

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MARINAS

Tesis Doctoral

Inducción de metalotioneínas en *Palaemonetes argentinus*
(Nobili, 1901) por exposición a cadmio: influencia de la pre-
exposición ambiental

Tesista: Lic. Leila N. Chiodi Boudet

Director: Dra. Marcela S. Gerpe



Mar del Plata, Julio de 2013

A mi dulce Catalina

Después de tanto tiempo esperando este momento, aquí me encuentro por fin escribiendo las memorias de la Tesis doctoral. El trabajo desarrollado durante estos años no podría haber concluido sin la ayuda de muchas personas, por lo que en estas líneas les quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

A los jurados, Dras. Ana María Gagneten, Alicia Escalante y Alcira Díaz, por sus correcciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo.

A mi directora, Dra. Marcela Gerpe, por haber confiado en mí, por su apoyo y paciencia. Gracias por todo.

A todos mis compañeros del laboratorio por los gratos momentos compartidos, pero especialmente a Paula, por las innumerables veces que me acompañaste a muestrear y contar camarón por camarón, por estar siempre. A Belén, “la peque” del grupo, por tu ayuda siempre que la necesité.

Al Dr. Diego Rodríguez por facilitarme el espacio para llevar a cabo los ensayos en Nágera y también por su ayuda en numerosos muestreos.

Al Sr. Pedro Urrutia por facilitarme el acceso a la laguna Nahuel Rucá y el Sr. Julio del Club la Isla de la laguna de los Padres, por su ayuda durante los muestreos.

Al Dr. Francesco Dondero (Universidad de Piemonte, Italia) por sus consejos en la metodología para cuantificar las MT.

A la Dra. Vivian Lutz y la Lic. Valeria Segura por facilitarme el uso del Espectrofotómetro y a todos los integrantes del Laboratorio por hacerme sentir a gusto.

Al cartógrafo Marcelo Farenga, por el diseño del mapa.

Al Dr. Federico Isla, por facilitarme el uso del HORIBA para las campañas de muestreo.

A los integrantes del Laboratorio de Acuicultura, especialmente a la Dra. Cristina Díaz por brindarme su conocimiento y el instrumental necesario para realizar los cortes histológicos.

A la Dra. Mirta Menone, por facilitarme el uso del microscopio.

Al CONICET, porque sin la beca no hubiese sido posible desarrollar esta tesis.

A la UNMdP y la Escuela de Postgrado de la FCEyN, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo y doctorarme.

Por último, y por eso no menos importante, a mi familia, especialmente a mi mamá, por apoyarme en cada paso de la carrera, sin ella esto no sería posible; y a Jorge, por su apoyo e infinita paciencia y respeto por mi trabajo.

Gracias a todos!!!!!!!!!!!!!!

INDICE

	Página
Resumen	ix
Abstract	x
Lista de abreviaturas	xi
Capítulo I: Antecedentes	
1.1. Contaminantes metálicos.....	1
1.1.1. Cadmio.....	2
1.2. Biomarcadores de estrés.....	3
1.2.1. Biomarcadores de estrés metálico: Metalotioneínas.....	4
1.2.2. Biomarcadores de estrés oxidativo: Peroxidación lipídica.....	5
1.2.3. Alteraciones histológicas.....	6
1.3. <i>Palaemonetes argentinus</i> “camarón de agua dulce”.....	7
1.4. Hipótesis y Objetivos.....	9
Capítulo II: Materiales y Métodos	
2.1. Sitios de estudio.....	10
2.2. Muestreo estacional y procesamiento de las muestras.....	13
2.3. Ensayos en laboratorio.....	17
2.3.1. Preparación de la solución de Cd.....	17
2.3.2. Determinación de la Concentración Letal media (CL ₅₀).....	17
2.3.3. Ensayos a 24h y 96h (curvas dosis-respuesta).....	18

2.3.4. Ensayos a 15 días (curvas tiempo-respuesta).....	20
2.3.5. Ensayos de depuración.....	20
2.4. Determinación de MT.....	21
2.5. Determinación de LPO.....	22
2.6. Cortes histológicos.....	23
2.7. Análisis de los datos.....	24

**Capítulo III: Variaciones estacionales en los niveles de metalotioneínas y peroxidación
lipídica**

3.1. Introducción.....	25
3.2. Análisis de los datos.....	26
3.3. Resultados	
3.3.1. Variables ambientales.....	27
3.3.2. Variaciones estacionales en los niveles de MT.....	28
3.3.3. Variaciones estacionales en los niveles de LPO.....	30
3.4. Discusión.....	31
3.5. Conclusiones.....	34

Capítulo IV: Ensayos de toxicidad con cadmio

4.1. Introducción.....	35
4.2. Análisis de los datos.....	37
4.3. Resultados	
4.3.1. Concentración de Cd en agua.....	38
4.3.2. Ensayos de toxicidad.....	38

4.4. Discusión.....	42
4.5. Conclusiones.....	47

Capítulo V: Ensayos subletales con cadmio. Biomarcadores

5.1. Introducción.....	48
5.2. Análisis de los datos.....	50
5.3. Resultados.....	50
5.3.1. Curvas dosis-respuesta.....	50
5.3.1.a. Ensayos a 24h.....	50
5.3.1.b. Ensayos a 96h.....	53
5.3.2. Curvas tiempo-respuesta.....	55
5.3.2. a. Ensayos a 15 días $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ + Depuración.....	55
Población NR.....	55
Población LP.....	58
5.3.2.b. Ensayos a 15 días $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ + Depuración.....	61
Población NR.....	61
Población LP.....	61
5.4. Discusión.....	64
5.4.1. Curvas dosis respuesta: 24-h y 96-h.....	64
Población NR.....	64
Población LP.....	66
5.4.2. Curvas tiempo-respuesta.....	68
5.4.2.a. Experiencia 15 días- $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ + Depuración.....	68
Población NR.....	68

Población LP.....	70
5.4.2.b. Experiencia 15 días-12,26 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ + Depuración.....	71
Población LP.....	71
5.5. Conclusiones.....	72

Capítulo VI: Efectos a nivel histológico

6.1. Introducción.....	73
6.2 Resultados.....	75
6.2.1. Alteraciones tisulares provocadas por la exposición a Cd.....	75
6.2.1.a. Experiencia 15 días-3,06 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$	75
Población NR.....	75
Población LP.....	81
6.2.1.b. Experiencia 15 días-12,26 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$	89
Población NR.....	89
Población LP.....	89
6.2.2. Depuración: Evaluación de la capacidad de recuperación del hepatopáncreas.....	93
Población NR.....	93
Población LP.....	97
6.3. Discusión.....	101
6.4. Conclusiones.....	106

Capítulo VII: Consideraciones finales.....	107
---	------------

Capítulo VIII: Bibliografía.....	109
---	------------

Resumen

Inducción de metalotioneínas en *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) por exposición a cadmio: influencia de la pre-exposición ambiental.

Chiodi Boudet, Leila N.

El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral fue evaluar la respuesta de *Palaemonetes argentinus* a la exposición a cadmio en poblaciones provenientes de ambientes lagunares con diferente calidad ambiental.

Para tal fin, se trabajó con camarones de las poblaciones de las lagunas Nahuel Rucá (sin impacto) y de Los Padres (impactada). Ensayos a concentraciones letales fueron realizados para establecer la LC₅₀ a Cd. También, se ensayaron concentraciones subletales para evaluar las respuestas bioquímicas (metalotioneínas y peroxidación lipídica) y morfológicas (alteraciones histológicas).

Una alta sensibilidad a Cd para *P. argentinus*, independientemente del ambiente; fue encontrada; si bien los valores de LC₅₀ fueron distintos entre poblaciones. Estos resultados indicarían una tolerancia diferencial asociada a la pre-exposición ambiental. Estas diferencias se reflejaron en los niveles y patrones de metalotioneínas, peroxidación lipídica y alteraciones histológicas; donde la población de la laguna de los Padres manifestó ser la más afectada.

La información obtenida demostró que el grado de contaminación ambiental determinó las respuestas de *Palaemonetes argentinus* ante la exposición a Cd, estableciendo variaciones intraespecíficas. Sería importante ampliar el estudio a otras respuestas para establecer una batería de biomarcadores que permita una evaluación integral de la especie, contribuyendo a una mejor gestión de los ambientes dulceacuícolas.

Abstract

Induction of metallothionein in *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) by exposure to cadmium: influence of environmental pre-exposure.

Chiodi Boudet, Leila N.

The aim of the present Doctotal thesis was to evaluate the response of *Palaemonetes argentinus* to cadmium exposure in populations from lagoons with different environmental quality.

The study was conducted on shrimp populations from Nahuel Ruca (no impact) and de Los Padres (impacted) lagoons. Toxicity tests were performed to establish the LC₅₀ of Cd. Sublethal concentrations were also tested to evaluate the biochemical (metallothionein and lipid peroxidation) and morphological (histological alterations) responses.

A high sensitivity to Cd for *P. argentinus* was found, regardless of the environmental quality, although the LC₅₀ values were different between populations. These results showed a differential tolerance associated to the environmental pre-exposure. These differences were showed at metallothioneins, lipid peroxidation and histological alterations levels and patterns, where the population of de los Padres lagoon were to be the most affected.

The obtained information demonstrated that the degree of environmental pollution determined the *Palaemonetes argentinus* responses to Cd exposure, establishing intraspecific variations. Would be important to extend the study to other responses to establish a battery of biomarkers to allow an integral assessment of the species, contributing to improve the management of freshwater environments.

Lista de abreviaturas

Cd	Cadmio
CL₅₀	Concentración letal media
CS	Concentraciones Seguras
LP	Laguna de los Padres
LPO	Peroxidación lipídica
MDA	Malondialdeído
MT	Metalotioneinas
NR	Laguna Nahuel Rucá
ROS	Especies reactivas del oxígeno
ROO[·]	Radicales peroxilipídicos

Capítulo I

Antecedentes

1.1. Contaminantes metálicos

En el medio acuático están presentes numerosos contaminantes de distintos origen y con potencial efecto tóxico para la biota. Teniendo en cuenta su naturaleza química, los contaminantes pertenecen a dos grandes grupos: metales pesados (naturales, iónicos y de alta solubilidad en agua) y xenobióticos u orgánicos persistentes (sintetizados por el hombre, no polares y de baja o nula solubilidad en agua). Los metales pesados son comunes en los ambientes marinos y dulceacuícolas con concentraciones variables dependiendo del metal y del ambiente (Förstner y Wittmann, 1983; Fergusson, 1991; Newman y McIntosh, 1991). Estos contaminantes están presentes bajo distintas especies químicas, que a su vez, interactúan con la biota en un “equilibrio natural”. La acción del hombre ha provocado la alteración de este equilibrio, modificando las condiciones ambientales (pH, potencial redox, aporte y cantidad de materia orgánica y consecuentemente ligandos, capacidad de intercambio catiónico, etc.) y aumentando sus concentraciones (Fergusson, 1991; Hutchinson y Meema, 1994). Entre las actividades humanas es posible mencionar la minería, la explotación de petróleo y gas, los efluentes industriales y domésticos, los drenaje de campos destinados a agricultura y ganadería, etc. Esta contribución antrópica a los ambientes acuáticos trae consecuencias negativas para la biota, no solamente por el aporte como tal, sino por los cambios en la especiación química de los metales, alterando su biodisponibilidad (Förstner y Wittmann, 1983; Newman y McIntosh, 1991). Los metales pesados se encuentran dentro de los contaminantes ambientales más peligrosos por su elevada toxicidad, su persistencia y su grado de acumulación a lo largo de las cadenas tróficas, llegando a afectar a la salud humana (Newman y McIntosh, 1991; Klaassen, 2001).

Los metales pueden ser clasificados en esenciales, con funciones fisiológicas, como zinc (Zn) y cobre (Cu) y no esenciales, con funciones fisiológicas no conocidas,

como cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg). La toxicidad de estos últimos ha sido comprobada, incluso a concentraciones extremadamente bajas (Goyer y Clarkson, 2001; Klaassen, 2001). Entre sus principales efectos se destacan disturbios neurológicos, disfunciones orgánicas, teratogénesis, mutagénesis y carcinogénesis (Förstner y Wittmann, 1983; Klaassen, 2001). También pueden manifestarse como disruptores endocrinos o xenoestrógenos, interfiriendo en el sistema hormonal, reproductivo y tiroideo (Olsson et al., 1998).

1.1.1. Cadmio

El Cd es un metal de relevancia ambiental, cuyas fuentes naturales son principalmente la actividad volcánica, lixiviación de rocas e incendios forestales. Las fuentes antrópicas están principalmente relacionadas con el uso de fertilizantes, en pigmentos, pinturas anticorrosivas, pilas, entre otros (Förstner y Wittmann, 1983, Fergusson, 1991), obteniéndose como subproducto en minerías y fundiciones de Zn y Pb (Förstner y Wittmann, 1983; Fergusson 1991; Klaassen, 2001); liberándose al ambiente, principalmente al acuático. Se encuentra presente, debido a su bioacumulación, en todos los niveles tróficos, siendo los crustáceos más sensibles que otros grupos biológicos (Sadiq, 1992). Entre los principales efectos sobre los organismos acuáticos es posible mencionar, afecciones respiratorias y musculares, alteraciones enzimáticas y proteicas, desestabilización de membranas, disminución del crecimiento y la reproducción. La peroxidación lipídica es una consecuencia de la exposición a Cd ya que el mismo provoca la alteración de los lípidos de membrana (Stoys y Bagchi, 1995). Por otro lado, este metal está reconocido como un fuerte

inductor de metalotioneínas (Klaassen, 2001), siendo informada esta capacidad también en crustáceos (Amiard et al., 2006; del Ramo et al., 1995; Romero-Isart y Vasák, 2002).

1.2. Biomarcadores de estrés

Según la definición de McCarthy y Shugart (1990), los biomarcadores son "medidas a nivel molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de ambientes contaminados o no, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, y que indican la exposición y magnitud de la respuesta a la/s sustancia/s". Estos autores consideran biomarcadores sólo a niveles molecular y celular, debido a que es donde ocurre la interacción inicial contaminante-organismo. Además, la cuantificación de los mismos a este nivel permite su aplicación como señales de alarma temprana en las jerarquías superiores, individuo, población y/o ecosistema (Olsson et al, 1998). El nivel molecular es, además, el ideal para estudiar relaciones causa-efecto y los mecanismos de acción de los contaminantes. Es posible distinguir dos tipos de biomarcadores, de exposición, asociados a los niveles de un contaminante (metalotioneínas), y de efecto, relacionados al daño producido por la exposición (peroxidación lipídica).

Los organismos mantienen un equilibrio dinámico complejo (homeostasis), que puede ser alterado por estresores internos o externos. El estrés se define como el estado de demanda física fuera de lo habitual, y usualmente bajo presión, que provoca una desestabilización del equilibrio dinámico (homeostasis) recuperándolo mediante alostasis (estabilidad a través del cambio) (Mc Ewen, 2000). Sustancias tóxicas son claro ejemplo de agentes que producen estrés sobre los sistemas biológicos (van Straalen, 2003). El estrés también está definido en términos de respuestas fisiológicas

que ocurren como reacción a un disturbio ambiental o metabólico (Selye, 1956). De acuerdo a la duración del estrés, el mismo puede clasificarse como agudo, producido en un evento puntual, y estrés crónico, producido por eventos de mayor duración. Por la propia definición de estrés, el estudio de biomarcadores permite su evaluación ya que vincula los niveles de contaminación y/o estrés con la respuesta (Bucheli y Fent, 1995).

1.2.1. Biomarcadores de estrés metálico: Metalotioneínas

Las metalotioneínas (MT) son proteínas citosólicas ubicuas de bajo peso molecular (6-10 kD), con alto contenido de residuos de cisteína (20-30 %, 20 cisteínas), que unen metales divalentes mediante los grupos sulfhidrilos (-SH) de dicho aminoácido, presentan una secuencia de 61 o 62 aminoácidos y carecen de aminoácidos aromáticos, son termoestables y solubles en agua (Viarengo y Nott, 1993; Olafson et al., 1998; Sarkar et al., 2006; Viarengo et al., 2007). Están presentes en toda la escala zoológica y en diversos tejidos, si bien predominan en hígado y riñón de vertebrados, y en la glándula digestiva e intestino de invertebrados (Roesijadi, 1992).

Las MT están involucradas en la homeostasis de metales esenciales, y participan en la detoxificación de éstos en niveles que superan los fisiológicos, y de aquellos no esenciales y altamente tóxicos como Cd. También intervienen en ciertos procesos inflamatorios y en la inactivación de radicales libres (Klaassen, 2001). Estas proteínas son inducidas, aumentando su expresión génica, ante la presencia de niveles tóxicos de metales esenciales y no esenciales, por lo que son consideradas como biomarcadores de estrés metálico (Chan, 1995; Linde et al., 2001). La síntesis de MT puede ser inducida

por una gran variedad de estímulos, entre los que se incluyen ciertos metales, hormonas, toxinas y estrés, siendo los metales los inductores más potentes (Klaassen, 2001).

Numerosos estudios demuestran su inducción ante la exposición a metales en crustáceos (Amiard et al., 2006; Barka et al., 2001; Legras et al., 2000; Mouneyrac et al., 2002; Nunez-Nogueira et al., 2010), y así como su rol protector ante el estrés oxidativo (González-Rey et al., 2008; Viarengo et al., 1999).

1.2.2. Biomarcadores de estrés oxidativo: peroxidación lipídica

Los radicales libres son partículas químicas que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo y son altamente reactivos (Halliwell y Gutteridge, 1986 en Ruttkay et al., 2013). Altas concentraciones producen estrés oxidativo, provocando daños importantes en las estructuras celulares, incluyendo los lípidos de membranas, proteínas y ácidos nucleicos (Ruttkay et al., 2013). Entre los radicales libres, se encuentran las especies reactivas del oxígeno (ROS) y los radicales peroxilipídicos (ROO[•]). Cuando se produce un desbalance entre pro-oxidante (ROS o ROO[•]) y el sistema antioxidante (enzimático y no enzimático) se produce estrés oxidativo (Lund Amado et al., 2009), siendo uno de los daños la peroxidación de lípidos (LPO) de membrana (Halliwell y Gutteridge, 1986 en Ruttkay et al., 2013).

Un metabolito final de peroxidación de lípidos es el malondialdeído (MDA), el cual se genera durante las últimas etapas del reordenamiento en la estructura de los ácidos grasos poliinsaturados. Una manera de evaluar los niveles de MDA, y así el daño oxidativo producido, es mediante la técnica de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). La determinación de peroxidación de lípidos de membrana a través de la cuantificación directa de MDA o indirecta mediante la cuantificación de

TBARS constituye biomarcadores que permiten detectar condiciones de estrés oxidativo.

1.2.3. Alteraciones histológicas

El diagnóstico histológico es un método altamente sensible que muestra la respuesta integrada de un individuo al impacto de un tóxico, bajo ciertas condiciones fisiológicas, nutricionales y ambientales (Vogt, 1987). Este diagnóstico es una herramienta valiosa adicional a los métodos convencionales utilizados, tales como la mortalidad, el crecimiento, el comportamiento, la reproducción, la bioquímica, etc.

El hepatopáncreas, o también llamado glándula del intestino medio, es un órgano muy importante para los crustáceos; desarrolla funciones metabólicas fundamentales: es el órgano principal involucrado en la digestión, absorción y reserva de nutrientes y excreción de desechos (Johnston et al., 1998; Loizzi, 1971; Vogt et al., 1985). Asimismo, ciertos sistemas enzimáticos responsables de la biotransformación de xenobióticos (sistema del citocromo P450 y glutatión S-transferasa) y metalotioneínas, son sintetizados en el hepatopáncreas. Estas características le confieren la capacidad de biotransformar y detoxificar muchos contaminantes (Ahearn et al., 2004). Estas características lo posicionan como un órgano relevante para los crustáceos, y para estudios ecotoxicológicos, permitiendo evaluar biomarcadores de exposición y efecto ya que brinda información importante y apropiada.

1.3. *Palaemonetes argentinus* “camarón de agua dulce”

Los organismos acuáticos son considerados como indicadores *in situ* de degradación ambiental. van Gestel y van Brummelen (1996) definen a un bioindicador como “un organismo que aporta información sobre las condiciones ambientales de su hábitat mediante su presencia, ausencia y comportamiento”. Los crustáceos suelen estar afectados y por tal razón suelen ser empleados como bioindicadores de estrés ambiental. Entre los crustáceos, los camarones son un grupo biológico frecuentemente empleado en estudios ecotoxicológicos de cuerpos de aguas continentales y marinas.

Los camarones carideos de la familia Palaemonidae representan un grupo particularmente diverso y ecológicamente importante, su distribución alcanza ambientes marinos, estuariales y de agua dulce (Bauer, 2004). Las especies del género *Palaemonetes* -*grass shrimp*- se encuentran ampliamente distribuidas en estuarios, marismas y bahías de la costa Atlántica, Golfo de México, Estados Unidos, Europa (Bauer, 2004) y Australia (Bray, 1976). Éstas son ecológicamente importantes por ser detritívoros, predadores de pequeños invertebrados y presa de peces y aves (Bauer, 2004); son abundantes en los sistemas estuariales y arroyos, y debido a su modo de alimentación se consideran piezas claves en el ciclo de nutrientes, y consecuentemente en el balance energético de esos ambientes (Reinsel et al., 2001). Por su fácil obtención, recolección y mantenimiento en acuarios, son adecuadas para ensayos de laboratorio (Buikema et al., 1980). Estas características de manera conjunta con la sensibilidad a una amplia gama de sustancias tóxicas, determina su utilización frecuente en pruebas de toxicidad aguda y crónica.

Palaemonetes argentinus (Nobili 1901) se distribuye en el norte y centro de Argentina, Uruguay y sur de Brasil (Spivak, 1997; Collins et al., 2004). *Palaemonetes argentinus* es comúnmente conocido como el “camarón de agua dulce”. Resulta

interesante notar que *P. argentinus* es el único camarón palemónido presente en la mayoría de las lagunas del sureste de la provincia de Buenos de Aires. En estos sistemas, los adultos cumplen un rol muy importante como predadores del zooplancton (González Sagrario, 2004). Además, su calidad nutricional es muy alta (alrededor del 70% es contenido proteico) representando uno de los ítems alimentarios más importantes para otros organismos como peces y aves (Collins y Montagna, 2006).

Muchos aspectos han sido estudiados: estructura poblacional, reproducción, desarrollo, ciclo de muda, alimentación natural y artificial, fisiología de la osmorregulación e histología (Charmantier y Anger, 1999; Collins, 1999; Felix y Petriella, 2003; Nazary et al., 2000; Rodríguez Capítulo y Freyre, 1995; Sousa y Petriella, 2007); sin embargo, aquellos toxicológicos son escasos (Collins y Capello, 2006; Montagna y Collins, 2007; Rodríguez Capítulo, 1984).

En la distribución geográfica de *Palaemonetes argentinus*, es posible reconocer ambientes con distinto grado de impacto por diversos contaminantes. Ésta es la situación que presentan las dos lagunas seleccionadas para desarrollar la presente tesis. La laguna de Los Padres, con reconocido impacto por metales y otros contaminantes, y la laguna Nahuel Rucá, con nulo o bajo impacto, constituyen dos escenarios contrastantes que permitirán evaluar la influencia de la pre-exposición ambiental sobre las respuestas de *P. argentinus*.

1.4. Hipótesis y Objetivos

- Hipótesis

La biosíntesis de metalotioneínas y la presencia de estrés oxidativo por exposición a cadmio en *Palaemonetes argentinus* está alterada en función de la pre-exposición ambiental.

- Objetivo General

Evaluar las respuestas de *Palaemonetes argentinus* a la exposición a cadmio en poblaciones provenientes de lagunas con diferente calidad ambiental.

- Objetivos particulares

- 1) Evaluar las variaciones estacionales de los niveles de MT y LPO en *P. argentinus* de las lagunas Nahuel Rucá y de los Padres.
- 2) Evaluar la toxicidad de Cd de *P. argentinus* provenientes de las poblaciones de las lagunas Nahuel Rucá y de los Padres mediante de ensayos letales.
- 3) Evaluar los niveles de MT y LPO en *P. argentinus* de las lagunas Nahuel Rucá y de los Padres expuestos a dosis subletales de Cd por medio de curvas dosis-respuesta y tiempo-respuesta.
- 4) Evaluar los niveles de MT y LPO en *P. argentinus* de las lagunas Nahuel Rucá y de los Padres pre-expuestos a Cd durante procesos de depuración.
- 5) Evaluar efectos a nivel histológico en *P. argentinus* de las lagunas Nahuel Rucá y de los Padres expuestos a Cd y su capacidad de recuperación durante procesos de depuración.

Capítulo II

Materiales y Métodos

2.1. Sitios de estudio

Las lagunas estudiadas fueron elegidas por el grado de contaminación contrastante entre ambas, la proximidad que presentan, su fácil acceso y la información disponible sobre datos ambientales. Ambas lagunas, Nahuel Rucá (NR) y Los Padres (LP), son típicas lagunas pampeanas ubicadas en la misma región geográfica, la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Las lagunas pampeanas fueron caracterizadas por Quirós et al. (2002) como lagos muy poco profundos, con bajos tiempos de permanencia del agua, salinidades altamente variables y naturalmente eutróficos. Por su concentración salina, se las clasifica como lagos oligohalinos, salvo pocas excepciones (Ringuelet, 1962, 1972).

La Laguna Nahuel Rucá (37° 37'S - 57° 25'O) pertenece a la cuenca de la laguna costera Mar Chiquita (Fig. 2.1.), encontrándose dentro de la Reserva de la Biósfera del Programa Man and Biosphere (MAB) de UNESCO (Martínez, 2001). Posee un área total de 2,45 km² y una profundidad máxima de 1,5 m (Federman, 2003). En el sector NO de la laguna ingresa el Arroyo Dulce y en el sector S, la laguna desemboca mediante un canal artificial en el Arroyo Sotelo, y éste en la laguna Mar Chiquita. El canal artificial cuenta con una compuerta que regula el nivel de agua. Estudios de contaminantes realizados en biota y sedimentos, revelaron bajos niveles de plaguicidas (Ondarza, 2005) y metales pesados (Chiodi et al., 2010). Debido a que Argentina aún no ha establecido estándares de calidad propios para dichos contaminantes en sedimentos, la Secretaría de Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Provincia de Buenos Aires en el Marco del Proyecto Binacional para Prevención y Control de la Contaminación y Restauración de Hábitats recomienda adoptar los valores establecidos por el Consejo Canadiense de Ministros de Medio Ambiente (FREPLATA, 2005). Los niveles de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos, hallados en sedimentos de

esta laguna se encontraron por debajo de los establecidos para la protección de la vida acuática (Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life - CSQG-, CCME, 2002) (Tabla 2.1). Por lo antes mencionado, la laguna NR fue considerada como sitio de referencia.

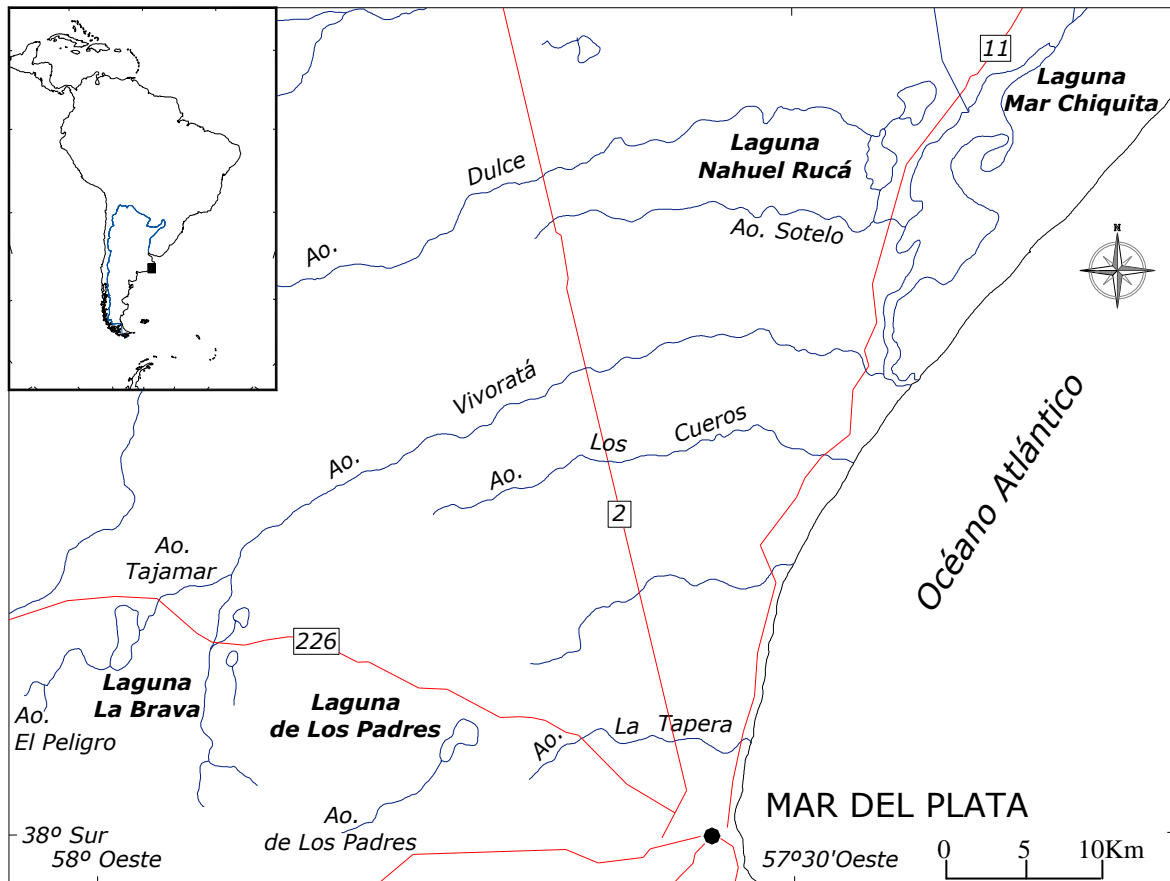


Figura 2.1. Sitios de muestreo en la provincia de Buenos Aires, donde se ubican las Laguna Nahuel Rucá (NR) y Laguna de Los Padres (LP).

