos pueden ser transformados a compuestos más hidrofílicos, facilitando su eliminación. Algunos compuestos pueden ser transformados a formas no tóxicas, otros a compuestos que, aunque no son eliminados, son “almacenados” fuera de los sitios de acción. En algunos casos incluso, los procesos de biotransformación pueden favorecer la activación del contaminante, convirtiéndolo en un compuesto aún más tóxico que el compuesto original, como en el caso del paratión transformado en paraoxon (Newman y Unger, 2003).

Los metales son elementos químicos que no pueden de ser degradados naturalmente a formas más sencillas. Algunos metales son esenciales en la vida ya que son partes constituyentes de enzimas, catalizadores biológicos de reacciones químicas dentro de las células (Schmidt-Nielsen, 1997; Walker y col., 2001). La exposición de crustáceos decápodos y otros organismos acuáticos a metales, además de producir diferentes efectos tóxicos propios, puede resultar en la bioacumulación de estos en diferentes órganos, como hepatopáncreas, músculos, caparazón, gónadas y branquias (Mortimer, 2000; Al-Mohanna y Subrahmanyam, 2001; Marchese y col., 2008; Gagneten y col., 2008; 2012; Kouba y col., 2010).

Algunos compuestos orgánicos son potencialmente acumulables debido a sus propiedades intrínsecas. Una de las más importante es la lipofilidad, usualmente expresada a través del coeficiente de partición octanol/agua, ya que los compuestos hidrofílicos son más fácilmente eliminados (Varó y col., 2002; Newman y Unger, 2003; Menone y col., 2004, Santos de Souza y col., 2008). En varias especies de peces ha sido observada la existencia de una buena correlación entre el factor de bioconcentración de un compuesto y el coeficiente de partición octanol – agua (Miranda y col., 2008). Otro de los requisitos necesarios es la estabilidad, ya sea del compuesto parental como de sus metabolitos. Un compuesto poco estable puede ser rápidamente biotransformado,

generalmente siguiendo rutas metabólicas de oxidación, que aumentan la polaridad de la molécula, modificando su toxicidad y la capacidad de ser eliminado (Rand y Petrocelli, 1985; Newman y Unger, 2003).

Entre los compuestos orgánicos bioacumulables, los plaguicidas organoclorados y los bifenilos policlorados (PCBs por sus siglas en inglés) son los más detectados, ya que son persistentes (poseen una alta vida media) y son altamente liposolubles. Debido a esta lipofilia, los órganos que poseen una alta concentración lipídica son potencialmente sitios de acumulación de estos biocidas, ya que existe una correlación positiva entre el contenido lipídico de los tejidos y las concentraciones de compuestos orgánicos persistentes (Miranda y col., 2008).

La translocación de plaguicidas lipofílicos hacia tejido lipídicos no blanco puede ser un mecanismo involuntario de resistencia a biocidas, ya que de esta manera se disminuyen las concentraciones en los sitios de acción (órgano blanco).

El hepatopáncreas tiene un activo rol en la producción y envío de reservas lipídicas (lipovitelinias) al ovocito, las cuales son utilizadas como suministro de reservas energéticas y materiales estructurales en el futuro embrión en desarrollo. Junto con estas lipoproteínas los xenobióticos lipofílicos podrían transportarse a través de la hemolinfa hacia los ovocitos (Lee y col, 1993; Wirth y col, 2001). Estos actuarían como un sitio final de acumulación, ya que no posee estructuras que les permitan eliminar estos plaguicidas (Lee y col., 1993). Como ejemplo de esto, las hembras de *Palaemonetes pugio* serían más resistentes que los machos a compuestos lipofílicos como endosulfán debido a que transfieren parte de estos plaguicidas a los ovocitos (Wirth y col., 2001). Estos ovocitos actuarían como sitio de almacenaje de este biocida, así como de otros cuyo coeficiente de partición indican una mayor tendencia hacia los lípidos (Lee y col., 1993). De esta manera disminuye su acumulación y acción en los sitios blancos, disminuyendo la toxicidad hacia la hembra (Wirth y col., 2001).

Debido a que la acumulación de biocidas en tejidos está íntimamente relacionada con la contaminación de los sistemas acuáticos, ya que a diferencia de los metales no deberían existir concentraciones de xenobióticos en la naturaleza, la determinación de concentraciones de plaguicidas en tejidos indicaría la existencia de eventos de contaminación. Diversos autores han relacionado la presencia de diferentes concentraciones de xenobióticos en tejidos de cangrejos y en otros compartimentos ambientales con la contaminación producida, ya sea en el mismo sitio o luego de su

traslado desde las fuentes de contaminación (Menone y col., 2000; 2004; 2006; Santos de Souza y col., 2008).

Metabolismo

Los crustáceos decápodos son organismos aeróbicos, que necesitan del oxígeno molecular en los procesos de oxidación y obtención de energía. La cantidad de oxígeno consumido durante la respiración, así como del dióxido de carbono eliminado como producto de la oxidación, está íntimamente relacionada con la actividad metabólica del individuo (Schmidt-Nielsen, 1997; Mente, 2003). Así, la medición del consumo de oxígeno puede ser utilizada como un buen indicador de la tasa metabólica de las especies. Además, como el oxígeno consumido es utilizado en la oxidación como mecanismo de obtención de energía, el consumo de este puede ser utilizado como un estimador de energía utilizada por un individuo (Pillai y Diwan, 2002).

El metabolismo así como también el gasto energético pueden variar debido a diferentes factores internos y externos, tales como el tamaño corporal, sexo, actividad, etapa del ciclo de muda, temperatura, entre otros (Newman y Unger, 2003). Además, el gasto energético y el consumo de oxígeno pueden verse afectados por la exposición a compuestos químicos contaminantes como los plaguicidas (Montagna y Collins, 2008).

Además del dióxido de carbono, los crustáceos decápodos liberan al medio acuático compuestos nitrogenados, especialmente bajo la forma de amonio, ácido úrico y urea. Este nitrógeno proviene del catabolismo de aminoácidos y amidas, la degradación de los ácidos nucleicos y la desaminación de purinas y urea. Este nitrógeno amoniacal es principalmente excretado a través de las branquias, aunque también se excreta a través de las glándulas antenales y el tegumento (Parry, 1960; Kormanik y Cameron, 1981; Pequeux y Guilles, 1981). La cantidad de productos nitrogenados excretados varía según factores internos y externos entre ellos dieta, etapa del ciclo de muda, salinidad y temperatura (Schmidt- Nielsen, 1997). La exposición a plaguicidas también puede modificar las tasas de excreción de estos compuestos nitrogenados (Montagna y Collins, 2008).

La relación entre el oxígeno consumido y el nitrógeno excretado es un buen indicador del estado metabólico y del recurso energético utilizado en la obtención de energía. Valores de relación entre equivalentes atómicos de oxígeno consumido y

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulceacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

nitrógeno excretado (relación O:N) mayores a 24 indican un mayor metabolismo de lípidos, mientras que un valor menor a 24 indica un metabolismo dominado por el consumo de proteínas (Pillai y Diwan, 2002). Un mayor consumo relativo de proteínas en relación al catabolismo de carbohidratos y lípidos es generalmente utilizado como indicador de estrés, como puede ser la exposición a plaguicidas (Pillai y Diwan, 2002; Montagna y Collins, 2008).

Crustáceos decápodos dulceacuícolas de América del sur y problemática regional

En América del Sur se encuentra una variada fauna de crustáceos decápodos dulceacuícolas agrupadas en 7 familias que representan cuatro morfotipos diferentes. En el tramo medio del río Paraná el número de familias se reduce a 4; los camarones de las familias Sergestidae y Palaemonidae, los pseudo-cangrejos de la familia Aeglidae y los cangrejos de la familia Trichodactylidae. El número de especies descritas es de 13, las cuales están mayormente incluidas en las comunidades litorales de sistemas lóticos y leníticos, ya que esta zona posee una alta heterogeneidad de biotopos capaces de soportar mayores valores de diversidad y abundancia biológica (Bliss, 1989; Collins y col., 2007). La conquista del agua dulce en crustáceos decápodos sudamericanos pudo haber comenzado con el ingreso de la familia Trichodactylidae a través del río Amazonas o la región de la Mata Atlántica. En el caso de los camarones el ingreso pudo haberse dado por América central y por los grandes ríos de Sudamérica mientras que en el caso de la familia Aeglidae como también la familia Parastacidae el ingreso habría ocurrido por el río de la Plata o por el océano Pacífico, en la zona ocupada actualmente por Chile y Perú. Más allá del punto de ingreso a los sistemas continentales, algunas especies de estas familias se establecieron en el sistema del río Paraná, a través de la dispersión por diferentes conexiones relacionadas con los cambios en los sistemas hídricos ocurridos desde la formación del sistema (Collins y col., 2007).

En el tramo medio del río Paraná se encuentran los cangrejos *Trichodactylus borellianus*, *Poppiana argentiniana*, *Valdivia camerani*, *Silviocarcinus australis*, *S. pictus*, *Dilocarcinus pagei*, *D. septemdentatus*, *Zilchiopsis oronensis* y *Z. collastinensis* (Collins y col., 2007). Los cangrejos del género *Zilchiopsis* son cangrejos cavadores ampliamente distribuidos en las cuencas de los principales ríos de Sudamérica. *Zilchiopsis collastinensis* es un cangrejo de gran porte (entre 35 y hasta 60 mm de ancho

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
(Decapoda, Trichodactylidae)*

de cefalotórax medido en la segunda espina del caparazón en los adultos) propio del tramo medio de este río. Habita las márgenes de los sistemas lóticos y leníticos, siendo encontrados en cuevas realizadas en las riberas y entre la vegetación, tanto flotante como arraigada (Melo, 2003). Estos cangrejos son animales de hábito crepuscular o nocturno, netamente bentónicos, caminadores, con ocasionales salidas a la zona terrestre, donde se alimentan y realizan actividades relacionadas con la disputa por el territorio y la reproducción, entre otras (Collins, comunicación personal). Así como otros cangrejos, poseen un exoesqueleto endurecido y han adquirido la capacidad de aislarse del medio cerrando su cámara branquial, cumpliendo funciones más parecidas a un pseudo pulmón (Ruppert y Barnes, 1994; Collins y col., 2007).

Debido a la capacidad de conectar los sistemas acuáticos y terrestres, estos cangrejos cumplen un importante papel en las redes tróficas de las zonas ribereñas, transfiriendo materia y energía entre ambos sistemas. Entre los ítems alimenticios que consumen, los cuales se modifican a medida que los individuos crecen, se pueden encontrar larvas de insectos, oligoquetos, crustáceos, peces, material vegetal, así como también otros cangrejos, incluso de la misma especie. A su vez, los diferentes estadios de cangrejos pueden ser presas de insectos, peces, aves, reptiles y mamíferos (Williner y Collins, 2002; Collins y col., 2007; Williner, 2009). El hecho de ocupar una posición intermedia en las redes tróficas, transformar celulosa en proteínas al alimentarse de material vegetal, devolver materia y energía proveniente de organismos muertos y conectar los sistemas acuáticos y terrestres los convierte en un componente clave en la dinámica de los ecosistemas acuáticos (Williner, 2009).

En las regiones templadas existe una marcada diferenciación a través del año en la temperatura, en el régimen de lluvias y períodos e intensidad de la luz (fotoperíodo). Además, el sistema Paraná posee ciclos de crecientes y bajantes que se repiten con cierta regularidad durante el año, inundando el valle durante las crecientes y luego restringiéndose a su cauce normal. Los crustáceos decápodos adaptaron sus ciclos reproductivos de acuerdo con estas variaciones, ocurriendo la eclosión de las crías durante primavera y verano, época con mayor superficie inundada y temperaturas más altas, favorecidas por la heterogeneidad del ambiente y productividad del sistema. *Zilchiopsis collastinensis* es un cangrejo cuya ovipostura puede observarse durante primavera - verano (Collins, comunicación personal). Como otros decápodos dulceacuícolas, presentaría huevos grandes, períodos de incubación extendidos con

eclosión de juveniles, y cuidados parentales extendidos, aunque todavía son escasos los estudios ecológicos relacionados con estos temas en esta especie.

Las mayores aplicaciones de plaguicidas, sobre todo de insecticidas, también se realizan durante primavera y verano, ya que durante esta época los insectos plaga se encuentran en mayor actividad debido a las altas temperaturas (Rodríguez y Amin, 1991; CASAFE, 2007). Durante estas estaciones del año se observan además los mayores eventos de lluvia, favoreciendo la escorrentía y la asociada contaminación de los sistemas acuáticos con plaguicidas, la cual puede persistir en el ambiente (Lenardón y Enrique, 1998; Lenardón y col., 1998; Jergentz y col 2004; 2005; Silva y col 2005).

Uno de los efectos que producen los plaguicidas más fácilmente observable es la muerte de los individuos. Como todo compuesto, los diferentes plaguicidas son letales a determinada dosis en los individuos. La sensibilidad de estos depende de varios factores. Por un lado, los inherentes a los organismos vivos, como estadio de vida, sexo, condición nutricional, entre otros. Pero además se relaciona con las variables físico-químicas del ambiente al momento de la exposición, el tipo de compuesto y modo de acción de este.

Entre los plaguicidas mayormente aplicados se encuentran los herbicidas e insecticidas. Estos últimos son altamente tóxicos hacia los crustáceos debido a la proximidad filogenética que existe entre estos y los insectos (ambos pertenecen al filum Arthropoda), organismos blanco de los insecticidas (Montagna y Collins, 2004; 2005; 2007; 2008; Montagna 2010). Sin embargo los cangrejos, los cuales tienen menor superficie de exposición que otros morfotipos, exoesqueletos más duros y la capacidad de cerrar su cámara branquial, podrían ser más resistentes a insecticidas que otros morfotipos.

La exposición de los huevos a estos biocidas también podría causar efectos letales. Los embriones suelen ser reconocidos como un estadio sensible, ya que tienen menos capacidad de resistir los cambios físico-químicos del ambiente y la exposición a plaguicidas (Amstrong y Milleman, 1974; Barnes y col., 1993; Lee y Oshima, 1997). Sin embargo, el aislamiento que provoca el corion engrosado en los organismos dulceacuícolas podría también reducir los efectos que ocasionarían en los embriones, como lo observado en *P. pugio* (Key y col., 2003).

La exposición a concentraciones subletales podría causar también efectos sobre los embriones, los cuales se evidenciarían en las diferencias en el tiempo de incubación,

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

el número de embriones que logran eclosionar, la presencia de malformaciones e incluso la disminución de la supervivencia de los juveniles, como lo observado otras especies de cangrejo (Rodríguez y Pisanó, 1993; Lee y col., 1996; Lee y Oshima, 1998).

En los adultos, la exposición a contaminantes y compuestos orgánicos en concentraciones más bajas a las concentraciones letales puede provocar efectos subletales observables en niveles de organización biológica menores. Entre algunas de esta acciones, la exposición a plaguicidas, metales, hidrocarburos o toxinas de origen natural pueden causar modificaciones en la distribución celular en hepatopáncreas (número de células por túbulo) e histopatologías, como se ha observado en camarones y cangrejos (Bhavan y Geraldine, 2000; 2009; Pinho y col., 2003; Sreeram y Menon 2005; Collins y col., 2010). La exposición a estos compuestos también podrían causar daños o efectos en las gónadas *Z. collastinensis* (diferencias en el índice gonadal, diferencias en el desarrollo de los ovocitos, modificaciones en el porcentaje de ovocitos atrésicos), como ocurre en algunos cangrejos, ya sea por efecto directo o indirectamente al afectar el hepatopáncreas o el balance hormonal (Reddy y col., 1983; Rodríguez y col., 1994; Lee y col., 1996; Rodríguez y col., 2000; Medesani y col., 2004; Yamaguchi y col., 2008).

Además, estos plaguicidas lipofílicos podrían ser acumulados en tejidos altamente lipídicos, como hepatopáncreas y gónadas, en mayores proporciones que en tejidos con menor contenido lipídico como músculos (Menone y col., 2000; 2004; 2006; Pinho y col., 2003).

Por otra parte, la exposición de los juveniles de *Z. collastinensis* a concentraciones subletales de estos plaguicidas podría causar modificaciones en el metabolismo de los juveniles, ya que en algunas especies, tanto de crustáceos como de peces, se han observado cambios en el consumo de oxígeno y en la excreción de nitrógeno (Rao y col., 1981; Rodríguez y Monserrat, 1991; Williner y Collins, 2003; Montagna y Collins, 2008; Barbieri, 2009).

A pesar de la importancia de los cangrejos en los sistemas fluviales y de la contaminación de los sistemas acuáticos cercanos a las zonas agrícolas, lo cual provoca la constante presencia de diferentes concentraciones de plaguicidas en ríos y arroyos, pocos son los trabajos desarrollados acerca del efecto que estos producen no solo sobre *Z. collastinensis*, sino también en el resto de los cangrejos pertenecientes a la familia Trichodactylidae.

HIPÓTESIS GENERAL

La exposición a diferentes concentraciones de endosulfán y clorpirifos causa efectos letales y subletales sobre el cangrejo cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae).

HIPÓTESIS PARTICULARES:

H₁: La toxicidad de formulaciones comerciales conteniendo endosulfán y clorpirifós es mayor en adultos que en embriones de *Z. collastinensis*.

H₂ La exposición de adultos de *Z. collastinensis* a concentraciones subletales de formulaciones comerciales conteniendo endosulfán y clorpirifós produce efectos en gónadas y alteraciones histológicas en hepatopáncreas.

H₃: Los adultos de *Z. collastinensis* expuestos a concentraciones subletales de formulaciones comerciales conteniendo endosulfán acumulan este biocida mayormente en órganos como hepatopáncreas y gónadas.

H₄: La exposición de huevos de *Z. collastinensis* a concentraciones subletales de formulaciones comerciales conteniendo endosulfán y clorpirifós provoca alteraciones a nivel de huevos, embriones y cangrejitos eclosionados.

H₅: La exposición a concentraciones subletales de formulaciones comerciales de biocidas conteniendo endosulfán modifica el metabolismo de *Z. collastinensis*.

OBJETIVO GENERAL:

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
(Decapoda, Trichodactylidae)*

Determinar efectos letales y subletales producidos por formulaciones comerciales de Endosulfán y Clorpirifós en individuos del cangrejo cavador *Zilchiopsis collastinensis*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de formulaciones comerciales de Endosulfán y Clorpirifós en adultos y embriones de *Z. collastinensis*.

Reconocer efectos en gónadas y efectos histológicos en hepatopáncreas de adultos de *Z. collastinensis* expuestos a dosis subletales de formulaciones comerciales de Endosulfán y Clorpirifós.

Determinar la capacidad de bioacumulación de Endosulfán en hepatopáncreas, gónadas y músculo de adultos de *Z. collastinensis* expuestos a concentraciones subletales de formulaciones comerciales de estos biocidas.

Reconocer efectos de concentraciones subletales de Endosulfán y Clorpirifós sobre período de incubación, eclosión efectiva y supervivencia de las crías nacidas vivas de *Z. collastinensis*.

Reconocer efectos de endosulfán sobre el metabolismo de juveniles del cangrejo cavador *Z. collastinensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de los animales de experimentación y condiciones de cría y aclimatación.

En el cumplimiento de los objetivos planteados y de las hipótesis generadas se realizaron diversos ensayos utilizando animales obtenidos del ambiente. Los individuos de *Z. collastinensis* fueron recolectados en ríos, arroyos y lagunas pertenecientes a la llanura aluvial del Río Paraná (31°30'S, 60°41'W; Santa Fe, Argentina). Los sitios de recolección fueron escogidos luego de realizarse campañas exploratorias detectando zonas de alta densidad de cangrejos (cangrejales) alejadas de zonas de cultivo y áreas pobladas. En esas áreas también se realizaron muestreos de agua y de cangrejos descartando la presencia de estos plaguicidas en los tejidos (niveles por debajo de los límites de detección de las técnicas). Las recolecciones se realizaron mediante la utilización de redes de mano muestreando por debajo de la vegetación flotante, fundamentalmente de los embalsados ubicados en las orillas formados principalmente por *Eichhornia crassipes*; excavando las cuevas de cangrejos y mediante la recolección manual de aquellos animales que caminaban por las orillas, siendo este método mayormente utilizado durante las campañas al atardecer y durante la noche. Solo fueron recolectados aquellos individuos que demostraban comportamientos normales, presentaban la totalidad de sus pereopodos y en los cuales no se observaban anormalidades o daños.

Una vez recolectados se trasladaron en recipientes plásticos hacia el Instituto Nacional de Limnología (CONICET – UNL), junto con agua de los sitios de muestreo y vegetación acuática de la zona. Antes de comenzar la recolección de individuos se midieron diferentes parámetros abióticos como temperatura, oxígeno disuelto, pH, y conductividad del agua, mediante sensores tanto digitales como no digitales (termómetro de mercurio, Oxímetro Hanna HI 9146; pHmetro y conductímetro Hanna HI 98129).

Una vez en el INALI, estos contenedores fueron llevados a la sala de aclimatación y cría del instituto (Sala de bioensayos II). Esta sala cuenta con sistemas de control de temperatura a 25°C (acondicionadores de aire frío - calor) y fotoperíodo (relación luz – oscuridad 12 – 12 horas, luz fluorescente), tanques con agua declorada,

acuarios de diferentes dimensiones, red eléctrica, agua potable y mobiliario necesario (mesadas, alacenas, estanterías, entre otros). Luego de que el agua de los recipientes alcanzara la temperatura de la sala, los individuos fueron trasladados a los acuarios previamente acomodados para tal fin, disminuyendo el shock térmico y procurando reducir el estrés general. Estos acuarios fueron llenados con agua de clorada a 25°C, incluyendo rocas y tubos plásticos como refugios, aireadores eléctricos, especies animales acompañantes, como peces, moluscos y crustáceos, y plantas flotantes o sumergidas propias de la región. Estos animales fueron alimentados *ad libitum* con una formulación optimizada para crecimiento de crustáceos (Lordi y Collins, 1996) y músculos de pescado, además de utilizar como alimento moluscos, crustáceos, peces y plantas presentes en los acuarios. Cada dos o tres días se limpiaron los acuarios, disminuyendo la carga de materia orgánica y la proliferación de hongos y otros posibles patógenos asociados. Durante estos ciclos de limpieza se renovó aproximadamente el 30% del agua. En estas condiciones fueron mantenidos los individuos que luego fueron utilizados en los experimentos realizados para determinar la concentración letal media. Las hembras ovígeras, cuyos huevos fueron utilizados en experimentos con embriones y los juveniles utilizados en experimentos realizados con el objetivo de determinar efectos en el metabolismo, fueron mantenidos de la misma manera.

En el caso de los individuos utilizados en los experimentos de efectos subletales en gónadas y hepatopáncreas y bioconcentración de plaguicidas en estos tejidos, las hembras recolectadas fueron mantenidas en tanques de 2000 litros de capacidad llenados con aproximadamente 1000 - 1200 litros de agua de clorada, acompañados de piedras, tubos plásticos utilizados como refugios, plantas (flotantes y sumergidas), organismos pertenecientes al fito y zooplancton, moluscos, crustáceos y peces.

Estos tanques fueron mantenidos bajo condiciones ambientales de luz y temperatura, ya que los experimentos también se realizaron bajo estas condiciones. Los cangrejos fueron alimentados y limpiados de la misma manera que los cangrejos mantenidos dentro de la sala de aclimatación. Todos los animales fueron aclimatados por lo menos 14 días antes de ser utilizados en los experimentos.

Los plaguicidas utilizados fueron formulaciones comerciales comúnmente utilizadas en las actividades agrícolas, las cuales incluyen en su formulación no solo el principio activo, sino también solventes y otros coadyuvantes. Los resultados obtenidos con estas formulaciones comerciales, aunque puedan diferir de los resultados que se

obtendrían utilizando solamente el compuesto a evaluar (plaguicida grado técnico), serían más representativos de lo que sucede en el ambiente.

Los productos utilizados fueron endosulfán Zebra Red Surcos[®] (concentración de ingrediente activo: 35 g / 100 cm³) y clorpirifós Clorpi Red Surcos[®] (concentración de ingrediente activo: 48 g / 100 cm³). Las diluciones fueron realizadas en agua destilada ya que, aunque estos compuestos posean una baja solubilidad en agua (0,33 y 1,5 – 2 mg de plaguicida, respectivamente), poseen emulsionantes que permiten formular concentraciones en agua mayores a las permitidas por el producto puro (CASAFE, 2007). Las concentraciones de plaguicidas en agua fueron medidas a través de cromatografía gaseosa, de acuerdo al método 508 de la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 1989).

Ensayos de toxicidad aguda

Ensayos de toxicidad sobre adultos.

Los ensayos de toxicidad aguda fueron realizados siguiendo los métodos estandarizados utilizados para determinar toxicidad aguda en organismos dulceacuícolas y marinos (APHA, 1998; USEPA, 2002). Los individuos del cangrejo cavador *Z. collastinensis* utilizados en la determinación del valor de concentración letal media (CL 50) fueron recolectados en el período de Marzo - Agosto (Otoño – Invierno).

Los animales utilizados en estos experimentos fueron cangrejos adultos en intermuda, determinada por la dureza del caparazón, con totalidad de quelípedos, comportamiento normal y sin daños a simple vista. En el caso de ocurrir la ecdisis de alguno de los individuos durante la experimentación, tanto en estos como en cualquiera de los experimentos realizados, los animales fueron descartados y los datos obtenidos no fueron incluidos. Antes del comienzo de los bioensayos el ancho del cefalotórax de cada individuo a la altura de la primera espina del caparazón (sin tener en cuenta la espina ocular) fue medido con calibre digital (Schwyz electronic digital caliper). En ninguno de los experimentos el individuo más grande fue mayor que 1,5 veces el tamaño del más pequeño, criterio utilizado en las recomendaciones de bioensayos con peces (Reish y Oshida, 1987).

Los individuos fueron separados por sexo, con el objetivo de determinar la concentración letal media de cada plaguicida para cada sexo. Los machos de esta especie presentan un marcado comportamiento agonístico, el cual puede extenderse hasta la muerte de uno de los individuos (Negro y Senkman, 2009). Debido a este comportamiento, los individuos utilizados fueron encerrados en jaulas individuales y agrupados de a 4 individuos por acuario (réplica). Sin embargo, en los experimentos se encontraban las jaulas destruidas, quedando libres los individuos. Las peleas ocurridas luego del escape provocaron la muerte de los individuos más allá de los efectos de los plaguicidas. Por este motivo, la determinación de la concentración letal media fue realizada solamente en hembras, las cuales fueron dispuestas en jaulas individuales, debido a su comportamiento agonístico. Si bien las hembras desarrollan peleas, estas fueron menos intensas que en el caso de los machos. Sin embargo, luego de algunas peleas eventualmente ocurrió la muerte de algunos individuos.

Acuarios plásticos de 60 litros fueron utilizados, llenados con 30 litros de las soluciones utilizadas o con agua de clorada en el caso de los controles negativos. Cuatro individuos fueron colocados en cada réplica y cinco réplicas fueron realizadas por cada concentración, incluyendo los controles ($n = 20$ individuos por concentración; N total = 120 individuos en los ensayos de endosulfán; 140 individuos en los ensayos de clorpirifós). Las concentraciones utilizadas, escogidas luego de diversos experimentos preliminares, se citan en Tabla 1. Los bioensayos fueron realizados en la sala de bioensayos ecotoxicológicos del INALI, que se mantuvo a temperatura controlada a 25 ± 1 °C y fotoperíodo de 12:12 horas de luz/oscuridad (luz fluorescente). Las soluciones y el agua de clorada (control) fueron renovadas diariamente con el objetivo de mantener constante la concentración de plaguicidas (Varó y col., 2000). Las soluciones utilizadas en cada acuario fueron preparadas colocando los volúmenes de producto comercial en matraz de 2000 ml con 1000 ml de agua de clorada, agitado vigorosamente y distribuido en los 29 litros restantes en cada acuario. Las soluciones finales fueron homogeneizadas, se dejaron reposar por media hora y luego fueron tomadas las muestras de agua, determinando de las concentraciones de plaguicidas en agua. Estas muestras (500 ml de volumen) fueron tomadas aproximadamente a cuatro centímetros de fondo del acuario, la zona de la columna de agua que está más íntimamente en contacto con los cangrejos bentónicos. Las muestras fueron tomadas por duplicado en cada concentración, en botellas de color caramelo, secadas, rotuladas y conservadas en

heladera hasta el envío al laboratorio. Una vez tomada la muestra, se colocaron las jaulas con los cangrejos en las soluciones. Estas se renovaron cada 24 horas, preparando primero otro acuario para cada réplica de forma similar a la ya descrita y trasladando las jaulas hacia la nueva solución. Antes de realizar el traslado de las jaulas, el número de muertos fue registrado y estos fueron retirados. Los criterios para establecer la muerte de los individuos fue la ausencia total de movimiento al ser estimulado, comprobándose luego, una vez abiertas las jaulas, la completa laxitud de los quelípedos y falta de respuesta de los ojos al ser estimulados mecánicamente, de manera similar a lo recomendado por Rodríguez y Lombardo (1991). La muerte de los individuos fue registrada a las 24, 48, 72 y 96 horas. Los individuos no fueron alimentados durante el periodo de experimentación. En los experimentos con clorpirifós se adicionaron también aireadores para mantener altos los valores de oxígeno disuelto. Debido a la excitación producida por este insecticida organofosforado los cangrejos consumían el oxígeno disuelto en el agua antes de realizarse el recambio diario de los acuarios, afectando la supervivencia. En el caso de endosulfán, los valores de oxígeno disuelto medidos nunca fueron menores a 2 ppm, por lo cual se consideró suficiente el recambio diario de soluciones.

Los valores de CL_{50} con sus respectivos intervalos de confianza al 95% se calcularon mediante el método integrativo de PROBIT con corrección de Abbot para mortalidad en controles, utilizando en este cálculo los valores de concentración de plaguicidas medidas por cromatografía. El valor mínimo de supervivencia aceptable en los controles fue de 90%. Las diferencias en la supervivencia en función del tiempo fueron evaluadas con el test de Kruskal-Wallis seguidos del post test de Mann Whitney ($p < 0,05$) (Zar, 1996).

Ensayos de toxicidad sobre embriones.

Las hembras ovígeras de *Z. collastinensis* fueron recolectadas en la llanura de inundación del tramo medio del río Paraná (31°30'S, 60°41'W; Santa Fe, Argentina) a fines de la primavera (principios de Diciembre) y transportadas al INALI. Estas se matuvieron en las salas de aclimatación de la manera ya descrita hasta que los embriones alcanzaron el 5° estadio de desarrollo, en los cuales se observa presencia de pigmentación ocular y notorio latido del corazón (Yavar y Dupré, 2007). La

determinación de los estadios se realizó mediante la observación de algunos huevos bajo lupa. Este estadio fue escogido porque en experimentos preliminares observamos que al utilizar estadios menos desarrollados la mortalidad natural ocurría en un porcentaje superior al 10%.

Una vez alcanzado este estadio, los huevos fueron delicadamente removidos de las hembras con ayuda de un pincel y distribuidos en las diferentes concentraciones. Todos los experimentos con embriones fueron realizados *in vitro*, en incubadora a 25 ± 1 °C, sobre agitador de balanceo a 40 rpm bajo condiciones de oscuridad perpetua y con recambio diario de soluciones. Estas condiciones se utilizaron debido a que la ausencia de agitación provocó en los experimentos preliminares la proliferación de hongos, mientras que la iluminación causó la proliferación de algas filamentosas que envolvían los huevos y causaban la muerte de los embriones.

Los huevos, obtenidos de 4 hembras diferentes, se ubicaron en placas de Petri plásticas de dos compartimentos, llenados con 10 ml de agua de clorada (control) o concentraciones ascendentes de biocidas, cubriendo completamente los huevos. Estas concentraciones fueron realizadas en botellas de 500 ml de capacidad a las cuales se les adicionaron los volúmenes necesarios del producto comercial, agitándose luego vigorosamente para favorecer la homogeneización. Las concentraciones utilizadas fueron preparadas y renovadas diariamente. Muestras de estas soluciones fueron conservadas y enviadas para la determinación de las concentraciones de plaguicidas en agua.

Diez huevos se colocaron en cada compartimento. Cuatro réplicas se realizaron por concentración, con huevos provenientes de cada hembra colocados en cada réplica (n = 40 individuos por concentración, N total = 320 individuos por cada plaguicida). Las concentraciones utilizadas se citan en Tabla 1. Los embriones se observaron bajo lupa, contando y eliminándose los embriones muertos. El conteo fue realizado antes del recambio diario de las soluciones. El criterio de muerte utilizado fue la ausencia del latido del corazón, además del cambio de color que se produce en los huevos muertos (Figura 1).

