



***Ensayos toxicológicos de retardantes de flama polibromados (PBDEs) sobre el caracol manzana (Pomacea canaliculata, CAENOGASTROPODA, AMPULLARIIDAE)***

***Tesista: ARRIGONI, María Paula***

***Director: Dr. KOCH, Eduardo***

***Co-director: Dr. ALBRECHT, Eduardo***

CONICET



CCT - MENDOZA

## Resumen

Los éteres de difenil polibromados (PBDEs), son un grupo de compuestos químicos industriales que pertenecen a la familia de los retardantes de llama bromados (BFRs) y comprenden 209 congéneres en función del número de bromos asociados y su posición. Estas sustancias son agregadas a los polímeros presentes en las placas electrónicas, computadoras, televisores, automóviles y aeronaves, entre otros, para inhibir o retardar el inicio y propagación del fuego. El congénere BDE-209 es uno de los PBDEs más utilizado. Su importancia reside en que son agregados a múltiples plásticos, de los cuales se liberan fácilmente, causando efectos negativos en el ambiente y en la salud humana. Su producción está regulada por la Convención de Estocolmo por ser contaminantes orgánicos persistentes (POPs por sus siglas en inglés). El caracol manzana, *Pomacea canaliculata*, (Caenogastrópodo de la familia Ampullariidae) ha sido propuesto como un bioindicador de POPs. En este trabajo se expuso a dicha especie a la exposición a corto plazo del congénere BDE-209, en tres concentraciones diferentes (400 (C<sub>1</sub>), 4700 (C<sub>2</sub>) y 8300 (C<sub>3</sub>)  $\mu\text{g g}^{-1}$  de lípido) durante 42 días. Durante dicho tiempo todos los animales sobrevivieron al tratamiento. Se registró un aumento, no significativo, en la frecuencia de las cópulas en el tratamiento C<sub>3</sub>. El porcentaje de huevos embrionados entre tratamientos no arrojó diferencias significativas para ninguna de las concentraciones ensayadas. Sin embargo el registro de puestas mostró una disminución significativa para la concentración C<sub>2</sub>. Para esta última concentración se observó una alteración en la coloración de los huevos, cuyos valores fueron registrados empleando un espectroradiómetro. No se observaron diferencias entre los tratamientos a nivel histológico. Los resultados del presente trabajo son alentadores para explorar eventuales mecanismos de detoxificación que protejan a *Pomacea canaliculata* del BDE-209.

**Palabras clave:** PBDEs – POPs – Ecotoxicología – BDE 209 – *Pomacea*

*canaliculata*

*A mi papá.*

## Agradecimientos

A mi director de tesis, Dr. Eduardo Koch, por la orientación y ayuda que me brindó en la realización de esta tesis, por su apoyo y consejos que me permitieron aprender mucho más que lo estudiado en la elaboración de la misma.

A mi codirector, Dr. Eduardo Albrecht por su apoyo y consejos durante la realización de esta tesis y su redacción.

Al Dr. Néstor Ciocco por su ayuda desinteresada en la búsqueda del tema de tesis, por su sinceridad y responsabilidad a la hora de tomar decisiones.

Al Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas y al Instituto de Nivología, Glaciología y Ciencias Ambientales por el espacio brindado para llevar a cabo el ensayo.

A la Dra. Jorgelina Altamirano por brindarme el alimento necesario para la realización de esta tesis.

A la Dra. Carina González por facilitarme el espectroradiómetro para la obtención más precisa del color de los huevos.

Al Laboratorio de Fisiología del Instituto de Histología y Embriología, especialmente a su director el Dr. Alfredo Castro-Vázquez, por cederme los ejemplares y por permitirme el acceso a sus instalaciones.

A mis compañeros por tantos momentos vividos, en y fuera de la universidad.

A mi familia por su apoyo incondicional, por compartir mis alegrías, tristezas y aprendizajes dentro de la universidad. Principalmente a mis padres que me ayudaron desde el principio a encontrar una carrera y que siempre me impulsaron a seguir para lograr mis objetivos. Dedico esta tesis a la memoria de mi Padre.

<b>Índice</b>	<b>Paginas</b>
Introducción	7
1. <i>Pomacea canaliculata</i>	7
2. PBDEs	9
3. Objetivos	11
Capítulo 1	12
1.1. Introducción	12
1.2. Materiales y Métodos	13
1.2.1. Animales	13
1.2.2. Área de trabajo	13
1.2.3. Acondicionamiento del área de trabajo	13
1.2.4. Vía de administración del PBDE	14
1.2.5. Diseño Experimental	15
1.2.6. Registro de Datos	16
1.2.7. Análisis de los huevos	18
1.3. Resultados	20
1.3.1. Supervivencia	21
1.3.2. Actividad de los acuarios	21
1.3.3. Análisis de los huevos	22
1.3.3.1. Oviposición	22
1.3.3.2. Fertilidad	22
1.3.3.3. Color	23
Capítulo 2	27
2.1. Introducción	27
2.2. Materiales y Métodos	29
2.2.1. Animales y condiciones experimentales	29
2.2.2. Procesamiento de muestras histológicas	29
2.3. Resultados	34
2.3.1. Acuario control hembra-macho	35
2.3.2. Acuario concentración de PBDE-209 de 400 µg g <sup>-1</sup> de lípido hembra-macho	36
2.3.3. Acuario concentración de PBDE-209 de 4700 µg g <sup>-1</sup> de lípido hembra-macho	37
2.3.4. Acuario concentración de PBDE-209 de 8300 µg g <sup>-1</sup> de lípido hembra-macho	38
2.4. Conclusión	39
Capítulo 3. Discusión General	41
Referencia Bibliográfica	44

## Introducción

### 1. *Pomacea canaliculata*

El caracol manzana, *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Fig.1), es un cenogasterópodo de la familia Ampullariidae, que se distribuye por la cuenca inferior del Amazonas y por toda la cuenca del Plata hasta el sur de la provincia de Buenos Aires (Martin et al., 2001); habita en aguas de movimiento lento o estancadas de los pantanos, canales, lagos y ríos (Cowie, 2002).



Figura 1: *Pomacea canaliculata*. Fuente: Creación propia

Es un animal gonocórico con fecundación interna y dimorfismo sexual, presentando hembras de mayor tamaño (Cowie, 2002). La diferenciación entre ambos sexos se logra por la forma de sus opérculos córneos: cóncavos en la hembra y convexos en el macho (Cazzaniga, 1990) (Fig. 2).



Figura 2: Opérculos de *P. canaliculata*; izquierda: hembra y derecha: macho. Fuente: Creación propia.

Son animales ovíparos. La hembra pone huevos sobre substratos elevados, por encima del nivel de agua, probablemente con el objetivo de evitar

depredadores o en respuesta a la baja densidad de oxígeno en sus hábitats acuáticos. Los huevos presentan una coloración rosa intenso, agrupados en racimos de aproximadamente 120 huevos (Fig. 3). Los juveniles recién eclosionados caen al agua y comienzan su vida libre. La eclosión de los huevos ocurre generalmente alrededor de dos semanas después de la oviposición.



Figura 3: Racimo de huevos de *P. canaliculata*. Fuente: creación propia.

Esta especie ha sido introducida en América del Norte, Hawai y Asia para consumo humano y como animal de acuario (Cowie and Holland, 2006; Hayes et al., 2008; Rawlings et al., 2007) convirtiéndose en plaga para los cultivos acuáticos (Joshi and Sebastian, 2006). Son individuos con una gran capacidad de adaptación, lo que los ha posicionado como una especie invasora de importancia; de hecho, es el único molusco que figura en la lista de las 100 peores especies invasoras a nivel mundial (Lowe et al., 2000).

Debido en parte a la abundancia y ubicuidad de esta especie existe abundante literatura acerca de su biología, ecología y control. Algunas de las especies del género, entre ellas *P. canaliculata*, han sido propuestas como bioindicadores<sup>-1</sup> de muchos contaminantes ambientales entre los que están metales pesados y compuestos organometálicos (Giraud-Billoud, 2010; Piyatiratitivorakul et al., 2006; Province, 2006; Takeda, 2000; Vega et al., 2012), como también algunos contaminantes orgánicos persistentes en el<sup>-1</sup> especie cuyos requerimientos ecológicos son bien conocidos y comprendidos que, cuando se encuentra en un área puede proveer información valiosa sobre las condiciones ambientales actuales o pasadas.

ambiente identificados como POPs (Persistent Organic Pollutants) por sus siglas en inglés (Fu et al., 2011; Harmon, 2009).

## 2. PBDEs

Los éteres de difenil polibromados (PBDEs), son un grupo de compuestos químicos industriales que pertenecen a la familia de los retardantes de llama bromados (BFRs) y comprenden 209 congéneres en función del número y posición de sus bromos asociados. La estructura química de los PBDEs está constituida por dos anillos aromáticos unidos entre si y sustituidos con 1 a 10 átomos de bromos (Fig. 4).

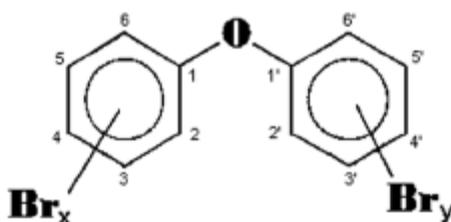


Figura 4: Estructura general de los PBDEs. Fuente: Costa, et al., 2008.

Estas sustancias son agregadas a los plásticos presentes en las placas electrónicas, computadoras, televisores, automóviles y aeronaves, entre otros, para prevenir la ignición del polímero y/o retardar la fase inicial de combustión capturando los radicales libres que son esenciales para la extensión de las llamas (Lana et al., 2010). Pese a sus ventajas en cuanto a la prevención de incendios, estos compuestos han atraído considerablemente la atención pública en las últimas dos décadas debido a su alta persistencia en el ambiente, y al riesgo que representan para la salud humana. Una de las principales razones que ha incrementado la preocupación por la presencia de los PBDEs en el ambiente, se relaciona con datos toxicológicos que

demuestran efectos sobre la salud. Son compuestos con actividad carcinogénica (Barber et al., 2006; Siddiqi et al., 2003; Song et al., 2009), teratogénica (Mhadhbi et al., 2010; Talsness et al., 2005), genotóxica (He et al., 2008; Ji et al., 2011; Olsvik et al., 2009), disrupción endocrina (Gregoraszczyk et al., 2008; Morgado et al., 2007; Vos et al., 2003) y efectos neurotóxicos (Lilienthal et al., 2005). Por tal motivo en el año 2009 fueron incorporados en la lista de nuevos contaminantes orgánicos persistentes (POPs por sus siglas en inglés) reguladas por la Convención de Estocolmo. (<http://chm.pops.int/>).