La Laguna de Los Padres ($37^{\circ} 56' 30''$ S, $57^{\circ} 44' 30''$ O) está localizada en el borde oriental del cordón serrano septentrional de la Provincia de Buenos Aires, conocido como Sierras Septentrionales o Sistema de Tandilia (Romanelli y Massone, 2009). Fue declarada Reserva Natural Municipal en octubre de 1982 (Decreto-

Ordenanza N° 5383) y en mayo de 2011 fue declarada Área Protegida Provincial (Decreto (PEP) 469/11). La laguna posee un área total de 2,97 km² y una profundidad máxima de 2,4 m (Romanelli y Massone, 2009). Su cuenca superficial comprende el Arroyo de Los Padres (afluente), la laguna homónima y el Arroyo La Tapera (efluente) (Figura 2.1.) (Esquius et al., 2008). El Arroyo de Los Padres nace en las sierras y fluye a través de campos con intensa actividad agrícola para desembocar en la laguna formando un delta (Campana et al., 2001). Desde el año 1926, una compuerta situada en las nacientes del efluente regula el nivel de agua de su cuenca (Savigny, 2001). Los suelos de la cuenca de la Laguna de Los Padres han sido objeto de numerosos estudios, especialmente debido al grado de degradación que presentan por el intensivo uso agropecuario y hortícola al que son sometidos (Osterrieth et al., 2000; Borrelli, 2001; Osterrieth, 2002). Estas prácticas, llevadas a cabo en forma casi ininterrumpida por más de 30 años (Osterrieth, 2002), son la causa de la presencia de pesticidas organoclorados (POC), bifenilos policlorados (PCBs) y metales pesados en suelos, sedimentos y biota (Miglioranza et al., 1999; 2002; 2004a; González Sagrario et al., 1998; Chiodi et al., 2008). Los niveles de dichos contaminantes en sedimentos exceden, en su mayoría, el límite establecido para la protección de la vida acuática según la Guía de Calidad Ambiental de Canadá (CCME, 2002) (Tabla 2.1.). Dicha tabla resume los contaminantes y sus niveles en sedimentos superficiales para cada laguna; y, con fines comparativos, se incluyen los valores Guía de Calidad Ambiental de Canadá para sedimentos de cuerpos de agua dulce (CCME, 2002).

		Nahuel Rucá	Los Padres	CSQG ^a
POCs (ng·g ⁻¹)	Lindano	0,16 ± 0,004 ^b	3,0 ± 0,5 ^c	0,94
	Clordano	0,06 ± 0,014 ^b	14,6 ± 3,3 ^c	4,5
	DDT	0,05 ± 0,005 ^b	22,8 ± 4,3 ^c	1,19
	Dieldrin	NA	4,8 ± 0,8 ^c	2,85
Metales (µg·g ⁻¹)	Mercurio	0,02 ± 0,01 ^d	0,8 ± 0,2 ^e	0,17
	Cadmio	0,15 ± 0,01 ^d	0,7 ± 0,2 ^e	0,6
	Cromo	NA	52,0 ± 22,1 ^e	37,3
	Arsénico	NA	12,3 ± 2,4 ^e	5,9
	Cinc	28,0 ± 0,59 ^d	109,0 ± 15,1 ^e	123

Tabla 2.1. Niveles de contaminantes presentes en sedimentos superficiales en las dos lagunas muestreadas (valores medios ± desvío estándar expresados como ng·g⁻¹ o µg·g⁻¹ peso seco). CSQG: Canadian Sediment Quality Guidelines for the protection of aquatic life, DDT: Diclorodifeniltricloroetano, DDD: diclorodifenildicloroetano, DDE: diclorodifeniletileno. NA: no analizado. a- CCME, 2002; b- Ondarza, 2005; c- Miglioranza et al., 2004b.; d- Chiodi et al., 2010.; e- Chiodi et al., 2008.

2.2. Muestreo estacional y procesamiento de las muestras

Los muestreos fueron realizados durante septiembre 2008 y agosto 2009 para las 4 estaciones del año. Los muestreos entre lagunas difirieron en un período máximo de 4 días, y los correspondientes a cada estación del año fueron realizados en el mismo lugar (margen SE cercano al Arroyo Sotelo en Laguna Nahuel Rucá y muelle del Club La Isla

en Laguna de los Padres) (Fig. 2.2.). Los camarones (adultos de ambos sexos) fueron recolectados con copo de mano (tamaño de malla 1 mm) hasta alcanzar una cantidad de 300 individuos aproximadamente. Los camarones fueron disecados *in situ*, extrayéndose el hepatopáncreas con una pinza de puntas finas. Se obtuvieron 3 muestras ($n = 3$) independientes, cada una formada por 80 hepatopáncreas (equivalente a 160 μg aproximadamente de tejido húmedo). Las muestras fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y transportadas al laboratorio para ser almacenadas en freezer a -80°C hasta su análisis. Las siguientes variables fisicoquímicas fueron registradas *in situ* mediante equipo multiparamétrico (marca Horiba, U-10): salinidad; pH y temperatura. Adicionalmente, se tomaron muestras de agua para la determinación de la dureza del agua, la cual fue determinada mediante el método EDTA (Trillas, 1973).



Figura 2.2. Sitios de muestreo en las lagunas Nahuel Rucá (A) y de los Padres (B).

2.3. Ensayos en laboratorio

Los camarones destinados a la experimentación fueron adultos en reposo sexual. Para asegurar tal condición, los ensayos fueron realizados con camarones en etapa no reproductiva, la cual comienza en septiembre-octubre y finaliza en febrero (Donatti et

al., 1986). Los camarones fueron trasladados en conservadoras plásticas con agua de las lagunas de origen a la sala de acuarios de la Estación Costera J.J. Nágera (UNMDP, Estafeta Chapadmalal, Mar del Plata). Las condiciones experimentales se basaron en las recomendaciones de Buikema et al. (1980) para el género *Palaemonetes*. Los individuos fueron aclimatados durante 3 días, para lo cual se mantuvieron en acuarios de 140 litros con agua de red previamente aireada, con valores de temperatura ($17 \pm 1^\circ\text{C}$), pH ($8,7 \pm 0,3$), dureza ($215 \pm 32 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) y fotoperíodo 12:12 h luz/oscuridad controlados. Los camarones fueron alimentados diariamente con fórmula comercial TetraFin Sinking Mini Sticks (marca Tetra). A la misma se le determinó Cd (Espectrofotometría de Absorción Atómica con horno de grafito, Laboratorio de Calidad de Aguas de Obras Sanitarias Sociedad de Estado -OSSE-, Mar del Plata), para descartar un aporte trófico adicional, presentando valores por debajo del límite de detección ($< 0,005 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Aquellos grupos de individuos que presentaron una mortalidad mayor al 2% no fueron utilizados en las experiencias, adoptándose el criterio establecido por Khan et al. (1988) para *Palaemonetes pugio*.

Transcurrido el período de aclimatación, los camarones fueron transferidos a las peceras de experiencia (35 x 40 x 25 cm; ancho, largo, alto, respectivamente). Todas las experiencias fueron realizadas bajo las mismas condiciones de aireación, temperatura, pH, dureza y fotoperíodo que las aplicadas durante la aclimatación. Respecto a la alimentación durante las experiencias, cabe destacar que el género *Palaemonetes* se caracteriza por ser muy voraz (Tatem et al., 1976; Buikema et al., 1980), y por lo tanto, la falta de alimentación podría constituir un estrés adicional. También se ha reportado que el género manifiesta aumentos de agresividad ante el ayuno durante ensayos de toxicidad, contribuyendo al canibalismo (Buikema et al., 1980). En consecuencia, esta situación probablemente provoque una subestimación en la CL_{50} calculada durante las

pruebas. Por lo tanto, se adoptó la recomendación de Buikema et al. (1980), administrando diariamente una cantidad de alimento equivalente al 1% de la biomasa, de esta manera el medio se conservó con baja materia orgánica en suspensión y se redujo al mínimo el canibalismo. Los acuarios fueron cubiertos con film plástico para reducir la evaporación del medio y así evitar procesos de concentración de Cd en el medio.

2.3.1. Preparación de la solución de Cd

La solución stock de Cd ($613 \text{ mgCd} \cdot \text{L}^{-1}$) se preparó a partir de cloruro de cadmio ($\text{CdCl}_2 \geq 99,99\%$, Sigma-Aldrich Chemical Corporation EE.UU.) y agua bidestilada ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$). Las concentraciones de Cd ensayadas fueron preparadas a partir de diluciones de dicha solución de manera directa en el agua de experiencia. Las concentraciones nominales de Cd al inicio de cada experimento fueron chequeadas por Voltimetría de Redisolución Anódica (ASV) mediante la técnica de film de mercurio sobre electrodo rotatorio de grafito sólido (Andrade et al., 2006), con un límite de detección < 50 ppb de Cd. Se realizó una curva estándar utilizando una solución de Cd patrón (1.000 mgCd , CdCl_2 en H_2O , Titrisol® de Merck) para validar los datos. La concentración de Cd fue expresada en μg de Cd por litro.

2.3.2. Determinación de la Concentración Letal media (CL_{50})

Las concentraciones utilizadas para la determinación de la CL_{50} fueron establecidas previamente a partir de un ensayo preliminar (Range Finding Test). De acuerdo a la American Public Health Association (APHA, 1992), la mayor concentración a utilizarse en los ensayos definitivos debe causar una mortalidad superior al 50 % a las 24h, mientras que la menor concentración no debe causar

mortalidad al término del ensayo (96h). Las concentraciones ensayadas en la prueba preliminar fueron: 0,0; 3,06; 12,26; 30,66; 61,32; 306,0; 613,2 y 1226,4 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, el ensayo comprendió una duración de 96h y se emplearon 20 individuos/acuario. En base a los resultados obtenidos de la prueba preliminar, las concentraciones establecidas para los ensayos definitivos fueron las siguientes: 0,0; 3,06; 12,26; 30,66; 61,32; 306,0 y 613,2 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$. Teniendo en cuenta que los niveles de Cd en aguas no contaminadas corresponden a los 2 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ y que en ambientes donde hay contaminación por este metal se han informado niveles hasta 115 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Galvão y Corey, 1987), las concentraciones establecidas para los ensayos comprenden situaciones de relevancia ambiental.

Para la determinación de la CL_{50} se aplicó un diseño estático con renovación parcial (25%) del agua cada 48h. Se ensayaron con 100 camarones/acuario para el control y cada tratamiento, por triplicado. Los individuos fueron chequeados cada 24h, registrándose la cantidad de individuos muertos en cada tratamiento, los cuales fueron removidos inmediatamente. La ausencia de respuesta a un estímulo mecánico suave fue el criterio para establecer la muerte (Lin y Chen, 2003).

La CL_{50} para cada población de camarones se determinó a 24, 48, 72 y 96h mediante el método Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977), utilizando el programa Spearman (U.S.EPA, 1993). Las Concentraciones Seguras (CS) de Cd se determinaron por el método de Miller y Miller (1986), siguiendo el factor de aplicación 1/100 del valor de la CL_{50} 96h.

2.3.3. Ensayos a 24h y 96h (curvas dosis-respuesta)

Para la obtención de las curvas dosis-respuesta a 24h y 96h, los camarones fueron expuestos a diferentes concentraciones subletales de Cd, las cuales fueron establecidas a

partir de los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda para cada población. Las concentraciones ensayadas a 24h fueron: 0,0; 3,06; 12,26; 30,66 y 61,32 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que a 96h fueron: 0,0; 3,06; 12,26 y 30,66. Los tratamientos y sus controles correspondientes se realizaron por duplicado, utilizando 200 individuos/acuario (Fig. 2.3. A).

De igual manera que las pruebas de CL_{50} , el agua de los tratamientos fue renovada parcialmente (25%) cada 48h. Una vez transcurrido el tiempo de ensayo, los hepatopáncreas fueron disecados inmediatamente con pinza de puntas finas (Fig. 2.3. B) y congelados en nitrógeno líquido, para luego ser almacenados en freezer a -80°C hasta su análisis.

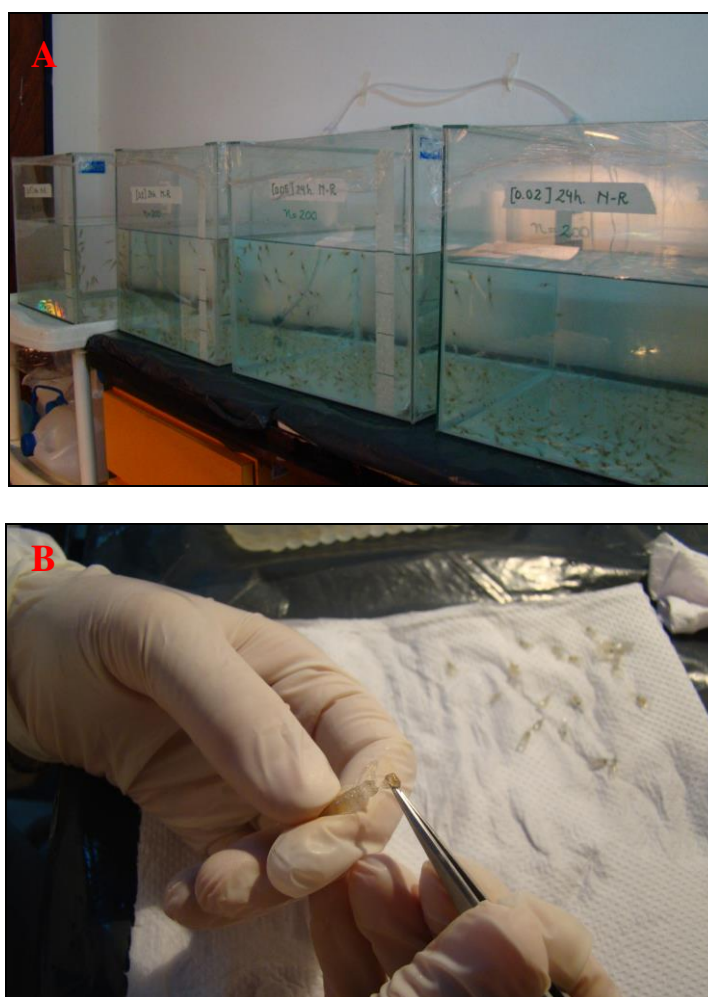


Figura 2.3. A: acuarios durante ensayo a 24h, B: Disección del hepatopáncreas.

2.3.4. Ensayos a 15 días (curvas tiempo-respuesta)

Los camarones fueron expuestos a dosis subletales de Cd, las cuales fueron establecidas en base a los valores de CL_{50} de cada población. La población NR se expuso a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que la población LP a $3,06$ y $12,26 \mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 3, 5, 7, 10 y 15 días. Cada tratamiento se realizó con su respectivo control, utilizando 200 individuos/acuario. Transcurrido el tiempo de ensayo, los hepatopáncreas fueron disecados inmediatamente con pinza de puntas finas y congelados en nitrógeno líquido, para luego ser almacenados en freezer a -80°C hasta su análisis. De cada tratamiento, se conservaron muestras de hepatopáncreas ($n = 4$) en solución Davison para el posterior análisis histológico.

2.3.5. Ensayos de depuración

Individuos expuestos a dosis subletales de Cd (NR: $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$; LP: $3,06$ y $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$) durante 15 días fueron transferidos a acuarios con agua potable libre de Cd durante 7, 14, 21 y 28 días. El tiempo total de depuración fue establecido a modo de abarcar al menos un ciclo de muda completo, siendo para esta especie y en condiciones de cautiverio de $25 \pm 4,4$ días (Díaz et al., 1998). Para cada tratamiento se emplearon 200 individuos/acuario con un control para cada uno. Transcurrido el tiempo de depuración, los hepatopáncreas fueron disecados inmediatamente y congelados en nitrógeno líquido, para luego ser almacenados en freezer a -80°C hasta su análisis. De cada tratamiento, se conservaron muestras de hepatopáncreas ($n = 4$) en solución Davidson para el análisis histológico.

2.4. Determinación de MT

La concentración de MT fue determinada de acuerdo con el protocolo descrito por Viarengo et al. (1997), basada en la determinación de los grupos sulfhidrilos (-SH) correspondientes al aminoácido cisteína de las mismas. La muestra (50 µg) fue homogenizada en 3 volúmenes de una solución buffer (conteniendo sacarosa 0,5 M; buffer Tris-HCl 20 mM a pH 8,6; fenilmetilsulfonilfluoruro -PMSF- 0,5 mM como agente antiproteolítico y β-mercaptoetanol 0,01% como agente reductor) con un homogeneizador manual a motor. El homogenato se centrifugó a 30.000 x g durante 45 min (4°C) para obtener el sobrenadante (fracción citosólica) conteniendo las MT. El sobrenadante se trató con etanol absoluto y cloroformo y luego se centrifugó a 6000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Al sobrenadante obtenido se adicionó una solución de ácido clorhídrico (HCl) - etanol absoluto (concentración final de etanol 87%) y se mantuvo a -20°C durante 1 hora; luego se centrifugó a 6000 x g durante 10 minutos. El pellet, conteniendo las MT, se lavó con una solución de etanol-cloroformo en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,6 y se centrifugó a 6000 x g durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 300 µl de cloruro de sodio (ClNa) 250 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 4 mM, pH 7. A continuación, se añadió a la muestra 500 µl de buffer conteniendo fosfato disódico anhidro (Na₂HPO₄) 0,2 M; NaCl 2 M y 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 0,43 mM a pH 8, e incubada a 35°C durante 30 minutos. La muestra se centrifugó finalmente a 3000 x g durante 5 minutos y la absorbancia del sobrenadante se cuantificó por Espectrofotometría UV-VIS a 412 nm (Espectrofotómetro Shimadzu UV-2450; Laboratorio de Producción Primaria del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero –INIDEP-, Mar del Plata). Se realizó una curva estándar, utilizando una solución de glutatión reducido (GSH 120 µM) como patrón de referencia. Cada muestra fue analizada por duplicado. La cuantificación

se realizó en base al contenido de cisteína de MT de *Palaemonetes pugio* (17 cisteínas, GenBank N° AY935987), asumiendo un contenido similar para la MT de *P. argentinus*, debido a la naturaleza conservativa de su secuencia (Hardivillier et al., 2004). La concentración de MT fue expresada en μg de MT gr^{-1} de tejido húmedo.

2.5. Determinación de LPO

La peroxidación lipídica total se determinó por el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) propuesto por Oakes y Van Der Kraak (2003). Esta técnica se basa en la reactividad del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA), uno de los productos finales de la degradación lipoperoxidativa, produciendo un cromógeno color rosa que se cuantifica por Espectrofotometría o Fluorometría (Sinnhuber y Yu, 1958). Por lo tanto, altas concentraciones de TBARs corresponden a altos niveles de MDA indicando peroxidación lipídica.

La muestra (30 μg) fue homogenizada en una solución de cloruro de potasio (KCl) 1,15% conteniendo butilhidroxitolueno (BHT) 35 μM en una proporción 1:9 (v/v). El BHT evita oxidación de la muestra y por lo tanto la producción de MDA durante el manipuleo de la misma. Seguido, se añadió a la mezcla de reacción BHT 67 μM , ácido acético 20%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8%, dodecilsulfato sódico (SDS) 8,1% y H_2O . La mezcla se calentó a 95 °C durante 30 minutos y luego se enfrió en hielo durante 10 minutos. Después del enfriamiento, se añadió agua bidestilada y n-butanol concentrado, centrifugándose a 2000 x g durante 10 minutos. La fluorescencia fue medida en la fracción butanólica (Fluorómetro Fluoroskan Thermo, Instituto de Investigaciones Biológicas -IIB-, Mar del Plata) con longitudes de onda de excitación y emisión de 515 nm y 553 nm, respectivamente. El tetrametoxipropano (TMP) se utilizó

como patrón externo, ya que la hidrólisis ácida de este acetal produce MDA en una reacción equimolecular (Sinnhuber y Yu, 1958). Las determinaciones fueron realizadas por duplicado y los niveles de LPO se expresaron en nmoles de TBARs gr^{-1} de tejido húmedo.

2.6. Cortes histológicos

El hepatopáncreas, es un órgano altamente sensible a cambios fisiológicos, tales como la alimentación y/o la muda (Johnston et al., 1998), produciendo algunas alteraciones tales como atrofia celular, condensación de la cromatina nuclear, interrupción del ribete en cepillo y algunos cambios ultraestructurales en las mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso y cuerpos residuales (Icely y Nott, 1992; Storch, 1984; Storch y Anger, 1983; Vogt et al., 1985). Por lo tanto, para poder distinguir entre las lesiones causadas por los contaminantes y las normales variaciones estructurales en las células y tejidos, es necesario contar con una buena base de datos. La estructura del hepatopáncreas de *P. argentinus* está ampliamente documentada (Sousa, 2003; Sousa et al., 2005; Sousa y Petriella, 2000; 2001; 2007). Sousa (2003), caracterizó la estructura del hepatopáncreas durante el ciclo de muda, informando que en el estadio de intermuda los organismos presentan un buen estado nutricional y el hepatopáncreas presenta un estado funcional normal. Por esta razón, para realizar el estudio histológico en *P. argentinus* se seleccionaron individuos en dicho estadio. El mismo fue determinado mediante la observación de la setogénesis de los urópodos, de acuerdo con el criterio establecido por Díaz et al. (1998).

El análisis histológico se llevo a cabo sobre un total de 192 individuos, correspondientes a los ensayos de 15 días y depuración. Los hepatopáncreas fueron

disecados e inmediatamente fijados en solución Davidson (etanol, formol, ácido acético y agua destilada) (Bell y Lightner, 1988) durante 24 h. Luego fueron deshidratados en una serie progresiva de alcohol etílico, alcohol butílico (dos cambios de 24 horas cada uno), butil-parafina 50:50 (24 horas) y finalmente se realizó la inclusión en parafina. Se realizaron cortes seriados de 3 μm en micrótopo de deslizamiento (marca ARCANO, Laboratorio de Acuicultura, Departamento de Ciencias Marinas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata). Los cortes fueron coloreados con el método de tinción topográfico Hematoxilina-Eosina (H-E). Las alteraciones histológicas fueron evaluadas en microscopio óptico y basándose en las características establecidas por Sousa y Petriella (2000).

2.7. Análisis de los datos

Todas las comparaciones fueron realizadas de acuerdo al procedimiento estadístico sugerido por Underwood (1997). Luego del control de calidad de los datos y previo a cada test aplicado, se chequeó la homocedasticidad de las varianzas mediante el test de Levene y la normalidad de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Para establecer la presencia o ausencia de diferencias significativas se aplicaron las pruebas paramétricas: test de t-Student y ANOVA de una vía y las no-paramétricas: U Mann Wittney y Kruskal-Wallis (Zar, 1996). Finalmente, cuando los tests ANOVA y Kruskal-Wallis detectaron diferencias significativas, las comparaciones *a posteriori* (post-hoc test) fueron realizadas mediante los tests de Tukey y Dunn, respectivamente. El nivel de significación fue de 0,05. Todos los análisis fueron realizados mediante el programa STATISTICA versión 8.0 (Statsoft, Inc.).

Capítulo III

Variaciones estacionales en los niveles de metalotioneínas y peroxidación lipídica

3.1. Introducción

Los niveles de los biomarcadores pueden ser influenciados por diferentes factores bióticos y abióticos, incluyendo el estado nutricional, ciclo reproductivo, edad, temperatura, salinidad, entre otros (Amiard et al., 2006; Sroda y Cossu-Leguille, 2011). Muchos de estos factores presentan estacionalidad, determinando un patrón de variación natural en los niveles de los biomarcadores a lo largo del año. La influencia de estos factores sobre los biomarcadores varía entre especies, y con menor frecuencia entre poblaciones de una misma especie (Bebianno et al., 2003; Geffard et al., 2007). Por lo tanto, la comprensión de sus fluctuaciones naturales es necesaria para una correcta interpretación de los resultados de campo y laboratorio, para discriminar el inicio de una perturbación biológica sobre la variabilidad natural (Mouneyrac et al., 2000).

Existe una gran cantidad de publicaciones relacionadas con las variaciones naturales de MT en diferentes especies de invertebrados, especialmente moluscos bivalvos (Baudrimont et al., 1997; Hamza-Chaffai et al., 1999; Serra et al., 1999; Mouneyrac et al., 2000; Geffard et al., 2005). Sin embargo, los estudios en crustáceos son escasos (Legras et al., 2000; Geffard et al., 2007) y nulos para especies de camarones. En cambio, las evaluaciones sobre LPO han sido documentadas en crustáceos (Correia et al., 2003; Dutra et al., 2007, 2008; Sroda y Cossu-Leguille, 2011), así como también para una especie de camarón de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii*, n.v. camarón gigante de agua dulce, Dandapata et al., 2003).

Para realizar una evaluación apropiada de las variaciones estacionales de un biomarcador, es necesario que los organismos provengan de un ambiente prístino (Geffard et al., 2007; Lavariás et al., 2011; Sroda y Cossu-Leguille, 2011). Como se expuso en el capítulo II, la laguna NR se la considero como sitio de referencia por su bajos niveles de contaminantes, por lo tanto, la población de NR resulta adecuada para evaluar las

variaciones estacionales. En el caso de la laguna LP, si bien no constituye un ambiente prístino, la evaluación de organismos provenientes de un ambiente crónicamente contaminado permitirá analizar la influencia de dicho impacto sobre el patrón de variación natural.

El **objetivo** propuesto para el Capítulo III es “conocer las variaciones estacionales de los niveles de MT y LPO en las poblaciones de *Palaemonetes argentinus* de las lagunas Nahuel Rucá y de los Padres”.

Se postula:

- Los factores biológicos y aquellos ambientales, ajenos a procesos de contaminación, influyen sobre los niveles de MT y LPO, determinando un patrón de variación natural.

3.2. Análisis de los datos

Todos los valores fueron expresados como el promedio \pm desvío estándar (DS). Para establecer diferencias en los niveles de MT y LPO y de temperatura entre estaciones para una misma laguna se realizó el test ANOVA de una vía (F) o su versión no paramétrica, el test Kruskal-Wallis (H). En los casos que se obtuvieron diferencias significativas, se aplicó posteriormente el test de comparaciones múltiples de Duncan o Dunn, según corresponda. Las diferencias entre lagunas, para una misma estación del año, se analizaron mediante los tests de Student (t) y U-Mann Wittman (Z) (Zar, 1996).

3.3. Resultados

3.3.1. Variables ambientales

En verano, la temperatura del agua fue la máxima registrada para ambas lagunas, si bien fue significativamente superior en NR ($Z = 2,882307$, $p = 0,003$) (Figura 3.1.). En otoño se observó un descenso, menor en NR, hasta alcanzar los mínimos valores registrados en el invierno para ambas lagunas. Finalmente, la temperatura del agua en primavera aumento significativamente (NR: $p = 0,0001$, LP: $p = 0,0001$) en ambos sitios. Los valores medios de pH variaron entre 8,9 – 9,2 para NR y entre 8,4 – 9,8 para LP, no encontrándose diferencias significativas entre lagunas ni estaciones del año. Los valores medios de salinidad para LP y NR fueron $0,03 \pm 0,00$ y $0,04 \pm 0,02$, respectivamente; indicando la ausencia de variaciones temporales. Los valores de dureza del agua fueron obtenidos en otoño y estuvieron en el rango 150,0 - 244,5 mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ para NR y 172,3 - 242,3 mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ para LP.

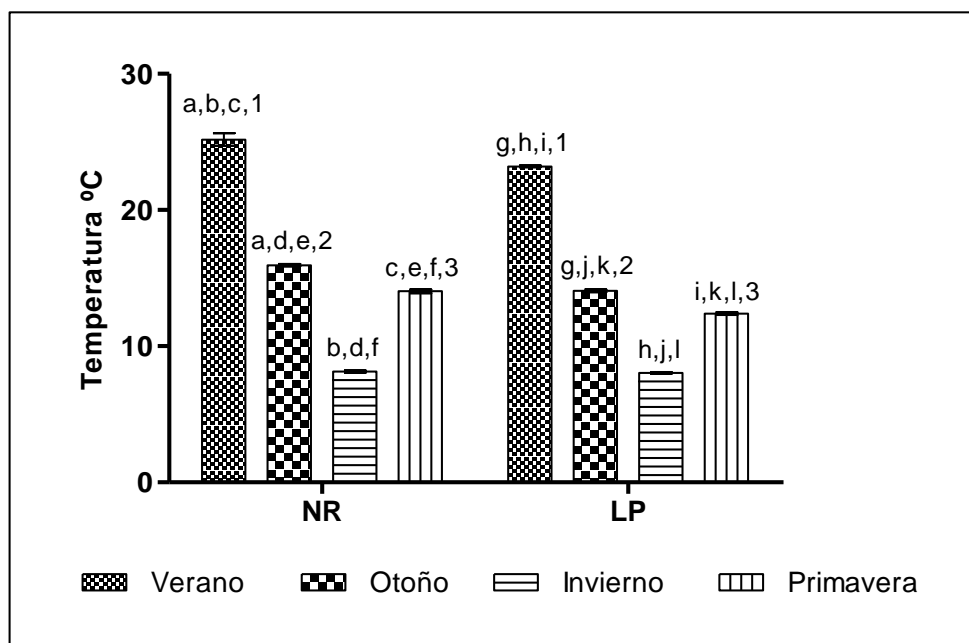


Figura 3.1. Valores estacionales de las temperaturas (promedio \pm desvío estándar) registradas en las lagunas Nahuel Rucá (NR) y de Los Padres (LP). Letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estaciones para una misma laguna. Números indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre lagunas para la misma estación.

