



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



FACULTAD DE
**CIENCIAS
AGRARIAS**

**EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES DE
CONTAMINACIÓN POR CLORFENAPIR,
DELTAMETRINA Y LAMBDAHALOTRINA EN
Pomacea canaliculata (Caenogastropoda,
Ampullaridae).**

AUTOR: EMILIO MANSILLA

**TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERÍA EN RECURSOS
NATURALES RENOVABLES**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS – UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

MENDOZA – 2022

Tesis de grado “Evaluación de biomarcadores de contaminación por Clorfenapir, Deltametrina y Lambdacialotrina en *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullaridae)”.

Autor: Emilio Mansilla

Correo electrónico: edanielmansilla@gmail.com / emansilla@est.fca.uncu.edu.ar

Director: Dr. Maximiliano Giraud-Billoud. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. IHEM, CONICET.

Codirector: Dr. Eduardo Albrecht. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.

Comisión evaluadora:

- Ing. Alejandro Drovandi. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo
- Ing. Santiago Echevarría. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo
- Dr. Israel Aníbal Vega. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. IHEM, CONICET

RESUMEN

La caracterización de organismos bioindicadores constituye un campo de creciente desarrollo en la toxicología ambiental, ya que a través de ellos pueden identificarse sustancias potencialmente nocivas para la salud y el medio ambiente que contaminan distintos ecosistemas. Los moluscos son organismos útiles para evidenciar la presencia de tóxicos en cuerpos de agua, originados en prácticas agrícolas y emisiones industriales. Particularmente, se ha postulado a *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae) como un organismo bioindicador, debido entre otras características, a su amplia distribución mundial en ecosistemas acuáticos y a la identificación de efectos tisulares y reproductivos en animales expuestos a distintos contaminantes ambientales como compuestos organoestañosos, metales pesados y algunos agroquímicos. Estos cambios fisiológicos e histológicos pueden ser utilizados como biomarcadores de la contaminación presente en cuerpos de agua y, por tanto, indicar la presencia de tóxicos que pueden estar evadiendo a los mecanismos clásicos de control físico-químicos de calidad de agua. En este trabajo se propuso caracterizar biomarcadores en *P. canaliculata* y para ello inicialmente se determinó la toxicidad de los insecticidas Clorfenapir (Onfire® 24%), Deltametrina (Decis forte® 10.5%) y Lambdacialotrina (Rafter® 5%) a través de la identificación de la dosis letal 50 (LC50) y la dosis en la que no se evidencian efectos sobre letalidad (NOEC_L) a las 48 horas de exposición a dichos compuestos en el agua. Posteriormente, se evaluó si la exposición aguda a dosis NOEC_L produce alteraciones histológicas de los acinos y de la ocupación simbiótica glandular y cambios en la actividad de enzimas antioxidantes superóxido-dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión-transferasa (GST), en la glándula digestiva de esta especie. En los ensayos se utilizaron individuos adultos de ambos sexos, provenientes de una línea de cultivo de laboratorio, mantenidos bajo condiciones controladas, que se dividieron en 4 grupos experimentales, un grupo control y los tres correspondientes a los insecticidas, expuestos por 48 h a dosis NOEC_L. Posteriormente, se obtuvieron muestras de glándula digestiva de animales de cada grupo. Parte de las muestras fueron procesadas para técnicas histológicas y otra parte para medición de actividad enzimática. Las muestras para histología fueron fijadas, incluidas en parafina y se cortaron a 5 µm. Los cortes fueron montados y se obtuvieron micrografías para hacer análisis morfométrico, donde se cuantificó el área de ocupación de corpúsculos de un simbiote presente en este órgano, utilizando 10 imágenes por caso y el software Image ProPlus®. Las muestras para la medición de actividad de las enzimas SOD, CAT y GST, por espectrofotometría, fueron homogeneizadas en buffer específico y los sobrenadantes se congelaron a -80°C hasta su utilización. Las LC50_{48h} y NOEC_{L48h} para Clorfenapir fueron de 2.96 y 0.20 µg/ml, para Deltametrina 1.63 y 0.88 µg/ml y para Lambdacialotrina 0.65 y 0.42 µg/ml, respectivamente. La ocupación de los acinos glandulares

por la forma vegetativa del simbionte que allí habita se vio disminuida en los animales expuestos a insecticidas, siendo significativa la caída para Deltametrina, comparado con el control (ANOVA, post-test Tukey). La ocupación por la forma quística del simbionte no presentó modificaciones, aunque mostró tendencia a disminuir su ocupación en animales expuestos a Deltametrina y Lambdacialotrina. Asimismo, la exposición aguda a Deltametrina produjo un aumento significativo de la SOD y disminución significativa de la CAT, mientras que la exposición a Lambdacialotrina se asoció una caída significativa en la actividad de GST y el Clorfenapir no indujo cambios significativos en las enzimas antioxidantes estudiadas (ANOVA, post-test Tukey). Estos resultados abren la posibilidad de utilizar cambios histológicos y en la actividad de defensas antioxidantes de *P. canaliculata* como biomarcadores de contaminación de cuerpos de agua por insecticidas, principalmente para Deltametrina. Sin embargo, aunque la herramienta resulta interesante y prometedora, es aún un campo en desarrollo en donde hay que establecer específicamente los biomarcadores adecuados para cada región, por lo que constituye hoy en día un complemento a implementar a los ya utilizados métodos de detección físico-químicos de rutina para la detección de insecticidas contaminantes de cuerpos de agua, especialmente en zonas donde este recurso es limitado.

Palabras clave: bioindicador, insecticidas, contaminación de agua, toxicología ambiental, gasterópodos.

ABSTRACT

The characterization of bioindicator organisms is a field of growing development in environmental toxicology since they can be used to identify potentially harmful substances for health and the environment that contaminate different ecosystems. Molluscs are useful organisms to demonstrate the presence of toxicants in water bodies, originating in agricultural practices and industrial emissions. *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae) has been postulated as a bioindicator organism, due, among other characteristics, to its wide worldwide distribution in aquatic ecosystems and to the identification of tissue and reproductive effects in animals exposed to different environmental pollutants such as organotin compounds, heavy metals and some agrochemicals. These physiological and histological changes can be used as biomarkers of the contamination present in water bodies and, therefore, indicate the presence of toxicants that may be evading the classic mechanisms of physicochemical control of water quality. In this work we proposed to characterize biomarkers in *P. canaliculata* and for this purpose we initially determined the toxicity of the insecticides Chlorfenapyr (Onfire® 24%), Deltamethrin (Decis forte® 10.5%) and Lambdacyhalothrin (Rafter® 5%) through the identification of the lethal dose 50 (LC50) and the dose at which no effect on lethality is evident (NOECL) after 48 hours of exposure to these compounds in water. Subsequently, it was evaluated whether acute exposure to NOECL doses produces histological alterations of acini and glandular symbiotic occupancy and changes in the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione transferase (GST) in the digestive gland of this species. Adult individuals of both sexes from a laboratory culture line, maintained under controlled conditions, were divided into 4 experimental groups: a control group and the three groups corresponding to the insecticides, exposed for 48 h at NOECL doses. Subsequently, digestive gland samples were obtained from animals in each group. Part of the samples were processed for histological techniques and another part for enzymatic activity measurement. The samples for histology were fixed, embedded in paraffin and cut at 5 µm. The sections were mounted and micrographs were obtained for morphometric analysis, where the area of corpuscle occupation of a symbiont present in this organ was quantified, using 10 images per case and Image ProPlus® software. Samples for the measurement of SOD, CAT and GST enzyme activity by spectrophotometry were homogenized in specific buffer and the supernatants were frozen at -80°C until use. The LC50_(48h) and NOECL_(48h) for Chlorfenapyr were 2.96 and 0.20 µg/ml, for Deltamethrin 1.63 and 0.88 µg/ml and for Lambdacyhalothrin 0.65 and 0.42 µg/ml, respectively. The occupancy of the glandular acini by the vegetative form of the symbiont that inhabits them was decreased in the animals exposed to insecticides, the drop being significant for Deltamethrin, compared to the control (ANOVA, post-test Tukey). Occupation by the cystic form of the symbiont did not show

modifications, although it showed a tendency to decrease in animals exposed to Deltamethrin and Lambdacyhalothrin. Likewise, acute exposure to Deltamethrin produced a significant increase in SOD and a significant decrease in CAT, while exposure to Lambdacyhalothrin was associated with a significant drop-in GST activity and Chlorfenapyr did not induce significant changes in the antioxidant enzymes studied (ANOVA, Tukey post-test). These results open the possibility of using histological changes and changes in the activity of antioxidant defenses of *P. canaliculata* as biomarkers of contamination of water bodies by insecticides, mainly for Deltamethrin. However, although the tool is interesting and promising, it is still a developing field where the appropriate biomarkers for each region have to be specifically established, so it is nowadays a complement to implement to the already used routine physical-chemical detection methods for the detection of insecticides contaminating water bodies, especially in areas where this resource is limited.

Keywords: bioindicator, insecticides, water pollution, environmental toxicology, gastropods.

AGRADECIMIENTOS

A mi director y codirector, Maximiliano Giraud-Billoud y Eduardo Albrecht, por orientarme con la mejor predisposición, con gran profesionalismo y enorme paciencia a lo largo de todo este trabajo de tesis

A todo el grupo del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas, por la buena onda, por la voluntad de enseñar y ayuda recibida.

A mi familia entera, por el apoyo recibido a lo largo de todos estos años.

A Agustina, mi compañera de vida e impulsora fundamental de todo este trabajo.

A amigos y compañeros de facultad, quienes siempre estuvieron a mi lado acompañándome.

Al grupo del Instituto de Biología Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias, por el apoyo constante y crecimiento personal y académico en estos años compartidos.

A los profesores de Ciencias Agrarias, por haber participado en mi formación.

A los evaluadores, por la predisposición y el tiempo dedicado a la evaluación de este trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 PLAGUICIDAS.....	1
1.1.1 DEFINICIÓN.....	1
1.1.2 CLASIFICACIÓN.....	1
1.2 RECURSO AGUA	3
1.2.1 SITUACIÓN EN ARGENTINA	3
1.2.2 SITUACIÓN EN MENDOZA.....	4
1.2.3 CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR PLAGUICIDAS	5
1.2.4. ANTECEDENTES DE CONTAMINACIÓN CON PLAGUICIDAS EN AMBIENTES ACUÁTICOS ARGENTINOS.....	6
1.3 <i>P. canaliculata</i> : MODELO BIOLÓGICO UTILIZADO EN ESTA TESIS	6
1.4 MOLUSCOS Y SU IMPOTANCIA COMO BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN	10
1.5 BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN	12
1.5.1 DEFINICIÓN	12
1.5.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y CAMBIOS HISTOLÓGICOS COMO BIOMARCADORES	12
1.5.3 BIOMARCADORES ANTIOXIDANTES E HISTOLÓGICOS EN <i>Pomacea canaliculata</i>	14
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. HIPÓTESIS	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15

4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	15
4.2 INSECTICIDAS	15
4.2.1 DECIS ® FORTE (Deltametrina)	15
4.2.2. ONFIRE® (Clorfenapir)	16
4.2.3. RAFTER® (Lambdacialotrina).....	17
5. METODOLOGÍA.....	18
5.1. DETERMINACIÓN DE DL50 _(48h) Y NOEC _{L(48h)}	18
5.2. CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS	19
5.3 DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.....	21
5.3.1 PROTOCOLO DE MEDICIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	22
5.3.2 PROTOCOLO PARA MEDIR ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).....	23
5.3.3 PROTOCOLO PARA MEDICIÓN DE ACTIVIDAD CATALASA (CAT).....	24
5.3.4 PROTOCOLO PARA MEDIR ACTIVIDAD GLUTATIÓN TRANFERASA (GST).....	24
5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
6. RESULTADOS.....	25
6.1 EVALUACIÓN DE TOXICIDAD DE CLORFENAPIR, DELTAMETRINA Y LAMBDACIALOTRINA EN <i>Pomacea canaliculata</i>	25
6.2 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS	27
6.3 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO (CAT, SOD y GST).....	29
7. DISCUSIÓN.....	30
7.1 TOXICIDAD DE INSECTICIDAS	30
7.3 OCUPACIÓN GLANDULAR COMO BIOMARCADOR.....	30

7.2 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS COMO BIOMARCADOR	31
8. CONCLUSIÓN	33
ANEXO.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PLAGUICIDAS

1.1.1 DEFINICIÓN

Un plaguicida se puede definir como cualquier sustancia, o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar una plaga (FAO¹, 2006). Aquí se incluyen vectores de enfermedades humanas o de animales, especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y subproductos o alimentos para animales o que pueden administrarse a animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos (FAO, 2006). Es importante también incluir los plaguicidas utilizados en el ámbito hogareño para combatir plagas y vectores. Así, este grupo de sustancias químicas puede ser usado a nivel humano, agronómico, sanitario y veterinario, y está sujeto a registros y reglamentaciones, que incluyen sus prohibiciones (Miglioranza, 2021).

1.1.2 CLASIFICACIÓN

Los plaguicidas pueden clasificarse de distinta manera y con distinto grado de especificidad (Miglioranza, 2021). Según el organismo sobre el cual actúan se los divide en:

Tabla 1: Clasificación de Plaguicidas según organismo sobre el cual actúan.

Organismo	Plaguicida
Insectos	Insecticidas
Ácaros	Acaricidas
Hongos	Fungicidas
Nemátodos	Nematicidas, desinfectantes del suelo y fumigantes
Malezas	Herbicidas
Moluscos	Molusquicidas
Roedores	Rodenticidas

Fuente: Elaboración propia en base a Miglioranza, 2021.

¹ FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Según el grupo químico al cual pertenecen:

- Insecticidas

Tabla 2: Clasificación y ejemplos de Insecticidas según grupo químico al cual pertenecen.

Grupo químico	Ejemplos
Clorados ²	DDT, endosulfán, HCHs,
Organofosforados	Clorpirifos, mercaptotión, etión, triclorfón.
Carbamatos	Carbofurán, carbosulfán.
Piretroides	Cipermetrina, deltametrina, lambdacialotrina.
Neonicotinoides	Acetamiprid, imidacloprid.
Benzoilureas	Novalurón, clorfluazurón, teflubenzurón.
Pirroles	Clorfenapir

Fuente: Elaboración propia en base a Miglioranza, 2021 y CASAFE³, 2021.

- Herbicidas

Tabla 3: Clasificación y ejemplos de Herbicidas según grupo químico al que pertenecen.

Grupo químico	Ejemplos
Derivados de la glicina	Glifosato
Imidazolinonas	Imazaquim, imazetapir, imazapir
Triazinas	Atrazina, prometrina
Acetanilidas	Acetoclor, alaclor
Derivados benzoicos	Dicamba
Benzonitrilos	Bromoxinil
Diazinas	Bentazón
Bipiridilos	Paraquat, diquat

Fuente: Elaboración propia en base a Miglioranza, 2021.

- Fungicidas

Tabla 4: Clasificación y ejemplos de Fungicidas según grupo químico al que pertenecen.

Grupo químico	Ejemplos
Metoxiacrilatos	Azoxistrobina
Triazoles	Epoxiconazole, ciproconazole, difenoconazole

² Este grupo se encuentra prohibido a nivel mundial y forma parte de la lista de Compuestos Orgánicos Persistentes, regulados por el Convenio de Estocolmo (UNEP, 2003).

³ Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes.

Bencimidazoles	Carbendazim, tibendazol, metil tiofanato
Derivado del benceno	Clorotalonil
Ditiocarbamato	Mancozeb

Fuente: Elaboración propia en base a Miglioranza, 2021.

Existe, además, una clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) basada en la toxicidad aguda de los plaguicidas en estudios con animales. En la misma se destacan los colores que deben llevar los productos en su etiquetado, como se muestra a continuación.

Tabla 5: Clasificación de Plaguicidas según toxicidad

Categoría	Clasificación toxicológica
Extremadamente peligrosos	Ia
Altamente peligrosos	Ib
Moderadamente peligrosos	II
Poco peligrosos	III
Normalmente no ofrecen peligro bajo uso adecuado	IV

Fuente: Elaboración propia en base a OMS, 2019.

1.2 RECURSO AGUA

El agua es un recurso renovable finito, esencial para la vida y para el desarrollo de las sociedades (Fernández Cirelli, 2012). Este factor indispensable para todo ecosistema requiere de un manejo integral para alcanzar un uso adecuado y un cuidado eficiente (Moretto *et al*, 2018).

El uso global de agua se ha multiplicado por un factor de seis en los últimos 100 años y sigue aumentando a un ritmo constante de 1% anual, debido al cambio en los patrones de consumo, al desarrollo económico y al aumento de la población. El cambio climático y un suministro más errático e incierto agravarán la situación de las regiones donde este bien más escasea y crearán escasez en las regiones en las que el agua abunda hoy. Los depósitos de agua dulce se verán así negativamente afectados en cuanto a su calidad por el aumento de sus temperaturas, la menor cantidad de oxígeno disuelto y por consiguiente, su capacidad de autodepuración. Por otro lado, en épocas de sequía, fenómenos como inundaciones y concentración de contaminantes, elevará el riesgo de contaminación patogénica (UNESCO⁴, 2020).

1.2.1 SITUACIÓN EN ARGENTINA

Argentina es un país marcadamente heterogéneo en lo que se refiere a disponibilidad y demanda de sus recursos hídricos. Presenta una desigual distribución del agua, con dos tercios del territorio conformado por regiones áridas y semiáridas, y sólo un tercio rico en fuentes de este recurso, fundamentalmente superficiales (Sturzenegger *et al.*, 2011).

⁴ UNESCO: Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura.

El país dispone de una oferta hídrica media anual por habitante superior a los 20.000 m³/habitante, muy por encima del umbral de estrés hídrico que adopta PNUD⁵, equivalente a una disponibilidad de 1.000 m³/habitante, aunque algunas provincias se encuentran por debajo del mismo (Sturzenegger *et al.*, 2011; Calcagno *et al.*, 2000).

Actualmente este recurso se ve severamente amenazado en cuanto a calidad y disponibilidad, por actividades como la agricultura, consumo industrial y doméstico consecuencia del aumento poblacional, incorrecta explotación y contaminación, entre otras. Esto representa un enorme desafío para las instituciones encargadas de la gestión del agua que deben garantizar su disponibilidad espacial y temporal y su calidad en función de los distintos tipos de uso. (Sturzenegger *et al.*, 2011).