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

Tabla 1: Concentraciones de endosulfán y clorpirifós nominales y medidas, media y (desvío estandard), utilizadas en la determinación de la concentración letal media.

Concentración	Endosulfán ($\mu\text{g l}^{-1}$)			
	Adultos		Embriones	
	Nominal	Medida	Nominal	Medida
C1	875	902 (36)	8000	10300 (1101)
C2	1250	1295 (101)	16000	17300 (363)
C3	1780	2076 (79)	32000	29900 (1039)
C4	2540	2681 (421)	64000	73500 (3636)
C5	3620	3126 (608)	128000	120800 (5106)
C6			256000	259700 (30815)
C7			512000	440800 (7375)

Concentración	Clorpirifós ($\mu\text{g l}^{-1}$)			
	Adultos		Embriones	
	Nominal	Medida	Nominal	Medida
C1	32	18.9 (2.68)	360	388.4 (15.65)
C2	64	53.1 (3.67)	720	509.4 (188,37)
C3	128	117.1(13.58)	1440	1528.69 (32.14)
C4	256	276.4 (10.82)	2880	2127.12 (178.14)
C5	512	361 (133.97)	5760	5977.52 (698.50)
C6	1024	1090 (21.71)	11520	9710.9 (409.21)
C7			23040	19312 (1272.65)

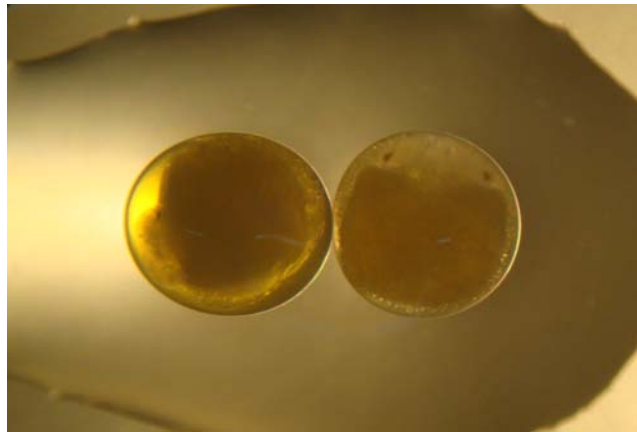


Figura 1: Embrión muerto (izquierda), caracterizado por la pérdida de la conformación general, cambio de color y ausencia de latido del corazón, y embrión vivo, donde se observan estructuras como ojos y pereopodos y latido del corazón (derecha) de *Z. collastinensis*.

Las concentraciones letales medias con sus respectivos intervalos de confianza al 95% se calcularon mediante el método PROBIT, de la misma manera descrita en los adultos. El valor mínimo de supervivencia aceptable en los controles fue de 90%. Las

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
(Decapoda, Trichodactylidae)*

diferencias en la supervivencia en función del tiempo fueron evaluadas con el test de Kruskal-Wallis seguidos del post test de Mann Whitney ($p < 0,05$).

Las concentraciones letales medias se compararon entre los diferentes estadios de vida (adultos – embriones) y entre los diferentes plaguicidas. La comparación entre pares de CL_{50} se evaluó mediante el cociente CL_{50} mayor / CL_{50} menor, existiendo diferencias estadísticamente significativas cuando tal estadístico fue mayor que el correspondiente valor crítico. Este valor se calculó en base al método estadístico recomendado por APHA (1978) (Rodríguez y Lombardo, 1991).

Efectos subletales de endosulfán y clorpirifós sobre hepatopáncreas y gónadas de adultos.

Los adultos del cangrejo cavador *Z. collastinensis* utilizados en estos experimentos fueron recolectados durante Agosto y Setiembre. Una vez recolectados el número de individuos necesarios y alcanzado un tiempo de aclimatación de entre 14 y 28 días, 180 cangrejos se colocaron en acuarios de 1 m² de superficie y 400 litros de capacidad, llenados con 200 litros de agua declorada o con concentraciones crecientes de endosulfán o clorpirifós (15 individuos por acuario). Antes del comienzo de los bioensayos el ancho del cefalotórax de cada individuo a la altura de la primera espina extraorbicular fue medido con calibre digital (Schwyz electronic digital caliper). El individuo más grande no fue mayor que 1,5 veces el tamaño del más pequeño, criterio utilizado en bioensayos con peces (Reish y Oshida, 1987).

Cada una de las réplicas recibió una única concentración de plaguicida. Los volúmenes necesarios de producto comercial de plaguicidas fueron diluidos en matraz de 2000 ml llenados con 1000 ml de agua declorada, vigorosamente agitados, homogeneizados y luego aplicados a los acuarios con los cangrejos, distribuyéndolo por toda la superficie. Tres concentraciones subletales fueron utilizadas, con una concentración inicial seguida por dilución con agua declorada libre de plaguicida, simulando la dilución propia de los sistemas naturales. Esta dilución se realizó a una tasa de 20 litros/día en un sistema de corriente continua, donde el agua excedente se evacuaba por rebalse a través de un caño de evacuación. Los acuarios fueron instalados dentro de invernaderos semi cerrados construidos con tela de media sombra, bajo condiciones naturales de temperatura y fotoperíodo, ya que estos factores podrían influir

en el desarrollo gonadal. Los cangrejos fueron alimentados *ad libitum* con músculo de pescado durante la tarde, y el excedente fue retirado a la mañana del día siguiente.

En el caso de clorpirifós, las concentraciones subletales utilizadas fueron aproximadamente 1/2; 1/4 y 1/8 de la $CL_{50-96horas}$ (50, 25 y 12,5 %), es decir, 80; 40 y 20 $\mu\text{g/litro}$ (Suryavanshi y col., 2009). En el caso de endosulfán, las concentraciones iniciales de plaguicidas fueron calculadas de acuerdo a las dosis recomendadas en la aplicación, de 0,75; 1,5 y 3 l de producto comercial/ha, equivalente a 400, 200 y 100 $\mu\text{g/litro}$. De esta manera se pretendió simular la posible contaminación producida durante las aplicaciones. Además, estas proporciones son semejantes a las recomendadas como subletales por Bhavan y Geraldine (2000). Las concentraciones de clorpirifós en agua fueron medidas al momento inicial y a los días 1, 2, 5 y 7. A partir de ese día no se detectaron concentraciones de clorpirifós en agua. Las concentraciones de endosulfán en agua fueron medidas al momento inicial y a los días 2, 8, 15 y 22. Las determinaciones de plaguicidas en agua se realizaron mediante cromatografía gaseosa. Un grupo control negativo, sujeto a las mismas condiciones que los grupos expuestos, fue realizado utilizando solo agua declorada. Tres réplicas de cada tratamiento, incluyendo los controles, fueron hechas. El oxígeno disuelto, pH y conductividad fueron medidos tres veces por semana antes de la alimentación. La temperatura del agua fue registrada dos veces al día.

Muestras de gónadas y hepatopáncreas fueron tomadas antes de comenzar los experimentos (Día 0) con el objetivo de reconocer el estado de los individuos previo a la aplicación de biocidas. Luego, estos tejidos fueron muestreados a los días 2, 8, 15 y 22 luego de la adición del plaguicida en el caso de los individuos expuestos a endosulfán. En el caso de los expuestos a clorpirifós, los muestras de estos tejidos fueron tomados a los 8, 15 y 22 días luego de la adición del plaguicidas. Este nuevo criterio de muestreo se utilizó ya que en los experimentos realizados con endosulfán, la respuesta tisular no se observó luego de 2 días de exposición (ver la sección resultados). Tres individuos fueron tomados en cada día de muestreo de cada réplica, totalizando nueve individuos por concentración por día. Los individuos muestreados fueron anestesiados en agua fría (1-3 °C). Una vez que no mostraban reacción ante estímulos, los cangrejos fueron medidos con calibre digital (ancho de cefalotórax a la altura de la primera espina extraorbital, según mencionado anteriormente) y pesados (peso húmedo: el excedente de agua fue eliminado previamente mediante papel secante). Luego, estos fueron

abiertos manualmente por su sector posterior y apoyados sobre una cama de hielo molido en placa de Petri de 145 mm. La gónada fue suavemente extraída, evitando la destrucción del hepatopáncreas y la consecuente liberación de enzimas. Esta se pesó en balanza analítica (Ohaus CS 200). Los índices gonadosomáticos fueron calculados de acuerdo a la fórmula $IGS = (\text{peso húmedo de la gónada} / \text{peso húmedo total}) \times 100$ (n = 6 hembras por concentración y día) (Medesani y col., 2004).

Pequeñas alícuotas de cada gónada fueron extraídas y fijadas en solución de Bouin durante 4 horas a temperatura ambiente y luego preservadas en alcohol al 70%. Al momento de la medición, los ovocitos fueron suavemente extraídos de los ovarios y fotografiados bajo lupa con escala milimétrica. Los largos de los ejes mayor y menor fueron medidos con el programa TPSdig (versión 1.40). El volumen de los ovocitos fue calculado de acuerdo a la fórmula

$$V_o = 1/6 (a \cdot b^2 \cdot \pi)$$

donde a = eje mayor y b = eje menor (Corey y Reid 1991). Diez ovocitos por cada réplica fueron seleccionados al azar siendo un total de 30 ovocitos medidos por concentración y día.

Los ovocitos correspondientes a las muestras provenientes de los ensayos realizados con clorpirifós fueron fotografiados inmediatamente después de la extracción de la muestra (en fresco) bajo lupa con escala milimétrica. El largo de los ejes y el volumen de los ovocitos fueron calculados de la manera previamente descrita.

La proporción de ovocitos descritos por Rodríguez y col. (1994) como atrésicos, los cuales presentan color blancuzco, menor tamaño y contornos irregulares, fue calculada mediante el conteo de este tipo de ovocito cada 100 ovocitos totales. El porcentaje de estos ovocitos fue calculado mediante la fórmula

$$\% \text{ ovocitos atrésicos} = (n^\circ \text{ ovocitos atrésicos} / n^\circ \text{ de ovocitos totales}) \times 100.$$

Esta proporción fue determinada en cada individuo, contando 25 ovocitos totales de 4 diferentes regiones de la gónada escogidas al azar, totalizando 600 ovocitos por réplica por día.

En el caso de hepatopáncreas, pequeñas muestras del tejido fueron tomadas directamente del cangrejo, fijadas en solución de Bouin y preservadas en alcohol al 70%, de la misma manera que las gónadas. Este órgano no fue extraído ni pesado debido a su fragilidad y fácil destrucción. Las muestras fueron deshidratadas en series crecientes de etanol hasta alcohol etílico absoluto (99,5% de pureza), “diafanizadas” en xileno, incluidas en medio de inclusión en base a parafina (Histoplast[®]) y cortadas en microtomo de rotación (Reitcher) en secciones de 6 µm. Los cortes realizados fueron cortes transversales de los túbulos hepatopancreáticos en su sección media, descartando la zona distal. Luego de cada corte o lámina realizada se “avanzaron” 120 µm por túbulo y se obtuvo un nuevo corte o lámina. Estas fueron montadas en portaobjetos, desparafinadas en xileno, re hidratadas con serie de alcoholes decreciente hasta agua destilada, teñidas con hematoxilina-eosina, deshidratadas, diafanizadas en xilenos y montadas con bálsamo de Canadá (Rodríguez y col., 1994).

Una vez obtenidos los portaobjetos con las muestras de tejido hepatopancreático se procedió a la observación e identificación de los diferentes tipos celulares en microscopio Nikon E100 a 400x. El número de células B, F y R se contabilizó bajo microscopio óptico en cada túbulo cortado transversalmente. En el caso de las muestras provenientes de los individuos expuestos a clorpirifós solamente se contabilizaron las células F y las células B, ya que las células R no intervienen en los procesos de detoxificación y son de difícil conteo. También se observaron otras histopatologías como necrosis, anormalidades en el lumen e infiltración hemocítica (Bhavan y Geraldine, 2000; Pinho y col., 2003).

Los índices gonadosomáticos, volúmenes de ovocitos, porcentaje de ovocitos atrésicos y número de células F, B y R por túbulo fueron comparados mediante test de Kruskal–Wallis con post test de Dunn ($p < 0,05$), ya que no se cumplieron los supuestos de normalidad y/o de homogeneidad de las varianzas necesarios para realizar estadística paramétrica.

Bioconcentración de plaguicidas en tejidos.

Las concentraciones de endosulfán acumulados fueron determinadas en hepatopáncreas, gónadas y músculo de las quelas de los mismos cangrejos utilizados en las observaciones de los efectos subletales en estos tejidos. Luego de extraídas las

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis
(Decapoda, Trichodactylidae)*

muestras de la manera ya descrita, estas fueron inmediatamente conservadas a -18°C en frascos de vidrio color caramelo de 150 ml de capacidad. Al momento de ser analizadas, las muestras provenientes de cada réplica de la misma concentración y día fueron trituradas manualmente y homogeneizadas, conformando una muestra única proveniente de 9 individuos. Aproximadamente 0,5 g de cada muestra fueron pesados en balanza analítica y adicionados con Na_2SO_4 anhidro hasta lograr sequedad y extraídos en microcolumnas de extracción con n-hexano y acetona (proporción 4:1). La fase orgánica fue separada y evaporada a sequedad. El porcentaje de lípidos extraíbles fue determinado gravimétricamente (Mettler Toledo, USA, AB 204 scale). Debido al alto tenor lipídico de los extractos de gónadas y hepatopáncreas, las concentraciones de plaguicidas fueron determinados de acuerdo al método propuesto por Mills y col. (1963) con menores modificaciones (Stoker y col., 2011). Aproximadamente 0,1 g de lípidos fueron incluidos en tubos falcon de 15 ml, adicionados con 0,3 ml de hexano y agitados en vortex durante 1 min. Luego de la agitación, a estas muestras se les adicionó 8 ml de acetonitrilo (1 % de ácido acético) saturado en n-hexano, agitados vigorosamente durante 5 minutos y centrifugados a 3500 rpm durante 5 min.

La fase de acetonitrilo fue transferida a tubo falcon de 50 ml, adicionada con 4 ml de n-hexano, 0,5 ml de solución saturada de NaCl y 25 ml de agua, agitados vigorosamente durante 5 minutos y luego agitados en baño de ultrasonido durante 5 minutos. La fase orgánica fue separada y reservada en tubo falcon de 15 ml. La fase acuosa fue re-extraída con 4 ml de n-hexano, unificado con la fase etérea extraída anteriormente y concentrado a sequedad con corriente de Nitrógeno. Este extracto fue transferido luego con 3 porciones de 0,5 ml de hexano a un cartucho de extracción de fase sólida (SPE) conteniendo 0,5 g de Alumina desactivada al 5%, 1 g de Florisil y 0,5 g de Na_2SO_4 . La extracción en fase sólida fue realizada utilizando tubos Supelclean LC-Alumina-N SPE (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Este cartucho SPE fue eluído luego de 3 minutos de reposo con 10 ml de n-hexano y 5 ml n-hexano / dietiléter (85:15). El eluído fue concentrado hasta 0,5 ml y se realizó una segunda limpieza utilizando tubos SPE Supelclean Envi-Florisil (Supelco). Este nuevo extracto fue concentrado a sequedad, redisolto en 1 ml de isooctano e inyectado en cromatógrafo gaseoso. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado.

En el caso de las muestras provenientes de músculo, las cuales poseen bajo tenor lipídico, la extracción se realizó mediante un método basado en la dispersión en matriz

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

de fase sólida (MSPD) (Carro y col., 2005). Aproximadamente 0,5 g de tejido fueron homogeneizados en mortero de vidrio con entre 2 y 5 gramos de Na₂SO₄ anhidro. Esta muestra homogeneizada fue transferida a cartucho SPE (tubos Supelclean LC-Alumina-N SPE 1 g). El cartucho fue eluído con 10 ml de n-hexano y 5 ml de de n-hexano / dietiléter. El extracto fue concentrado a sequedad, redisolto en 1 ml de isoctano e inyectado en cromatógrafo. Muestras de los músculos de pescado ofrecidos como alimentos fueron analizados de similar manera para descartar la presencia de endosulfán en estos.

La cromatografía gaseosa (GC) fue realizada con GLC (Hewlett Packard modelo 5890, USA) con detector de captura electrónica 63Ni. Columnas Pas 5 (25 m, 0,32 mm ID, film th. 0,52 mm) y pas 1701 (25m, 0,32 mm ID, film th. 0,25) fueron utilizadas. Estándares Pestanal[®] de endosulfán (Honeywell Riedel-de Haen Fine Chemicals, Seelze, Germany) fueron utilizados. Todos los solventes utilizados eran calidad grado plaguicida (Merck, Darmstadt, Germany).

Ensayos de recuperación de concentraciones conocidas en muestras de hepatopáncreas, gónadas y músculos fueron realizados. Los porcentajes de recuperación variaron entre 74 y 117%. El desvío relativo estándar (RSD) fue menor de 20% para todos los residuos (n=6). El límite de detección (LD), basado en tres veces el desvío estándar promedio de las muestras blancos fue de 0,8 ng g⁻¹ para α y β endosulfán y 1,0 ng g⁻¹ para sulfato de endosulfán. El límite de cuantificación (LQ), fue calculado como 7,5 veces el desvío estándar de los blancos, siendo de 2,0 ng g⁻¹ para α y β endosulfán y 2.5 ng g⁻¹ para sulfato de endosulfán.

Las concentraciones de plaguicidas fueron calculadas en base a los lípidos extraídos y en relación a las cantidades de tejido (en peso) utilizados en la extracción, expresándolas en ng de plaguicida/g de lípido y ng de plaguicida/g de tejido. La normalidad de los datos fue analizada utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias en las concentraciones de endosulfán acumulado en los tejidos a diferentes días fueron comparados utilizando análisis de varianzas (ANOVA) con post test de Tukey, asumiendo una significancia menor a 0,05 (p < 0,05).

Efectos subletales de biocidas sobre embriones

Efectos producidos por concentraciones subletales de endosulfán y clorpirifós en las variables tiempo de eclosión, eclosión efectiva y supervivencia de neonatos se evaluaron en *Z. collastinensis*.

Los experimentos se realizaron bajo tratamientos *in vitro*, en incubadora a 25 ± 1 °C, sobre agitador de balanceo a 40 rpm bajo condiciones de oscuridad perpetua y recambio diario de las soluciones, similar a lo descrito anteriormente en los ensayos de toxicidad aguda.

En una primera etapa se evaluó la exposición de embriones a cinco concentraciones subletales relacionadas con las utilizadas en la determinación de la CL₅₀ de adultos, con el objetivo de establecer comparaciones entre ellos. Cuarenta embriones en el 5° estadio de desarrollo, de acuerdo a Yavar y Dupré (2007), con presencia de ojo desarrollado y latido del corazón observable fueron utilizados por cada concentración, provenientes de 4 hembras diferentes (N total = 240 embriones por plaguicida). Los huevos fueron aislados en placas plásticas de 7 cámaras de 6 ml de volumen, llenas con 5 ml de las soluciones ensayadas. Luego de 96 hs de exposición, 20 embriones fueron mantenidos solo en agua declorada hasta el momento de la eclosión, bajo las mismas condiciones de experimentación (Exposición aguda), mientras que otro grupo de 20 embriones fue mantenido en condiciones de exposición constante a plaguicidas hasta el primer evento de muda o la muerte del individuo. Las soluciones fueron preparadas de la manera ya descrita y renovadas diariamente, así como el agua declorada. Las concentraciones utilizadas se describen en Tabla 2.

Todos los individuos fueron observados diariamente bajo lupa estereoscópica desde el comienzo del experimento hasta la muerte o hasta el primer ciclo de muda luego de la eclosión. Las observaciones se realizaron antes de la renovación de las soluciones. Luego de producida la eclosión, pequeñas porciones de *Ceratophyllum demersum* fueron agregados a las cámaras debido a que la adición de soporte vegetal incrementa la supervivencia, de acuerdo a lo observado en experimentos previos. El criterio de muerte utilizado fue la ausencia de latido del corazón, tanto en el caso de los embriones como en el caso de los cangrejitos eclosionados.

Los efectos de plaguicidas en el tiempo de eclosión fueron comparados mediante el test de Kruskal-Wallis seguido por el post test de Dunn. Los efectos de los

plaguicidas en la eclosión efectiva fueron analizados mediante test de chi cuadrado. Las diferencias se juzgaron como significativas cuando la probabilidad fue menor al 5% ($p < 0,05$).

Tabla 2: Concentraciones de endosulfán y clorpirifós utilizadas en ensayos subletales con embriones de *Zilchiopsis collastinensis*.

Concentraciones subletales (μg / litro)			
Endosulfán		Clorpirifós	
Nominal	Medida	Nominal	Medida
500	629 (81)	45	26,2 (3,95)
1000	1165 (102)	90	74,7 (4,76)
2000	2158 (176)	180	164,3 (19,32)
4000	4465 (1082)	360	388,4 (15,65)
8000	10254 (1101)	720	509,4 (188,37)

Efectos de concentraciones similares a ambientales en embriones

Efectos subletales provocados por concentraciones más bajas de estos plaguicidas, las cuales podrían ocurrir en el ambiente, se evaluaron. Embriones en el 5° estadio de maduración, de acuerdo a Yavar y Dupré (2007), fueron expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán y clorpirifós de manera similar a la ya descrita. 70 individuos por concentración fueron utilizados, provenientes de 7 hembras diferentes (N total = 280 individuos por plaguicida). Estos huevos fueron colocados aisladamente en placas plásticas de 7 cámaras de 6 ml de volumen cada una, llenas con aproximadamente 5 ml de las soluciones ensayadas, cubriéndolos completamente. Los embriones fueron incubados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sobre agitador de balanceo a 40 rpm bajo condiciones de oscuridad perpetua y con recambio diario de las soluciones. Estas fueron preparadas a partir de los productos comerciales ya descritos así como también a partir de los productos puros, recibidos en carácter de donación de la empresa Red Surcos S.A. Antes de preparar las soluciones de exposición se prepararon soluciones más concentradas (soluciones madre), la cuales fueron preparadas cada 48 horas y conservadas en heladera. Estas soluciones fueron retiradas antes de su utilización y fueron utilizadas cuando alcanzaron la temperatura del ambiente. En el caso de los productos comerciales fueron preparadas con agua destilada, ya que estos productos contienen productos acompañantes que permiten la formación de una emulsión, mientras que en el caso de los productos puros, cuya presentación es en polvo, fueron

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

diluidas en acetona pro análisis. Las soluciones de exposición fueron preparadas en matraces de 500 ml adicionando los volúmenes necesarios de las soluciones madre en agua de clorada. Todos los individuos fueron observados diariamente desde el comienzo del experimento hasta la muerte o completado el primer ciclo de muda luego de la eclosión. Las observaciones se realizaron bajo lupa estereoscópica, antes del momento de renovación de soluciones. Luego de producida la eclosión, pequeñas porciones de *Ceratophyllum demersum* fueron agregados a las cámaras debido a que la adición de soporte vegetal incrementa la supervivencia de acuerdo a lo observado en estudios preliminares, como se mencionó previamente. Las diferencias en el tiempo de eclosión fueron evaluadas mediante tests de Kruskal-Wallis seguido del post test de Dunn. Los efectos de los plaguicidas en la eclosión efectiva fueron comparados mediante el test de chi cuadrado. Las diferencias se juzgaron como significativas cuando la probabilidad fue menor al 5% ($p < 0,05$).

Efectos de endosulfán sobre el metabolismo de juveniles.

Los efectos de concentraciones subletales de endosulfán en el consumo de oxígeno y en la excreción de amonio fueron evaluados en juveniles de seis meses de edad, nacidos y criados en la sala de cría del INALI. Los ejemplares más jóvenes fueron evitados en los experimentos debido a la alta tasa de muda, la cual dificultó la mantención de una población suficiente de individuos en intermuda durante el tiempo de experimentación. Ciento cinco individuos de 10,49 ($\pm 1,46$) mm de ancho de cefalotórax y 0,48 ($\pm 0,19$) g de peso fueron utilizados. En mayor de los individuos no superó en más de 1,5 veces el ancho del cefalotórax del menor. Estos fueron aislados individualmente durante 4 días sin ser alimentados en acuarios de 6 litros de capacidad, con el objetivo de favorecer el vaciamiento del sistema digestivo. Los acuarios fueron limpiados cada día evitando con esto la reingestión de las heces. Los cangrejos que atravesaron el proceso de ecdisis durante este período no fueron incluidos en los experimentos.

Dos concentraciones fueron utilizadas, 6 y 62 μg de endosulfán l^{-1} (valores nominales; 7 y 70 μg de endosulfán l^{-1}), evaluando treinta individuos en cada concentración. Los individuos fueron colocados aisladamente en cámaras de vidrio de 500 ml de capacidad. Treinta litros de cada solución fueron preparados diluyendo los

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

volúmenes apropiados del producto comercial en un litro de agua de clorada, agitado vigorosamente, adicionado a los 29 litros restantes de agua de clorada y agitado nuevamente. Las cámaras fueron llenadas completamente, luego fue medido el oxígeno disuelto (concentración inicial) y fueron cerradas hasta la siguiente medición. El nitrógeno amoniacal fue medido en el momento inicial en 10 réplicas de cada concentración seleccionadas al azar. Los datos provenientes de los individuos muertos o de los que atravesaron el ciclo de muda durante el experimento no fueron tenidos en cuenta en los análisis.

Las concentraciones de oxígeno disuelto fueron medidas en las cámaras respirométricas mediante un sensor conectado a un oxímetro (Hanna HI9143). El nitrógeno amoniacal fue medido al comienzo y a las 22 horas, siguiendo el método colorimétrico de Nessler (Test Kit Model FF- de espectrofotómetro Hatch). Los experimentos fueron realizados en sala de bioensayos ecotoxicológicos a 25 ± 1 °C con fotoperíodo de 12:12 horas de luz-oscuridad (luz fluorescente). El oxígeno disuelto fue medido a cada hora durante las primeras 4 horas y a la hora 22, de manera de completar el ritmo circadiano de esta especie. A partir de las 22 horas los niveles de oxígeno disuelto en algunas réplicas fueron de alrededor de 2 ppm; y debido a que la hipoxia y la acumulación de productos metabólicos puede introducir errores en las mediciones tanto de oxígeno disuelto como de excreción de amonio, se tomó esa hora como momento final, de acuerdo al criterio de Eriksen (2002). En 10 animales por concentración incluido el grupo control, el consumo de oxígeno fue medido hasta que los cangrejos se aletargaron debido a la hipoxia o a los efectos combinados de endosulfán y de hipoxia (Zou, 1992). La excreción de nitrógeno amoniacal fue medida a la hora 0 y 22.

La tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de excreción de nitrógeno amoniacal con respecto al peso fueron calculadas y expresadas como $\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $\text{mg NH}_3\text{-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respectivamente. Regresiones entre las tasas de consumo de oxígeno y el oxígeno disuelto fueron realizadas. Las pendientes y las intercepciones con el eje Y fueron comparadas entre el control y las concentraciones experimentadas (Zar, 1996).

Las relaciones oxígeno: nitrógeno (O:N) fueron calculados como la relación entre átomos de oxígeno consumido y átomos de nitrógeno excretados a las 22 horas. El gasto energético fue calculado utilizando el valor oxicalorífico de $20.11 \text{ Joules ml O}_2^{-1}$, de acuerdo a Pillai y Diwan (2002). Las diferencias en las tasas de consumo de

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
(Decapoda, Trichodactylidae)*

Oxígeno, excreción de Amonio, gasto energético y relación O:N fueron comparadas con el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Mann-Whitney ($p < 0,05$) (Zar, 1996).

RESULTADOS

Consideraciones generales

Durante las colectas así como durante el periodo de aclimatación posterior los cangrejos mantuvieron un estado normal de condiciones conductuales y fisiológicas básicas. Estos desarrollaron actividades de alimentación, interactuaron intra e interespecíficamente, respondieron a estímulos, atravesaron diferentes ciclos de muda (principalmente juveniles) e incluso se observaron cópulas en laboratorio y ovipostura. Sin embargo, las condiciones necesarias para que las hembras ovígeras mantengan esta condición hasta la eclosión de los juveniles requirieron mayores esfuerzos buscando disminuir el estrés, ya que en las primeras experiencias se observó la pérdida de la masa de huevos algunos días después del desove. Debido a esto se volvió imposible realizar experimentos ecotoxicológicos con este tipo de hembras.

La cría *in vitro* de los huevos solamente pudo realizarse a partir de embriones en el 5° estadio de acuerdo a Yavar y Dupré (2007), luego de la puesta a punto de este método tanto con individuos de esta especie como del cangrejo *Trichodactylus borellianus*, perteneciente a la misma familia.

El mantenimiento de individuos machos en laboratorio resultó muy dificultosa, ya que estos desplegaban un activo comportamiento agonístico. Los individuos iniciaban una pelea que generalmente concluía con la muerte de alguno de los contrincantes. La única manera de conservarlos fue mantenerlos aislados, colocando un solo macho por acuario. Al momento de realizar los experimentos este comportamiento agonístico llevaba a la muerte de muchos individuos de la población experimental más allá de los efectos de los biocidas. En el caso de las hembras, también pudieron observarse comportamientos agonísticos, pero menos intensos y cortos en el tiempo, con el posterior escape de una de ellas hacia otro sector del acuario. Sin embargo al ser expuestas a plaguicidas, estos comportamientos se intensificaron, volviéndose necesaria la utilización de jaulas en algunos ensayos.

Toxicidad aguda de biocidas

Determinación de la concentración letal media

En los experimentos realizados con endosulfán los individuos adultos de *Z. collastinensis* tuvieron un ancho de cefalotórax medio y un desvío estándar de $51,73 \pm 2,97$ mm (N = 20). Estos fueron distribuidos aleatoriamente entre las diferentes concentraciones y los controles negativos. La comparación del ancho de cefalotórax entre las diferentes agrupaciones no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$).

En el caso de los cangrejos utilizados en los experimentos necesarios en la determinación de la concentración letal media de clorpirifós, el ancho de cefalotórax medio y desvío fue de $48,33 \pm 2,87$ mm (N = 20). La comparación del ancho de cefalotórax entre las diferentes agrupaciones no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$).

Sin embargo, la población utilizada en los experimentos realizados con endosulfán presentó un mayor tamaño que la población utilizada en los experimentos realizados con clorpirifós ($p < 0,01$).

Los valores de temperatura, pH y conductividad fueron de 25 ± 1 °C; $7,12 \pm 1,22$; $1228,68 \pm 21,42$ $\mu\text{S cm}^{-1}$. El oxígeno disuelto fue de $6,37 \pm 2,28$ mg L^{-1} en los experimentos correspondientes a endosulfán, mientras que en los experimentos realizados con clorpirifós este no fue menor a 7 mg L^{-1} en ninguno de los casos, debido a la presencia de aireadores.

Las comparaciones entre las concentraciones letales medias de los plaguicidas en diferentes estadios muestran que los embriones son más resistentes a endosulfán y a clorpirifós que los estadios adultos ($p < 0,05$ en ambos casos). La comparación de la concentración letal media dentro de cada estadio muestra que el clorpirifós provoca la muerte de la mitad de la población en concentraciones más bajas que endosulfán ($p < 0,05$ en ambos casos) (Tabla 3).

Tabla 3: Concentración letal media y límites de confianza de clorpirifós y endosulfán sobre adultos y embriones del cangrejo cavador *Zilchiopsis collastinensis* luego de 96 horas de exposición.

	Endosulfán ($\mu\text{g l}^{-1}$)		
	CL ₅₀	Límites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Adultos	1902	1679	2124
Embriones	95385	37305	349767
	Clorpirifós ($\mu\text{g l}^{-1}$)		
	CL ₅₀	Límites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Adultos	156,78	109,08	207,74
Embriones	1242,54	983,28	1543,9

Curvas de supervivencia.

Endosulfán

En el caso de los individuos expuestos a endosulfán, la mortalidad en los adultos fue similar a las 24 hs en todas las concentraciones ($p > 0,05$). A las 48 horas solo en los expuestos a la concentración mayor ($3126 \mu\text{g endosulfán l}^{-1}$) se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$). A las 72 y a las 96 horas se observaron diferencias significativas entre las concentraciones bajas y altas ($p < 0,05$) (Figura 2, Tabla 4).