Los PBDEs se liberan del plástico con relativa facilidad, dado que no están unidos covalentemente al polímero. Debido a sus propiedades fisicoquímicas son persistentes en el ambiente, y se ha demostrado que poseen una gran afinidad por la materia orgánica en suspensión que se halla en los cursos de agua (de Wit, 2002). Se encuentran distribuidos ampliamente en el ambiente, incluyendo aire, sedimentos, agua y biota en diferentes niveles de la cadena trófica (de Wit, 2002). Sus propiedades lipofílicas hacen que se bioacumulen y biomagnifiquen en las cadenas tróficas (Costa et al., 2008; Hu et al., 2010). La facilidad con la que se liberan al ambiente y su elevada vida media ha contribuido a aumentar el interés por su control.

El congénere decabromado (BDE-209) es el más utilizado por la industria en la actualidad como retardante de llama por la menor capacidad de dispersión respecto a otros menos brominados. Esta menor capacidad de dispersión está dada por el alto número de átomos de Br que posee la molécula, lo que dificulta su incorporación en la célula, y por su estabilidad y supuesto carácter inerte (Alcock and Busby, 2006). Sin embargo, se sabe que en el ambiente y por acción de la luz solar (rayos UV), se produce su debrominación a formas menos bromadas y en consecuencia más tóxicas (Shih and Wang, 2009).

Pese a los numerosos estudios realizados a nivel mundial sobre la distribución y concentración de estos contaminantes en el ambiente, Sudamérica y en particular Argentina, cuentan con escasa información sobre la presencia y distribución de estos compuestos en sus sistemas naturales. En el caso de la provincia de Mendoza se han reportado concentraciones relativamente bajas para los congéneres BDE-47, BDE-99, BDE-100 y BDE-153 en muestras de sedimento y agua (Fontana et al., 2010; Lana et al., 2010). Los valores reportados se encuentran dentro del rango esperado para ciudades con poca contaminación y coinciden con los hallados en otras cuencas de Argentina como por ejemplo la del Río Negro, en Patagonia (Miglioranza et al., 2013).

### 3. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo de tesis de grado fue explorar los efectos tóxicos del congénere BDE-209, identificado como el más inocuo para el ambiente y en consecuencia el más utilizado actualmente como retardador de llama, sobre la especie *Pomacea canaliculata*. ensayar

Para esto se desarrollaron los siguientes objetivos particulares: i) Experimentar una exposición a corto plazo de tres dosis de BDE-209, con la dosis media igual a la mayor reportada para ambientes donde habita *P. canaliculata* (Fu et al., 2011), ii) Indagar en la toxicidad de BDE-209 sobre la oviposición y fertilidad de los huevos de la especie *P. canaliculata*; iii) Investigar posibles alteraciones en la histología de las gónadas de la especie *P. canaliculata* expuesta a tres dosis de BDE-209 .

Los objetivos i) y ii) se desarrollan en el Capítulo 1 y el iii) en el Capítulo 2. En el capítulo 3 se presenta una Discusión general.

# Capítulo 1.

## 1. 1. Introducción

Los estudios toxicológicos en animales se pueden dividir en tres grandes categorías (Lu and Kacew, 1991) en función del tiempo y de la forma de administración de un tóxico en particular. La primera consiste en la administración de una sustancia de ensayo en una única vez o en varias administraciones en un período de 24 horas; este estudio se emplea para evaluar toxicidad aguda. La segunda, a corto plazo, implica administraciones repetidas durante un período de tiempo equivalente a alrededor del 10% de la esperanza de vida del animal. Por último, a largo plazo o toxicidad crónica, lo que implica administraciones repetidas a lo largo del tiempo ya sea durante toda la vida del animal o bien en una fracción importante de su vida. La mayoría de los estudios de toxicidad aguda tienen por objeto determinar la llamada “dosis letal 50” (DL50) que consiste en la cantidad necesaria de una sustancia para matar a la mitad de los animales del grupo experimental. El valor de la DL50 se expresa en términos de la masa de la sustancia de ensayo por unidad de peso del animal (mg / kg).

En este capítulo exploramos la toxicidad del BDE-209 sobre *P. canaliculata* y su eventual efecto sobre la oviposición e influencia sobre el número de huevos embrionados en cada racimo mediante una exposición prolongada. Si consideramos que la bibliografía menciona una expectativa de vida de aproximadamente 25 meses (Liu et al., 2012), la duración del experimento, si bien menor al 10% de la expectativa de vida, es suficiente como para considerar una exposición a corto plazo y no una intoxicación aguda.

## 1. 2. Materiales y Métodos

### 1. 2. 1. Animales

Los animales utilizados en el experimento provinieron de una línea de cultivo mantenida en el laboratorio de Fisiología del Instituto de Histología y Embriología (IHEM-CONICET-UNCUYO) originada a partir de individuos recolectados a principios de los `90 en el Lago del Rosedal (Palermo, Buenos Aires). El transporte de los mismos se realizó en uno de los acuarios que se utilizó en el experimento, provisto de tapa para evitar la fuga. Ejemplares de la población original y de la colonia actual (todos ellos preservados en alcohol) se encuentran depositados en la colección de invertebrados del Museo Argentino de Ciencias Naturales (Buenos Aires, lotes MACN-In 35707 y MACN-In 36046 respectivamente).

### 1. 2. 2. Área de trabajo

El experimento se efectuó en las instalaciones del Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas (IADIZA) y del Instituto Argentino de Nivología, Glaciología y Ciencias Ambientales (IANIGLA), dependientes del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

### 1. 2. 3. Acondicionamiento del área de trabajo

El ensayo comenzó con la aclimatación de los animales a las condiciones experimentales. Los ejemplares fueron colocados en 4 acuarios a razón de 7 (5 ♀ y 2 ♂) animales por acuario, los cuales presentaban un rango de longitud mayor de 40 mm ( $\pm 5$ ). Cada uno de 14 por 23,5 cm de lado y 7 cm de profundidad, conteniendo aproximadamente 800 cm<sup>3</sup> de agua (3 cm), dotados

de una tapa (con perforaciones para asegurar el intercambio de gases) para evitar la fuga. El agua fue renovada diariamente y alimentados *ad-libitum* con alimento comercial para peces (ver punto 1.2.4.). Los acuarios fueron mantenidos a una temperatura ambiente de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  y fotoperiodo natural. Dicha temperatura fue lograda mediante un artefacto eléctrico de calefacción, controlado con un termostato, y fue registrada con un termómetro de mínima y máxima diariamente. Respecto a la iluminación no se incorporó luz artificial, sino que se utilizó la luz natural que ingresaba a la habitación, el experimento ocurrió durante los meses de setiembre-octubre (régimen: 14 horas luz, 10 oscuridad).

Los caracoles fueron mantenidos en las condiciones descritas durante 7 días para su aclimatación. Durante este periodo los animales fueron sometidos a una manipulación similar a la necesaria para la recolección de datos con el fin de acostumbrarlos al estrés que conlleva la misma.

#### 1. 2. 4. Vía de administración del PBDE

Los animales fueron alimentados *ad-libitum* con alimento balanceado comercial para peces en pellet marca Peische Car (Shullet) (Fig.5).



Figura 5: Alimento en acuario. Fuente: creación propia.

Pasado el período de aclimatación se suministró alimento tratado con tres dosis diferentes de BDE-209 durante 42 días, identificadas como C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>.

El alimento fue preparado y cedido por la Dra. Jorgelina Altamirano del IANIGLA. Para preparar las concentraciones que se utilizaron, se adicionaron a 100 gramos de alimento balanceado para cada tratamiento: 0,6 ml (C<sub>1</sub>), 6,0 ml (C<sub>2</sub>) y 60 ml (C<sub>3</sub>) de una solución 1700 mg/L de BDE-209 preparada en tolueno conforme solventes utilizados en experiencias similares (La Guardia et al., 2006; Stapleton et al., 2006). Posteriormente cada lote de alimento fue secado en estufa hasta evaporación del solvente. La concentración final de BDE-209 en los pellets fue de 400 (C<sub>1</sub>), 4700 (C<sub>2</sub>) y 8300 (C<sub>3</sub>) µg g<sup>-1</sup> de lípido (l.w.).

#### 1. 2. 5. Diseño experimental

Antes de dar comienzo a la investigación y al concluir la misma se registró el peso de cada individuo por acuario y por sexo, utilizando una balanza analítica, en la cual luego de secar a los caracoles se procedió a pesar a cada ejemplar.

El acuario uno (1) se utilizó como control por lo que se le administró alimento balanceado no tratado con dosis de BDE- 209 y a los acuario dos (2), tres (3) y cuatro (4) se les administró el alimento balanceado enriquecido con BDE-209 con las concentraciones C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> respectivamente según protocolo utilizado previamente (Koch et al., 2013).

Diariamente se realizó el recambio de agua con agua de la red (de un termotanque a 20-25 °C). Además se realizó diariamente la limpieza de los acuarios que consistió en enjuagar con agua, evitando la proliferación de musgos y bacterias en los mismos y descartando el sobrante de alimento, los huevos caídos al agua y las heces de los caracoles. Antes de realizar dichas actividades se procedía a la recolección de datos (ver 1.2.6), los cuales se fueron asentando en un cuaderno de campo.

Al finalizar el experimento los animales fueron sacrificados mediante sedación por hipotermia, la que consistió en la disminución gradual de la temperatura corporal por inmersión en un baño con hielo, hasta la detención del corazón. Esta situación es reversible con el aumento de la temperatura. Una vez relajado el animal, se separó el tejido blando de la conchilla (Fig. 6). Se tomaron muestras de testículo, ovario y glándula digestiva que fueron conservados individualmente en un fijador (ver punto 2.2.2) para realizar estudios histológicos sobre las gónadas (Capítulo 2).



Figura 6: Proceso de separación del tejido blando del caparazón del caracol *P. canaliculata*. Fuente: creación propia.

#### 1. 2. 6. Registro de datos

Durante el experimento se llevó un registro diario de la supervivencia, la cantidad de cópulas, la actividad de los caracoles, el número de racimos (=puesta) y la temperatura máxima/mínima de la habitación. Los racimos fueron recolectados para conteo de huevos y evaluación del porcentaje de fertilidad (ver punto 1.2.7.). La identificación de animales vivos o muertos se realizó mediante simple observación.

Para registrar la cantidad de cópulas se diferencié entre montura o cópula propiamente dicha. Se identificó como cópula cuando el macho se posa sobre la hembra e introduce la vaina del pene en la cavidad paleal de la hembra. Se

supone que en esta situación el macho deposita el líquido espermático por medio de su órgano protractil (pene). Por el contrario, se definió montura a la situación semejante en la que no había introducción de la vaina peneana en la cavidad de la hembra. Cabe mencionar que la duración de las cópulas en la especie oscila entre 10-18hrs (Albrecht, 1998).