1.2.2 SITUACIÓN EN MENDOZA

La provincia de Mendoza cuenta con un clima regional árido, continental y típicamente templado, con un promedio de precipitación anual en el llano de 200 mm. La actividad agropecuaria depende del sistema de riego, con agua captada de fuentes superficiales y subterráneas, cuyos caudales son abastecidos por el deshielo en alta montaña. Las principales cuencas hidrográficas son de los ríos Mendoza, Tunuyán⁶, Diamante, Atuel, Malargüe, Grande y Colorado. El aprovechamiento de sus aguas se hace por medio de infraestructura hidráulica compuesta por diques de derivación y embalses (Galmarini, 2020).

Los acuíferos se extienden por debajo del 50 % de la superficie provincial y representan un volumen estimado de 700.000 hm³, de los cuales, alrededor de 21.300 hm³ son explotables económicamente. La importancia de estos acuíferos se evidencia al tomar en cuenta el volumen total de agua almacenada en todos los embalses provinciales, el cual alcanza los 1.800 hm³. Existen cerca de 22.000 pozos construidos para la extracción de agua subterránea, de los cuales un 90 % son destinados para uso agrícola (Galmarini, 2020).

La superficie irrigada es de aproximadamente 350.000 ha, lo que representa sólo el 3,4 % de la superficie total y concentra el 91 % de la actividad económica y humana. En cuanto a la disponibilidad de agua para realizar estas actividades, el 81 % es requerido por el sector agrícola, el 11% se destina al abastecimiento poblacional, un 4% para uso recreativo, un 2% para uso público, un 1% para uso industrial y un 1% para el sector minero y petrolero y (DGI, 2020; Galmarini, 2020; Morábito *et al.*, 2005).

En la última década se observó en la provincia un descenso sostenido del caudal de sus ríos, como consecuencia del calentamiento global y la reducción en precipitación y acumulación nívea, llegando a la peor situación hídrica de los últimos 33 años, con un 30 % menos que el promedio histórico, según datos del DGI⁷. En este sentido, las proyecciones a futuro son poco alentadoras para la región, basadas en pronósticos de agencias internacionales que indican que las precipitaciones níveas seguirán manteniéndose por debajo de los promedios históricos. Dada esta situación, se hace necesario abordar la problemática de manera holística e integrada, articulando acciones de organismos nacionales, provinciales y municipales y desarrollando acciones para hacer un uso eficiente y sustentable del agua.

⁵ PNUD: Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo

⁶ Esta cuenca se encuentra dividida en dos subcuencas: aguas arriba del Dique Carrizal, denominada subcuenca del Tunuyán Superior, y aguas abajo, subcuenca del Tunuyán Inferior.

⁷ DGI: Departamento General de Irrigación, es un organismo público descentralizado que administra el recurso hídrico en la provincia de Mendoza, reglamentando y fiscalizando su uso. Tiene autarquía institucional, presupuestaria y jerarquía constitucional.

1.2.3 CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR PLAGUICIDAS

Se entiende como contaminación a la presencia en el aire, agua o suelo de sustancias o formas de energía no deseables en concentraciones tales que puedan afectar al confort, salud y bienestar de las personas, y al uso y disfrute de lo que ha sido contaminado (Encinas Malagón, M.D., 2011). También podemos definirla como la introducción de agentes biológicos, químicos o físicos a un medio al que no pertenecen (Peñaloza Páez, 2012). De estas dos definiciones, se desprende que la contaminación se trata de un fenómeno en el cual una sustancia se encuentra presente en un sistema en el que no debería y que esta presencia puede alterar el estado de este como así también su uso. Es este concepto el que se usará de base a lo largo de este trabajo.

Cuando los contaminantes son introducidos al ambiente y se distribuyen en los diferentes componentes ambientales, pueden estar más o menos biodisponibles para entrar en contacto e ingresar a los organismos, distribuirse en ellos, disponerse en diferentes tejidos, biotransformarse, eliminarse y eventualmente acumularse respecto a las concentraciones externas. Estos contaminantes pueden interactuar con biomoléculas generando efectos tóxicos sobre los organismos, que se manifiestan a diferentes niveles de organización (molecular, bioquímico, histológico, fisiológico, etc.) en función de la concentración y tiempo de exposición (Carriquiriborde, 2021).

Los plaguicidas son contaminantes de relevancia para la toxicología ambiental, ya que existe gran variabilidad espacial y temporal respecto a su aplicación, como así también distintas frecuencias y concentraciones de uso que determinan distintos efectos deletéreos en el ambiente (Aparicio *et al.*, 2015). Los cuerpos de agua reciben directa o indirectamente descargas de plaguicidas como consecuencia de las diferentes actividades antrópicas que tienen lugar en las cercanías de estos (Peluso, 2021; Dalamas y Eleftherohorinos, 2011). El transporte de los plaguicidas en agua se da por escorrentía, infiltración y deposición húmeda. Así, estos compuestos pueden encontrarse en acequias, redes de drenajes, canales de riego, desagües pluviales, ríos y aguas subterráneas (Gravilescu, 2005). Para evaluar la toxicidad de una sustancia química (u otro agente) sobre la biota, es necesario estudiar la relación entre su concentración y la cuantificación de diferentes respuestas biológicas del organismo o grupo de organismos bajo investigación (Peluso, 2021).

Argentina es considerado un país de gran importancia como productor agrícola, cuya economía primaria se basa en los cultivos de soja, maíz, trigo, girasol, maní, frutas de pepita, pasturas, hortalizas, algodón, tabaco, frutas de carozo, caña de azúcar, arroz, vid y otros (Villamil *et al.*, 2013). La introducción de la soja transgénica resistente al glifosato en la década de 1990 fue una importante modificación agraria en el país, ya que se tradujo en un aumento notable de superficies sembradas y en los rendimientos de cosechas; hecho que está sostenido en el uso de un paquete tecnológico que incluye la utilización de semillas modificadas genéticamente, glifosato como herbicida y algunos insecticidas como endosulfán, clorpirifos y piretroides, en grandes cantidades de aplicación (Villamil *et al.*, 2013).

Los principales agroquímicos utilizados en Argentina son los herbicidas, de los cuales el más usado es el glifosato seguido por la atrazina; en tanto que los insecticidas de mayor uso son el clorpirifos, luego la cipermetrina y lambdacialotrina (Villamil *et al.*, 2013).

Investigaciones realizadas sobre esta situación arrojaron como resultado el probable riesgo de contaminación por distintas vías; entre ellas, deriva durante la aplicación de plaguicidas o por lixiviación de los mismos, generando posibles riesgos para organismos acuáticos y para seres humanos, en especial por insecticidas como cipermetrina, clorpirifos y endosulfan (Mugni *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2013; Loewy *et al.*, 2011; Miglioranza *et al.*, 2011). En relación con esto,

existen estudios (Jergentz *et al.*, 2005; Mugni *et al.*, 2011; González *et al.*, 2013) que advierten sobre los potenciales efectos citotóxicos y genotóxicos de plaguicidas como el glifosato (Villamil *et al.*, 2013).

1.2.4. ANTECEDENTES DE CONTAMINACIÓN CON PLAGUICIDAS EN AMBIENTES ACUÁTICOS ARGENTINOS

Desde 1970 se han reportado plaguicidas organoclorados en muestras de aguas en el sector antártico argentino y costa atlántica (García Fernández *et al.*, 1979a), en concentraciones que alcanzaron los 9 ng/l de DDT (diclorodifenil-tricloroetano) en ciertas regiones. Asimismo, en los ríos Uruguay y Paraná, se hallaron HCB (hexaclorobenceno), HCH (hexaclorociclohexano) y DDT, alcanzando este último concentraciones de 5.61 ng/l (García Fernández *et al.*, 1979b).

Un estudio realizado entre 2001 y 2003, reporta concentraciones de clorpirifós y cipermetrina en la escorrentía y agua de inundación en valores que superan los criterios de calidad de agua dulce y de endosulfán en material en suspensión, en los arroyos Brown y Horqueta, la principal zona de producción sojera de la provincia de Buenos Aires (Jergentz *et al.*, 2005); en el valle del río Neuquén, se realizó una evaluación de la migración de residuos de plaguicidas en suelo, aguas superficiales y subterráneas poco profundas fuera de la zona de aplicación, y se encontraron en estos tres lugares residuos de azinfos metílico, carbaril y clorpirifós (Loewy *et al.*, 2011); en el año 2013, en la cuenca del río Negro (Patagonia argentina) se reportó la presencia de organoclorados en suelos, sedimentos y en cursos de agua, a pesar de la prohibición de su uso (Miglioranza *et al.*, 2013). Se ha encontrado sulfato de endosulfán y HCH, 9.4 ng/l y 21.65 ng/l respectivamente, en la Laguna de Mar Chiquita, Córdoba (Ballesteros *et al.*, 2010). Estas cantidades superaron los niveles permitidos por la legislación nacional; en aguas de la cuenca del río Suquía, cuyo cauce desemboca en la laguna mencionada anteriormente, se detectaron altos niveles de plaguicidas en las zonas con prácticas agrícolas, es decir, 433.9 ng/l de atrazina, 121.7 ng/l de α -cipermetrina y 106.7 ng/l de sulfato de endosulfán (Ballesteros *et al.*, 2010).

1.3 P. *canaliculata*: MODELO BIOLÓGICO UTILIZADO EN ESTA TESIS

Entre los animales, el filo Mollusca es uno de los más diversos e incluye a la clase Gastropoda. Dentro de la misma, se encuentra la subclase Caenogastropoda, donde está incluido el grupo informal Architaenioglossa (Bouchet y Rocroi, 2005). Dentro de este orden se encuentra la familia Ampullariidae, que incluye caracoles dulciacuícolas distribuidos principalmente en las regiones tropicales y subtropicales húmedas de nuestro planeta (Hayes *et al.*, 2015) y se encuentran agrupados en 10 géneros, con aproximadamente 120 especies actualmente consideradas válidas dentro de ella. La mayoría de las especies están actualmente incluidas en los géneros *Pomacea*, *Pila* y *Lanistes* (Hayes *et al.*, 2015).

Filo: *Mollusca*

Clase: *Gastropoda*

Clado *Caenogastropoda*⁸

Orden: *Architaenioglossa*⁹

Familia: *Ampullariidae*

⁸ Clado grande y diverso que contiene aproximadamente el 60% de los gasterópodos vivos; sus relaciones de base no están resueltas, por lo tanto, tampoco lo está su nivel taxonómico (Hayes *et al.*, 2015).

⁹ Grupo definido como parafilético (grupo cuyos integrantes tienen un ancestro común, pero que no incluye a la totalidad de los descendientes de este) según análisis que utilizan datos morfológicos y moleculares (Hayes *et al.*, 2015)

Género: *Pomacea*

Especie: *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822)



Figura 1: Ejemplar de *Pomacea canaliculata*. Fuente: M. Giraud-Billoud

Pomacea canaliculata es una especie nativa de la cuenca del Río de la Plata y fue introducida en la década de 1980 en varios países de Asia, ampliando su distribución posteriormente a Oceanía, Europa (delta del Río Ebro), Estados Unidos (Hawái y otros estados continentales) y otros países sudamericanos donde no estaba presente como Ecuador y Chile (Ferreira y Rodrigues, 2017).

El área de distribución natural se extiende desde la cuenca del Río de la Plata hacia el sur hasta la cuenca de las Encadenadas del Oeste, al sur de la provincia de Buenos Aires, lo que lo convierte en el ampulárido más austral del mundo (Martin *et al.*, 2001; Cazzaniga y Estebenet, 1998). Existen barreras naturales que impiden que esta especie extienda su área de distribución; hacia el oeste de la provincia de Buenos Aires, la presencia de ambientes acuáticos salinos, alcalinos, con poca vegetación y de frecuente desecación, actúan como límites. Mientras que, al sur el principal factor que limita su expansión son las sierras de Tandilia y Ventania (Martin *et al.*, 2001). Sin embargo, se han identificado ejemplares de esta especie en otras provincias argentinas, como Neuquén y Mendoza. En la provincia de Neuquén, se ha confirmado la presencia de individuos y de masas de huevos en el río Limay, hecho que parece estar vinculado al aumento de las temperaturas y precipitaciones medias de la región provocados por el cambio climático, a valores cercanos a los del extremo sur del área de distribución original, lo que habría beneficiado a extender estos límites hacia la región patagónica (Darrigran *et al.*, 2011).

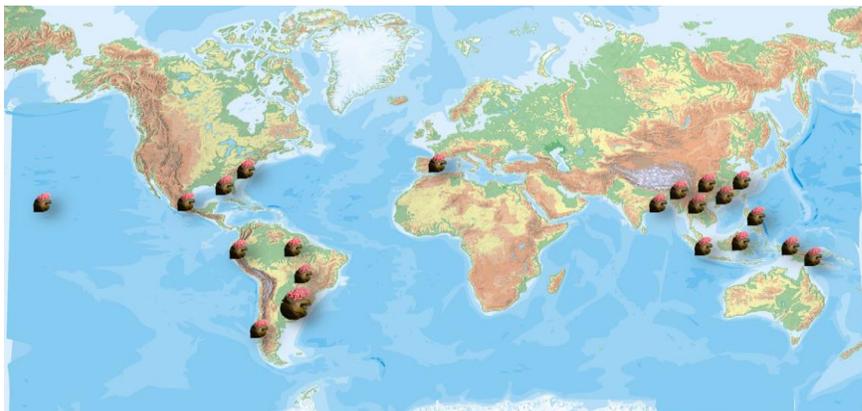


Figura 2: Mapa de distribución mundial de *P. canaliculata*. Fuente: M. Giraud Billoud.

En la provincia de Mendoza, se han identificado poblaciones que habitan áreas marginales de los ríos Tunuyán y Mendoza, ubicadas entre los 500 a 800 metros sobre el nivel del mar, que se caracterizan por un escaso movimiento de sus aguas (Albrecht, E., 1996).

Estos ampuláridos habitan ambientes lénticos y lóticos en su área de distribución natural (Martin *et al.*, 2001). En estos dos tipos de ambientes, comúnmente se encuentran cerca de los márgenes, asociados a macrófitas y corrientes lentas de poca profundidad (Hayes *et al.*, 2015). Posiblemente esto se deba a la disponibilidad de sustratos para la oviposición y a factores relacionados con la evitación de depredadores, disponibilidad de alimento y frecuente ventilación pulmonar (Seuffert y Martin, 2010).



Figura 3: Ambiente típico donde habita *P. canaliculata*, donde pueden observarse las puestas de huevos aéreas en la vegetación (a); detalle de una puesta de huevos (b); ejemplares adultos de esta especie, hembra (izq) y macho (der) (c). En esta última imagen se observa el detalle de la curvatura cóncava o convexa del opérculo, carácter morfológico utilizado para diferenciar los sexos en la especie. Fuente: M. Giraud -Billoud.

Pomacea canaliculata es considerado como un caracol polífago y cuenta con varias estrategias de alimentación, entre ellas el raspado, triturado y recolección pedal (Andrews, 1965; Escobar Correas *et al.*, 2019). Mediante el raspado, obtiene material adherido a superficies sumergidas, haciendo uso de su rádula; con su mandíbula consigue triturar piezas de materiales sumergidos como macrófitas y además, recolecta materiales de la superficie del agua acumulados por un embudo temporal generado por movimientos de la cara ciliar de su pie (Martin *et al.*, 2017). Estos materiales incluyen perifiton, macrófitas, desechos y materia orgánica, aunque su preferencia alimenticia tiene variaciones durante su ontogenia. En etapas juveniles, los caracoles prefieren ingerir detritos y algas, mientras que en la adultez prefiere macrófitas (Cruz *et al.*, 2015).

P. canaliculata es una especie anfibia, ya que posee una branquia y un pulmón funcional, que posibilitan tanto la respiración acuática como la aérea, respectivamente. En esta última, también interviene otro órgano, llamado sifón, que es extensible y permite ventilar al pulmón. Esto permite la respiración para la oviposición aérea o en hábitats que se secan o en ocasiones están poco oxigenados. (Martin *et al.*, 2017).

En esta especie el crecimiento es estacional y se encuentra regulado por la temperatura, aunque la tasa de crecimiento disminuye y los períodos de crecimiento activo se hacen más cortos con

el envejecimiento de los caracoles. La estacionalidad en regiones de climas templados impone épocas de descanso invernal durante los cuales el crecimiento llega a detenerse por completo y se reanuda cuando la temperatura del agua asciende en primavera (Albrecht *et al.*, 1999; Martín *et al.*, 2017).

Otra característica es que esta especie presenta dimorfismo sexual secundario en cuanto a forma, tamaño y peso de los individuos. La longitud media de conchilla es mayor en hembras que en machos (Estebenet *et al.*, 2006), ya que su tasa de crecimiento es ligeramente más alta (Estebenet y Cazzaniga, 1998). Respecto al peso corporal, el de las hembras es mayor que el de machos de igual longitud. Las tasas de crecimiento de longitud, y en especial del ancho del opérculo, son más altas en machos (Estebenet y Cazzaniga, 1998), lo que se traduce en formas de opérculo sexualmente dimórficas, siendo cóncavo en hembras y convexo en machos (Figura 3c) (Gamarra-Luques *et al.*, 2013). Caracoles de diferentes sitios pueden variar este grado de expresión en dimorfismo sexual (Estebenet *et al.*, 2006).

Pomacea canaliculata es una especie iterópara en zonas de clima templado y semélpara en condiciones de clima cálido (Albrecht *et al.*, 1999). Los cambios de temperatura en zonas templadas, pueden ser el factor crítico que causa el inicio estacional de la copulación y oviposición (Estebenet y Cazzaniga, 1992). Uno de los aspectos más estudiados en esta especie es el apareamiento; las cópulas, que son subacuáticas, se encuentran entre las más largas de la subclase Caenogastropoda (12.15 ± 3.97 h) (Burela y Martín, 2009) y pueden ser más frecuentes que los episodios de oviposición (Albrecht *et al.*, 1996). Machos y hembras se aparean frecuentemente con diferentes parejas (Burela y Martín, 2011). La oviposición tiene lugar fuera del agua sobre cualquier sustrato emergente y firme (Figura 3a), fundamentalmente durante la noche o al amanecer. Los huevos están compuestos de una cáscara calcárea y una masa gelatinosa que incluye perivitelina¹⁰ de color rosado oscuro (Figura 3b), con función protectora frente a depredadores, a la luz solar y a la desecación (Dreon *et al.*, 2006)). Estas acciones se vuelven más evidentes conforme aumenta el tamaño de las puestas, permitiendo así a las masas de huevos tolerar condiciones ambientales desfavorables (Tamburi y Martín, 2009).