3.3.2. Variaciones estacionales en los niveles de MT

Los niveles de MT en hepatopáncreas fueron significativamente diferentes en las cuatro estaciones del año en ambas poblaciones de camarones (NR: $F = 5,006704$, $p = 0,030$; LP: $F = 4,202986$, $p = 0,044$) (Figura 3.2.). En NR, los niveles más altos se registraron en verano, si bien no fueron significativamente superiores (Test de Duncan, $p = 0,195$) a los correspondientes a primavera. Luego se observó una disminución significativa durante otoño (Test de Duncan, $p = 0,006$) e invierno (Test de Duncan, $p = 0,011$). En LP,

los niveles más altos se registraron en otoño, disminuyendo significativamente hacia la primavera (Test de Duncan, $p = 0,011$).

En cuanto a las diferencias entre lagunas para cada estación del año, durante el período primavera-verano, los niveles en NR fueron significativamente superiores a los de LP (primavera: $t = 8,522676$, $p = 0,001$; verano: $t = 2,798940$, $p = 0,048$); mientras que en otoño fueron significativamente más altos en LP ($t = -2,60928$, $p = 0,050$). En invierno no se registraron diferencias significativas entre ambos sitios ($t = 0,189109$, $p = 0,859$).

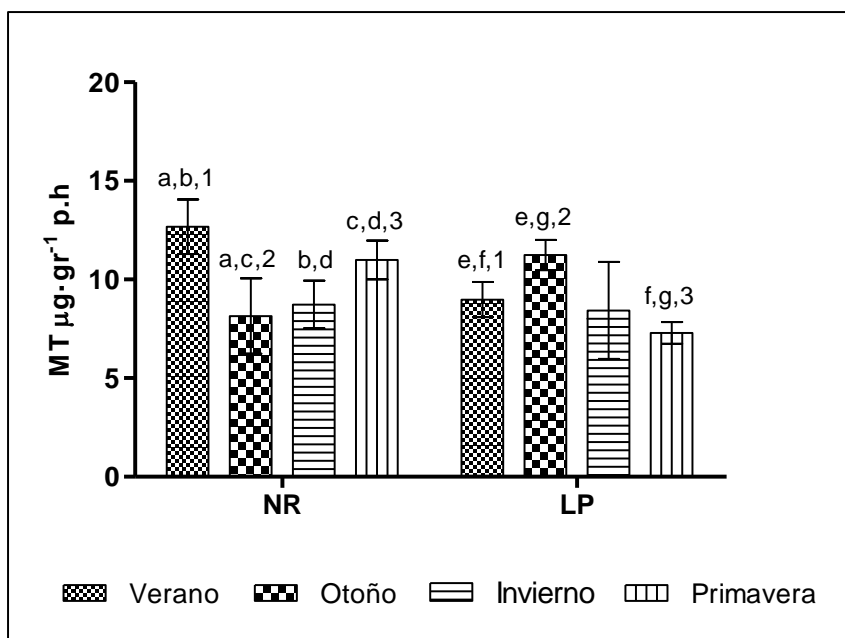


Figura 3.2. Niveles estacionales de metalotioneínas (MT) (promedio \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de *P. argentinus* provenientes de las lagunas Nahuel Rucá (NR) y de Los Padres (LP). Letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estaciones para una misma laguna. Números indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre lagunas para la misma estación.

3.3.3. Variaciones estacionales en los niveles de LPO

Los niveles de LPO en hepatopáncreas de ambas poblaciones de camarones mostraron variaciones en las cuatro estaciones del año (NR: $H = 13,18573$, $p = 0,004$; LP: $F = 4,474149$, $p = 0,040$) (Figura 3.3.). El patrón estacional de LPO en NR se caracterizó por un descenso gradual desde el verano hasta la primavera. Si bien los valores correspondientes al verano y otoño no presentaron diferencias entre sí (Test de Dunn, $p = 1,00$), los mismos fueron significativamente superiores a los de invierno y primavera ($p < 0,05$). Los niveles de LPO en LP fueron más altos durante el período verano-otoño, sin encontrarse diferencias significativas entre sí (Test de Duncan, $p = 0,749$), y más bajos en invierno-primavera, aunque este descenso fue significativo sólo para primavera (Test de Duncan, verano: $p = 0,032$, otoño: $p = 0,022$) respecto a verano y otoño.

En cuanto a las diferencias entre lagunas para una misma estación del año, los niveles de verano y otoño fueron significativamente superiores en NR (verano: $t = 15,20395$, $p = 0,0001$; otoño: $t = 2,556138$, $p = 0,050$). En cambio, no se encontraron diferencias significativas en invierno ($t = 2,095314$, $p = 0,104$) ni primavera ($t = -2,09761$, $p = 0,103$).

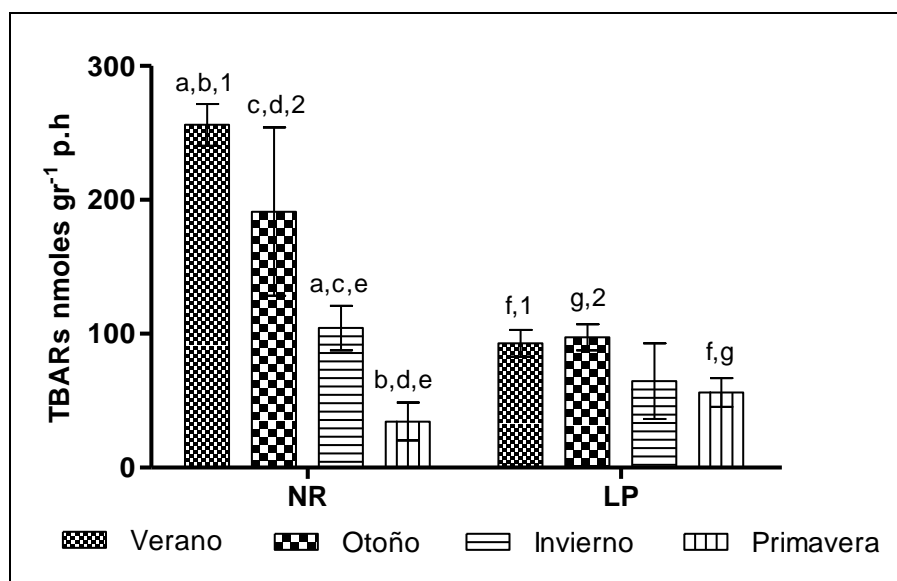


Figura 3.3. Niveles estacionales de peroxidación lipídica (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de *P. argentinus* provenientes de las lagunas Nahuel Rucá (NR) y de Los Padres (LP). Letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estaciones para una misma laguna. Números indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre lagunas para la misma estación.

3.4. Discusión

Las variaciones estacionales fueron notorias para los dos biomarcadores estudiados y en ambas poblaciones de *P. argentinus*, si bien el patrón fue diferente.

La estacionalidad de MT en NR, con valores elevados en primavera-verano e inferiores en otoño-invierno, fue similar a la reportada para otras especies de crustáceos, tales como el cangrejo marino, *Pachygrapsus marmoratus* (n.v. cangrejo corredor, Mouneyrac et al., 2001) y el anfípodo dulceacuícola, *Gammarus pulex* (n.v. pulga de agua,

Geffard et al., 2007). En ambos casos, los niveles de MT estuvieron relacionados con la condición fisiológica de los organismos, particularmente con la actividad reproductiva. Los mencionados autores observaron un aumento en los niveles de MT durante el período reproductivo; de la misma manera que para numerosas especies de bivalvos: *Corbicula fluminea* (Baudrimont et al., 1997), *Ruditapes decussatus* (Hamza-Chaffai et al., 1999), *Mytilus galloprovincialis* (Serra et al., 1999), *Macoma balthica* (Mouneyrac et al., 2000) y *Mytilus edulis* (Geffard et al., 2005). El período reproductivo de *P. argentinus* comienza en septiembre-octubre y finaliza en febrero (Donatti et al., 1986), coincidiendo con los máximos valores de MT hallados en primavera-verano. Por lo tanto, el patrón estacional de MT en los camarones de NR parece estar también relacionado con su período reproductivo, el cual a su vez está asociado al aumento de la temperatura del agua (Goldstein y Lauría de Cidre, 1974; Donatti et al., 1986). En los camarones de LP, el patrón de variación de MT fue opuesto al observado en NR, y no coincide con lo informado para otras especies de invertebrados, reflejando un patrón alterado asociado a la contaminación del ambiente. Además, cabe destacar que los niveles de MT en la población de LP, a pesar de provenir de un ambiente con una alta carga de metales pesados, no fueron más elevados a los correspondientes a NR, lo cual no era lo esperable. Dicha situación también fue hallada para el bivalvo *Crassostrea gigas* (n.v. ostra japonesa), donde los niveles basales de MT no presentaron diferencias entre las poblaciones provenientes de ambientes prístinos con los de ambientes contaminados por Cd, Cu y Zn (Damiens et al., 2006). Es altamente probable que los niveles de MT existentes en los camarones de LP, indistintamente de la estación del año, permite entrapar los metales biodisponibles presentes en su ambiente.

Los niveles de LPO mostraron también una marcada estacionalidad, con valores más altos en verano-otoño y más bajos en invierno-primavera para las dos poblaciones estudiadas, si bien fue más evidente para NR. El mismo patrón se ha observado en el

camarón marino *Aristeus antennatus* (n.v. gamba roja, Antó et al., 2009) así como también en el camarón *Macrobrachium borelli* (n.v. camarón de río, Lavarías et al., 2011) y en el anfípodo *Hyaletilla curvispina* (n.v. pulga de agua, Dutra et al., 2008), ambos dulceacuícolas. Dutra et al. (2008) relacionó el aumento en los niveles de peroxidación lipídica con el incremento de las horas de luz durante los meses de verano. Por su parte, Duran-Lizarraga et al (2001) y Fanjul-Moles et al. (2003) observaron en el cangrejo de río *Procambarus clarkii*, que entre 12-20 horas de irradiación induce estrés oxidativo. También en el anfípodo dulceacuícola *Daphnia longispina* (n.v. pulga de agua), se ha probado bajo condiciones de laboratorio que la radiación UV causa un aumento de la peroxidación lipídica (Vega y Pizarro, 2000). Según datos del Servicio Hidrográfico Naval (SHN) de la República Argentina, para el área geográfica correspondiente a las lagunas, los meses de verano se caracterizan por presentar entre 14 y 16 horas de luz aproximadamente (SHN, 15/11/2009), en contraste con las 10 a 12 horas durante el invierno. Dicha variación podría tener una influencia sobre los niveles de LPO. Por otra parte, la temperatura es un factor que parece también influir sobre este biomarcador. Sroda y Cossu-Leguille (2011) observaron, en el crustáceo gamárido (n.v. pulga de agua) *Gammarus roeseli*, que la temperatura está positivamente correlacionada con los niveles de LPO. Esto concuerda con lo observado en *P. argentinus* de ambas lagunas, pudiendo explicar los altos niveles observados durante los meses mas cálidos (verano-otoño). A su vez, este factor podría justificar las diferencias entre lagunas. La mayor peroxidación lipídica encontrada en NR, durante verano – otoño, coincide con mayores temperaturas promedio (25,16 y 15,95°C, verano y otoño, respectivamente) que aquellas registradas en LP (23,2 y 14,06°C, verano y otoño, respectivamente). Por lo mencionado, las variaciones en los niveles de LPO en *P. argentinus* podrían asociarse a cambios estacionales de temperatura y fotoperiodo.

3.5. Conclusiones

Los resultados del estudio estacional de los biomarcadores en *Palaemonetes argentinus* demostraron:

- Los factores bióticos y abióticos (excepto la contaminación), en camarones de NR, ejercen una influencia sobre los niveles de MT y LPO durante las estaciones del año.
- La población de NR presentó un patrón de variación estacional de MT con dos períodos de clara diferencia: otoño-invierno (mínimos) y primavera-verano (máximos).
- La población de NR presentó un patrón de variación estacional de LPO con dos períodos de clara diferencia: invierno-primavera (mínimos) y verano-otoño (máximos).
- El patrón estacional de MT y LPO de los camarones de LP se encontró alterado producto de la contaminación.

Capítulo IV

Ensayos de toxicidad con cadmio

4.1. Introducción

La liberación de sustancias tóxicas en los ecosistemas acuáticos produce una variedad de respuestas complejas en los organismos, las que precisan ser evaluadas. Entre los métodos desarrollados para evaluar el efecto potencial de dichas sustancias se encuentran los bioensayos de toxicidad aguda. Estos consisten en experiencias que estiman los efectos perjudiciales mediante la respuesta de los organismos expuestos a un rango de concentraciones de una sustancia durante períodos cortos de tiempo (Silva et al., 2007). Los bioensayos de toxicidad son una herramienta ampliamente utilizada en el campo de la Ecotoxicología, permitiendo la cuantificación de la relación concentración-efecto de compuestos químicos o mezclas complejas, evaluando respuestas biológicas bajo condiciones controladas y estandarizadas. Si bien existen muchas formas de establecer la respuesta tóxica (efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos, comportamiento, entre otros) la más aplicada para determinar la toxicidad es la muerte del organismo de prueba (Giesy y Graney, 1989). El parámetro toxicológico más utilizado es la concentración o dosis letal (CL_x), definida como la concentración o dosis de una sustancia química que produce la muerte de un porcentaje "x" de la población expuesta durante el ensayo. Entonces, la concentración letal media o CL₅₀ se define como la concentración que mata al 50 % de la población expuesta en un tiempo dado, normalmente 24 ó 96 horas (Díaz-Báez et al., 2004).

La CL₅₀ brinda información sobre la sensibilidad de una especie a un determinado compuesto, lo cual ayuda a determinar criterios de calidad ambiental, es decir, los límites máximos permitidos de un contaminante presente en un ecosistema. Un método para determinar un criterio de calidad es basarse en la especie más sensible del ecosistema, por lo que las otras especies que co-habitan ese ambiente no se verán afectadas si se respeta el límite.

Es así que los niveles de toxicidad letal aguda han sido ampliamente utilizados para determinar los valores máximos permitidos de distintos contaminantes tales como cromo, níquel, cobre, cadmio, plomo, cinc, Diuron, Clorotalonil, entre otros (Mortimer y Miller, 1994; Fichet et al., 1998; Preston y Snell, 2001; Koutsaftis y Aoyama, 2007). La CL_{50} también permite comparar sensibilidades entre diferentes especies para un mismo compuesto, así como la toxicidad de diferentes compuestos para una misma especie.

Los crustáceos han sido extensamente empleados en bioensayos de toxicidad de metales pesados y compuestos orgánicos persistentes (COPs) mostrando una particular sensibilidad (López Greco et al., 2001). El género *Palaemonetes* posee características que han facilitado su empleo en estudios toxicológicos, como son su fácil mantenimiento en cautiverio, abundancia, disponibilidad y sensibilidad a tóxicos (Buikema et al., 1980). Estas características coinciden con algunas de las recomendaciones hechas en la selección de organismos para pruebas de toxicidad (Castillo, 2004). Si bien el género *Palaemonetes* cuenta con numerosos trabajos sobre efectos letales y subletales por COPs (De Lorenzo et al., 2006; Key et al., 1998; 2006; Key y Fulton, 2006; Marshalonis et al., 2006; Oberdörster, et al., 2000; Weber et al., 1996; Wirth et al., 2001) y metales pesados (Khan et al., 1988; 1993), son escasos para *P. argentinus*. En lo que respecta a COPs, Collins y Capello (2006) reportaron la CL_{50} de cipermetrina para juveniles de *P. argentinus*, mientras que Montagna y Collins (2007) la CL_{50} de clorpirifos y endosulfán en adultos. En el caso de metales sólo se ha reportado la CL_{50} de arsénico en adultos de la especie (Rodríguez Capítulo, 1984), siendo desconocida hasta la fecha, la sensibilidad de *P. argentinus* a Cd.

Se debe tener en cuenta que las poblaciones de *P. argentinus* evaluadas en este estudio provienen de lagunas con distintos grado de contaminación, siendo posible el desarrollo de

cierta tolerancia a los contaminantes presentes en su ambiente (entre ellos Cd). Por lo tanto, resulta interesante comparar las sensibilidades al Cd entre las poblaciones de *P. argentinus* estudiadas.

En este contexto el **objetivo** propuesto para el Capítulo IV es “evaluar la toxicidad del cadmio en las poblaciones de *Palaemonetes argentinus* de las lagunas Nahuel Rucá y de los Padres”.

Se postula:

- *Palaemonetes argentinus* es una especie sensible al Cd.
- La población de *Palaemonetes argentinus* de la laguna de los Padres presenta mayor tolerancia al Cd como resultado de la calidad disminuida de su ambiente.

4.2. Análisis de los datos

Los valores de supervivencia para cada tiempo fueron expresados como porcentajes promedios. Para establecer diferencia de supervivencia entre poblaciones de camarones para los distintos tiempos de exposición se utilizaron los tests de Student (t) y U Mann Wittman (Z) (Zar, 1996). La existencia de diferencias significativas entre los valores de LC₅₀ calculados para ambas poblaciones de camarones se determinó por la comparación de los intervalos de confianza al 95% (IC) (Rodríguez et al., 2011).

4.3. Resultados

4.3.1. Concentración de Cd en agua

Los valores analíticos de Cd en las soluciones ensayadas (Tabla 4.1.) estuvieron entre el 94-99% de los valores nominales para el rango de soluciones 12,26 - 613,2 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$. La concentración nominal más baja (3,06 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$) no fue detectada (límite de detección del método < 5 ppb).

Concentración nominal ($\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$)	Concentración analítica ($\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$)
3,06	ND
12,26	11,64 \pm 0,8
30,66	29,81 \pm 0,9
61,32	58,84 \pm 1,2
306,00	304,03 \pm 1,9
613,20	604,87 \pm 3,2

Tabla 4.1. Concentraciones nominales y analíticas (promedio \pm desviación estándar, n = 4) de Cd en las soluciones ensayadas durante las pruebas de toxicidad. ND: no detectable.

4.3.2. Ensayos de toxicidad

La supervivencia de los camarones para los tratamientos control y 3,06 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, fue 100% para ambas poblaciones luego de 96h de exposición (Fig. 4.1.). A partir de la

concentración $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, se empezaron a observar diferencias entre poblaciones. Para el tratamiento $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, la supervivencia de la población NR comenzó a disminuir significativamente respecto al control ($t = 6,047432$; $p = 0,003$) a partir de 48h de exposición, presentando una supervivencia promedio de 94,7% y alcanzando el 50% a 96h de exposición. En LP, para el tratamiento $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, la supervivencia comenzó a disminuir significativamente respecto al control ($Z = 1,963961$, $p = 0,049$) a partir de 72h de exposición (97,0 %), presentando al final de la experiencia una supervivencia promedio de 93,7 %. Respecto a los tratamientos $30,66$ y $61,32 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, se pudo observar que la población NR presentó valores de supervivencia inferiores al 50% a las 48h de exposición; mientras que en la población LP, los porcentajes estuvieron por encima de 50% para el mismo tiempo. Al final del ensayo, la supervivencia promedio en camarones de NR fue 4,7 y 0% para los tratamientos $30,66$ y $61,32 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente; mientras que en LP fue 21,7 y 5,7%, respectivamente. Por último, para los tratamientos $306,0$ y $613,2 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, ambas poblaciones presentaron porcentajes promedios de supervivencia inferiores al 30% ya a las 24h, alcanzando porcentajes inferiores a 5% a las 48h.

En cuanto al comportamiento, para los tratamientos $3,06$, $12,26$, $30,66$ y $61,32 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ los camarones de ambas poblaciones no presentaron cambios a ninguno de los tiempos ensayados. Contrariamente, los organismos expuestos a $306,0$ y $613,2 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, de ambas poblaciones, presentaron un estado letárgico con movimientos lentos de los pleópodos dentro de las primeras 24 horas de exposición. Sumado a esta conducta, también se observó melanización de las branquias.

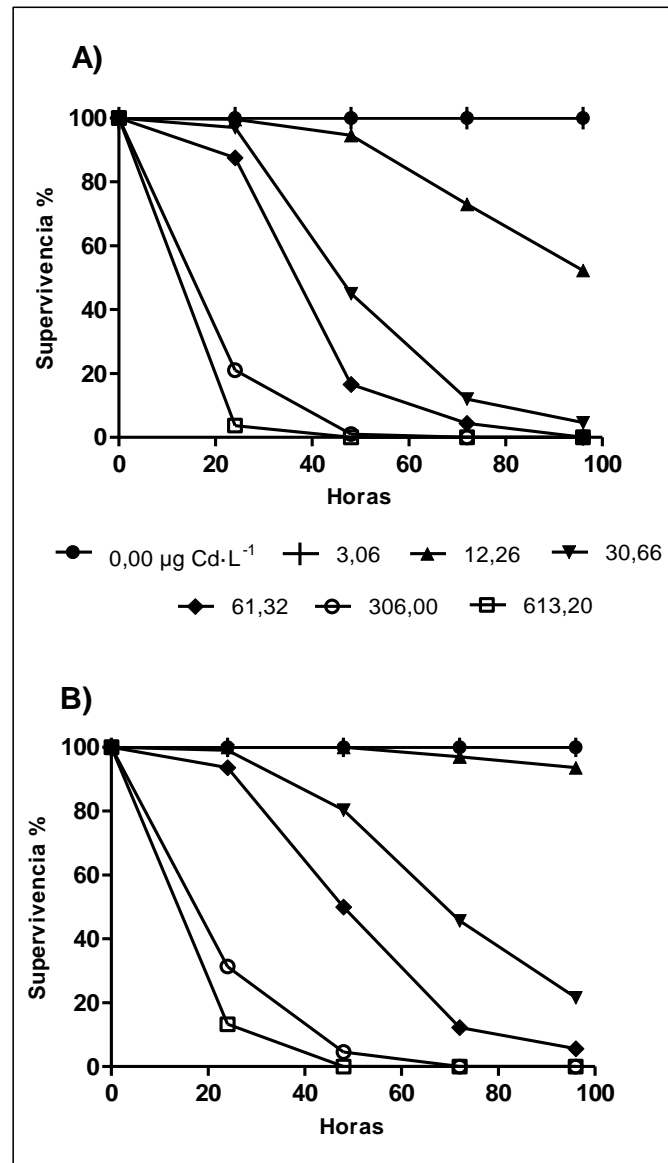


Figura 4.1. Supervivencia (porcentajes promedio) de las poblaciones de *Palaemonetes argentinus* de las lagunas Nahuel Rucá (A) y de los Padres (B) expuestas a cadmio durante 96h.

De acuerdo con las mortalidades registradas, los valores calculados de CL_{50} a 24, 48, 72, y 96h y sus intervalos de confianza al 95% (IC) se presentan en la Tabla 4.2. Los valores de CL_{50} en los camarones de la población LP fueron significativamente superiores a los calculados para NR a todos los tiempos de exposición, si bien a 24h como los IC se solapan dichas diferencias no serían significativas.

En base a los valores de CL_{50} -96h, la Concentración Segura (CS) de Cd calculada fue 0,123 y 0,245 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ para las poblaciones de NR y LP, respectivamente.

Exposición (horas)	NR		LP	
	CL_{50}	IC	CL_{50}	IC
24	153,3	122,6 – 208,5	269,80	141,0 – 380,2
48	32,65	24,50 – 36,80	67,45	55,15 – 85,80
72	18,40	12,26 – 18,40	30,66	24,50 – 36,80
96	12,26	12,26 – 12,26	24,50	18,40 – 24,50

Tabla 4.2. Concentración letal media (CL_{50}) de Cd ($\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$) y sus intervalos de confianza al 95% (IC) de las poblaciones de *Palaemonetes argentinus* de las lagunas Nahuel Rucá (NR) y de los Padres (LP).

4.4. Discusión

Palaemonetes argentinus demostró una alta sensibilidad al Cd, como se puede deducir de las CL_{50} obtenidas. Además, la disminución de este parámetro con el tiempo demostró que la toxicidad no solo es concentración-dependiente sino también tiempo-dependiente.

La toxicidad del Cd para crustáceos de agua dulce se encuentra ampliamente documentada (Tabla 4.3.), y si bien los valores presentan cierta variabilidad a igual tiempo, todos indican una alta sensibilidad al Cd por parte de las especies dulceacuícolas. Al compararlos con los obtenidos en los camarones de las lagunas NR y LP, es posible decir que estos últimos se ubicaron entre los más bajos reportados para crustáceos de agua dulce. Cabe destacar, que las CL_{50} de *P. argentinus* de NR y LP son cercanas a los valores reportados para los anfípodos *Hyalella azteca* ($8,0 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, García et al., 2010) y *H. curvispina* ($29,99 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, Nebeker et al., 1986), ambas especies consideradas como las más sensibles al Cd entre los crustáceos de agua dulce (Achiorno et al., 2010), demostrando la alta sensibilidad al Cd de la especie bajo estudio.

Especie	Estado de desarrollo	Tiempo (horas)	CL ₅₀ (µg · L ⁻¹)	Referencia
<i>Palaemonetes argentinus</i> (NR/LP)	Adulto	96	12,26 / 24,5	Presente estudio
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (decápodo)	Adulto	96	53,9	Kaoud y Eldahshan, 2010
<i>M. nipponense</i>	Adulto	96	74	Yang et al., 2008
<i>M. lanchesteri</i>	Adulto	96	7	Shuhaimi-Othman et al., 2011
<i>Hyalella azteca</i> (anfípodo)	Adulto	96	8	García et al., 2010
<i>H. curvispina</i>	Adulto	96	29,99	Nebeker et al., 1986
<i>Echinogammarus italicus</i> (anfípodo)	Adulto	96	910	Pantani et al., 1997
<i>E. echinosetosus</i>	Adulto	96	480	Martínez et al., 1996
<i>Gammarus tibalidii</i> (anfípodo)	Adulto	96	1100	Pantani et al., 1997
<i>G. pulex</i>	Adulto	48	1100	Stuhlbacher y Maltby, 1992
<i>Daphnia magna</i> (cladóceros)	Adulto	48	40,0	Nebeker et al., 1986
<i>D. magna</i>	Nauplios 24h	48	233	Barata et al., 1998

Tabla 4.3. Concentración letal media (CL₅₀) de Cd en crustáceos de agua dulce.

Caber destacar que las poblaciones de *P. argentinus* estudiadas presentaron una notable diferencia de sensibilidad, siendo los camarones de LP más tolerantes al Cd que los provenientes de NR. Dicha tolerancia podría relacionarse con la pre-exposición a los contaminantes presentes en su ambiente. Como ya fue mencionado en el Capítulo II, los sedimentos de LP presentaron altas concentraciones de COPs (Ondarza, 2005) y metales pesados (Chiodi et al., 2008), e incluso superiores a los niveles máximos establecidos como seguros para la biota (CCME, 2002). Por el contrario, los sedimentos de NR presentaron concentraciones de metales por debajo de dichos valores guía (Chiodi et al., 2010). Nuestros resultados concordaron con investigaciones de pre-exposición a Cd en *Palaemon elegans* (n.v. camarón de roca, Moraitou-Apostolopoulou et al., 1982) y en *Palaemonetes pugio* (n.v. camarón de hierba, Khan et al., 1988), demostrando que la exposición previa a bajas concentraciones de éste puede producir una mayor tolerancia al mismo. Similarmente, larvas de *C. gigas* pre-expuestas ambientalmente a Cd, Zn y Cu, presentaron una mayor tolerancia al Cu (Damiens et al., 2006). De la misma manera, la pre-exposición de los camarones de LP a los contaminantes presentes en su ambiente, entre ellos Cd, sería la causa de la tolerancia de esta población a dicho metal. Si bien el desarrollo de una mayor tolerancia podría ser considerada una ventaja adaptativa (Le Blanc, 1982), se ha demostrado que el mismo tiene un costo, que puede afectar al fitness de la población (Holloway et al., 1990; Kwok et al., 2009; Maltby, 1991; Pook et al., 2009). En el copépodo *Tigriopus japonicus* la resistencia al Cu estuvo asociada a menores tasas de crecimiento y fecundidad (Kwok et al., 2009); así como en las poblaciones resistentes a Cu y Zn del oligoqueto *Nereis diversicolor* (n.v. gusano de arena, Pook et al., 2009). Dicha situación fue informada también en la población de LP. En un estudio sobre los rasgos de historia de vida de diferentes poblaciones de *P. argentinus*, reveló

que la correspondiente a LP presentó anomalías en numerosos rasgos reproductivos, tales como menor tamaño y peso de larvas y adultos, mínimo porcentaje de ovígeras durante la estación reproductiva (siempre < 50%), mínima fecundidad, menor número de huevos y máxima pérdida de huevos (47%), informando un nivel de adecuación particularmente bajo (Ituarte, 2008). Por lo tanto, es esperable que estas anomalías afecten al fitness de los camarones de LP evaluados en esta tesis.

La determinación de la CS de Cd en *P. argentinus* permitió verificar si los niveles de Cd establecidos como seguros para la vida acuática protegen a la especie. En Argentina, los niveles admisibles de Cd en cuerpos de agua dulce para la protección de la vida acuática son regulados a través de la Ley Nacional N° 24.051 (reglamentada por Decreto Nacional N° 831/93). Dicha ley, se basa en los niveles establecidos por el Consejo Canadiense de Ministros de Medio Ambiente (CCME) del año 1987 (CCME, 1987), los cuales están calificados según la dureza del cuerpo de agua (Tabla 4.4.). Por lo tanto, en base a los valores de dureza encontrados en las lagunas estudiadas (150,0 - 244,5 mgCaCO₃ · L⁻¹, para NR y 172,3 - 242,3 mgCaCO₃ · L⁻¹, para LP), el nivel permisible de Cd en agua para ambos ambientes se encuentra en el rango 1,3 - 1,8 µgCd · L⁻¹. Las CS obtenidas para *P. argentinus* (0,123 y 0,245 µgCd · L⁻¹ para NR y LP, respectivamente), estuvieron muy por debajo de dicho rango, revelando que la regulación en Argentina no está protegiendo a esta especie autóctona.