La actividad de los caracoles se registró, teniendo en cuenta las siguientes situaciones: fuera del agua (indicador de posible estrés), sumergido (condición normal), cuerpo desplegado fuera de la conchilla (activos) y cuerpo retraído dentro de la conchilla (inactivos). Se registró también la ubicación o distribución de los caracoles en cada acuario. En caso de presentar un caracol fuera del agua se procedió a identificar si el mismo era hembra o macho, debido a que una hembra fuera del agua puede significar que la misma está oviponiendo.

Con respecto a los racimos, cada uno fue retirado del acuario, identificado y colocado en portaobjetos para su análisis. Teniendo en cuenta que los racimos de huevos son depositados sobre las paredes del acuario, se consideraron sólo aquellos que al momento de recolección estuvieran sobre el nivel del agua (Fig. 7), descartando cualquier huevo o porción de racimo que se encontrara sumergido. Este criterio fue adoptado para poder comparar la producción total de huevos por tratamiento.

La temperatura de la habitación se monitoreó con un termómetro de máxima y mínima, que diariamente fue reseteado. Se debe tener en cuenta que a la habitación solo se ingresaba para realizar las labores experimentales descritas, por lo que las temperaturas registradas no sufrían variaciones significativas por ingreso/egreso de personal ni se producía estrés adicional a los animales.



Figura 7: Hembra de *P. canaliculata* oviponiendo. Fuente: creación propia.

### 1. 2. 7. Análisis de los huevos

El análisis de los huevos incluyó 3 aspectos, el número total, el color y el porcentaje de huevos embrionados por racimo.

Los racimos fueron recolectados diariamente y ubicados en portaobjetos identificados con el número de acuario, fecha y número de racimo, debido a que un mismo acuario podía presentar más de uno. Todos ellos fueron registrados fotográficamente con una cámara digital (Fig.8).

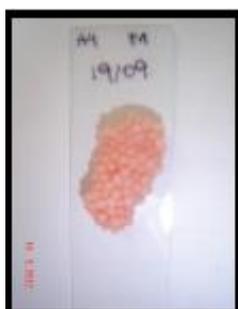


Figura 8: Identificación de racimo de *P. canaliculata* en portaobjeto. Fuente: creación propia.

Durante el primer tercio del experimento se registró el color de los huevos, antes de manipularlos, mediante el uso de un espectroradiómetro (Ocean

Optics Inc.). El propósito de estos registros fue explorar eventuales variaciones de color atribuibles a la intoxicación con BDE-209 (Fig.9). El registro de esta variable se discontinuó debido a dificultades en el acceso al equipo.



Figura 9: Tomando registro del color del racimo de *P. canaliculata* con espectroradiómetro. Fuente: creación propia.

Luego del registro del color, se procedió a contar los huevos de cada racimo con sumo cuidado, intentando no romper ningún huevo. Se los contabilizó a ojo desnudo o con la ayuda de una lupa. A continuación se tomaron 20 huevos de diferentes sitios de un mismo racimo (siempre que fuera posible) para determinar el porcentaje de huevos embrionados. La determinación se realizó bajo un microscopio estereoscópico y consistió en fragmentar la cáscara de huevo con pequeños fórceps para extraer el albumen del huevo (fracción que le da el característico color rosado al huevo) donde se buscó el embrión. Las observaciones al microscopio se realizaron durante las primeras etapas de desarrollo embrionario, en las cuales el albumen se observa como una zona translúcida que contiene el esperma y rodea al embrión (Fig. 10).



Figura 10: Gástrula rodeada por una zona translúcida que contiene esperma. Barra= 100  $\mu$ m. Fuente: Koch, 2009.

Se consideraron tres condiciones posibles en cada huevo: “embrionado”, es decir con embrión presente, “no embrionado” (embrión ausente) y “roto” cuando el huevo estaba seco, lo que impedía contabilizar 20 huevos embrionados o no embrionados para la muestra.

Los portaobjetos con los huevos sobrantes se guardaron para registrar la fecha de eclosión. No se tomó el porcentaje de eclosionados debido a que la manipulación de los racimos produjo la ruptura de gran porcentaje de los huevos.

### 1. 3. Resultados

Concluido el ensayo se procedió a la evaluación de los parámetros recolectados durante todo el experimento. Todos los animales subieron de peso, los pesos por acuario expresados en peso inicial ( $\pm$  desvió estándar) – peso final ( $\pm$  desvió estándar) fueron: **Acuario 1:** 14,23 g ( $\pm$  5,3) – 18,13 g ( $\pm$  3,77); **Acuario 2:** 12,67 g ( $\pm$  3,2) – 16,21 g ( $\pm$  2,7); **Acuario 3:** 12,64 g ( $\pm$  4,21) – 17,17 g ( $\pm$  2,27) y **Acuario 4:** 12,33 g ( $\pm$  2,38) – 16,41 g ( $\pm$  3,33).

### 1.3.1. Supervivencia

La mortalidad durante el experimento fue nula durante los 42 días que duró la exposición al tóxico.

### 1.3.2. Actividad de los acuarios.

Del registro de actividad por acuario no se pudieron identificar situaciones compatibles con estrés para ninguno de los casos. Dado que en todos los tratamientos los animales estuvieron activos, se alimentaron consumiendo casi la totalidad del alimento suministrado en todos los acuarios y no se observó crecimiento bacteriano (blooms) en ninguno de los casos.

Respecto a las copulas se registraron en los acuarios de concentraciones  $C_1$ ,  $C_2$  y  $C_3$  siendo nulo el registro para el grupo control (Fig. 11). Si se realiza un análisis estadístico para la frecuencia de las cópulas (Chi cuadrado) teniendo en cuenta el registro diario durante los 42 días, el resultado es que no hay diferencias significativas entre los grupos tratados.

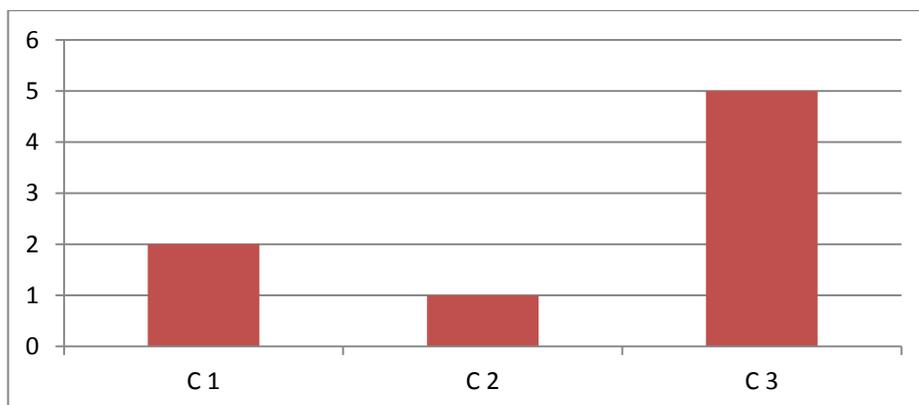


Figura 11: Cantidad de copulas de *P. canaliculata* respecto a la concentración de PBDE-209.

### 1.3.3. Análisis de los huevos

#### 1.3.3.1. Oviposición

La Figura 12 muestra el número de racimos registrados durante el experimento por acuario. Los valores registrados en los acuarios con la menor y la mayor concentración de BDE-209 ( $C_1$  y  $C_3$  respectivamente) no difirieron significativamente de los valores registrados en el grupo control (Kruskal-Wallis,  $P < 0.05$ ). El acuario expuesto a la concentración media ( $C_2$ ) difirió significativamente de los demás (Test de comparaciones múltiples de Dunn,  $P < 0.05$ ).

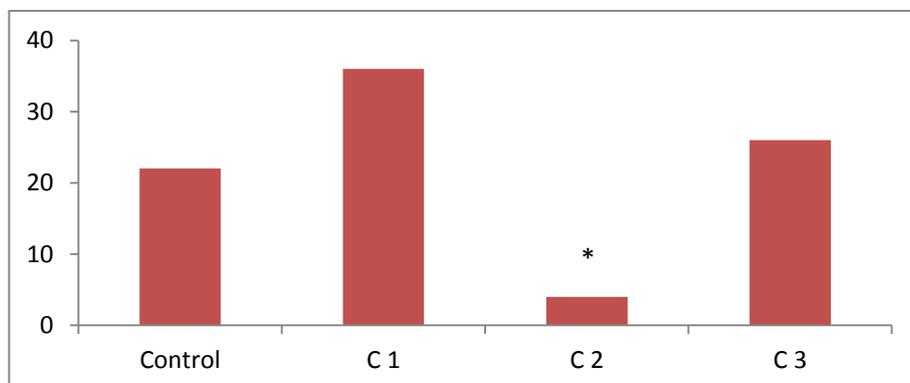


Figura12: Número de racimos de *P. canaliculata* respecto a la concentración de PBDE-209.

#### 1.3.3.2. Fertilidad

De la recolección diaria de los racimos se obtuvieron el porcentaje de huevos embrionados, no embrionados y rotos. En la Tabla 1 se puede ver el porcentaje de huevos embrionados, observando que en casi el 80% para todos los casos los huevos presentaron embrión.

Tratamiento	Total de huevos contabilizados por tratamiento	Total de huevos estudiados	Porcentaje de huevos embrionados (%)	Número de huevos embrionados	Número de huevos no embrionados	Número de huevos rotos
<b>Control</b>	1781	418	78,2	327	28	63
<b>C<sub>1</sub></b>	2743	680	78,5	534	95	51
<b>C<sub>2</sub></b>	323	80	76,3	61	19	-
<b>C<sub>3</sub></b>	2802	498	77,51	386	70	42

Tabla 1: Total de huevos, cantidad de huevos estudiados para determinar el % de embrionados, % de huevos embrionados y números de huevos para las condiciones embrionado, no embrionado y roto por tratamiento.

Del análisis estadístico realizado sobre el total del número de embriones por racimo se observa que no hay diferencia significativa entre el control y las tres concentraciones de BDE-209 (Kruskal-Wallis,  $P < 0.05$ ).

#### 1.3.3.3. Color

Respecto al color de los huevos se realizó un registro fotográfico y otro con un espectroradiómetro.

##### Registros de color mediante fotografía

En las Figuras 13 a 16 se muestran las variaciones extremas de color en los racimos del grupo control y de las tres concentraciones de BDE-209 registradas fotográficamente para cada racimo identificado.



Figura 13: Variaciones extremas de color en los racimos de *P. canaliculata* correspondientes al control.



Figura 14: Variaciones extremas de color en los racimos de *P. canaliculata* correspondientes al tratamiento C<sub>1</sub> (concentración de BDE-209 de 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  de lípido)



Figura 15: variaciones extremas de color en los racimos de *P. canaliculata* correspondientes al tratamiento C<sub>2</sub> (concentración de BDE-209 de 4700  $\mu\text{g g}^{-1}$  de lípido).