Recientemente, se ha secuenciado el genoma completo de *P. canaliculata* (Sun *et al.*, 2019), siendo el primer caracol argentino en el cual se ha llevado a cabo este estudio; en el mismo se destacan el hallazgo de los genes vinculados a la producción de las proteínas que se encuentran en los huevos que les dan los atributos anteriormente mencionados y a la expresión de genes que codifican la enzima celulasa. Estos hallazgos son de gran importancia en el marco de la gran invasividad de la especie en ambientes fuera del rango de distribución nativa.

Los ampuláridos han establecido una gran variedad de asociaciones simbióticas y la mayor parte de la información sobre ellas proviene de estudios en *P. canaliculata* (Di Persia y Radici de Cura, 1973; Vega *et al.*, 2006; Cazzaniga, 1988; Gorni y Alves, 2006; Gamarra-Luques *et al.*, 2004; Keawjam *et al.*, 1993). Diversos organismos acuáticos establecen relaciones epibióticas con este caracol; en esta larga lista se pueden nombrar cianobacterias filamentosas, clorofitas, euglenófitos, ciliados, rotíferos, anélidos y larvas de dípteros (Hayes *et al.*, 2015). También existen endosimbiosis con otros taxa como por ejemplo trematodos, nematodos y copépodos (Gamarra Luques 2004; Dellagnola *et al.*, 2019). Pero resulta sumamente interesante, un tipo de endosimbionte intracelular pigmentado que se aloja en células específicas de la glándula digestiva (Castro-Vázquez *et al.*, 2002, revisar Koch *et al.*, 2005, Vega *et al.*, 2007, Dellagnola *et al.*, 2019). Este simbiote es un organismo procariota, dada la presencia de ADN sin presencia morfológica de un núcleo verdadero, que tendría una forma vegetativa y quística, denominados forma "C" y "K". La forma "C" contienen clorofilas modificadas y representan entre un 8 y 11% de

¹⁰ Complejo fluido compuesto por proteínas, lípidos y carbohidratos (glicolipoproteínas) que rodean al embrión en desarrollo (Dreon *et al.*, 2006).

la masa de la glándula, respectivamente. Esta asociación parece ser la única de carácter obligatorio para esta especie, ya que estos simbiosntes están presentes en todos los individuos de las poblaciones estudiadas (Vega *et al.*, 2005; Hayes *et al.*, 2015).

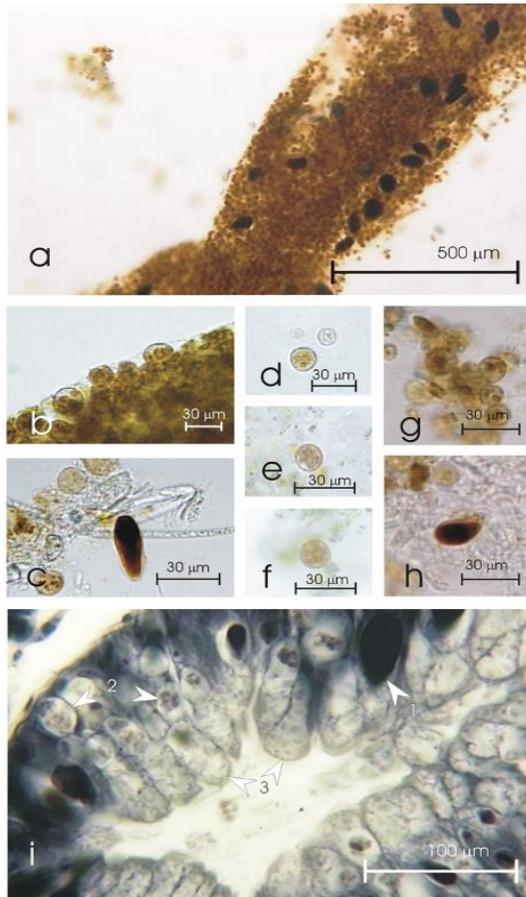


Figura 4: Micrografías sin teñir de preparados de materia fecal de especies de Ampuluridos Neotropicales que muestran los Corpúsculos K y C. Heces fecales de *P. insularum* compuesto por una matriz translúcida con abundantes corpúsculos C y los más grandes (corpúsculos K) de color más oscuros. (a); Corpúsculos C en heces de *P. canaliculata* (b); Corpúsculos K en heces de *P. canaliculata* (c); Corpúsculos C en heces de *P. insularum*, *P. scalaris* y *Asolene pulchella* (d, e y f, respectivamente); Corpúsculos C en sedimentos de acuario 13 meses luego de la eliminación de los caracoles de este (g); Corpúsculo K en el mismo sedimento (h); Corpúsculos C [1] y [K] ubicados en un alveolo de la glandula digestiva de *P. canaliculata* (i). Fuente: Castro-Vazquez *et al.*, 2002.

1.4 MOLUSCOS Y SU IMPOTANCIA COMO BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN

Un bioindicador puede ser definido como un organismo que se utiliza para evaluar el estado de salud de un ecosistema natural y es una herramienta importante para la detección de cambios en el ambiente, sus posibles efectos sobre la sociedad. Mediante la aplicación de bioindicadores puede predecirse el estado natural o el nivel de contaminación de una determinada región. Para ello, pueden ser utilizados microorganismos, plancton, plantas y diversos grupos de animales (Trishala *et al.*, 2016).

Un organismo bioindicador ideal debe cumplir con una serie de requisitos, entre los que se destacan (Gerhardt, 2002):

- a) Distribución geográfica amplia (útil para comparaciones de distintas regiones).
- b) Alta abundancia (disponibilidad de material biológico para ensayos de laboratorio).

- c) Movilidad restringida (vincular el tóxico al lugar de emisión).
- d) Posición clara y relevante en el sistema trófico.
- e) Conocimiento sobre su biología.
- f) Sensible a contaminantes específicos.
- g) Fácil muestreo, clasificación taxonómica y almacenamiento.
- h) Fácilmente cultivable (experimentación en condiciones controladas de laboratorio).
- i) Relevancia para las decisiones políticas o de gestión

El biomonitoreo tiene la ventaja de retener una memoria de las emisiones de contaminantes, superando así la dificultad de detectar sustancias que se emiten irregularmente y se diluyen rápidamente en grandes volúmenes de agua como lagos y arroyos (Vega *et al.*, 2012).

Los ambientes acuáticos representan más de dos tercios de la Tierra y el 90% de las especies animales que allí habitan son invertebrados. Los invertebrados acuáticos tienen un papel importante en las cadenas tróficas de estos ambientes, ya que son alimento para peces, aves y mamíferos, por lo que indirectamente estos organismos también se ven afectados por la presencia de contaminantes en el agua (Tallarico, 2016).

Tabla 6: Grupos de Animales usados o con potencial de ser usados como bioindicadores en ambientes acuáticos

Grupos	Ejemplos
Fitoplancton	Cianofitas y Clorófitas (Anabaena, Calothrix, Microcystis, Chlorella, Euglena, etc.)
Macroinvertebrados	Insectos (Díptera, Coleóptera, Ephemeroptera, Hemíptera, Odonata, Lepidóptera, Plecóptera, Trichoptera, etc.) Moluscos, Crustáceos y Poliquetos
Vertebrados	Peces (Aterínidos, Ciclidos, Ciprínidos)

Fuente: Adaptado de Lanza y Hernández, 2014.

Entre los invertebrados, los moluscos son vitales para sostener muchos ecosistemas. Este hecho, sumado a que este filo es el segundo más biodiverso, detrás sólo de los Artrópodos, hace que se los considere buenos indicadores del estado de salud de los ecosistemas en general, además de que son particularmente sensibles a los cambios en su entorno y pueden actuar como bioindicador de alerta temprana del deterioro del hábitat (Tallarico, 2016).

Los moluscos, en especial los gastrópodos, con abundantes especies distribuidas ampliamente en ambientes acuáticos, se han empleado como indicadores de contaminación para diferentes sustancias (metales, metaloides, detergentes sintéticos y pesticidas), en evaluaciones de calidad del agua y sedimentos debido a su sensibilidad a los compuestos químicos (Tallarico, 2016) y porque también pueden actuar como facilitadores de la entrada de contaminantes desde el agua y sedimentos hacia distintas cadenas alimentarias. Además, pueden acumular diferentes xenobióticos e integrar información ambiental (Juárez *et al.*, 2022). Los caracoles de agua dulce son comúnmente utilizados en estudios de toxicidad aguda y crónica de productos químicos que potencialmente podrían generar daños en otros filos animales de especies acuáticas, así como en aves y mamíferos, incluyendo al hombre (Ibrahim *et al.*, 2018).

En América latina y en ciertos países del mundo se han realizado estudios relevantes empleando Gastrópodos. Dentro de la subclase Caenogastropoda, representantes de ciertas familias han sido utilizados en evaluaciones ecotoxicológicas, como por ejemplo el género *Pomacea* (Ampullariidae) en Argentina, Bolivia, Uruguay, Brasil y Chile; el género *Bithynia* (Bithyniidae) en Canadá, Estados Unidos y Europa; *Bellamyia aeruginosa* (Viviparidae) en África y Asia. Mientras que de la subclase Heterobranchia, los géneros *Chilina* (Chilinidae), *Biomphalaria* (Planorbidae) y *Physa* (Physidae) son los más utilizados en América del Sur (Tallarico, 2016).

El uso de los bioindicadores es necesario para desarrollar sistemas de detección de contaminantes en ecosistemas, incluso en bajas concentraciones, y evaluar sus efectos ambientales y sobre poblaciones naturales. Esto puede servir para establecer normas regulatorias orientadas al cuidado del recurso hídrico, con el fin de asegurar la calidad de vida y entornos menos contaminados (Tallarico, 2016).

1.5 BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN

1.5.1 DEFINICIÓN

La Organización Mundial de la Salud define a un biomarcador como cualquier medición que refleje una interacción entre un sistema biológico y un peligro potencial que puede ser químico, físico o biológico (WHO, 1993). Desde el campo de la ecotoxicología, los biomarcadores se definen como cambios en una respuesta biológica que puede relacionarse con la exposición o los efectos tóxicos de químicos ambientales (Cazenave *et al.*, 2021). En este sentido, los biomarcadores pueden ser utilizados tanto para detectar una exposición (biomarcadores de exposición) como para determinar sus consecuencias biológicas adversas (biomarcadores de efecto). Así, la importancia de su uso radica en su habilidad para proveer un sistema de alerta temprano, a nivel de organismo, antes de que ocurran cambios a niveles de organización mayores (población, comunidad, ecosistema). Además, los biomarcadores podrían servir para evaluar cambios o mejoras en un ambiente, posterior a un proceso de remediación (Cazenave *et al.*, 2021).

1.5.2 ESTRÉS OXIDATIVO Y CAMBIOS HISTOLÓGICOS COMO BIOMARCADORES

Uno de los biomarcadores más utilizados, por ser muy sensibles tanto en animales como en plantas, es la determinación de parámetros relacionados al estrés oxidativo. Estos biomarcadores son usados principalmente por la variedad de contaminantes capaces de desbalancear prooxidantes y antioxidantes (Cazenave *et al.*, 2021), a través de distintos factores (Monserrat *et al.*, 2007; Lushchak, 2011; Kütter *et al.*, 2014; Lushchak, 2014; Monserrat, 2021). Distintos mecanismos de defensa antioxidante mantienen concentraciones de sustancias prooxidantes en niveles compatibles con la vida. Existen dos grupos de defensas; por un lado, están los antioxidantes enzimáticos, como por ejemplo la enzima Superóxido dismutasa (SOD), que reduce al radical O_2^- a H_2O_2 y H_2O . A su vez, el H_2O_2 puede ser reducido a H_2O y O_2 por acción de la Catalasa (CAT). Otras enzimas, como la Glutación-S-transferasa (GST), catalizan reacciones de detoxificación celular, conjugando metabolitos tóxicos (endógenos y exógenos) con un antioxidante no enzimático, el glutatión reducido (GSH^{11}). Por otro lado, la presencia de antioxidantes no enzimáticos, constituyen el otro grupo de defensas antioxidantes (Figura 5). Estos últimos pueden ser incorporados exógenamente por la dieta, como las vitaminas C

¹¹ Tri péptido formado por residuos de glutamato, cisteína y glicina a través de la acción catalítica de dos enzimas: glutamato cisteína ligasa (GCL) y glutatión sintetasa (Dickinson y Forman, 2002; como se citó en Monserrat, 2021).

(ascorbato) y E (α -tocoferol) y β -carotenos, o a partir de la producción endógena, como el ácido úrico, el GSH o el ácido lipoico¹² (Monserrat, 2021).

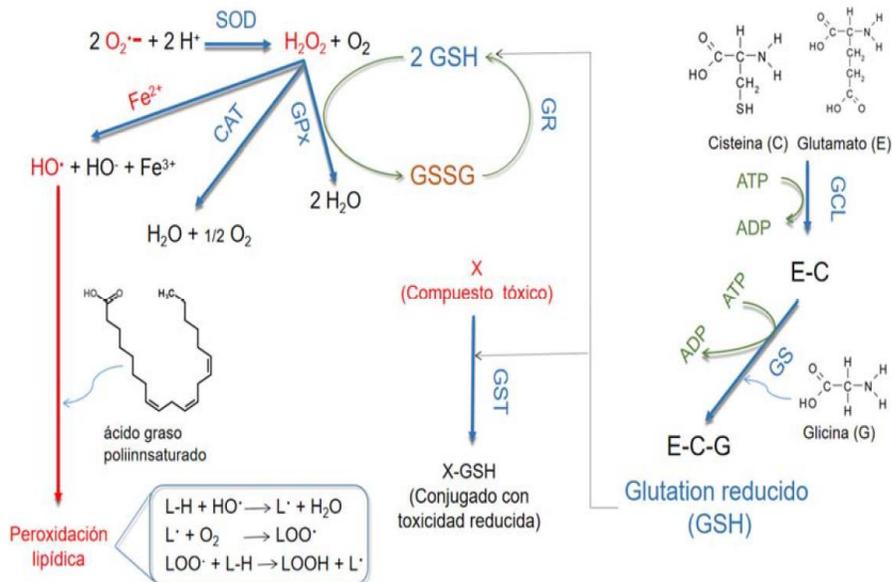


Figura 5: Ejemplo de algunas defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. Fuente: Carriquiriborde, 2021.

Como ejemplos del uso de biomarcadores de estrés oxidativo en modelos animales podemos nombrar estudios como los realizados en el erizo marino *Hemicentrotus pulcherrimus* expuesto a Bisfenol A, donde se evaluó la expresión de la enzima GST (Hwang *et al.*, 2014) como así también el efecto sobre la actividad CAT en la exposición a Deltametrina en el mejillón de agua dulce *Unio elongatus eucirrus* y la rana *Bombina variegata* (Simsek *et al.*, 2008; Radovanovic *et al.*, 2021). Por otro lado, en el caracol *Biomphalaria*¹³ *straminea*, se evaluaron efectos de exposición subcrónica a concentraciones ambientales de contaminantes como insecticidas organofosforados, carbamatos y neonicotinoides, en las actividades de SOD, CAT y GST (Cossi, 2018).

Los cambios histológicos han sido utilizados clásicamente como biomarcadores de ya que evidencian efectos subletales y crónicos de contaminantes sobre un organismo determinado. Las perturbaciones histológicas son el resultado de cambios bioquímicos y fisiológicos en un organismo y son útiles para predecir posibles consecuencias sobre otros procesos o niveles de organización biológica (crecimiento, reproducción, comportamiento, población) (Hinton y Lauren, 1990). El uso de estos biomarcadores permite el examen de diferentes órganos o tejidos, e incluso de animales enteros (huevos, larvas, adultos de especies pequeñas). Otra ventaja es que son relativamente fáciles de realizar, utilizándose métodos convencionales (fijación, procesamiento, tinción) de bajo costo. Asimismo, el avance tecnológico permite realizar análisis morfométricos cuantitativos de las alteraciones observadas, lo cual favorece el desarrollo de métodos estandarizados para la descripción y evaluación sistemática de las alteraciones (Cazenave *et al.*, 2021).

¹² Molécula conocida por ser el cofactor de enzimas del ciclo de Krebs, pero que también posee propiedades antioxidantes, principalmente por la inducción de genes importantes en la defensa antioxidante y detoxificación celular (Rochette *et al.*, 2013; como se citó en Monserrat, 2021).

¹³ *Biomphalaria* es un género de gastrópodos acuáticos de la subclase Pulmonata, que pertenece a la familia Planorbidae; *Biomphalaria straminea* es nativo de América del Sur (Cossi, P., 2018).

Como ejemplo del uso de biomarcadores histológicos en moluscos y agroquímicos podemos mencionar el realizado en *Bimphalaria alexandrina*, en el cual se evaluaron aspectos histológicos por exposición a la mezcla formulada de acetamiprid y lambdacialotrina (Ibrahim *et al.*, 2018).

1.5.3 BIOMARCADORES ANTIOXIDANTES E HISTOLÓGICOS EN *Pomacea canaliculata*.

Pomacea canaliculata ha sido objeto de diversos estudios por su potencial como especie bioindicadora. Respecto al uso de defensas antioxidantes como biomarcadoras, se han evaluado diferentes actividades enzimáticas (SOD, CAT y GST) frente a distintas sustancias como insecticidas piretroides y neonicotinoides y molusquicidas (Arrighetti *et al.*, 2018; Attademo *et al.*, 2016; Attademo *et al.*, 2018; Peña *et al.*, 2017). Respecto al uso de los cambios histológicos como biomarcadores, hay estudios que reportan daños cuali y cuantitativos, mediciones de áreas de ocupación simbiótica en glándula digestiva y daño en las branquias por exposición de animales adultos a cipermetrina y metales pesados (Arrighetti *et al.*, 2018; Campoy-Díaz *et al.*, 2018). En esta especie también se estudiaron los efectos histopatológicos en pulmón, branquia, manto, tubo del sifón, ventrículo, cavidad pericárdica, glándula digestiva y riñón, producidos por un molusquicida natural, la Pedunsaponina A (Yang *et al.*, 2018).