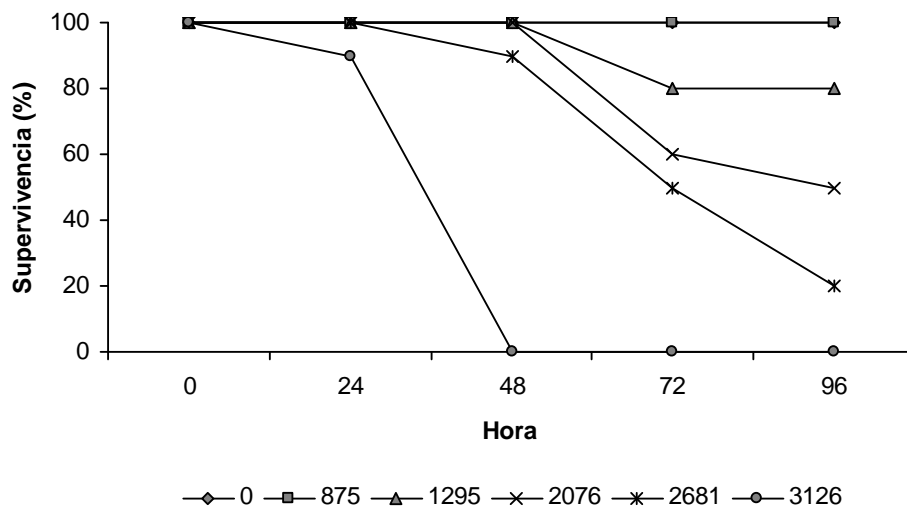


Figura 2: Supervivencia de adultos del cangrejo cavador *Z. collastinensis* expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán ($\mu\text{g/L}$).

Carlos Leandro Negro
 Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavadador *Zilchiopsis collastinensis*
 (Decapoda, Trichodactylidae)

Tabla 4: Grupos homogéneos de supervivencia de adultos de *Z. collastinensis* expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán. Los grupos homogéneos ($p > 0,05$) se identifican con las mismas letras.

Grupos homogéneos				
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Concentración ($\mu\text{g/L}$)				
0	A	A	A	A
902	A	A	A	A
1295	A	A	A B	A B
2076	A	A	B C	B
2681	A	A	C	C
3126	A	B	D	C

En el caso de los embriones expuestos a este plaguicida, las diferencias en la letalidad producida entre las concentraciones bajas y altas tuvieron diferencias significativas desde las 24 horas de exposición ($p < 0,05$) (Figura 3, Tabla 5).

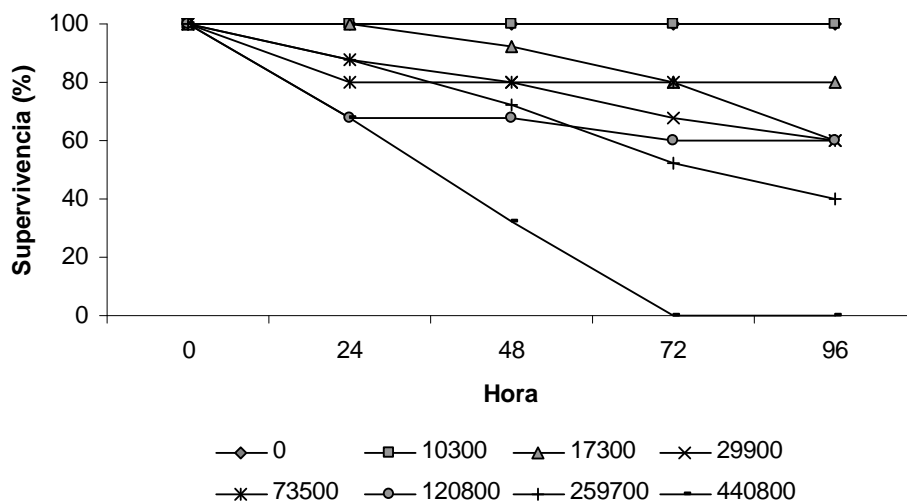


Figura 3: Supervivencia de embriones del cangrejo cavadador *Z. collastinensis* expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán ($\mu\text{g/L}$).

Tabla 5: Grupos homogéneos de supervivencia de embriones de *Z. collastinensis* expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán. Los grupos homogéneos ($p > 0,05$) se identifican con las mismas letras.

Grupos Homogéneos				
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Concentración ($\mu\text{g/L}$)				
0	A	A	A	A
10300	A	A	A	A
17300	A	B	B	B
29900	B	C	C	C
73500	B	C	B	C
120800	C	C	C	C
259700	B	C	C	C
440800	C	D	D	D

Clorpirifós

La mortalidad en los ensayos realizados exponiendo cangrejos a clorpirifós varió de manera similar a los ensayos realizados con endosulfán. En el caso de la supervivencia de los individuos expuestos a este biocida, solo los adultos expuestos a la mayor concentración ($1090 \mu\text{g clorpirifós l}^{-1}$) mostraron diferencias con respecto a las otras concentraciones de exposición ($p < 0,05$). A las 48, 72 y 96 horas de iniciados los ensayos se observaron diferencias significativas entre las concentraciones menores y mayores ($p < 0,05$) (Figura 4, Tabla 6).

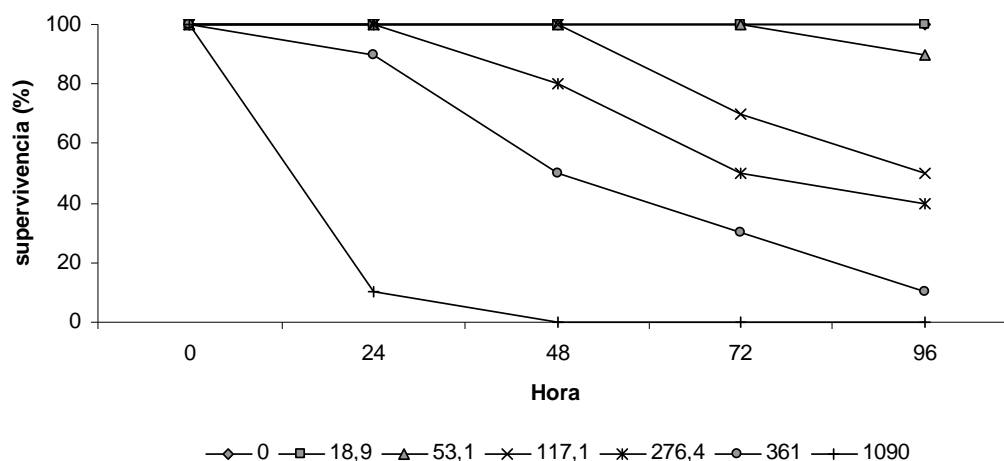


Figura 4: Supervivencia de adultos del cangrejo cavadador *Z. collastinensis* expuestos a diferentes concentraciones de clorpirifós ($\mu\text{g/L}$).

Carlos Leandro Negro
 Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
 (Decapoda, Trichodactylidae)

Tabla 6: Grupos homogéneos de supervivencia de adultos de *Z. collastinensis* expuestos a diferentes concentraciones de clorpirifós. Los grupos homogéneos ($p > 0,05$) se identifican con las mismas letras.

Grupos homogéneos				
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Concentración ($\mu\text{g/L}$)				
0	A	A	A	A
18,9	A	A	A	A
53,1	A	A	A	A
117,1	A	A	B	B
276,4	A	B	B C	B C
361	A	B	C	C D
1090		B	C	D

En el caso de los embriones expuestos a este plaguicida, las diferencias en la letalidad producida entre las concentraciones más bajas y las concentraciones más altas mostraron diferencias desde las 24 horas de exposición ($p < 0,05$) (Figura 5, Tabla 7).

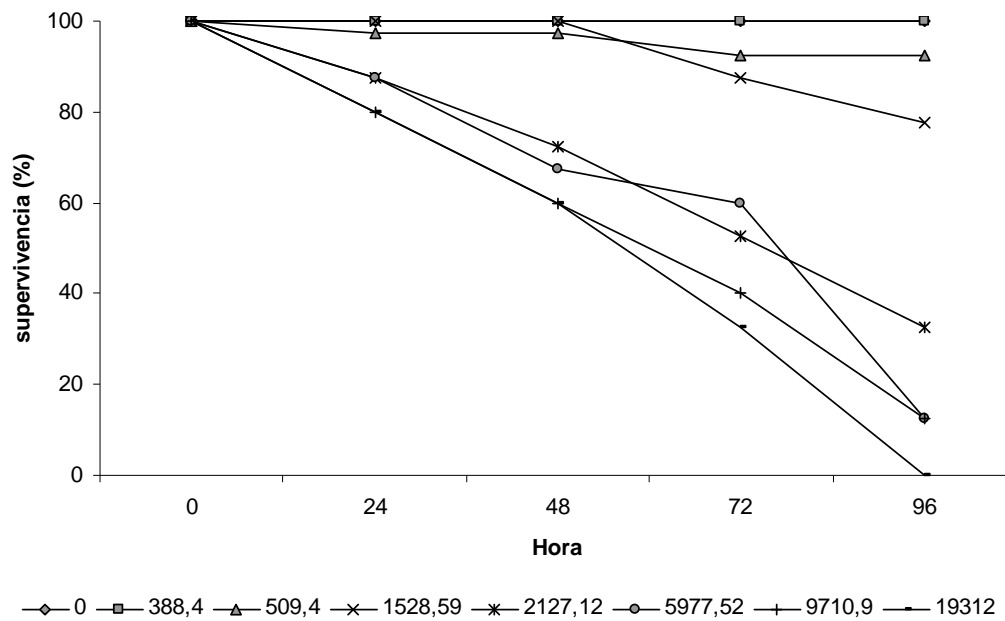


Figura 5: Supervivencia de embriones del cangrejo cavador *Z. collastinensis* expuestos a diferentes concentraciones de clorpirifós ($\mu\text{g/L}$).

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Tabla 7: Grupos homogéneos de supervivencia de embriones de *Z. collastinensis* expuestos a diferentes concentraciones de clorpirifós. Los grupos homogéneos ($p > 0,05$) se identifican con las mismas letras.

Grupos homogéneos				
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Concentración ($\mu\text{g/L}$)				
0	A	A	A	A
388,4	A	A	A	A B
509,4	A B	A	A	B
1528,59	A	A	B	C
2127,12	B C	B	C D	D
5977,52	B C	B	C	D
9710,9	C	B	C D	D E
19312	C	B	D	E

Efectos histopatológicos de plaguicidas en hepatopáncreas y gónadas.

Consideraciones generales.

Hepatopancreas

El hepatopáncreas de *Z. collastinensis* está compuesto por una serie de estructuras tubulares ciegas formadas por una capa simple de células epiteliales, con lumen en forma de cruz o estrella. Entre estas células epiteliales encontramos células E, las cuales poseen un núcleo que ocupa la mayor parte del volumen celular; células F, observables por su profunda coloración; células B, distinguibles por sus grandes vacuolas; y células R, que se caracterizan por presentar un núcleo basal y numerosas vacuolas pequeñas (Figura 6).

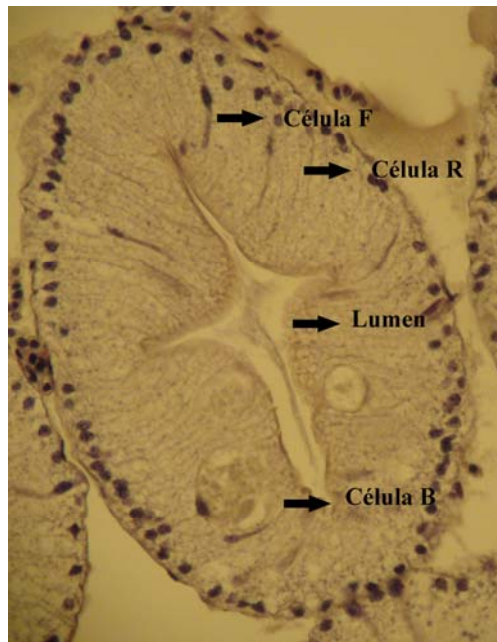


Figura 6: Corte histológico de tubo hepatopancreático normal de *Zilchiopsis collastinensis* cortado transversalmente en su sección media, teñido con tinción de hematoxilina – eosina y observado a 400X

Gónadas

Las gónadas de las hembras de *Z. collastinensis* presentaron una conformación en forma de U invertida, con coloración anaranjada en la etapa de vitelogénesis exógena. Esta se encontró siempre ocupando la mayor parte de la zona dorsal de los

individuos. En el caso de las hembras con un alto grado de madurez incluso pudo observarse el repliegamiento de ovario sobre si mismo (Figura 7 y 8).

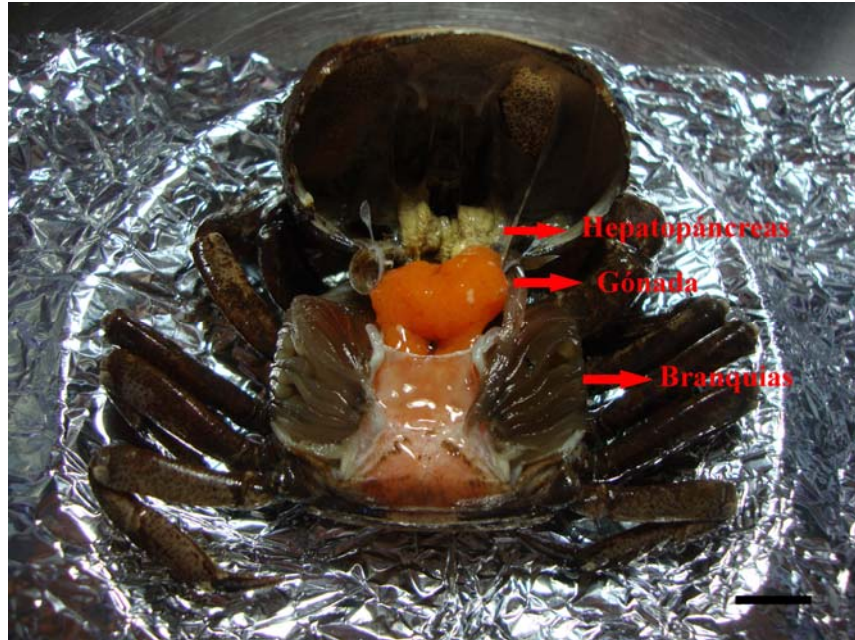


Figura 7: Hembra madura de *Z. collastinensis*. Gónada en vitelogénesis exógena (ovocitos de color anaranjado). Barra = 1 cm.



Figura 8: Gónada de hembra madura de *Z. collastinensis* en forma de U invertida. Barra = 1 cm.

Efectos histopatológicos de Endosulfán

Los individuos adultos de *Z. collastinensis* utilizados en estos experimentos tuvieron un ancho de cefalotórax medio y un desvío estándar de $51,45 \pm 2,86$ mm (N = 180). Estos fueron distribuidos aleatoriamente entre las diferentes concentraciones y los controles negativos. La comparación del ancho de cefalotórax entre los diferentes tratamientos no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$).

Los valores medios de pH, oxígeno disuelto, conductividad y temperatura en las réplicas del grupo control fueron de $7,22 \pm 1,1$; $7,12 \pm 1,4$ mg l⁻¹; $1231,75 \pm 10,53$ μS/cm y $14,55 \pm 4,32$ °C respectivamente.

Los valores de temperatura variaron entre los diferentes momentos del día, con menores temperaturas durante las horas matutinas (6 - 15 °C) y mayores temperaturas durante las horas vespertinas (12 – 19 °C).

Las concentraciones de endosulfán en agua tuvieron una concentración inicial más elevada, la cual fue disminuyendo con el tiempo. A partir de los 15 días de exposición las concentraciones de endosulfán solo fueron cuantificables en C₃. A los 22 días de exposición las concentraciones de endosulfán en agua fueron detectadas, pero demasiado bajas para ser cuantificadas (Figura 9)

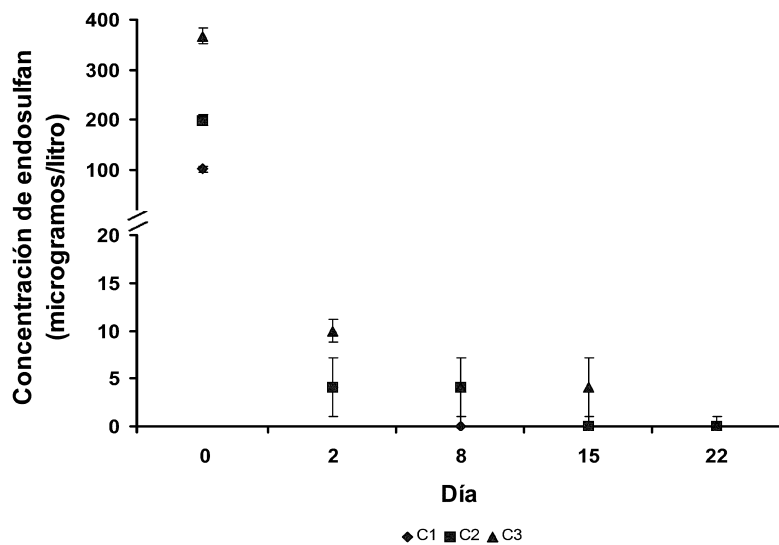


Figura 9: Concentraciones medias (\pm desvío estandar) de endosulfán en agua en cada tratamiento al momento inicial (Día 0) y a los días siguientes.

Efectos de endosulfán en hepatopáncreas

El número de células R y B en los controles fue similar durante la experimentación, ya que no se observaron diferencias significativas en los diferentes días en ningún tipo de célula ($p > 0,05$ en todos los casos). En el caso de las células F, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en estas a los 8, 15 y 22 días con respecto a las observadas en el día previo a la exposición (Día 0).

Células R

En el caso de los cangrejos expuestos a endosulfán el número de células R fue similar entre los expuestos y los grupos control luego de dos días de exposición ($p > 0,05$). Sin embargo, el número de estas células fue significativamente menor en todos los individuos expuestos a los días 8, 15 y 22 ($p < 0,05$) (Figura 10).

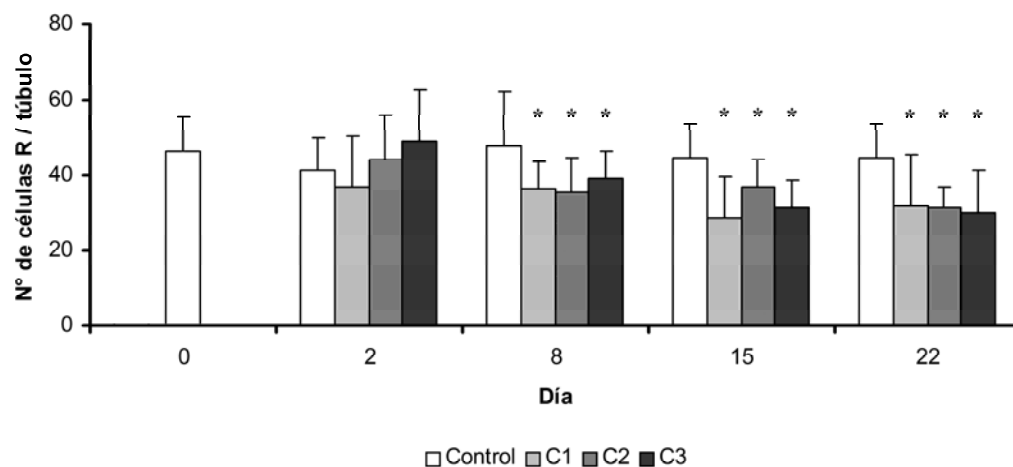


Figura 10: Número de células R por túbulo hepatopancreático de *Zilchiopsis collastinensis* expuestos a concentraciones variables de endosulfán durante diferentes días. (*) Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Células B

A los 2 días de exposición el número de células B fueron similares entre los controles y los expuestos a las tres diferentes concentraciones ($p > 0,05$). Sin embargo, luego de ocho días de exposición aumentó significativamente en todas las concentraciones. Luego de 15 días de exposición, el número de estas células fue significativamente mayor que en el control solo en los cangrejos expuestos a C_1 y C_3 . A

los 22 días de exposición solo se observó un aumento significativo en C₁ ($p < 0,05$) (Figura 11).

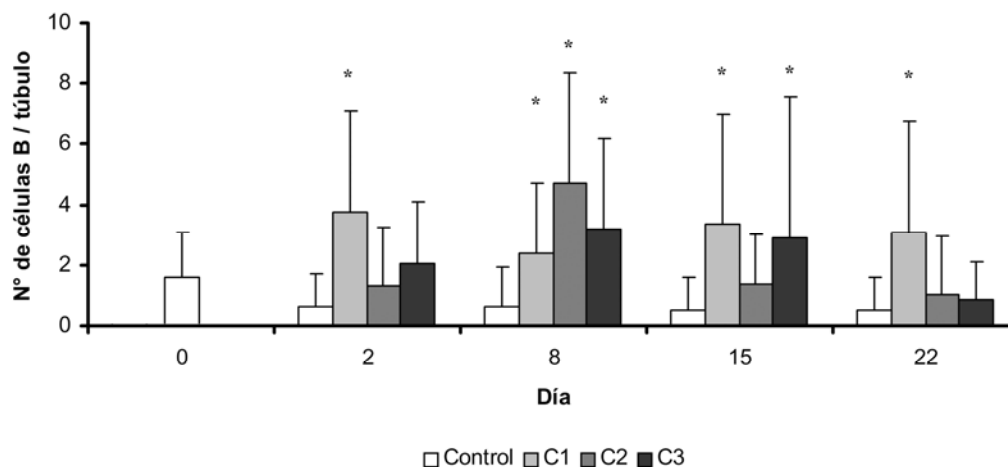


Figura 11: Número de células B por túbulo hepatopancreático de *Zilchiopsis collastinensis* expuestos a concentraciones variables de endosulfán durante diferentes días. (*) Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Células F

El número de células F por túbulo fue similar en todas las concentraciones a los dos días de exposición ($p > 0,05$). Sin embargo, luego de 8, 15 y 22 días, el número de estas células fue menor en los cangrejos expuestos a las diferentes concentraciones de endosulfán ($p < 0,05$) (Figura 12).

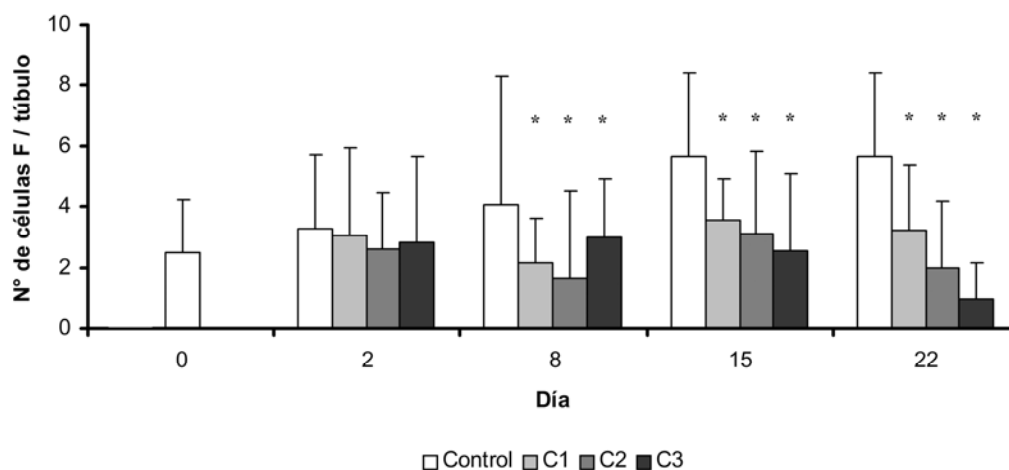


Figura 12: Número de células F por túbulo hepatopancreático de *Zilchiopsis collastinensis* expuestos a concentraciones variables de endosulfán durante diferentes días. (*) Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Diversas histopatologías fueron observadas en animales expuestos. Entre estas se pudo observar anomalías en la conformación del lumen, necrosis, hipertrofia celular e infiltración hemocítica (Figura 13).

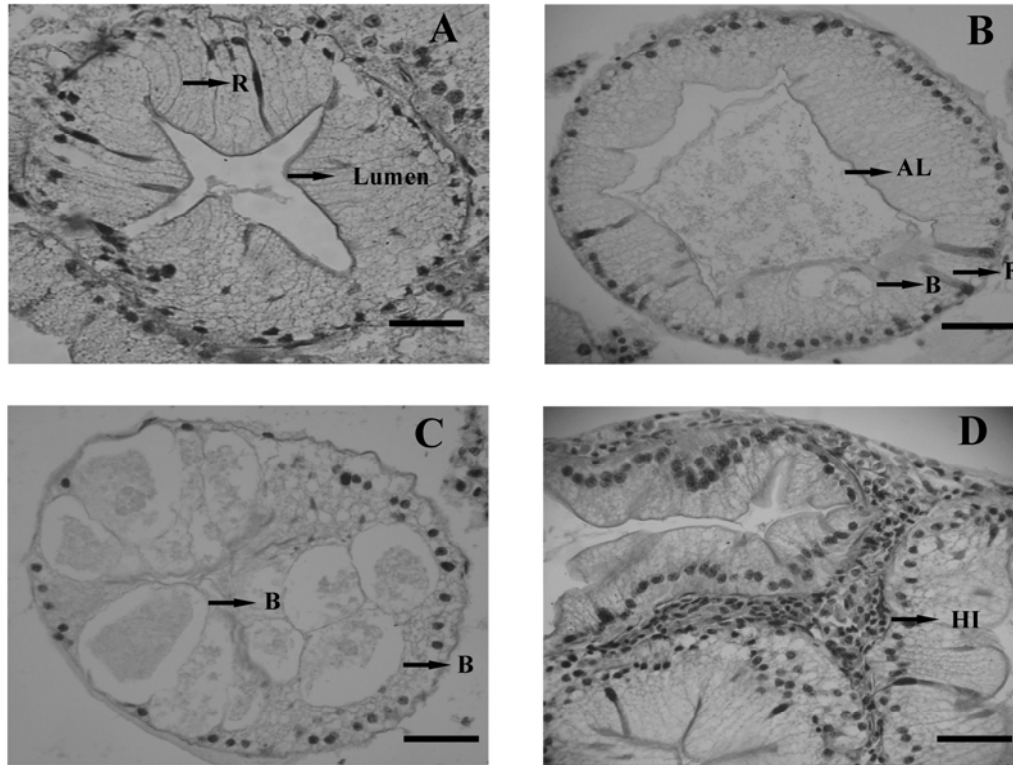


Figura 13: Hepatopancreas de *Zilchiopsis collastinensis*, tanto expuestos a endosulfán como pertenecientes al grupo control. (A) Lúmen normal de cangrejos control, con aspecto de estrella o cruz, mayormente compuesto por células R. (B) Lumen anormal (AL) de cangrejos expuestos a una concentración inicial de 400 μg endosulfán l^{-1} luego de 15 días de exposición. Las flechas indican las células F, teñidas de color más profundo, y células B, caracterizadas por una vacuola grande. (C) Tubulos hepatopancreáticos compuestos mayormente por células B hipertrofiadas de cangrejos expuestos a una concentración inicial de 400 μg endosulfán l^{-1} luego de 15 días de exposición. (D) Infiltración hemocítica (HI) en la zona intertubular de cangrejos expuestos a una concentración inicial de 400 μg endosulfán l^{-1} luego de 15 días de exposición. Barra = 0,03 mm.

Efectos de endosulfán sobre gónadas

Todas las hembras, tanto las expuestas como las de los controles, se encontraban en la etapa de vitelogénesis exógena, la cual se caracteriza por el color anaranjado de los ovocitos.

Indices gonadosomáticos

Los índices gonadosomáticos de los individuos expuestos a endosulfán fueron similares en todos los días observados ($p > 0,05$), variando los valores entre 2,9 y 8,1 % (Figura 14)

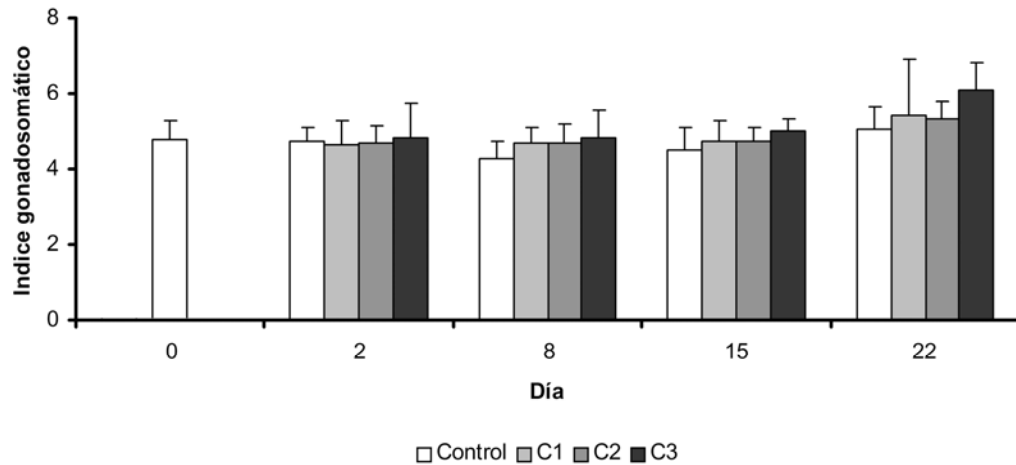


Figura 14: Índices gonadosomáticos de hembras del cangrejo cavadador *Zilchiopsis collastinensis* expuestas a endosulfán

Volumen de los ovocitos

En los individuos del grupo control los valores medios del volumen de los ovocitos fueron aumentando con el paso del tiempo. Sin embargo, estos incrementos no fueron significativos estadísticamente ($p > 0,05$).

Luego de dos días de exposición el volumen de los ovocitos fue similar entre el grupo control y todas las concentraciones ($p > 0,05$). Un aumento en el volumen de los ovocitos de los individuos expuestos a C₂ fue observado luego de 8 días de exposición, mientras que se observó una reducción en el volumen de los ovocitos de los individuos expuestos a C₃ 15 días después del ingreso de endosulfán ($p < 0,05$). Luego de 23 días de exposición no se observaron diferencias en los volúmenes entre los grupos expuestos y los grupos control ($p > 0,05$) (Figuras 15 y 16).

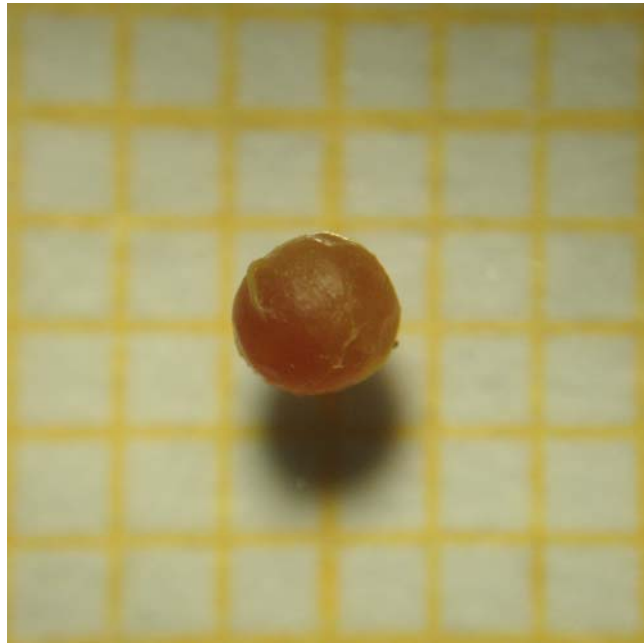


Figura 15: Ovocito normal en vitelogenesis exógena de hembra de *Z. collastinensis* luego de su fijación en solución de Bouin durante 4 horas y conservación en alcohol 70 %.

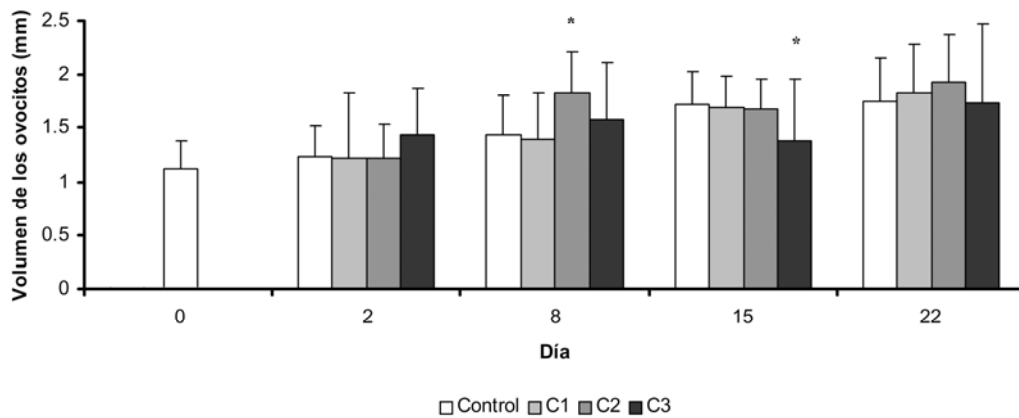


Figura 16: Volumen (mm^3) de los ovocitos de hembras del cangrejo cavador *Zilchiopsis collastinensis* expuestas a endosulfán. (*) Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$)

Efectos histopatológicos de Clorpirifós

Los individuos adultos de *Z. collastinensis* utilizados en estos experimentos tuvieron un ancho de cefalotórax medio y un desvío estándar de $48,77 \pm 3,75$ mm (N = 144). Estos fueron distribuidos aleatoriamente entre las diferentes concentraciones y los

controles negativos. La comparación del ancho de cefalotórax entre las diferentes agrupaciones no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$).

