



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**“Efectos del herbicida atrazina sobre el crecimiento
ovárico y su control endocrino en crustáceos
decápodos”**

Tesis presentada para optar al Título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Gabriela Romina Silveyra

Director de Tesis: Dr. Daniel Alberto Medesani

Consejero de Estudios: Dr. Enrique Marcelo Rodríguez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología de Crustáceos, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental (DBBE), FCEN-UBA. Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada (IBBEA), CONICET-UBA

Buenos Aires, 2019

“Efectos del herbicida atrazina sobre el crecimiento ovárico y su control endocrino en crustáceos decápodos”

Resumen

El herbicida atrazina es uno de los principales plaguicidas aplicados de manera intensiva a nivel mundial. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de atrazina sobre la reproducción y su control endocrino en crustáceos decápodos. Para esto, se realizaron ensayos *in vivo* con hembras del cangrejo *Neohelice granulata*, que fueron expuestas de manera crónica a tres concentraciones subletales (0,05; 0,5 y 5 mg/L) de una formulación comercial o bien de una formulación experimental de atrazina, durante tres meses. Se observó un descenso en el contenido total de proteínas vitelogénicas en el ovario, un menor tamaño de oocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos, y un descenso en la proporción de oocitos vitelogénicos en los animales expuestos a 5 mg/L del formulado comercial, evidenciando un retraso en el crecimiento ovárico. Estos resultados no fueron observados en las hembras expuestas a la formulación experimental, revelando una toxicidad diferencial entre ambos formulados. Además, se observó un descenso en el contenido de glucógeno y proteínas en el músculo de las hembras expuestas a 5 mg/L, posiblemente como respuesta compensatoria al efecto estresante inespecífico del herbicida. Por otro lado, en animales ablacionados de ambos pedúnculos oculares y expuestos a 5 mg/L del formulado comercial, no se observaron cambios en ninguna de las mismas variables medidas en las hembras intactas, indicando que el retraso en el crecimiento ovárico podría deberse a una interferencia del herbicida con la regulación del proceso de vitelogénesis dada por neurohormonas pedunculares. Este mecanismo de acción del herbicida se corroboró mediante ensayos *in vitro*, incubando ovarios con pedúnculos oculares en presencia o ausencia de atrazina; el análisis histológico del ovario evidenció que el formulado comercial estaría actuando como un desorganizador endocrino, posiblemente estimulando la secreción desde los pedúnculos oculares de la neurohormona inhibidora del desarrollo gonadal, afectando así negativamente el crecimiento ovárico. Varios de los resultados obtenidos en *N. granulata* fueron también observados en la langosta

Procambarus clarkii. En particular, se observó un descenso en la expresión relativa de vitelogenina (Vg) ovárica y hepatopancreática y un menor contenido de Vg en el ovario de hembras expuestas a 5 mg/L del formulado comercial, así como una disminución en el tamaño de los oocitos en hembras expuestas a 1 y 5 mg/L; esta inhibición del crecimiento ovárico fue similar a la observada en *N. granulata*. Asimismo, se determinaron en *P. clarkii* los niveles de algunos esteroides sexuales y marcadores de estrés metabólico y oxidativo; los niveles circulantes de estradiol se vieron aumentados en los animales expuestos, demostrando que el descenso en la expresión relativa y en el contenido de Vg ovárica no estaría asociado con una menor secreción de esta hormona. Las hembras expuestas a atrazina mostraron un incremento de lactato y glutatión circulante, indicando un mayor esfuerzo metabólico y una cierta activación de las defensas antioxidantes, en respuesta al estrés generado por el herbicida. En su conjunto, los resultados obtenidos evidencian que el formulado comercial de atrazina utilizado altera la dinámica normal del crecimiento gonadal, en hembras de dos especies de crustáceos y, en consecuencia, podría afectar de manera directa a sus poblaciones, poniendo de manifiesto los efectos nocivos de este tipo de sustancias para el ambiente y los seres vivos que habitan en él.

Palabras claves: atrazina, crustáceos, crecimiento ovárico, vitelogenina, control endocrino.