Finalmente, se puede resaltar que *P. canaliculata* se ha utilizado como modelo en diversos estudios relacionados a su interacción con diversos contaminantes, describiendo por ejemplo, la ruta de entrada y la dinámica de distribución de arsénico dentro del organismo y las posibles implicancias ambientales de la entrada de este contaminante a los ecosistemas (Juárez *et al.*, 2022); respuestas de bioconcentración y depuración en tejidos y corpúsculos simbióticos frente a la exposición de mercurio, arsénico y uranio (Campoy-Díaz *et al.*, 2018); estrés metabólico y efecto en tamaño de conchillas por la exposición a bifentrin e imidacloprid (Attademo *et al.*, 2018); fallas reproductivas y masculinización inducidos por exposición a compuestos organoestañosos como el tributilestaño (TBT) y trifenilestaño (TPT) (Giraud-Billoud *et al.*, 2013; Giraud Billoud *et al.* 2019); o modificaciones en supervivencia, desarrollo y crecimiento provocados por el herbicida glifosato (Xu *et al.*, 2107).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar al caracol dulceacuícola *Pomacea canaliculata* como bioindicador de contaminación ambiental por los insecticidas Clorfenapir, Deltametrina y Lambdacialotrina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar la toxicidad de los insecticidas Clorfenapir, Deltametrina y Lambdacialotrina en la especie *Pomacea canaliculata* mediante la identificación de DL50_(48h) y NOEC_{L (48h)}.
- 2- Medir las respuestas tisulares al estrés oxidativo de animales expuestos de forma aguda a la NOEC_{L (48h)} de los distintos insecticidas y compararlas entre sí.
- 3- Determinar alteraciones histopatológicas producidas por la exposición aguda (NOEC_{L (48h)}) a los insecticidas en estudio y compararlas entre sí.

3. HIPÓTESIS

Pomacea canaliculata es un organismo que puede ser utilizado como bioindicador, dado que la exposición aguda a los insecticidas Clorfenapir, Deltametrina y Lambdacialotrina produce alteraciones histopatológicas y respuestas antioxidantes enzimáticas, que pueden ser usadas como biomarcadores de contaminación ambiental.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizaron individuos de *Pomacea canaliculata* adultos (4-5 meses de edad) de ambos sexos, de una cepa de cultivo criados bajo condiciones controladas de laboratorio. El origen de esta línea de cultivo proviene de una población del lago Rosedal (Palermo, Buenos Aires, Argentina). Los animales son mantenidos a temperatura regulada 24-26°C, humedad del 80 % y fotoperíodo de 14/10 hs de luz-oscuridad, que simula las condiciones naturales en las que vive. Los animales se mantienen en acuarios de plástico (figura 6), con un volumen de 3 litros de agua, que se cambia tres veces por semana. La alimentación consta de una dieta a base de lechuga (*Lactuca sativa*) fresca y pellets de alimento para peces (Peishe®).



Figura 6: Sala de cultivo de *P. canaliculata*. Fuente: imágenes propias obtenidas durante el desarrollo del trabajo.

4.2 INSECTICIDAS

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes insecticidas, que serán descriptos en detalle a continuación en base a los marbetes de cada producto:

- DECIS ® FORTE. Principio activo: Deltametrina
- ONFIRE ®. Principio activo: Clorfenapir
- RAFTER ®. Principio activo: Lambdacialotrina

4.2.1 DECIS ® FORTE (Deltametrina)

4.2.1.1 DESCRIPCIÓN

Es un insecticida formulado a base de un piretroide de amplio espectro. Actúa por contacto e ingestión y posee un efectivo poder de volteo. Su acción repelente ayuda a evitar las

reinfestaciones. Es estable a la luz y no se lava con el agua de lluvia ni de riego, características que le confieren un adecuado poder residual.

4.2.1.2. IDENTIFICACIÓN

Nombre común: Deltametrina

Nombre comercial: DECIS FORTE 10 EC. Fabricado por Bayer S.A.

Tipo de formulación: Concentrado Emulsionante (EC)

Nombre y forma química: isómero d-cis de α -ciano-3-fenoxibencil-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil ciclopropano carboxilato.

Concentración: 10% (principio activo 10g; solvente, estabilizante y emulsionante c.s.p 100ml).

Estructura molecular:

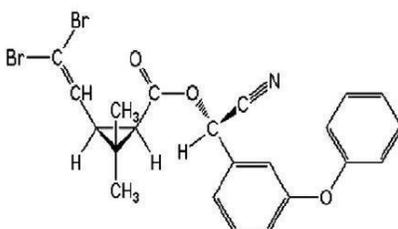


Figura 7: Estructura molecular de Deltametrina. Fuente: Extraído de Fayez A. Bakry et al, 2011.

Fórmula química: C₂₂H₁₉Br₂NO₃ (Fayez A. Bakry et al, 2011)

4.2.1.3 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Aspecto físico: líquido

Color: Amarillo claro a marrón

Olor: aromático

pH: 4.5 – 7.0 a 1% (23°C)

Punto de inflamación: 40°C

Densidad: 0.95 g/ml a 20°C

Solubilidad en agua: Miscible

4.2.2.4 CLASIFICACIÓN

Según grupo químico al que pertenece (Miglioranza, 2021): Piretroide.

Según toxicidad (OMS, 2019): Clase II, Moderadamente peligroso.

Según modo de acción (IRAC¹⁴, 2021): Grupo 3A, Piretroides cuyo sitio de acción primaria son los moduladores de canales de sodio.

4.2.2. ONFIRE® (Clorfenapir)

4.2.2.1 DESCRIPCIÓN

Es un acaricida-insecticida que actúa por ingestión y contacto. Derivado pirrólico que desacopla la fosforilación oxidativa produciendo muerte celular (Valdivia y Benites, 2014).

¹⁴ IRAC: Comité de Acción de Resistencia a Insecticidas.

4.2.2.2 IDENTIFICACIÓN

Nombre común: Clorfenapir

Nombre comercial: ONFIRE. Fabricado por Farm Chemicals Argentina S.R.L.

Tipo de formulación: Suspensión concentrada (SC)

Nombre y forma química: 4-bromo-2-(4-clorofenil)-1-(etoximetil)-5-(trifluorometil)-1H-pirrol-3-carbonitril.

Concentración: 24 % (principio activo 24g; inertes y coadyudantes c.s.p. 100ml).

Estructura química:



Figura 8: Estructura molecular de Clorfenapir. Fuente: Extraído de Valdivia-Infantas M. y Rodríguez-Benites, A., 2014.

Fórmula química: $C_{15}H_{11}BrClF_3N_2O$ (UNA¹⁵, 2022)

4.2.2.3 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Aspecto físico: líquido

Color: Beige

Olor: Característico

pH: 6.72

Punto de inflamación: >90.7°C

Densidad: 1.0929 mg/ml

Solubilidad en agua: Dispersable

4.2.3.4 CLASIFICACIÓN

Según grupo químico al que pertenece (CASAFE, 2021): Pirrol.

Según toxicidad (OMS, 2019): Clase II, Moderadamente peligroso.

Según modo de acción (IRAC, 2021): Grupo 13, pirroles cuyo sitio primario de acción son los desacopladores de fosforilación oxidativa vía disrupción del gradiente de protones.

4.2.3. RAFTER® (Lambdacialotrina)

4.2.3.1. DESCRIPCIÓN

Es un insecticida piretroide que actúa por contacto, ingestión y repelencia para el control de larvas y adultos de insectos masticadores, picadores y chupadores, afectando además la oviposición de ellos. Posee un largo efecto residual y amplio espectro de acción. Tiene un rápido

¹⁵ UNA: Universidad Nacional de Costa Rica.

efecto de volteo y después de la aplicación los insectos se alejan del sector y dejan de alimentarse.

4.2.3.2 IDENTIFICACIÓN

Nombre común: Lambdialotrina

Nombre comercial: RAFTER. Fabricado por Chemotecnica

Tipo de formulación: Concentrado Emulsionante (CE)

Nombre y forma química: mezcla de isómeros (ZR cis S y ZS cis R) del α -ciano-3-fenoxibencil-cis-3-(Z-2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetil ciclopropano carboxilato

Concentración: 5 % (principio activo 5g; solventes y emulsionantes 100ml)

Estructura química:

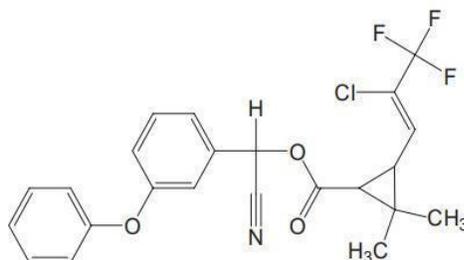


Figura 9: Estructura molecular de Lambdialotrina. Fuente: Extraído de Cifuentes *et al*, 2015)

Fórmula química: $C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$ (Cifuentes *et al*, 2015)

4.2.3.3. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Aspecto físico: Líquido.

Color: Blanco a beige.

Olor: Dulce

pH: No disponible

Punto de inflamación: No disponible

Densidad: No disponible

Solubilidad en agua: Soluble

4.2.3.4. CLASIFICACIÓN

Según grupo químico al que pertenece (Miglioranza, 2021): Piretroide

Según toxicidad (OMS, 2019): Clase II, Moderadamente peligroso.

Según modo de acción (IRAC, 2021): Grupo 3A, Piretroides cuyo sitio de acción primaria son los moduladores de canales de sodio.

5. METODOLOGÍA

5.1. DETERMINACIÓN DE $DL50_{(48h)}$ Y $NOEC_{L(48h)}$

Se utilizaron ejemplares adultos de ambos sexos, los cuales se colocaron en acuarios en grupos de 6 individuos (3 parejas) con un volumen de 3L de agua para someterlos a exposición aguda por 48 horas de manera replicada para cada concentración de insecticida evaluada (Figura 10). Los insecticidas se disolvieron en el agua de los acuarios y posteriormente se introdujeron los

animales. Durante el ensayo los animales fueron alimentados únicamente con lechuga fresca, lo cual sirvió para evidenciar cambios comportamentales.



Figura 10: Ejemplares de *P.canaliculata* alimentándose de lechuga durante el ensayo. Fuente: imágenes propias obtenidas durante el desarrollo del trabajo.

Las dosis o concentraciones aplicadas ($\mu\text{l/ml}$ de agua) fueron: para Deltametrina 17.50, 8.75, 4.38, 3.50, 2.63, 2.28, 1.75, 1.23, 0.88, 0.44 y 0.04; para Lambdacialotrina 6.25, 4.17, 2.08, 1.25, 1.08, 0.83, 0.75, 0.58, 0.50, 0.42, 0.33 y 0.17 y para Clorfenapir 6.00, 5.20, 4.00, 2.80, 2.40, 2.00, 0.60, 0.20, 0.16, 0.08, 0.04 y 0.008. La exposición a cada concentración se realizó por 48 horas y al finalizar se contabilizó y registró la cantidad de individuos fallecidos sobre el total expuesto para calcular el porcentaje de mortalidad. La cantidad de animales utilizados varió en función de los ensayos realizados y las concentraciones probadas. En total se usaron 66 animales para deltametrina y 72 para lambdacialotrina y clorfenapir.

Con estos datos se construyeron curvas de Dosis-Respuesta o curvas de Toxicidad, que vinculan las concentraciones de exposición con el porcentaje de mortalidad. El objetivo del análisis e interpretación de esta curva fue estimar la $DL_{50(48h)}$, entendida como la dosis requerida para alcanzar el 50% de mortalidad (Carrquiriborde, 2021), y la $NOEC_{L(48h)}$, dosis máxima a la cual no se observaron efectos sobre la letalidad en 48 horas (Carrquiriborde, 2021). Estos valores de $NOEC_{L(48h)}$ determinados para cada agroquímico, son los que se utilizaron para la exposición en la evaluación de los biomarcadores estudiados en este trabajo, cuyos resultados se presentan en el correspondiente apartado.

5.2. CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS

Para evaluar la ocupación de los acinos glandulares de la glándula digestiva de *Pomacea canaliculata* (Campoy-Díaz *et al.*, 2018; Dellagnola *et al.*, 2019) por los endosimbiontes que allí se alojan, se conformaron 4 grupos de estudio. Un grupo control y 3 grupos expuestos a los distintos insecticidas estudiados a dosis $NOEC_{L(48h)}$ (0.20 $\mu\text{g/ml}$ para Clorfenapir, 0.88 $\mu\text{g/ml}$ para Deltametrina y 0.42 $\mu\text{g/ml}$ para Lambdacialotrina). Dos parejas de animales adultos ($N=4$) se colocaron en acuarios con el insecticida disuelto en el agua y tras 48 horas de exposición se los sacrificó. Posteriormente, luego de la separación del animal de su conchilla, se extrajo una porción de glándula digestiva de la parte media de la misma y posteriormente se disecó. Una muestra de este tejido se fijó en formaldehído (4%) durante 24 h, luego se deshidrató en concentraciones crecientes de etanol a tiempos variables, para pasar por xileno y finalmente ser

incluida en Histoplast® (parafina modificada en pellets)¹⁶ durante 2 horas a 60°C. Para este proceso se utilizaron envases de vidrio adecuados para el procesamiento de la muestra.



Figura 11: Envases de vidrio con muestras de glándula digestiva en proceso de deshidratación. Fuente: imágenes propias obtenidas durante el desarrollo del trabajo.

Una vez transcurridas las 2h de inclusión se retiraron las muestras del envase de vidrio y se las colocó en moldes de papel de forma cúbica de un volumen 1 cm³, el cual se llenó de nuevo con histoplast y se dejó enfriar para el armado de tacos.

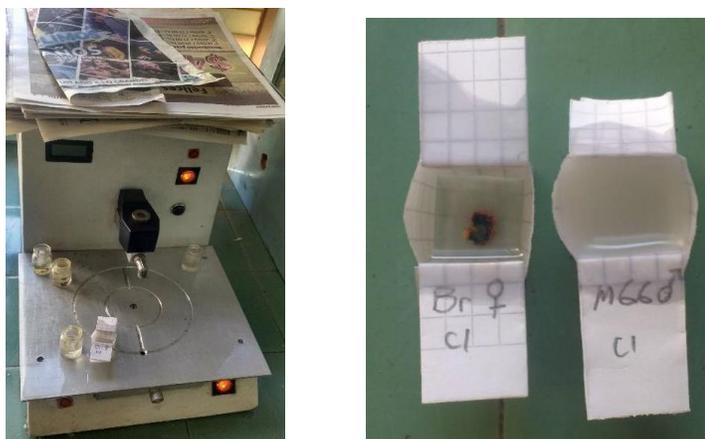


Figura 12: Equipo de parafina y moldes con los tejidos incluidos en Histoplast.

Luego de que se enfrió la parafina, el taco se sacó del molde y se pegó a un bloque de madera para poder ser colocado en el equipo donde se realizaron los cortes histológicos (micrótopo). Para la realización de los cortes, se tallaron los bloques de parafina en forma de pirámide truncada. Al frente de corte se le dio forma de trapecio isósceles, con la base mayor hacia abajo. Se montó el taco en un micrótopo Microm® HM 325 (figura 13) y se realizaron cortes de 7µm de espesor. Las tiras de cortes se colocaron en baño termostático a 45-50°C, se montaron en un portaobjetos y se llevaron a estufa a 60°C durante 8 min para favorecer la adhesión del corte al vidrio.

Los portaobjetos se montaron con medio de montaje sin coloración y cubreobjetos. Una vez que se secaron, fueron observados en un microscopio óptico Olympus®, donde se tomaron las

¹⁶ Histoplast® sintético es un medio de imbibición, impregnación e inclusión para muestras de tejido humano o animal, que requieren dicho proceso para la realización de cortes histológicos para microscopía.

micrografías (figura 13). Por cada muestra de tejido se sacaron 10 fotos para el análisis morfométrico mediante el software Image ProPlus®. Lo que se midió fue la superficie de ocupación de simbiontes por superficie acinar total y se calculó el porcentaje de ocupación simbiótica total, de corpúsculos “C” y de corpúsculos “K”, haciendo uso de las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} 1: OT &= [(ACC + ACK) / AA] * 100 \\ 2: OCK &= (ACK / AA) * 100 \\ 3: OCC &= (ACC / AA) * 100 \end{aligned}$$

Donde:

OT = porcentaje de ocupación simbiótica total

ACC = área ocupada por corpúsculos “C”

ACK = área ocupada por corpúsculos “K”

AA = área acinar¹⁷

OCK = porcentaje de ocupación por corp. “K”

OCC = porcentaje de ocupación por corp. “C”



Figura 13: Micrótomo MICROM y equipo para la digitalización de imágenes de microscopía óptica de la glándula digestiva de *P. canaliculata* de los cuatro grupos experimentales.

5.3 DETERMINACIÓN DE ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Para estos ensayos se separaron nuevamente 4 grupos experimentales, constituidos por 6 individuos (3 parejas) cada uno, 1 grupo control y 3 tratamientos. El grupo control no fue expuesto mientras que los tratamientos consistieron en la exposición a las dosis NOEC_{L (48h)} de cada insecticida (0.20 µg/ml para Clorfenapir, 0.88 µg/ml para Deltametrina y 0.42 µg/ml para Lambdacialotrina).

Luego de las 48h de exposición, se tomaron los caracoles de los acuarios, se registró el peso mediante balanza analítica y se realizó la separación del animal de su conchilla para luego

¹⁷ Se excluyó la luz acinar del análisis de manera que el área evaluada corresponda solo al tejido acinar.

extraer una muestra de tejido de glándula digestiva. Alrededor de 100 mg de tejido fueron disecados e inmediatamente colocados en 1 mL de buffer (Tris base 20 mM, EDTA 1 mM, ditioneitol 1 mM, sacarosa 0.5 M, KCl 0.15 M y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.1 mM; pH 7.6) con inhibidores de proteasas 1x (Halt™ Protease Inhibitor, Cocktail 100X). Luego de esto, las muestras fueron homogeneizadas en un homogeneizador ULTRATURRAX (figura 14) y posteriormente centrifugadas a 13000 g durante 5 minutos y los sobrenadantes (3 alícuotas) fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.



Figura 14: Homogeneizador Ultraturrax utilizado. Fuente: imágenes propias obtenidas durante el desarrollo del trabajo.