Figura 16: Variaciones extremas de color en los racimos de *P. canaliculata* correspondientes al tratamiento C<sub>3</sub> (concentración de BDE-209 de 8300  $\mu\text{g g}^{-1}$  de lípido).

#### Registros de color mediante espectroradiómetro

En el estudio de la percepción del color, uno de los primeros espacios de color matemáticamente definidos es el CIE 1931 XYZ, creado por la Comisión

Internacional de Iluminación (CIE) en 1931 (Smith and Guild, 1931). El espectroradiómetro cuantifica el color en base a tres dimensiones, X, Z e Y, las que se asocian al rojo (X), al azul (Z) y a la luminosidad (Y). Se decidió inicialmente realizar la comparación entre los valores registrados para la dimensión X que se asocia al rojo. Los valores registrados para los racimos de los acuarios con la menor y la mayor concentración de BDE-209 ( $C_1$  y  $C_3$  respectivamente) no difirieron significativamente respecto a los valores del grupo control (Kruskal-Wallis,  $P < 0.05$ ). Los racimos provenientes del acuario expuesto a la concentración media ( $C_2$ ) difirió significativamente de las demás (Test de comparaciones múltiples de Dunn,  $P < 0.05$ ). El análisis mencionado se extendió a las otras dos dimensiones (Y y Z) en las que se repitió el patrón descripto para la dimensión de color X.

## Capítulo 2.

### 2. 1. Introducción

En este capítulo exploramos posibles alteraciones histológicas en las gónadas de ejemplares del caracol manzana *Pomacea canaliculata* expuestos a BDE-209. Si bien existen numerosos reportes sobre la acción de los PBDEs sobre la fisiología reproductiva de diferentes especies tanto de artrópodos, anfibios, peces, aves y mamíferos (Law et al., 2008), no existen antecedentes similares sobre *P. canaliculata* por efectos de este disruptor endocrino ni de cualquier otro de los 208 congéneres restantes de PBDEs.

Los disruptores endocrinos son productos químicos sintéticos que pueden imitar o bloquear hormonas que interfieren con el sistema endocrino y tarde o temprano comprometer procesos biológicos cruciales. La contaminación creciente en la biosfera, con potenciales disruptores endocrinos representa una amenaza seria a poblaciones naturales y para el ser humano (Morgado et al., 2007) a la que pueden llegar vía cadena alimenticia. Debido a esto actualmente dicha contaminación ambiental es un tema de preocupación.

Las investigaciones que se han realizado, hasta el momento, sobre posibles alteraciones histológicas por efecto de PBDE en gónadas de animales, han sido sobre la rana leopardo de América del Norte *Rana pipiens* y sobre la carpa común silvestre *Cyprinus carpio*, que habita en el Lago Erie de EEUU. Se estudiaron los efectos del congénere BDE-71 (tetrabromado) sobre el desarrollo gonadal de la *R. pipiens*, en el cual no se detectaron aumento de la incidencia de anomalías gonadales (Van Schmidt et al., 2012). En la investigación sobre *C. carpio* se analizaron concentraciones de PCBs y PBDEs en el plasma, músculo e hígado para evaluar la exposición a estos productos químicos a través de interacciones de hábitat, además se

realizaron investigaciones histológicas sobre los testículos de *C. carpio*, las cuales no mostraron anomalías gonadales (Pérez-Fuentetaja et al., 2010). Los mismos resultados se obtuvieron para otros disruptores endocrinos tales como el tributilestaño (TBT) y el trifenilestaño (TPT) sobre *P. canaliculata* (Giraud-Billoud et al., 2013). Por otro lado, se postuló un particular fenómeno, imposex, que consiste básicamente en el desarrollo por parte de la hembra de estructuras masculinas (pene) como consecuencia a la exposición a TBT (Gamarra-Luques et al., 2013; Takeda, 2000).

El presente estudio se llevó a cabo mediante una técnica histológica, que consiste en una serie secuencial de pasos a través de los cuales una muestra de tejido llega a transformarse en delgados cortes coloreados capaces de ser observados al microscopio. Las muestras histológicas estuvieron compuestas de glándula digestiva, testículo y ovarios. La glándula digestiva de *P. canaliculata* presenta corpúsculos pigmentados denominados C y K (fig. 16). Los corpúsculos C son esferas que miden entre 11 y 13  $\mu\text{m}$  de diámetro y presentan coloración entre verdosa y marrón. En cambio los corpúsculos K tienen forma de clava y miden entre 35  $\mu\text{m}$  de largo y 13  $\mu\text{m}$  de ancho. La coloración típica de los corpúsculos K es marrón oscuro (Koch et al., 2006). Investigaciones llevadas a cabo en el Área de Fisiología Normal de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo, dirigidas por el Dr. Alfredo Castro-Vázquez y colaboradores, revelaron que estos corpúsculos podrían ser organismos procarióticos simbióticos y demostraron que los mismos tienen capacidad para acumular metales pesados (Vega et al., 2012).



Figura 16: Corpúsculos, a la derecha, C y K, a la izquierda. Fuente: Koch, 2006.

## 2. 2. Materiales y métodos

### 2. 2. 1. Animales y condiciones experimentales

Ver punto 1.2.3

### 2. 2. 2. Procesamiento de muestras histológicas

Para la obtención de las muestras histológicas se tomó una muestra de tejido de unos 5mm de grosor que incluyó el ovario y glándula digestiva para las hembras y testículo con una porción de glándula digestiva para los machos. La razón de incluir en la muestra a la glándula digestiva fue doble, por un lado, dado que el ovario está incluido en ella, resulta imposible disecarlo sin dañar los túbulos ováricos en el caso de las hembras, y por otro lado presenta un buen control para descartar posibles artefactos de fijación. Para el caso de los machos, en los que el testículo es fácilmente reconocible y aislable del resto se incluyó en el taco por el mismo motivo de control frente a posibles artefactos de la técnica.

Luego de obtener las muestras de testículo, ovario y glándula digestiva, las mismas, se fijaron en líquido de Bouin débil por un periodo de 7 días a 4° C. Se eligió dicho fijador debido a que ya había sido probado para estos órganos

en el animal utilizado. El líquido de Bouin débil está formado por una mezcla de ácido acético, formol y ácido pícrico. El objetivo de la fijación fue detener la vida de las células e impedir las modificaciones *post-mortem* que puedan sufrir las células (procesos autolíticos), manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos.

Los tejidos fijados adquirieron cierta consistencia y dureza, pero no la suficiente para que, de ellos, se pueda obtener secciones delgadas del orden de algunas milésimas de milímetros (5 a 10  $\mu\text{m}$ ). Esto se logró cuando los tejidos fueron infiltrados con sustancias denominadas “de inclusión” y adquirieron tal dureza que sometidos al filo de una navaja se produjeron láminas sumamente delgadas y transparentes.

Las denominadas sustancias “de inclusión” tienen la propiedad de incorporarse e infiltrarse al interior de las células y tejidos con la finalidad de servirles de soporte. Así los tejidos y la sustancia de inclusión forman un bloque homogéneo en dureza y consistencia, a pesar que sus componentes tuvieron originalmente distinta dureza.

Los pasos que se siguieron para la inclusión de las muestras en parafina fueron:

Deshidratación: implicó extraer o remover el agua de los tejidos fijados. La deshidratación debió ser completa debido a que la parafina (medio de inclusión) es hidrófoba. Para tal fin se deshidrataron las muestras en baños sucesivos en soluciones de concentraciones crecientes de alcohol etílico, hasta alcohol 100.

Diafanización: las muestras deshidratadas, al comenzar esta etapa, se encontraban totalmente embebidas en alcohol etílico absoluto; pero debido a que la parafina no es soluble en alcohol fue necesario reemplazar el alcohol etílico por alguna sustancia que fuera capaz, simultáneamente, de mezclarse

con el alcohol y disolver la parafina. Estas sustancias se denominan líquidos diafanizadores o intermediarios. En este caso se eligió utilizar xileno. La diafanización de los tejidos deshidratados se debe a que estas sustancias poseen un alto índice de refracción y al interactuar con los tejidos los vuelven transparentes.

Inclusión y formación del bloque de parafina o “entacado”: La penetración de la parafina al interior de los tejidos se efectúa cuando ésta se encuentra en estado líquido. Por lo mismo se procedió a colocar en estufa y por veinticuatro (24) horas el tejido en parafina a fin de asegurar que esta penetre en el tejido. Luego de esto, se tomó el tejido y se realizó el entacado o formación del bloque que se efectuó empleando moldes de papel. En el bloque de parafina se debió orientar correctamente la muestra para facilitar la obtención de las secciones o “cortes”. El molde se llenó con parafina caliente pura; con una pinza calentada en un mechero se tomó una pieza de tejido y se orientó una de sus superficies (aquella que se pondrá en contacto con el filo de la navaja) y se sumergió al interior del molde, teniendo especial cuidado de eliminar todo el aire del tejido para permitir una penetración compacta de la parafina.

Cortes de los bloques de parafina: Las secciones delgadas o “cortes” se obtuvieron utilizando un micrótopo rotativo (fig. 17). El movimiento que se realizaba para obtener los cortes era vertical. El mecanismo que sujetaba al bloque de parafina era el que se desplazaba y la navaja permanecía estática. Dicho micrótopo permitió obtener secciones delgadas, del orden de 5 a 8  $\mu\text{m}$  de espesor y produjo cortes seriados, es decir, cuando se obtenía un corte, éste quedaba adherido por su borde anterior al borde posterior del que lo precedió; formándose de esta manera una cinta de cortes que iba descendiendo por la superficie anterior del soporte de la cuchilla.



Figura 17: Micrótopo HM-325. Fuente: creación propia.

Extensión y adhesión de los cortes al portaobjetos: Los cortes obtenidos, en forma de cintas, generalmente se presentaban arrugados y mostraban un área menor que la que poseían en la inclusión, por lo que fue necesario extenderlos y luego adherirlos al portaobjetos. Los cortes se extendieron al depositarlos sobre la superficie del agua entre 40° a 45° C. En caso que ciertas arrugas persistían, se empleaban unas pinzas finas o un pincel de pelo de camello, para ejercer una ligera tracción entre los extremos de los cortes y así desarrugarlos totalmente. Los portaobjetos fueron dejados por 10 horas en una estufa a 37°C para lograr una buena adhesión de los cortes al vidrio.

Tinción: La elegida fue la Hematoxilina-Eosina. Dicha coloración se considera como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos, a través del microscopio óptico.