Los valores medios de pH, oxígeno disuelto, conductividad y temperatura en las réplicas del grupo control fueron de $7,08 \pm 1,56$; $7,06 \pm 0,89$ mg l⁻¹; $1311,86 \pm 9,83$ μ S/cm y $16 \pm 3,69$ °C respectivamente.

Los valores de temperatura variaron entre los diferentes momentos del día, observándose menores temperaturas durante las horas matutinas (6 – 14 °C) y mayores durante las horas vespertinas (16 – 23 °C).

Las concentraciones de clorpirifós en agua tuvieron una concentración inicial elevada, la cual fue disminuyendo con el tiempo, de manera similar a lo observado en el caso de endosulfán. A los 5 días de exposición, las concentraciones de clorpirifós en agua solo fueron cuantificables en C₃, mientras que a partir de 7 días de exposición las concentraciones de este biocida en agua estuvieron por debajo del límite de detección de la técnica (figura 17).

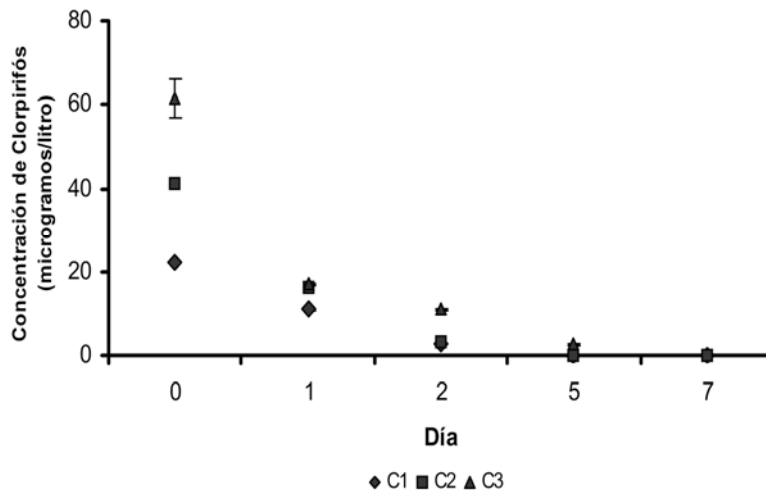


Figura 17: Concentraciones de clorpirifós (μ g clorpirifós l⁻¹) en las concentraciones utilizadas a los diferentes días

Efectos de clorpirifós en hepatopáncreas

Células B

En los cangrejos del grupo control se observó una disminución en el número de estas células con el paso del tiempo, la cual fue significativa luego de 15 y 22 días ($p < 0,05$). La exposición a clorpirifós provocó aumentos en el número de células B en los cangrejos expuestos a C₃ luego de 15 días y en los cangrejos expuestos a C₁ y C₂ luego de 22 días de exposición ($p < 0,05$) (Figura 18).

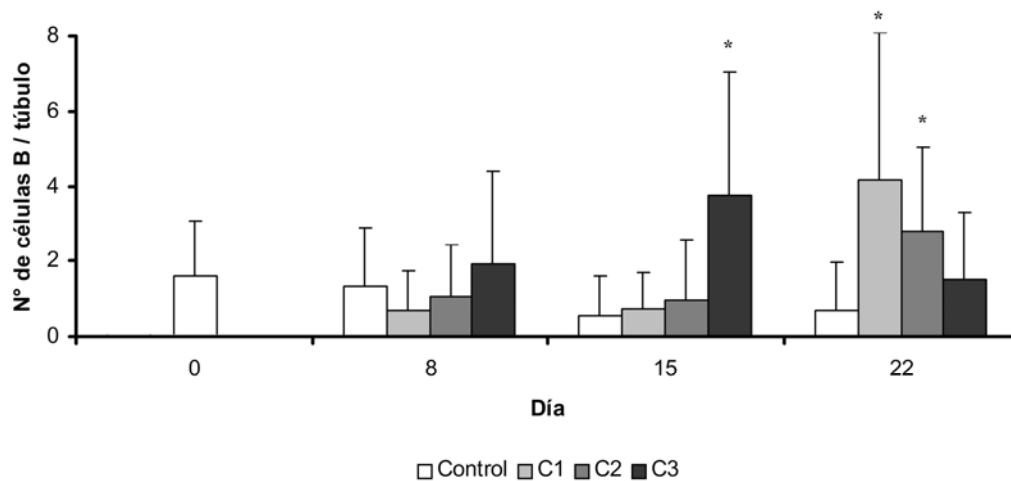


Figura 18: Número de células B por túbulo hepatopancreático de *Zilchiopsis collastinensis* expuestos a concentraciones variables de clorpirifós durante diferentes días. (*) Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$)

Células F

En los cangrejos del grupo control se observó una disminución en el número de estas células luego de 22 días ($p < 0,05$). En general no se observaron diferencias en el número de estas células entre los expuestos y los grupos control ($p > 0,05$). Solamente se observó un aumento en los cangrejos expuestos a C₁, comparandolo con su respectivo control, luego de 22 días de exposición ($p < 0,05$) (Figura 19).

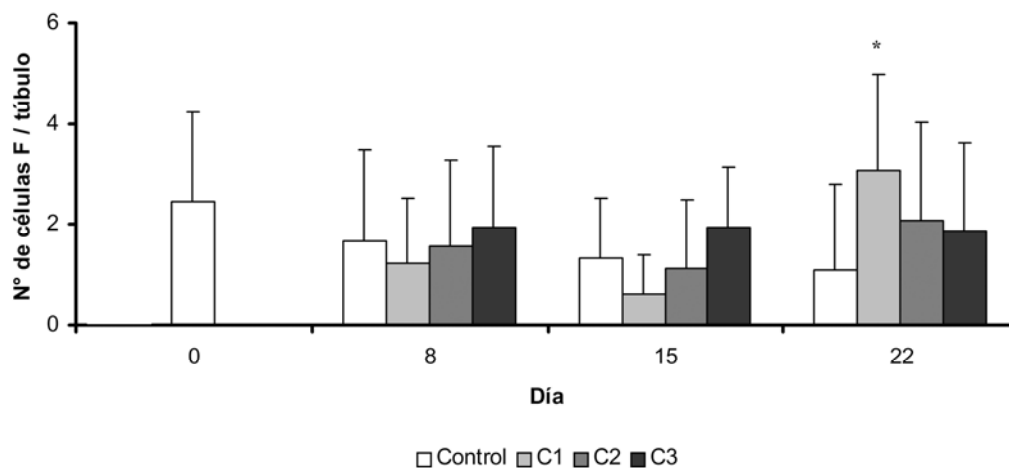


Figura 19: Número de células F por túbulo hepatopancreático de *Zilchiopsis collastinensis* expuestos a concentraciones variables de clorpirifós durante diferentes días. (*) Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$)

Efectos de clorpirifós sobre gónadas

En el caso de los cangrejos expuestos a clorpirifós todas las hembras observadas se encontraban en la etapa de vitelogenénesis exógena, presentando ovocitos de color anaranjado.

Índices gonadosomáticos

Los índices gonadosomáticos de los individuos expuestos a clorpirifós, los cuales variaron entre 2,8 y 8,8 %, fueron similares en todos los días observados ($p > 0,05$) (Figura 20).

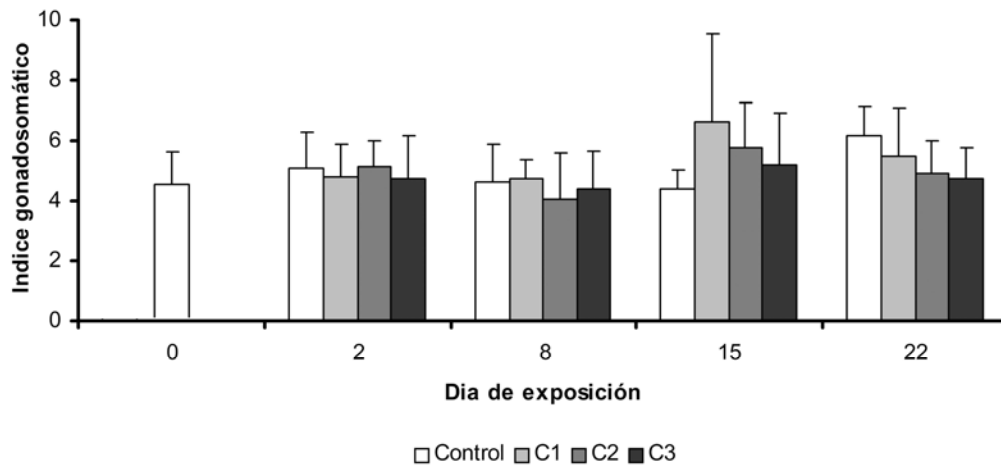


Figura 20: Índices gonadosomáticos de hembras del cangrejo cavador *Zilchiopsis collastinensis* expuestas a clorpirifós.

Volumen de los ovocitos

A los 8 días de exposición se observó un aumento en el volumen de los ovocitos de las hembras expuestas a C₁ comparados con el control ($p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los controles y los ejemplares expuestos a C₂ y C₃ ($p > 0,05$). Además, el volumen de los ovocitos de las hembras del grupo control y las expuestas a clorpirifós a los días 15 y 22 luego del ingreso del plaguicida fueron similares ($p > 0,05$) (Figuras 21 y 22).

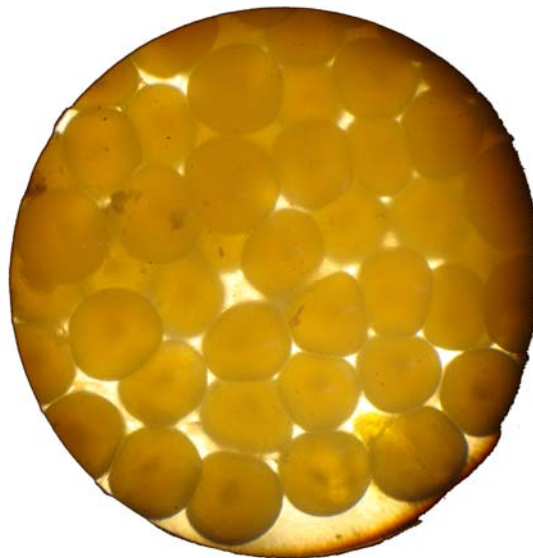


Figura 21: Ovocitos de hembra de *Z. collastinensis* en fresco. Observación a 20X

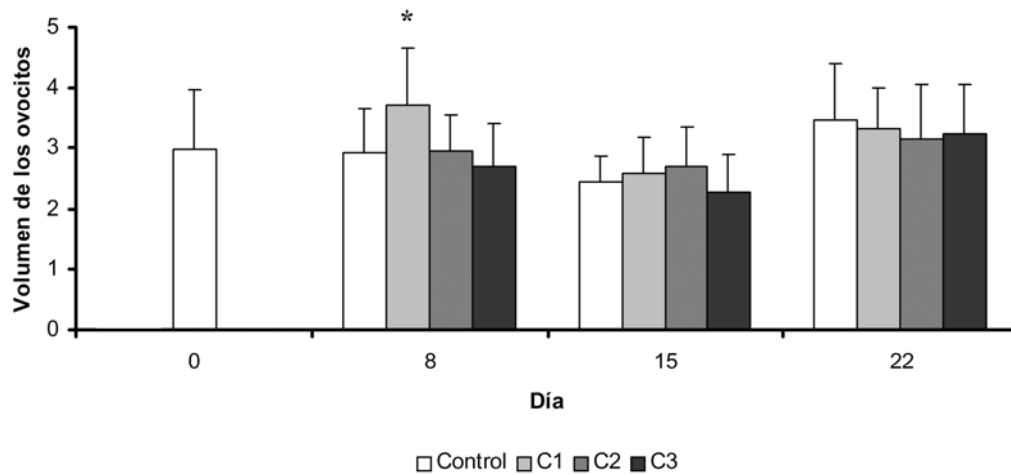


Figura 22: Volumen de los ovocitos (mm^3) de hembras del cangrejo cavador *Zilchiopsis collastinensis* expuestas a clorpirifós. (*) Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$).

Proporción de ovocitos atrésicos

Las proporciones de ovocitos atrésicos, los cuales se diferencian por su color blanco, menor tamaño y contorno irregular, fueron similares entre los animales sacrificados antes de comenzar los experimentos (Día 0) y los individuos del grupo control el resto de los días ($p > 0,05$). Luego de 8 días de exposición a clorpirifós, se observó un aumento estadísticamente significativo en la proporción de ovocitos atrésicos en todas las concentraciones con respecto al control ($p < 0,05$). A los 15 días de exposición los valores de porcentaje de ovocitos atrésicos fueron similares entre el grupo control y los expuestos a todas las concentraciones ($p < 0,05$). Luego de 22 días de exposición, se observó un aumento estadísticamente significativo en la proporción de este tipo de ovocitos entre las hembras del grupo control y los expuestos a C_2 y C_3 ($p < 0,05$). Se puede observar una alta variabilidad intrapoblacional en los efectos causados sobre los ovocitos atrésicos, expresados en los altos desvíos estándar obtenidos (Figuras 23, 24 y 25).



Figura 23: Aspecto externo de gónadas de hembras expuestas a clorpirifós, observándose ovocitos en vitelogenénesis exógena (anaranjados) y ovocitos atrésicos (blancos)

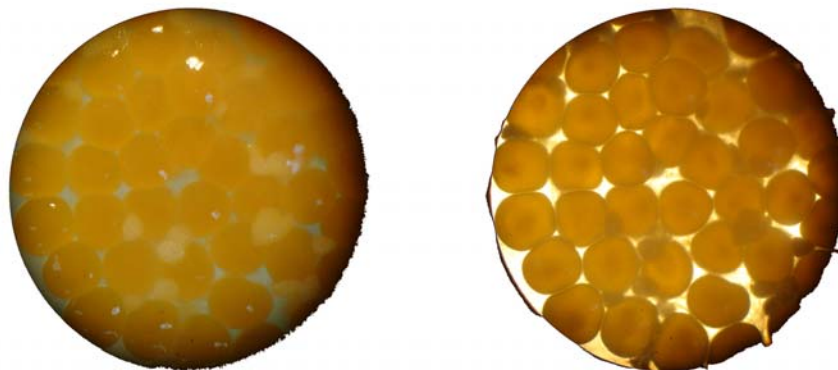


Figura 24: Ovocitos normales (anaranjados) y atrésicos (blancos) observados bajo lupa con luz superior (izquierda) y luz inferior (derecha). Observación a 10X

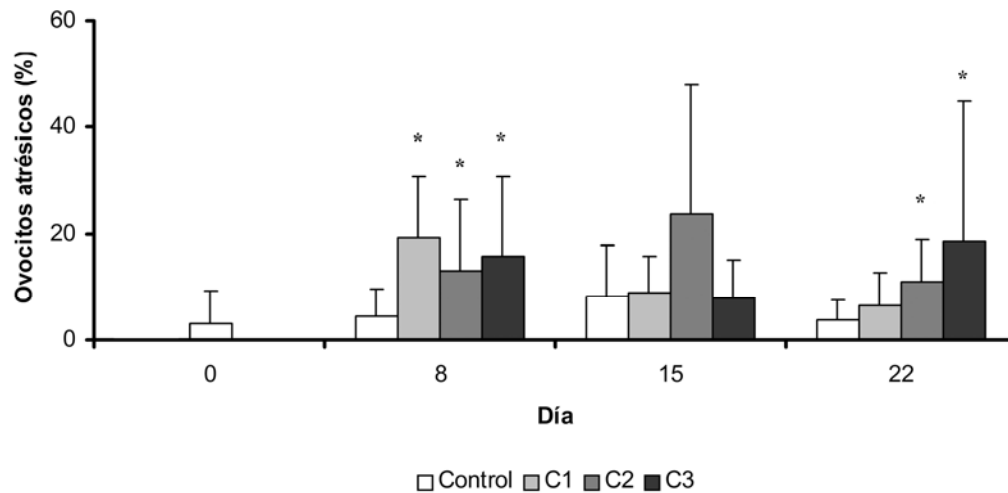


Figura 25: Porcentaje de ovocitos atrésicos de hembras de *Zilchiopsis collastinensis* expuestas a clorpirifós. (*) Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$).

Bioconcentración de endosulfán en tejidos

El hepatopáncreas, gónadas y músculos de la quela utilizados en la determinación de concentraciones de plaguicidas provinieron de los mismos individuos utilizados en la determinación de las histopatologías causadas por estos biocidas. Las condiciones de experimentación se encuentran descritas en la sección de histopatologías causadas sobre estos órganos.

Las concentraciones de endosulfán en el agua de clorada utilizada en la dilución y en los músculos de pescado utilizados como alimento fueron menores que los límites de detección de las técnicas utilizadas ($LD = 0,8$ ng/g para α - endosulfán, $0,8$ ng/g para β - endosulfán y $1,0$ ng/g para sulfato de endosulfán). Así, se descarta el ingreso de este biocida más allá de la aplicación inicial. Además, las concentraciones de endosulfán en hepatopáncreas, gónadas y músculo de la quela de los cangrejos sacrificados previamente, utilizados para determinar el nivel de base de concentración de biocidas, también fueron menores que los límites de detección de la técnica, descartándose la acumulación previa de este biocida.

Concentraciones de endosulfán en agua

Las concentraciones de endosulfán en los recipientes de ensayo fueron inicialmente elevadas, disminuyendo con el tiempo. A partir de los 15 días de exposición las concentraciones de endosulfán solo fueron cuantificables en C₃, mientras que a los 22 días de exposición las concentraciones de endosulfán en agua fueron detectadas, pero demasiado bajas para ser cuantificadas (Figura 26).

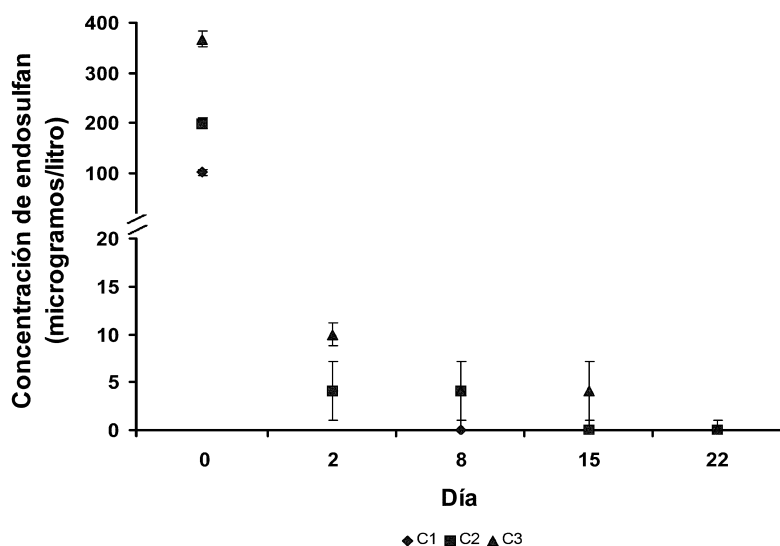


Figura 26: Concentraciones de exposición de endosulfán en agua durante 22 días de exposición.

Entre los tres tejidos evaluados, el hepatopáncreas presentó las mayores cantidades de lípidos ($0,15 \pm 0,04$ g de lípidos/g de tejido), seguido por las gónadas ($0,11 \pm 0,02$ g de lípidos/g de tejido) ($p < 0,05$). Los músculos no presentaron contenido lipídico suficiente para ser medidos por métodos gravimétricos. Las concentraciones de endosulfán acumuladas también fueron mayores en hepatopáncreas que en gónadas, mientras que en los músculos casi no se detectó este biocida ($p < 0,05$).

Entre ambos compuestos parentales α - endosulfán fue el isómero mayormente bioacumulado y detectado en hepatopáncreas y gónadas durante los ensayos. β - endosulfán y sulfato de endosulfán fueron detectados en casos aislados y no fueron considerados en los análisis estadísticos.

Las mayores concentraciones fueron medidas en el hepatopáncreas de los individuos expuestos a la mayor concentración de endosulfán (C₃) luego de dos días de

exposición. Las concentraciones en este tejido decrecieron con el paso del tiempo, siendo diferentes entre los días de experimentación ($p < 0,05$).

Las concentraciones de endosulfán en hepatopáncreas de los cangrejos expuestos a C_1 y C_2 fueron similares durante el ensayo, sin observarse diferencias entre ellas ($p > 0,05$) (Figura 27). Estas concentraciones fueron significativamente menores que las concentraciones detectadas en C_3 en todos los días ($p < 0,05$).

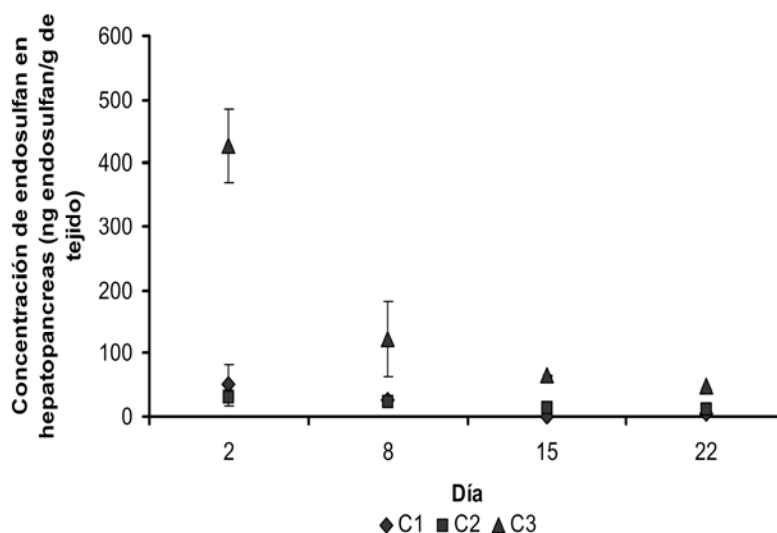


Figura 27: Bioacumulación de α -endosulfán (ng endosulfán/g de tejido) en hepatopáncreas del cangrejo cavadador *Zilchiopsis collastinensis*.

Las concentraciones de endosulfán acumuladas en gónadas fueron similares entre todas las concentraciones de exposición ($p > 0,05$). Los valores bioacumulados en general no variaron en el tiempo, ya que casi no se observaron diferencias significativas en ninguno de los días ($p > 0,05$). Solamente se observaron diferencias significativas a los 15 días de exposición, donde en los individuos expuestos a C_1 no se detectaron concentraciones de endosulfán (valores por debajo de los límites de detección) (Figura 28).

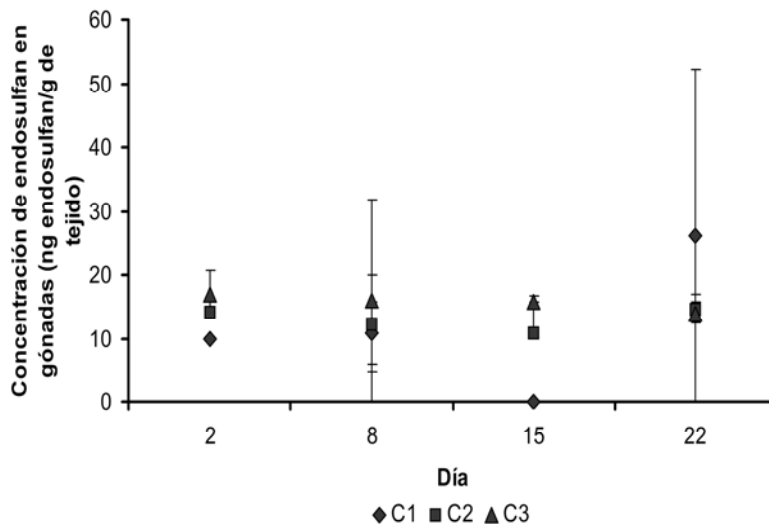


Figura 28. Bioacumulación de α -endosulfán (ng endosulfán/g de tejido) en gónadas femeninas del cangrejo cavador *Zilchiopsis collastinensis*.

La acumulación de endosulfán en tejido del músculo de la quela fue menor que los límites de detección de la técnica en la mayor parte de las muestras. Algunas concentraciones fueron detectadas en el día 3 ($3,4 \mu\text{g endosulfán l}^{-1}$ en los expuestos a C_1 y $2,0$ en los expuestos a C_3). Sin embargo, solamente estos valores pudieron ser cuantificados, ya que en el resto de los días no se encontraron valores que superen el límite de detección.

Efectos subletales de biocidas sobre embriones

Efectos de endosulfán

Efectos sobre el período de incubación

La exposición permanente a las concentraciones subletales C₂, C₃, C₄ y C₅ de endosulfán (1165; 2158; 4465 y 10254 µg l⁻¹), concentraciones aproximadas a las utilizadas en los experimentos realizados en la determinación de la concentración letal media en adultos, provocó un aumento en el tiempo de incubación de los embriones ($p < 0,05$). En los expuestos de forma aguda (solo 96 horas), también se observó un incremento en el tiempo de incubación en las hembras expuestas a las concentraciones C₂, C₃, C₄ y C₅ con respecto al control ($p < 0,05$) (Figura 29).

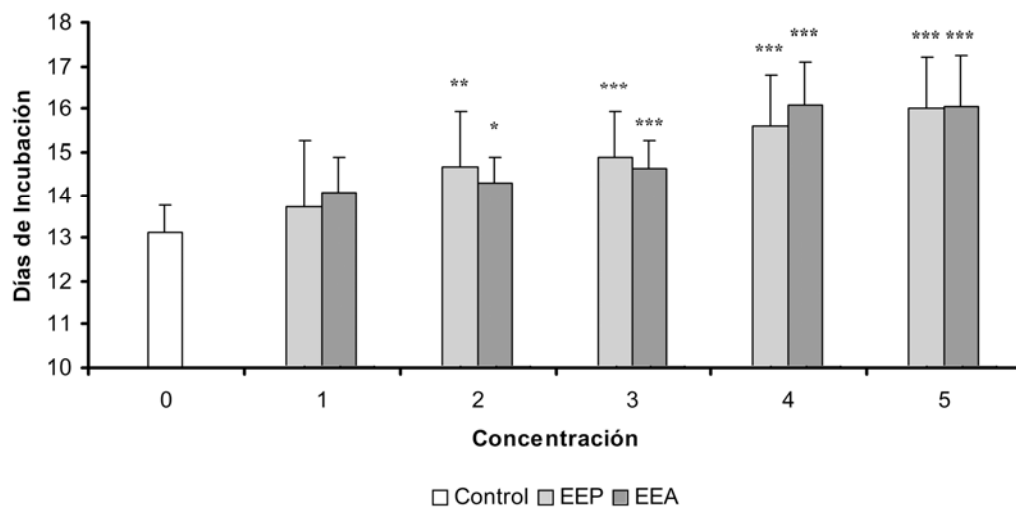


Figura 29: Efectos de diferentes concentraciones de endosulfán en el período de incubación de los embriones de *Z. collastinensis* expuestos tanto de forma permanente (EEP) como de forma aguda durante 96 horas (EEA). Concentraciones de endosulfán: 0; 629; 1165; 2158; 4465 y 10254 µg endosulfán l⁻¹ respectivamente. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

Efectos sobre la eclosión efectiva de embriones.

En los individuos del grupo control la eclosión fue efectiva en el 100% de los casos (40 individuos). En los embriones expuestos permanentemente a endosulfán el número de individuos que logró salir del huevo disminuyó en todas las concentraciones de exposición (629; 1165; 2158; 4465 y 10254 μg endosulfán l^{-1}) ($p < 0,05$). En el caso de los expuestos en forma aguda, solo durante 96 horas, las concentraciones 3, 4 y 5 (2158; 4465 y 10254 respectivamente) disminuyeron significativamente la eclosión efectiva de los embriones ($p < 0,05$) (Figuras 30 y 31).

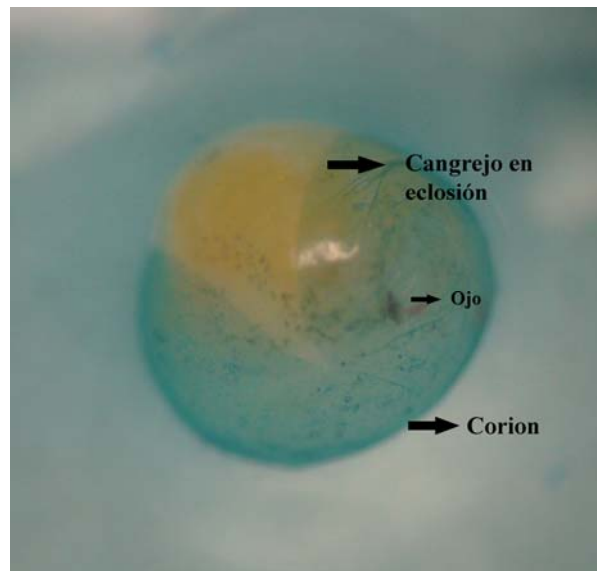


Figura 30: Cangrejo en eclosión. El corion fue teñido con azul de metileno para su mejor observación. Observación a 10X

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
(Decapoda, Trichodactylidae)

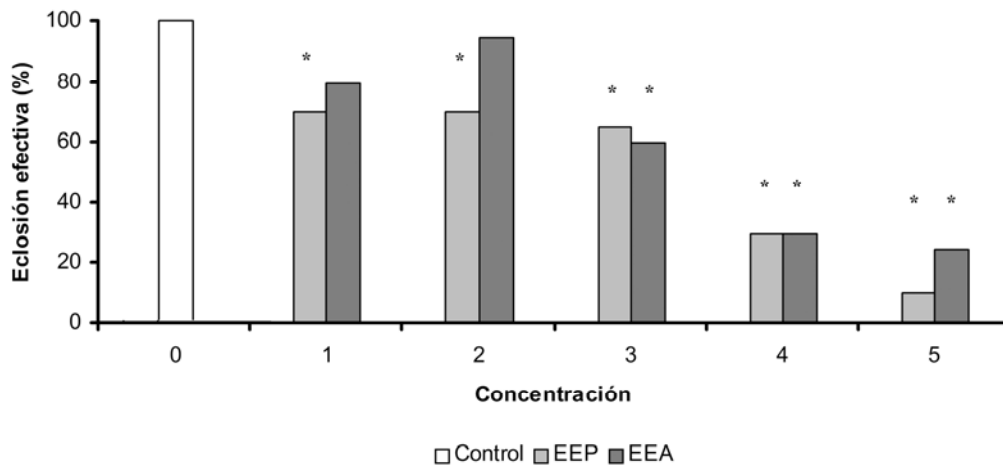


Figura 31: Efectos de diferentes concentraciones de endosulfán en la eclosión efectiva de los embriones de *Z. collastinensis* expuestos tanto de forma permanente (EEP) como de forma aguda durante 96 horas (EEA). Concentraciones de endosulfán: 0; 629; 1165; 2158; 4465 y 10254 μg endosulfán l^{-1} respectivamente. Diferencias estadísticamente significativas. (*) $p < 0,05$.

Supervivencia de los neonatos

En los neonatos expuestos a endosulfán tanto permanentemente como de forma aguda, se observaron dificultades en el movimiento de los pereiópodos, alterando la movilidad. Estos individuos presentaban sus pereiópodos replegados sobre el abdomen, posición similar a la que presentaban dentro del huevo. Solo se observaron movimientos en los apéndices cefálicos y latido del corazón (Figura 32).



Figura 32: Cangrejos eclosionados. Izquierda: Individuo del grupo control, presentando los pereiópodos desplegados, con aspecto normal. Derecha: Individuo afectado por plaguicida, con replegamiento de los pereiopodos y aspecto anormal. Observación a 10X

Ninguno de los individuos expuestos a cualquiera de las concentraciones de endosulfán, tanto de forma permanente como aguda, sobrevivió hasta alcanzar el primer ciclo de muda, el cual ocurrió entre 21 y 23 días después de la eclosión en los individuos del control. Luego de la ecdisis el número de individuos supervivientes pertenecientes al grupo control descendió al 77,5% de los individuos eclosionados.

Efectos de clorpirifós

Efectos sobre el periodo de incubación

En el caso de los embriones expuestos a clorpirifós, tanto en forma permanente como de forma aguda (solo 96 horas), la exposición a las concentraciones C₁, C₂ y C₃ (26,2; 74,7 y 164,3 µg l⁻¹) provocó aumentos en los días de incubación (p < 0,05) (Figura 33).