Las mediciones de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GST se realizaron mediante determinaciones colorimétricas con técnicas bioquímicas espectrofotométricas. Para estos ensayos se utilizaron protocolos específicos (detallados a continuación) y un Espectrofotómetro Helios® Gama&Delta de UNICAM (figura 15), para registrar absorbancias a diferentes longitudes de onda.



Figura 15: Espectrofotómetro utilizado para medir la absorbancia. Se observa gradilla con eppendorfs. Fuente: imágenes propias obtenidas durante la realización del trabajo.

5.3.1 PROTOCOLO DE MEDICIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se estimó según el método de Lowry *et al.* (1951) usando 50 μl de muestra. Se utilizó como estándar una solución de albúmina sérica bovina de concentración conocida (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), solución "A" (Na_2CO_3 2% y NaOH 0.1N), solución "B1" ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% P/P), solución "B2" (tartrato de Na y K), solución "C" (100 partes A + 1 parte de B, se prepara en el momento del ensayo) y reactivo de Folin (H_2O 1:3 v/v, se prepara en el momento del ensayo). El procedimiento consistió en la utilización del homogenato para cada determinación.

En 7 eppendorfs de 1.5ml (por duplicado), se agregó estándar de albúmina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), mezcla de muestra (μl) /agua destilada (μl) en las siguientes proporciones: 0/100, 5/95, 10/90, 20/80, 40/60, 60/40 y 80/20, para la construcción de una gráfica de estandarización. Luego se agregaron 1000 μl de solución C, se agitó y dejó reposar 10 min. Pasado este tiempo se agregaron 100 μl de reactivo de Folin, se agitó y se esperó 30 min. Luego se registró la absorbancia una longitud de onda (λ) de 690nm. La cuantificación en μg de proteína se realizó mediante el uso directo de la función de la gráfica.

5.3.2 PROTOCOLO PARA MEDIR ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La actividad de la enzima SOD se midió siguiendo el protocolo descrito por Misra y Fridovich (1972), utilizando buffer glicina 50 mM con un pH 10.2 y adrenalina 60 mM. Se registró la absorbancia dos veces a $\lambda = 480$ nm, al tiempo cero y a los 60 segundos. Se definió una unidad de actividad SOD como la cantidad de muestra que inhibe el 50% de reducción de adrenalina a adrenocromo.

Los materiales usados fueron buffer glicina 50 mM de pH= 10 (750 mg de glicina + 200 ml de H_2O), adrenalina 60 mM (11 mg de adrenalina + 7 μl de HCl puro + 1 ml de H_2O destilada, preparados en el momento).

En una cubeta de cuarzo se colocaron 950 μl de buffer y 6-8 μl de adrenalina, luego se realizó el autozero y se esperó aproximadamente 1 min hasta alcanzar una absorbancia de 0.030. Cuando se obtuvo esta medición se agregó un volumen de muestra necesario para alcanzar un volumen final de 1 ml. Se probaron dos volúmenes que estén por debajo y por arriba del 50% de inhibición de la enzima. En esta técnica se buscó el volumen de muestra que posee la cantidad de enzima que provoca el 50% de inhibición.

Para las muestras de glándula digestiva se modificó el protocolo según se detalla a continuación: Se realizó una dilución 1/4 con buffer de homogeneización. A 50 μl de esta dilución se le agregó 30 μl de cloroformo y 60 μl de etanol. En un tubo de 0.5 ml se centrifugó a 2500G durante 10 min. De la fase acuosa (superficie del tubo) se extrajeron los volúmenes de 3 y 5 μl para realizar la determinación.

Para cuantificar la actividad de SOD se determinó la absorbancia del blanco (sin muestra) a los 60 segundos y se obtuvo Δabs del blanco. Además, se realizó el mismo procedimiento para las muestras, con dos volúmenes para cada una (que estén por debajo y por arriba del 50% de inhibición de la enzima), y se obtuvo Δabs de muestra.

Se calcula Muestra/Blanco para cada volumen de muestra y se grafica el log (M/B) en función de los volúmenes de muestra. A ese gráfico se le ajusta una recta de regresión y de ella se obtiene el valor x (volumen) para una inhibición del 50% y = log 0,5 que equivale a la cantidad de

microlitros que inhiben el 50% de actividad de la enzima. La actividad específica de esta enzima se obtuvo empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Act. esp} = 1000 / (v * \text{proteínas})$$

Donde:

v = volumen de muestra que inhibe el 50% de formación de adrenocromo expresado en microlitros

Proteínas = concentración de proteínas expresada en mg/ml

Actividad específica = U/mg proteína

Los resultados se expresaron en Unidades (U) de SOD por miligramo de proteína, donde cada unidad corresponde a la cantidad de μl de muestra que inhiben el 50 % de formación de adrenocromo.

5.3.3 PROTOCOLO PARA MEDICIÓN DE ACTIVIDAD CATALASA (CAT)

La actividad de la enzima CAT se determinó a través del método descrito por Beutler (1982), midiendo la disminución de la absorbancia del H_2O_2 a $\lambda = 240 \text{ nm}$ cada 10 segundos durante 1 minuto en espectrofotómetro, a una temperatura constante de 30°C .

Los materiales empleados fueron: KPi 50mM (pH 7) y H_2O_2 mM que se prepara en el momento. Para ello se emplean 333.3 μl de H_2O_2 puro más 666.6 μl de H_2O (titular a $\lambda = 240$; $\text{abs} = 0,5 - 0,6$, $\epsilon = 40\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

En una cubeta de cuarzo se agregó 950 μl de KPi, 30 μl de H_2O_2 y 20 μl de muestra (volumen final de 1000 μl o 1 ml). Se midieron 12 ciclos cada 10 segundos a una longitud de onda de 240 nm y temperatura ambiente. Además, se hizo un blanco sin muestra. Los resultados se obtuvieron mediante la fórmula de Lambert-Beer:

$$\text{Act. esp} = (\Delta \text{ abs min}^{-1} * \text{dilución}) / (\epsilon * v * \text{proteínas})$$

Donde:

$\Delta \text{abs} = (\text{abs}_{15\text{s}} - \text{abs}_{90\text{s}}) * 60$ (pendiente del logaritmo natural de absorbancia)

ϵ (coeficiente de extinción molar de la molécula de H_2O_2) = $0.04 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

v = volumen de muestra expresado en ml

proteínas: concentración de proteínas expresada en mg/ml

Actividad específica = U/mg proteína

Los resultados se expresaron en Unidades (U) de CAT por miligramo de proteína, donde cada unidad corresponde a la cantidad de enzima que degrada 1 μM de H_2O_2 en un minuto. Cada muestra se leyó por duplicado y la actividad final se calculó como el promedio de ambas lecturas.

5.3.4 PROTOCOLO PARA MEDIR ACTIVIDAD GLUTATIÓN TRANFERASA (GST)

La actividad de GST se midió de acuerdo con Habig *et al.* (1974) usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CNDB) como sustrato que, en presencia de GSH y la enzima, forma el complejo GS-dinitrobenzeno (GS-DNB), cuya absorbancia se lee a $\lambda = 340 \text{ nm}$. El ensayo se llevó a cabo

a temperatura constante (25° C) en buffer fosfato de potasio 0,1 M pH 7, CNDB 50 mM y glutatión reducido 100 mM.

Los materiales usados fueron Buffer de homogeneización de enzimas 50mM, GSH (se prepara en el momento) en el buffer de medida 61mg/2ml (0,05mM) y CDNB (se prepara en el momento) en metanol 20mg/2ml

En una cubeta de cuarzo se colocaron 930 µl de buffer, 10 µl de GSH y 50 µl de muestra. Se realizó un autozero y se agregó 20 µl de CDNB, Se registró el aumento de absorbancia cada 30 s durante 3 min a 30° C. La actividad específica de esta enzima se obtuvo empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Act. esp} = (\Delta \text{ abs min}^{-1} * \text{dilución}) / (\epsilon * v * \text{proteínas})$$

Donde:

$$\Delta \text{ abs} = (\text{abs}_{120 \text{ seg.}} - \text{abs}_{30 \text{ seg.}}) * 60$$

$$\epsilon \text{ (coeficiente de extinción)} = 9,6 \text{ nM}^{-1} * \text{cm}^{-1}$$

v = volumen de muestra expresado en mililitros

Proteínas = concentración de proteínas expresada en mg/ml

Unidades = mM/cm/mg proteína

$$\underline{\text{Actividad específica} = \text{mU/mg proteína}}$$

Los resultados se expresaron en miliunidades internacionales (mU) de GST por miligramo de proteína, donde cada unidad corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de GS-DNB en un minuto.

Cada muestra se leyó por duplicado y la actividad final de la misma se calculó como el promedio de ambas lecturas.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar las curvas de toxicidad y DL50, se realizó una Regresión y Ajuste no lineal con un modelo sigmoideal.

La comparación de los distintos biomarcadores (actividad de SOD, CAT y GST – ocupación glandular simbiótica) cuantificados entre los grupos experimentales se realizó evaluando primero la distribución normal de las muestras con la prueba de Shapiro Wilk y la homocedasticidad con el test de Bartlett. En base a los resultados obtenidos se realizó la comparación entre medias utilizando pruebas paramétricas, ANOVA de una vía y una prueba de Tukey como post-test para comparar actividad enzimática y post-test de Dunnett para ocupación glandular. El valor de significancia fue de p< 0.05.

Para todos los cálculos estadísticos detallados y análisis de resultados se utilizó el paquete estadístico Prism 8 (Graphpad®).

6. RESULTADOS

6.1 EVALUACIÓN DE TOXICIDAD DE CLORFENAPIR, DELTAMETRINA Y LAMBDAIALOTRINA EN *Pomacea canaliculata*.

En la tabla 7 se presentan las NOEC_{L(48h)} de los insecticidas usados en este trabajo y en la figura 16 se muestra la DL50_(48h), calculadas a partir de las Curvas de Toxicidad.

Los valores de $NOEC_{L(48h)}$ para cada caso fueron: 0.20 $\mu\text{g/ml}$ para Clorfenapir, 0.88 $\mu\text{g/ml}$ para Deltametrina y 0.42 $\mu\text{g/ml}$ para Lambdacialotrina.

Tabla 7: Porcentajes de mortalidad en función de la concentración de cada insecticida. En negrita y resaltado, se destacan las $NOEC_{L(48h)}$ detectadas para cada insecticida.

Clorfenapir		Deltametrina		Lambdacialotrina	
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Mortalidad (%)	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Mortalidad (%)	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Mortalidad (%)
6.000	100	17.50	100	6.25	100
5.200	67	8.75	100	4.17	100
4.000	67	4.38	100	2.08	100
2.800	67	3.50	100	1.25	100
2.400	50	2.63	83	1.08	83
2.000	29	2.28	83	0.83	17
0.600	7	1.75	50	0.75	71
0.200	0	1.23	33	0.58	36
0.160	0	0.88	0	0.50	7
0.080	0	0.44	0	0.42	0
0.040	0	0.04	0	0.33	0
0.008	0	-	-	0.17	0

Los valores de $DL50_{(48h)}$ observados fueron de 0.65 $\mu\text{g/ml}$ para Lambdacialotrina (Figura 16, a), de 1.63 $\mu\text{g/ml}$ para Deltametrina (Figura 16, b) y finalmente de 2.96 $\mu\text{g/ml}$ para Clorfenapir (Figura 16, c).

Las gráficas y valores de $DL50_{L(48h)}$ indican que el insecticida Lambdacialotrina es el que presenta mayor toxicidad, ya que presenta la dosis letal más baja de los tres insecticidas estudiados).

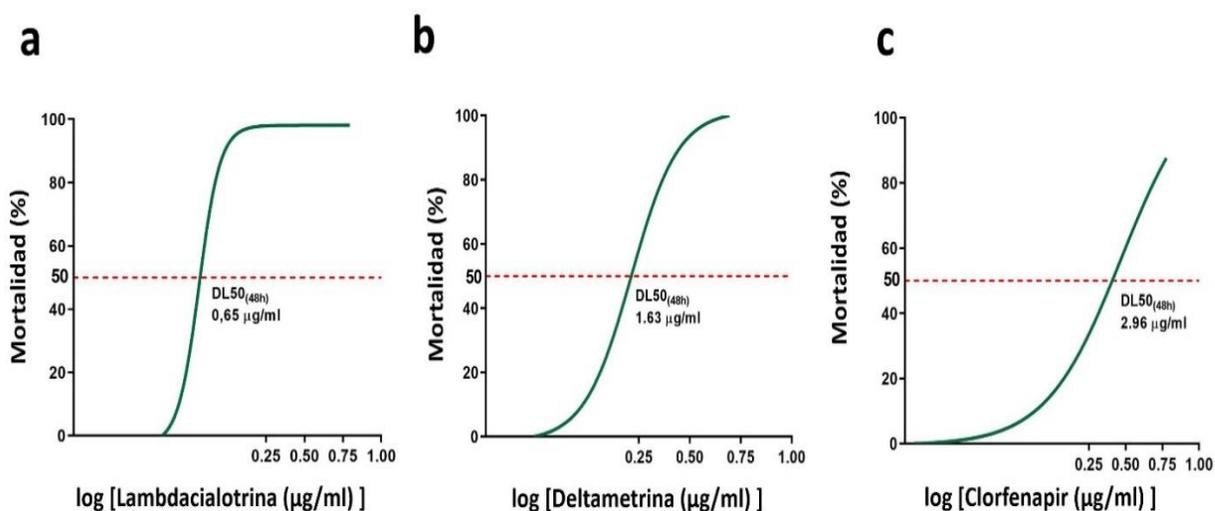


Figura 16: Curvas de Toxicidad para Lambdacialotrina (a), Deltametrina (b) y Clorfenapir (c) en *P. canaliculata*; se observan las $DL50_{(48h)}$ respectivas, luego de 48 horas de exposición a cada insecticida.

6.2 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS

En la figura 17 se observa el efecto de la exposición aguda de los insecticidas sobre la ocupación simbiótica en la glándula digestiva de *Pomacea canaliculata*.

En a y b se muestran dos micrografías de cortes transversales sin tinción de acinos de la glándula digestiva, las cuales ejemplifican las más de 200 micrografías que se utilizaron para realizar la cuantificación de ocupación glandular de los grupos estudiados. Mientras que, en c, d y e se presentan gráficas de barra donde se observan los resultados obtenidos de cuantificación morfométrica.

La imagen 17a muestra un acino del grupo control, donde se observan ambos tipos de corpúsculos, diferenciados visualmente por tamaño, forma y coloración. Los corpúsculos “C” se observan de menor tamaño, forma circular y coloración verde-amarillenta, mientras que los corpúsculos “K” son de mayor tamaño, forma de ovalo a veces deformada y coloración marrón oscura.

En 17b se observa a modo de ejemplo una micrografía de un caso del grupo tratado con Deltametrina como ejemplo, ya que este insecticida induce modificaciones significativas en la ocupación simbiótica acinar. En el acino se ven claramente las diferencias de ocupación respecto al grupo control, que fueron debidamente cuantificadas para tener el dato objetivo, y donde se evidencia la poca presencia de corpúsculos “C”, que se presentan muy dispersos entre sí, mientras que los corpúsculos “K” se presentan también en bajo número.

En 17c se grafica la cuantificación de ocupación de corpúsculos “C” por área acinar. Las áreas de ocupación expresadas en porcentaje fueron de (4.29 ± 1.04) para el grupo Control, 2.15 ± 0.16 para Lambdacialotrina, 1.48 ± 0.25 para Deltametrina y 1.95 ± 0.15 para Clorfenapir. Los animales expuestos a los tres insecticidas presentan un descenso cercano al 50% en el porcentaje de ocupación, pero solamente los animales expuestos a deltametrina presentan una diferencia significativa respecto a los animales no expuestos del grupo control (ANOVA, post test Tukey, $p < 0.05$),

En 17d se grafica la ocupación de corpúsculos “K” por área acinar. Los porcentajes fueron de (15.56 ± 1.78) para el grupo Control, 11.67 ± 1.76 para Lambdacialotrina, 9.83 ± 2.32 para Deltametrina y 17.50 ± 1.02 para Clorfenapir. Si bien los animales expuestos a Lambdacialotrina y Deltametrina presentan una tendencia a la disminución de la ocupación (30.9%) respecto al grupo control, esta caída no fue significativa. Por su parte, los animales expuestos a Clorfenapir presentan un aumento de ocupación (12.5 %) respecto al grupo control, pero este tampoco resultó significativo.

En 17e se presenta la ocupación de corpúsculos total (corpúsculos “K” + “C”) por área acinar. Los resultados fueron de 19.85 ± 2.599 para el grupo Control, 13.82 ± 1.69 para Lambdacialotrina, 11.31 ± 2.33 para Deltametrina y 19.45 ± 1.17 para Clorfenapir. Aunque los animales expuestos a los tres insecticidas presentaron un descenso en la ocupación total de corpúsculos, esta caída fue significativa sólo para el grupo expuesto a Deltametrina (ANOVA, post test Tukey, $p < 0.05$), donde se registró una diferencia cercana al 43 %; este hecho observado en la micrografía presentada en b, donde es notable este descenso de ocupación. En las tablas S1, S2 y S3 del Anexo, están ejemplificados los datos utilizados para medir estos parámetros.