“Effects of atrazine on ovarian growth and its endocrine control in decapod crustaceans”

Abstract

The herbicide atrazine constitutes one of the most widely used pesticides in the world. The present study was aimed at evaluating the effect of atrazine on reproductive function and its endocrine control, in two crustacean decapod species. For this, we ran *in vivo* assays, in which females of the crab *Neohelice granulata* were chronically exposed to three sublethal concentrations (0.05, 0.5 and 5 mg/L) of either an experimental formulation or a commercial formulation of atrazine, for three months. We observed a decrease in total content of the ovarian protein vitelogenin (Vg) and a significant decrease in pre-vitellogenic and vitellogenic oocyte size, together with a lower proportion of vitellogenic oocytes in animals exposed to 5 mg/L of the commercial formulation, showing a delay in ovarian maturation. These results were not observed with the experimental formulation, indicating a differential toxicity between both formulations. In addition, we observed a decrease in glycogen and protein levels in muscle of females exposed to 5 mg/L, likely due to a compensatory effect of the stress induced by the exposure to the herbicide. On the other hand, in animals that were ablated of both eyestalks before exposing them to 5 mg/L of atrazine, no changes were observed in the same variables measured in intact females, indicating that the delay in ovarian maturation may be due to an interference of the herbicide on the eyestalk hormonal regulation of vitellogenesis. This mechanism of action of the herbicide was corroborated by means of *in vitro* assays, incubating ovarian pieces with eyestalks in the presence or absence of atrazine. Histological analysis of ovaries revealed that the commercial formulation may be acting as an endocrine disruptor, potentially inducing the secretion of gonad inhibiting hormone from the eyestalks, therefore reducing ovarian growth. Several of effects observed in *N. granulata* were also seen in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. Particularly a reduction in the relative expression of both ovarian and hepatopancreatic Vg and a lower ovarian Vg content in females exposed to 5 mg/L

of commercial atrazine were observed, as well as a reduction in the oocyte size, in females exposed to both 1 and 5 mg/L of the commercial formulation; this inhibition was similar to that observed in *N. granulata*. We also measured some steroid hormone levels and oxidative and metabolic stress markers. We found that circulating levels of estradiol were increased in exposed females, indicating that the reduction in the relative expression and content of ovarian Vg may not be associated with a reduction in estradiol secretion. Females exposed to atrazine showed increased levels of circulating lactate and glutathione, indicating a higher metabolic effort and some activation of antioxidant defenses, in response to the stress induced by the herbicide. Taken together, the observed results demonstrate that the commercial formulation of atrazine alters the normal ovarian growth in females of the two crustacean species, and may directly affect their natural populations, providing evidence of the harmful effects of these chemicals to the environment and the species living there.

Keywords: atrazine, crustaceans, ovarian growth, vitellogenin, endocrine control.

A mamá, Patri y Santi.

Los resultados de la presente Tesis Doctoral fueron parcialmente publicados en:

“Effects of atrazine on ovarian growth, in the estuarine crab *Neohelice granulata*.” Silveyra, G. R., Canosa, I. S., Rodríguez, M. E., Medesani, D. A. (2017). *Comparative Biochemistry and Physiology Part: C, Toxicology and Pharmacology*, 192: 1-6.

“Effects of atrazine on vitellogenesis, steroid levels and lipid peroxidation, infemale red swamp crayfish *Procambarus clarkii*.” Silveyra, G. R., Silveyra, P., Vatnick, I., Medesani, D. A., y Rodríguez, M. E. (2018). *Aquatic Toxicology*, 197: 136-142.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| <u>INTRODUCCIÓN</u> | 1 |
| HERBICIDA ATRAZINA | 1 |
| <i>Propiedades y usos</i> | 1 |
| <i>Toxicidad sobre los organismos</i> | 3 |
| BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE CRUSTÁCEOS | 4 |
| <i>Vitelogénesis</i> | 4 |
| <i>Control endocrino de la reproducción en hembras de crustáceos</i> | 7 |
| ESPECIES EN ESTUDIO | 13 |
| <i>Neohelice granulata</i> | 13 |
| <i>Distribución y hábitat</i> | 13 |
| <i>Problemática ambiental</i> | 16 |
| <i>Biología general de la especie</i> | 18 |
| <i>Ciclo reproductivo</i> | 19 |
| <i>La especie como modelo de estudio</i> | 22 |
| <i>Procambarus clarkii</i> | 23 |
| <i>Hábitat y distribución</i> | 23 |
| <i>Problemática ambiental</i> | 25 |
| <i>Biología general de la especie</i> | 26 |
| <i>Ciclo reproductivo</i> | 28 |
| <i>La especie como modelo de estudio</i> | 31 |
| <u>OBJETIVO GENERAL</u> | 32 |