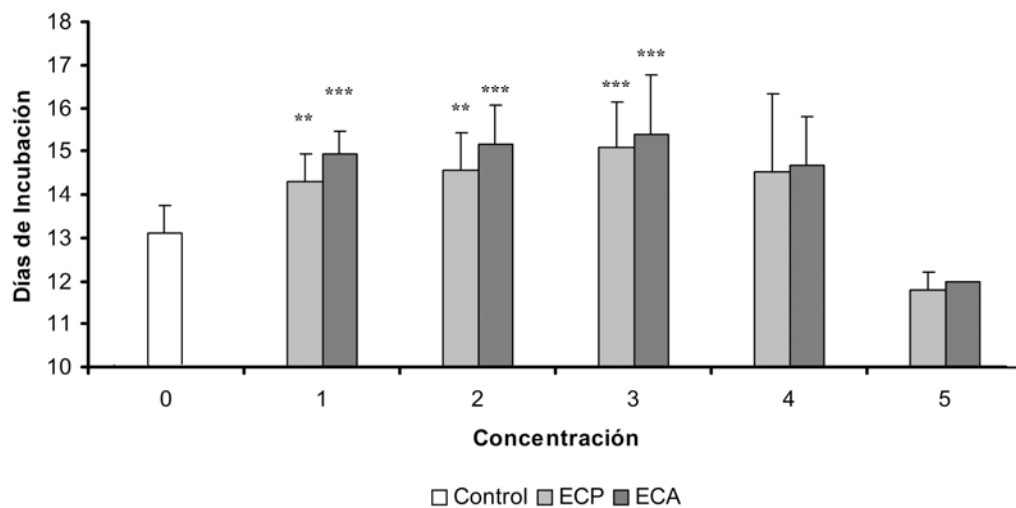


Figura 33: Efectos de diferentes concentraciones de clorpirifós en el periodo de incubación de los embriones de *Z. collastinensis* expuestos tanto de forma aguda durante 96 horas (ECP) como de forma permanente (ECA). Concentraciones de clorpirifós: 0; 26,2; 74,7; 164,3; 388,4 y 509,4 µg endosulfán l⁻¹ respectivamente. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. (**) p < 0,01; (***) p < 0,001.

Efectos sobre la eclosión efectiva de embriones.

La exposición permanente de los embriones a clorpirifós causó una disminución en el número de individuos que lograron eclosionar en las concentraciones 2, 3, 4 y 5 (74,7; 164,3; 388,4 y 509,4 µg l⁻¹). En los expuestos de forma aguda, el número de embriones que lograron eclosionar solo disminuyó en las concentraciones 4 y 5 (388,4 y 509,4 µg l⁻¹) (p < 0,05) (Figuras 34 y 35)

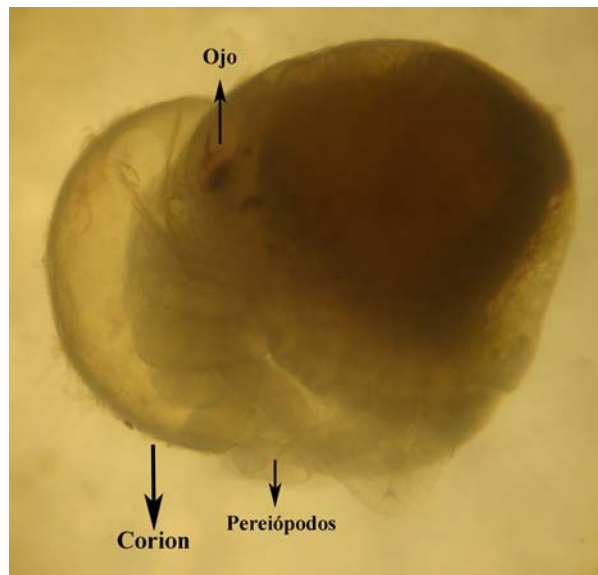


Figura 34: Cangrejo expuesto a clorpirifós durante la eclosión. Observación a 10X

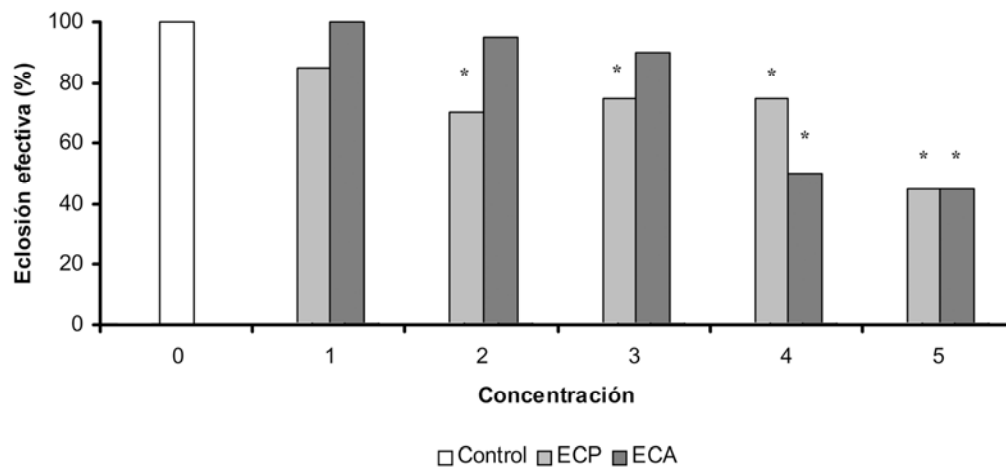


Figura 35: Efectos de diferentes concentraciones de clorpirifós en la eclosión efectiva de los embriones de *Z. collastinensis* expuestos tanto de forma permanente (ECP) como de forma aguda durante 96 horas (ECA). Concentraciones de clorpirifos: 0; 26,2; 74,7; 164,3; 388,4 y 509,4 μg endosulfán l^{-1} respectivamente. (*) Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Supervivencia de los neonatos

De los neonatos que lograron la eclosión, tanto de los expuestos en forma permanente como aguda, ninguno logró alcanzar el primer ciclo de muda, el cual ocurrió en los individuos control entre 21 y 23 días después de la eclosión. En estos

individuos eclosionados también se observaron dificultades en el movimiento de los pereiópodos, similares a los descritos en los neonatos expuestos a endosulfán.

Efectos de concentraciones de biocidas similares a ambientales en embriones

Efectos de endosulfán

Efectos sobre el periodo de incubación

La exposición permanente a 0,14; 0,7 y 3,5 μg endosulfán l^{-1} (C_1 , C_2 y C_3 respectivamente) no causó diferencias en los días de incubación, los cuales fueron de entre 14 y 19 días desde el comienzo de la 5° etapa de desarrollo hasta el momento de la eclosión ($p > 0,05$) (Figura 36).

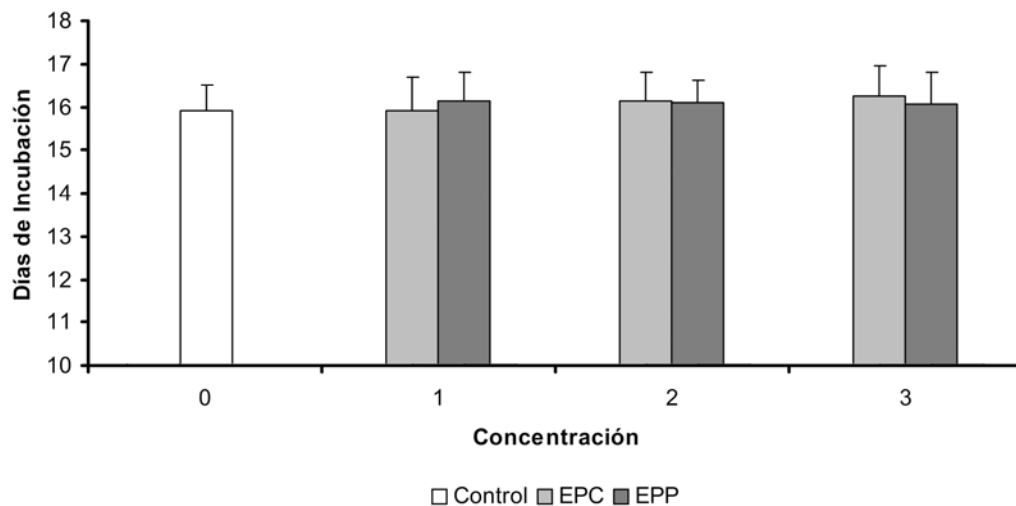


Figura 36: Efectos de diferentes concentraciones de endosulfán, contruidos a partir del producto comercial (EPC) o del producto puro (EPP), en el periodo de incubación de los embriones de *Z. collastinensis*. Concentraciones de endosulfán: 0; 0,14; 0,7 y 3,5 μg endosulfán l^{-1} respectivamente.

Efectos sobre la eclosión efectiva de embriones.

En el grupo control el 97% de los individuos logró eclosionar. En el caso de los embriones expuestos a endosulfán, no se observaron efectos de las concentraciones similares a ambientales en la eclosión efectiva de *Z. collastinensis*, las cuales variaron entre 80 y 100% de individuos eclosionados ($p > 0,05$) (Figura 37).

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
(Decapoda, Trichodactylidae)

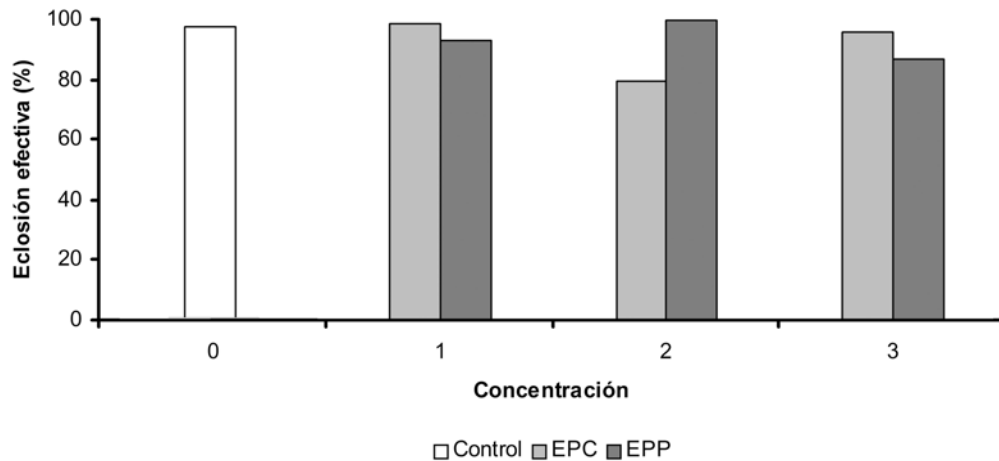


Figura 37: Efectos de diferentes concentraciones de endosulfán, contruidos a partir del producto comercial (EPC) o del producto puro (EPP), en la eclosión efectiva de los embriones de *Z. collastinensis*. Concentraciones de endosulfán: 0; 0,14; 0,7 y 3,5 μg endosulfán l^{-1} respectivamente.

Supervivencia

A pesar de no afectar significativamente el tiempo de incubación ni la eclosión efectiva de los neonatos, la exposición permanente a C_1 , C_2 y C_3 preparadas a partir del producto puro (0,14; 0,7 y 3,5 μg endosulfán l^{-1} respectivamente) y la concentración C_3 fabricada a partir del producto comercial (3,5 μg endosulfán l^{-1}) provocaron la disminución de la supervivencia ($p < 0,05$). Los neonatos expuestos a estas concentraciones presentaron anomalías en los pereopodos, similares a las descritas previamente (Figura 38). Sin embargo, la supervivencia hasta el primer ciclo de muda de los individuos expuestos a las concentraciones de endosulfán 1 y 2 fabricadas a partir del producto comercial fue similar al grupo control (Figura 39).

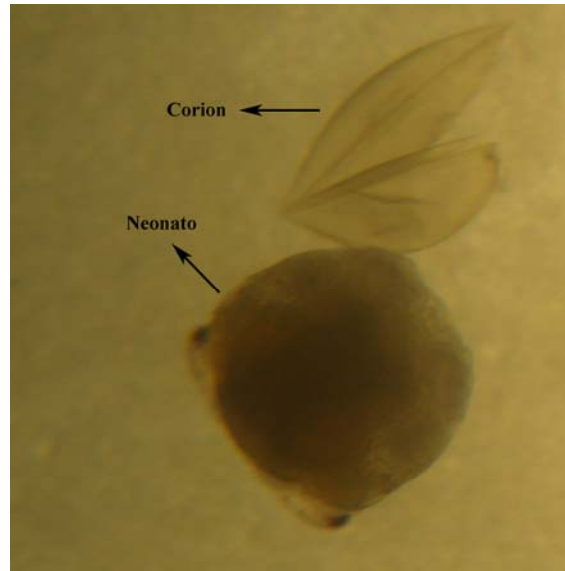


Figura 38: Neonato separado del corion, expuesto a endosulfán. Los pereiopodos permanecen replegados por debajo del abdomen. Observación a 10X

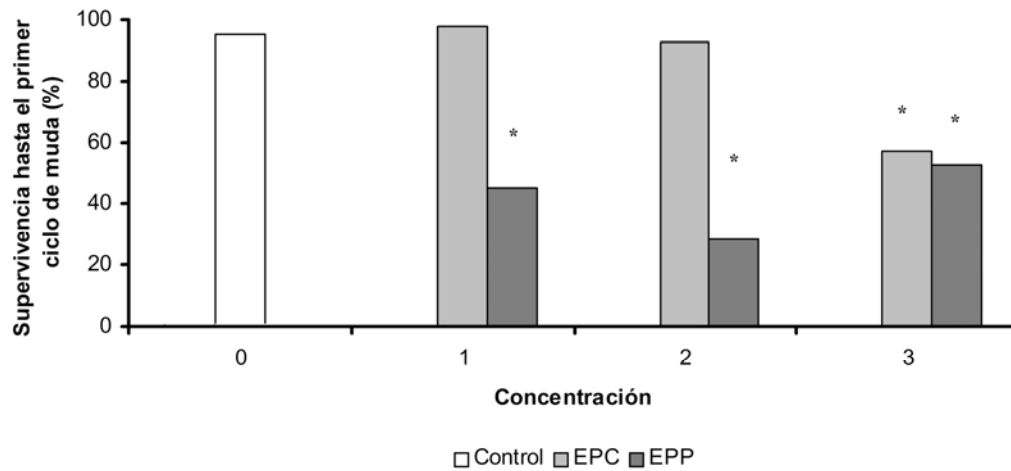


Figura 39: Efectos de diferentes concentraciones de endosulfán, preparadas a partir del producto comercial (EPC) o del producto puro (EPP), en la supervivencia de los neonatos de *Z. collastinensis*. Concentraciones de endosulfán: 0; 0,14; 0,7 y 3,5 μg endosulfán l^{-1} respectivamente. (*) Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$).

Efectos de Clorpirifós

Efectos sobre el periodo de incubación

La exposición a concentraciones de clorpirifós similares a las halladas en el ambiente (0,1; 0,5 y 2,5 μg clorpirifós l^{-1}) no causó modificaciones en el tiempo de incubación, el cual fue de entre 14 y 19 días desde el comienzo de la 5° etapa de desarrollo hasta el momento de la eclosión ($p > 0,05$) (Figura 40).

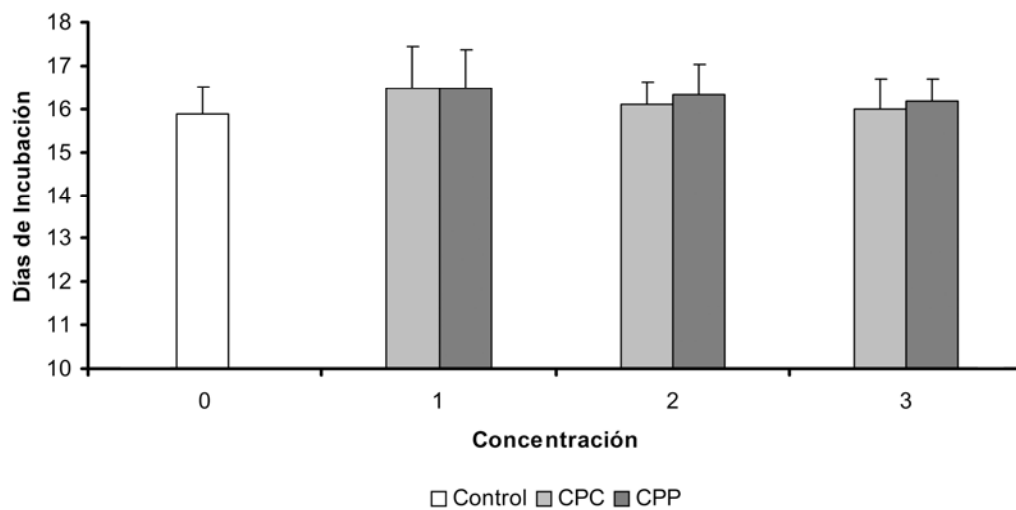


Figura 40: Efectos de diferentes concentraciones de clorpirifós, construidos a partir del producto comercial (CPC) o del producto puro (CPP), en el periodo de incubación de los embriones de *Z. collastinensis*. Concentraciones de clorpirifós: 0; 0,1; 0,5 y 2,5 μg clorpirifós l^{-1}

Efectos sobre la eclosión efectiva de embriones.

En el grupo control el 97% de los individuos logró eclosionar. En el caso de los embriones expuestos a clorpirifós, no se observaron efectos de las concentraciones similares a ambientales en la eclosión efectiva de *Z. collastinensis*, las cuales variaron entre 76 y 94% de individuos eclosionados ($p > 0,05$) (Figura 41).

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
(Decapoda, Trichodactylidae)

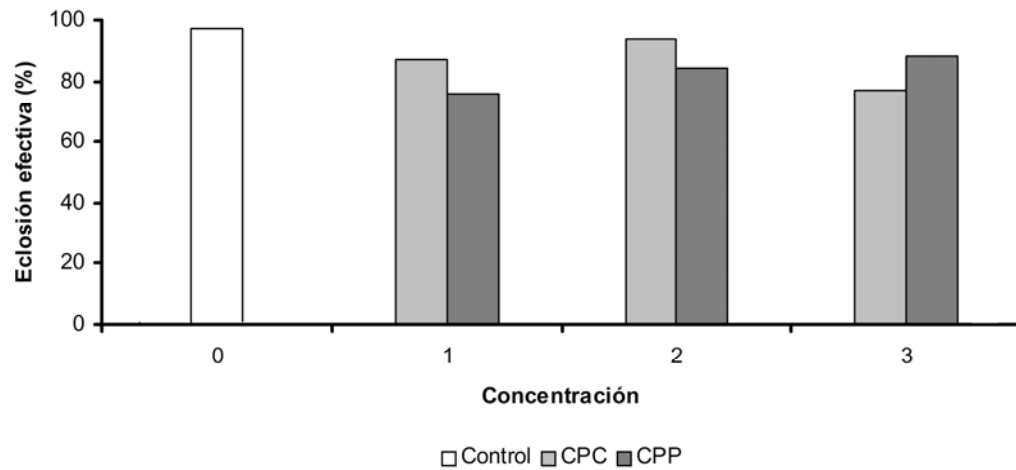


Figura 41: Efectos de diferentes concentraciones de clorpirifós, contruidos a partir del producto comercial (CPC) o del producto puro (CPP), en la eclosión efectiva de los embriones de *Z. collastinensis*. Concentraciones de clorpirifós: 0; 0,1; 0,5 y 2,5 μg clorpirifós l^{-1} .

Supervivencia.

A pesar de no afectar significativamente el tiempo de incubación ni la eclosión efectiva de los neonatos, la exposición permanente a C_1 , C_2 y C_3 de clorpirifós (0,1; 0,5 y 2,5 μg clorpirifós l^{-1}) fabricadas a partir del producto comercial y del producto puro disminuyó la supervivencia de los neonatos hasta el primer ciclo de muda ($p < 0,05$) (Figura 42). Los individuos expuestos a estas concentraciones presentaban anomalías similares a las descritas previamente (Figura 43).

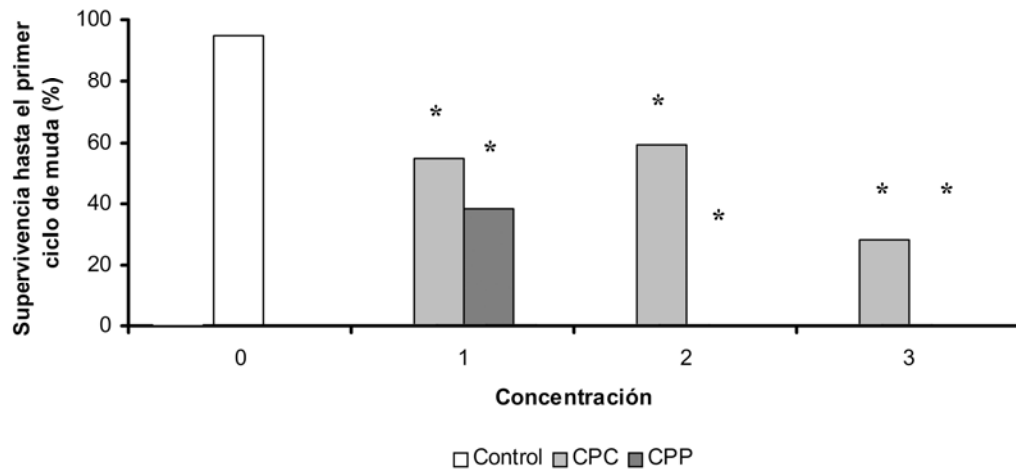


Figura 42: Efectos de diferentes concentraciones de clorpirifós, preparadas a partir del producto comercial (CPC) o del producto puro (CPP), en la supervivencia de los neonatos de *Z. collastinensis*. Concentraciones de clorpirifós: 0; 0,1; 0,5 y 2,5 µg clorpirifós l⁻¹. (*): Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0,05$).

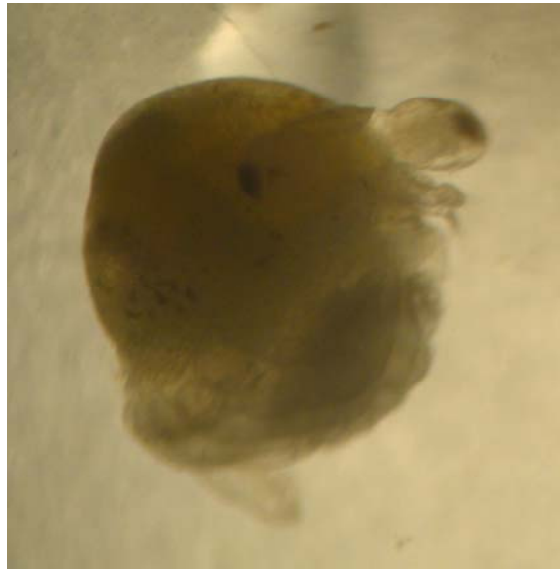


Figura 43: Neonato expuesto a clorpirifós. Los pereiópodos permanecen replegados por debajo del abdomen. Observación a 10X

Efectos de endosulfán sobre el consumo de oxígeno y la excreción de nitrógeno.

Efectos sobre el consumo de oxígeno.

La exposición a 6 y 62 μg endosulfán l^{-1} provocó la muerte en algunos individuos luego de 22 horas de exposición. Sin embargo, la supervivencia en general fue alta (96,66; 80 y 83 % de los individuos del grupo control y los expuestos a C₁ y C₂ respectivamente), sin observarse diferencias significativas entre el control y los expuestos ($p > 0,05$).

La exposición a endosulfán no causó modificaciones en el consumo de oxígeno durante las primeras cuatro horas de exposición, ya que no hubo diferencias significativas en la tasa de consumo de oxígeno de *Z. collastinensis* entre el grupo control y los expuestos a las diferentes concentraciones de endosulfán ($p > 0,05$) (Figura 44).

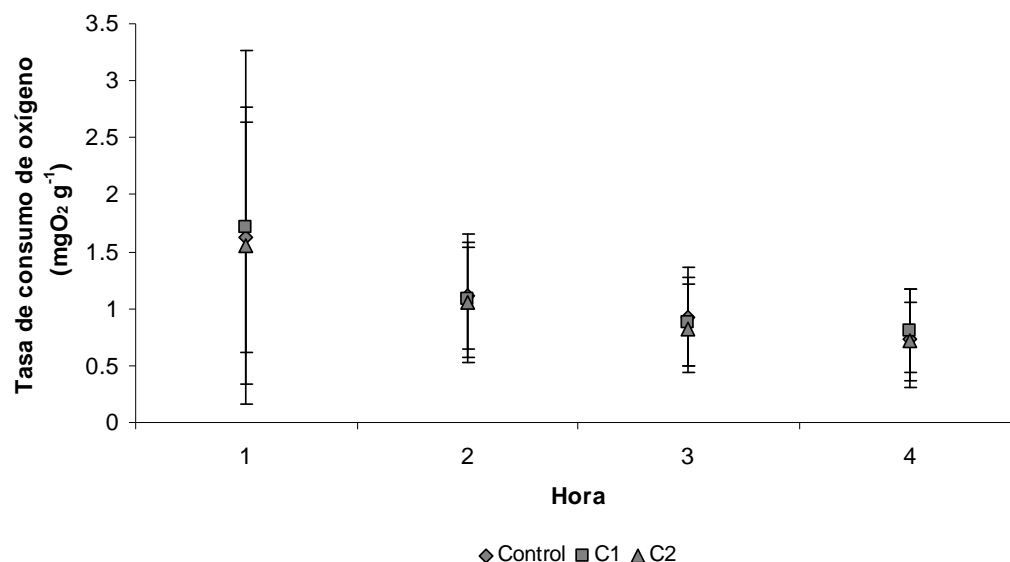


Figura 44: Tasa de consumo de oxígeno de *Z. collastinensis* expuestos a endosulfán durante 4 horas. Concentraciones de endosulfán: 0, 6 y 62 μg endosulfán l^{-1} respectivamente

Luego de 22 horas de exposición las tasas medias de consumo de oxígeno fueron similares entre los expuestos a endosulfán y los cangrejos del grupo control ($p > 0,05$) (Figura 45).

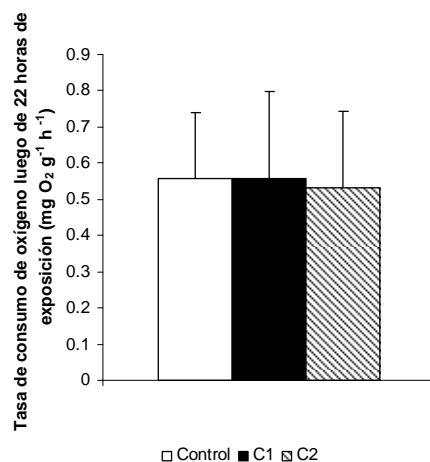


Figura 45: Consumo de oxígeno promedio de *Z. collastinensis* expuestos durante 22 horas a endosulfán. Concentraciones: 0, 6 y 62 µg endosulfán l⁻¹ respectivamente.

Gasto energético.

El gasto energético fue similar durante las primeras 4 horas entre los individuos del grupo control y los expuestos a las diferentes concentraciones de endosulfán ($p > 0,05$) (Figura 46). Luego de 22 horas de exposición las tasas de gasto energético fueron similares entre los expuestos a endosulfán y los cangrejos del grupo control ($p > 0,05$) (Figura 47).

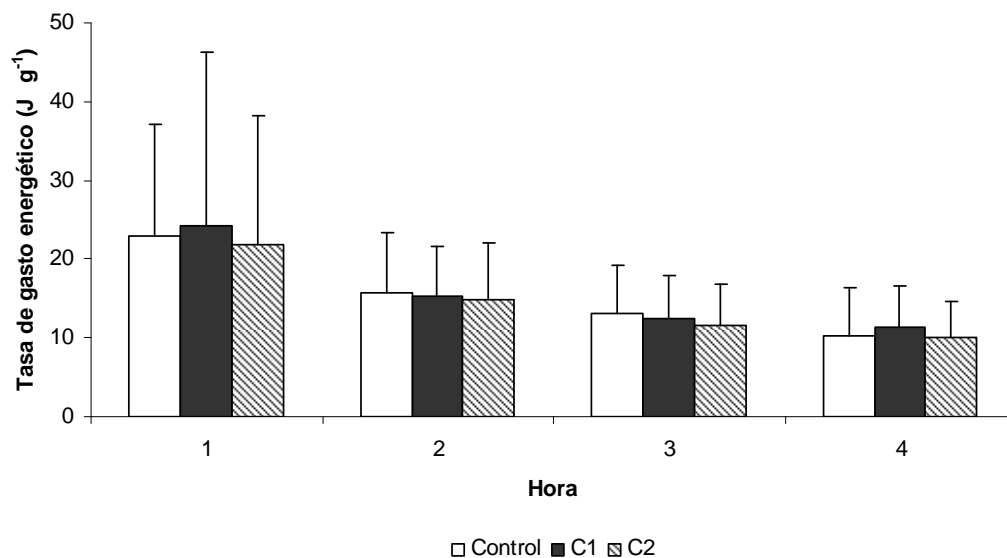


Figura 46: Tasa de consumo energético de *Z. collastinensis* expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán durante 4 horas. Concentraciones: 0, 6 y 62 µg endosulfán l⁻¹ respectivamente

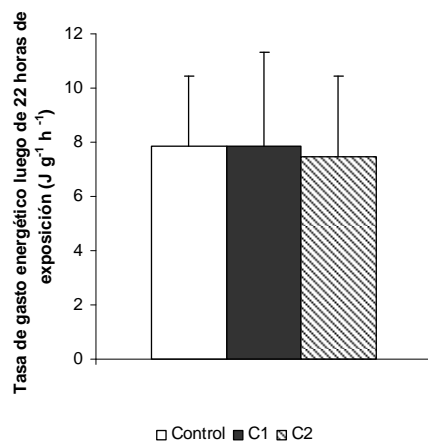


Figura 47: Gasto energético promedio de *Z. collastinensis* expuestos durante 22 horas a diferentes concentraciones de endosulfán. Concentraciones: 0, 6 y 62 μg endosulfán l^{-1} respectivamente.

Relación entre tasa de consumo de oxígeno y oxígeno disuelto

La correlación entre el oxígeno disuelto y la tasa de consumo de oxígeno fue significativa en todos los casos ($p < 0,05$), aunque con valores de R^2 muy bajas. No se observaron diferencias ni en las pendientes ni en la intercepción con el eje de las Y en ninguno de los casos ($p > 0,05$) (Tabla 8).

Tabla 8: Valores de R^2 , p, pendiente e intercepción con el eje Y de la relación entre consumo de oxígeno y oxígeno disuelto.

Concentración	R^2	p	Pendiente	Intercepción con el eje Y
C0	0,4484	< 0,0001	0,1116	0,2007
C1	0,4699	< 0,0001	0,1138	0,1688
C2	0,2373	0,0014	0,0878	0,2871

Excreción de nitrógeno amoniacal

La tasa de excreción de nitrógeno amoniacal, la cual varió entre 0,0020 y 0,61 $\text{mg NH}_4^+ \text{l}^{-1}$, disminuyó significativamente entre los individuos expuestos a 62 μg endosulfán l^{-1} (C_2) ($p < 0,05$), mientras que no hubo diferencias en la tasa de excreción entre los individuos control y los expuestos a 6 μg endosulfán l^{-1} (C_1) ($p > 0,05$) (Figura 48).

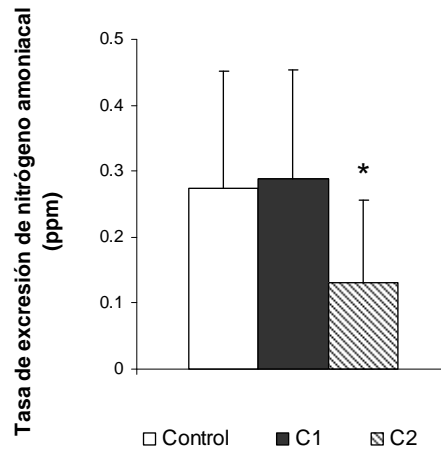


Figura 48: Tasa de excreción de nitrógeno de *Z. collastinensis* expuestos durante 22 horas a diferentes concentraciones de endosulfán. Concentraciones: 0, 6 y 62 μg endosulfán l^{-1} respectivamente.

Relación O:N

En el caso de la relación oxígeno – nitrógeno (O:N), la cual varió entre 7,34 y 644, 5, se observaron diferencias entre los cangrejos expuestos a la concentración 2 y los cangrejos control ($p < 0,05$), mientras que no se observaron diferencias entre los pertenecientes al grupo control y los expuestos a la concentración 1 ($p > 0,05$) (Figura 49).