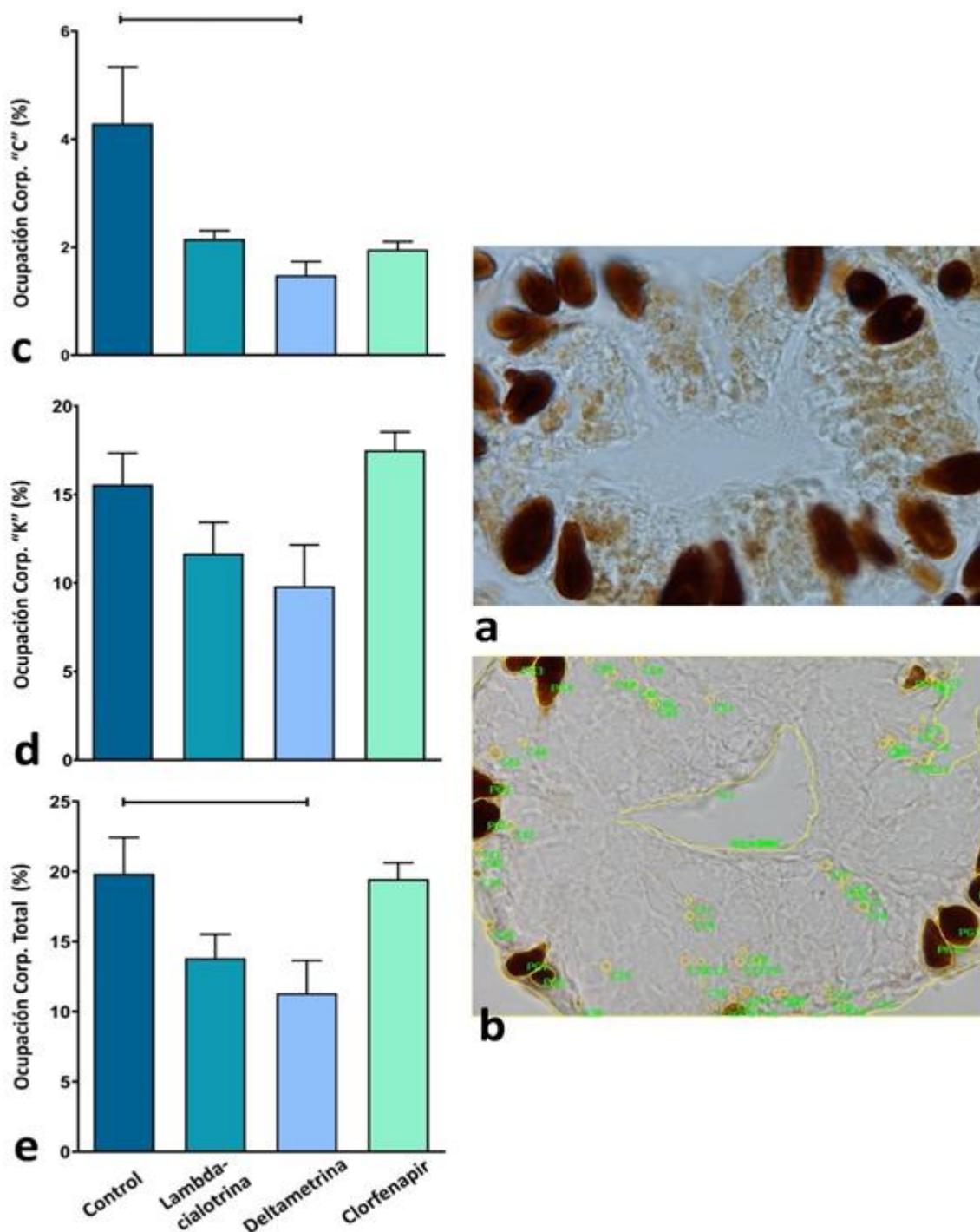


Figura 17 Efecto de la exposición a la NOEC $L_{(48h)}$ de los insecticidas en la ocupación simbiótica de la glándula digestiva de *P. canaliculata*. Micrografías utilizadas para análisis morfológico (área de ocupación de simbioses / área acinar): Acino glandular del grupo control (a); Acino glandular del grupo tratado con Deltametrina (b); se observan las líneas de análisis que delimitan las distintas áreas evaluadas. Ocupación de corpúsculos C (c); Ocupación de corpúsculos K (d); Ocupación de corpúsculos totales (e). Se presenta la Media y Error estándar de la media. **Las barras en la parte superior de cada gráfico indican entre qué grupos existen diferencias significativas (ANOVA, post Tukey test, $p < 0.05$).**

6.3 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO (CAT, SOD y GST)

En la figura 18 se observa el efecto de la exposición aguda de los insecticidas sobre las defensas antioxidantes enzimáticas de *P. canaliculata*, es decir, las actividades enzimáticas de Catalasa, Superóxido dismutasa y Glutación -S- transferasa, expresadas como U/mg proteína o bien mU/mg proteína.

En 18a se observa la actividad de la enzima Catalasa (CAT). Los resultados fueron de 129.23 ± 19.87 U/mg para el grupo Control, 94.50 ± 12.36 U/mg para Lambdacialotrina, 53.55 ± 4.96 U/mg para Deltametrina y 75.23 ± 18.22 U/mg para Clorfenapir. Aunque todos los animales expuestos a Clorfenapir, Deltametrina y Lambdacialotrina mostraron un descenso en la actividad CAT, sólo aquellos expuestos a Deltametrina presentaron diferencias significativas respecto al grupo Control (ANOVA, post test Tukey, $p < 0.05$)

En 18b se observa la actividad de la enzima Superóxido dismutasa (SOD). Los resultados fueron de 96.18 ± 10.36 U/mg para el grupo Control, 55.17 ± 8.39 U/mg para Lambdacialotrina, 129.16 ± 29.75 U/mg para Deltametrina y 60.92 ± 9.23 U/mg para Clorfenapir. En los animales expuestos a Lambdacialotrina y Clorfenapir, se produjo una caída en la actividad SOD comparadas con el grupo Control, pero para ninguno de los casos resultó significativa. Respecto a los animales expuestos a Deltametrina, los mismos mostraron actividades SOD superiores al grupo Control, aunque este aumento tampoco resultó ser significativo. Pero, las actividades SOD de los animales expuestos a Lambdacialotrina y Clorfenapir, si mostraron diferencias significativas respecto a aquellos animales expuestos a Deltametrina (ANOVA, post test Tukey, $p < 0.05$).

En 18c se observa la actividad de la enzima Glutación -S- transferasa (GST). Los resultados fueron de $(830.10 \pm 98.05$ mU/mg) para el grupo Control, 428.63 ± 127.10 mU/mg para Lambdacialotrina, 514.29 ± 73.41 mU/mg para Deltametrina y 626.55 ± 46.62 mU/mg para Clorfenapir. Aquí se produjo una caída en los animales expuestos a los tres insecticidas, pero esta disminución fue significativa sólo entre el grupo expuesto a Lambdacialotrina y el grupo Control (ANOVA, post test Tukey, $p < 0.05$).

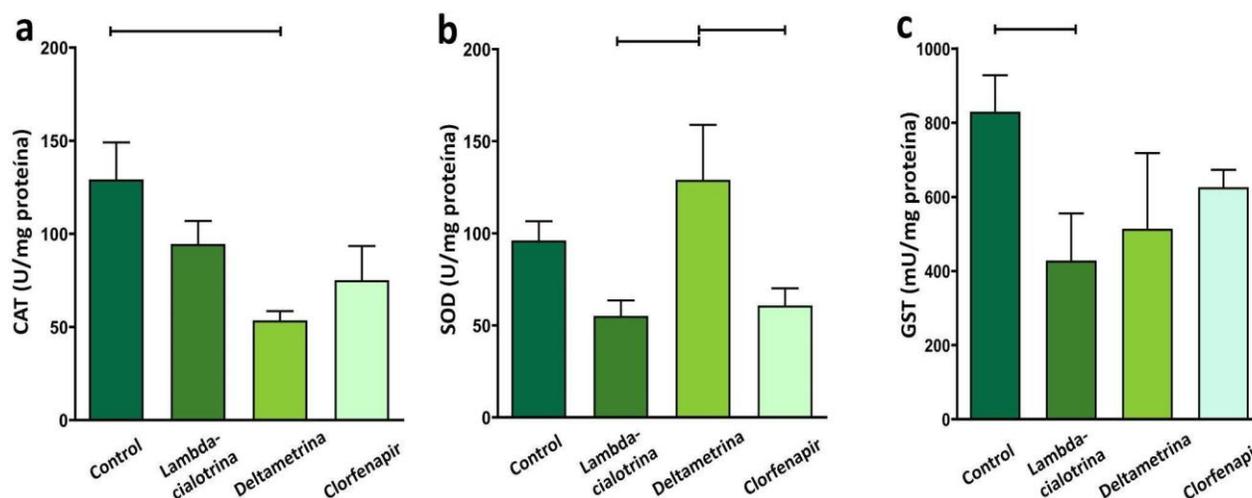


Figura 18: Efecto de la exposición a la $NOEC_{L(48h)}$ de los insecticidas usados sobre la actividad enzimática de CAT (a); actividad enzimática de SOD (b) y actividad enzimática de GST (c) en la glándula digestiva de *P. canaliculata*. Se muestran la Media y Error estándar de la media. Las barras en la parte superior de cada gráfico indican entre qué grupos existen diferencias significativas (ANOVA, post Tukey test, $p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

7.1 TOXICIDAD DE INSECTICIDAS

El uso de métodos biológicos de monitoreo de ambientes acuáticos se ha incrementado en diversos países como una herramienta para evaluar la calidad del agua complementando los métodos físicos y químicos (de la Lanza y Hernández, 2014). Para llevar a cabo esta tarea, es fundamental la elección de bioindicadores y biomarcadores adecuados, de manera que la evaluación se ajuste a las metas fijadas en planes o programas de monitoreo ambiental (González, C. y Vallarino, A., 2014).

En el presente estudio se evaluó al caracol dulceacuícola *Pomacea canaliculata* como potencial bioindicador de contaminación de cuerpos de agua por los insecticidas Lambdacialotrina, Deltametrina y Clorfenapir. En esta especie, los ensayos de toxicidad indicaron que el insecticida más tóxico para individuos adultos de *P. canaliculata* es Lambdacialotrina, quien presentó la dosis letal más baja (Lambdacialotrina: 0.65 µg/ml < Deltametrina: 1.63 µg/ml < Clorfenapir 2.96 µg/ml).

Arrighetti *et al.* (2018) encontraron que, para cipermetrina, un piretroide ampliamente utilizado para combatir lepidópteros y coleópteros y que además es un insecticida de amplio espectro de organismos acuáticos, siendo peces e invertebrados los más sensibles; la NOEC_{L(96h)} en adultos de *P. canaliculata* fue de 0.40 µg/ml, un valor comparativamente más bajo que los insecticidas Deltametrina y Lambdacialotrina. A pesar de que cipermetrina, deltametrina y lambdocalotrina pertenecen a una misma familia química; estos resultados sugieren que la toxicidad de cipermetrina puede ser más elevada. Sin embargo, para confirmar esto, debería evaluarse para cipermetrina una dosis de toxicidad como, por ejemplo, la DL50, como se hizo en nuestro estudio.

Ibrahim *et al.*, (2018) encontraron que la DL50_(24h) de una mezcla formulada de dos insecticidas usada para controlar plagas de varios insectos en Egipto, que contiene 30 g/l de Lambdacialotrina y 17 g/l de Acetamiprid, resultado de la exposición en el caracol *Biomphalaria alexandrina* fue de 7.90 µg/ml. Comparando este valor con el hallado en nuestro trabajo, podemos decir que el piretroide sintético Lambdacialotrina, podría ser más tóxico en *P. canaliculata* que en *B. alexandrina* dada la diferencia entre ambas DL50, aunque en esta última especie se haya utilizado una mezcla formulada que contiene el principio activo. El valor relativo más alto en *B. alexandrina* podría deberse también a una resistencia mayor en esta especie a estos compuestos.

Bakry *et al.* (2011) en su estudio determinaron la DL50_(24h) de Deltametrina en la especie de caracol *Helisoma duryi* (Planorbidae), presente en el Río Nilo, en la zona de Giza, Egipto, fue de 4.82 µg/ml en animales expuestos. Nuevamente, este resultado indica que este compuesto piretroide es más tóxico para *P. canaliculata* de acuerdo con los resultados de nuestro trabajo (DL50_(48h) = 1.63 µg/ml). Aunque para tener una conclusión fehaciente respecto a esta afirmación, deberían repetirse los ensayos con tiempos de exposición iguales.

7.3 OCUPACIÓN GLANDULAR COMO BIOMARCADOR

Dado que la glándula digestiva es el principal órgano de detoxificación, se espera que presente cierta sensibilidad histopatológica frente a la exposición de pesticidas como ciertos xenobióticos (Arrighetti *et al.*, 2018). El análisis de alteraciones histológicas puede dar información acerca del estado de salud de un organismo; por lo tanto, pueden ser biomarcadores sensibles para responder frente a una amplia gama de compuestos sintéticos y estresores naturales (Arrighetti *et al.*, 2018).

Se han propuesto hipótesis sobre el origen de los corpúsculos simbióticos (“C” y “K”) que concuerdan en base a la evidencia morfológica y molecular, con un origen procariota y más precisamente cianobacteriano (Castro-Vazquez *et al.*, 2002; Koch *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2005). Ambos morfotipos viven en el interior de dos tipos de células epiteliales específicas en los acinos de la glándula digestiva de *P. canaliculata*. Los corpúsculos “C” se alojan en células columnares mientras que los corpúsculos “K” lo hacen en células piramidales (Castro-Vazquez *et al.*, 2002). A pesar de que exista escasa evidencia de cambios histológicos inducidos por piretroides, Arrighetti *et al.* (2018) reportaron que la exposición a cipermetrina en *P. canaliculata* induce cambios cualitativos a nivel histológico en todos los tejidos de órganos evaluados en su estudio, especialmente en glándula digestiva y branquia (también se evaluó el pie de los animales).

En nuestro estudio observamos que la ocupación de los acinos glandulares por la forma vegetativa del simbiote es de un 4.29% en animales no expuestos. Se vio disminuida significativamente únicamente en los animales expuestos al insecticida deltametrina, comparada con el control (ANOVA, post-test Tukey, $p < 0.05$). Campoy-Díaz *et al.* (2018) mostraron que la simbiosis entre *P. canaliculata* y los corpúsculos que en ella se alojan, pueden ser usados como un bioindicador de metales en el agua; evaluaron la concentración, depuración y respuesta antioxidante frente a la exposición crónica a Mercurio, Arsénico y Uranio, en distintos órganos y en los corpúsculos. Entre las determinaciones llevadas a cabo en dicho estudio, se hizo un análisis morfométrico evaluando la ocupación de ambos corpúsculos en los acinos glandulares, cuyo resultado fue de 8.3% para los corpúsculos “C”.

La ocupación por la forma quística del simbiote en nuestro trabajo fue de 15.56% en el grupo control y no presentó modificaciones, aunque mostró tendencia a disminuir su ocupación en animales expuestos a Deltametrina y Lambdaialotrina. En el trabajo de Campoy-Díaz *et al.* (2018) y Dellagnola *et al.* (2019), los resultados de los grupos no expuestos fueron 9.5% y 11%, respectivamente. Por otra parte, registramos un aumento no significativo respecto al control, en los animales expuestos a clorfenapir, hecho que está en concordancia con el trabajo de Peña *et al.* (2017), quienes hallaron en su estudio que la exposición a cobre en animales de *P. canaliculata* provenientes de ríos de Filipinas, provoca un aumento en el número y tamaño de los corpúsculos “K” de la glándula digestiva de animales expuestos a una solución cuya concentración usada fue de 0.068 $\mu\text{g/ml}$; esto estaría vinculado a la acción de detoxificación de estos corpúsculos mencionada por la autora, y que estaría actuando además como sitio de acumulación de metales.

La ocupación total de ambos simbioses que medimos fue de 19.85% en el grupo control, resultado que se acerca a los obtenidos por Campoy-Díaz *et al.* (2018) y Dellagnola *et al.* (2019), quienes midieron un 17.5% y un 23.3%, respectivamente. Aunque los grupos expuestos presentaron una disminución de ocupación, la misma fue significativa sólo para el grupo expuesto a Deltametrina (ANOVA, post test Tukey, $p < 0.05$). Esto fue distinto a los resultados publicados por Arrighetti *et al.* (2018), quienes reportan que la ocupación simbiótica en los acinos glandulares de los animales de *P. canaliculata* aumentó luego de ser expuestos a distintas concentraciones de cipermetrina.

7.2 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS COMO BIOMARCADOR

Las actividades SOD y CAT se han propuesto como biomarcadores de contaminación en ecosistemas acuáticos, por lo que reciben cada vez más la atención de la comunidad científica. Aunque estas enzimas conforman la primera línea de defensa para contrarrestar los efectos de las ROS, se ha reportado que no siempre responden de la misma manera (Arrighetti *et al.*, 2018). La enzima de biotransformación metabólica de fase II, la GST, es la más estudiada en

organismos acuáticos; su rol involucra la detoxificación de xenobióticos como pesticidas y sus metabolitos, mediante la conjugación con glutatión reducido para facilitar su excreción (Arrighetti *et al.*, 2018).

Al igual que en nuestro estudio, Shaker *et al.*, (2015) determinaron que las actividades de las enzimas CAT y GST disminuyeron en la glándula digestiva del caracol terrestre *Eobania vermiculata* luego de la exposición durante 96 horas a 0.047 µg/ml (DL50) de lambdacialotrina.

Arrighetti *et al.*, (2018) en su trabajo pudieron medir que la dosis ambientalmente relevante de Cipermetrina fue 0.10 µg/ml, medida en el arroyo Zapata, afluente del estuario del Río de La Plata (zona de colecta de los individuos utilizados en esta investigación) y fue esta concentración la elegida como máximo para realizar las exposiciones de cipermetrina. En su estudio determinaron que la actividad de la enzima catalasa en la glándula digestiva de los caracoles, respondió con un aumento significativo en todos los animales expuestos a distintas concentraciones respecto al grupo control en tiempos de exposición entre 1-7 días. Para el último período de exposición, 14 días, se registró una caída significativa de este parámetro ($p < 0.05$). Este resultado se contrapone con el determinado en nuestro estudio, dado que encontramos una disminución en la actividad CAT en los tres grupos expuestos, pero sólo en el grupo expuesto a deltametrina registramos una caída significativa (ANOVA, post test Tukey, $p < 0.05$) respecto al grupo control. Estas diferencias pueden atribuirse quizás a la diferencia en el insecticida utilizado; los diferentes tiempos de exposición de ambos estudios, ya que Arrighetti *et al.* (2018) trabajaron con tiempos más largos de exposición, donde la actividad enzimática puede quizás recuperarse; finalmente, la dosis del insecticida puede ser otro parámetro determinante para la actividad celular que determine un comportamiento diferente de la CAT al observado en los piretroides utilizados en este trabajo.

En nuestro estudio registramos un incremento considerable, aunque no significativo de la actividad de la enzima Superóxido dismutasa únicamente en los animales expuestos a deltametrina, comparados con el grupo control. Sin embargo, los altos niveles de SOD del grupo expuesto a deltametrina si resultó significativamente mayor (ANOVA, post test Tukey, $p < 0.05$) respecto a los grupos expuestos a lambdacialotrina y clorfenapir. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Arrighetti *et al.* (2018), lo que indicaría que SOD podría ser un buen biomarcador de deltametrina. Finalmente, cabe mencionar que Arrighetti *et al.*, (2018) encontraron que esta enzima se comportó de manera variable de acuerdo a los tiempos y dosis de exposición.