| | |
|--|-----------|
| <u>CAPÍTULO I</u> “Evaluación in vivo del efecto del herbicida atrazina sobre el crecimiento ovárico, en el cangrejo de estuario <i>Neohelice granulata</i>.” | 34 |
| HIPÓTESIS | 35 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 36 |
| METODOLOGÍA | 37 |
| <i>Condiciones generales de experimentación</i> | 37 |
| <i>Muestreo y aclimatación de los animales</i> | 37 |
| <i>Ensayos in vivo</i> | 38 |
| <i>Diseño experimental</i> | 40 |
| <i>Validación de concentraciones nominales</i> | 41 |
| Experimento in vivo I | 42 |
| <i>Obtención de muestras biológicas</i> | 43 |
| <i>Variables analizadas</i> | 43 |
| <i>Supervivencia, porcentaje de hembras ovígeras y eventos de muda</i> | 43 |
| <i>Ganancia en peso e índices gonadosomático y hepatosomático</i> | 44 |
| <i>Reservas energéticas</i> | 44 |
| <i>a) Niveles de glucógeno en tejidos y órganos</i> | 44 |
| <i>b) Niveles de glucosa en hemolinfa</i> | 45 |
| <i>c) Niveles de lípidos en tejidos y órganos</i> | 46 |
| <i>d) Niveles de proteínas en tejidos y órganos</i> | 47 |
| <i>Contenido total de proteínas vitelogénicas</i> | 47 |
| <i>Procesamiento de muestras de ovario y hepatopáncreas</i> | 48 |
| <i>Técnica inmunoenzimática ELISA</i> | 49 |
| <i>Tamaño y proporción de los oocitos</i> | 50 |
| Experimento in vivo II | 52 |

| | |
|--|-----|
| <i>Obtención de muestras biológicas</i> | 53 |
| <i>Variables analizadas</i> | 53 |
| <i>Contenido total de proteínas vitelogénicas</i> | 53 |
| <i>Tamaño y proporción de los oocitos</i> | 54 |
| <i>Análisis estadístico</i> | 54 |
| RESULTADOS | 55 |
| DISCUSIÓN | 80 |
| <u>CAPÍTULO II</u> “Evaluación in vitro del efecto del herbicida atrazina sobre el control endocrino del crecimiento ovárico, en el cangrejo de estuario <i>Neohelice granulata</i>.” | 89 |
| HIPÓTESIS | 90 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 91 |
| METODOLOGÍA | 92 |
| <i>Ensayos in vitro</i> | 92 |
| <i>Obtención de muestras biológicas</i> | 92 |
| <i>Diseño experimental</i> | 93 |
| Experimento in vitro I | 93 |
| Experimento in vitro II | 94 |
| Experimento in vitro III | 95 |
| <i>Variables analizadas</i> | 96 |
| <i>Contenido total de proteínas vitelogénicas</i> | 96 |
| <i>Proporción oocitaria (en el Experimento in vitro III)</i> | 96 |
| <i>Análisis estadístico</i> | 97 |
| RESULTADOS | 98 |
| DISCUSIÓN | 102 |

| | |
|--|------------|
| <u>CAPÍTULO III</u> “Evaluación in vivo del efecto del herbicida atrazina sobre el crecimiento ovárico, en la langosta de agua dulce <i>Procambarus clarkii</i>.” | 107 |
| HIPÓTESIS | 108 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 109 |
| METODOLOGÍA | 110 |
| <i>Condiciones generales de experimentación</i> | 110 |
| <i>Muestreo y aclimatación de los animales</i> | 110 |
| <i>Ensayo in vivo</i> | 111 |
| <i>Diseño experimental</i> | 112 |
| <i>Validación de concentraciones nominales</i> | 113 |
| <i>Obtención de muestras biológicas</i> | 113 |
| <i>Variables analizadas</i> | 114 |
| <i>Supervivencia, porcentaje de hembras ovígeras y eventos de muda</i> | 114 |
| <i>Ganancia en peso e índices gonadosomático y hepatosomático</i> | 114 |
| <i>Reservas energéticas</i> | 115 |
| <i>Niveles de proteínas en músculo</i> | 115 |
| <i>Niveles circulantes de esteroides sexuales</i> | 115 |
| <i>Parámetros de estrés metabólico y oxidativo</i> | 116 |
| a) <i>Niveles de glucosa en hemolinfa</i> | 116 |
| b) <i>Niveles de lactato en hemolinfa</i> | 117 |
| c) <i>Niveles de TBARS en hepatopáncreas</i> | 117 |
| d) <i>Niveles de glutatión en hepatopáncreas</i> | 118 |
| <i>Expresión relativa de ARNm de vitelogenina</i> | 118 |
| <i>Contenido total de proteínas vitelogénicas</i> | 121 |
| <i>Técnica inmunoenzimática ELISA</i> | 121 |