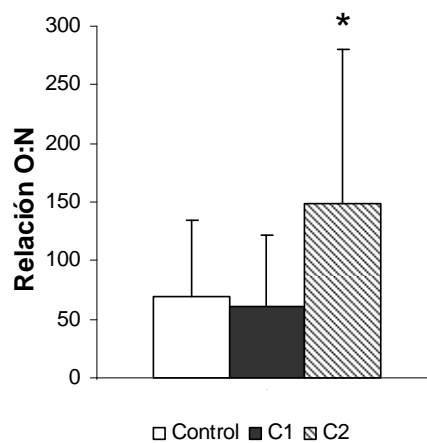


Figura 49: Relación oxígeno - nitrógeno de *Z. collastinensis* expuestos durante 22 horas a diferentes concentraciones de endosulfán. Concentraciones: 0, 6 y 62 μg endosulfán l^{-1} respectivamente.

DISCUSIÓN

Efectos letales

La región pampeana es una zona de amplia explotación agrícola-ganadera, tanto extensiva como intensiva. Diversos sistemas acuáticos cercanos se encuentran periódicamente expuestos a diferentes concentraciones de plaguicidas, encontrándose tanto en agua como en sedimentos asociados (Jergentz y col., 2004; 2005; Silva y col., 2005; Lenardón y Enrique, 1998; Lenardón y col., 1998). La exposición a estos biocidas puede potencialmente causar diversos efectos sobre la biota allí presente, dentro de la cual se encuentran los crustáceos decápodos de la familia Trichodactylidae, única familia de brachiuros presente en ríos y lagunas de la región (Collins y col., 2007).

Dentro de los grupos de biocidas que se utilizan en la agricultura, los insecticidas son los que en general presentan toxicidad letal aguda a menores concentraciones que los herbicidas y fungicidas (Montagna y Collins, 2004; 2005; 2009). La sensibilidad de los decápodos hacia este grupo de biocidas en particular puede estar relacionada con la afinidad filogenética que existe entre insectos y crustáceos, ya que ambos pertenecen al filo Arthropoda (Ruppert y Barnes, 1994). Los insecticidas, que están diseñados para matar o impedir el desarrollo de los insectos, tienen un mecanismo de acción que puede afectar también a crustáceos. Endosulfán, como insecticida de la familia de los ciclodienos, es un inhibidor de los receptores del ácido gama amino butírico (GABA) en el sistema nervioso central de artrópodos (Murray y col., 1993; French-Constant y col., 1993). Clorpirifós es un insecticida organofosforado que inhibe la producción de la enzima acetilcolinesterasa, la cual tiene la función de catalizar la hidrólisis de la proteína que permite las transmisiones de los impulsos nerviosos (acetilcolina). Esto provoca la excesiva estimulación de los receptores sinápticos y movimientos musculares incontrolados (Murty y Ramani, 1992). Ambos plaguicidas actúan sobre el sistema nervioso tanto de insectos como de crustáceos, causando finalmente la muerte de estos.

Sin embargo, los cangrejos en general, incluyendo la especie *Z. collastinensis*, poseen una elevada resistencia a estos insecticidas. La concentración que produce la muerte en la mitad de la población (CL₅₀) a las 96 horas es alta comparada con otros crustáceos. Este morfotipo sería incluso más resistente en general que otros morfotipos dentro del grupo de crustáceos decápodos, como los camarones (Tabla 9)

Carlos Leandro Negro
 Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
 (Decapoda, Trichodactylidae)

Tabla 9: Concentración letal 50 de endosulfán y clorpirifós sobre distintos grupos de crustáceos (anfípodos y decápodos).

Anfípodos	Endosulfán ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Clorpirifós ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Referencias Endosulfán	Referencias Clorpirifós
<i>Gammarus palustris</i>	0,54 (0,41 – 0,71)	0,19 (0,15 – 0,24)	Leight y Van Dolah (1999)	
<i>Gammarus lacustris</i>	5,8	0,11	Leight y Van Dolah (1999)	
<i>Gammarus fasciatus</i>	6	0,32	Leight y Van Dolah (1999)	
<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>		0,18		Leight y Van Dolah (1999)
<i>Hyalella azteca</i>	11,5 (8,5 – 33,9)	0,14	Leight y Van Dolah (1999)	
<i>Hyalella curvispina</i>	9,46 (8,07 – 11,10)		Negro y col. (2013)	
Camarones	Endosulfán ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Clorpirifós ($\mu\text{g l}^{-1}$)		
<i>Cardina laevis</i>	1.02 (0.87 - 1.19)		Suchayo y col. (2008)	
<i>Crangon septemspinosa</i>	0,2		Leight y Van Dolah (1999)	
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	0.2 (0.04 - 0.38)		Lombardi y col. (2001).	
<i>Palaemon macrodactylus</i>	17,1		Wirth y col. (2001)	
<i>Penaeus duorarum</i>	0,04		Leight y Van Dolah (1999)	
<i>Penaeus monodon</i>	12.2	20.74	Joshi y Mukhopadhyay (1990)	Eamkamon y col. (2012)
<i>Palaemonetes pugio</i>	0.32 (0.24 - 0.41)	0.37 (0.30 - 0.44)	Key y col. (2003)	Key y col. (1993)
<i>Palaemonetes argentinus</i>	6.144 (4.417 - 8.69)	0.49 \pm 0.255	Montagna y Collins. (2007)	
<i>Paratya australiensis</i>		0.167 (0.145 - 0.192)		Olima y col. (1997)
Langostas	Endosulfán ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Clorpirifós ($\mu\text{g l}^{-1}$)		
<i>Orconectes immunis</i>		6		Leight y Van Dolah (1999)
<i>Procambarus acutus</i>		2		Leight y Van Dolah (1999)
<i>Procambarus clarkii</i>	120	21	Leight y Van Dolah (1999)	
Cangrejos	Endosulfán ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Clorpirifós ($\mu\text{g l}^{-1}$)		
<i>Oziotelphusa senex senex</i>	18620		Rajeswari y col. (1988).	
<i>Eriocheir sinensis</i>		143.05 (126.1 - 162.6)		Li y col. (2006)
<i>Barytelphusa querini</i>		38.81 (37.09 - 40.46)		Srivastava y col. (2013)
<i>Spiralothelphusa hydrodroma</i>		120 (81 - 249)		Senthilkumar y col. (2007)
<i>Trichodactylus borellianus</i>	1860 \pm 78	45.53 (25.28 - 67.75)	Montagna (2010)	
<i>Zilchiopsis collastinensis</i>	1902 (1679 - 2124)	156. 78 (109.08 - 207.74)		

La mayor resistencia a biocidas que poseen los cangrejos podría estar relacionada con diversos aspectos inherentes a la anatomía y aspectos conductuales propios de estos. Los cangrejos son crustáceos decápodos cuyo abdomen se encuentra plegado sobre la zona ventral del cefalotórax, llevando el centro de gravedad a la zona central del cangrejo, facilitando la caminata (Brusca y Brusca, 1990; Ruppert y Barnes, 1994). Este abdomen plegado reduce la superficie de exposición al medio. La cutícula es mucho mas gruesa que la de otros crustáceos, solo superada por los cirripedios, lo cual disminuye la permeabilidad de sustancias con el ambiente (Brusca y Brusca, 1990;

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

Ruppert y Barnes, 1994). La disminución de la superficie de exposición así como también la cutícula más dura de la superficie expuesta disminuiría el ingreso dermal de los biocidas presentes en agua, resistiendo mayores concentraciones de insecticidas.

Por otro lado las especies de algunas familias de cangrejos, como los de la familia Trichodactylidae, poseen modos de vida semiterrestres, pudiendo emerger a la zona terrestre durante el atardecer y/o la noche. En estas especies las branquias se encuentran en cámaras branquiales semicerradas, formadas entre los lados del cuerpo y el caparazón, quedando resguardadas de la desecación provocada por la exposición directa (Brusca y Brusca, 1990). Durante estas salidas transitorias, en la cuales estos animales realizan diversas actividades como alimentación, construcción de cuevas, defensa del territorio, cortejo, entre otras, sus branquias actúan de manera similar a un pseudo-pulmón, utilizando el oxígeno que difunde hacia la humedad que cubre las branquias (Ruppert y Barnes, 1994). Este mecanismo anatómico de semi-aislamiento del ambiente podría contribuir también a la resistencia de este grupo a plaguicidas en comparación con otros crustáceos, incluso decápodos como los camarones.

La mayor resistencia de embriones hacia plaguicidas, comparándolos con los adultos, puede tener varias explicaciones. Evolutivamente los cangrejos que habitan el agua dulce desarrollaron diversas adaptaciones que les permitieron conquistar los sistemas continentales y completar el ciclo de vida en ellos. Entre las adaptaciones reproductivas que presentan, se puede observar un complejo de sacos embrionarios más gruesos que en los cangrejos marinos. Este saco embrionario engrosado permitiría aislar a los embriones del ambiente hipoosmótico, el cual representa un estrés muy fuerte en los embriones sin mecanismos de regulación eficientes (Barnes y col., 1993; Glas y col., 1997). Este aislamiento del ambiente podría ser también una causa de mayor resistencia de los embriones, al reducir el ingreso de biocidas, y por lo tanto aumentar la supervivencia de estos.

Por otro lado, la baja toxicidad sobre los embriones podría explicarse por la inmadurez del sistema nervioso. El modo de acción de endosulfán y de clorpirifós están relacionados con la disrupción de actividades del sistema nervioso central, a nivel de receptores GABA o de inhibición de la acetilcolinesterasa. En un sistema nervioso inmaduro, estos insecticidas tendrían disponibles menos sitios de acción que en los adultos, disminuyendo su efecto (Key y col., 2003).

Estos resultados coinciden con lo ocurrido en *P. pugio*, donde los embriones son más resistentes a endosulfán que los adultos e incluso, de acuerdo a Key y col. (2003), serían “relativamente insensibles” a fipronil. En el caso del cangrejo *E. sinensis*, los embriones son menos resistentes a clorpirifós, resultados opuestos a los encontrados en este estudio (Li y col., 2006). Sin embargo, *E. sinensis* es un cangrejo que puede vivir en ambientes dulceacuícolas pero no puede completar la reproducción en este medio, ya que necesita volver a la zona estuarial o marina para desovar (Schmidt-Nielsen, 1997). Sus huevos no poseerían el corion engrosado propio de los animales netamente dulceacuícolas, por lo cual el aislamiento que se propone como mecanismo que permite la mayor resistencia de los embriones no se aplicaría a esa especie (Waterman, 1961). El corion presenta una barrera que disminuiría el ingreso de biocidas, aumentando la resistencia de los embriones. Esta barrera, que no aísla totalmente el ingreso de plaguicidas, es un mecanismo involuntario que permitiría un mayor ingreso de plaguicidas a mayores concentraciones de exposición.

Efectos histopatológicos sobre hepatopáncreas y gónadas.

La conformación general del hepatopáncreas, compuesto por estructuras tubulares conformadas por una capa simple de células epiteliales y el lumen en forma de estrella o cruz, es similar a la de otros crustáceos decápodos, como el camarón *M. malcolmsonii*, el cangrejo *N. granulata* y la langosta *Nephrops norvegicus* (Bhavan y Geraldine, 2000; Pinho y col., 2003; Ridgway y col., 2006).

Las células R fueron el tipo celular más abundante, como se observa en general en los crustáceos decápodos (Icely y Nott, 1992; Bhavan y Geraldine 2000; Sousa y col., 2005). Entre las funciones que se le reconocen a estas células están las de absorber material del lumen y acumular lípidos y glucógeno. Una reducción en las células R causada por la exposición a plaguicidas, como lo ocurrido en endosulfán, podría causar una reducción en los sitios de acumulación de estas sustancias de reserva energética.

La exposición crónica a endosulfán puede causar la disminución de las reservas lipídicas y glucogénicas en el hepatopáncreas, como se ha observado en el camarón *Metapenaeus monoceros* luego de 7 días de exposición (Suryavanshi y col., 2009). De acuerdo a estos autores, la disminución en las concentraciones de lípidos y glucógeno estuvieron relacionadas con el aumento en el metabolismo de estos lípidos. Enfrentados a una situación estresante, aumentaría la demanda energética y la degradación de los

lípidos a ácidos grasos libres y glicerol (Suryavanshi y col., 2009). Además de este aumento en el metabolismo, una disminución de células R, las cuales son las responsables de absorber material del lumen y acumular lípidos y glucógeno, podría provocar una disminución en la acumulación de reservas energéticas. La disminución en las células R se observa debido al aumento de otros tipos celulares como células F y B, relacionados con los mecanismos de detoxificación, que desplazarían a las primeras.

Sin embargo, la exposición a endosulfán también puede causar un aumento en las reservas lipídicas, como en el caso de *M. malcolsonii*. En este camarón, la exposición crónica a concentraciones subletales de este plaguicida provocó una disminución en las concentraciones de glucógeno y de lípidos en hemolinfa, branquias y músculo. Sin embargo, las concentraciones de estos aumentaron en hepatopáncreas (Bhavan y Geraldine 1997).

La disminución en las células F y el incremento en el número de células B por túbulo podrían definirse como una respuesta no específica a la exposición a plaguicidas, las cuales estarían relacionadas con los procesos de detoxificación. Usualmente existe una relación inversa entre la cantidad de células F y la cantidad de células B por túbulo hepatopancreático, ya que de acuerdo al modelo de Hirsch y Jacobs las primeras dan lugar a las segundas, coincidiendo con lo observado en este caso (Papathanassiou y King 1984; Al-Mohanna y Nott 1989, Icely y Nott 1992). En la célula transicional F/B del hepatopáncreas de *Carcinus maenas*, Köhler y col. (1998) observaron la expresión de P-glucoproteínas (P-gp) en las microvellosidades. Estas proteínas estarían mediando diversos mecanismos de resistencia a xenobióticos, formando la primera línea de defensa contra el ingreso de tóxicos a las células. La expresión de estas proteínas no se observa ni en células F ni en células B, solamente en los compartimentos lisosomales de la célula transicional F/B, por lo cual estos autores suponen que estas células están especializadas en la acumulación y eliminación de compuestos tóxicos (Köhler y col., 1998). La exposición a plaguicidas podría haber estimulado la producción y transición de las células, encontrándose como resultado el aumento de las células B, las cuales serían el producto de esta transición.

Aumentos en el número de células transicionales F/B y de células B fueron también descritos en el tramo medio del hepatopáncreas del camarón *M. dobsoni*. Luego de 15 días de exposición a hidrocarburos de petróleo, este camarón presentó aumentos evidentes en el número de células B. Este aumento rápido en el número de estas células,

el cual pudo ser observado luego de solo 15 minutos de exposición, estuvieron acompañadas de una reducción extrema del número de células F (Sreeram y Menon, 2005). El aumento de estas células indican una alta tasa de excreción desde el hepatopáncreas. La acumulación y eliminación de los xenobióticos sería efectuado, de acuerdo a estos autores, a través de un alto número de células F que se convierten luego en células B. Collins (2010) observó un aumento en células F en camarones expuestos a cipermetrina. La mayor cantidad de este tipo celular podría, siguiendo el esquema de Hirsch y Jacobs y de acuerdo a lo propuesto por Sreeram y Menon (2005), observarse luego como un aumento de las células B.

Las modificaciones del número de células puede no ser una respuesta observable ante la exposición a todos los compuestos tóxicos. En el caso de la exposición de *N. granulata* a microcistina, no se encontraron aumentos en el número de células B (Pinho y col., 2003). Esto podría indicar que los sistemas de detoxificación mediados por p-glicoproteínas no estarían expresándose en el caso de toxinas naturales como las microcistinas. Estos serían mecanismos de resistencia a xenobióticos, como algunos biocidas e hidrocarburos (Khöler y col., 1998).

Pinho y col (2003) observaron una disminución en el número de células B en hepatopáncreas de *N. granulata* en los grupos de control comparado con los valores obtenidos de los individuos analizados antes del comienzo de la experimentación. En nuestro caso también observamos una disminución en estas células a partir de los 16 días de experimentación. El hepatopáncreas es un órgano dinámico capaz de modificar su estructura celular en base a los estímulos recibidos del medio o a necesidades fisiológicas propias. Las células B, relacionadas con la digestión intracelular, pueden disminuir por la disminución en la alimentación o durante la premuda (Papathanassiou y King, 1984). En nuestro sistema experimental, si bien la oferta de alimento fue constante, podría haber ocurrido una disminución en la alimentación debido a la disminución de otras actividades como reproducción, evasión de predadores, entre otras. Otros autores también detectaron disminuciones en el número de células B así como también en el número de células R, debido principalmente a la necrosis producida y a la pérdida de tejido hepatopancreático (Frias-Espéricueta y col., 2008).

De acuerdo a Sreeram y Menon (2005), los mecanismos de defensa relacionados con la mayor producción de células F y su transformación en células B, las cuales aumentan en un intento por metabolizar y excretar la mayor cantidad posible de

xenobióticos, no pueden mantenerse indefinidamente. A medida que las dosis o los días de exposición aumentan, comienzan a observarse ciertos indicadores de daño como citopatologías (atrofia de células E y delaminación de los hepatocitos), las cuales dan luego a diversas histopatologías.

La exposición a tóxicos, tanto biocidas como metales, pueden provocar histopatologías en el hepatopáncreas de crustáceos, como la presencia de lúmenes anormales, necrosis, delaminación de los epitelios, infiltración hemocítica, melanización, entre otras. (Ridgway y col., 2006; Bianchini y Monserrat, 2007; Wu y col., 2008; Bhavan y Geraldine, 2009; Abad-Rosales y col., 2010).

Estas histopatologías se observan entonces como efecto luego de que los mecanismos de defensa existentes, tanto a nivel molecular, celular e histológico, no fueron suficientes para impedir el daño. Las modificaciones en la composición tisular del hepatopáncreas, relacionada con los mecanismos de defensa ante compuestos tóxicos, son capaces de actuar de forma efectiva dentro de ciertos niveles de exposición. Superados estos niveles, que son variables entre especies y entre compuestos, los procesos de detoxificación ya no son completamente efectivos y comienzan a aparecer distintos indicadores de daño, como necrosis, delaminaciones en los epitelios, anomalías en el lumen, entre otros. Diversas histopatologías han sido encontrados en los túbulos hepatopancreáticos de *Z. collastinensis* expuestos a estos plaguicidas, las cuales fueron más frecuentemente observadas al exponerse a estos cangrejos a algunas concentraciones de plaguicidas. La identificación y cuantificación de estas podrían ser utilizadas como indicadores complementarios de exposición y daño, ya que no todos los compuestos tóxicos poseerían mecanismos de detoxificación relacionados con modificaciones a nivel de tejido hepatopancreático (Pinho y col., 2003; Bianchini y Monserrat, 2007). La combinación entre las modificaciones en el número de células y la ocurrencia de histopatologías podría indicar la exposición a situaciones estresantes, aunque no permitiría reconocer la causa por la cual ese estrés se está produciendo.

Estos efectos producidos en hepatopáncreas, relacionados con la disminución general de células R, podría provocar una disminución en la capacidad de tomar material del lumen y acumular reservas, como se expresó anteriormente. La disminución en la acumulación de reservas lipídicas podría tener sus efectos en el desarrollo del ovario, ya que este está íntimamente relacionado con el hepatopáncreas. Durante la vitelogénesis exógena, las lipoproteínas que conforman el vitelo son

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulceacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

producidas en el hepatopáncreas y a través de la hemolinfa alcanzan el ovario y los ovocitos (Harrison 1990). Una disminución en la acumulación de lípidos en hepatopáncreas, los cuales son utilizados en la síntesis de lipoproteínas que luego migran al ovario, podría provocar una disminución de la velocidad de crecimiento.

En el caso de los individuos de *Z. collastinensis* expuestos a endosulfán y clorpirifós los índices gonadosomáticos fueron similares entre los grupos expuestos y los grupos control. La exposición a plaguicidas y algunos metales ha causado diferencias en los índices gonadosomáticos y en el tamaño de los ovocitos en los cangrejos *U. pugilator* y *N. granulata* (Rodríguez y col., 1994; 2000). En el caso del cangrejo dulceacuícola *Oziotelphusa senex senex* expuesto al plaguicida organofosforado sumitién, se inhibió el desarrollo gonadal luego de 20 días de exposición constante a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Esta inhibición pudo ser observada en el menor índice gonadosomático que presentaban los individuos expuestos en comparación con los controles (Sreenivasula Reddy y col., 1983). En cangrejos previamente ablacionados, Medesani y col (2004) observaron una disminución en el índice gonadal de las hembras de *N. granulata* expuestas a cadmio y cobre comparados con los ablacionados del grupo control. En los cangrejos no ablacionados, si bien se observó una disminución en los valores medios de los índices gonadosomáticos, estas diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas. En nuestro caso las diferencias en los valores medios no fueron estadísticamente significativas. En el caso de los peces, efectos en los índices gonadosomáticos fueron observados en hembras de *Channa punctatus* expuesto a 5 ppm de carbofurán y 1,5 ppm de fenutrotión durante 120 días, donde se observó una disminución con respecto al control (Mani y Saxena, 1985). Similares resultados se encontraron en el caso de hembras de *Rasbora daniconius* expuestas a endosulfán, carbofurán y metil paratión (Rastogi y Kulshrestha, 1990). Sin embargo, estas respuestas fueron observadas luego de transcurridos varios días de exposición constante a concentraciones que podrían considerarse altas, demostrando un efecto crónico relacionados con estas concentraciones de exposición.

El menor valor en los índices gonadosomáticos puede relacionarse con una disminución o retardamiento en el crecimiento ovocitario, ya que la exposición a plaguicidas puede causar diferencias en los tamaños de los ovocitos. Rodríguez y col. (1994) observaron aumentos en el tamaño de los ovocitos al exponer hembras de *N. granulata* a paratión, un plaguicida organofosforado cuyo modo de acción es similar a

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

clorpirifós. Este aumento estaría relacionado, de acuerdo a estos autores, con los efectos neurotóxicos causados a nivel del complejo órgano X – glándula del seno, ubicado en el pedúnculo ocular. Este complejo glandular es el encargado de sintetizar la hormona inhibidora de la gónada (GIH, por sus siglas en inglés). La exposición a paratión podría haber inhibido la producción de esta hormona, estimulando el crecimiento de la gónada. Sin embargo, este efecto ocurrió luego de dos meses de exposición a una concentración constante de $10 \mu\text{g l}^{-1}$, una metodología diferente a la utilizada en este trabajo. Nuestro diseño experimental se caracterizó por una concentración inicial subletal alta que se diluye en el tiempo, simulando un pico de contaminación con posterior dilución. En este sistema la exposición podría no haber sido lo suficientemente alta durante el suficiente tiempo como para producir un efecto en el volumen de los ovocitos y en los índices gonadosomáticos de *Z. collastinensis* que supere las variaciones intra poblacionales.

La exposición a plaguicidas como clorpirifós puede producir aumentos en el número de ovocitos atrésicos. Estos se observaron en la etapa de vitelogénesis exógena y se caracterizan por ser más pequeños que los ovocitos normales, poseer contorno irregular, perdiendo la forma redondeada u ovoide, y presentan color blancuzco, diferente al color que presentan los ovocitos en vitelogénesis exógena, el cual es propio de cada especie. La exposición a clorpirifós causó un aumento en el número de estos ovocitos en *Z. collastinensis*. En *Tilapia leucosticta* expuestos a fentiión, insecticida perteneciente a la familia de los organofosforados, Kling y col. (1981) encontraron una alta proporción de ovocitos maduros atrésicos, de alrededor del 90%. Algo similar ocurrió en *C. punctatus* expuesto a concentraciones constantes de 5 ppm de carbofurán y 1.5 ppm de fenitrotión durante 120 días y en el pez *Brachydario rerio* expuesto a malatión (Mani y Saxena, 1985; Ansari y Kumar, 1987). La exposición a endosulfán, carbofurán y metil paratión de *R. daniconius* también causó un aumento de atresia así como también de ovocitos inmaduros (Rastogi y Kulshrestha, 1990). Sin embargo, en este último caso el aumento en el número de ovocitos atrésicos estuvo también acompañado de una reducción en el diámetro de los ovocitos expuestos. En *Z. collastinensis* los efectos estuvieron relacionados con el aumento de este tipo de ovocitos en lugar de la reducción general en el tamaño.

En el caso de crustáceos decápodos pocos son los trabajos existentes. En el cangrejo estuarial *N. granulata*, la exposición a 2,4-D causó un aumento en los ovocitos atrésicos lo cual puede estar relacionado con el aumento en los niveles de estrés. Sin

embargo la exposición a paratión no causó un aumento en estos, como otros organofosforados lo hicieron en peces, aunque si aumentaron aquellos que presentaban contornos anormales (Rodríguez y col., 1994).

Si bien la mayor parte de los ovocitos de las gónadas de los animales expuestos presentarían características similares a los grupos control, al menos en cuanto a tamaño y conformación general, la reducción en el número de ovocitos viables para ser fecundados podría causar efectos a niveles poblacionales. La reducción de estos puede causar la disminución en el número de embriones y en los nuevos integrantes de la población. La baja tasa de natalidad cobra fundamental relevancia en una especie como esta, la cual presentaría uno o a lo sumo dos eventos reproductivos en el año (datos de nuestro laboratorio).

Bioconcentración de biocidas.

La ausencia de concentraciones de endosulfán en los tejidos del control indica que los cangrejos utilizados provienen de lugares poco o sin impacto de contaminación con este plaguicida. Estos cangrejos fueron recolectados en lugares considerados *a priori* como “prístinos” o “semi prístinos”, si es que se puede considerar que estos lugares todavía existan. Los sitios de muestreo se encontraban en la zona del valle aluvial relacionado con el tramo medio del río Paraná. En estos sitios no se observan áreas de cultivo cercanas, ya que son sitios de baja cota que durante las crecientes pueden cubrirse con agua, y las condiciones edáficas y de aislamiento dificultan su utilización en la agricultura.

La acumulación general del isómero α -endosulfán se relaciona con el hecho de que el producto utilizado (Zebra[®], Red Surcos) posee una relación de isómeros de 70% de este y 30% de β -endosulfán. El sulfato de endosulfán, metabolito de degradación de ambos isómeros, pudo no haber sido detectado por diferentes motivos. Por un lado la degradación hacia ese metabolito está mediada por microorganismos, los cuales se encontraban en nuestro sistema en bajas concentraciones ya que no fueron agregados. Al no existir una comunidad que degrade estos compuestos, las concentraciones de sulfato de endosulfán fueron bajas. Por otro lado, el camino de degradación relacionado con la hidrólisis de los compuestos parentales tiene como producto el endosulfán diol, el cual no fue medido. La mayor acumulación de α -endosulfán está relacionada con la mayor presencia en agua de este isómero.

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

El hepatopáncreas es un sitio de acumulación de lípidos en crustáceos decápodos (Icely y Nott, 1992; Vogt, 2002). De los 3 tejidos analizados, el orden en cuanto a la concentración de lípidos fue hepatopáncreas > gónadas > músculos de la quela, en los cuales no se detectó contenido lipídico mensurable por métodos gravimétricos. Las concentraciones de endosulfán acumuladas también siguieron el orden hepatopáncreas > gónadas > músculos de la quela. Endosulfán es un compuesto mayormente lipofílico, por lo cual fue mayormente acumulado en los órganos con mayor concentración de lípidos.

La acumulación de xenobióticos es la diferencia entre el ingreso y la eliminación de estos compuestos. A medida que las concentraciones en el medio se modifican (aumentan o disminuyen), las concentraciones en los individuos también aumenta o disminuye hasta alcanzar el estado estacionario (Newman y Unger, 2003). En hepatopáncreas, las concentraciones de endosulfán acumuladas fueron mayores en los primeros días, cuando las concentraciones de este en agua fueron más altas. A medida que las concentraciones en agua decrecieron, los valores observados en este órgano también disminuyeron. Esta detoxificación podría estar definida por los mecanismos que este órgano posee. Como se planteó anteriormente, estos mecanismos de detoxificación podrían estar relacionados con las células F, su transformación en células F/B y el aumento observado de células de excreción B, las cuales aumentan en un intento por metabolizar y excretar la mayor cantidad posible de xenobióticos (Sreeram y Menon, 2005). Distintas cantidades de este plaguicida habrían sido excretadas por acción de las células B hacia el lumen, para luego acoplarse a las heces y ser excretados hacia el exterior. Este aumento en la transformación de células F en células B, el cual se deduce por el aumento de estas últimas, sería el responsable de la detoxificación en el tiempo.

Los procesos de detoxificación pueden incrementar la eliminación de plaguicidas, reduciendo la bioacumulación. Debido a ello, la acumulación de xenobióticos en diferentes tejidos puede no ser directamente proporcional a la concentración a la que los organismos están expuestos. Estos mecanismos de detoxificación actúan en diferentes intensidades de acuerdo a la concentración de exposición. Las concentraciones de endosulfán acumuladas por los cangrejos expuestos a C₁ y C₂, las cuales fueron similares a pesar de las diferencias en las concentraciones en agua, están influidas por los mecanismos de detoxificación. Estos se activan en

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

mayor o menor intensidad de acuerdo a los estímulos recibidos (Sreeram y Menon, 2005). De esta manera, los animales regulan los niveles de plaguicidas acumulados. White y Rainbow (1982), probaron la existencia de mecanismos de regulación de metales acumulados en el camarón *P. elegans*, el cual regula las concentraciones de metales esenciales hasta cierto valor, denominado nivel umbral, por encima del cual la acumulación ya no puede ser controlada. Sin embargo, estos mecanismos de regulación parecen actuar solo en el caso de metales esenciales, como el Zinc y el Cobre, mientras que en el caso de metales no esenciales como el Cadmio, la acumulación está directamente relacionada con la concentración en agua.

En el caso de los cangrejos expuestos a la concentración 3 (concentración inicial de $360 \pm 15 \mu\text{g. endosulfán l}^{-1}$), las concentraciones de endosulfán habrían sido más altas que el valor umbral de detoxificación. Los mecanismos de eliminación habrían sido saturados, no logrando regular su acumulación. De este modo, la acumulación estuvo menos controlada y mayormente relacionada con la concentración de endosulfán en agua, la cual fue decreciendo con el tiempo, aumentando los efectos deletéreos relacionados con necrosis y otros efectos histopatológicos.

Procesos de bioacumulación no lineales también han sido observados en otros trabajos realizados en especies dulceacuícolas de la región. En el caso de *Z. oronensis*, no se encontraron diferencias en la acumulación de plomo en el sistema digestivo (entre los cuales se encontraría el hepatopáncreas) entre las diferentes concentraciones de exposición de este metal luego de 15 días de exposición (Gagneten y col., 2012). En el caso de *Z. collastinensis*, no se observaron diferencias en la acumulación de cromo al ser expuestos a concentraciones ascendentes de este metal en agua, las cuales poseían un factor de dilución de 0,5 (Marchese y col., 2008).

En algunos casos se encontraron incluso relaciones inversas, donde la mayor acumulación se observó en los animales expuestos a concentraciones menores. De acuerdo a Gutiérrez y col. (2008), ejemplares del cladóceros *Daphnia magna* acumularon cantidades mayores de cromo en aquellos expuestos a $100 \mu\text{g. l}^{-1}$ que los expuestos a concentraciones mayores, de $300 \mu\text{g. l}^{-1}$. Sin embargo todos estos trabajos han sido realizados con animales expuestos a diferentes metales, y mecanismos que regulan la acumulación y detoxificación de estos no son los mismos que aquellos que intervienen en el caso de compuestos orgánicos como los insecticidas (McGeer y col., 2003).

En el caso de la bioconcentración en gónadas femeninas, esta no mostró relación con la concentración de exposición así como tampoco se observaron variaciones en el tiempo. El endosulfán presente en las gónadas puede tener dos vías de ingreso. Por un lado, las concentraciones de biocidas circulantes por hemolinfa pueden haberse acoplado a los ovocitos por contacto directo. Los ovarios son sitios de acumulación de lipoproteínas, en las cuales los plaguicidas lipofílicos podrían haberse adsorbido luego de atravesar el epitelio ovárico y penetrar en los ovocitos.

Por otro lado, el ingreso de plaguicidas a las gónadas puede relacionarse con las lipoproteínas enviadas desde el hepatopáncreas. Durante la vitelogénesis exógena los lípidos acumulados en este son transformados en lipoproteínas y enviados a través de la hemolinfa hacia los ovocitos (Harrison, 1990; Lubzens y col., 1995; Rodríguez y col., 2000). Los biocidas como endosulfán, cuyo coeficiente de partición octanol/agua favorece su solubilidad en tejidos ricos en lípidos, podrían adherirse a las lipoproteínas y ser transportado junto con ellas hacia el ovario.

Los ovocitos son estructuras de acumulación de vitelo, el cual luego le servirá a los embriones para obtener la energía necesaria para su desarrollo así como también a las larvas o juveniles en especies lecitotróficas. De este modo, diferentes concentraciones de biocidas, las cuales forman parte del vitelo de los ovocitos, estarían pasando a las siguientes generaciones, entrando en contacto con los embriones desde la fecundación.