El procedimiento que se siguió fue: desparafinar los cortes, para eliminar el sobrante de parafina, lo cual se realizó embebiendo la muestra en xileno durante tres (3) minutos (fig. 18). Luego se hidrataron los cortes, debido a que la laca utilizada (Hematoxilina de Harris) es hidrosoluble lo mismo que la eosina, para lograr esto se procedió a hidratar paulatinamente la muestra, primero con alcohol 96° durante tres (3) minutos y luego en agua destilada por

un (1) minuto. En el paso siguiente se tiñeron las muestras con hematoxilina, para lo cual se incubó el tejido en hematoxilina de Harris durante cinco (5) minutos. Luego se realizó un rápido paso por una solución diluida de amoníaco (pH 8) para lograr la diferenciación de la laca (el tejido pasa de rojizo al azul). Previo a la incubación con una solución de Eosina se realizó un rápido pasaje por una solución diluida de ácido acético (pH 4) para facilitar la penetración de la Eosina. Posteriormente se coloreo con una solución acuosa de Eosina durante tres (3) minutos. A continuación se lavó en agua destilada durante un (1) minuto. Para poder colocar el medio de montaje (Eukitt), que es hidrófobo, fue necesario deshidratar nuevamente el tejido. Para ello las muestras se incubaron primero en alcohol etílico 96° durante un (1) minuto y luego se completó la deshidratación empleando carboxilol durante tres (3) minutos. Este paso tiene por objeto lograr la deshidratación completa para permitir la inclusión en el líquido de montaje lo mismo que servir como antiséptico (el fenol) para evitar la formación de hongos y consecuente daño de los cortes.



Figura 18: Baterías de coloración. Fuente: creación propia.

Realizada la coloración y el montado el preparado se pudo, finalmente, observarlo al microscopio óptico (Nikon Alpha Phot-2 IS2 equipado con una cámara de video digital Nikon).

## 2. 3. Resultados

Los resultados que se obtuvieron en este capítulo fueron registrados en imágenes, captadas con un microscopio. En este apartado, sólo, se muestran las fotos más representativas para testículo, ovario o glándula digestiva de *P. canaliculata* (fig. 19) de los cortes histológicos ordenados por tratamiento y sexo (fig.20-27).

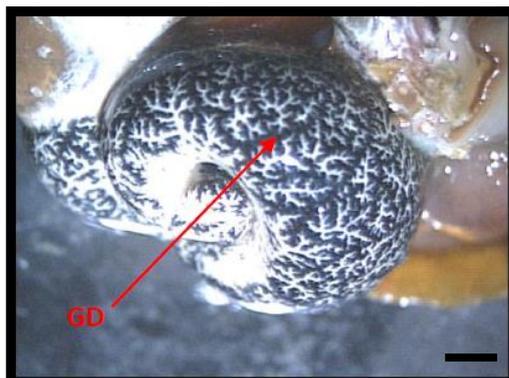


Figura 19: Glándula digestiva de *Pomacea canaliculata*. Barra 1mm. Fuente:  
Creación propia.

2. 3. 1. Acuario control hembra –macho

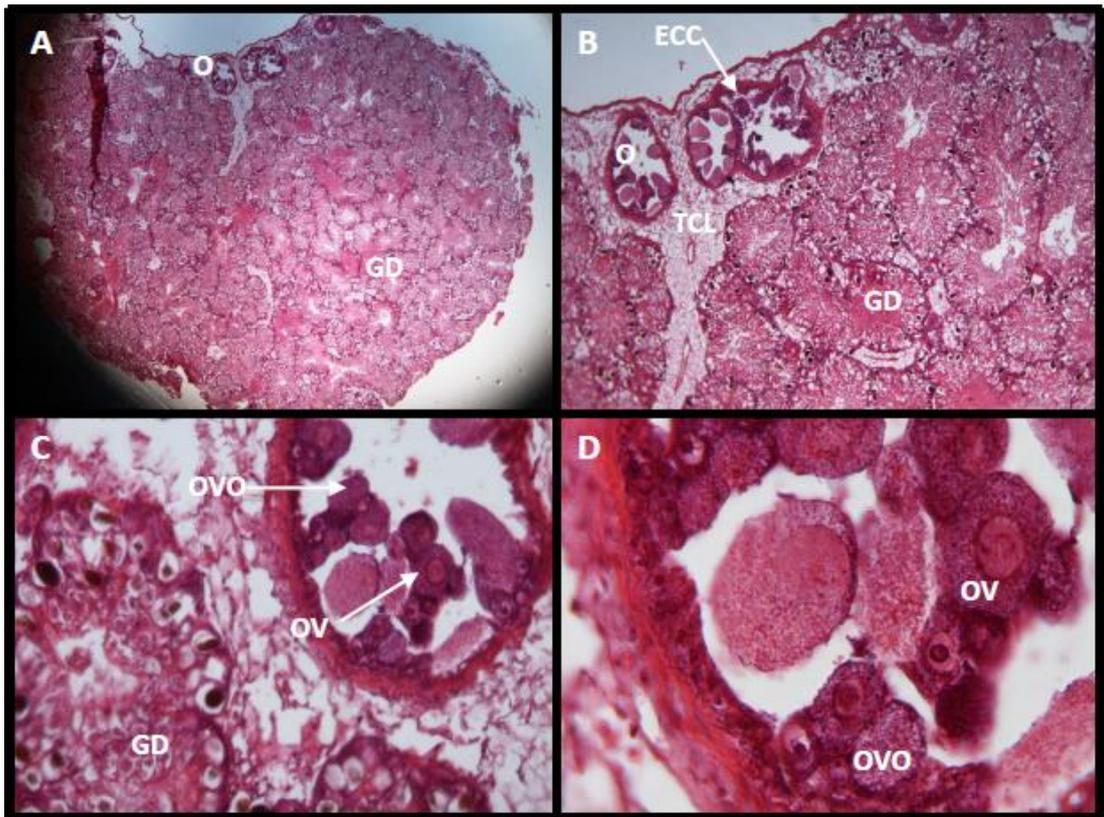


Figura 20: Hembra: A: 4X; B: 10X; C: 40X y D: 100X. GD: Glándula Digestiva, O: Ovario, TCL: Tejido conjuntivo laxo, ECC: Epitelio cilíndrico ciliado, OV: Ovocitos, OVO: Ovogonias.

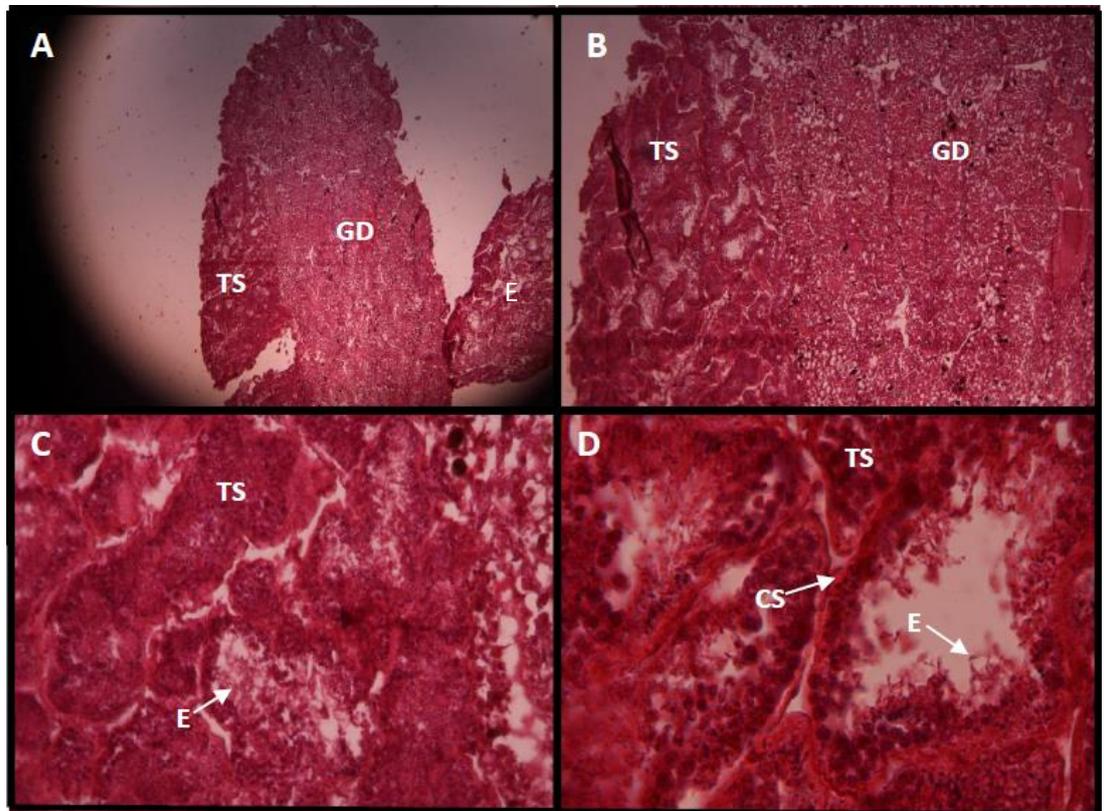


Figura 21: Macho: A: 4X; B: 10X; C: 40X y D: 100x. GD: Glándula Digestiva, TS: Túbulos seminíferos, E: Espermatozoides, CS: Células de Sertoli.

2. 3. 2. Acuario concentración de BDE-209 de  $400 \mu\text{g g}^{-1}$  de lípido (C<sub>1</sub>)  
 hembra – macho.

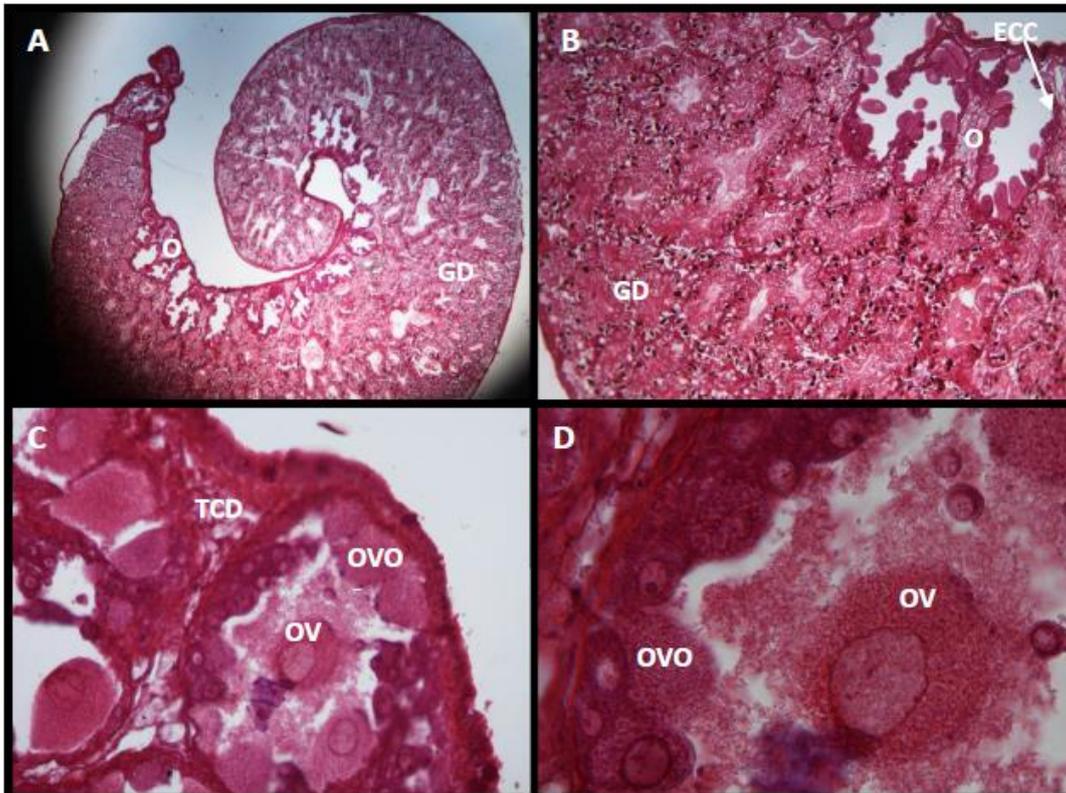


Figura 22: Hembra: A: 4X; B: 10X; C: 40X y D: 100x. GD: Glándula Digestiva, O: Ovário, ECC: Epitelio cilíndrico ciliado, TCD: Tejido conjuntivo denso, OV: Ovocitos, OVO: Ovogonias.