| | |
|---|-----|
| <i>Tamaño oocitario</i> | 123 |
| <i>Análisis estadístico</i> | 124 |
| RESULTADOS | 125 |
| DISCUSIÓN | 138 |
| <u>CONCLUSIONES</u> | 143 |
| <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 147 |
| <u>ANEXOS</u> | 167 |
| <i>Composición de la dieta base</i> | 168 |
| <i>Purificación de la lipoproteína vitelogenina para la posterior obtención del anticuerpo primario anti-vitelogenina</i> | 167 |
| <i>Recetas</i> | 176 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| 17PG | 17 α -hidroxiprogesterona |
| ABTS | Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico copia |
| ADNasa | Enzima degradadora de ADN |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| ARNr | Ácido ribonucleico ribosomal |
| ARNasa | Enzima degradadora de ARN |
| ATZ | Atrazina |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| C | Control |
| Ct | Cycle threshold |
| CHH | Hormona hiperglucemiante de crustáceos |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| E ₂ | 17 β -estradiol |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| GIH | Hormona inhibidora de las gonadas |
| GP | Ganancia en peso |
| GS | Glándula del seno |
| GSF | Factor estimulante del desarrollo gonadal |
| GT | Ganglio torácico |

| | |
|------|--|
| IG | Índice gonadosomático |
| IH | Índice hepatosomático |
| MF | Metil farnesoato |
| MIH | Hormona inhibidora de la muda |
| MOIH | Hormona inhibidora del órgano mandibular |
| OM | Órgano mandibular |
| OX | Órgano X |
| PBS | Buffer fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| TBS | Buffer tris salino |
| Vg | Vitelogenina |
| Vn | Vitelinas |
| VgR | Receptor de vitelogenina |

INTRODUCCIÓN

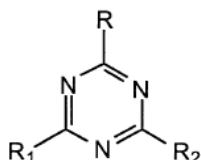
HERBICIDA ATRAZINA

Propiedades y usos

Dentro del grupo de los plaguicidas, la atrazina constituye uno de los herbicidas más utilizados a nivel mundial, pese a que en el año 2004 su uso fue prohibido en la Unión Europea y restringido en otros países por considerarlo altamente contaminante del agua potable (Sánchez-Camazano *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2013).

Actualmente, la atrazina es el segundo herbicida más utilizado en Argentina, luego del glifosato (CASAFE, 2012), siendo intensivamente aplicado para el control de malezas de hoja ancha y gramíneas anuales en cultivos de maíz, sorgo granífero y caña de azúcar (Atanor, 2012). Su principal acción es a nivel del suelo; debido a la absorción por raíz se lo suele aplicar como herbicida de pre-emergencia (Phyu *et al.*, 2011), si bien en aplicaciones post-emergentes puede actuar a nivel de follaje (Kogan, 1992). Este plaguicida actúa como un inhibidor fotosintético, afectando el transporte de electrones en el sitio receptor del fotosistema II (reacción de Hill), e impidiendo así la producción normal de ATP, NADPH y H⁺ (Fuentes, 1992). El daño producido se pone de manifiesto luego de la emergencia de los cotiledones, presentando clorosis en los ápices foliares y márgenes, lo que puede derivar en necrosis y muerte de tejidos (Kogan y Pérez, 2003). Debido a su estructura molecular (Figura 1), la atrazina no se adsorbe fuertemente a sedimentos y es poco soluble en agua, pero los excipientes agregados a las formulaciones comerciales le confieren una alta solubilidad. Este herbicida presenta una vida media de 2 a 6

meses dependiendo de las características del suelo, la concentración utilizada y las condiciones climatológicas (Jablonowski *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2017). Durante el proceso de transformación, una vez aplicado al suelo, la acción de microorganismos es tal vez el factor biótico más importante en la degradación de este herbicida (Radosevich *et al.*, 1995).