Cabe destacar, que los niveles establecidos por el CCME del año 1987 fueron remplazados en el año 1999 (CCME, 1999; Tabla 4.4.), siendo muy inferiores a los anteriores. Los actuales niveles se basan en la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Cd} = 10^{0,86[\log(\text{dureza})] - 3,2} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

la cual, como se puede observar, también tiene en cuenta la dureza del agua.

Dureza (mgCaCO ₃ · L ⁻¹)	Niveles máximos permitidos (µgCd · L ⁻¹)	
	CCME (1987)	CCME (1999)
0-60	0,2	0,02
60-120	0,8	0,04
120-180	1,3	0,05
180-250	1,8	0,07

Tabla 4.4. Niveles máximos de Cd permitidos en agua según la dureza.

Sería recomendable que en Argentina se consideraran los niveles propuestos por el CCME del año 1999, ya que su aplicación a las lagunas aseguraría la protección de la especie, y así también de otros miembros de la biota, en los cuerpos de agua dulce.

4.5. Conclusiones

Los resultados de los ensayos de toxicidad en *Palaemonetes argentinus* demostraron:

- Es una especie altamente sensible al Cd, situándose entre las de mayor sensibilidad para los crustáceos de agua dulce.
- La LC₅₀ de la población de LP demostró que la especie es capaz de desarrollar tolerancia como resultado de la pre-exposición ambiental.
- Las diferencias de sensibilidad entre poblaciones permiten proponer a *Palaemonetes argentinus* como un bioindicador de la calidad ambiental.

Capítulo V

Ensayos subletales con cadmio

Biomarcadores

5.1. Introducción

La mayor parte de los estudios de toxicidad en organismos acuáticos se focalizan en el análisis de la mortalidad (toxicidad aguda), sin embargo, es de mayor importancia conocer el efecto a concentraciones subletales sobre el crecimiento, la reproducción y la supervivencia de los organismos expuestos (Jak y Meador, 1997). Cuando una sustancia tóxica ingresa a un organismo se desencadenan numerosos mecanismos bioquímicos y fisiológicos para contrarrestar el estrés tóxico causado por el contaminante. Estas respuestas (biomarcadores) son de gran interés debido a que son parámetros sensibles cuantificables a concentraciones subletales, brindando información inicial sobre posibles efectos producidos por los tóxicos (Graney y Giesy, 1986). En este tipo de evaluaciones se desarrollan ensayos subletales para evidenciar respuestas y/o efectos que si bien no implican la muerte del organismo, producen alteraciones a nivel bioquímico, fisiológico, morfológico y/o comportamental. A su vez, este tipo de estudios permiten dilucidar los mecanismos de detoxificación y las estrategias que los organismos desarrollan para habitar ambientes contaminados. Por su parte, los ensayos que incluyen procesos de depuración permiten evaluar el restablecimiento a las condiciones iniciales, es decir, su capacidad de recuperación ante la restitución de la calidad del agua con la eliminación del estresor.

En el Capítulo IV quedó demostrado que la población de *P. argentinus* proveniente de LP es más tolerante a Cd que la correspondiente a NR. Por lo tanto, resulta interesante comparar el comportamiento de MT y LPO ante la exposición a Cd entre las poblaciones estudiadas.

En base a lo anteriormente expresado los **objetivos** propuestos para el Capítulo V son:

“evaluar los niveles de MT y LPO en hepatopáncreas de *Palaemonetes argentinus* expuestos a dosis subletales crecientes (curva dosis-respuesta) y fijas (curva tiempo-respuesta) de Cd en las poblaciones de las lagunas Nahuel Rucá y de los Padres”
y

“evaluar los niveles de MT y LPO en hepatopáncreas de individuos pre-expuestos a Cd durante procesos de depuración”.

Se postula:

- La inducción de MT ante la exposición a Cd constituye una señal de alarma temprana en *P. argentinus*.
- El origen de los camarones asociado a la calidad ambiental condiciona la respuesta a la exposición a Cd.
- Durante procesos de depuración *P. argentinus* restablece los niveles iniciales de MT y LPO.

5.2. Análisis de los datos

Los niveles de MT y LPO fueron expresados como promedios \pm desvío estándar. Para establecer diferencia en los niveles de MT y LPO entre diferentes dosis de Cd, así como entre distintos tiempos de exposición se utilizó el test de ANOVA de una vía (F) o su versión no paramétrica, el test Kruskal-Wallis (H). En los casos que se obtuvieron diferencias significativas, se aplicó posteriormente el test de comparaciones múltiples de Tukey o Dunn, según corresponda. Las diferencias entre poblaciones, para un mismo tratamiento, se analizaron mediante los tests de Student (t) y U-Mann Wittman (Z) (Zar, 1996).

5.3. Resultados

5.3.1. Curvas dosis-respuesta

5.3.1.a. Ensayos a 24h

Las poblaciones de camarones estudiadas mostraron una respuesta diferencial en los niveles de MT ante la exposición a Cd durante 24h, no así en los niveles de LPO (Fig. 5.1. A y B).

La población NR, mostró un aumento significativo ($H = 10,4333$, $p = 0,033$) en los niveles de MT para los tratamientos $3,06$, $12,26$ y $30,66 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ (Test de Dunn; $3,06$: $p = 0,004$, $12,26$: $p = 0,004$ y $30,66$: $p = 0,049$) respecto al control, no así para el tratamiento de mayor concentración ($61,32 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$), el cual fue similar al control. Contrariamente, la población LP, no mostró variaciones en los niveles de MT respecto al control para ninguna concentración. Al comparar los niveles de esta proteína entre

ambas poblaciones, se observaron diferencias significativas sólo para los tratamientos 3,06, 12,26 y 30,66 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ (3,06: $t = 6,833966$, $p = 0,002$; 12,26: $Z = -2,32379$, $p = 0,020$; 30,66: $Z = 1,963961$, $p = 0,049$), presentando la población NR niveles superiores a los de LP. En cambio, para el control las concentraciones fueron similares.

En cuanto a los niveles de LPO, ambas poblaciones mostraron una respuesta similar ante la exposición a Cd durante 24h, las cuales mostraron un aumento significativo respecto al control (NR: $t = -3,20829$, $p = 0,032$; LP: $t = -3,02434$, $p = 0,038$) sólo para el tratamiento de mayor concentración ($61,32 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$). Por su parte, no se observaron diferencias entre las poblaciones para cada tratamiento, excepto para los controles, los cuales fueron significativamente ($Z = -2,88231$, $p = 0,003$) más elevados para NR.

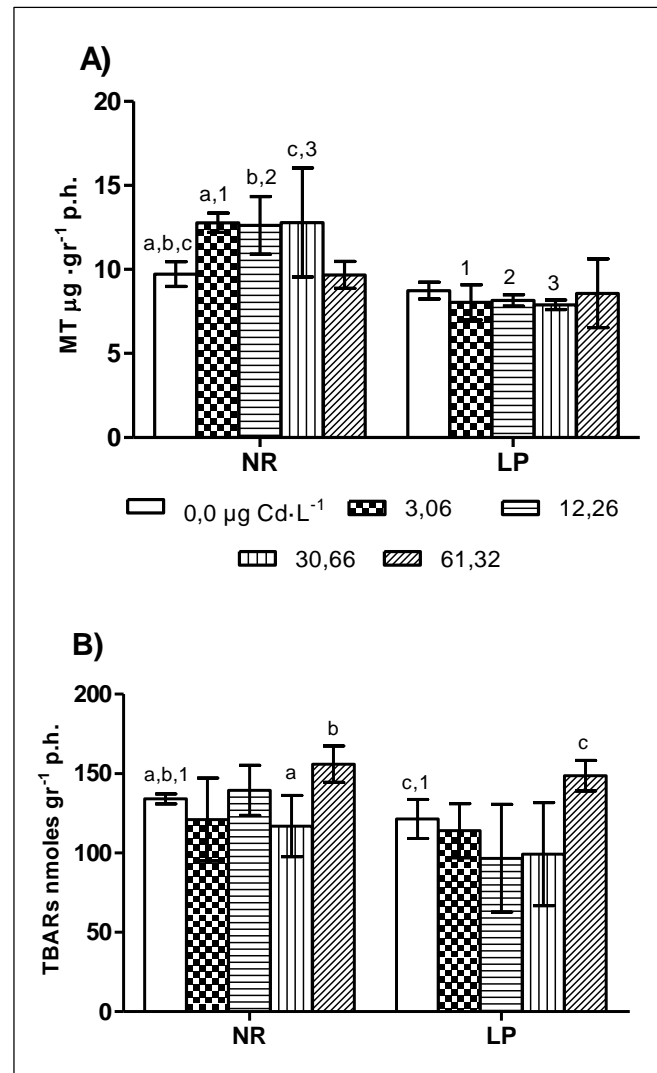


Figura 5.1. Niveles de metalotioneínas (A) y peroxidación lipídica (B) (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de las poblaciones NR y LP de *P. argentinus* expuestos a diferentes concentraciones de Cd durante 24h. Letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para una misma laguna. Números indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre lagunas para un mismo tratamiento.

5.3.1.b. Ensayos a 96h

Las poblaciones de camarones se diferenciaron, nuevamente, en su respuesta a la exposición a Cd durante 96h, tanto en los niveles de MT como en los de LPO (Fig. 5.2. A y B). Cabe destacar que la supervivencia de los camarones de ambas poblaciones para el tratamiento $61,32 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ fue inferior a 4%, no siendo posible su evaluación.

Para la población NR, los niveles de MT fueron significativamente superiores al control para los tratamientos 3,06, 12,26 y $30,66 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ (3,06: $t = -7,19410$, $p = 0,001$; 12,26: $t = -8,18792$, $p = 0,001$; 30,66: $t = -8,52375$, $p = 0,001$). Mientras que para la población LP, no se observaron diferencias significativas respecto al control para todos los tratamientos. La comparación entre poblaciones mostró que los niveles de MT del tratamiento control para la población LP fueron significativamente ($t = -3,71038$, $p = 0,020$) superiores a los de NR. Contrariamente, para los tratamientos 3,06, 12,26 y $30,66 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, los niveles fueron significativamente (3,06: $Z = -2,12132$, $p = 0,033$; 12,26: $t = 2,782109$, $p = 0,049$; 30,66: $t = -3,02173$, $p = 0,042$) superiores para la población NR. Respecto a los niveles de LPO, la población NR si bien mostró variaciones en sus niveles, los mismos no fueron significativos. En cambio, la población LP presentó niveles significativamente superiores para el tratamiento $30,66 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ (F: 6,671252, $p = 0,014$) respecto al control (test de Tukey, $p = 0,030$) y al resto de los tratamientos (3,06: $p = 0,010$; 12,26: $p = 0,009$). Al comparar las poblaciones, se observó que para el tratamiento $30,66 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ los niveles de LPO fueron significativamente ($t: 4,874960$, $p = 0,008$) superiores en la población LP, no observándose diferencias para el resto de los tratamientos.

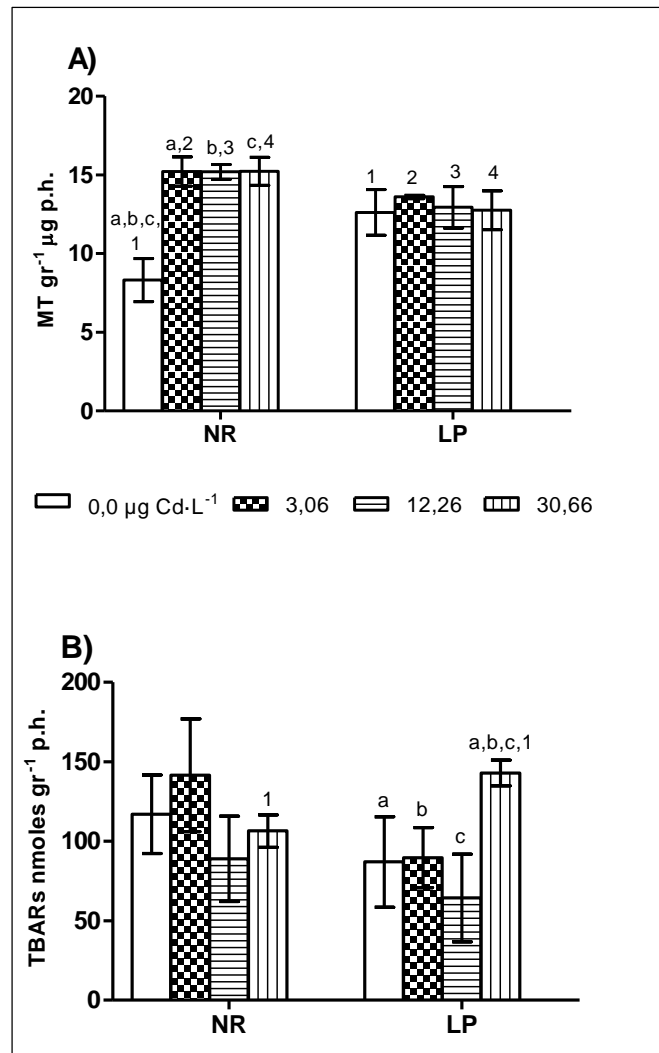


Figura 5.2. Niveles de metalotioneínas (A) y peroxidación lipídica (B) (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de las poblaciones NR y LP de *P. argentinus* expuestos a diferentes concentraciones de Cd durante 96h. Letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para una misma laguna. Números indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre lagunas para un mismo tratamiento.

5.3.2. Curvas tiempo-respuesta

5.3.2. a. Ensayos a 15 días $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ + Depuración

Población NR

La exposición a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ produjo variaciones en los niveles de MT de los camarones de NR, observándose un aumento significativo a todos los tiempos de exposición (3 días: $t = -3,27988$, $p = 0,030$; 7 días: $t = -7,22852$, $p = 0,001$; 10 días: $t = -7,46646$, $p = 0,001$, 15 días: $t = -5,84767$, $p = 0,004$) en relación a sus respectivos controles (Fig 5.3. A). A su vez, se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tiempos de exposición ($F = 14,55238$, $p = 0,001$), observándose el pico máximo a los 10 días, el cual fue significativamente superior a los niveles de 3 ($p = 0,003$), 7 ($p = 0,014$) y 15 días ($p = 0,001$) de exposición. Por su parte, los camarones control no presentaron diferencias en los niveles de MT a lo largo de la experiencia.

Durante las cuatro semanas de depuración los niveles de MT no presentaron diferencias significativas respecto a sus controles (Fig 5.3. B), ni tampoco entre los distintos tiempos de depuración. Sin embargo, cabe destacar que durante la primer semana de depuración los niveles disminuyeron significativamente ($t = -3,38645$, $p = 0,013$) respecto a los observados a 15 días de exposición. Contrariamente, los camarones control no presentaron diferencias en los niveles de MT a lo largo de la experiencia.

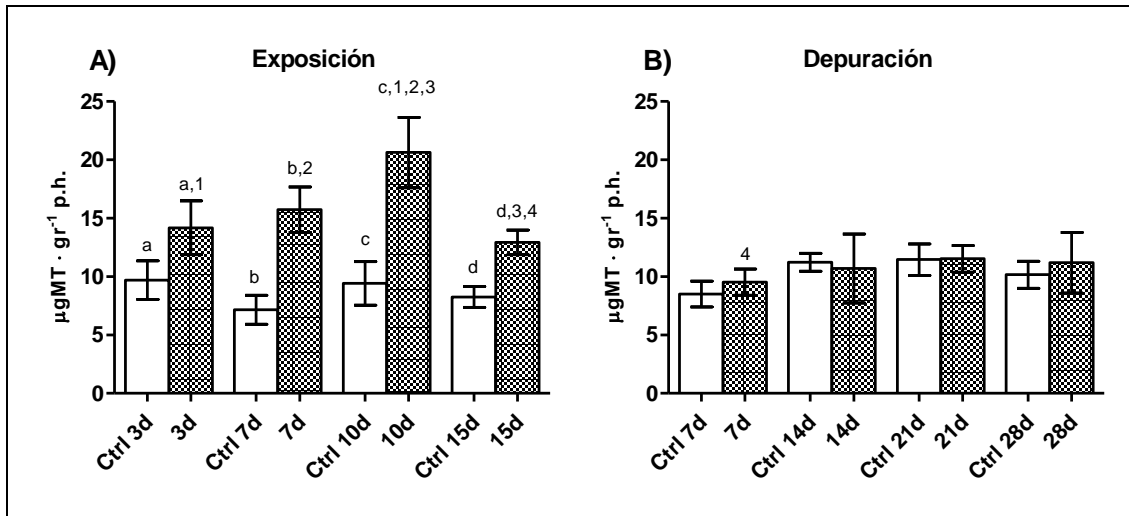


Figura 5.3. A) Niveles de metalotioneínas (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de la población de NR de *P. argentinus* expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 15 días. B) Niveles de metalotioneínas (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de la población de NR de *P. argentinus* pre-expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 28 días de depuración. Letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a su control. Números indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a diferentes tiempos de exposición.

Respecto a los niveles de LPO (Fig. 5.4. A), los camarones de NR no presentaron variaciones durante los primeros 10 días de exposición a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$. A los 15 días, se observó un aumento significativo en los niveles respecto a su control ($t = -4,20746$, $p = 0,013$), los cuales a su vez fueron significativamente superiores a los correspondientes a 3 y 10 días ($F = 5,28796$, $p = 0,049$; Test de Tukey, 3d: $p = 0,044$, 10d: $p = 0,039$). Por su parte, los camarones control no presentaron diferencias significativas a lo largo de los 15 días de exposición.

Los niveles de LPO a los 7 y 14 días de depuración fueron significativamente superiores respecto a sus correspondientes controles (7d: $t = -4,37318$, $p = 0,011$; 14d: $t = -3,14319$, $p = 0,034$), no así a los 21 y 28 días (Fig. 5.4. B). Al comparar los niveles de LPO entre diferentes tiempos de depuración, se observó que a 7 días los mismos fueron significativamente superiores ($F = 9,138650$, $p = 0,005$) a los registrados a 14, 21 y 28 días de depuración (Test de Duncan, 14d: $p = 0,028$, 21d: $p = 0,002$ y 28d: $p = 0,003$). A su vez, cabe destacar que dichas concentraciones no presentaron diferencias respecto a los observados a 15 días de exposición. Por su parte, los camarones control no presentaron diferencias en los niveles de LPO durante la experiencia de depuración.

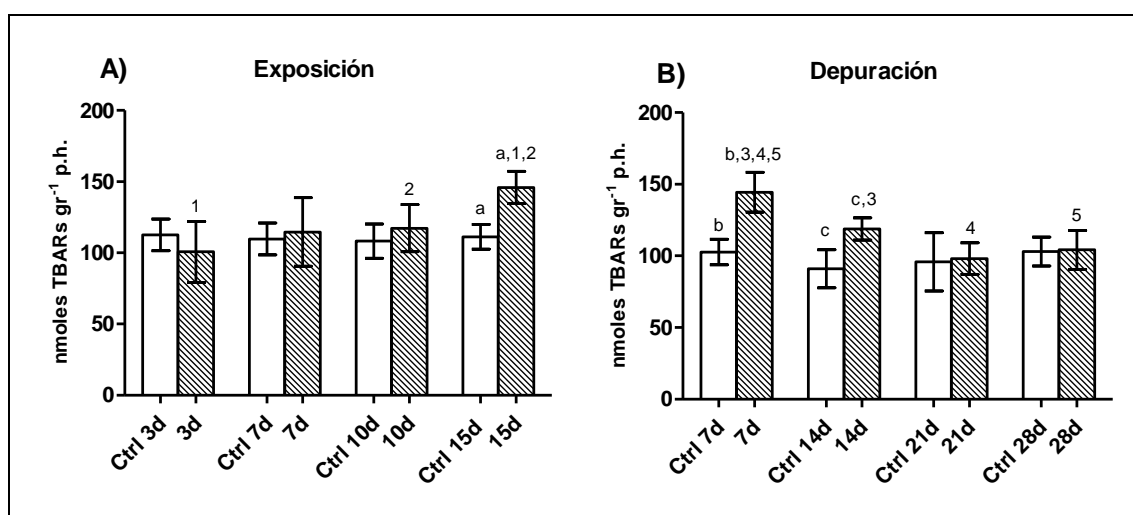


Figura 5.4. A) Niveles de peroxidación lipídica (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de la población de NR de *P. argentinus* expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 15 días. B) Niveles de peroxidación lipídica (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de la población de NR de *P. argentinus* pre-expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 28 días de depuración. Letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a su control. Números indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a diferentes tiempos de exposición.

Población LP

Contrariamente a lo observado en la población de NR, la exposición a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ no provocó variaciones en los niveles de MT en los camarones de LP (Fig. 5.5. A), no observándose diferencias significativas con sus respectivos controles ni entre los distintos tiempos de exposición. A su vez, los camarones control no presentaron diferencias significativas entre sí, excepto para los correspondientes a 10 días, los cuales fueron significativamente superiores al resto ($F = 10,03512$, $p = 0,004$; Test de Tukey, Ctrl 3d: $p = 0,038$, Ctrl 7d: $p = 0,003$, Ctrl 15d: $p = 0,025$).

Durante la experiencia de depuración, los niveles de MT no presentaron diferencias significativas respecto a sus controles ni entre los diferentes tiempos de depuración (Fig. 5.5. B). De la misma manera, los camarones control tampoco presentaron diferencias significativas entre sí.

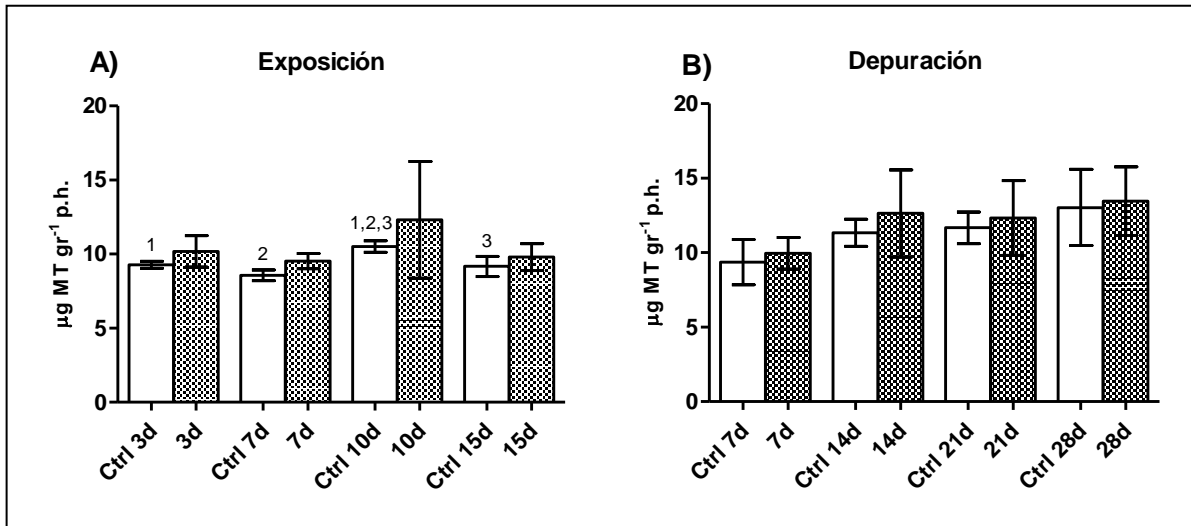


Figura 5.5. A) Niveles de metalotioneínas (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de la población de LP de *P. argentinus* expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 15 días. B) Niveles de metalotioneínas (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de la población de LP de *P. argentinus* pre-expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 28 días de depuración. Letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a su control. Números indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a diferentes tiempos de exposición.

De la misma manera que en la población NR, los camarones de LP no presentaron variaciones en los niveles de LPO durante los primeros 10 días de exposición a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fig. 5.6. A), observándose a los 15 días un aumento significativo respecto a su control ($t = -3,00557$, $p = 0,039$). Además, estos últimos fueron significativamente superiores a los correspondientes a 7 y 10 días ($H = 13,18753$ $p = 0,004$, Test de Dunn, 7d: $p = 0,044$, 10d: $p = 0,049$). Por su parte, los camarones control no presentaron diferencias a lo largo de los 15 días de exposición.

A lo largo del ensayo de depuración, se observó una disminución gradual en los niveles de LPO (Fig. 5.6. B). Los máximos valores correspondieron a los 7 días de

depuración, los cuales fueron significativamente superiores a su respectivo control ($t = -4,37318$, $p = 0,011$). A su vez, dichos valores fueron significativamente superiores a los correspondientes a 21 y 28 días ($F = 9,138650$, $p = 0,005$; Test de Tukey, 21d: $p = 0,006$, 28d: $p = 0,013$). Además, cabe destacar que los niveles a 7 días de depuración no presentaron diferencias respecto a los observados a 15 días de exposición. Por su parte, los camarones control no presentaron diferencias entre sí a lo largo de los 28 días de depuración.

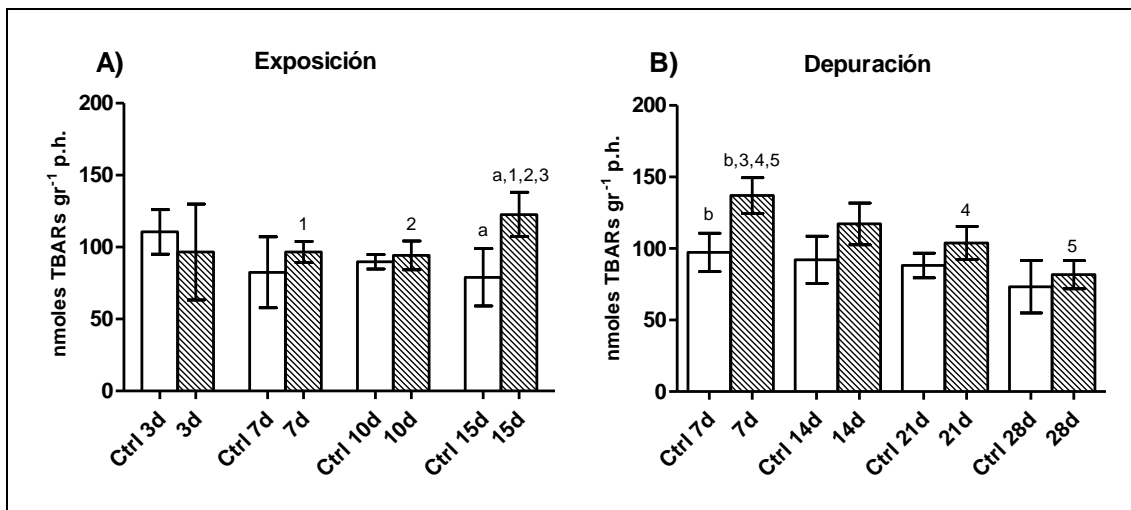


Figura 5.6. A) Niveles de peroxidación lipídica (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de la población de LP de *P. argentinus* expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 15 días. B) Niveles de peroxidación lipídica (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de la población de LP de *P. argentinus* pre-expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 28 días de depuración. Letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a su control. Números indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a diferentes tiempos de exposición.

5.3.2.b. Ensayos a 15 días $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ + Depuración

Población NR

Como fue mencionado en la Sección 2.3.4. del Capítulo II, las dosis subletales de Cd para los ensayos a 15 días fueron establecidas en base a los valores de CL_{50} calculados para cada población. Por lo tanto, no fue posible realizar el ensayo a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ con los camarones de NR, debido a que el valor de CL_{50} a 96h fue $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ (Capítulo IV, Sección 4.3.2.).

Población LP

La exposición a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 15 días produjo variaciones significativas en los niveles de MT en los camarones de LP ($F = 5,657828$, $p = 0,022$) (Fig. 5.7. A). Durante la primer semana de exposición (3 y 7 días) los niveles se mantuvieron sin cambios, mientras que a los 10 y 15 días se observó un aumento, si bien éste fue significativo sólo respecto a los 3 días (Test de Tukey, 10d: $p = 0,048$, 15d: $p = 0,039$). A su vez, dichos niveles fueron significativamente superiores a sus controles (10d: $t = -5,15699$, $p = 0,006$, 15d: $t = -2,88294$, $p = 0,044$). Los camarones control no presentaron diferencias significativas entre sí durante los 15 días de exposición.

Durante el ensayo de depuración se observó una disminución gradual en los niveles de MT (Fig. 5.7. B), presentando a los 7 y 14 días concentraciones significativamente superiores respecto a las observadas a 21 ($F = 9,369623$, $p = 0,014$, Test de Tukey, 7d: $p = 0,032$, 14d: $p = 0,027$) y 28 días (Test de Tukey, 7d: $p = 0,029$, 14d: $p = 0,018$), los cuales a su vez no presentaron diferencias con los correspondientes a 10 y 15 días de exposición. Además, los niveles a 7 y 14 días fueron

significativamente superiores a sus respectivos controles (7d: $t = -2,81252$, $p = 0,005$, 14d: $t = -5,27268$, $p = 0,006$), no así los correspondientes a 21 y 28 días. Los niveles de MT en los camarones control no presentaron diferencias significativas entre sí, excepto los correspondientes a 7 días, los cuales fueron significativamente diferentes a los de 14 días ($F = 8,45487$, $p = 0,030$, Test de Tukey, $p = 0,045$).