El hecho de que algunos compuestos lipofílicos sean acumulados en las gónadas de las hembras es señalado como una de las razones por las cuales existen diferencias entre sexos en cuanto a la resistencia a plaguicidas. En el camarón dulceacuícola *P. pugio* se puede observar una mayor resistencia hacia endosulfán en las hembras, comparándolas con los machos o con las agrupaciones de hembras y machos juntos (Wirth y col., 2001). De acuerdo a estos autores, uno de los mecanismos metabólicos mediante los cuales las hembras disminuyen las concentraciones de este biocida circulante se relaciona con el transporte de lipoproteínas hacia los ovocitos. En otras especies de crustáceos, como en el copépodo *Microarthridion littorale*, se puede observar también una mayor resistencia de las hembras con respecto a los machos, determinada a través de las diferencias en los valores de concentración letal media (Di Pinto y col., 1993). Similares resultados se observarían también en el cangrejo *U. pugilator* en ensayos agudos de 96 horas (Wirth y col., 2001).

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis*
(Decapoda, Trichodactylidae)*

Sin embargo este mecanismo de detoxificación, que permite disminuir las concentraciones y los efectos de estos compuestos sobre las hembras, podría tener un efecto negativo sobre las crías y por lo tanto al resto de la población. Estos plaguicidas alcanzan las células reproductivas, comenzando la exposición de los embriones desde el momento mismo de la fertilización. Esta exposición constante de los embriones a plaguicidas puede causar diferentes efectos sobre estos (Rodríguez y Amin, 1991; Lee y col., 1996).

El compuesto mayormente encontrado en las gónadas fué el isómero α -endosulfán. No se encontraron cantidades detectables del compuesto de degradación, sulfato de endosulfán, tanto en hepatopáncreas como en gónadas, lo que estaría indicando que no existe una acumulación de compuestos metabolizados. Estos resultados coinciden con los encontrados por Lee (1993) en el cangrejo azul *C. sapidus*, en el cual se encontró poca acumulación de metabolitos de trifeniltín y de hexaclorobifenilo en el hepatopáncreas, primando la acumulación de los compuestos parentales. En el único caso en el que se detectaron mayores cantidades de los productos de metabolización fue en el dicloronitrobenceno. Sin embargo en el ovario y en los ovocitos la acumulación también fue en general de los compuestos parentales para estos tres plaguicidas, encontrando solo en el caso trifeniltín pudieron observarse algunas concentraciones del metabolito acumuladas en el ovario. Esto indicaría que los compuestos parentales son transportados hacia los ovocitos, mientras que los metabolitos, en el caso de existir metabolización interna, no serían enviados hacia estos (Lee, 1993). Este comportamiento es similar al observado en el caso de *Z. collastinensis*.

El hepatopáncreas es un órgano dinámico, cuya composición celular y funcionalidad puede modificarse de acuerdo a diferentes estímulos. A través de diferentes mecanismos de detoxificación este órgano es capaz de depurarse a si mismo con el tiempo. De este modo, las concentraciones acumuladas en este órgano estarían relacionadas con las concentraciones presentes en un plazo de tiempo corto.

Por otro lado, las gónadas serían un sitio conservativo de acumulación de lípidos y de compuestos relacionados con estos. Las concentraciones allí acumuladas tendrían relación con algún evento de exposición, pero no necesariamente con un evento cercano en el tiempo. Luego del cese de la exposición, las concentraciones presentes en este

órgano podrían disminuir por la acumulación de lípidos con menores concentraciones de plaguicidas.

La combinación de información entre las concentraciones acumuladas en hepatopáncreas y en gónadas puede tener importancia en la utilización de *Z. collastinensis* como bioindicador de contaminación. Las concentraciones presentes en hepatopáncreas estarían más relacionadas con exposiciones recientes a plaguicidas, indicando un evento de contaminación cercano en el tiempo. Las concentraciones acumuladas en gónadas brindan información acerca de algún evento de exposición, sin poder estimarse el momento en que este ocurrió. Así, los diferentes tejidos de este cangrejo, en especial el hepatopáncreas, pueden servir en el reconocimiento no solo del tipo de compuesto a los que estuvieron expuestos estos organismos y el resto de la biota relacionada, sino que también podrían brindar información acerca del momento en que esta exposición ocurrió, es decir, si fue una exposición reciente.

Los cangrejos ocupan un sitio central en las redes tróficas, tanto de los ecosistemas terrestres relacionados con las riberas como de los ecosistemas dulceacuícolas. Estos pueden ser activos depredadores de invertebrados, como oligoquetos, moluscos y otros crustáceos, alimentarse de plantas e incluso de restos de animales y plantas en descomposición. A su vez, son utilizados como recurso trófico por peces, reptiles, aves y mamíferos, además de otros cangrejos (Williner y Collins, 2002; Collins, 2006). Su alta resistencia a plaguicidas, superior a otros crustáceos decápodos, y su capacidad de bioacumular plaguicidas los convierte en una fuente alimenticia disponibles en sitios cuya biodiversidad haya disminuido por la exposición a plaguicidas, transfiriendo estos compuestos a sus predadores (biomagnificación) y potencialmente al hombre (Newman y Unger, 2003).

Efectos subletales en embriones.

Los embriones dentro del huevo de *Z. collastinensis* presentan una alta resistencia a concentraciones de plaguicidas, incluso a aquellas que son letales para los adultos. De acuerdo a estos resultados, este estadio inmaduro sería más resistente. Sin embargo la exposición a estas concentraciones, si bien no fue letal, tampoco fue inocua, ya que se produjeron varios efectos subletales, como el incremento en el tiempo de incubación, disminución en la eclosión efectiva y disminución en la supervivencia de las crías nacidas.

El incremento en el tiempo de incubación de los embriones expuestos a endosulfán y a las 4 concentraciones más bajas de clorpirifós coincide con lo observado en el cangrejo azul *C. sapidus* expuesto a fenvalerato, el camarón *P. pugio* expuesto a fipronil y a endosulfán y el cangrejo *E. sinensis* luego de la exposición a algunas concentraciones de clorpirifós (Lee y Oshima, 1998; Wirth y col., 2001; Key y col., 2003; Li y col., 2006). En este último se observó también, como en el caso de *Z. collastinensis*, un aumento en el periodo de incubación en las concentraciones más bajas y un periodo de incubación similar al control en las concentraciones más altas (Li y col., 2006).

Sin embargo, Rodríguez y Pisanó (1993) encontraron similares tiempos de incubación entre las larvas del cangrejo *N. granulata* expuestas al insecticida paratión y al herbicida 2,4-D y sus respectivos grupos control. En el caso de *E. sinensis* expuesto a atrazina, Li y col. (2006), encontraron una disminución en el periodo de incubación.

En animales marinos la exposición a metales causa en general modificaciones en el periodo de incubación pero tendientes a su acortamiento. La exposición a ciertos metales como plomo y cadmio disminuye el tiempo de incubación del cangrejo anomuro *Lithodes santolla* (Amin y col., 1997). En el caso de *N. granulata* la exposición de embriones a metales como cobre también redujo el periodo de incubación, mientras que zinc y plomo no causaron modificaciones en el tiempo de incubación, aunque sí causaron asincronías en la eclosión (Zapata y col., 2001; Lavolpe y col., 2004). Por el contrario, la exposición a mercurio aumentó el tiempo de incubación de esta especie (Sánchez y col., 2005). Amin y col. (1997) plantean que, expuestas a concentraciones tóxicas de metales, las larvas “preferirían” eclosionar a su forma de vida libre como un método de evadir este ambiente estresante. Estas larvas, que permanecen en la zona pelágica durante un tiempo, podrían migrar junto con las corrientes marinas hacia sitios menos estresantes (Amin y col., 1997).

En las especies marinas las larvas poseen espinas dorsales y/o rostrales, las cuales son utilizadas en la ruptura del corion durante el inicio de la eclosión. Estas espinas, así como también las setas, son desarrolladas durante el último periodo de incubación. Las larvas eclosionadas prematuramente ante la exposición a metales presentaron malformaciones en estas estructuras (Amin y col., 1997; Zapata y col., 2001; Lavolpe y col., 2004 Sánchez y col., 2005). De acuerdo a Amin y col. (1997), el

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis
(Decapoda, Trichodactylidae)

estimulo hacia la eclosión prematura en ambientes estresantes, descrito anteriormente, sería tan fuerte que se realizaría aún a costa del completo desarrollo de estas estructuras.

En el caso de los neonatos de *Z. collastinensis*, los cuales eclosionan como juveniles, no se observan espinas u otras estructuras similares a las larvas de especies marinas (datos sin publicar). La eclosión se produce a través de los movimientos de los pereopodos que realizan los embriones, empujando hasta romper el corion. El mayor tiempo de incubación podría estar relacionado con los efectos de estos plaguicidas sobre la coordinación de los movimientos. Endosulfán y clorpirifós son dos insecticidas que alteran el sistema nervioso central. La exposición a ambos plaguicidas puede causar dificultades en la coordinación de los movimientos de juveniles y adultos (Montagna y Collins, 2007). El aislamiento del corion, si bien disminuiría la permeabilidad de plaguicidas hacia el interior del huevo, no es total. Lund y col. (2000) observaron la inhibición en los niveles de acetilcolinesterasa en diversos estadios embrionarios del camarón *P. pugio* luego de ser expuestos al clorpirifós. Diversas concentraciones de endosulfán y clorpirifós podrían haber penetrado el huevo, alcanzando el embrión. Los efectos motrices podrían haber dificultado la eclosión de los cangrejitos, incrementando el tiempo de incubación por la dificultad en lograr eclosionar.

Por otro lado, durante los últimos días de incubación de los embriones de los organismos dulceacuícolas se observa una reducción en el grosor del corion (Glas y col., 1997). Este afinamiento estaría mediado por enzimas proteolíticas liberadas por el embrión en las etapas finales del desarrollo, facilitando la ruptura del corion durante la eclosión (Glas y col., 1997). La exposición a estos plaguicidas podría causar un desequilibrio en la producción de enzimas, dificultándose la ruptura de este corion más grueso.

Sin embargo, en los embriones expuestos a clorpirifós puede observarse un aumento en el tiempo de incubación a menores concentraciones, sin encontrarse diferencias en los expuestos a las mayores concentraciones. Similares resultados se observaron en el cangrejo *E. sinensis* expuesto a clorpirifós. Estudios complementarios deberían realizarse para determinar si a mayores concentraciones se observa una disminución en los periodos de incubación, como los observados ante la exposición a metales.

El incremento en el periodo de incubación no solo tendría efectos sobre los embriones, sino que también aumentaría el estrés sobre la hembra, la cual carga con los

huevos. Al extenderse el periodo de incubación aumenta también el riesgo de depredación, aunque estos incrementos sean solo de algunos días (Li y col., 2006).

El número de embriones que lograron completar la eclosión (eclosión efectiva) también disminuyó por la exposición a ambos plaguicidas, teniendo una mayor relación concentración – efecto que sobre el período de incubación. Como se describió previamente, antes de la eclosión comienzan los procesos de afinamiento del corion y luego se produce la ruptura. El afinamiento y posterior ruptura de este corion, el cual es propuesto como una barrera contra los plaguicidas, aumenta el contacto de los embriones/neonatos con estos. Key y col. (2003) observaron una mayor mortalidad en los embriones de *P. pugio* en el momento de la eclosión. Rodríguez y Pisanó (1993) observaron también una disminución en las larvas eclosionadas de *C. granulata* luego de la exposición a paratión, aunque la exposición a 2,4-D no provocó modificaciones significativas. La exposición a ciertas concentraciones de cobre causó también la disminución de larvas eclosionadas en el cangrejo *Petrolisthes galathinus* y en el camarón *P. pugio* (López Greco y col., 2002a, b). Los efectos letales de endosulfán y clorpirifós en *Z. collastinensis* pudieron observarse también en los individuos expuestos permanentemente, los cuales no sobrevivieron al romper el corion durante la eclosión.

La disminución en la eclosión efectiva, así como también el aumento general en el periodo de incubación, fueron observados no solamente en los cangrejos expuestos permanentemente sino también en aquellos que fueron expuestos de forma aguda (96 horas) y luego llevados a agua declorada libre de plaguicidas. Estos resultados muestran que no solamente en el periodo cercano a la eclosión, con el afinamiento y/o ruptura del corion, los embriones son sensibles a los biocidas. Los efectos producidos en el embrión dentro del huevo, a pesar del cese de la exposición, pueden observarse al momento de la eclosión (Lund y col., 2000).

La exposición a estos plaguicidas, tanto permanentemente como de manera aguda, provocó también efectos irreversibles en los neonatos, observables luego de la eclosión. Estos efectos causaron que los cangrejos juveniles no pudieran sobrevivir hasta el primer ciclo de muda, mientras que todos los individuos del grupo control alcanzaron esta etapa. Diversas malformaciones relacionadas con la exposición a tóxicos, sobre todo a metales, han sido registradas en varias especies de decápodos. Algunas de estas malformaciones, como se discutió previamente, están relacionadas con el desarrollo incompleto de espinas y setas, presumiblemente a causa de la eclosión

prematura de las larvas (Amin y col., 1997; Zapata y col., 2001; Lavolpe y col., 2004 Sánchez y col., 2005). En el caso de *Z. collastinensis*, si bien no se descarta la existencia de malformaciones, los efectos observados se relacionan con el normal comportamiento anormal de los juveniles eclosionados. Estos permanecieron con los pereopodos replegados por el abdomen, la misma posición que adoptaron durante la etapa de embrión dentro del huevo. Los movimientos observados estuvieron relacionados con el movimiento de antenas y anténulas y con la circulación del agua dentro de la cámara branquial, además de los latidos del corazón.

A pesar de no haber alcanzado el primer ciclo de muda, estos juveniles sobrevivieron durante diferentes periodos de tiempo a concentraciones a las cuales no sobreviven los adultos. Esta mayor resistencia, en este caso sin la protección del corion, puede relacionarse con el menor efecto de los plaguicidas en el sistema nervioso inmaduro de los neonatos (Key y col., 2003; Li y col., 2006).

Los cangrejos juveniles del grupo control se comportaron de manera normal, caminando entre las plantas ofrecidas como sustrato. Los embriones no solo encuentran en esta un refugio, sino que también se pueden alimentar tanto de la planta ofrecida como del perifiton presente. Sin embargo se desconoce si en la etapa de neonato existe alimentación exógena, ya que podrían no estar desarrolladas las estructuras necesarias para la alimentación. La supervivencia de los neonatos expuestos durante algunos días, los cuales no fueron capaces de alimentarse, estaría relacionada con la utilización de la reserva energética con la que nace cada cangrejito (alimentación endógena). En sistemas inestables como los dulceacuícolas, donde la oferta trófica para los neonatos es también inestable, los juveniles eclosionados se alimentan durante un tiempo de las reservas de vitelo que poseen, independizándose de la alimentación exógena (Vance, 1973; Bliss, 1982; Anger, 1995; 2013).

Sin embargo los efectos en tiempo de incubación y eclosión efectiva observados están relacionados con concentraciones de plaguicidas que pueden considerarse altas. Al exponerse los embriones a concentraciones más bajas de plaguicidas, que pueden encontrarse en el ambiente, no se observaron diferencias en tiempo de incubación y eclosión efectiva de los embriones de *Z. collastinensis*. Las bajas concentraciones de exposición, sumadas al efecto protector del corion y a la inmadurez del sistema nervioso, no habrían sido suficientes para afectar estas variables.

A pesar de no afectarse el tiempo de incubación o la eclosión efectiva, la supervivencia de los neonatos disminuyó con respecto a los individuos del grupo control en varias concentraciones. Las dificultades en el movimiento de los pereopodos provocadas por algunas concentraciones de estos insecticidas, similares a las descritas anteriormente, impidió la supervivencia de algunos de los cangrejitos.

Una vez producida la eclosión, en los neonatos expuestos la supervivencia hasta el primer ciclo de muda fue menor. El corion actuaría como una barrera eficaz ante la exposición a bajas concentraciones de plaguicidas, similares a las que se encuentran en el ambiente. Al salir del huevo y perder la protección de este mecanismo de barrera, comenzaron a evidenciarse los efectos de los plaguicidas.

Estos individuos que poseen dificultades para mover sus pereopodos, y que no están destinados a sobrevivir, pueden considerarse como “ecológicamente muertos” de acuerdo a Newman y Unger (2003). Dentro de un contexto ecológico en el cual se produzca el ingreso de concentraciones de plaguicidas similares a las aquí trabajadas, los individuos afectados no serían capaces de crecer, competir favorablemente por el alimento, evadir a sus predadores y menos aún de desarrollar otras actividades de importancia poblacional como la reproducción. A pesar de que los cangrejos estén fisiológicamente vivos durante algunos días, pueden considerarse ecológicamente muertos ya que en el ambiente no sobrevivirían en esas condiciones (Newman y Unger, 2003).

En el ambiente pueden encontrarse concentraciones dentro del rango de las utilizadas aquí como “similares a ambientales” (Lenardón y Enrique, 1998; Lenardón y col., 1998; Jergentz y col., 2004; 2005; Silva y col., 2005). La exposición de las hembras ovígeras a estas concentraciones no causaría efectos que perjudiquen la supervivencia a corto plazo de estas. Sin embargo disminuiría la capacidad de aportar nuevos integrantes poblacionalmente activos, ya que los neonatos no podrían crecer hasta el tamaño adulto y reproducirse. Estas concentraciones subletales fisiológicamente para las hembras serían letales en un contexto poblacional (Rand y Petrocelli, 1986; Newman y Unger, 2003).

Efectos en el metabolismo de juveniles

El consumo de oxígeno de los juveniles de *Z. collastinensis* no sufrió modificaciones ante la exposición a 6 y 62 μg endosulfán Γ^1 . Los mayores desvíos

estándar observados en la primera hora de exposición se relacionan con el estrés del manipuleo al comenzar los experimentos. Estos ingresaron a las cámaras e intentaron escapar, mientras que otros permanecieron en reposo.

La exposición de *T. borellianus* a este plaguicida incrementó el consumo de oxígeno en algunas concentraciones durante las primeras horas de exposición (Montagna y Collins, 2008). De acuerdo a estos autores, el aumento en la tasa de consumo de oxígeno estaría relacionado con los efectos fisiológicos producidos. Este biocida, de acción inicial moderada y luego rápida y prolongada, está diseñado para provocar la estimulación en los centros motores de los insectos, incrementando la actividad, provocando el ascenso espontáneo en la temperatura y el consumo de oxígeno, seguido de inmovilidad y muerte (Agroquim, 2013). En el caso de juveniles del cangrejo dulceacuícola *Dilocarcinus pagei*, Negro y col (2012) observaron también un aumento en el consumo de oxígeno ante la exposición a 6 μg endosulfán l^{-1} y una disminución durante las primeras horas de exposición a 62 μg endosulfán l^{-1} . De acuerdo a estos autores la reducción del consumo de oxígeno en la primera hora podría estar relacionada con una respuesta de aislamiento a través del cierre de la cámara branquial, utilizando el oxígeno presente en ese volumen de agua. Con el tiempo el agua debe ser renovada debido al consumo del oxígeno disuelto y a la acumulación de compuestos de excreción. Con cada renovación ocurre la exposición al plaguicida. Los efectos de este biocida, relacionados con el aumento en el consumo de oxígeno, impedirían la utilización de este mecanismo de defensa conductual por periodos de tiempo prolongados, aumentando el consumo de oxígeno hasta niveles similares al control. Efectos similares a lo descrito para este último cangrejo, donde las menores concentraciones causaron un aumento en el consumo de oxígeno, fueron observadas en el pez *Labeo rohita* al ser expuesto a endosulfán y en el pez *Geophagus brasiliensis* al ser expuesto a glifosato (Rao y col., 1981; Barbieri 2009).

Sin embargo en los juveniles de *Z. collastinensis* el consumo de oxígeno fue similar entre los individuos control y los expuestos a endosulfán. Los efectos causados por este plaguicida o los mecanismos de defensa de esta especie no estarían relacionados con modificaciones en el consumo de oxígeno. Estos corresponderían a modificaciones en el sustrato energético, observable por las diferencias en la excreción de nitrógeno amoniacal y la relación de equivalentes atómicos de oxígeno y nitrógeno. Los caminos metabólicos de los crustáceos relacionados con la excreción de nitrógeno

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

son el catabolismo de aminoácidos y ciertas amidas, degradación de ácidos nucleicos y desaminación de los nucleótidos de las purinas y urea. Los crustáceos decápodos excretan el nitrógeno mayormente como amonio, siendo excretada la mayor parte de este a través del epitelio branquial (Kormanik y Cameron, 1981; Pequeux y Guilles, 1981). La reducción en la excreción de nitrógeno amoniacal en *Z. collastinensis* podría estar relacionado con la reducción en el catabolismo de aminoácidos y la mayor presión en otros sustratos energéticos, lo cual sugiere la interferencia de este plaguicida en su metabolismo.

Por otra parte, la exposición a plaguicidas puede causar lesiones (histopatologías) en las branquias de cangrejos, en general relacionadas con el colapso de estas por el efecto sobre las células pilares que las conforman (Bhavan y Geraldine, 2000). Estas histopatologías podrían dificultar la excreción de los residuos amoniacales, siendo el motivo por el cual se encontraron menores concentraciones de nitrógeno en agua. Una reducción en la excreción de nitrógeno amoniacal fue también observado como efecto de la exposición a endosulfán en el pez *Macrogathus aculeatum* (Rao y col., 1981).

La combinación entre el consumo de oxígeno y la excreción de nitrógeno amoniacal (relación O:N) puede ser utilizada en el reconocimiento del tipo de sustrato energético utilizado por cualquier organismo aeróbico. Una alta relación O:N sugiere un incremento en el metabolismo de lípidos o carbohidratos, mientras que una relación O:N baja indica un incremento en el metabolismo de proteínas (Pillai y Diwan, 2002). Esta relación de equivalentes puede ser modificada por el contacto con diferentes contaminantes. En general la utilización de proteínas como sustrato energético es utilizada como un indicador de condiciones estresantes. Sin embargo en el caso de *Z. collastinensis* se observó un mayor consumo de lípidos como sustrato energético, disminuyendo el consumo de compuestos nitrogenados, con la consecuente disminución en la excreción de nitrógeno amoniacal. Durante la exposición del cangrejo *T. borellianus* a endosulfán también pudo observarse un aumento en la relación O:N (Montagna y Collins, 2008). La función fundamental de los lípidos es la reserva energética. Estas aportan mayor cantidad de energía por gramo (9,4 kcal g⁻¹) que los carbohidratos y las proteínas (4,2 y 4,3 kcal g⁻¹ respectivamente) (Schmidt y Nielsen, 1997). Estos cangrejos mantienen el nivel de gasto energético utilizando la energía proveniente de la oxidación de los lípidos en lugar de proteínas. Estas podrían haberse

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

destinado a procesos de detoxificación, como la producción de enzimas u otras proteínas. La exposición a endosulfán en estas concentraciones durante 22 horas podría no ser lo suficientemente fuerte como para lograr modificar el camino metabólico hacia el consumo de proteínas.

Ante la exposición a endosulfán *Z. collastinensis* no estaría utilizando mecanismos de defensa relacionados con modificaciones en el consumo de oxígeno o en el gasto energético, mientras que si lo hicieron otras especies de la misma familia, como *D. pagei* y *T. borellianus* (Montagna y Collins, 2008; Negro y col., 2012). Esto podría estar relacionado con el tipo de hábitat que estas especies utilizan. Mientras que estos últimos viven asociados a las raíces de la vegetación flotante como *Eichornia crassipes*, entre piedras y ocasionalmente ocupando cuevas cercanas a las orillas, el cangrejo cavador *Z. collastinensis* habita generalmente en cuevas que realiza en las riberas, las cuales pueden ser muy profundas (mas de un metro de profundidad), por debajo del nivel del agua. En estas la concentración de oxígeno disuelto puede llegar a 0 ppm, hecho que fue observado por integrantes del laboratorio de Macrocrustáceos del INALI en varias oportunidades (datos sin publicar). En un ambiente donde el oxígeno disuelto puede ser una limitante, como en las cuevas de los cangrejos cavadores, el desarrollo de mecanismos de defensa relacionados con el aumento en el consumo de oxígeno no sería posible. Este cangrejo utiliza otros mecanismos, como podrían ser los relacionados con la producción de enzimas de detoxificación.

CONSIDERACIONES FINALES

El cangrejo cavador *Zilchiopsis collastinensis* es una especie de crustáceo decápodo de gran porte, ampliamente distribuido en sistemas lóticos y leníticos del tramo medio del río Paraná. Los adultos se establecen en las riberas, en poblaciones relativamente permanentes (cangrejales).

La alta resistencia a plaguicidas de esta especie les permite sobrevivir a concentraciones que otras especies, por lo menos de crustáceos, no sobreviven. Sin embargo, la supervivencia a la exposición a ciertas concentraciones de plaguicidas no es inocua, ya que causa diferentes efectos subletales que pueden, con el paso del tiempo, convertirse en letales

Debido a su alta resistencia a biocidas, en futuras campañas de biomonitoreo podrían incluirse a individuos de esta especie, ya que puede obtenerse información tanto de acumulación en tejidos como de diversos biomarcadores que esta especie posee. Entre los posibles biomarcadores, podrían observarse las modificaciones en la distribución celular del hepatopáncreas, en especial de las células F y B, relacionadas con los procesos de detoxificación. En gónadas las diferencias en la proporción de ovocitos atrésicos podría ser también un indicador de sitios afectados por actividades antrópicas, mientras que el índice gonadosomático y el volumen de los ovocitos no serían buenos biomarcadores.

La acumulación de biocidas en hepatopáncreas podría utilizarse como un indicador de contaminación cercana en el tiempo, ya que este órgano posee mecanismos de detoxificación que le permiten autodepurarse. Las gónadas, por el contrario, estarían “reservando” algunas concentraciones de biocidas, sin poder estimarse el tiempo en que ocurrió la contaminación.

La presencia de neonatos que presenten posición fetal o algunas dificultades en el movimiento de los pereiopodos también podrían utilizarse como biomarcadores morfológicos de exposición, ya que estos neonatos son capaces de sobrevivir a la exposición a plaguicidas dentro del huevo, pero sus efectos pueden observarse luego de la eclosión.

Sin embargo, nuevos trabajos sobre los efectos de otros contaminantes tanto en estas variables así como también sobre otros niveles de organización son necesarios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Rosales, S.M.; Frías-Espericueta, M.G.; Inzunza-Rojas, A.; Osuna-López, I.; Páez-Osuna, F.; Lozano-Olvera, R. y Voltolina, D. (2010) *Histological effects of Cu²⁺ to white shrimp Litopenaeus vannamei (Crustacea: Decapoda) juveniles at low salinities*. Rev. Biol. Mar. y Ocean. 45(1): 99 – 105.
- Al-Mohanna, S.Y. y Nott, J.A. (1989). *Functional cytology of the hepatopancreas of Penaeus semisulcatus (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle*. Mar. Biol. 101: 535 – 544.
- Al-Mohanna, S.Y. y Subrahmanyam, M.N.V. (2001) *Flux of heavy metal accumulation in various organs of the intertidal marine blue crab, Portunus pelagicus (L.) from the Kuwait coast after the Gulf War*. Environ. Int. 27: 321 – 326.
- Amin, O.A.; Rodríguez, E.M.; Hernando, M.; Comoglio, L.I.; López, L.S. y Medesani, D.A. (1997) *Effects of lead and cadmium on hatching of the southern king crab Lithodes santolla (Decapoda, Anomura)*. Inv. Rep. Develop. 33 (1): 81 – 85.
- Anger, K. (1995) *The conquest of freshwater and land by marine crabs: adaptations in life-history patterns and larval bioenergetics*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 193: 119 – 145.
- Anger, K. (2013). *Neotropical Macrobrachium (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp*. J. Crust. Biol. 33 (2): 151 – 183.
- Ansari, B.A. y Kumar, K. (1987) *Malathion Toxicity: Effect on the Ovary of the Zebra Fish Brachydanio rerio (Cyprinidae)*. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie 72 (4): 517 – 528.
- APHA (American Public Health Association), (1998) *Standard methods for the examination of water and wastewater, 20 ed.*, Washington DC p. 1220.
- Armstrong, D.A. y Milleman, R.E. (1974) *Effects of the Insecticide Sevin and Its First Hydrolytic Product, 1-naphthol, on Some Early Developmental Stages of the Bay Mussel Mytilus edulis*. Mar. Biol. 28: 11 – 15.
- Barbieri, E. (2009) *Effects of 2,4-D herbicide (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) on oxygen consumption and ammonium excretion of juveniles of Geophagus brasiliensis (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae)*. Ecotoxicology 18: 55 - 60.
- Barnes, R.S.K.; Calow, P. y Olive, P.J.W. (1993) *The invertebrates: a new synthesis*. Blackwell, London, p. 488.

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Bauer, R.T. y Martin, J.W. (1991) *Crustacean sexual biology*. Columbia University Press, New York – Oxford, p. 355.

Bhavan, P.S. y Geraldine, P. (1997) *Alterations in concentrations of protein, carbohydrate, glycogen, free sugar, and lipid in the prawn Macrobrachium malcolmsonii on exposure to sublethal concentrations of endosulfan*. Pest. Biochem. Physiol. 58: 89 - 101.

Bhavan, P.S., Geraldine, P. (2000) *Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn Macrobrachium malcolmsonii exposed to endosulfan*. Aquat. Toxicol. 50, 331 - 339.

Bavhan, P.S. y Geraldine, P. (2009) *Manifestation of carbaryl toxicity on soluble protein and histopathology in the hepatopancreas and gills of the prawn, Macrobrachium malcolmsonii*. J. Environ. Biol. 30 (4): 533 – 538.

Bianchini, A. y Monserrat, J.M. (2007) *Effects of methyl parathion on Chasmagnathus granulatus hepatopancreas: protective role of Sesamol*. Ecotox. Environ. Saf. 67: 100 – 108.

Bliss, D. (1989) *Shrimps, lobster and crabs: their fascinating life story*. Columbia University Press, New York, p. 242.

Brooks, G.T. (1974) *Chlorinated insecticides I. Technology and application*. CRC press. Cleveland, p. 197.

Browdy, C.L. (1990) *Vitellin synthesis in relation to oogenesis in in vitro-incubated ovaries of Penaeus semisulcatus (Crustacea, Decapoda, Penaeidae)*. J. Exp. Zool. 255: 205 – 215.

Brusca, R. y Brusca, G. (1990) *Invertebrates*. Sinauer Associates, Massachusetts. 922 p.

CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes de la República Argentina) (2007). *Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina*. Tomo I: *Generalidades – Herbicidas - Fertilizantes*. Tomo II: *Insecticidas – Fungicidas - Productos Varios*. p. 2248

CASAFE. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (2010). *Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios 2010*.

<http://www.casafe.org/pdf/estadisticas/Informe%20Mercado%20Fitosanitarios%202010.pdf>

CASAFE. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. (2012). *Mercado Argentino de Productos Fitosanitarios 2012*.

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis
(Decapoda, Trichodactylidae)

<http://www.casafe.org/pdf/estadisticas/Informe%20Mercado%20Fitosanitario%202012.pdf>

Capitanelli, R. (1992) *Geomorfología*. Ceyne, Buenos Aires, p. 126.

Carro, A.M.; Lorenzo, R.A.; Fernández, F.; Rodil, R. y Cela, R. (2005) *Multi-residue screening of chlorinated and brominated compounds from aquaculture samples using matrix solid-phase dispersion—gas chromatography—mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 1071: 93 - 98.

Charniaux-Cotton, H. (1980). Experimental studies of reproduction in malacostraca crustaceans. Description of vitellogenesis and of its endocrine control. En: *Advances in Invertebrate Reproduction* (Eds.: Clark, W.H. y Adam, T.S.). Elsevier, New York, p. 177 – 186.

Charniaux-Cotton, H. (1985). Vitellogenesis and Its Control in Malacostracan Crustacea. *Amer. Zool.* 25 (1): 197 - 206

Collins, P.; Williner, V. y Giri, F. (2006) *Trophic relationships in Crustacea: Decapoda of river with a floodplain*. En: *Predation in organisms: A distinct phenomenon* (Ed.: Elewa, A.). Springer, Heidelberg, p. 59 - 86

Collins, P.; Williner, V. y Giri, F. (2007) *Littoral Communities*. En: *The Middle Paraná River. Limnology of a subtropical Wetland* (Eds.: Iriondo, M.H.; Paggi, J.C. y Parma J.) Springer-Verlag, Heidelberg, p. 277-301.