En cuanto a la GST, Arrighetti *et al.*, (2018) mostró que en animales expuestos a cipermetrina no presentaron una clara respuesta dependiente de la concentración respecto a los controles. En nuestro trabajo determinamos que la actividad de la GST disminuyó en los tres grupos de animales expuestos, siendo significativa esta caída en el grupo expuesto a lambdacialotrina respecto al control. Esta variabilidad en la respuesta de una misma enzima expuesta a distintos estresores indica que la actividad de esta enzima podría ser usada como un biomarcador de estrés oxidativo en *P. canaliculata*, al menos para el insecticida lambdacialotrina, pero hay que considerar que esta enzima participa en otros procesos además de la defensa antioxidante y que, en ocasiones, muestra un comportamiento diferente en animales según edad, tiempo de exposición y sexo de los mismos (Arrighetti *et al.*, 2018). Por otro lado, existe evidencia que este posible biomarcador puede variar según el tipo de organismo y plaguicida al cual sea expuesto (Van Erp *et al.*, 2002; Ibarra Núñez, G., 2014). De igual manera, en otro estudio donde individuos de esta especie fueron expuestos a una fórmula mixta de un piretroide (bifentrin) y un neonicotenoide (imidacloprid) en un campo arrocero (Attademo *et al.*, 2018), la actividad de la enzima GST en la glándula digestiva disminuyó significativamente respecto a la actividad de animales no expuestos a agroquímicos. Este resultado es semejante al obtenido en nuestro estudio, pero hay que tener en cuenta la potencial acción sinérgica entre los principios activos

en la mezcla formulada que se utilizó en dicho estudio. Sin embargo, a los fines prácticos, el empleo de la actividad de GST potencialmente representa un buen biomarcador de contaminación en el agua por insecticidas.

8. CONCLUSIÓN

Los ensayos realizados permitieron comprobar las hipótesis planteadas y hacen viable la posibilidad del uso de *Pomacea canaliculata* como especie bioindicadora de contaminación en cuerpos de agua por insecticidas. Esto principalmente se sustenta en que las exposiciones llevadas a cabo produjeron alteraciones histológicas y bioquímicas evidenciables. Por un lado, los biomarcadores histológicos planteados aquí, tienen un potencial prometedor e interesante de aplicación particularmente en ampuláridos, debido a la relativa simplicidad de la técnica pueden observarse cambios con rapidez. Es así como la ocupación simbiótica de corpúsculos "C" y la ocupación simbiótica total, podrían ser usadas como biomarcador para la exposición de deltametrina, Por otro lado, aunque las defensas antioxidantes enzimáticas parecen tener resultados con más variación, en la actualidad se están empleando ampliamente en ensayos de ecotoxicología alrededor del mundo y cada vez son más confiables. Así es que la actividad de CAT y SOD sería un buen biomarcador para deltametrina y GST para lambda-dialotrina.

Este trabajo constituye un aporte a la actual línea de investigación de los efectos de agroquímicos sobre la especie y también a la escasa información sobre las consecuencias de exposición de esta clase de pesticidas sobre especies animales y sobre el ambiente. Aquí, podemos decir que es necesaria la realización de nuevos estudios que complementen estos resultados, ya que no se tiene certezas aún si otros tipos de contaminantes presentes en ecosistemas acuáticos puedan causar los mismos o similares efectos a los obtenidos en esta investigación. En este sentido, es positivo considerar que la Dirección de Investigación, Ciencia y Técnica del Ministerio de Salud, Desarrollo Social y Deportes de la Provincia de Mendoza ha financiado recientemente el proyecto "Evaluación de la contaminación por agroquímicos en humedales de Mendoza, su identificación con bioindicadores y su impacto en la salud", del cual forman parte tesista, codirector y director de esta tesis de grado, se espera poder vincular los biomarcadores caracterizados en este trabajo, en ejemplares de *P. canaliculata* que habitan humedales de la Provincia, con la posible presencia de agroquímicos en el agua, para llevar el trabajo de laboratorio a su aplicación traslacional directa.

ANEXO

Tabla S1: Ejemplo de salida del software Image ProPlus®, correspondiente a la foto 1 del ejemplar identificado como "Macho 1" sometido a exposición de Deltametrina. Las celdas que contienen "PG" corresponden a los corpúsculos "K" medidos y las que contienen "C", corresponden a los corpúsculos "C" medidos

Deltametrina, M1 – F1			
ID	Features	Measurement	Value
1	Área total	Area	4897296
2	Área acino	Area	1331673
3	Área acino2	Area	997459
4	Área acino3	Area	179239
5	PG4	Area	16451
6	PG5	Area	31532
7	PG6	Area	6588
8	PG7	Area	39436
9	PG8	Area	23843
10	PG9	Area	21052
11	PG10	Area	47323
12	PG11	Area	22763
13	PG12	Area	46989
14	PG13	Area	92688
15	PG14	Area	76218
16	PG15	Area	64708
17	PG16	Area	23382
18	PG17	Area	32329
19	PG18	Area	25595
20	PG19	Area	24650
21	C1	Area	615,7522
22	C2	Area	804,2477
23	C3	Area	6939,778
24	C4	Area	804,2477
25	C5	Area	452,3893
26	C6	Area	1256,637
27	C7	Area	615,7522
28	C8	Area	1256,637
29	C9	Area	2827,433
30	C10	Area	113,0973
31	C11	Area	1256,637
32	C12	Area	615,7522
33	C13	Area	201,0619
34	C14	Area	314,1593
35	C15	Area	1256,637
36	C16	Area	6939,778
37	C17	Area	2123,717
38	C18	Area	4071,504
39	C19	Area	452,3893
40	C20	Area	1256,637
41	C21	Area	804,2477
42	C22	Area	804,2477
43	C23	Area	452,3893

Los valores medidos observados (Value) corresponden a pixeles medidos por el programa. En la columna "Features", los elementos "PG" se corresponden con los corpúsculos K y los elementos "C" con los corpúsculos C.

Tabla S2: Datos extraídos de la salida de Image ProPlus®, que se utilizaron para calcular los porcentajes de ocupación.

Área Total	Área Tejido	Área Luz Acinar	Área corp. "K"	Área corp. "C"	% corp. "K"	% corp. "C"	% corp. Total
4897296	2508371	0	595547	37777.65	23.74	1.51	25.25

Tabla S3: Resumen de porcentajes calculados para cada foto para el mismo ejemplar (M1) tratado con deltametrina.

	% Corp. K	% Corp. C	% Corp. Total
Foto 1	23.742	1.506	25.248
Foto 2	25.004	0.810	25.813
Foto 3	23.367	1.967	25.335
Foto 4	14.776	1.467	16.243
Foto 5	15.395	0.737	16.132
Foto 6	7.721	1.039	8.761
Foto 7	8.301	1.069	9.370
Foto 8	10.637	0.694	11.331
Foto 9	12.978	1.312	14.290
Foto 10	8.173	0.794	8.967
Media	15.01	1.14	16.15

Tabla S4: Datos de absorbancia medidos en glándula digestiva (MGG) y utilizados para la determinación de curva de contenido de proteína según Lowry et al (1951). En este caso corresponde al grupo control, y para cada tratamiento se realizó la misma determinación.

Punto (µl muestra MGG)	Repetición		Media
	1°	2°	
0	4	0	2
5	67	63	65
10	118	102	110
20	206	182	194
40	357	367	362
80	607	681	644
100	781		781

Tabla S5: Datos de absorbancias registradas en glándula digestiva (MGG) para obtener la cantidad total de proteína en cada muestra. En este caso se corresponde al grupo control, y para cada tratamiento se realizó la misma determinación.

MGG	Reactivo	Blanco
H1	309	12
H2	323	9
H3	375	18
M1	325	0
M2	426	6
M3	353	17

Tabla S6: Datos de absorbancia registrados en la medición de actividad SOD. Se observan los volúmenes de muestra y adrenalina usados.

Grupo	Ind.		Vol. muestra (µl)	Adrenalina (µl)	Abs. Med 0s	Abs. Med 60s	Dif.	Cálculo	Inh. (%)
Control	H1	>50%	10	32	53	64	11	0,34	66
		<50%	1,5	30	38	57	19	0,63	37
	H2	>50%	25	30	50	63	13	0,43	57
		<50%	13	28	43	58	15	0,54	46
	H3	>50%	15	30	48	61	13	0,43	57
		<50%	10	30	45	61	16	0,53	47
	M1	>50%	30	31	35	50	15	0,48	52
		<50%	10	29	48	63	15	0,52	48
	M2	>50%	20	29	41	55	14	0,48	52
		<50%	7	29	42	58	16	0,55	45
	M3	>50%	20	28	46	56	10	0,36	64,3
		<50%	10	30	43	60	17	0,57	43,3
Lambda-cialotrina	H1	>50%	35	30	41	53	12	0,40	60,0
		<50%	10	31	45	65	20	0,65	35,5
	H2	>50%	30	30	41	55	14	0,47	53,3
		<50%	10	30	45	61	16	0,53	46,7
	H3	>50%	30	32	50	59	9	0,28	71,9
		<50%	10	32	45	67	22	0,69	31,3
	M1	>50%	30	30	53	67	14	0,47	53,3
		<50%	10	30	50	70	20	0,67	33,3
	M2	>50%	40	32	49	63	14	0,44	56,3
		<50%	10	30	43	63	20	0,67	33,3
	M3	>50%	30	30	52	65	13	0,43	56,7
		<50%	5	31	45	62	17	0,55	45,2
Delta-metrina	H1	>50%	10	32	45	59	14	0,44	56,3
		<50%	5	32	47	69	22	0,69	31,3
	H2	>50%	40	32	57	71	14	0,44	56,3
		<50%	10	29	43	62	19	0,66	34,5
	H3	>50%	30	29	45	57	12	0,41	58,6
		<50%	10	29	43	63	20	0,69	31,0
	M1	>50%	35	32	47	60	13	0,41	59,4
		<50%	5	30	40	58	18	0,60	40,0
	M2	>50%	25	28	47	58	11	0,39	60,7
		<50%	10	32	54	71	17	0,53	46,9
	M3	>50%	25	28	39	49	10	0,36	64,3
		<50%	10	30	43	60	17	0,57	43,3

Clorfenapir	H1	>50%	35	32	50	63	13	0,41	59,4
		<50%	10	32	50	70	20	0,63	37,5
	H2	>50%	35	28	40	52	12	0,43	57,1
		<50%	10	28	46	63	17	0,61	39,3
	H3	>50%	35	30	39	52	13	0,43	56,7
		<50%	10	29	41	59	18	0,62	37,9
	M1	>50%	40	28	46	58	12	0,43	57,1
		<50%	10	30	44	68	24	0,80	20,0
	M2	>50%	35	30	40	53	13	0,43	56,7
		<50%	10	29	52	68	16	0,55	44,8
	M3	>50%	35	28	43	54	11	0,39	60,7
		<50%	10	32	51	71	20	0,63	37,5

Tabla S7: Datos de absorbancia registrados en la medición de actividad CAT. Se observan los promedios de 2 repeticiones efectuadas y el volumen de muestra usado por individuo.

Grupo	Ind.	Vol. Muestra (µl)	Tiempo (s)						
			0	10	20	30	40	50	60
Control	H1	8	499	494,5	491	486	482	478,5	474
	H2	8	496,5	493	489,5	486,5	483,5	480,5	478
	H3	8	514	503,5	490,5	483,5	476,5	469,5	463
	M1	8	578	572,5	568,5	564,5	559,5	556	551,5
	M2	8	555,5	550	543	537,5	531,5	526,5	521
	M3	8	523,5	518,5	515	512,5	509,5	506,5	505
Lammbdacialotrina	H1	15	608,5	600,5	592,5	584,5	575,5	567	558,5
	H2	15	614,5	604,5	595	584,5	575	564,5	555,5
	H3	15	611,5	604,5	597,5	590,5	583,5	575,5	568,5
	M1	20	631,5	626,5	621,5	615	609,5	603	597,5
	M2	20	593,5	579,5	571	563,5	554	545,5	535
	M3	20	630,5	617	609,5	598,5	587	575	564
Deltame-trina	H1	25	625,5	622	617,5	613,5	608	602	596,5
	H2	25	680,5	673,5	669,5	665	661	655,5	651
	H3	25	691,5	684,5	681,5	676	670	663,5	656,5
	M1	30	734,5	726	721,5	716,5	711,5	705,5	700
	M2	30	740	728,5	721	713	705,5	697,5	688
	M3	30	688	681	625	669	661	653	644
Clorfenapir	H1	30	692	678	662,5	651	637	623,5	609,5
	H2	30	700	685	682	670	658	645	632
	H3	30	694,5	682	664	648	631,5	613	596,5
	M1	30	749	744,5	741	737,5	734	730	724,5
	M2	30	759	752	744	734	722	712	702
	M3	30	790	781	774,5	768	760	753	745,5

Tabla S8: Datos de absorbancia registrados en la medición de actividad GST. Se observan los promedios de 2 repeticiones efectuadas y el volumen de muestra usado por individuo.

Grupo	Ind.	Vol. muestra (µl)	Tiempo (s)						
			0	30	60	90	120	150	180
Control	H1	10	804,5	868	917,5	978,5	1038,5	1085,5	1139
	H2	5	831,5	890,5	936,5	990,5	1044	1091	1144,5
	H3	5	860	942,5	1015	1088,5	1155,5	1230	1291
	M1	5	866,5	940	1003,5	1058	1124	1179	1231
	M2	5	861,5	941	999	1057	1115	1174	1235
	M3	10	890,5	941	983	1023,5	1066,6	1102,5	1141
Lambda-cialotrina	H1	10	484	510,5	537	563,5	594,5	616	643,5
	H2	10	542,5	533,5	621	660	697	730	765,5
	H3	10	604,5	815	746	813	872,5	937	995,5
	M1	3	620	723	816	904	993,5	1076,5	1146,5
	M2	3	597	633,5	664,5	694,5	724	752	781
	M3	3	611,5	651	687,5	720	753,5	784,5	818
Deltame-trina	H1	10	606	660,5	705,5	751,5	794,5	833,5	879
	H2	10	617,5	692	763	834	896,5	961,5	1021
	H3	10	497,5	543	585,5	626,5	667	709,5	750,5
	M1	10	657	760	857,5	941	1029	1115	1192
	M2	5	674	783,5	869	962,5	1051,5	1135	1213,5
	M3	10	676,5	751	818	889	951	1017,5	1079,5
Clorfe-Napir	H1	10	666,5	738	790,5	848,5	901	951	1006
	H2	10	714,5	791	860,5	922,5	991,5	1048	1107,5
	H3	5	687	752,5	808	865,5	921,5	977	1029
	M1	5	720,5	762	794,5	823,5	854,5	883	914,5
	M2	5	756,5	820,5	878,5	931,5	985	1042,5	1096,5
	M3	5	779	847	902,5	956	1014,5	1068	1123

BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht E, Carreño N, Castro-Vazquez A. 1996. A quantitative study of copulation and spawning in the South American applesnail, *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia: Ampullariidae). *Veliger* 39: 142-7.
- Albrecht E, Carreño N, Castro-Vazquez A. 1999. A quantitative study of environmental factors influencing the seasonal onset of reproductive behaviour in the South American apple-snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies* 65: 241-50.
- Albrecht EA. 1998. *Control de la estacionalidad reproductiva en el gastrópodo Pomacea canaliculata (Prosobranchia : Ampullariidae)*. Universidad Nacional de Cuyo. 148 pp.
- Andrews, E. B., 1964. The functional anatomy of the gut of the prosobranch gastropod *Pomacea canaliculata* and of some other Pilids. Department of Zoology, University of Reading.
- Aparicio, V., De Gerónimo, E., Guijarro, K. H., Pérez, D., Portocarrero, R. y Vidal, C. 2015. 1° ed. Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente. Balcarce, Buenos Aires. Faimallá, Tucumán, Reconquista, Santa Fé. Ediciones INTA 13.
- Arrighetti, F., Ambrosio, E., Astiz, M., Rodrigues Capítlo, A. y Lavarías, S. 2018. Differential response between histological and biochemical biomarkers in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) exposed to cypermethrin. *Aquatic Toxicology* Vol. 194, 140-151.
- Attademo, A. M., Lajmanovich, R., Peltzer, P. y Junges, C. 2016. Acute toxicity of Metaldehyde in the invasive rice snail *Pomacea canaliculata* and sublethal effects on tadpoles of a non-target species (*Rhinella arenarum*). *Water Air Soil Pollut* 227:400. Doi: 10.1007/s11270-016-3082-9.
- Attademo, A. M., Tamburi, N., Peltzer, P., Lajmanovich, R. y Martinuzzi, C. 2018. Metabolic stress and Shell thinning in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae) in rice agroecosystem of Argentina. *Currents topics in Toxicology* Vol. 14.
- Banerjee, R. (2008). Redox metabolism and life. En: *Redox Biochemistry*, R. Banerjee (Ed), John Beutler, E. (1982). Catalase. In E. Beutler (Ed.), *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods* (pp. 105–106). New York: Grune and Stratton Inc. Biomedical Research, 2, 146-50.
- Bouchet, P. y Rocroi, L.P., 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia*, 47: 1–397
- Burela S, Martín PR. 2009. Sequential Pathways in the Mating Behavior of the Apple Snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia* 51: 157-64.
- Burela S, Martín PR. 2011. Evolutionary and functional significance of lengthy copulations in a promiscuous apple snail, *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies* 77: 54-64.
- Campoy-Diaz, A., 2019. Una simbiosis como bioindicador de metales en el agua: concentración, depuración y respuesta antioxidante a mercurio, arsénico y uranio. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Cuyo.
- Campoy-Diaz, A., Arribére, M., Riberiro Guevara, S. y Vega, I.A., 2018, Bioindication of mercury, arsenic and uranium in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda,

Ampullariidae): Bioconcentration and depuration in tissues and symbiotic corpuscles. *Chemosphere*, Volume 196, 196-205 p.

Carrquirirborde, P., 2021. Principios de Ecotoxicología. Editorial de la UNLP.

CASAFE, 2021. Guía online de Productos Fitosanitarios. Disponible en: <https://guiaonline.casafe.org/>.