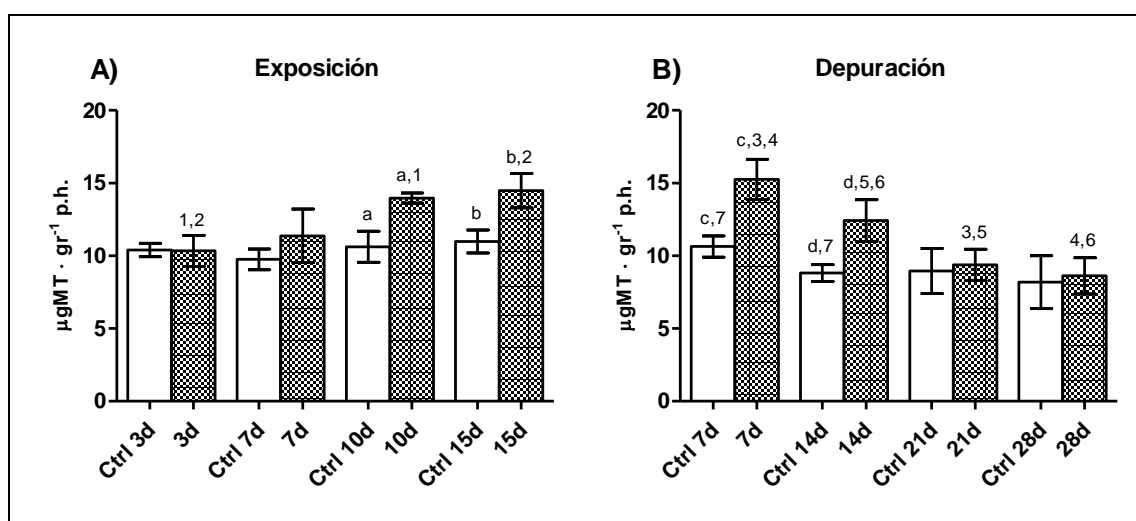


Figura 5.7. A) Niveles de metalotioneínas (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de la población de LP de *P. argentinus* expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 15 días. B) Niveles de metalotioneínas (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de la población de LP de *P. argentinus* pre-expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 28 días de depuración. Letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a su control. Números indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a diferentes tiempos de exposición.

Durante la exposición a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, los camarones de LP también presentaron variaciones significativas en los niveles de LPO ($F = 8,266471$, $p = 0,007$) (Fig. 5.8. A). A los 10 y 15 días de exposición se observó un aumento significativo en

los niveles respecto a los 3 (test post hoc de Tukey, 10d: $p = 0,024$, 15d: $p = 0,028$) y 7 días de exposición (test post hoc de Tukey, 10d: $p = 0,037$, 15d: $p = 0,042$). A su vez, dichos niveles fueron significativamente superiores a sus respectivos controles (7d: $t = -4,99953$, $p = 0,007$, 14d: $t = -5,26409$, $p = 0,006$), no así los correspondientes a 3 y 7 días. Por su parte, los niveles de LPO en los camarones control no presentaron diferencias significativas entre sí.

Los camarones de LP pre-expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ presentaron variaciones significativas en los niveles de LPO durante el ensayo de depuración ($F = 5,289485$, $p = 0,026$) (Fig. 5.8. B), observándose una disminución gradual de los mismos. Durante las dos primeras semanas de depuración (7 y 14 días) se observaron los máximos niveles, si bien sólo fueron significativamente superiores a los observados a 28 días (Test de Tukey, 7d: $p = 0,031$; 14d: $p = 0,049$). A su vez, sólo los niveles a 7 días de depuración presentaron diferencias significativas con su control ($t = -4,69117$, $p = 0,009$). Además, es importante destacar que los niveles a 7 y 14 días de depuración no presentaron diferencias respecto a los observados a 15 días de exposición. Por otro lado, los niveles de LPO en los camarones control no presentaron diferencias significativas entre sí.

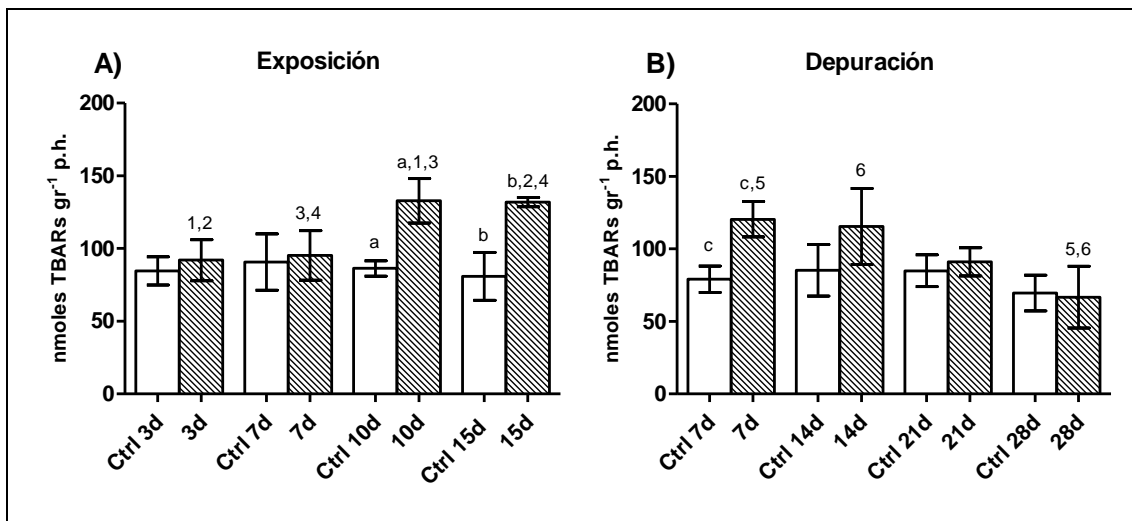


Figura 5.8. A) Niveles de peroxidación lipídica (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de la población de LP de *P. argentinus* expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 15 días. B) Niveles de peroxidación lipídica (promedios \pm desvío estándar, p.h.: peso húmedo) en hepatopáncreas de la población de LP de *P. argentinus* pre-expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 28 días de depuración. Letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a su control. Números indican diferencias significativas ($p < 0,05$) a diferentes tiempos de exposición.

5.4. Discusión

5.4.1. Curvas dosis respuesta: 24-h y 96-h

Población NR

La inducción de MT en los camarones de NR se produjo al tiempo mínimo de exposición (24h) y desde la dosis más baja de Cd, revelando una respuesta fisiológica muy rápida ante la contaminación por el mismo. Estos resultados concuerdan con lo informado para el anfípodo dulceacuícola *E. echinosetosus*, donde se observó un aumento en los niveles de MT a 24h de exposición a $100 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ (Martínez et al., 1996). De igual manera, en el braquiópodo *Artemia* spp se reportó un aumento a 24h de

exposición a $10 \text{ mgCd} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que en el cangrejo de río americano *Procambarus clarkii* el aumento fue a las 12h de exposición, bajo las mismas condiciones experimentales (del Ramo et al., 1995). Dichas especies también presentaron una alta capacidad de inducción por Cd, siendo de hasta 300 y $500 \text{ } \mu\text{gMT} \cdot \text{g}^{-1}$ tejido húmedo para *Artemia* spp y *P. clarkii*, respectivamente, explicando su mayor resistencia a este metal ($\text{CL}_{50-96\text{h}}$ *Artemia* spp: $43000 \text{ } \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ *P. clarkii*: $58000 \text{ } \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, del Ramo et al., 1995). La unión a dicha proteína reduce la cantidad de Cd libre evitando la interacción con otras macromoléculas, disminuyendo su toxicidad (Klaassen, 2001). Para la población de NR los niveles de inducción por Cd fueron muy inferiores ($16,53 \text{ } \mu\text{gMT} \cdot \text{g}^{-1}$ tejido húmedo a 96h), lo cual podría explicar su alta sensibilidad a dicho metal ($\text{CL}_{50-96\text{h}}$: $12,26 \text{ } \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, Sección 4.3.2. - Capítulo IV). Por otra parte, la falta de inducción a la máxima concentración de ensayo ($61,32 \text{ } \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, 24h) era esperable, debido a que la toxicidad para esta población fue elevada (mortalidad 24h: 13%, mortalidad 48h: 87%; Sección 4.3.2. - Capítulo IV). Martínez et al. (1996) observó inducción a bajas concentraciones ($100 \text{ } \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, 24h) y ausencia al máximo nivel ($2000 \text{ } \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, 24h) que fue expuesto *E. echinosetosus*, sosteniendo que la toxicidad del Cd limitó su eficacia como inductor. Similares resultados también han sido informados en otro anfípodo, *Orchestia gammarellus* (n.v. pulga de arena), donde la ausencia de inducción y la disminución de las concentraciones de MT fueron observadas no sólo a dosis altas de Cd ($3,55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ - 17 días), sino también de Cu ($63,54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y Zn ($65,37 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (Mouneyrac et al., 2002).

Los niveles de LPO en los camarones de NR evidenciaron la ausencia de daño oxidativo causado por Cd para todas las concentraciones ensayadas a 24 y 96h, excepto para el tratamiento $61,32 \text{ } \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ (24-h), en el cual se observó un aumento de dicho biomarcador. Al relacionar los niveles de LPO con los correspondientes a MT, los

tratamientos sin aumento evidente de estrés oxidativo presentaron inducción de la proteína. Estos resultados opuestos podría estar demostrando el rol protector de la MT contra el daño oxidativo en *P. argentinus*. Esta función antioxidante también ha sido reportada en el crustáceo *Chorocaris chacei* (n.v. camarón de aguas hidrotermales profundas, González-Rey et al., 2008) y en los bivalvos *Cerastoderma glaucum* (n.v. berberecho de laguna, Machreki-Ajmi et al., 2008), *Ruditapes decussatus* (n.v. almeja fina, Geret et al., 2003) y *C. gigas* (Damiens et al., 2006) y *Mytilus galloprovincialis* (n.v. mejillón mediterráneo, Viarengo et al., 1999). Si bien el mecanismo exacto por el cual las MT actúan como antioxidantes no se ha dilucidado, Thornalley y Vasäk (1985) han propuesto que los grupos sulfhidrido (-SH) de las cisteínas pueden atrapar rápidamente los radicales hidroxilo, evitando el daño oxidativo de biomoléculas, importantes tales como el ADN y otras proteínas.

Población LP

Los camarones de LP no presentaron inducción de MT a ninguna concentración ensayada, a pesar de haber sido la población con mayor tolerancia al Cd (Sección 4.3.2. - Capítulo IV). Dicha respuesta fue inesperada, debido a que en crustáceos se ha demostrado que una mayor tolerancia a metales está relacionada con un incremento en los niveles de MT (Martínez et al., 1996; Ross et al., 2002; Stuhlbacher y Maltby, 1992). A su vez, no se observaron aumentos en los niveles de LPO, excepto a la máxima concentración para cada tiempo, indicando la ausencia de daño oxidativo causado por Cd para el resto de los tratamientos. Esta situación podría deberse a una disminución en la asimilación de Cd, lo cual es poco probable debido a que los crustáceos no tienen la capacidad de regular el ingreso de metales no esenciales tales como Cd (Rainbow, 1998; White y Rainbow, 1986). Por lo tanto, la falta de inducción

de MT y la ausencia de daño oxidativo en la población de LP sugiere la presencia de otro mecanismo en la detoxificación de Cd. Los invertebrados presentan dos posibles mecanismos para la detoxificación de metales: las ya nombradas proteínas de unión a metales, MT, y los gránulos metálicos insolubles (Ahearn et al., 2004; Amiard et al., 2006). Éstos son particularmente abundantes en crustáceos y moluscos (Mason y Simkiss, 1982) y están formados por fosfato de calcio y sulfuro de magnesio (Al-Mohanna y Nott, 1985). La biomineralización involucra el secuestro de los cationes metálicos del citoplasma dentro de vacuolas específicas, siendo almacenados en forma insoluble y detoxificada. Los gránulos se encuentran usualmente en hepatopáncreas y tejidos del tracto intestinal que poseen un lumen abierto al exterior, permitiendo así su eliminación por exocitosis o descamación celular (Ahearn et al., 2004). La extracción de los metales por biomineralización reduce la cantidad de cationes libres que inducirían MT (George y Olsson, 1994), encontrando niveles elevados de metales sin un aumento de las concentraciones de MT. Posiblemente, ésta sea la causa por la cual no se detectó aumento en los niveles de MT en los camarones de LP. Dicha situación también fue observada en el anfípodo *O. gammarellus* (Mouneyrac et al., 2002) y en el cangrejo *Carcinus maenas* (n.v. cangrejo común de mar, Pedersen et al., 1997). Nunez-Nogueira et al. (2010) han informado que *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* (n.v. camarón patiblanco) ante la exposición a plomo, éste ha sido almacenado y detoxificado en gránulos, en vez de MT. Por otra parte, ciertas especies que desarrollaron tolerancia a ciertos metales se ha observado un aumento en la producción de gránulos metálicos. Tal es el caso del oligoqueto *Limnodrilus hoffmeisteri*, donde si bien no se encontraron diferencias significativas en los niveles de Cd unido a MT entre la población sensible y la Cd-resistente, esta última presentó una mayor proporción de gránulos, atribuyendo la resistencia a dicho metal por la formación de los mismos (Klerks y Bartholomew,

1991). Por su parte, poblaciones del isópodo *Asellus meridans* y el poliqueto *N. diversicolor* provenientes de ambientes contaminados con Cu y tolerantes al mismo, presentaron gránulos ricos en Cu (Brown, 1977; Bryan y Hummerstone, 1971).

En base a lo expuesto, la biomineralización podría explicar la ausencia de inducción de MT en la población LP, así como su mayor tolerancia al Cd, sin embargo, se requieren estudios para confirmar su presencia en *P. argentinus*.

5.4.2. Curvas tiempo-respuesta

5.4.2.a. Experiencia 15 días-3,06 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ + Depuración

Población NR

Siguiendo la tendencia observada a 24 y 96h, los camarones de NR presentaron inducción de MT ante la exposición prolongada a 3,06 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$; alcanzando la máxima capacidad a los 10d de exposición, la cual involucró niveles de hasta 23,91 $\mu\text{gMT} \cdot \text{g}^{-1}$ p.h., duplicando los valores control. En el copépodo *Tigriopus brevicornis*, la máxima capacidad de inducción fue a sólo 24h de exposición con niveles cercanos a 1 $\mu\text{gMT} \cdot \text{g}^{-1}$ p.h., los cuales fueron 5 veces más altos que los controles (Barka et al., 2001). También el braquiópodo *Artemia parthenogenetica* y el anfípodo *E. echinosetosus* alcanzaron su máxima capacidad de inducción a las 24h de exposición, con valores de hasta 110 y 9 $\mu\text{gMT} \cdot \text{g}^{-1}$ p.h. (Martínez et al., 1996), respectivamente. Por su parte, el decápodo *L. vannamei* alcanzó su máxima capacidad de inducción a los 56 días de exposición con niveles cercanos a 250 $\mu\text{gMT} \cdot \text{g}^{-1}$ p.h. (Wu y Chen, 2005). Es evidente que la respuesta de dicha proteína ante la exposición a Cd es muy variable entre los crustáceos. Dicha variabilidad se puede deber a numerosos factores propios de cada especie, tales como el origen de los organismos asociado al grado de

contaminación, las variaciones estacionales de MT, tamaño de los organismos, sexo, muda, entre otros (Amiard et al., 2006), lo cual no permite una comparación directa de los resultados. Sin embargo, caracterizar la respuesta (tiempo y capacidad), permitiría entender las diferencias de vulnerabilidad interespecíficas a la contaminación por Cd. Para el caso de *P. argentinus*, especie ubicada entre las más sensibles a este metal, se encontraron niveles de inducción de MT entre los más bajos reportados para crustáceos.

Es de general consenso, que el Cd puede provocar una disminución en los niveles de MT debido a un impacto en la estructura y funcionamiento normales del hepatopáncreas, causando cambios fisiológicos y metabólicos en los organismos acuáticos (Crespo et al., 1986; Wu y Chen, 2005). Wu y Chen (2005) consideran que la propia toxicidad de Cd provocó la disminución de los niveles de MT en *L. vannamei*. Dichos cambios podrían estar ocurriendo en la población NR causando la disminución en los niveles de MT a 15d. A pesar de no haberse visto afectada la supervivencia de esta población, se observó un aumento de la peroxidación lipídica, la cual, a su vez, estuvo ausente en los tratamientos que presentaron inducción de MT. Esta relación inversa entre MT - LPO también se observó durante el primer período de depuración (7d). Una vez más, y similarmente a lo observado a 24 y 96h, los resultados encontrados hasta aquí estarían demostrando el rol protector de la MT ante el daño oxidativo en *P. argentinus*. Por su parte, la disminución en los niveles de MT observada a partir de los 15d de exposición y continuando durante la depuración, también fue informada por Moksnes et al. (1995) en *L. vannamei*. Dicho autor atribuyó la pérdida de MT inducida a la disminución de las concentraciones internas de Cd. Una vez restituida la calidad del agua durante la depuración, el patrón de ambos biomarcadores en los camarones NR indicó el restablecimiento de sus niveles a los de inicio del ensayo, lo cual estaría relacionado con la disminución de Cd disponible.

Población LP

De la misma manera a lo observado a 24 y 96 h, la exposición prolongada a 3,06 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ no produjo una inducción en los niveles de MT a los tiempos ensayados. En este caso, la falta de inducción no parecería estar relacionada con un efecto tóxico de Cd, ya que no se observó aumento en los niveles de LPO, para la mayoría de los tiempos ensayados, ni diferencias de supervivencia entre tratamientos y sus respectivos controles. Cabe destacar que a la misma concentración y tiempos de ensayo la población NR presentó una capacidad inductora de 100%, y quedando probado en esta población que 3,06 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ induce MT. Lo observado en este ensayo permite sugerir nuevamente la presencia de los gránulos metálicos como mecanismo detoxificador de Cd. Amiard et al. (2006) postulan que en algunas especies de invertebrados en los que no se observó inducción de MT, se encontraron gránulos metálicos. Asimismo, estos autores informaron que la ausencia de inducción de MT se encuentra asociada a especies resistentes a metales. En los ensayos de toxicidad aguda la tolerancia al Cd de la población LP quedó probada. Brown (1982) y Roesijadi (1992) postularon que la formación de gránulos metálicos es un mecanismo para el almacenamiento a largo plazo de metales esenciales y no esenciales, en tanto que las MT están involucradas en escalas de tiempo más cortas. Los resultados observados en la población de LP, la cual se encuentra crónicamente expuesta a diversos metales en su ambiente, sustentan la hipótesis relacionada con la presencia de gránulos metálicos como estrategia detoxificadora en esta población. Sin embargo la presencia de estrés oxidativo hacia el final de la exposición (15d) e inicio de la depuración (7d) estaría indicando que la capacidad detoxificadora de los gránulos podría estar superada, quedando Cd libre interactuando con los lípidos de membrana. Sanders et al. (1983) y Wallace et al. (2000)

(ambos citados en Wallace et al., 2003) informaron en crustáceos expuestos a concentraciones elevadas de Cu y Cd, respectivamente, que la capacidad de detoxificación de MT y gránulos puede verse superada.

5.4.2.b. Experiencia 15 días-12,26 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ + Depuración

Población LP

A diferencia de lo observado hasta aquí para la población LP, la exposición prolongada a 12,26 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ provocó, por primera vez, la inducción en los niveles de MT. Nunez-Nogueira et al. (2010) encontraron inducción de MT retrasada en *P. vannamei* pre-expuestos a metales. La capacidad de inducción de MT fue de tan solo un 25% respecto al control, observándose recién a partir de los 10d de exposición y hasta los 7d de depuración, donde comienza a descender. Contrariamente a lo observado en los ensayos anteriores, un aumento en los niveles de MT no contrarrestó los efectos oxidativos de Cd, ya que coincide con las máximas concentraciones de LPO. Además, se evidenció una supervivencia disminuida de hasta un 67% (15d). Considerando que la concentración de ensayo corresponde a 1/2 de la $\text{LC}_{50-96\text{h}}$, es evidente que el sistema detoxificador de MT no es suficiente como para entrapar la cantidad interna de Cd. El otro mecanismo detoxificador propuesto también podría encontrarse limitado. Por su parte, Brown y Parsons (1978) y Sanders et al. (1983) observaron efectos negativos asociados a Cd cuando la capacidad de la MT para unir dicho metal está excedida, uniéndose a macromoléculas. Escorcía y Wang-Chan (2010) también informaron en *C. virginica* (n.v. ostra americana) que la función antioxidante de MT se encontró acotada y que dicha limitación estuvo asociada a ambientes pre-impactados.

En base a los resultados observados en los camarones de la población LP, queda evidenciado que los mismos requieren tiempos de exposición más prolongados y concentraciones más altas para inducir la síntesis de MT respecto a la población NR. Es probable que estas diferencias se deban a la pre-exposición ambiental que sufre la población LP.

5.5. Conclusiones

Los resultados de los biomarcadores en *Palaemonetes argentinus* demostraron:

- La rápida inducción de MT por Cd en camarones de NR demostró que es una herramienta de respuesta temprana para la especie.
- La inducción de MT en los camarones de NR contrarrestó el estrés oxidativo provocado por Cd.
- La ausencia de inducción de MT ante la exposición a Cd, sumada la tolerancia de los camarones de LP, sugiere la formación de gránulos metálicos como mecanismo detoxificador.
- Los camarones de LP presentaron una capacidad de inducción de MT menor respecto a los de NR.
- La calidad ambiental de las lagunas determinó variaciones intraespecíficas en las respuestas de MT y LPO.

- Ambas poblaciones de *Palaemonetes argentinus* restablecieron los niveles iniciales de MT y LPO en los procesos de depuración, independientemente del origen de los camarones y las concentraciones de ensayo.

Capítulo VI

Efectos a nivel histológico

6.1 Introducción

El hepatopáncreas es un órgano altamente sensible a los cambios fisiológicos y ambientales (Johnston et al., 1998). En relación a sus funciones metabólicas (digestión, absorción y reserva de nutrientes y excreción de desechos), la estructura del hepatopáncreas sufre cambios rápidos en respuesta a diferentes demandas fisiológicas (muda, reproducción) y variaciones ambientales (temperatura, alimentación, contaminación) (Icely y Nott, 1980; Vogt et al., 1985; Johnston et al., 1998). A su vez, es el principal órgano involucrado en la detoxificación de contaminantes, siendo susceptible de sufrir alteraciones en su estructura funcional ante la exposición a sustancias tóxicas y contaminantes. Por lo tanto, es posible el uso de los patrones de modificación en las células de este órgano como índices para determinar el impacto de los contaminantes (Hinton et al., 1973; Moore, 1985; Sousa, 2003).

El diagnóstico histológico es un método altamente sensible que muestra la respuesta integrada de un individuo al impacto de un tóxico, bajo ciertas condiciones fisiológicas, nutricionales y ambientales (Vogt, 1987). Este diagnóstico es una herramienta valiosa adicional a los métodos convencionales utilizados, tales como la mortalidad, el crecimiento, el comportamiento, la reproducción, la bioquímica, etc. Sin embargo, la aplicación de la histopatología presenta limitaciones, como la escasa base de datos y el problema de distinguir entre las lesiones causadas por los contaminantes de las normales variaciones estructurales en las células y tejidos. En el caso de *P. argentinus* no se presentan dichas limitaciones, ya que la estructura del hepatopáncreas de la especie está ampliamente documentada (Sousa, 2003; Sousa et al., 2005; Sousa y Petriella, 2000; 2001; 2007).

En *P. argentinus* el hepatopáncreas ocupa gran parte de la cavidad cefalotorácica y se conecta a la región ventroposterior del estómago pilórico a través de dos conductos primarios. Cada conducto se ramifica en numerosos túbulos que forman la glándula. Cada túbulo, tapizado por un epitelio simple con diferentes tipos celulares, puede dividirse en tres zonas:

una zona ciega distal, una media y una proximal (Sousa y Petriella, 2000). Las zonas media y distal forman la región cortical de la glándula y poseen luz estrecha e irregular, mientras que las zonas proximales forman la región medular. La luz tubular se amplía en la zona proximal formando los conductos colectores secundarios que luego se abren en los conductos colectores primarios. En el epitelio tubular se diferencian cuatro tipos celulares: E (embrionarias), R (absorbentes), F (fibrilares) y B (digestivas). Las células E se localizan en la zona distal de los túbulos y son las únicas capaces de multiplicarse, mientras que las células diferenciadas (F, R y B) se localizan en las zonas media y proximal de los túbulos (Sousa y Petriella, 2000). Dicha organización es similar a la descrita para otros decápodos (Al-Mohanna y Nott, 1989; Johnston et al., 1998; Petriella y Fonalleras, 1998; Sousa y Petriella, 2000), facilitando la comparación con otras especies. Por su parte, Sousa (2003) caracterizó la estructura del hepatopáncreas de *P. argentinus* en todos los estadios del ciclo de muda, corroborando que la observación histológica refleja los cambios en la actividad fisiológica que sufren las células durante dicho proceso.

En base al conocimiento disponible y dentro del marco de esta tesis, la aplicación del diagnóstico histológico en hepatopáncreas de *P. argentinus* puede brindar información valiosa sobre posibles alteraciones provocadas por problemas de contaminación por Cd.

El **objetivo** propuesto para el Capítulo VI es “evaluar efectos histológicos por la exposición a Cd en hepatopáncreas de *Palaemonetes argentinus* de las lagunas Nahuel Rucá y de los Padres, y el grado de recuperación durante procesos de depuración”.

Se postula:

- La morfología funcional de los hepatopáncreas de *P. argentinus* provenientes de ambientes contaminados (LP) está afectada.
- La exposición a Cd causa alteraciones histológicas en el hepatopáncreas de *P. argentinus*.
- El hepatopáncreas de *P. argentinus* posee la capacidad de recuperar su estructura funcional normal.

6.2 Resultados

6.2.1. Alteraciones tisulares provocadas por la exposición a Cd

6.2.1.a. Experiencia 15 días-3,06 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$

Población NR

Los hepatopáncreas de los individuos control presentaron una estructura funcional normal (Fig. 6.1.) durante los 15 días de experimentación, pudiéndose distinguir claramente los cuatro tipos celulares (E, F, R y B). Las células E se encontraron en la zona distal de los túbulos, y carecían de microvellosidades, mientras que los otros tres tipos lo presentaron. Las células R fueron las más abundantes en las zonas media y proximal de los túbulos; en ésta última se observó descamación degenerativa de las células B y de las R adyacentes (Fig. 6.2., 6.3.).

En los hepatopáncreas de individuos expuestos a Cd durante 3 días no se observaron alteraciones, presentando características similares a los controles. A los 7 y 10 días de exposición se observaron pequeñas infiltraciones hemocíticas en la zona medular. A los 15 días de exposición se observó un aumento en el número de infiltraciones hemocíticas, junto con la aparición de tejido conectivo (Fig. 6.4., 6.5.). La descamación degenerativa también

fue mayor, observándose displasia de gran número de células B y erosión de las microvellosidades en la mayoría de los túbulos (Fig. 6.6.).

En todos los hepatopáncreas analizados las lesiones no abarcaron la totalidad del órgano, sino que se encontraron focalizadas en ciertas zonas, particularmente en la medular. En el resto de los túbulos se observó estructura y funcionamiento normal.

Figura 6.1.: Vista general del hepatopáncreas de camarones control de NR. Organización tubular normal.

H y E. Escala: 500 μ m.

Figura 6.2.: Corte longitudinal de túbulo del hepatopáncreas de camarones control de NR. Zona tubular media con tipos celulares especializados y zona tubular proximal con descamación de células B.

B: célula B, R: célula R, zp: zona proximal, zm: zona media, L: luz tubular, d: descamación. v: vacuola. H y E. Escala: 100 μ m.

Figura 6.3.: Detalle de túbulo del hepatopáncreas de camarones control de NR. Detalle de célula B y microvellosidades (flechas).

B: célula B, vd: vacuola digestiva. H y E. Escala: 50 μ m.