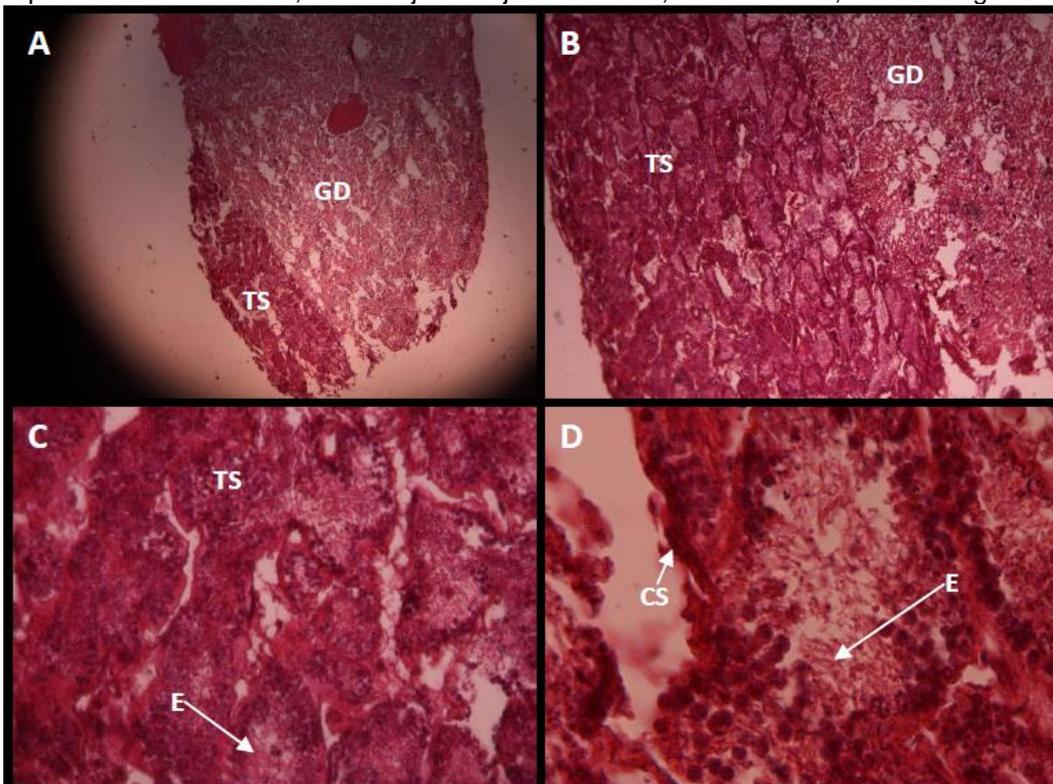


Figura 23: Macho: A: 4X; B: 10X; C: 40X y D: 100X. GD: Glándula Digestiva, TS: Túbulos seminíferos, E: Espermatozoides, CS: Células de Sertoli.

2. 3. 3. Acuario concentración de BDE-209 de  $4700 \mu\text{g g}^{-1}$  de lípido ( $\text{C}_2$ )  
 hembra – macho.

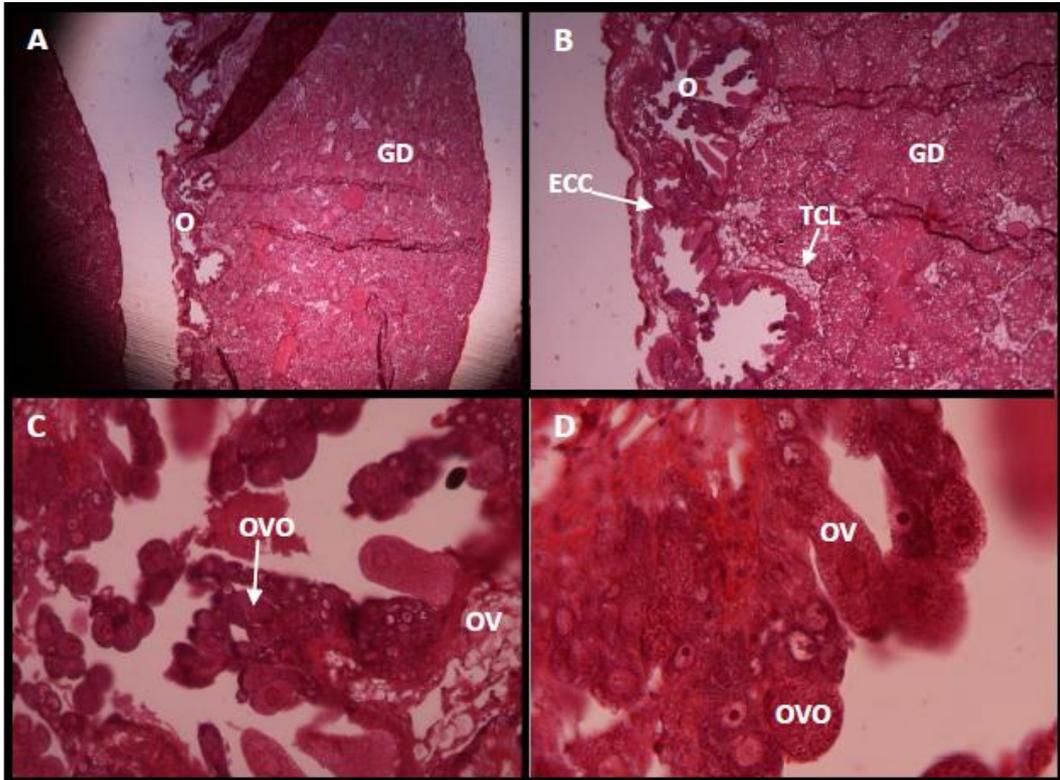


Figura 24: Hembra: A: 4X; B: 10X; C: 40X y D: 100X. GD: Glándula Digestiva, O: Ovário, TCL: Tejido conjuntivo laxo, ECC: Epitelio cilíndrico ciliado, OV: Ovocitos, OVO: Ovogonias.

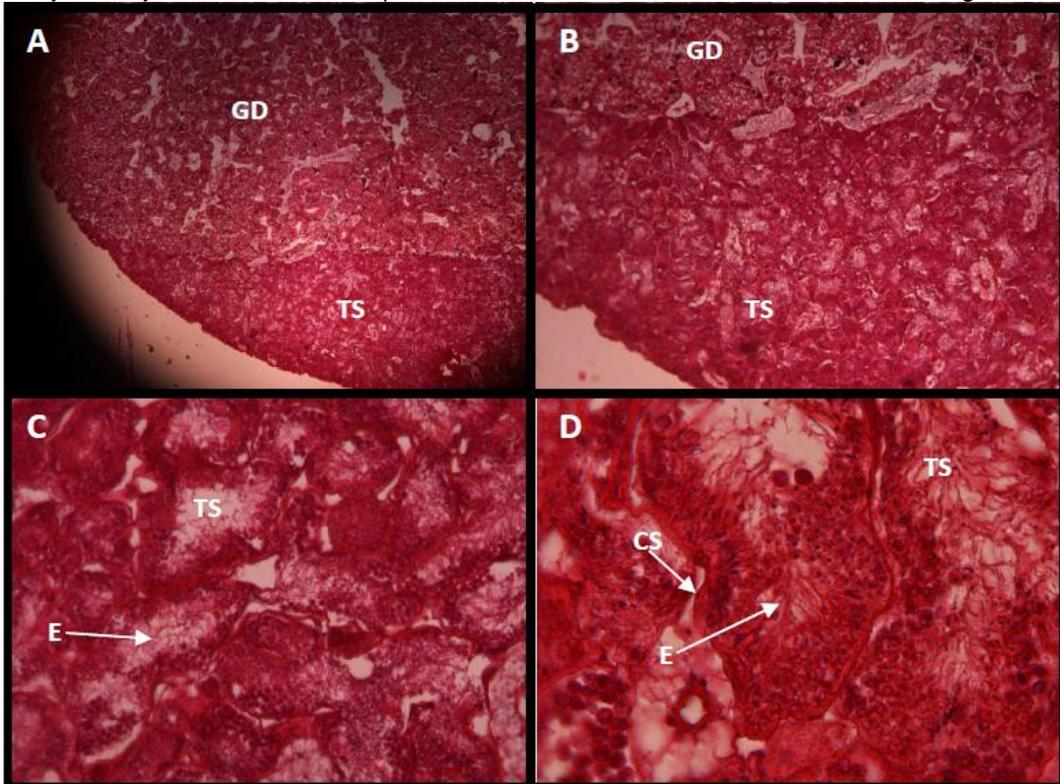


Figura 25: Macho: A: 4X; B: 10X; C: 40X y D: 100X. GD: Glándula Digestiva, TS: Túbulos seminíferos, E: Espermatozoides, CS: Células de Sertoli.