Collins, P. (2010) *Environmental stress upon hepatopancreatic cells of freshwater prawns (Decapoda: Caridea) from the floodplain of Paraná River*. *Nat. Sci.* 2 (7): 748 – 759.

Corey, S. y Reid, D.M. (1991) *Comparative fecundity of decapod crustaceans, I. The fecundity of thirty tree species of nine families of caridean shrimps*. *Crustaceana* 60 (3), 270 - 294.

D'Angelo, M.L. (1991) *Geografía*. En: *Nueva Enciclopedia de la Provincia de Santa Fe*. (Ed: Renna, A.D.) Ediciones Sudamericanas, Santa Fe, p. 33 - 136.

DiPinto, L.M.; Coull, B.C. y Chandler, G.T. (1993) *Lethal and sublethal effects of sediment associated PCB Aroclor 1254 on a meiobenthic copepod*. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 1909 - 1918.

Eamkamon, T.; Klinbunga, S.; Thirakhupt, K.; Menasveta, P. y Puanglarp, N. (2012) *Acute Toxicity and Neurotoxicity of Chlorpyrifos in Black Tiger Shrimp, Penaeus monodon*. *Envirom. Asia* 5 (1): 26 - 31

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Ecobichon, D. J. (2001) *Pesticide use in developing countries*. Toxicol. 160: 27 – 33.

Edwards, C.A. (1973) *Persistent pesticides in the environment*. 2 ed. CRC Press, Cleveland, p. 179.

Eriksen, N.T. (2002) *Accuracy and precision of aquatic respirometers with emphasis on monophasic oxygens*. Fish. Physiol. Biochem. 26: 139 – 147.

Ernst, W.R.; Jonah, P.; Doe, K.; Julien, G. y Hennigar, P. (1991) *Toxicity to aquatic organisms of off-target deposition of endosulfán applied by aircraft*. Environ. Toxicol. Chem. 10: 103 – 114.

French-Constant, R.H.; Rocheleau, T.A.; Steichen, J.C. y Chalmers, A.E. (1993) *A point mutation in a Drosophila GABA receptor confers insecticide resistance*. Nature 363: 449 – 451.

Frías-Espericueta, M.G.; Abad-Rosales, A.; Nervárez-Velázquez, A.C.; Osuna-López, I.; Páez-Osuna, F.; Lozano-Olvera, R. y Voltolina, D. (2008) *Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei juveniles*. Aquat. Toxicol. 89: 152 – 157.

Gagneten, A.M.; Imhof, A. y Gervasio, S. (2008) *Accumulation and elimination of Cr in gills and eggs by the freshwater crab Zilchiopsis collastinensis after experimental exposure*. Fresen. Environ. Bull. 17: 182 – 187.

Gagneten, A.M.; Tumini, G.; Imhof, A. y Gervasio, S. (2012) *Comparative study of lead accumulation in different organs of the freshwater crab Zilchiopsis collastinensis*. Water Air Soil Poll. 223: 617 – 624.

García Araya, O. y Don, R.N. (2002) *Manual de Procedimientos para la Gestión con Productos Fitosanitarios. Guía para operar productos fitosanitarios*. Col. Ing. Agrónom., Santa Fe, p. 125.

Glas, P.S.; Courtney, L.A.; Rayburn, J.R. y Fisher, W.S. (1997) *Embryonic coat of the grass shrimp Palaemonetes pugio*. Biol. Bull. 192: 231 – 242.

Gutierrez, F.; Gagneten, A.M. y Parma, J. (2008) *Bioconcentration and trophic transfer of chromium in the Daphnia magna (Crustaceae: Cladocera)- Cnesterodon decemmaculatus (Pisces: Poeciliidae) system*. Fresen. Environ. Bull. 17: 647 – 651.

Harrison, K.E. (1990) *The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: A review*. J. Shell. Res. 9 (1): 1 – 28.

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis
(Decapoda, Trichodactylidae)

Hose, G.C.; Van den Brink, P.J. (2004) *Confirming the Species-Sensitivity Distribution Concept for Endosulfan Using Laboratory, Mesocosm, and Field Data*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 47: 511 – 520.

Icely, J.D. y Nott, J.A. (1992) *Digestion and Absorption: Digestive System and Associated Organs*. En: *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea* (Eds.: Harrison, F.W. y Humes, A.G.) Wiley-Liss, New York, p. 147 – 202.

Joshi, H.C. y Mukhopadhyay, M.K. (1990) *Toxicity of quinalphos and endosulfan to different life-stages of tiger prawn (Penaeus monodon)*. Environ. Conserv. 17: 266 – 267.

Jergentz, S.; Pessacq, P.; Mugni, H.; Bonetto, C. y Schulz, R. (2004) *Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa*. Ecotox. Environ. Saf. 59: 133 – 141.

Jergentz, S.; Mugni, H.; Bonetto, C. y Schulz, R. (2005) *Assessment of insecticide in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina*. Chemosphere 61: 817 – 826.

Johnson, P.T. (1980). *Histology of the Blue Crab, Callinectes sapidus: A model for the Decapoda*. Praeger, New York, p. 440.

Jonsson, C.M. y Toledo, M.C.F. (1993) *Bioaccumulation and elimination of endosulfan in the fish yellow tetra (Hypessobrycon bifasciatus)*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 572 - 577.

Key, P.B. y Fulton, M.H. (1993) *Lethal and sublethal effects of chlorpyrifos exposure on adult and larval stages of the grass shrimp, Palaemonetes pugio*. J Environ Sci Health B 28 (5):621-640

Key P.B.; Chung, K.W.; Opatkiewicz, A.D.; Wirth, E.F. y Fulton, M.H. (2003) *Toxicity of the insecticides Fipronil and Endosulfán to selected life stages of the grass shrimp (Palaemonetes pugio)*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 70: 533 – 540.

Kling, D. (1981). *Total atresia of the ovaries of Tilapia leucosticta (Cichlidae) after intoxication with the insecticide Lebaycid*. Experientia 37 (1): 73 – 74.

Köhler, A., Lauritzen, B., Jansen, D., Böttcher, P., Teguliwa, L., Krüner, G., Broeg, K., (1998) *Detection of P-glycoprotein mediated MDR/MXR in Carcinus maenas hepatopancreas by immuno-gold-silver labeling*. Mar. Environ. Res. 46 (1-5), 411 – 414.

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Kormanik, G.A. y Cameron, J.N. (1981) *Ammonia excretion in animals that breathe water: a review*. Mar. Biol. Lett. 2: 11 - 23.

Kouba, A.; Buric, M. y Kozák, P. (2010) *Bioaccumulation and effects of heavy metals in crayfish: A review*. Water Air Soil Poll. 211: 5 – 16.

Krol, R.M.; Hawkins, W.E. y Overstreet, R. M. (1992) *Reproductive Components*. En: *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea* (Eds.: Harrison, F.W. y Humes, A.G.) Wiley-Liss, New York, p. 295 – 344.

Kuivila, K. M., Foe, C. G. (1995). Concentrations, transport and biological effects of dormant spray pesticides in the San Francisco estuary, California. Environ. Toxicol. Chem. 14 (7): 1141 – 1150.

Kutlu, M.; Baycu, C.; Aydogan, G.; Tanatmis, M. y Aldirmaz, N. (2005) *Histopathological changes in the hepatopancreas of Palaemonetes turcorum (Holthuis, 1961) (Crustacea, Decapoda), exposed to Lead Acetate*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 74: 1118 – 1125.

Lavolpe, M.; López Greco, L.; Kesselman, D. y Rodríguez, E. M. (2004) *Differential toxicity of copper, zinc, and lead during the embryonic development of Chasmagnathus granulatus (Brachyura, Varunidae)*. Environ. Toxicol. Chem. 23 (4): 960 – 967.

Lee, R.F. (1993). *Passage of xenobiotics and their metabolites from hepatopancreas into ovary and oocytes of blue crabs, Callinectes sapidus: Possible implications for vitellogenesis*. Mar. Environ. Res. 35 (1-2): 181 – 187.

Lee, R.F.; O'malley, K. y Oshima, Y. (1996) *Effects of toxicants on Developing oocytes and embryos of the blue crab, Callinectes sapidus*. Mar. Environ. Res. 42 (1-4): 125 - 128.

Lee, R. y Oshima, Y. (1998) *Effects of Selected Pesticides, Metal and Organometallics on Development of Blue Crab (Callinectes sapidus) Embryos*. Mar. Environ. Res. 46 (1-5): 479 - 482.

Leight, A. K. y Van Dolah, R. F. (1999). *Acute toxicity of the insecticides endosulfan, chlorpyrifos, and malathion to the epibenthic estuarine amphipod Gammarus palustris (Bousfield)*. Environ. Toxicol. Chem. 18 (5): 958 – 964.

Lenardón, A. y Enrique, S. (1998) *Insecticidas organoclorados en el río Paraná*. Natura Neotropicalis 29 (2): 111-116.

Lenardón, A.M.L.; Lorenzatti, E.A. y Enrique, S. (1998) *Monitoreo de insecticidas organoclorados y organofosforados en el río Paraná (km 600)*. Pesticidas: R.

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Ecotoxicol. e Meio Ambiente 8: 57 - 66.

Lenardón, A.M.L.; de la Sierra, P.M. y Marino, F. (2001). *Persistencia de endosulfan en medio acuoso estático*. Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente 11: 115-126.

Leonard, A.W.; Hyne, R.V.; Lim, R.P.; Leigh, K.A.; Le, J. y Beckett, R. (2001) *Fate and toxicity of endosulfán in Namoi river water and bottom sediment*. J. Environ. Qual. 30: 750 - 759.

Li, K.; Chen, L.Q.; Li, E.C. y Zhou, Z.K. (2006) *Acute Toxicity of the Pesticides Chlorpyrifos and Atrazine to the Chinese Mitten-handed Crab, Eriocheir sinensis*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 77: 918 – 924.

Lombardi, J.V.; Machado-Neto, J.G.; Brossi-Garcia, A.L.; Marques, H.L.A. y Kubo, E. (2001) *Acute Toxicity of the Pesticides Endosulfan and Ametryne to the Freshwater Prawn Macrobrachium rosenbergii De Man*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67: 665 – 671.

Lopez Greco, L.S.; Rodriguez, E.M.; Bolaños, J.; Hernández, G. y Fingerman, M. (2002a) *Toxicity of copper sulphate during early and late embryonic development of a palaemonid shrimp (Crustacea)*. Inv. Rep. Develop. 41 (1-3): 165 – 170.

Lopez Greco, L.S.; Rodriguez, E.M.; Hernández, G. y Bolaños, J. (2002b) *Effects of copper on hatching of larvae and prezoa survival of Petrolisthes galathinus (Porcellanidae): Assays with ovigerous females and isolated eggs*. Environ. Res. A 90: 40 – 46.

Lopretto, E. (1983) *Contribución a la bioecología del anfípodo dulciacuicola Hyalella pampeana Cavalieri I. Comportamiento reproductivo*. Limnobios 6: 371 - 378.

Lordi, C. y Collins, P. (2004). *Crecimiento de la Langosta Cherax quadricarinatus alimentadas con pellets utilizando harina del Mejillón asiático invasor Limnoperna fortunei*. Comunicación Científica CIVA 2004: 654 – 661.

Lubzens, E., Khayat, M., Ravid, T., Funkenstein, B. y Tietz, A. (1995) *Lipoproteins and lipid accumulation within the ovaries of penaeid shrimp*. Isr. J. Aquacult-Bamid. 47 (3-4), 185 – 195.

Lund, S.A.; Fulton, M.H. y Key, P. B. (2000) *The sensitivity of grass shrimp, Palaemonetes pugio, embryos to organophosphate pesticide induced acetylcholinesterase inhibition*. Aquat. Toxicol. 48: 127 – 134.

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Mani, K. y Saxena, P.K. (1985) Effect of safe concentrations of some pesticides on ovarian recrudescence in the freshwater murrel, *Channa punctatus* (BI.): A quantitative study. *Ecotox. Environ. Saf.* 9 (3): 241 – 249.

Manzi, R. y Gallardo, M. (1970) *Geografía de Santa Fe (1)*. Spadoni, Mendoza, 192 p.

Marchese, M.; Gagneten, A.M.; Parma, M.J. y Pavé, P.J. (2008) *Accumulation and Elimination of Chromium By Freshwater Species Exposed to Spiked Sediments*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55: 603 – 609.

Marino, D.; Ronco, A. (2005). Cypermethrin and Chlopyrifos Concentration Levels in Surface Water Bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75: 820 – 826.

McEwen, F.L. y Stephenson, G. R. (1979) *The use and significance of pesticides in the environment*. John Wiley & Sons Inc., p. 538.

McGeer, J.C.; Brix, K.V.; Skeaff, J.M.; De Forest, D.K. y Brigham, S.I. (2003) *Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (5): 1017 – 1037.

McLay, C.L. y López Greco, L.S. (2011) *A hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: How did a race to be first become a race to be the last?* *Zoologischer Anzeiger* 250: 378 – 406.

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

Melo, G.A.S. (2003) *Manual de identificação dos crustácea decapoda de água doce do Brasil*. Edições Loyola; São Paulo, p. 280 - 281.

Menone, M.L., Bortolus, A., Botto, F., Aizpún de Moreno, J.E., Moreno, V.J., Iribarne, O., Metcalfe, T.L. y Metcalfe, C.D. (2000). *Organochlorine Contaminants in a Coastal Lagoon in Argentina: Analysis of Sediment, Crabs, and Cordgrass from Two Different Habitats*. *Estuaries* 23 (4): 583 – 592.

Menone, M.L.; Miglioranza, K.S.B.; Iribarne, O.; Aizpún de Moreno, J.E. y Moreno, V. (2004) *The role of burrowing beds and burrows of the SW Atlantic intertidal crab Chasmagnathus granulata in trapping organochlorine pesticides*. *Mar. Poll. Bull.* 48 (3-4): 240 - 247.

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Menone, M.L.; Miglioranza, K.S.B.; Botto, F.; Iribarne, O.; Aizpún de Moreno, J.E. y Moreno, V. (2006) *Field accumulative behavior of organochlorine pesticides. The role of crabs and sediment characteristics in coastal environments*. Mar. Poll. Bull. 52: 1717 - 1724.

Mente, E. (2003) *Nutrition, physiology and metabolism of crustaceans*. Sci. Publish., Inc, Einfeld, p.160.

Mercado, M. y Coggiola de Panozzo, G. (1989) *El espacio pampeano. Geografía de la República Argentina*. Grafos Impresiones. Santa Fe, p: 77 - 94.

Meusy, J.J. y Payen, G.G. (1988). Female reproduction in malacostracan crustacea. Zool. Sci. 5: 217 – 265.

Miglioranza, K.S.B.; Aizpun de Moreno, J.E. y Moreno, V.J. (2004) *Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte Schoenoplectus californicus (C. A. Meyer) Soják from a shallow lake in Argentina*. Water Res. 38: 1765 - 1772.

Mills, P.A., Onley, J.H. y Guither, R.A. (1963) *Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods*. J. Assoc. Off. Agric. Chem. 42: 734 - 740

Miranda, A.L.; Roche, A.; Randi, M.A.F.; Menezes, M.L. y Oliveira Ribeiro, C.A. (2008) *Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in tropical freshwater fish Hoplias malabaricus: Histopathological, physiological, and immunological findings*. Environ. Int. 34: 939 – 949.

Montagna, M. y Collins, P. (2004) *Efecto de un formulado comercial del herbicida glifosato sobre el cangrejo Trichodactylus borellianus (Crustacea, Decapoda : Braquiura)*. FABICIB 8: 227 - 234.

Montagna, M.C. y Collins, P.A (2005) *Toxicity of glyphosate upon the freshwater prawn Palaemonetes argentinus*. Nauplius 13 (2): 149 - 157.

Montagna, M.C. y Collins, P.A. (2007) *Survival and growth of Palaemonetes argentinus (Decapoda; Caridea) exposed to insecticides with chlorpyrifos and endosulfan as active elements*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 53 (3): 371 - 378.

Montagna, M.C. y Collins, P.A (2008) *Oxygen consumption and ammonia excretion of the freshwater crab Trichodactylus borellianus exposed to chlorpyrifos and endosulfán insecticides*. Pest.Biochem. Physiol. 92: 150 - 155.

Montagna, M.C. (2010) *Toxicidad de clorpirifós como elemento activo de un formulado comercial en juveniles del cangrejo Trichodactylus borellianus*. Natura Neotropicalis 41: 31 – 43.

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Morrison, C.L.; Harvey, A.W.; Lavery, S.; Tieu, K.; Huang, Y. y Cunningham, C.W. (2002) *Mitochondrial gene rearrangements confirm the parallel evolution of the crab-like form*. Proc. R. Soc. Lond. B. 269: 345 – 350.

Mortimer, M.R. (2000) *Pesticide and trace metal concentrations in Queensland estuarine crabs*. Mar. Poll. Bull. 41 (7-12): 359 - 366.

Murray, E.; Jewell, C.; Rabe, C. y Segal, S. (1993). *Toxicological profile for endosulfan TP-91/16*. US Department of Health and Human Services. Washington, D C.

Murty, A.S. y Ramani, A.V. (1992) *Toxicity of anticholinesterases to aquatic toxicology*. En: *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates* (Eds.: Ballantyne, B. y Marrs, T.C.). Butterworth-Heinemann, Stoneham, p. 305 – 320.

Negro, C.L.; Senkman, L.E. *Lucha de titanes: comportamiento agonístico del cangrejo cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda: Trichodactylidae)*. X Jornadas de Ciencias Naturales de Litoral (X JCNL) y II Reunión Argentina de Ciencias Naturales (II RACN). Santa Fe, Argentina, 18 al 21 de octubre de 2009.

Negro, C.L.; Castiglioni, M.; Senkman, L.E.; Loteste, A. y Collins, P. (2013). *Cost of reproduction. Changes in metabolism and endosulfan lethality caused by reproductive behavior in Hyalella curvispina (Crustacea: Amphipoda)*. Ecotox. Environ. Saf. 90: 121 – 127.

Newman, M.C. y Unger, M.A. (2003) *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis publishers, CRC Press, Florida, p. 458.

Olima, C.; Pablo, F. y Lim, R.P. (1997) *Comparative tolerance of three populations of the freshwater shimp (Paratya australiensis) to the organophosphate pesticide, chlorpyrifos*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 59: 321 - 328.

Paulus, J.E. y Laufer, H. (1987) *Vitellogenocytes in the hepatopancreas of Carcinus maenas and Libinia emarginata (Decapoda, Brachyura)*. Int. J. Invert. Reprod. Dev. 11: 29 - 44.

Papathanassiou, E. y King, P.E. (1984) *Effects of starvation on the fine structure of the hepatopancreas in the common prawn Palaemon serratus (Pennant)*. Comp. Biochem. Physiol. 77A: 243 – 249.

Parry, G. (1960) *Excretion*. En: *The physiology of Crustacea. Vol. I Metabolism and growth* (Ed.: Waterman, T.H.), Academic Press, New York and London, p: 341-366.

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Pequeux, A. y Guilles, R. (1981) *Na⁺ fluxes across isolated perfused gills of the chinese crac Eriocheir sinensis*. J. Exp. Biol. 92: 173 - 186.

Pinho, G.L.L.; Moura da Rosa, C.; Yunes, J.S.; Luquet, C.M.; Bianchini, A. y Monserrat, J.M. (2003) *Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab Chasmagnathus granulatus (Decapoda, Grapsidae)*. Comp. Biochem. Physiol. C 135: 459 – 468.

Pillai, B.R. y Diwan A.D. (2002) *Effects of acute salinity stress on oxygen consumption and ammonia excretion rates of the marine shrimp Metapenaeus monoceros*. J. Crust. Biol. 22: 45 - 52.

Pinho, G.L.L.; Moura da Rosa, C.; Maciel, F.E.; Bianchini, A.; Yunes, J.S.; Proenca, L.A.O. y Monserrat, J.M. (2005) *Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crab species*. Ecotox. Environ. Saf. 61: 353 - 360.

Rajeswari, K.; Kalarani, V.; Reddy, D.C. y Ramamurthi, R. (1988) *Acute Toxicity of Endosulfan to Crabs: Effect on Hydromineral Balance*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 40: 212 - 218

Rand, G.M. y Petrocelli, S.R. (1985) *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere publishing corporation, New York, p. 666

Rao, D.M. R.; Devi, A. P. y Murty, A. S. (1981) *Toxicity and Metabolism of Endosulfán and its Effects on Oxygen Consumption and Total Nitrogen Excretion of the Fish Macrognathus aculeatum*. Pestic. Biochem. Physiol. 15: 282 - 287.

Rastogi, A. y Kulshrestha, S.K. (1990). *Effect of sublethal doses of three pesticides on the ovary of a carp minnow Rasbora daniconius*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 45: 742 – 747.

Reddy, P. S.; Bhagyalakshmi, A. y Ramamurthi, R. (1983) *Effects of sumithion on ovarian growth of a fresh water rice field crab (Oziotelphusa senex senex Fabricius)*. Toxicol. Let. 18: 273 – 276.

Reish, D.L. y Oshida, P.S. (1987) *Short-term bioassay*. En: *Manual of methods in aquatic environment research. Part 6*. FAO Fish Technical Paper 247: 1 - 62.

Repetto, M.; Martinez, D. y Sanz, P. (1995) *Actualización de la toxicología de los plaguicidas*. En: Repetto, M. (ed). *Toxicología avanzada*. Ediciones Diaz de Santos, Madrid, p. 557 – 599.

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Ridgway, I.D.; Taylor, A.C.; Atkinson, R.J.A.; Stentiford, G.D.; Chang, E.S.; Chang, S.A. y Neil, D.M. (2006) *Morbidity and mortality in Norway lobsters, Nephrops norvegicus: physiological, immunological and pathological effects of aerial exposure*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 328: 251 – 264.

Robertson, J.D. (1961). *Osmotic and Ionic Regulation*. En: *The physiology of crustacea. Volumen I. Metabolism and growth*. (Ed.: Waterman, T.H.). Academic press, New York, p. 317 – 340.

Rodríguez, E.M. y Amín O.A. (1991) *Acute Toxicity of Parathion and 2,4 D to Larval and Juvenile Stages of Chasmagnathus granulata (Decapoda, Brachyura)*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 47: 634 – 640.

Rodríguez E.M. y Lombardo R.J. (1991) *Acute Toxicity of Parathion and 2,4 D to Estuarine Adult Crabs*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 46: 576 – 582.

Rodríguez, E.M. y Monserrat, J.M. (1991) *Acute and chronic effects of parathion and 2,4D on the oxygen consumption of Chasmagnathus granulata (Decapoda: Brachyura)*. APPTLA, 41(2): 201 - 210.

Rodríguez, E.M. y Pisanó, A. (1993) *Effects of Parathion and 2,4-D to eggs incubation and larvae hatching in Chasmagnathus granulata (Decapoda, Brachyura)*. Comp. Biochem. Physiol. C 104 (1): 71 - 78.

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

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

Ruppert, E.E.; Barnes, R.D. (1994) *Invertebrate zoology 6° ed*. Saunders, Orlando, p. 1056.

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

Santos de Souza, A.; Machado Torres, J.P.; Ornellas Meire, R.; Curcio Neves, R.; Souto Couri, M. y Silveira Serejo, C. (2008). *Organochlorine pesticides (OCs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments and crabs (Chasmagnathus granulata,*

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Dana, 1851) from mangroves of Guanabara Bay, Rio de Janeiro State, Brazil. *Chemosphere* 73 (1): S186 - S192.

Schmidt-Nielsen, K. (1997) *Animal Physiology, Adaptation and Environment, fifth ed.* Cambridge University Press, New York, p. 607

Scholtz, G.; Abzhanov, A.; Alwes, F.; Biffis, C. y Pint, J. (2009) *Development, Genes and Decapod Evolution*. En: *Decapod Crustacean Phylogenetics* (Eds.: Martin, J. W., Crandall, K. A. y Felder, D. L.). CRC Press, Florida, p. 31 – 46.

Schulz, R. (2001). Rainfall-induced sediment and pesticide input from orchards into the Lourens river, Western Cape, South Africa: Importance of a single event. *Wat. Res.* 35 (8): 1869 – 1876.

Senthilkumar, P.; Samyappan, K.; Jayakumar, S. y Deecaraman, M. (2007). *Impact of Chlorpyrifos on the Neurosecretory Cells in a Freshwater Field Crab, Spiralothelphusa hydrodroma*. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3 (6): 625 - 630

Silva, C.; Boia, C.; Valente, J. y Borrego, C. (2005) *Pesticides in Esteros del Ibera (AR): evaluation of impacts and proposal of guidelines for water quality protection*. *Ecol. Model.* 186: 85 – 97.

Sousa, L.G.; Cuartas, E.I. y Petriella, A.M. (2005) *Fine structural análisis of the epithelial cells in the hepatopancreas of Palaemonetes argentinus (Crustacea, Decapoda, Caridea) in intermoult*. *Biocell* 29 (1), 25 – 31.

Sreenivasula Reddy, P.; Bhagyalakshmi, A. y Ramamurthi, R. (1983) *Effect of sumithion on ovarian growth of a fresh water rice field crab (Oziotelphusa senex senex Fabricius)*. *Toxicol. Letters* 18: 273 – 276.

Sreeram, M.P. y Menon, N.R. (2005) *Histopathological changes in the hepatopancreas of the penaeid shrimp Metapenaeus dobsoni exposed to petroleum hydrocarbons*. *J. Mar. Biol. Ass. India* 47 (2): 160 – 168.

Srivastava, J.; Das, S.; Pandey, R.K. y Das, V.K. (2013) *Acute toxicity and behavioural responses of freshwater crab Barytelphusa guerini to chlorpyrifos exposure*. *J. Appl. Biosci.* 39 (1): 56 – 59.

Stoker C.; Repetti, M.R.; García, S.R.; Zayas, M.A.; Galoppo, G.H.; Beldoménico, H.R.; Luque, E.H. y Muñoz-de-Toro, M. (2011) *Organochlorine compound residues in eggs of broad-snouted caimans (Caiman latirostris) and correlation with measures of reproductive performance*. *Chemosphere*, 84: 311 - 317.

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuicola cavador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Sucahyo, D.; van Straalen, N.M.; Krave, A y van Gestel, C.A.M. (2008) *Acute toxicity of pesticides to the tropical freshwater shrimp Caridina laevis*. *Ecotox. Environ. Saf.* 69 (3): 421 - 427.

Suryavanshi, U.; Sreepada, R.A.; Ansari, Z.A.; Nigam, S. y Badesab, S. (2009) *A study on biochemical changes in the penaeid shrimp, Metapenaeus monoceros (Fabricius) following exposure to sublethal doses of organochlorine pesticide (endosulfan)*. *Chemosphere* 77: 1540 – 1550.

Tsukimura, B. (2001). *Crustacean vitellogenesis: Its role in oocyte development*. *Amer. Zool.* 67: 125 – 141.

Traas, T.P.; Janse, J.H.; Aldenberg, T. y Brocks, T.C.M. (1998) *A food web model for fate and direct and indirect effects of Dursban® 4E (active ingredient chlorpyrifos) in freshwater microcosms*. *Aquat. Toxicol.* 32: 179 – 190.

Vance, R.R. (1973). *On reproductive strategies in marine benthic invertebrates*. *Am. Nat.* 107: 339 – 352.

USEPA (United States Environmental Protection Agency) 1989. *Determination of chlorinated pesticides in water by gas chromatography with an electron capture detector. Method 508*. Cincinnati, p. 28.

USEPA (United States Environmental Protection Agency) (2002) *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. Washington DC, p. 266.

Varó, I.; Serrano, R.; Pitarch, E.; Amat, F.; López, F.J. y Navarro, J.C. (2000). *Toxicity and bioconcentration of chlorpyrifos in aquatic organisms: Artemia parthenogenetica (Crustacea), Gambusia affinis, and Aphanius iberus (Pisces)*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65: 623 - 630

Varó, I.; Serrano, R.; Pitarch, E.; Amat, F.; López, F.J. y Navarro, J.C. (2002). *Bioaccumulation of Chlorpyrifos Through an Experimental Food Chain: Study of Protein HSP70 as Biomarker of Sublethal Stress in Fish*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 229 – 235.

Vogt, G. (1987) *Monitoring environmental pollutants such as pesticides in prawn aquaculture by histological diagnosis*. *Aquaculture* 67: 157 - 164.

Vogt, G. (2002). *Functional Anatomy*. En: *Biology of freshwater crayfish* (Ed.: Holdich, D.M.). Blackwell, Oxford: 53 – 151.

Carlos Leandro Negro

*Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavador *Zilchiopsis collastinensis* (Decapoda, Trichodactylidae)*

Walker, C.H.; Hopkin, S.P.; Sibly, R.M. y Peakall, D.B. (2001). *Principles of ecotoxicology. Second edition.* Taylor y Francis, London, p. 309

Wan, M.T., Kuo, J., Buday, C., Schroeder, G., Van Aggelen, G., Pasternak J. (2005) *Toxicity of α -, β -, ($\alpha+\beta$)-endosulfan and their formulated and degradation products to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus kisutch*, and biological implications in streams.* Environ. Toxicol. Chem. 24 (5): 1146 - 1154.

Waterman, T.H (1961). *The physiology of Crustacea. Vol. I Metabolism and growth.* Academic press. New York, p. 681

Weston, D.P. y Lydy, M.J. (2010). *Urban and agricultural sources of pyrethroid insecticides to the Sacramento – San Joaquin delta of California.* Environ. Sci. Technol. 44: 1833 – 1840.

White, S.L. y Rainbow, P.S. (1982) *Regulation and accumulation of copper, zinc and cadmium by the shrimp *Palaemon elegans*.* Mar. Ecol. Prog. Ser. 8: 95 – 101.

Williner, V. y Collins, P.A. (2002) *Daily rhythm of feeding activity of a freshwater crab *Dilocarcinus pagei pagei* in National Park Rio Pilcomayo, Formosa, Argentina.* En: *Modern approaches to the Study of Crustacea* (Eds.: Escobar-Briones, E. y Alvarez, F.). Kluwer Academic and Plenum Publishers, Nueva York, p. 171 – 178.

Williner, V. y Collins, P. (2003) *Effects of Cypermethrin on the Freshwater Crab *Trichodactylus borellianus* (Crustacea: Decapoda: Braquiura).* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71: 106 - 113.

Williner, V.; Giri, F. y Collins, P. A. (2009) *Los crustáceos decápodos dulciacuícolas en Argentina.* FABICIB 13: 107 - 125.

Williner, V. (2010). *Foregut ossicles morphology and feeding of the freshwater anomuran crab *Aegla uruguayana* (Decapoda, Aeglidae).* Acta Zool. 91 (4): 408 – 415.

Wirth, E.F.; Lund, S.A.; Fulton, M.H. y Scott, G. I. (2001) *Determination of acute mortality in adults and sublethal embryo responses of *Palaemonetes pugio* to endosulfán and methoprene exposure.* Aquat. Toxicol. 53: 9 - 18.

Wu, J.P.; Chen, H.C. y Huang, D.J. (2008) *Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*.* Chemosphere 73: 1019 - 1026.

Yamaguchi, S.; Celino, F.T.; Ito, A.; Agusa, T.; Tanabe, S.; Tuyen, B.C.; Miura, C. y Miura, T. (2008) *Effects of arsenic on gonadal development in freshwater crab,*

Carlos Leandro Negro

Efectos de biocidas en el cangrejo dulciacuícola cavadador Zilchiopsis collastinensis (Decapoda, Trichodactylidae)

Somanniathelphusa pax, in Vietnam and *Geothelphusa dehaani* in Japan. *Ecotoxicology* 17: 772 – 778.

Yang, Z.B.; Zhao, Y.L.; Li, N. y Yang, J. (2007) *Effects of Waterborne Copper on the Microstructures of Gill and Hepatopancreas in Eriocheir sinensis and Its Induction of Metallothionein Synthesis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 222 – 228.

Yano, I. y Chinzei, Y. (1987). *Ovary in the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, Penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 86 (2): 213 – 218.

Yávar, C. y Dupré, E. (2007) *Desarrollo embrionario del camarón de río Cryphiops caementarius (Decapoda: Palaemonidae) en condiciones de laboratorio*. *Biol. Trop.* 55 (1): 15 – 24.

Zapata, V.; López Greco, L. y Rodríguez, E.M. (2001) *Effect of copper on hatching and development of larvae of the estuarine crab Chasmagnathus granulata (Decapoda, Brachyura)*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (7): 1579 – 1583.

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

Zar, J.H. (1996). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New York, p. 662.

Zou, E.; Nanshan, D. y Wei, L. (1992). *The effects of acute progressive hypoxia on the respiration rate of the Chinese crab Eriocheir sinensis*. *Zool. Res.* 14: 327 - 334.