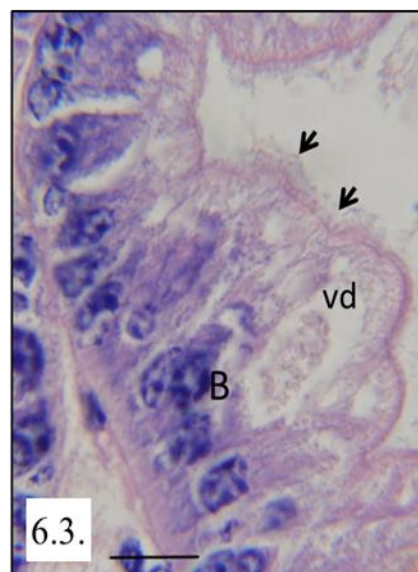
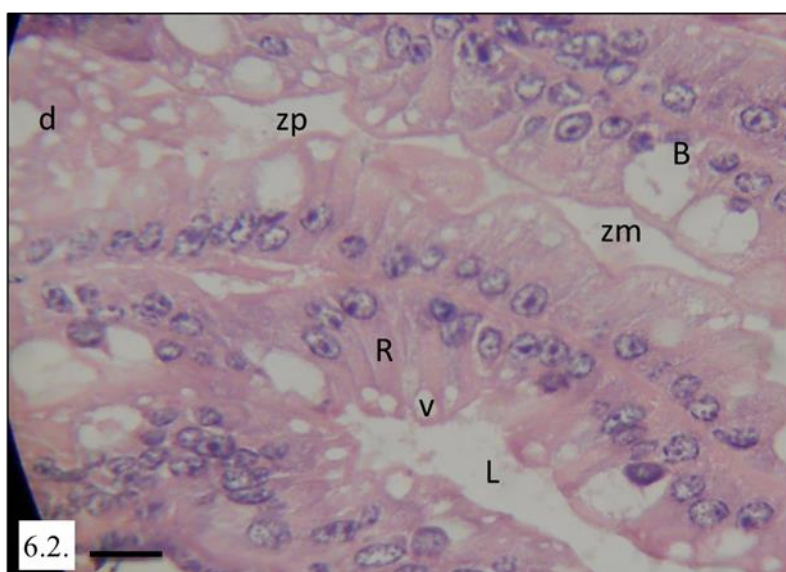
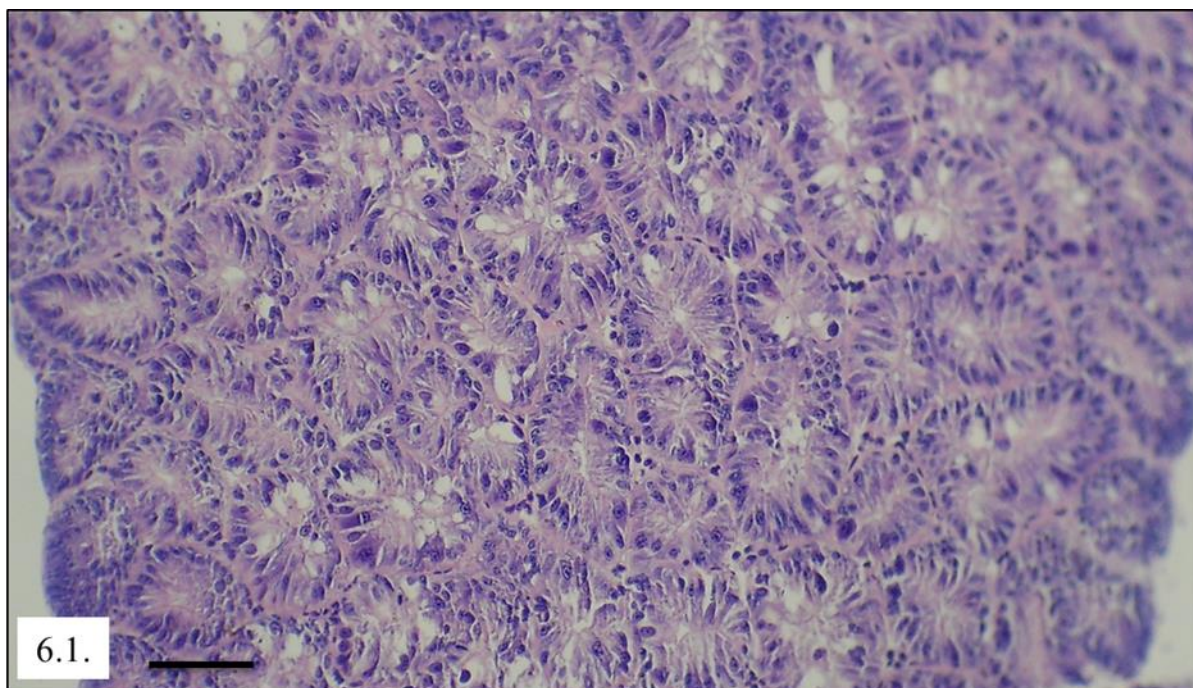


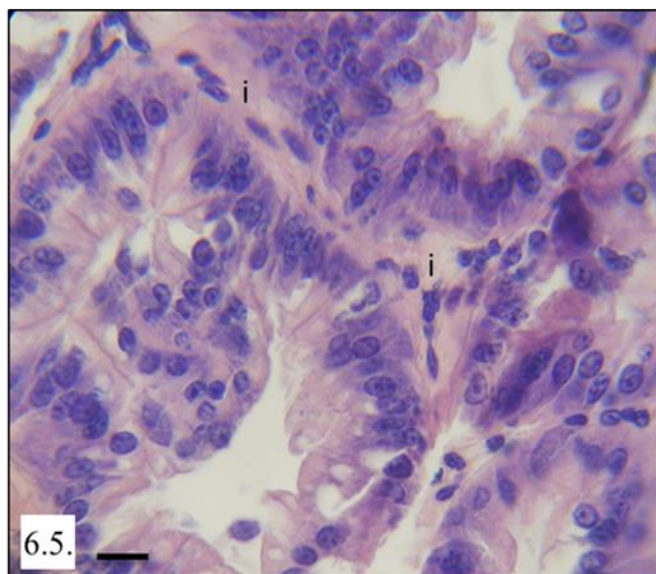
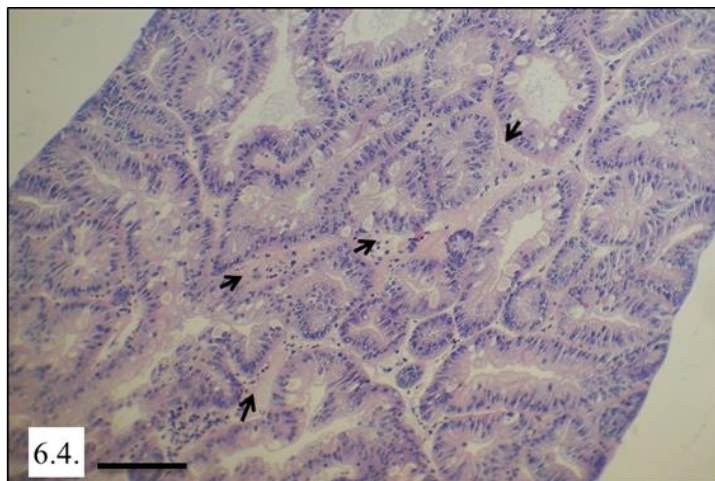
Figura 6.4.: Vista general del hepatopáncreas de camarones de NR a los 15 días de exposición a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$. Infiltraciones hemocíticas (flechas) y tejido conectivo en la zona medular. H y E. Escala: $500\mu\text{m}$.

Figura 6.5.: Corte transversal de túbulos del hepatopáncreas de camarones expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 15 días de NR. Detalle de la infiltración hemocítica intertubular.

i: infiltración hemocítica. H y E. Escala: $100\mu\text{m}$.

Figura 6.6.: Detalle de túbulo del hepatopáncreas de camarones expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 15 días de NR. Microvellosidades erosionadas o ausentes (flechas).

tc: tejido conectivo, D: displasia de células B. H y E. Escala: $50\mu\text{m}$.



Población LP

En los hepatopáncreas de los camarones provenientes de LP se detectaron diversas alteraciones histológicas, incluso en los individuos control. Estos presentaron importantes cambios histológicos con gran infiltración hemocítica y tejido conectivo, especialmente en la zona medular del órgano. Las células epiteliales presentaron erosión de las microvellosidades; el epitelio tubular se encontró atrofiado en algunas zonas y totalmente ausente en otras (Fig. 6.7.). Numerosos túbulos presentaron la luz ampliada e irregular como resultado de la variación en la altura celular y la membrana basal se observó plegada y separada del epitelio (Fig. 6.8.). Dichas alteraciones fueron observadas en los controles de 3 y 7 días. A partir del día 10 se observó cierta mejoría en los individuos control, los hepatopáncreas presentaron una mejor organización tubular, pero aún se encontraron abundantes infiltraciones hemocíticas y tejido conectivo (Fig. 6.9.). Algunos túbulos presentaron la luz agrandada, y si bien no se observó desprendimiento de la membrana basal, la misma estaba plegada (Fig. 6.10.). En los camarones control de 15 días la infiltración hemocítica y la descamación degenerativa fueron mínimas comparadas con lo observado a los 10 días (Fig. 6.11.). La membrana basal rara vez apareció ondulada y el epitelio estaba apoyado completamente sobre ella. La mayoría de las células epiteliales presentaron microvellosidades.

Figura 6.7.: Corte transversal del hepatopáncreas de camarones control de LP a los 3 días. Abundantes infiltraciones hemocíticas y tejido conectivo. Epitelio tubular atrofiado, ausente por zonas. Luz tubular aumentada e irregular y erosión de microvellosidades.

tc: tejido conectivo, i: infiltración hemocítica, a: epitelio ausente. L: luz tubular. H y E. Escala: 100 μ m.

Figura 6.8.: Detalle de túbulo del hepatopáncreas de camarones control de LP a los 3 días. Desprendimiento y plegado de membrana basal (flechas). Abundante tejido conectivo.

tc: tejido conectivo. H y E. Escala: 50 μ m.

Figura 6.9.: Vista general del hepatopáncreas de camarones control de LP a los 10 días. Mejor organización tubular con infiltraciones hemocíticas y tejido conectivo en zona medular.

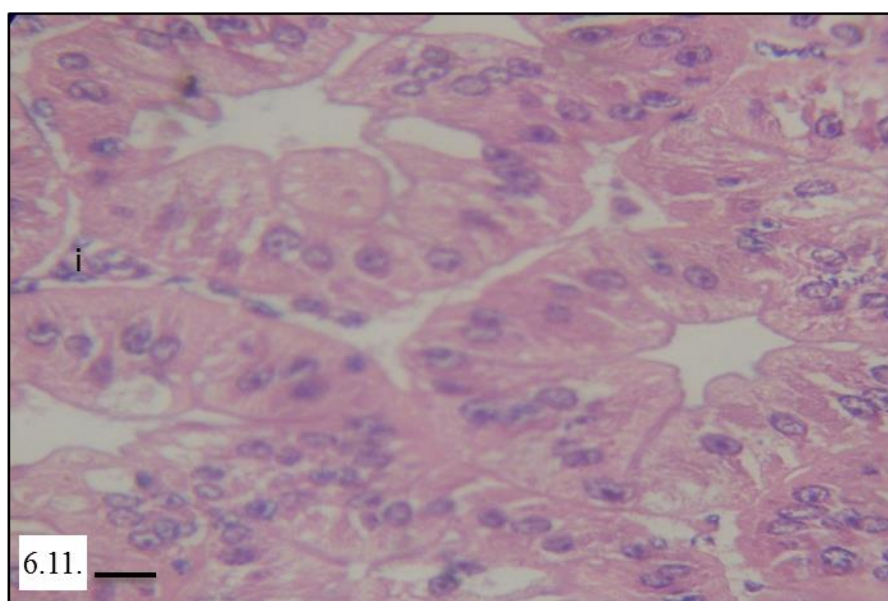
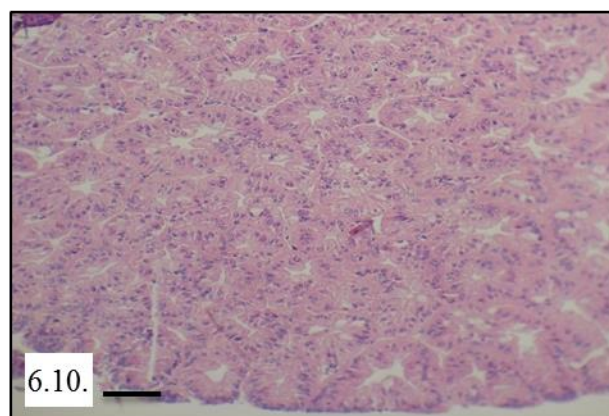
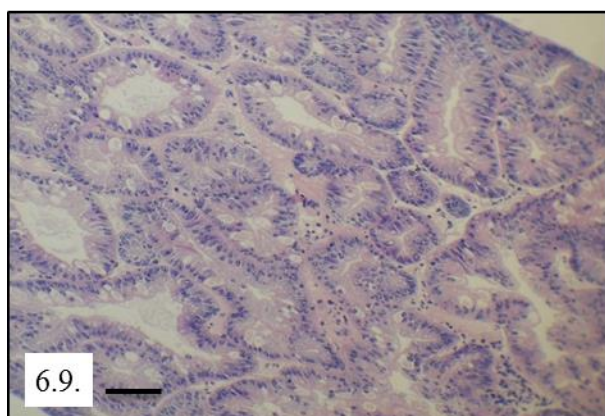
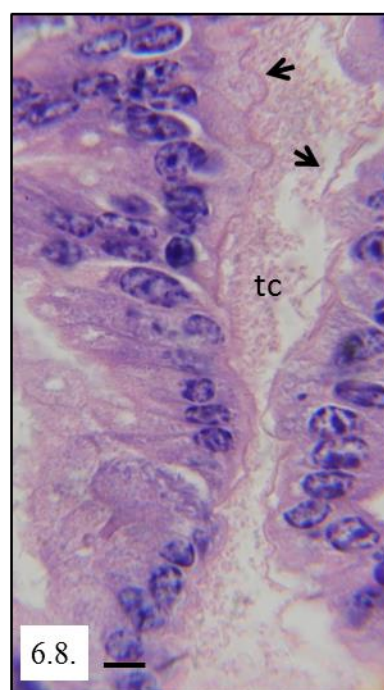
H y E. Escala: 500 μ m.

Figura 6.10.: Vista general del hepatopáncreas de camarones control de LP a los 15 días. Organización tubular normal.

H y E. Escala: 500 μ m.

Figura 6.11.: Corte transversal de túbulo del hepatopáncreas de camarones control de LP a los 15 días. Organización tubular normal y escasa infiltración hemocítica.

i: infiltración hemocítica. H y E. Escala: 100 μ m.



El tratamiento con $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ en los camarones provenientes de LP provocó numerosas alteraciones histológicas, las cuales se acentuaron con el tiempo de exposición. Los hepatopáncreas de individuos expuestos durante 3 y 7 días presentaron similares alteraciones a las observadas en sus respectivos controles: luz tubular irregular, infiltración hemocítica, desprendimiento de la membrana basal y células epiteliales con microvellosidades erosionadas. Después de 10 días de exposición se observó un incremento en la cantidad de infiltraciones hemocíticas y de tejido conectivo (Fig. 6.12.). Al finalizar el experimento (15 días) numerosos túbulos presentaron el epitelio totalmente descamado y necrótico, con núcleos picnóticos, cariorrexis y cariólisis, impidiendo el reconocimiento de los tipos celulares (Fig. 6.13., 6.14.). Es relevante destacar que estas últimas alteraciones no fueron observadas en los camarones de NR expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ para ningún tiempo de exposición.

En todos los hepatopáncreas analizados las lesiones no abarcaron la totalidad del órgano, sino que se encontraron focalizadas en ciertas zonas, particularmente en la zona medular. En el resto de los túbulos se observaron estructura y funcionamiento normales.

Figura 6.12.: Corte transversal de túbulos del hepatopáncreas de camarones de LP expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ por 10 días. Infiltración hemocítica y tejido conectivo. Luz tubular agrandada e irregular y microvellosidades erosionadas.

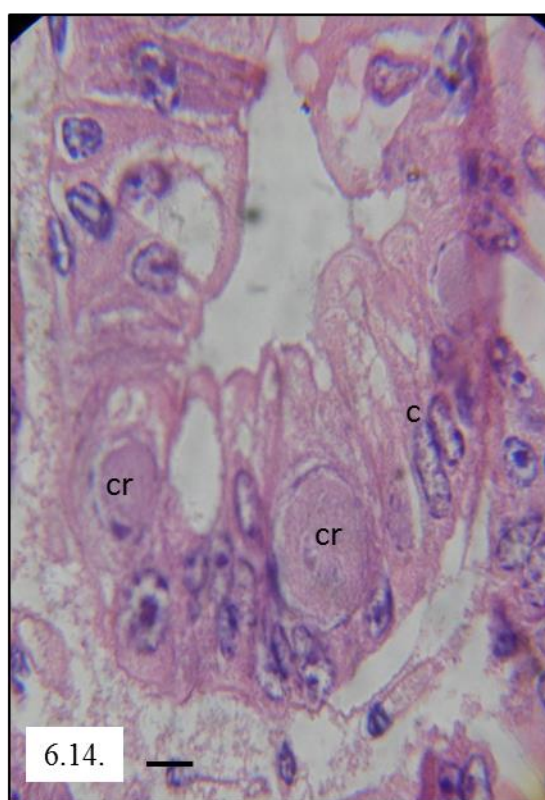
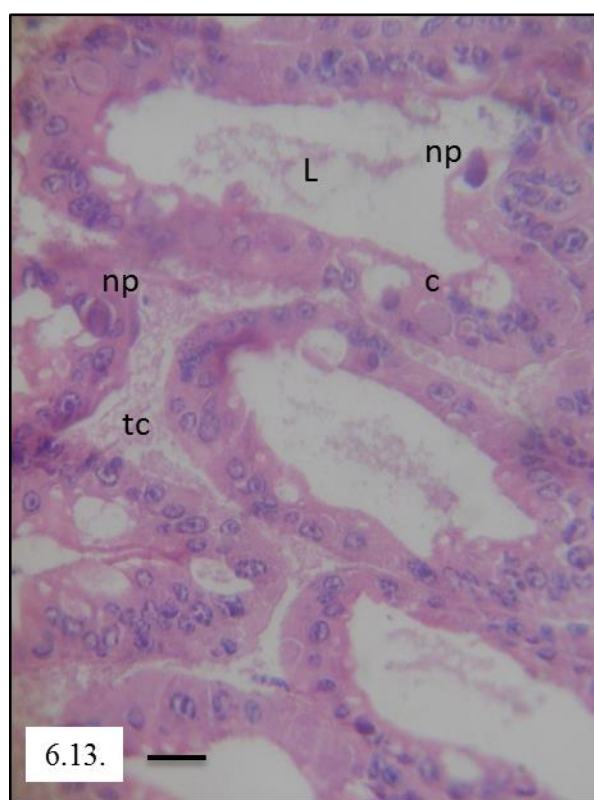
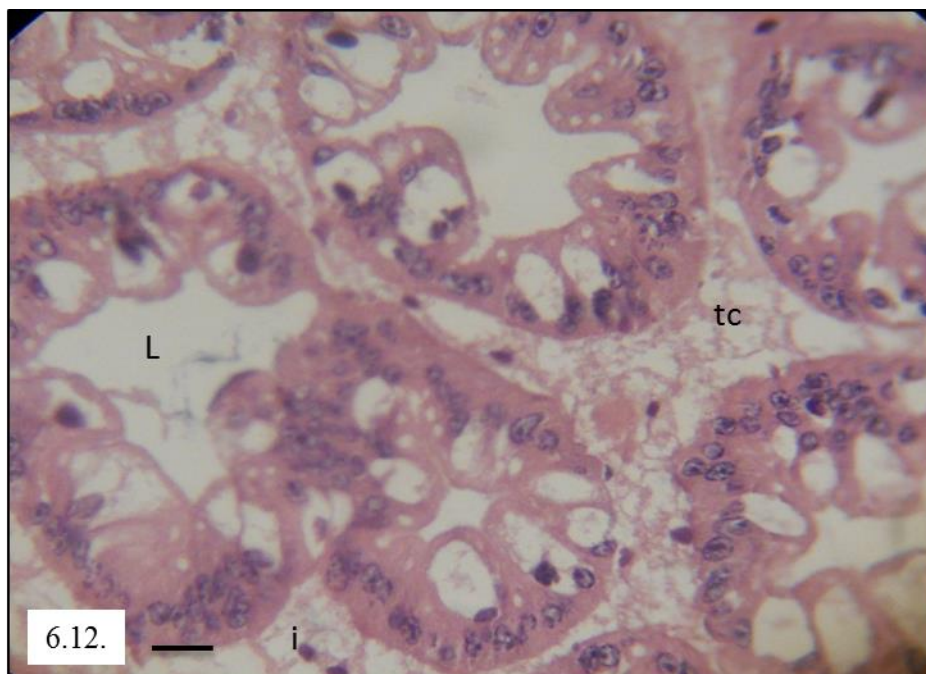
L: luz tubular, tc: tejido conectivo. i: infiltración hemocítica. H y E. Escala: $100\mu\text{m}$.

Figura 6.13.: Corte transversal de túbulos del hepatopáncreas de camarones de LP expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ por 15 días. Luz agrandada, microvellosidades erosionadas. Epitelio necrótico, con núcleos picnóticos, cariorrexis y pérdida de límites celulares.

L: luz tubular, tc: tejido conectivo, np: núcleo picnótico, c: cariorrexis. H y E. Escala: $100\mu\text{m}$.

Figura 6.14.: Detalle de túbulo del hepatopáncreas de camarones de LP expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ por 15 días. Membrana basal plegada y retraída. Núcleos con cariorrexis y cariólisis.

c: cariorrexis, cr: cariólisis. H y E. Escala: $50\mu\text{m}$.



6.2.1.b. Experiencia 15 días-12,26 $\mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$

Población NR

Como fue mencionado en la Sección 2.3.4. (Capítulo II), las dosis subletales de Cd para las experiencias a 15 días fueron establecidas en base a los valores de CL_{50} de cada población, por lo tanto, no fue posible realizar la experiencia a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ con los camarones de NR.

Población LP

Como ya fue descrito, al comienzo de las experiencias los camarones control de LP presentaron numerosas alteraciones, las cuales en el transcurso del ensayo fueron disminuyendo o desapareciendo, evidenciándose la recuperación del hepatopáncreas.

El tratamiento con $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ acentuó ciertas histopatologías ya observadas en los controles y provocó nuevas alteraciones histológicas. Los individuos expuestos durante 3 días presentaron las mismas alteraciones que los individuos control, si bien éstas abarcaron una mayor área del órgano. A los 7 días de exposición, numerosos túbulos presentaron pérdida de los límites celulares, impidiendo el reconocimiento de los distintos tipos (Fig. 6.15., 6.16.). A partir de los 10 días, las patologías mencionadas afectaron a gran parte del órgano (Fig. 6.16.), y la mayoría de los túbulos presentaron el epitelio necrosado con núcleos picnóticos y cariorrexis (Fig. 6.17.).

Cabe mencionar que los camarones de LP presentaron diferencias entre los tratamientos $3,06 \mu\text{gCd}$ y $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, las cuales se manifestaron a partir de los primeros días de exposición. A los 3 y 7 días de exposición, si bien las alteraciones observadas fueron similares, para el tratamiento $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ las mismas abarcaron una mayor área del órgano respecto al tratamiento $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$. En ambos tratamientos se observaron células

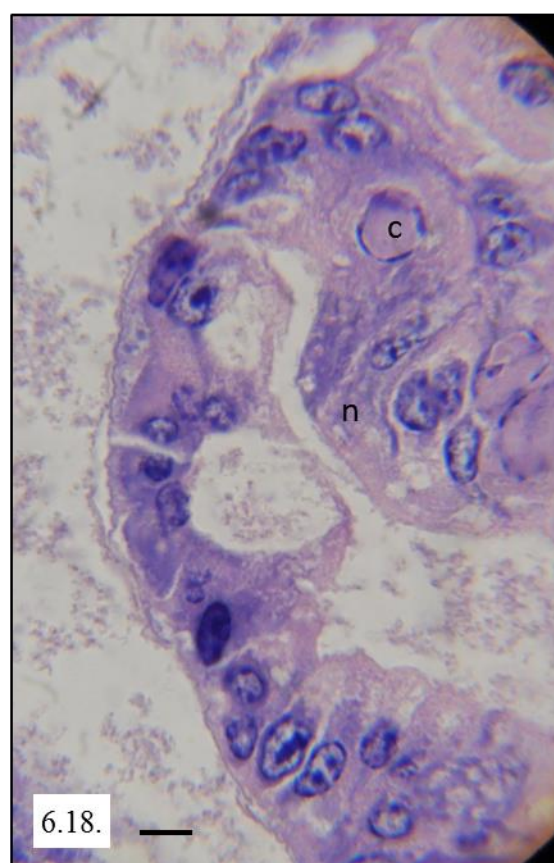
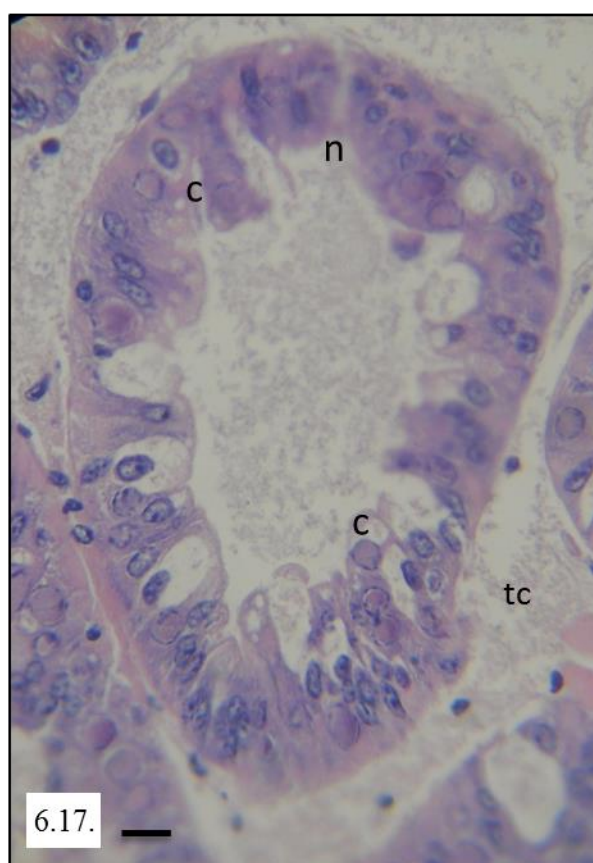
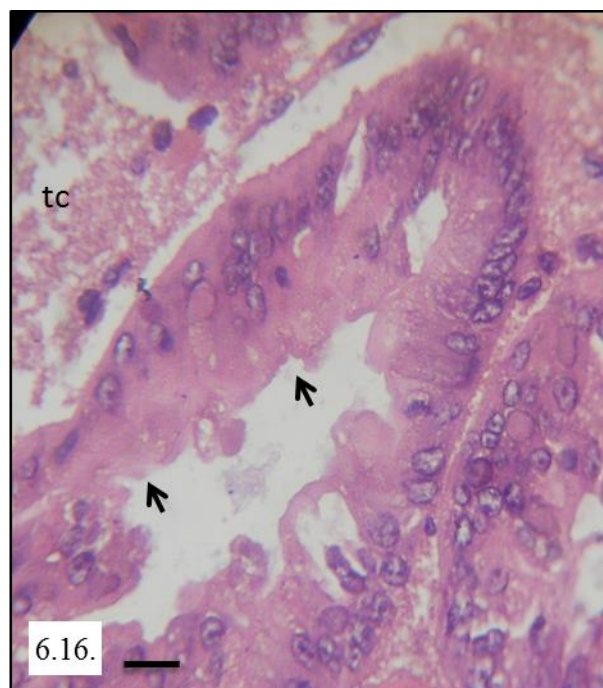
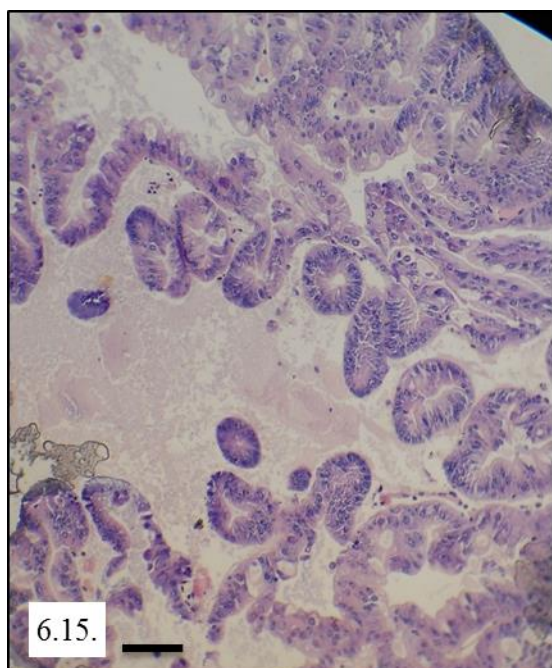
con signos de necrosis, sin embargo en $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ se presentaron a los 10 días de exposición, mientras que en $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ se observaron recién a los 15 días.

Figura 6.15.: Vista general del hepatopáncreas de camarones de LP expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ por 7 días. Alteraciones abarcan gran parte del órgano.
H y E. Escala: $500\mu\text{m}$.

Figura 6.16.: Corte transversal de túbulos del hepatopáncreas de camarones de LP expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ por 7 días. Necrosis con tumefacción (flechas).
tc: tejido conectivo, i: infiltración. H y E. Escala: $100\mu\text{m}$.

Figura 6.17.: Corte transversal de túbulos del hepatopáncreas de camarones de LP expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ por 10 días. Epitelio necrosado con núcleos picnóticos y cariorrexis.
n: necrosis, c: cariorrexis. H y E. Escala: $100\mu\text{m}$.

Figura 6.18.: Detalle de túbulos del hepatopáncreas de camarones de LP expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ por 15 días.
n: necrosis, c: cariorrexis. H y E. Escala: $50\mu\text{m}$.



6.2.2. Depuración: Evaluación de la capacidad de recuperación del hepatopáncreas

Población NR

Durante los 28 días de depuración se observó una reversión de las alteraciones provocadas por la exposición a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 15 días. Si bien en el transcurso de las dos primeras semanas no se notaron mejorías en el órgano, después de 21 días de depuración se evidenció un reordenamiento tubular con notable disminución de la infiltración hemocítica (Fig. 6.19.). En la zona distal de los túbulos, numerosas células E estaban en mitosis. La mayoría de las células B mostraron apariencia normal y no se observó displasia de este tipo celular. En las zonas media y proximal de gran parte de los túbulos resultó difícil diferenciar las células F y R y el citoplasma se presentó fuertemente basófilo con microvellosidades erosionadas o poco desarrolladas (Fig 6.20.). A los 28 días de depuración, la descamación degenerativa y la infiltración hemocítica se vio disminuida. Se pudieron diferenciar claramente los cuatro tipos celulares: E, R, F y B (Fig.6.21). Las células R presentaron microvellosidades bien desarrolladas y una vacuola subapical, características de células funcionales, y las células B maduras presentaron aspecto normal (Fig. 6.22.).