2.3.4. Acuario concentración de BDE-209 de  $8300 \mu\text{g g}^{-1}$  de lípido ( $\text{C}_3$ )  
 hembra – macho.

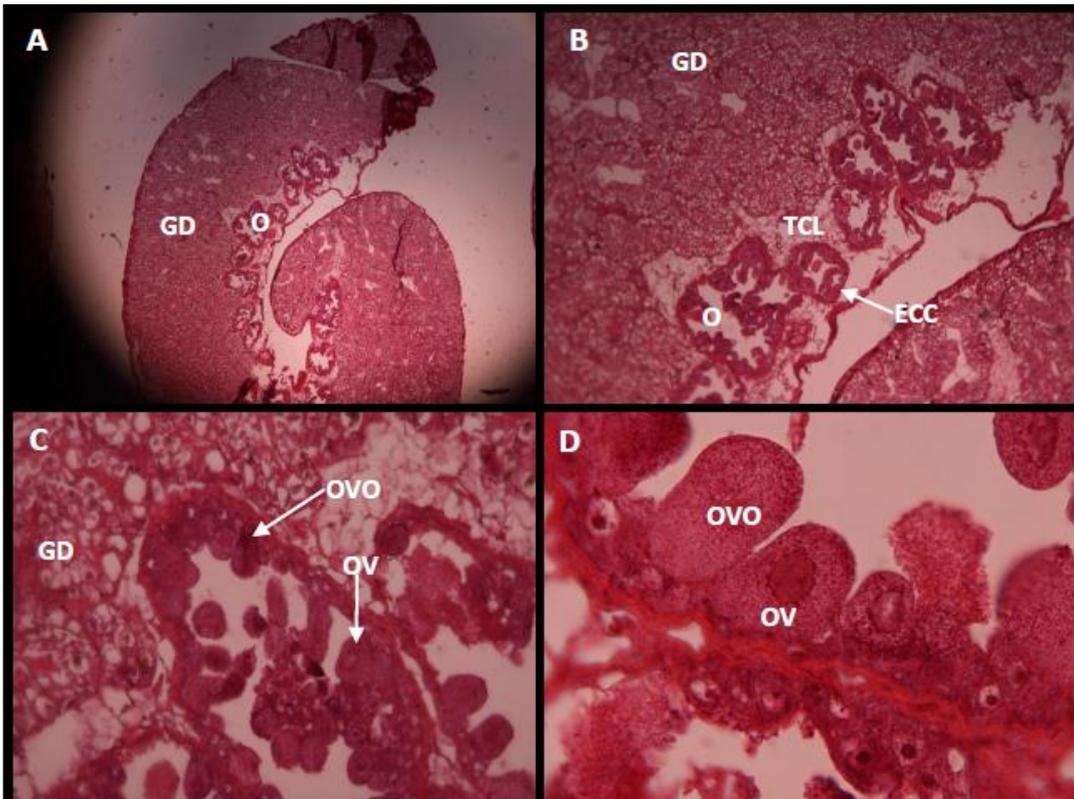


Figura 26: Hembra: A: 4X; B: 10X; C: 40X y D: 100X. GD: Glándula Digestiva, O: Ovário, TCL: Tejido conjuntivo laxo, ECC: Epitélio cilíndrico ciliado, OV: Ovocitos, OVO: Ovogonias.

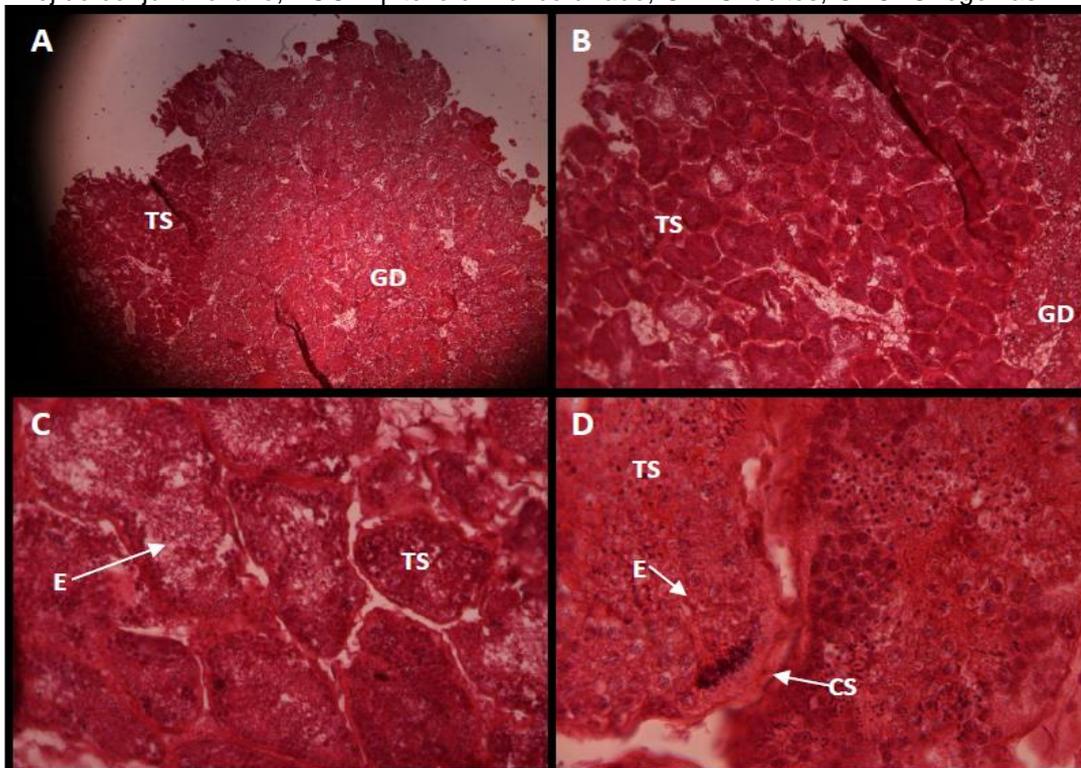


Figura 27: Macho: A: 4X; B: 10X; C: 40X y D: 100X. GD: Glándula Digestiva, TS: Túbulos seminíferos, E: Espermatozoides, CS: Células de Sertoli.

## 2. 4.Conclusión

En las imágenes de los ejemplares femeninos se observó el ovario, que es un cordón localizado dentro de la masa visceral en el vértice interno del borde de la espira del cuerpo del caracol. Rodeando al ovario se encuentra una capa gruesa de fibras colágenas y a continuación hay tejido conjuntivo laxo (TCL) que lo separa de la glándula digestiva (Figs A y B). Asimismo el oviducto está revestido por epitelio cilíndrico ciliado (ECC). El mismo da origen a las ovogonias (OVO) con citoplasma intensamente basófilo, lo cual no permite distinguir con precisión al núcleo. Las ovogonias se localizan sobre la membrana basal y se diferencian en ovocitos (OV) cuyos núcleos se distinguen fácilmente en las preparaciones de hematoxilina-eosina hacia la luz del oviducto a medida avanza su maduración (Figs C y D). A continuación del epitelio se encuentra una capa muy delgada de tejido conjuntivo denso (TCD) irregular y fibras musculares circulares (Fig. 22-C). Este esquema se repite en los casos control y tratados con el BDE-209 sin que se observen alteraciones o modificaciones a lo descrito.

En el caso de los machos, el testículo, ocupa la tercera parte de la espira del cuerpo del caracol (Figs A). Está formado por numerosos túbulos seminíferos (TS) irregulares separados por escasas fibras colágenas y tejido conjuntivo laxo. En su pared se encuentran las células gametogénicas en diferentes etapas de madurez (espermatogonias, espermatocitos y espermatozoides), rodeadas por las células de Sertoli (CS), que separan entre sí a cada uno de los grupos del mismo tipo celular (Figs C y D). El tejido es conjuntivo con fibras musculares lisas aisladas y abundantes senos. Además el epitelio cilíndrico simple ciliado está rodeado con numerosas células glandulares de secreción basófila intercaladas entre este (Figs D). En este caso se repite lo mencionado para las hembras: tanto en el tratamiento control como en los

grupos expuestos a BDE-209 no se observan alteraciones al esquema descrito.

Respecto a las glándulas digestivas se observó que todos los ejemplares presentaron los típicos corpúsculos C y K. Además no se observó ningún artefacto de fijación en los cortes.

Por lo tanto el análisis histológico de ovarios y testículos por medio de imágenes mostro que a nivel gonadal no hubo alteraciones morfológicas por efecto de BDE-209, en ninguna de las concentraciones ensayadas.

## Capítulo 3. Discusión general

Si bien las concentraciones empleadas en el ensayo estuvieron por encima y por debajo de las máximas reportadas para ambientes naturales en los que se describe la presencia de *Pomacea canaliculata* asociada a este tipo de contaminantes (Fu et al., 2011; Liu et al., 2008; Wang et al., 2011), no se observó mortalidad durante nuestro experimento. El hecho que ningún individuo muriera durante el experimento, junto con que no se registraron indicios de estrés nos hace cuestionar si realmente la vía de absorción para el compuesto fue la más indicada. Aun cuando según la bibliografía para un compuesto de la solubilidad en agua ( $Kow >5$ ) que presenta el BDE-209 la ingesta es la vía recomendable. Por otro lado sabemos por estudios previos que individuos sometidos al mismo esquema de intoxicación con el BDE-209 acumulan en sus tejidos el compuesto (Koch et al., 2013).

En cuanto a la influencia del BDE-209, sobre el comportamiento de cópula se debe considerar que el diseño para registrar este parámetro fue con el fin de determinar la salud general de la población de cada acuario y no para analizar el comportamiento de cópula *per se*. Para esto último hubiera sido necesario un planteo experimental diferente con un registro en video durante las 24 horas para cada acuario. Y si bien se observó una tendencia a la disminución en la frecuencia de cópulas para la concentración media ( $C_2$ ) y un aumento de las mismas para la concentración máxima ( $C_3$ ), se debe tener en cuenta que la recolección de datos se realizó en horarios cercanos al medio día, donde el ritmo diario de cópula es menor que en la mañana donde se observa la mayor frecuencia, como se puede observar en la Tabla 2.

	7:00-8:00 h	13:30-14:30 h	20:00-21:00 h
Parejas copulando	273 45%	225 37%	110 18%
Puestas depositadas	167 93%	10 6%	2 1%

Tabla 2: Registro del ritmo diario de cópulas de *P. canaliculata*. Fuente:(Albrecht, 1998).

Por lo que no podemos resolver si el BDE-209 influyó sobre el comportamiento de copulas o más bien fue una alteración en el ritmo diario de cópulas.

Por otro lado el análisis del porcentaje de huevos embrionados entre tratamientos no arroja diferencias significativas para ninguna de las concentraciones ensayadas. Sin embargo en cuanto al registro de puestas se observa una disminución significativa para el grupo expuesto a la concentración media ( $C_2$ ). De hecho este mismo patrón se observa al analizar la coloración de los huevos (comparación de los valores registrados con el espectroradiómetro) cuando se los compara para cada tratamiento. Siempre las diferencias, cuando significativas, se producen sobre el grupo expuesto a la concentración media.

Un dato llamativo es que no se observan diferencias entre los tratamientos a nivel histológico. Estos resultados coinciden en parte con los obtenidos por Clement y colaboradores para ensayos con TBT sobre la histología gonadal (Clement et al., 2012), donde reporta que este compuesto sí altera el número de oviposiciones y el porcentaje de huevos embrionados en dichos animales.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que con las concentraciones utilizadas y con el tiempo de exposición de la experiencia, la administración por dieta de BDE-209 no afecta la supervivencia de *P. canaliculata* ni tendría efectos notorios sobre la biología reproductiva de la

especie. Sin embargo, las diferencias señaladas en el número de puestas y coloración de los huevos indican la necesidad de explorar otras variables, tales como eventuales mecanismos de detoxificación que protejan a *Pomacea canaliculata* del BDE-209. Consideramos interesante continuar los estudios en tal dirección a fin de elucidar cuales puedan ser dichos mecanismos.