Castro-Vasquez, A., Albrecht, E. A., Vega, I. A., Koch, E., Gamarra-Luques, C., 2002. Pigmented corpuscles in the midgut gland of *Pomacea canaliculata* and other Neotropical apple snails (Prosobranchia, Ampullariidae): A possible symbiotic association. *Biocell* 26, 101-109.

Cazzaniga, N., 1988, *Hyalinella vahiriae* (Ectoprocta) en la Provincia de San Juan. *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral*, 19: 205–208.

Cazzaniga, N., 1990. Sexual dimorphism in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Veliger* 33: 384-8.

Cifuentes, L., Flores, D., Madriz, L. y Vargas, R., 2015. Oxidación electroquímica de lambdacialotrina sobre electrodos de PbO₂-Bi. *Revista Química Nova*, Volumen 38, N°8, 1009-1013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150107>.

Cossi, P. 2018. Efectos de la exposición subcrónica a concentraciones ambientales contaminantes de relevancia en un gasterópodo nativo de agua dulce: *Biomphalaria straminea*. Tesis presentada para optar al título de Doctora de la UBA en el área de Química Biológica.

Cruz C, Silva A, Venturini F, Garlich N, Pitelli R, Pitelli R. 2015. Food preference and consumption of aquatic macrophytes submerged by snail *Pomacea canaliculata*. *Planta Daninha* 33: 433-9.

Dalamos, C. y Eleftherohorinos, I. 2011. Pesticide Exposure, Safety Issues and Risk Assessment Indicators. In: *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Greece. 8:1402-1419. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3108117/pdf/ijerph-08-01402.pdf>.

Darrigran G, Damborenea C, Tambussi A. 2011. *Pomacea canaliculata* (Mollusca, Gastropoda) in Patagonia: potential role of climatic change in its dispersion and settlement. *Brazilian Journal of Biology* 71: 8-13.

De la Lanza, G. y Hernandez, S. 2014. Organismos como indicadores de cambios ambientales: características, elección, interpretación, monitoreo. Ventajas y desventajas. En Zuarth, C., Vallarino, A., Perez, J. y Low, A. *Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro* (41-64). ISBN 987-607-8429-05-9.

Dellagnola F. A., Rodríguez, C., Castro-Vasquez, A. y Vega, I. A., 2019. A multiple comparative study of putative endosymbionts in three coexisting apple snail species. *PeerJ* 7: e8125. Disponible en <http://doi.org/10.7717/peerj.8125>

Di Persia, D. y Radici de Cura, M., 1973. Algunas consideraciones acerca de los organismos epibiontes desarrollados sobre Ampullariidae. *Physis*, 32: 309–319.

Dreon, M. S., Heras, H. y Pollero, R., 2006. Biochemical composition, tissue origin and functional properties of egg perivitellins from *Pomacea canaliculata*. *Biocell* 2006, 30(2):359-365.

Encinas Malagón, M.D. 2011. Medio Ambiente y Contaminación. Principios Básicos. Primera edición. Disponible en:

http://siar.minam.gob.pe/puno/sites/default/files/archivos/public/docs/medio_ambiente_y_contaminacion_principios_basicos.pdf.

- Escobar-Correas, S., Mendoza-Porras, O., Dellagnola, F. A., Colgrave, M. L. y Vega, A. I., 2019. Integrative proteomic analysis of digestive tract glycosidases from the invasive golden apple snail, *Pomacea canaliculata*. *Journal of Proteome Research* 2019 18 (9), 3342-3352.
- Estebenet A, Cazzaniga N. 1992. Growth and demography of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) under laboratory conditions. *Malacological Review* 25: 1-12.
- Estebenet AL, Cazzaniga NJ. 1998. Sex-related differential growth in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies* 64: 119-23.
- Estebenet, A., Martín, P., 2002. *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): life-history traits and their plasticity. *Biocell* 26, 83-89.
- Estebenet AL, Martín PR, Silvana B. 2006. Conchological variation in *Pomacea canaliculata* and other South American Ampullariidae (Caenogastropoda, Architaenioglossa). *Biocell* 30: 329-35.
- FAO 2006. Código Internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas.
- Fayez A. Bakry, Wafaa S. Hasheesh, Salwa A.H. Hamdi, 2011. Biological, biochemical and molecular parameters of *Helisoma duryi* snails exposed to the pesticides Malathion and Deltamethrin.
- Fernández Cirelli, Alicia (2012). El agua: un recurso esencial. *Química Viva*, 11 (3),147-170. [fecha de Consulta 21 de Enero de 2022]. ISSN: Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86325090002>.
- Ferreira, A. C. y Rodrigues Capítulo,A., 2017. Growth and survival of juvenile *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) in plain streams associated to different land uses. *Studies on neotropical fauna and environment*, 52:2, 95-102. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/01650521.2017.1294359>.
- Galmarini, C. 2020. Crisis hídrica: una prioridad para el INTA en Cuyo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Disponible en: <https://inta.gob.ar/noticias/crisis-hidrica-una-prioridad-para-el-inta-en-cuyo> .
- Gamarra-Luques C, Giraud-Billoud M, Castro-Vazquez A. 2013. Reproductive organogenesis in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822), with reference to the effects of xenobiotics *Journal of Molluscan Studies* 79: 147-62.
- García Fernández J.C., Marzi A.A., Casabella A.N., Roses O., Guatelli M. y Villaamil E., 1979. Plaguicidas organoclorados en agua de los ríos Paraná y Uruguay. *Ecotoxicología* 1, 51-78
- García, B. 2019. *Identificación de los efectos del paraquat y fluroxipir sobre parámetros reproductivos en el caracol dulceacuícola Pomacea canaliculata (Caenogastropoda, Ampullariidae)*. Tesis de Grado, Universidad Nacional de Cuyo. Biblioteca Digital UNCuyo.
- Giraud-Billoud, M., Castro-Vazquez, A., Campoy-Diaz, A. D., Giuffrida, P. y Vega, I. A. 2017. Tolerance to hypometabolism and arousal induced by hibernation in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*.
- Giraud-Billoud, M., Vega, I. A., Rinaldi Tosi, M. y Abud, M. A. 2013. Antioxidant and molecular chaperone defences during estivation and arousal in the South American apple snail

- Pomacea canaliculata. Journal of Environmental Biology Vol. 216, 614-622. Doi: 10.1242/jeb.075655.
- Giraud-Billoud, M., Vega, I.A., Wuilloud, R., Clément, M.E. y Castro-Vazquez, A. 2013. Imposex and novel mechanisms of reproductive failure induced by Tributyltin (TBT) in the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. Environmental Toxicology and Chemistry. Doi: 10.1002/etc.2310.
- González M., Miglioranza K.S., Grondona S.I., Silva Barni M.F., Martinez D.E. y Peña A., 2013. Organic pollutant levels in an agricultural watershed: the importance of analyzing multiple matrices for assessing stream water pollution. Environ. Sci. Process. Impacts. 15, 739-750.
- González, C. y Vallarino, A. 2014. Los bioindicadores ¿una alternativa real para la protección del medio ambiente? En En Zuarth, C., Vallarino, A., Perez, J. y Low, A. Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro (21-37). ISBN 987-607-8429-05-9.
- Gorni, G. R. y Alves, R. G., 2006. *Naididae (Annelida, Oligochaeta)* associated with *Pomacea bridgesii* (Reeve) (*Gastropoda, Ampullariidae*). *Revista Brasileira de Zoologia*, 23: 1059–1061.
- Gravilescu, M. 2005. Fate of Pesticides in the Environment and Its Bioremediation. In Engineering in Life Science. 5 (6): 497-526.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. Journal of Biological Chemistry 249, 7130.
- Hanson, J.M., Go, Y-M., Jones, D.P. (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signalling. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 46, 215–34.
- Hayes K, Burks R, Castro-Vazquez A, Darby P, Heras H, Martín P, Qiu J-W, Thiengo S, Wada T, Yusa Y, Burela S, Cadierno MP, Cueto J, Dellagnola F, Dreon M, Frassa M, Giraud-Billoud M, Godoy M, Ituarte S, Koch E, Matsukura K, Pasquevich M, Rodriguez C, Saveanu L, Seuffert M, Strong E, Sun J, Tamburi NE, Tiecher M, Turner R, Valentine-Darby P, Vega I, Cowie R. 2015. Insights from an integrated view of the biology of apple snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia* 58: 245-302.
- Hinton, D.E., Laurén, D.J. (1990). Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: ADAMS S.M. (Ed) Biological Indicators of Stress in Fish. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society Symposium, 51-66.
- Hwang, U. K., Kim, D. H., Ryu, H. M., Lee, J. W., Park, S. Y. y Kang., H. S., 2014. Effect of Bisphenol A on Early Embryonic Development and the Expression of Glutathione S-transferase (GST) in the sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*). Korean J. Environmental Biology 32, 234-242.
- Ibarra Nuñez, G. 2014. Las arañas como bioindicadores. En Zuarth, C., Vallarino, A., Perez, J. y Low, A. Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro (273-290). ISBN 987-607-8429-05-9.
- Ibrahim, A. M., Sayed, S. S. y Shalash, I. R. 2018. Toxicology assessment of labdacyalothrin and acetamiprid insecticides formulated mixture on hatchability rate, histological aspects, and protein electrophoretic pattern of *Biomphalaria alexandrina* (Ehrenberg, 1831) snails. Environmental Science and Pollution Research Vol. 25, 32581-32590. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3238-x>.
- IRAC, 2021. IRAC Mode of action classification scheme. IRAC International MoA Working group.
- Jones, D.P. (2006). Redefining oxidative stress. Antioxidant & Redox Signaling, 8, 1865–1879.

- Juárez, A., Vega, I.A., Mayorga, L.S., Ribeiro Guevara, S. y Arribére, A. 2022. An Arsenic-76 radiotracer to study the routes of assimilation, hemolymph distribution, and tissue inventories in the bioindicator organism *Pomacea canaliculata*. *Science of the Total Environment* 815.
- Keawjam, R. S., Poonswad, P., Upatham, E. S. y Banpavichit, S., 1993. Natural parasitic infection of the golden apple snail, *Pomacea canaliculata*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 24:170–177.
- Koch, E., Vega, I. A., Albrecht, E. A., Ortega, H. H., Castro-Vasquez, A., 2005. A light and electron microscopic study of pigmented corpuscles in the midgut gland and feces of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Veliger* 48, 17-25.
- Loewy R.M., Monza L.B., Kirs V.E. y Savini M.C., 2011. Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *J. Environ. Sci. Health B*. 46, 662-670.
- López, E., Cisneros, S. y Ochoa, J., 2016. Procesos de bioestimulación para la remediación de suelos agrícolas contaminados con tebuconazol y lambdacialotrina. *Revista de Simulación y Laboratorio*. Volumen 3, N° 8, 1-9.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Martín P, Estebenet A, Cazzaniga N. 2001. Factors affecting the distribution of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) along its southernmost natural limit. *Malacologia* 43: 13-24.
- Martín P.R., Seuffert M.E., Tamburi N.E., Burela S. y Saveanu, L. 2017. Behaviour and ecology of *Pomacea canaliculata* from Southern Pampas (Argentina). *Biology and management of invasive apple snails*: 241-56.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein. *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055.
- Miglioranza K.S., González M., Ondarza P.M., Shimabukuro V.M., Isla F.I., Fillmann G., Aizpún J.E. y Moreno V.J., 2013. Assessment of Argentinean Patagonia pollution: PBDEs, OCPs and PCBs in different matrices from the Río
- Miglioranza, K., 2021. Principales familias de contaminantes, fuentes, distribución y destino ambiental. En Carriquiriborde, P. *Principios de Ecotoxicología*. (pp. 27-61). Editorial de la UNLP.
- Monserrat, J.M., 2021. Estrés oxidativo. En Carriquiriborde, P. *Principios de Ecotoxicología*. (pp. 116 - 125). Editorial de la UNLP.
- Morábito J, Salatino S, Medina R, Zimmermann M, Filippini M, Bermejillo A, Nacif N, Campos S, Dediol C, Genovese D. 2005. Evaluación de la calidad del agua en el área regadía del río Mendoza, Argentina. INA-CRA, Mendoza.
- Moreto, B., Gentili, J.O., Ortuño Cano, M. y Campo, A.M. 2018. El agua: recurso y peligro. Análisis normativo-institucional para la vertiente norte del Sistema de Ventania (Argentina). *Revista Geográfica Digital*, Vol.16, N°31, pp 29-45., DOI: <https://dx.doi.org/10.30972/geo.16313598>.
- Mugni H., Demetrio P., Bulus G., Ronco A. y Bonetto C., 2011. Effect of aquatic vegetation on the persistence of cypermethrin toxicity in water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86, 23-27.
- Peña, S., Pocsidio, G. y Co, E. 2017. Histological responses of golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) to copper. *Philippine Journal of Science* Vol. 146(3), 315-321.

- Peñaloza Páez, J. 2021. Contaminación. Revista DELOS: Desarrollo Sostenible. Grupo Eumed.net y Red Académica Iberoamericana Local Global, Volumen 5, N°13. Disponible en: <https://www.eumed.net/rev/delos/13/japp.html> .
- Pérez Espejo R, Aguilar Ibarra A, Hansen AM, González Rodríguez C, González Márquez LC, Bernal González M, Santos Baca A, Jara Durán A. 2012. *Agricultura y contaminación del agua*: UNAM Instituto de Investigaciones Económicas
- Radovanovic, T., Gavrilovic, B., Petrovic, T., Despotovic, S., Gavric, J., Kijanovic, M., Tomasevic Kolarov, N., Faggio, C. y Prokic, M., 2021. Impacto f pre-exposure on deltamethrin-induced oxidative stress in *Bombina variegata* juveniles.
- Resh, V.H., Rosenberg, D.M., 1993. Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates.
- Seuffert, M.E. y Martín P.R., 2010. Dependence on aerial respiration and its influence on microdistribution in the invasive freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biological invasions* 12: 1695-708.
- Seuffert, M.E., Martín, P.R., 2012. A lentic dweller in lotic habitats: the behavior of the invasive South American apple snail *Pomacea canaliculata* in flowing water. *Aquatic Ecology* 46, 129-142.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: impact in redox biology and medicine. *Archives of Medical and*
- Simsek, S., Yonar, E. y Seker, E., 2008. Effects of Deltamethrin on Antioxidant and Oxidative Stress Biomarkers in Freshwater Mussel, *Unio elongatus eucirrus*. *Bull Environ Contam Toxicology* 81, 253 – 257.
- Sturzenegger, A., Charreau, E. y Vardé, O. 2011. La cuestión del agua: algunas consideraciones sobre el estado de situación de los recursos hídricos en la Argentina. *Academias Nacionales de Ciencias Económicas, Ciencias Exactas, Físicas y Naturales e Ingeniería*. 1ª ed. La Plata: Universidad de la Plata.
- Tallarico, L. Freshwater gastropods as a tool for ecotoxicology assessments in Latin America. *American Malacological Bulletin* 33, 1-7.
- Tamburi NE, Martín PR. 2009. Reaction norms of size and age at maturity of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) under a gradient of food deprivation. *Journal of Molluscan Studies* 75: 19 48.
- Tamburi, N.E., Martín, P.R., 2012. Effect of food availability on morphometric and somatic indices of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Malacologia* 55, 33-41.
- Trishala K. Parmar, Deepak Rawtani y YK Agrawal. 2016. Bioindicators: the natural indicator or environmental pollution. *Frontier in Life Science*, 9:2, 110-118. Doi: 10.1080/21553769.2016.1162753.
- UNA, 2022. Manual de Plaguicidas de Centroamérica. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas. Universidad Nacional de Costa Rica.
- UNESCO, ONU-Agua, 2020: Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2020: Agua y Cambio Climático, París.
- Valdivia-Infantas M. y Rodríguez-Benites A. 2014. Intoxicación letal por Clorfenapir, un plaguicida derivado pirrólico. Reporte de un caso. *Revista Médica Herediana*. 2014; 25:42-45.
- Van Erp, S., L. Booth, R. Gooneratne y K. O'Halloran. 2002. Sublethal responses of wolf spiders (Lycosidae) to organophosphorous insecticides. *Environmental Toxicology* 17: 449-456.

- Vega, I.A., Gamarra-Luques, C., Koch, E., Bussmann, L. y Castro-Vazquez, A. 2005. A study of corpuscular DNA and midgut gland occupancy by putative symbiotic elements in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Symbiosis*, 39, 37–45.
- Vega, I. A., Damborenea, M. C., Gamarra-Luques, C., Koch, E., Cueto, J. A., Castro-Vasques, A., 2006. Facultative and obligate symbiotic associations of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biocell* 30, 367-375.
- Vega, I. A., Giraud-Billoud, M., Koch, E., Gamarra-Luques, C. y Castro-Vazquez, A., 2007. Uric acid accumulation within intracelular crystalloid corpuscles of the midgut gland in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *The Veliger* 48(4): 276-283.
- Vega, I.A., Arribére, A., Almonacid, A.V., Ribeiro Guevara, S. y Castro- Vazquez, A. 2012. Apple snails and their endosymbiionts bioconcentrate heavy metals and uranium from contaminated drinking water. *Environmental Science and Pollution Research* volume 19, p 3307–3316. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0848-6>.
- Villaamil Lepori, C., BOVI MITRE, G. y Nassetta, M. 2013. Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29 ,25-43.
- WHO D. 2019. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. World Health Organization Geneva.
- WHO, International Programme on Chemical Safety (1993). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155, World Health Organization, Geneva.
- Xu, Y., Jing Li, A., Li, K., Qin, J. y Li, H. 2017. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development and growth of invasive snail (*Pomacea canaliculata*). *Aquatic Toxicology* Vol. 193, 136-143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.011>.
- Valdivia-Infantas, M. y Rodríguez, A. 2014. Chlorphenapyr lethal poisoning, a pesticide derives pyrrole. Case report. *Revista Medica Herediana* Vol. 25, 42-45. DOI: 10.20453/rmh.2014.264.
- Yang, C., Tian, Y., Lv, T., Chang., X., Zhang, M., Gong, G., Zhao, L., Yang, S. y Chen, H. 2018. Histopathological effects of Pedunsaponin A on *Pomacea canaliculata*. *Pesticide Biochemistry and Phisiology*. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.010>.
- Yoshida, K., Hoshikawa, K., Wada, T., Yusa, Y., 2009. Life cycle of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) inhabiting Japanese paddy fields. *Applied Entomology and Zoology* 44, 465-474.