Figura 6.19.: Vista general del hepatopáncreas de camarones de NR pre expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ después de 21 días de depuración. Reordenamiento tubular con disminución de infiltración hemocítica.

H y E. Escala: $500\mu\text{m}$.

Figura 6.20.: Corte transversal de túbulo del hepatopáncreas de camarones de NR pre expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ después de 21 días de depuración. Citoplasma fuertemente basófilo, microvellosidades erosionadas.

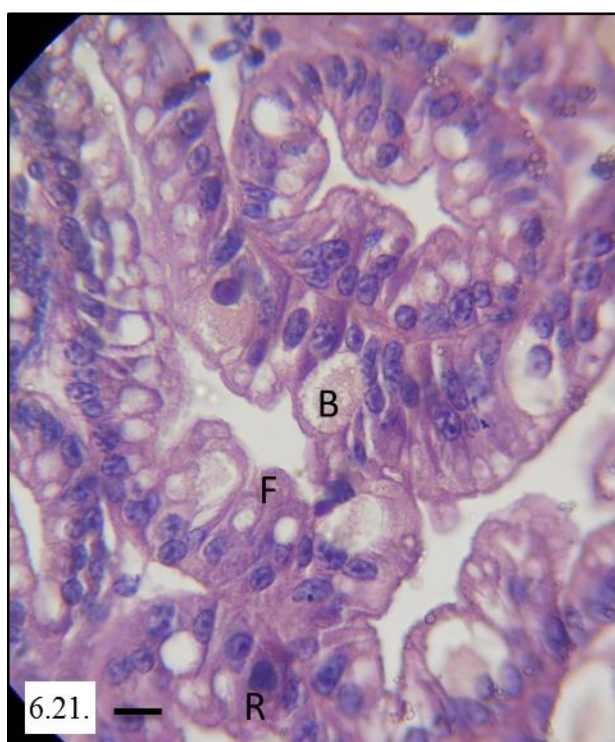
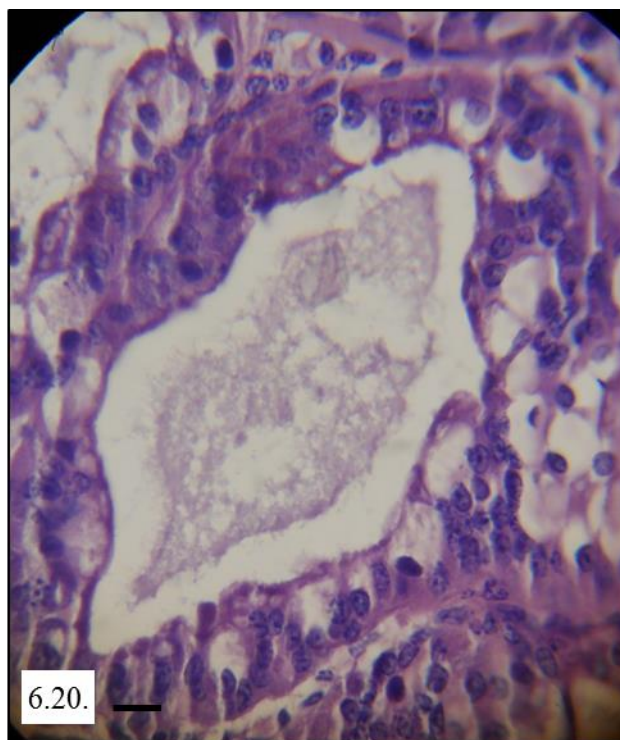
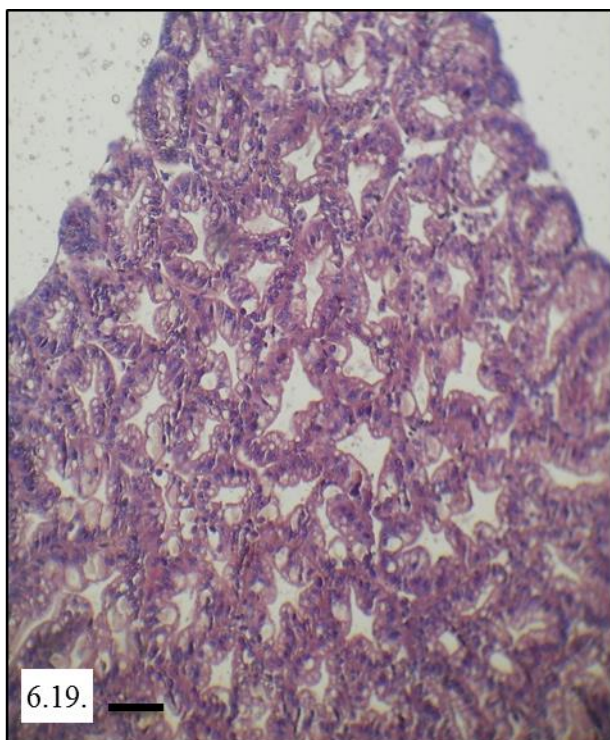
H y E. Escala: $100\mu\text{m}$.

Figura 6.21.: Corte de túbulos del hepatopáncreas de camarones de NR pre expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ después de 28 días de depuración. Se distinguen tipos celulares.

F: célula F, R: célula R, B: célula B. H y E. Escala: $100\mu\text{m}$.

Figura 6.22.: Detalle de túbulo del hepatopáncreas de camarones de NR pre expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ después de 28 días de depuración. Células con microvellosidades bien desarrolladas (flechas).

B: célula B, R: célula R, v: vacuola. H y E. Escala: $50\mu\text{m}$.



Población LP

La recuperación de los individuos provenientes de la laguna LP fue similar a la descrita para NR. Durante las dos primeras semanas de depuración no se observaron mejorías en el órgano, tanto en los individuos expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ como a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$. A partir de los 21 días se evidenció un reordenamiento tubular, con notable disminución de la infiltración hemocítica y ausencia de tejido conectivo (Fig. 6.23.). Como lo descrito en NR, en gran parte de los túbulos resultó difícil diferenciar las células F y R debido a que el citoplasma se presentó fuertemente basófilo con microvellosidades erosionadas o poco desarrolladas. Por su parte, la membrana basal raramente apareció ondulada (Fig. 6.24.). Estos cambios se observaron tanto en los individuos expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ como a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$. A los 28d de depuración los individuos de ambos tratamientos mostraron disminución de la descamación degenerativa y la infiltración hemocítica. Si bien los tipos celulares presentaron rasgos que permitieron diferenciarlos claramente, los individuos expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ evidenciaron algunas células con signos de necrosis, no así los correspondientes a la concentración $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fig. 6.25.). A 28d de depuración, y luego de la exposición a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$, las poblaciones de ambas lagunas alcanzaron el mismo grado de recuperación.

Figura 6.23.: Vista general del hepatopáncreas de camarones de LP pre expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ después de 21 días de depuración. Zona de túbulos colectores. Reordenamiento tubular con disminución de infiltración hemocítica.

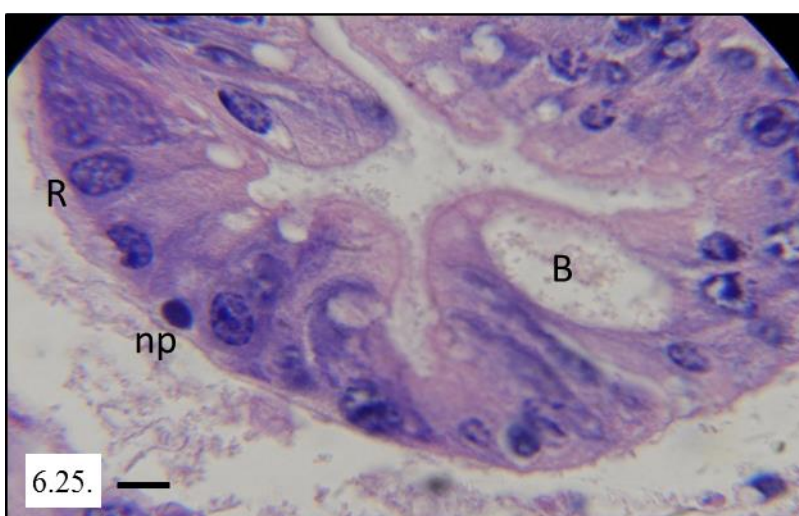
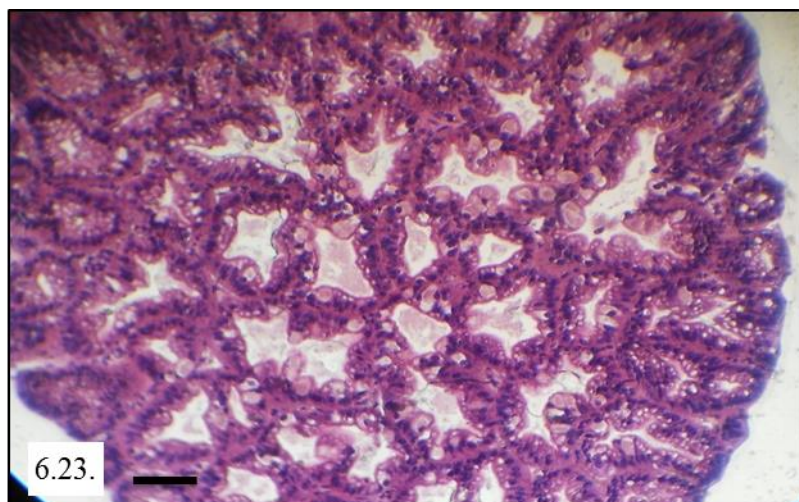
H y E. Escala: Escala: $500\mu\text{m}$.

Figura 6.24.: Corte transversal de túbulo del hepatopáncreas de camarones de LP pre expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ después de 21 días de depuración. Citoplasma fuertemente basófilo, microvellosidades erosionadas o poco desarrolladas (flechas).

H y E. Escala: $50\mu\text{m}$.

Figura 6.25.: Corte transversal de túbulo del hepatopáncreas de camarones de LP pre expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ después de 28 días de depuración.

B: célula B, R: célula R, np: núcleo picnótico. H y E. Escala: $50\mu\text{m}$.



6.3. Discusión

Los hepatopaneas de individuos control de la población NR mostraron una organización tubular normal, similar a la descrita para otras especies de camarones (Saravana Bhavan y Geraldine, 2000; Li et al., 2007; Wu et al., 2008), indicando un buen estado nutricional de los individuos y un normal funcionamiento de la glándula, propio del estadio de intermuda (Sousa, 2003). Como ya fue mencionado, la estructura funcional del hepatopáncreas consiste en un túbulo tapizado por un epitelio cilíndrico simple compuesto por cuatro tipos celulares que corresponden a las células E, F, R y B. Si bien, se ha reportado la existencia de un quinto tipo celular, las células M, en *Penaeus semisulcatus* (n.v. camarón tigre, Al-Mohanna y Nott, 1989) y *Emerita asiatica* (n.v. cangrejo topo, Kameswaramma et al., 1990) éstas no se encontraron en la especie estudiada aquí, en coincidencia con lo observado por Souza y Petriella (2000) en *P. argentinus*. La descamación degenerativa de las células B (y R adyacentes) observada en el extremo distal de los túbulos forma parte del mecanismo de renovación epitelial normal, en el cual la pérdida de células es compensada por la actividad mitótica de las células E en el extremo distal de los túbulos. Esto coincide con lo reportado para la especie por Souza (2003) y para el camarón *P. semisulcatus* (Al-Mohanna y Nott, 1989) y los cangrejos de río *Orconectes virilis* (n.v. cangrejo viril) y *P. clarkii* (Loizzi, 1971).

Por su parte, los hepatopáncreas de individuos control de la población LP mostraron diversas alteraciones, las cuales incluyen: dilatación tubular, infiltración hemocítica, membrana basal plegada, atrofia epitelial, reducción de la altura del epitelio tubular y erosión de microvellosidades. Similares alteraciones fueron reportadas en crustáceos decápodos para diversos contaminantes, tales como endosulfán (*Macrobrachium malcolmsonii*, Saravana Bhavan y Geraldine, 2000), pentaclorofenol (*P. pugio*, Rao y Doughtie, 1984), metil paratió (*C. granulatus*, Bianchini y Monserrat, 2007) etión (*P. clarkii*, Desouky et al., 2013),

dimetoato (*Penaeus monodon*, Vogt, 1987), Cu (*L. vannamei*, Frías-Espericueta et al., 2008 a), Cr (*P. pugio*, Rao y Doughtie, 1984), Cd (*Sinopotamon henanense*, Liu et al, 2013), Zn (*L. vannamei*, Wu et al., 2008), entre otros, muchos de los cuales fueron encontrados en sedimentos de la laguna LP (Chiodi Boudet et al., 2008; Miglioranza et al., 2004b). Asimismo, las patologías observadas en este estudio coincidieron con las previamente reportadas por Sousa y Petriella (2007) en esta misma población de camarones, las cuales fueron relacionadas con la alta carga de contaminantes presente en la laguna LP. Como fue mencionado en el Capítulo II, las poblaciones de *P. argentinus* bajo estudio provienen de ambientes contrastantes, en la laguna LP se reportaron una amplia variedad de contaminantes (COPs y metales pesados), con concentraciones que superan los límites establecidos como seguros para la biota acuática, situación no encontrada en la laguna NR. Por lo tanto, las diferencias observadas entre individuos control de ambas poblaciones pueden relacionarse con la calidad del ambiente, demostrando la sensibilidad del hepatopáncreas a cambios en la misma.

Las alteraciones descritas pueden afectar numerosas funciones vitales, tales como la alimentación y la reproducción debido a que el hepatopáncreas cumple un rol principal en el metabolismo y balance energético (Frías-Espericueta et al., 2008b; Revathi et al., 2011). Como fue mencionado en el Capítulo IV, Ituarte (2008) reportó en los camarones de la población de LP anomalías en numerosos rasgos reproductivos, las cuales podrían ser una consecuencia de las alteraciones morfológico-funcionales detectadas en los hepatopáncreas de dicha población en este estudio.

La exposición a Cd causó importantes alteraciones estructurales en los hepatopáncreas de *P. argentinus* indistintamente de la población evaluada, incluyendo desorganización tubular, infiltración hemocítica, erosión de las microvellosidades, plegamiento y desprendimiento de la membrana basal, atrofia celular, pérdida de los límites celulares y

necrosis. Dichas alteraciones han sido reportadas para otras especies de camarones expuestos a Cd, como *M. rosenbergii* ($25 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 15 días; Revathi et al., 2011) y *L. vannamei* ($0,4 \text{ mgCd} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 28 días; Wu et al., 2008). Ambas especies fueron expuestas a concentraciones de Cd superiores y tiempos más prolongados a los ensayados en este estudio, confirmando nuevamente que *P. argentinus* se encuentra entre las especies de crustáceos más sensibles.

Una patología común observada en todos los hepatopáncreas dañados fue la infiltración hemocítica, siendo una de las primeras alteraciones en manifestarse. Los hemocitos de crustáceos se consideran funcionalmente análogos a los leucocitos de vertebrados, involucrados principalmente en el reconocimiento y en la eliminación de materiales extraños (fagocitosis), así como en la coagulación de la hemolinfa entre otras funciones (Sindermann, 1971; Martin y Hose, 1992). Babel (1976) observó un aumento en el número de hemocitos en el isópodo marino *Jaera nordmanni* durante la exposición a metales pesados (Cd, Hg y Cu), postulando que una mayor producción de hemocitos podría fagocitar los metales pesados y así desempeñar un papel protector. De esta manera, la infiltración hemocítica no sólo formaría parte de las reacciones de defensa sino que podría tener cierto papel en la detoxificación de metales pesados.

La región medular, formada por las zonas media y proximal de los túbulos, de los hepatopáncreas fue la más afectada, característica observada en ambas poblaciones. Las células R son las más abundantes en dichas zonas, las cuales cumplen funciones de asimilación y almacenamiento, absorbiendo nutrientes desde el lumen y acumulando gotas lipídicas y glucógeno (Sousa y Petriella, 2000). Además, están involucradas en la detoxificación de metales pesados (Vogt, 1987) y de compuestos lipofílicos (Johnston et al., 1998) acumulándolos en el citoplasma (Sousa et al., 2005). Coincidentemente, en estudios sobre contaminación por Cu en las especies *P. clarkii* y *C. maenas*, se observó la mayor

cantidad de gránulos de Cu en las zonas media y proximal de los túbulos en relación con la edad celular (Hopkin y Nott, 1979; Ogura, 1979; Vogt y Quinitio, 1994). Debido a que las células R no presentan secreción apócrina, los contaminantes deben permanecer en las células hasta su senescencia (Vogt y Quinitio, 1994), por lo tanto, de todos los tipos celulares que conforman el epitelio tubular, las células R suelen ser las más afectadas por los contaminantes (Bautista et al., 1994; Li et al., 2007). Esta situación explicaría el patrón de distribución de las alteraciones observado en *P. argentinus*.

Las diferencias entre poblaciones para los camarones expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ fueron notables, destacándose la presencia de células con signos de necrosis en los camarones de LP, no así para los de NR. Además, es importante destacar que dicha patología fue evidenciada hacia el final del ensayo (15 días) acompañada por un aumento en los niveles de LPO (Sección 5.3.2. a., Capítulo V), en cambio los camarones de NR no presentaron dicho aumento. Las diferencias observadas entre poblaciones serían el resultado de la acumulación de efectos, relacionadas con la presencia de alteraciones estructurales previas a la exposición, como las observadas en los controles de LP. Por lo tanto, la condición morfológica-funcional inicial de los organismos control, como consecuencia de la calidad de su ambiente, determinó la gravedad de las alteraciones en cada población.

A su vez, los camarones de LP expuestos a las concentraciones $3,06 \mu\text{gCd}$ y $12,26 \mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$ difirieron en la extensión y tiempos de manifestación de las alteraciones histopatológicas. Por un lado, en los camarones expuestos a $12,26 \mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$ las alteraciones abarcaron una mayor área del órgano al comienzo del ensayo (3 y 7 días). Por otro, si bien para ambas concentraciones se observaron células con signos de necrosis, en los camarones expuestos a $12,26 \mu\text{g Cd} \cdot \text{L}^{-1}$ se presentaron con anterioridad (10 días) que los expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ (15 días). Las diferencias mencionadas estuvieron relacionadas con la concentración de Cd y el tiempo de exposición. Nuevamente, la presencia de necrosis estuvo

asociada a un aumento en los niveles de LPO (Sección 5.3.2.b., Capítulo V). Similarmente, Lei et al. (2011) reportó en el cangrejo de agua dulce *Sinopotamon yangtsekiense* expuesto a Cd la presencia de necrosis en tejido cardíaco asociado a un aumento en los niveles de LPO. La peroxidación lipídica representa un mecanismo importante de daño tisular, haciendo referencia a la degradación oxidativa de los lípidos de las membranas biológicas, siendo uno de los mayores responsables de la pérdida de función celular en situaciones de estrés oxidativo (Hermes-Lima et al., 1995).

Las alteraciones estructurales del hepatopáncreas de *P. argentinus* fueron revertidas al ser transferidos a un medio libre de contaminantes, tanto las observadas en los camarones control de LP así como en los expuestos a Cd, si bien, estos dos difirieron levemente en los tiempos de recuperación.

Los camarones control de LP alcanzaron una completa recuperación durante las experiencias de exposición a Cd, presentando los primeros signos de mejoría a los 10 días, por lo tanto, durante las experiencias de depuración los hepatopáncreas presentaron una estructura normal. Coincidentemente, la recuperación del hepatopáncreas en los camarones de LP también fue reportada por Souza (2003), informando un reordenamiento tubular con notable disminución de la infiltración hemocítica a los 15 días y la total recuperación del órgano a los 30 días.

Por su parte, los camarones expuestos a Cd presentaron los primeros signos de mejoría a los 21 días, independientemente de la concentración y del origen de los camarones. La completa recuperación del órgano se observó a los 28 días en los camarones expuestos a $3,06 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ de ambas lagunas. Sin embargo, dicho tiempo no fue suficiente para los camarones expuestos a $12,26 \mu\text{gCd} \cdot \text{L}^{-1}$ de LP, probablemente en relación a que en éstos las lesiones ocuparon casi la totalidad del órgano, necesitando un periodo de tiempo superior para su completa recuperación.

Claramente, el hepatopáncreas de *P. argentinus* evidenció capacidad de recuperar su estructura normal, si bien puede verse afectada si las lesiones ocupan la totalidad del órgano (Sousa, 2003). La recuperación celular y la eliminación de las células epiteliales senescentes y/o alteradas no es un evento continuo sino que está ligado a la renovación del epitelio hepatopancreático al final del ciclo digestivo (Hopkin y Nott, 1979). El epitelio es reemplazado desde el extremo distal al proximal por la actividad mitótica de las células E; por lo tanto, la completa renovación celular requiere de varios pulsos mitóticos o en otros términos de varios ciclos digestivos (Vogt y Quintio, 1994). Así como muchos decápodos, el hepatopáncreas de *P. argentinus*, tiene una alta tasa de renovación celular (Sousa, 2003), lo cual explica la rápida recuperación observada.

6.4. Conclusiones

Los resultados del estudio histológico en *Palaemonetes argentinus* demostraron:

- La morfología funcional del hepatopáncreas de los camarones de LP se encontró afectada como resultado de la exposición a los contaminantes presentes en el ambiente.
- La exposición a Cd causó alteraciones en el hepatopáncreas, dependientes del tiempo y la concentración de exposición.
- El hepatopáncreas posee la capacidad de recuperar su estructura funcional normal con el restablecimiento de la calidad del agua, siendo los daños provocados por Cd de carácter reversible.
- El análisis histológico del hepatopáncreas constituye una herramienta altamente sensible para evaluar la calidad del agua.

Capítulo VII

Consideraciones finales

El desarrollo de esta tesis permitió cumplir con los objetivos propuestos para cada capítulo, pudiendo contestar los postulados respectivos y concluyendo de manera particular para cada uno de ellos. En base a la discusión y conclusiones de cada capítulo se establecen las siguientes consideraciones generales:

Esta tesis constituye los primeros ensayos a Cd de *Palaemonetes argentinus*, obteniéndose el primer registro de LC₅₀, la caracterización de los biomarcadores, metalotioneínas y peroxidación lipídica, y el efecto sobre la estructura funcional del hepatopáncreas.

El “camarón de agua dulce” *Palaemonetes argentinus* es una especie muy sensible a Cd, lo cual podría estar relacionado con la baja-nula capacidad de inducción de MT.

Las diferencias de sensibilidad a Cd entre las poblaciones de *Palaemonetes argentinus*, relacionadas con la pre-exposición ambiental, no están asociadas a la inducción de MT, sugiriendo la presencia de gránulos metálicos como mecanismo detoxificador en la especie.

La presencia de daño histológico severo (necrosis) tuvo una relación directa con el aumento de LPO, destacándose la sensibilidad del análisis histológico del hepatopáncreas como una herramienta para evaluar la calidad del agua.

Los actuales valores guía de Cd para la protección de la vida acuática (Argentina) no están resguardando a especies sensibles, tales como *Palaemonetes argentinus*. Por lo tanto, es importante una revisión de los mismos para evitar efectos a nivel poblacional, los cuales debido a la relevancia ecológica de esta especie, pueden desencadenar futuros efectos a nivel ecosistémico en los ambientes que habita la especie.

La información acerca de la sensibilidad y el daño histológico en *Palaemonetes argentinus* reflejó la calidad ambiental de cada laguna, proponiendo a esta especie como un valioso bioindicador autóctono.

Queda demostrado que el grado de contaminación ambiental influye sobre las respuestas de *Palaemonetes argentinus* a Cd, estableciendo variaciones intraespecíficas.

Del presente trabajo se desprendieron, además de las conclusiones anteriormente mencionadas, nuevos interrogantes. En futuras investigaciones resultaría interesante confirmar la presencia de gránulos metálicos en la especie, y de esta manera tratar de dilucidar el mecanismo detoxificador que le permite a la población de LP ser más tolerante al Cd. Finalmente, sería importante establecer una batería biomarcadores que permita la evaluación integral de los mecanismos de respuesta a tóxicos en *Palaemonetes argentinus*, y contribuyendo a una mejor gestión de la calidad de los ambientes dulceacuícolas.

Capítulo VIII

Bibliografía

- Achiorno, C., De Villalobos, C., Ferrari, L., 2010. Validation test with embryonic and larval stages of *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha): sensitivity to three reference toxicants. *Chemosphere* 81, 133-140.
- Ahearn, G., Mandal, P., Mandal, A., 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J. Comp. Physiol. B* 174: 439-452.
- Al-Mohanna, S., Nott, J., 1989. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Mar. Biol.* 101, 535-544.
- Al-Mohanna, S.Y., Nott, J.A., Lane, J.W., 1985. Mitotic E-and secretory F- cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 66:403-414.
- Amiard, J., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160-202.
- Andrade, S., Moffett, J., Correa, J., 2006. Distribution of dissolved species and suspended particulate copper in an intertidal ecosystem affected by copper mine tailings in Northern Chile. *Mar. Chem.* 101, 203–212.
- Antó, M., Arnau, S., Buti, E., Cortijo, V., Gutiérrez, E., Solé, M., 2009. Characterization of integrated stress biomarkers in two deep-sea crustaceans, *Aristeus antennatus* and *Nephrops norvegicus*, from the NW fishing grounds of the Mediterranean sea. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1455-1462.
- APHA, 1992. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewaters, 14th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Barata, C., Baird, D., Markich, S., 1998. Influence of genetic and environmental factors on the tolerance of *Daphnia magna* Straus to essential and non-essential metals. *Aquat. Toxicol.* 42, 115-137.
- Barka, S., Pavillon, J., Amiard, J., 2001. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 128, 479–493.
- Baudrimont, M., Lemaire-Gony, S., Ribeyre, F., Métivaud, J., Boudou, A., 1997. Seasonal variations of metallothionein concentrations in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 118, 361-367.
- Bauer, R., 2004. Remarkable shrimps: adaptations and natural history of the carideans. University of Oklahoma Press, Norman. 282pp.
- Bautista, M., Lavilla-Pitogo, C., Subosa, P., 1994. Aflatoxin B₁ contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of pre-adult *Penaeus monodon*. *J. Sci. Food Agric.* 65, 5-11.

- Bebianno, M., Cravo, A., Miguel, C., Morais, S., 2003. Metallothionein concentrations in a population of *Patella aspera*: variation with size. *Sci. Tot. Environ.* 301, 151-161.
- Bell, T., Lightner, D., 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aq. Soc. Allen. Press, Inc. (USA), 144pp.
- Bianchini, A., Monserrat, J., 2003. Effects of metal pollution on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: protective role of sesamol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 100-108.
- Borrelli, N., 2001. Minerales, biominerales y su relación con las propiedades físico – químicas de Argiúdoles típicos afectados por prácticas agrícolas en Laguna de Los Padres, Buenos Aires. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, CGCyC, FCEyN, UNMdP, 76 pp.
- Bray, D., 1976. A review of two western Australian shrimps of the genus *Palaemonetes*, *P. australis* Dakin 1915 and *P. atrinubes* Sp. Nov. (Decapoda, Palaemonidae). *Rec. Aus. Mus.* 4, 65-84.
- Brown, B., 1977. Uptake of copper and lead by a metal tolerant isopod *Asellus meridianus* Rac. *Freshwat. Biol.* 7, 235-244.
- Brown, B., 1982. The form and function of metal-containing granules in invertebrate tissues. *Biol. Rev.* 57, 621-667.
- Brown, D., Parsons, T., 1978. Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem. *J. Fish Res. Board. Can.* 35, 880-884.
- Bryan, G., Hummerstone, L., 1971. Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to sediments containing high concentrations of heavy metals. I. General observations and adaptation to copper. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 51, 845–863.
- Bubel, A., 1976. Histological and electron microscopical observations on the effects of different salinities and heavy metal ions on the gills of *Jeara nordmanni* (Rathke) (Crustacea, Isopoda). *Cell Tissue Res.* 167, 65-95.
- Bucheli, T., Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 25, 201-268.
- Buikema Jr, A., Niederlehner, B., Cairns Jr., J., 1980. Use of grass shrimp in toxicity tests. En: Buikema Jr, A. and Cairns Jr, J. (Eds), *Aquatic Invertebrate Bioassays*. ASTM STP 715. American Society for Testing and Materials, pp. 155-173.
- Campana, M., Panzeri, A., Escalante, A., Moreno, V., Dulout, F., 2001. Micronucleus test in fish from a pampasic pond (Argentina): an estimation of the presence of genotoxic compounds. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20: 325-331.

- Castillo, G., 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Castillo, G. (Ed). IMTA, México, 189pp.
- CCME, 2002. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life. Canadian Council of Ministers of the Environment. Disponible en: http://www.ccme.ca/publications/ceqg_rcqe.html?category_id=124. Acceso: 14 Mayo 2012.
- CCME, 1987. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life. Canadian Council of Ministers of the Environment. Disponible en: http://www.ccme.ca/publications/ceqg_rcqe.html?category_id=124. Acceso: 20 junio 2012.
- CCME, 1999. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life. Canadian Council of Ministers of the Environment. Disponible en: http://www.ccme.ca/publications/ceqg_rcqe.html?category_id=124. Acceso: 12 Marzo 2013.
- Chan, K.M., 1995. Metallothionein: Potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin* 31, 411-415.
- Charmantier, G., Anger, K., 1999. Ontogeny of osmoregulation in the palaemonid shrimp *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Ecol. Prog. Series* 492, 125-129.
- Chiodi Boudet, L., Plá, R., Moreno, M., Invernizzi, R., Moreno, V., Gerpe, M., 2008. Impacto por metales pesados en la Laguna de los Padres, Provincia de Buenos Aires, Argentina. En: *Avances en Toxicología y Química Ambiental. SETAC 2nd Meeting in Argentina*.
- Chiodi Boudet, L., Escalante, A., von Haefen, G., Moreno, V., Gerpe, M., 2010. Assessment of heavy metal accumulation in two aquatic macrophytes: a field study. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 5, 1-13.
- Collins, P., 1999. Feeding of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda: Palaemonidae) from an oxbow lake of the Paraná River, Argentina. *J. Crust. Biol.* 19, 485-492.
- Collins, P., Capello, S., 2006. Cypermethrin toxicity to aquatic life: bioassays for the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 79-85.
- Collins, P., Montagna, M., 2006. Riesgos y áreas potenciales para la acuicultura de crustáceos en Entre Ríos (Argentina). *IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA*, 1-7.
- Collins, P., Williner, V., Giri, F., 2004. Crustáceos decápodos del litoral fluvial argentino. *Miscelánea*, 12: 253-264.