## Referencias bibliográficas

- Albrecht E. Control de la estacionalidad reproductiva en el gastrópodo *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia, Ampullariidae). Ph.D. Universidad Nacional de Cuyo, 1998.
- Alcock RE, Busby J. Risk migration and scientific advance: The case of flame-retardant compounds. *Risk analysis* 2006; 26: 369-381.
- Barber JL, Walsh MJ, Hewitt R, Jones KC, Martin FL. Low-dose treatment with polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) induce altered characteristics in MCF-7 cells. *Mutagenesis* 2006; 21: 351-360.
- Cazzaniga N. Sexual dimorphism in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Veliger* 1990; 33: 384-388.
- Clement M, Giraud-Billoud M, Castro-Vazquez A. Acción de un compuesto organometálico en la reproducción de *Pomacea canaliculata*. Jornadas de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas - UNCuyo 2012.
- Costa LG, Giordano G, Tagliaferri S, Caglieri A, Mutti A. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants: environmental contamination, human body burden and potential adverse health effects. *Acta Biomed* 2008; 79: 172-183.
- Cowie R. Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: their biology, impacts and management. In: Baker GM, editor. *Molluscs as crop pests*. CABI, Wallingford, 2002, pp. 145–192.
- Cowie RH, Holland BS. Dispersal is fundamental to biogeography and the evolution of biodiversity on oceanic islands. *Journal of Biogeography* 2006; 33: 193-198.
- de Wit CA. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 2002; 46: 583-624.
- Fontana AR, Lana NB, Martinez LD, Altamirano JC. Ultrasound-assisted leaching-dispersive solid-phase extraction followed by liquid—liquid microextraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers in sediment samples by gas chromatography—tandem mass spectrometry. *Talanta* 2010; 82: 359-366.
- Fu J, Wang Y, Zhang A, Zhang Q, Zhao Z, Wang T, et al. Spatial distribution of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyl ethers (PBDEs) in an e-waste dismantling region in Southeast China: Use of apple snail (*Ampullariidae*) as a bioindicator. *Chemosphere* 2011; 82: 648-655.
- Gamarra-Luques C, Giraud-Billoud M, Castro-Vazquez A. Reproductive organogenesis in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822), with reference to the effects of xenobiotics. *Journal of Molluscan Studies* 2013; 79: 147-162.
- Giraud-Billoud M. El aparato copulatorio de *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): Estructura, coaptación con la hembra durante la cópula y el efecto de xenobióticos. 2010.
- Giraud-Billoud M, Vega IA, Wuilloud RG, Clément ME, Castro-Vazquez A. Imposex and novel mechanisms of reproductive failure induced by tributyltin (TBT) in the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2013.
- Gobas F, Morrison HA. Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment. *Handbook of property estimation methods for chemicals, environmental and health sciences*. Boethling, RS and Mackay, D., eds. CRC Press, Boca Raton, USA 2000.
- Gregoraszczuk EL, Milczarek K, Wójtowicz AK, Berg V, Skaare JU, Ropstad E. Steroid secretion following exposure of ovarian follicular cells to three different natural mixtures of persistent organic pollutants (POPs). *Reproductive Toxicology* 2008; 25: 58-66.
- Harmon SM. Effects of pollution on freshwater organisms. *Water Environment Research* 2009; 81: 2030-2069.
- Hayes K, Joshi R, Thiengo S, Cowie R. Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Diversity and Distributions* 2008; 14: 701-712.
- He W, He P, Wang A, Xia T, Xu B, Chen X. Effects of PBDE-47 on cytotoxicity and genotoxicity in human neuroblastoma cells in vitro. *Mutation research* 2008; 649: 62.

- Hu G, Dai J, Xu Z, Luo X, Cao H, Wang J, et al. Bioaccumulation behavior of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the freshwater food chain of Baiyangdian Lake, North China. *Environment international* 2010; 36: 309-315.
- Ji K, Choi K, Giesy JP, Musarrat J, Takeda S. Genotoxicity of several polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and hydroxylated PBDEs, and their mechanisms of toxicity. *Environmental Science & Technology* 2011; 45: 5003-5008.
- Joshi RC, Sebastian LS. Global advances in ecology and management of golden apple snails. City of Mun\0303oz, Nueva Ecija, Philippines: Philippine Rice Research Institute, 2006.
- Koch E, Altamirano JC, Covaci A, Lana NB, Ciocco NF. Should apple snail *Pomacea canaliculata* (CAENOGASTROPODA, AMPULLARIIDAE) be used as bioindicator for BDE-209? *Environmental Science and Pollution Research* 2013; in press.
- Koch E, Vega IA, Albrecht EA, Ortega H, Castro-Vazquez A. A Light and Electron Microscopic Study of Pigmented Corpuscles in the Midgut Gland and Feces of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Veliger* 2006; 48: 17-25.
- La Guardia MJ, Hale RC, Harvey E. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environmental Science & Technology* 2006; 40: 6247-6254.
- Lana N, Fontana A, Ciocco N, Altamirano J. Determination of polybrominated diphenyl ethers in water samples from Mendoza River Basin by HS-SPME-GC-MS/MS. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo* 2010; 42: 85-98.
- Law RJ, Herzke D, Harrad S, Morris S, Bersuder P, Allchin CR. Levels and trends of HBCD and BDEs in the European and Asian environments, with some information for other BFRs. *Chemosphere* 2008; 73: 223-241.
- Lilienthal H, Roth-Härer A, Hack A, Altmann L, Winneke G. Developmental neurotoxicity of PHAHs: Endocrine-mediated and general behavioral endpoints in adult male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005; 19: 757-759.
- Liu H, Zhou Q, Wang Y, Zhang Q, Cai Z, Jiang G. E-waste recycling induced polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo- *p* -dioxins and dibenzo-furans pollution in the ambient environment. *Environment international* 2008; 34: 67-72.
- Liu J, He Y-j, Tan J-c, Xu C-x, Zhong L, Wang Z-g, et al. Characteristics of *Pomacea canaliculata* reproduction under natural conditions. *Chinese Journal of Applied Ecology* 2012; 23: 559-565.
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. A selection from the Global Invasive Species Database. Auckland, New Zealand: The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), 2000.
- Lu FC, Kacew S. Conventional toxicity studies. 1991.
- Martin P, Estebenet A, Cazzaniga N. Factors affecting the distribution of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) along its southernmost natural limit. *Malacologia* 2001; 43: 13-24.
- Mhadhbi L, Fumega J, Boumaiza M, Beiras R. Lethal and sublethal effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) for turbot (*Psetta maxima*) early life stage (ELS). 2010.
- Miglioranza KS, Gonzalez M, Ondarza PM, Shimabukuro VM, Isla FI, Fillmann G, et al. Assessment of Argentinean Patagonia pollution: PBDEs, OCPs and PCBs in different matrices from the Río Negro basin. *Science of the Total Environment* 2013; 452: 275-285.
- Morgado I, Hamers T, Van der Ven L, Power D. Disruption of thyroid hormone binding to sea bream recombinant transthyretin by ioxinyl and polybrominated diphenyl ethers. *Chemosphere* 2007; 69: 155-163.
- Olsvik PA, Lie KK, Sturve J, Hasselberg L, Andersen OK. Transcriptional effects of nonylphenol, bisphenol A and PBDE-47 in liver of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Chemosphere* 2009; 75: 360-367.

- Pérez-Fuentetaja A, Lupton S, Clapsadl M, Samara F, Gatto L, Biniakewitz R, et al. PCB and PBDE levels in wild common carp (< i> Cyprinus carpio</i>) from eastern Lake Erie. *Chemosphere* 2010; 81: 541-547.
- Piyatiratitivorakul P, Ruangareerat S, Vajarasathira B. Comparative toxicity of heavy metal compounds to the juvenile golden apple snail, *Pomacea* sp. *Fresenius Environmental Bulletin* 2006; 15: 379-384.
- Province SS. Accumulation and distribution of heavy metals in water, sediment, *Pomacea canaliculata* and some fish species in the Philok canal system. MAHIDOL UNIVERSITY, 2006.
- Rawlings TA, Hayes KA, Cowie RH, Collins TM. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States. *BMC Evolutionary Biology* 2007; 7: 97.
- Shih Y-h, Wang C-K. Photolytic degradation of polybromodiphenyl ethers under UV-lamp and solar irradiations. *Journal of hazardous materials* 2009; 165: 34-38.
- Siddiqi MA, Laessig RH, Reed KD. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): new pollutants–old diseases. *Clinical Medicine & Research* 2003; 1: 281-290.
- Smith T, Guild J. The CIE colorimetric standards and their use. *Transactions of the Optical Society* 1931; 33: 73.
- Song R, Duarte TL, Almeida GM, Farmer PB, Cooke MS, Zhang W, et al. Cytotoxicity and gene expression profiling of two hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in human H295R adrenocortical carcinoma cells. *Toxicology letters* 2009; 185: 23-31.
- Stapleton HM, Brazil B, Holbrook RD, Mitchelmore CL, Benedict R, Konstantinov A, et al. In vivo and in vitro debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by juvenile rainbow trout and common carp. *Environmental Science & Technology* 2006; 40: 4653-4658.
- Takeda N. Development of a penis from the vestigial penis in the female apple snail, *Pomacea canaliculata*. *Biological Bulletin* 2000; 199: 316-20.
- Talsness CE, Shakibaei M, Kuriyama SN, Grande SW, Sterner-Kock A, Schnitker P, et al. Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicology letters* 2005; 157: 189-202.
- Van Schmidt ND, Cary TL, Ortiz-Santaliestra ME, Karasov WH. Effects of chronic polybrominated diphenyl ether exposure on gonadal development in the northern leopard frog, *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2012; 31: 347-354.
- Vega IA, Arribére MA, Almonacid AV, Ribeiro Guevara S, Castro-Vazquez A. Apple snails and their endosymbionts bioconcentrate heavy metals and uranium from contaminated drinking water. *Environmental Science and Pollution Research* 2012: 1-10.
- Vos JG, Becher G, van den Berg M, de Boer J, Leonards PE. Brominated flame retardants and endocrine disruption. *Pure and applied chemistry* 2003; 75: 2039-2046.
- Wang J, Lin Z, Lin K, Wang C, Zhang W, Cui C, et al. Polybrominated diphenyl ethers in water, sediment, soil, and biological samples from different industrial areas in Zhejiang, China. *Journal of hazardous materials* 2011; 197: 211 - 219.