- Correia, A., Costa, M., Luis, O., Livingstone, D., 2003. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 296, 83-101.
- Crespo, S., Nonnotte, G., Colin, D., Leray, C., Nonnotte, L., Aubree, A., 1986. Morphological and functional alterations induced in trout intestine by dietary cadmium and lead. *J. Fish Biol.* 28: 69–80.
- Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., 2006. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. *Environ. Pollut.* 140, 492-499.
- Dandapata J., Chainy G., Rao, K., 2003. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 135, 221-233.
- De Lorenzo, M., Serrano, L., Chung, K., Hoguet, J., Key, P., 2006. Effects of the insecticide permethrin on three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 122–127.
- del Ramo, J., Torreblanca, A., Martinez, M., Pastor, A., Diaz-Mayans, J., 1995. Quantification of cadmium-induced metallothionein in crustaceans by the silver-saturation method. *Mar. Environ. Res.* 39, 121–125.
- Desouky, M., Abdel-Gawad, H., Hegazi, B., 2013. Distribution, fate and histopathological effects of ethion insecticide on selected organs of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Food Chem. Toxicol.* 52, 42-52.
- Díaz, A., Petriella, A., Sousa, L., 1998. Setogénesis and growth of the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Iheringia, Sér. Zool. (Brazil)* 85, 59-65.
- Díaz-Báez, M., López, M., Espinosa Ramírez, A., 2004. Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. Universidad Nacional de Colombia, pp. 118.
- Donatti, O., 1986. Algunos aspectos bioecológicos del camarón *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) en el embalse San Roque, Córdoba, (Argentina). *Rev. Hydrobiol. Trop.* 19, 45-60.
- Duran-Lizarraga, M., Prieto-Sagredo, J., Gonsebatt, M., Fanjul-Moles, M., 2001. Crayfish *Procambarus clarkii* shows circadian variations in different parameters of the GSH cycle. *Photochem. Photobiol.* 74, 350-355.
- Dutra, B., Castiglioni, D., Santos, R., Bond-Buckup, G., Oliveira, G., 2007. Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of *Hyalella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian highlands. *Comp. Biochem. Physiol. A* 148, 239-247.

- Dutra, B., Santos, R., Bueno, A., Oliveira, G., 2008. Seasonal variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyalella curvispina* (Crustacea, Amphipoda). *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, 322-328.
- Escorcía, G., Wang-Chan, I., 2010. Lipid peroxidation and metallothioneina induction by chromium and cadmium in oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) from Mandinga lagoon, Veracruz. *Hidrobiológica* 20, 1-40.
- Esquiús, K., Escalante, A., Solari, L., 2008. Algas epífitas indicadoras de calidad del agua en arroyos vinculados a la Laguna de Los Padres. *Biología Acuática* 24, 95-102.
- Fanjul-Moles, M., Durán-Lizarraga, M., Gonsebatt, M., Prieto-Sagredo, J., 2003. The effect of photoperiod and light irradiance on the antioxidant circadian system of two species of crayfish from different latitudes: *Procambarus clarkii* and *P. digueti*. *Photochem. Photobiol.* 77, 210-218.
- Federman, M., 2003. Mapeo y caracterización de la comunidad de macrófitas en tres lagos someros del sudeste bonaerense. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Mar del Plata, 36pp.
- Felix, M., Petriella, A., 2003. Molt cycle of the natural population of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Palaemonidae) from Los Padres lagoon (Buenos Aires, Argentina). *Iheringia Ser. Zool.* 93, 399-411.
- Fergusson, J., 1991. The heavy elements: chemistry environmental impact and health effects. Pergamon Press, 614pp.
- Fichet, D., Radenac, G., Miramand, P., 1998. Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 509-518.
- Förstner, U., Wittmann, G. (eds.) 1983. Metal pollution in the aquatic environment. 2da Ed., 486pp.
- FREPLATA, 2005. Acta 3^{er} Taller Binacional Objetivos de Calidad de agua y sedimentos. Proyecto Protección Ambiental del Río de la Plata y su Frente Marítimo: Prevención y Control de la Contaminación y Restauración de Hábitats. Secretaría de Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, Argentina, 6 pp.
- Frías-Espericueta, M., Castro-Longoria, R., Barrón-Gallardo, G., Osuna-López, J., Abad-Rosales, S., Páez-Osuna, F., Voltolina, D., 2008a. Histological changes and survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles with different copper concentrations. *Aquaculture* 278, 97-100.
- Frías-Espericueta, M., Abad-Rosales, S., Nevárez-Velázquez, A., Osuna-López, I., 2008b. Histological effects of a combination of heavy metals on pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquat. Toxicol.* 89, 152-157.

Galvão, L.; Corey, G., 1987. Cadmio. Serie Vigilancia 4. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 69pp.

García, M., Rodríguez Capítulo, A., Ferrari, L., 2010. Age-related differential sensitivity to cadmium in *Hyaella curvispina* (Amphipoda) and implications in ecotoxicity studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 771-778.

Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J-C, 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*?. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 209-220.

Geffard, A., Quéau, H., Dedourge, O., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, O., 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 145, 632-640.

George, S., Olsson, P., 1994. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In: Kramer, K.J.M. (Ed.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 151-171.

Geret, F., Serafim, A., Bebianno, M., 2003. Antioxidant enzyme activities, metallothionein and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*?. *Ecotoxicology* 12, 417-426.

Giesy, J., Graney, R., 1989. Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. *Hidrobiología* 188, 21-60.

Goldstein, B., Lauría de Cidre, L., 1974. Ciclo de maduración sexual y observaciones preliminares sobre el desove del camarón dulceacuícola *Palaemonetes argentinus* (Nobili, 1901) Crustacea, Caridea, Palaemonidae I. Hembra. *Physis, Sec. B*, 33 (87), 165-176.

González-Rey, M., Serafim, A., Company, R., Gomes, T., Bebianno, M., 2008. Detoxification mechanisms in shrimp: comparative approach between hydrothermal vent fields and estuarine environments. *Mar. Environ. Res.* 66, 35-37.

González Sagrario, M., 2004. Rol de las macrófitas sumergidas en las interacciones tróficas de lagos someros. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche. 145pp.

González Sagrario, M., Aizpún de Moreno, J., Moreno, V., Escalante, A., 1998. Dynamics of organochlorine compounds in different trophic levels of Los Padres pond in Argentina. I. Pesticides. *Environ. Sci.* 6, 153-169.

Goyer, R., Clarkson, T., 2001. Toxic effects of metals. En: C. Klaassen (ed.) *Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons*. Mc Graw-Hill Co., USA, 811-868.

- Graney, R., Giesy, J., 1986. Effects of long-term exposure to pentachlorophenol on the free amino acid pool and energy reserves of the freshwater amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* Bousfield (Crustacea, Amphipoda). *Ecotox. Environ. Saf.* 12, 233-251.
- Hamilton, M., Russo, R., Thurston, R., 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11, 714-719.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard, J., Cosson, R., 1999. Relationship between metallothioneins and metals in a natural population of the clam *Ruditapes decussatus* from Sfax coast: a non-linear model using Box-Cox transformation. *Comp. Biochem. Physiol. C* 123, 153-163.
- Hardivillier, Y., Leignel, V., Denis, F., Uguen, G., Cosson, R., Laulier, M., 2004. Do organisms living around hydrothermal vent sites contain specific metallothioneins? The case of the genus *Bathymodiolus* (Bivalvia, Mytilidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 111-118.
- Holloway, G., Sibly, R., Povey, S., 1990. Evolution in toxin-stressed environments. *Funct. Ecol.* 4, 289-294.
- Hermes-Lima, M., Willmore, W., Storey, K., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylenol orange complex formation. *Free Rad. Biol. Med.* 643, 271-280.
- Hinton, D., Kendall, M., Silver, B., 1973. Use of histologic and histochemical assessments in the prognosis of the effects of aquatic pollutants. *Am. Soc. Test. Mater., Spec. Tech. Publ.* 528, 194-208.
- Hopkin, S., Nott, J., 1979. Some observations on concentrically structured, intracellular granules in the hepatopancreas of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 59, 867-877.
- Hutchinson, T., Meema, C. (eds.), 1994. Global perspectives on lead, mercury and cadmium cycling in the environment. Wiley Eastern Limited - New Age International Limited, 413pp.
- Icely, J., Nott, J., 1980. Accumulation of copper within the "hepatopancreatic" caeca of *Corophium volutator* (Crustacea: Amphipoda). *Mar. Biol.* 57, 193-199.
- Icely, J., Nott, J., 1992. Digestion and absorption: the digestive system and associated organs. In: *Microscopic anatomy of invertebrates: decapod, Crustacea*. Vol. 10. Harrison, F.W., Humes, A.G., eds., Wiley-Liss Inc., New York, p. 147-201.
- Ituarte, R., 2008. Efectos de la salinidad sobre la reproducción y el desarrollo del "camarón de agua dulce" *Palaemonetes argentinus*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Mar del Plata, 196pp.

- Jak, D., Meador, J., 1997. Evaluation of laboratory derived toxic effects concentrations of a mixture of metals by testing freshwater plankton communities in enclosures. *Water Res.* 30, 1215-1227.
- Johnston, D., Alexander, C., Yellowhees, D., 1998. Epithelial cytology and function in the digestive gland of *Thenus orientalis* (Decapoda, Scyllaridae). *J. Crust. Biol.* 18, 271-278.
- Kameswaramma, A., Shyamasundari, K., Hanumantha, R., 1990. Histological and histochemical changes of the hepatopancreas in relation to moult stages of the mole crab *Emerita asatica* (Milne Edwards) (Crustacea: Anomura). *Riv. Idrobiol.* 29, 781-796.
- Kaoud, H., Eldahshan, A., 2010. Bioaccumulation of cadmium in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Nature Sci.* 8, 157-168.
- Key, P., Fulton, M., 2006. Correlation between 96-h mortality and 24-h acetylcholinesterase inhibition in three grass shrimp larval life stages. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 389–392.
- Key, P., Fulton, M., Scott, G., Layman, S., Wirth, E., 1998. Lethal and sublethal effects of malathion on three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Aquat. Toxicol.* 40, 311-322.
- Key, P., Wirth, E., Fulton, M., 2006. A review of grass shrimps as, *Palaemonetes spp.*, as a bioindicator of anthropogenic impacts. *Environ. Bioindicators* 1, 115-128.
- Khan, A., Weis, J., D'andrea, L., 1988. Studies of cadmium tolerance in two populations of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 30-34.
- Khan, A., Weis, J., Saharig, C., Polo, A., 1993. Effect of tributyltin on mortality and telson regeneration of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 152-157.
- Klaassen, C., (ed.), 2001. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Mc Graw Hill Professional, New York, 1236pp.
- Klerks, P., Bartholomew, P., 1991. Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochaetes *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Aquat. Toxicol.* 19, 97–112.
- Koutsaftis, A., Aoyama, I., 2007. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Sci. Tot. Environ.* 387,166-174.
- Kwok, K., Grist, E., Leung, K., 2009. Acclimatation effect and fitness cost of copper resistance in the marine copepod *Tigriopus japonicas*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 358-364.
- Lavariás, S., Heras, H., Pedrini, N., Tournier, H., Ansaldo, M., 2011. Antioxidant response and oxidative stress levels in *Macrobrachium borellii* (Crustacea:

- Palaemonidae) exposed to the water-soluble fraction of petroleum. *Comp. Biochem. Physiol. C* 153, 415-421.
- Legras, S., Mouneyrac, C., Amiard, J., Amiard-Triquet, C., Rainbow, P., 2000. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 246, 259-279.
- Le Blanc, G., 1982. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (Straus) to environmental pollutants. *Environ. Pollut.* 27, 309-322.
- Lei, W., Wang, L., Liu, D., Xu, T., Luo, J., 2011. Histopathological and biochemical alterations of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere* 84, 689-694.
- Li, N., Zhao, Y., Yang, J., 2007. Impact of waterborne copper on the structure of gills and hepatopancreas and its impact on the content of metallothionein in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 73-79.
- Lin, Y., Chen, J., 2003. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture* 224, 193-201.
- Linde, A., Sánchez-Galán, S., Vallés-Mota, P., García-Vázquez, E., 2001. Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 60-63.
- Liu, D., Yang, J., Wang, L., 2013. Cadmium induces ultrastructural changes in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *Micron* 47, 24-32.
- Loizzi, R., 1971. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Z. Zellforsch.* 113, 420-440.
- López Greco, L., Sánchez, M., Nicoloso, G., Medesani, D., Rodríguez, E., 2001. Toxicity of cadmium and copper on larval and juvenile stages of estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura Grapsidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 333-338.
- Lund Amado, L., Longaray, M., García, P., Ramosa, B., Franco Freitas, R., Zafalona, B., Ribas Ferreira, J., Sarkis Yunes, J., Monserrat, J., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci. Tot. Environ.* 407, 2115-2123.
- Machreki-Ajmi, M., Ketata, I., Ladhar-Chaabouni, R., Hamza-Chaffai, A., 2008. The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers in *Cerastoderma glaucum*. *Ecotoxicol.* 17, 1-11.
- Maltby, L., 1991. Pollution as a probe of life-history adaptation in *Asellus aquaticus* (Isopoda). *Oikos* 61, 11-18.

- Marshallon, D., Knowlton, R., Merchant, H., 2006. Acute toxicity of permethrin to four populations of ovigerous grass shrimp, *Palaemonetes pugio* Holthuis. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 77, 543-550.
- Martin, G., Hose, J., 1992. Vascular elements and blood (hemolymph). In: Microscopic anatomy of invertebrates: Decapod, Crustacea. Vol 10. Harrison F., Humes, A., Ed. Wiley-Liss Inc., New York. Pp117-146.
- Martínez, M., 2001. Avifauna de Mar Chiquita. Pp. 227–250 en: IRIBARNE O (ed) Reserva de Biosfera Mar Chiquita: características físicas, biológicas y ecológicas. Editorial Martín, Mar del Plata
- Martínez, M. Del Ramo, J., Torreblanca, A. Pastor, A., Diaz-Mayans, J., 1996. Cadmium toxicity, accumulation and metallothionein induction in *Echinogammarus echinosetosus*. J. Environ. Sci. Health A: Environ. Sci. Eng. Toxicol. 31, 1605-1617.
- Mason, A., Simkiss, K., 1982. Sites of mineral deposition in metal accumulating cells. Exp.Cell. Res. 139, 383-391.
- McCarthy, J., Shugart, L., 1990. Biomarkers of environmental contamination. Chelsea, MI (US); Lewis Publishers, United States, 457pp.
- McEwen, B.S. 2000. Allostasis, allostatic load, and the aging nervous system: role of excitatory amino acids and excitotoxicity. Neurochemical Research, 25:1219-1231.
- Miglioranza, K., Aizpun, J., Moreno, V., 2004a. Land based sources of marine pollution: organochlorine pesticides in stream systems. Environ. Sci. Pollut. Res. 11, 227 – 232.
- Miglioranza, K., Aizpún de Moreno, J., Moreno, V., 2004b. Organochlorine pesticides sequestered in the aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (C. A. Meyer) Soják from a shallow lake in Argentina. Water Res. 38: 1769-1772.
- Miglioranza, K., Aizpún de Moreno, J., Moreno, V.J., Osterrieth, M., Escalante, A., 1999. Fate of organochlorine pesticides in soils and terrestrial biota of “Los Padres” pond watershed, Argentina. Environ. Pollut. 100, 1-9.
- Miglioranza, K., González Sagrario, M., Aizpún de Moreno, J., Moreno, V., Escalante, A., Osterrieth, M., 2002. Agricultural soil as a potential source of input of organochlorine pesticides into a nearby pond. Environ. Sci. Pollut. Res. 9, 250-256.
- Miller, J., Miller, J., 1986. Statistics for Analytical Chemistry, 2nd Edition, Ellis Horwood, Chichester, England, 50 pp.
- Montagna, M., Collins, P., 2007. Survival and growth of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda; Caridea) exposed to insecticides with chlorpyrifos and endosulfan as active element. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 53, 371-378.

- Moksnes, P-O., Lindahl, U., Haux, C., 1995. Metallothionein as a Bioindicator of heavy metal exposure in the tropical shrimp, *Penaeus vannamei*: a study of dose-dependent induction. *Mar. Environ. Res.* 39,143-146.
- Moraitou-Apostolopoulou, M., Verriopoulos, G., Rogdakis, I., 1982. Evaluation of the stress exerted by a polluted environment to a marine organism by comparative toxicity tests. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 416-423.
- Mortimer, M., Miller, G., 1994. Susceptibility of larval and juvenile instars of the sandcrab, *Portunus pelagicus* (L.), to sea water contaminated by chromium, nickel and copper. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 45, 1107-1121.
- Mouneyrac, C., Amiard, J., Amiard-Triquet, C., Cottier, A., Rainbow, P., Smith, B., 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 57, 225–242.
- Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C., Amiard, J., Rainbow, P., 2001. Comparison of metallothionein concentrations and tissue distribution of trace metals in crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in and out of the reproductive season. *Comp. Biochem. Physiol C* 129, 193-209.
- Mouneyrac, C., Geffard, A., Amiard, J., Amiard-Triquet, C., 2000. Metallothionein-like proteins in *Macoma balthica*: effects of metal exposure and natural factors. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 34-42.
- Moore, M., 1985. Cellular responses to pollutants. *Mar. Pollut. Bull.* 16-4, 134-139.
- Nazary, E., Rauh Müller, Y., Ammar, D., 2000. Embryonic development of *Palaemonetes argentinus* Nobili, (Decapoda, Palaemonidae), reared in the laboratory. *Crustaceana* 73, 143-152.
- Nebeker, A., Onjukka, S., Cairns, M., Krawczyk, D., 1986. Survival of *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* in cadmium-spiked water and sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 933-938.
- Newman, M., McIntosh, A., (eds.) 1991. *Metal Ecotoxicology. Concepts & Applications.* Lewis Publishers, Inc., Chelsea, 399pp.
- Nunez-Nogueira, G., Mouneyrac, C., Muntz, A., Fernández-Bringas, L., 2010. Metallothionein-like proteins and energy reserve levels after Ni and Pb exposure in the pacific white prawn *Penaeus vannamei*. *J. Toxicol.*, 1-9.
- Oakes, K., Van Der Kraak, G., 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 63, 447-463.
- Oberdörster, E., Brouwer, M., Hoexum-Brouwer, T., Manning, S., McLachlan, J., 2000. Long-term pyrene exposure of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, affects molting and

reproduction of males and offspring of exposed females. *Environ. Health Persp.* 108, 641-646.

Ogura, K., 1979. Midgut gland cells accumulating iron and copper in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Annot. Zool. Jpn.* 32, 133-142.

Olafson, R., Kearns, A., Sim, R., 1998. Heavy metal induction of metallothioneins synthesis in the hepatopancreases of the crab, *Scylla serrate*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 62B:414-424.

Olsson, P-E., Borg, B., Brunström, B., Hakanson, H., Klasson-Wehler, E., 1998. Endocrine disrupting substances. Impairment of reproduction and development. Swedish Environmental Protection Agency, Suecia, 150pp.

Ondarza, P., 2005. Dinámica de plaguicidas organoclorados en la laguna Nahuel Rucá, cuenca de la laguna costera Mar Chiquita. Sedimentos, macrófitas y peces como potenciales remediadores. Tesis de grado, Universidad Nacional de Mar del Plata, UNMdP, 74pp.

Osterrieth, M.L., 2002. Geoecología y degradación de suelos afectados por prácticas hortícolas en áreas sub-urbanas de la provincia de Buenos Aires, Argentina. En: Teruggi L. B. (ed). Manejo integral de cuencas hidrográficas y planificación territorial. Editorial, 107-119.

Osterrieth, M., Oyarbide F., Bordas, V., 2000. Biominerales de oxalato de calcio en suelos de Laguna de Los Padres, Buenos Aires, Argentina. *Ciencia del Suelo* 18, 50-58.

Pantani, C., Pannunzio, G., de Cristofaro, M., Novelli, A., Salvatori, M., 1997. Comparative acute toxicity of some pesticides, metals, and surfactants to *Gammarus italicus* Goedm. and *Echinogammarus tibaldii* Pink and Stock (Crustacea: Amphipoda). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 963-967.

Pedersen, S., Lundebye, A., Depledge, M., 1997. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat. Toxicol.* 37, 183-200.

Petriella, A., Fonalleras, M., 1998. Citoarquitectura del hepatopáncreas del camarón *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Physis*, Secc. A55 (128-129), 25-30.

Pook, C., Lewis, C., Galloway, T., 2009. The metabolic and fitness costs associated with metal resistance in *Nereis diversicolor*. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1063-1071.

Preston, B., Snell, T., 2001. Direct and indirect effects of sublethal toxicant exposure on population dynamics of freshwater rotifers: a modeling approach. *Aquat. Toxicol.* 52, 87-99.

Quirós, R., Rennella, A., Boveri, M., Rosso, J., Sosnovsky, A., 2002. Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecología Austral*, 12, 175-185.

- Rainbow, P., 1998. Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. En: Langston, W., Bebianno, M. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman & Hall, London, pp. 285-319.
- Rao, K. Doughtie, D., 1984. Histopathological changes in grass shrimp exposed to chromium, pentachlorophenol and dithiocarbamates. *Mar. Environ. Res.* 14, 371-395.
- Reinsel, K., Glas, P., Rayburn, J., Pritchard, M., Fisher, W., 2001. Effects of food availability on survival, growth, and reproduction of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*: a laboratory study. *Mar. Ecol. Prog. Series* 220, 231-239.
- Revathi, P., Vasanthi, L., Munuswamy, N., 2011. Effect of cadmium on the ovarian development in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 623-629.
- Ringuelet R., 1962. *Ecología acuática continental*. Ed. Eudeba, Buenos Aires, 138 pp.
- Ringuelet, R., 1972. *Ecología y biocenología del hábitat lagunar o lago de tercer orden de la Región Neotrópica Templada (Pampasia Sud-Oriental de la Argentina)*. *Physis* 31, 55-76.
- Rodríguez Capítulo, A., 1984. Incidencia del arsénico en parámetros biológicos de *Palaemonetes argentinus* Nobili (Decapoda, Natantia). *Limnobiós* 2, 609-612.
- Rodríguez Capítulo, A., Freyre, L., 1995. Demografía de *Palaemonetes argentinus* Nobili (Decapoda, Natantia) en la laguna Chascomús, Buenos Aires, Argentina. Supervivencia, migraciones, biomasa y fecundidad. *Limnética* 11, 39-47.
- Rodríguez, H., Ramos, M., Pino, O., Díaz, B., 2011. Toxicidad del extracto crudo de maíz sobre *Panonychus citri* (McGregor) en condiciones de laboratorio. *Rev. Protección Veg.* 26, 105-110.
- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22, 81-114.
- Romanelli, A., Massone, H., 2009. Caracterización general del área de laguna de Los Padres. Cuenca de la laguna de los Padres, Partido de Gral. Pueyrredón, Provincia de Buenos Aires. Centro de Geología de Costas del Cuaternario, Universidad Nacional de Mar del Plata. 12pp.
- Romero-Isart, N. y M. Vasák. 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.*; 88:388-396.
- Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J., Elder, J., 2002. Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 671-679.

Ruttkey-Nedecky, B., Nejd, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6044-6066.

Sadiq, M., 1992. *Toxic Metal Chemistry in Marine Environments*. Marcel Dekker Inc., New York, 390pp.

Sanders, B., Jenkins, K., Sunda, W., Costlow, J., 1983. Free cupric ion activity in seawater: effects on metallothionein and growth in crab larvae. *Science* 22, 53-54.

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

Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A., Sarker, S., 2006. Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15, 333-340.

Savigny, C., 2001. Aves de Mar del Plata. Laguna de Los Padres, puerto y costas marinas. *Nuestras aves. Rev. Aves Argentinas Asoc. Ornitol. Plata.* 42, 11-18.

Selye, H., 1956. *The stress of life*. McGraw-Hill, New York, 515pp.

Serra, R., Isani, G., Tramontano, G., Carpena, E., 1999. Seasonal dependence of cadmium accumulation and Cd-binding proteins in *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Comp. Biochem. Physiol. C* 123, 165-174.

SHN, 15/11/2009. <http://www.hidro.gov.ar/observatorio/Resol.asp>.

Silva, J., Fuentealba, C., Bay-Schmith, E., Larrain, A., 2007. Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. *Gayana* 71, 135-141.

Sindermann, C., 1971. Internal defenses of crustacea: a review. *Fishery Bull.* 69, 455-489.

Sinnhuber, R., Yu, I., Yu, T., 1958. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Food Res.* 23, 624-634.

Sousa, G., 2003. Tesis doctoral. Estudio sobre las modificaciones tisulares del camarón *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea). Su empleo como indicadora de contaminación. Universidad Nacional de Mar del Plata, 138pp.

Sousa, G., Cuartas, E., Petriella, A., 2005. Fine structural analysis of the epithelial cells in the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) in intermoult. *Biocell* 29, 25-31.

Sousa, G., Petriella, A., 2000. Histology of the hepatopancreas of the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Caridea). *Biocell* 24, 189-195.

- Sousa, G., Petriella, A., 2001. Changes in the hepatopancreas histology of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Caridea) during moult. *Biocell* 2001, 275-281.
- Sousa, G., Petriella, A., 2007. Functional morphology of the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Decapoda): influence of environmental pollution. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.)* 55, 79-86.
- Spivak, E., 1997. Life history of a brackish-water population of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda: Caridea) in Argentina. *Ann. Limnol.* 33, 179-190.
- Sroda, S., Cossu-Leguille, C., 2011. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere* 83, 538-544.
- Stohs, S., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.
- Storch, V., 1984. The influence of nutritional stress on the ultrastructure of the hepatopancreas of terrestrial isopods. *Symp. Zool. Soc., London* 53, 167-184.
- Storch, V., Anger, K., 1983. Influence of starvation and feeding on the hepatopancreas of larval *Hyas araneus* (Decapoda, Majidae). *Helgol. Meeresunters* 36, 67-75.
- Stuhlbacher, A., Maltby, L., 1992. Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 319-324.
- Shuhaimi-Othman, M., Yakub, N., Ramle, N-A, Abas, A., 2011. Sensitivity of the freshwater prawn, *Macrobrachium lanchesteri* (Crustacea: Decapoda), to heavy metals. *Toxicol. Ind. Health* 27, 523-530.
- Tatem, H., Anderson, J., Neff, J., 1976. Seasonal and laboratory variations in the health of grass shrimp *Palaemonetes pugio*: Dodecyl sodium sulfate bioassay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 16, 368-375.
- Thornalley, P., Vasäk, M., 1985. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 827, 3644.
- Trillas, 1973. Investigación de suelos: métodos de laboratorio y procedimientos para recoger muestras. Editorial Trillas, México, 90pp.
- Underwood, A., 1997. *Experiments in Ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance*. Cambridge University Press. 504pp
- van Gestel, C., van Brummelen, T., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.
- van Straalen, N., 2003. Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environ. Sci. Technol.*, 324-330.

- Vega, M., Pizarro, R., 2000. Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater cladoceran *Daphnia longispina* exposed to UV radiation. *J. Photochem. Photobiol. B* 54, 121-125.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 277, 612-619.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 146, 281-300.
- Viarengo, A., Nott, J., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Phys. C* 104, 355-372.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44, 69-84.
- Vogt, G., Quintio, E., 1994. Accumulation and excretion of metal granules in the prawn, *Penaeus monodon*, exposed to water-borne copper, lead, iron and calcium. *Aquat. Toxicol.* 28, 223-241.
- Vogt, G., Storch, V., Quintio, E., Pascual, F., 1985. Midgut gland as a monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda). *Aquaculture* 48, 1-12.
- Vogt, G., 1987. Monitoring of environmental pollutants such as pesticides in prawn aquaculture by histological diagnosis. *Aquaculture* 67, 157-164.
- Wallace, G., Lee, B-G., Luoma, S., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249, 183-197.
- Weber, D., McKenney, C., MacGregor, M., Celestial, D., 1996. Use of artificial sediments in a comparative toxicity study with larvae and postlarvae of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Environ. Pollut.* 93, 129-133.
- White, S., Rainbow, P., 1986. Accumulation of cadmium by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 32, 17-25.
- Wirth, E., Lund, S., Fulton, M., Scott, G., 2001. Determination of acute mortality in adults and sublethal embryo responses of *Palaemonetes pugio* to endosulfan and methoprene exposure. *Aquat. Toxicol.* 53, 9-18.
- Wu, J-P., Chen, H-C., 2005. Metallothionein induction and heavy metal accumulation in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to cadmium and zinc. *Comp. Biochem. Physiol. C* 140, 383-394.

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

Yang, J-L., Chen, L-H., Lee, Y-C., Chen, H-C., 2008. Comparative acute toxicity of Copper(II), Cadmium(II), And Gallium(III) on freshwater shrimp (*Macrobrachium nipponense*) and reference values for five aquatic organisms. Environ. Sci. Vol. 3, Issues 2.

Zar, J., 1996. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey. 718pp.