| Compuesto | R | R1 | R2 |
|----------------------------|----|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Atrazina | Cl | NHCH(CH ₃) ₂ | NHCH ₂ CH ₃ |
| Dietilatrazina | Cl | NHCH(CH ₃) ₂ | NH ₂ |
| Deisopropilatrazina | Cl | NH ₂ | NHCH ₂ CH ₃ |
| Didealquilatrazina | Cl | NH ₂ | NH ₂ |
| Hidroxiatrazina | OH | NHCH(CH ₃) ₂ | NHCH ₂ CH ₃ |
| Dietilhidroxiatrazina | OH | NHCH(CH ₃) ₂ | NH ₂ |
| Deisopropilhidroxiatrazina | OH | NH ₂ | NHCH ₂ CH ₃ |

Figura 1. Estructura química del herbicida atrazina y de sus metabolitos (Adaptado de Graymore *et al.*, 2001).

Dados los procesos de escorrentía y lixiviación, tanto la atrazina como sus metabolitos pueden alcanzar cursos de agua superficiales y subterráneos. Tal es así, que estudios previos demuestran su presencia en cuerpos de agua a concentraciones que van desde 0,1 µg/L durante la época previa a su aplicación (Vonberg *et al.*, 2014), a más de 100 µg/L luego de ser aplicada (USEPA, 2002); en agua intersticial, las concentraciones pueden ser tan elevadas como 1 mg/L (Graymore *et al.*, 2001). En Argentina, este herbicida se aplica en concentraciones que varían entre 1 y 2 kg/ha (Atanor, 2012), dentro de un área de aproximadamente 10 millones de ha (Arancibia, 2013).

Debido al crecimiento exponencial del uso de atrazina, tanto su forma parental como sus metabolitos, han sido ampliamente dispersados presentando un grado variable de persistencia y toxicidad en el ambiente (Graymore *et al.*, 2001; Loos *et al.*, 2010; Da Cunha *et al.*, 2012). Este herbicida ha sido detectado, además de en zonas cercanas a su aplicación, en agua de lluvia y marina, niebla, aire y hielo del Ártico, en todos los casos a grandes distancias de áreas urbanas y agrícolas (Chernyak *et al.*, 1996; Goolsby *et al.*, 1997; Sanusi *et al.*, 2000; Bossi *et al.*, 2002). En Argentina, existen muy pocos registros sobre los niveles de atrazina presentes en cuerpos de agua en nuestro país. En ríos del sudeste de la Provincia de Buenos Aires se han reportado concentraciones de 1,4 µg/L de este herbicida (De Gerónimo *et al.*, 2014). También, han sido detectadas concentraciones de hasta 26,9 µg/L en agua de lluvia de la región Pampeana (Alonso *et al.*, 2018).

Toxicidad sobre los organismos

Existen antecedentes que evidencian alteraciones a nivel reproductivo por exposición a formulaciones comerciales de atrazina, demostrando su capacidad para actuar como desorganizador endocrino; en el caso particular de los crustáceos se ha demostrado que dicho herbicida antagoniza el efecto de hormonas juvenoides (Palma *et al.*, 2009) y altera la diferenciación sexual en especies de cladóceros como *Daphnia sp.* (Dodson *et al.*, 1999) y la langosta *Cherax quadricarinatus* (Mac Loughlin *et al.*, 2016). Además, en estudios realizados en hembras ovígeras del cangrejo de estuario *Neohelice granulata* expuestas a atrazina, se observó un retraso en la remaduración ovárica durante el período

reproductivo y malformaciones en las larvas eclosionadas (Álvarez *et al.*, 2015); estos efectos teratogénicos también fueron observados en otros invertebrados acuáticos, tal como caracoles de agua dulce (Sawasdee y Köhler, 2009). Otros estudios demuestran que este herbicida posee la capacidad de funcionar como xenoestrógeno *in vitro* (Lascombe *et al.*, 2000; Villeneuve *et al.*, 1998); en peces y otros vertebrados, se ha reportado que la atrazina inhibe la maduración gonadal (Tillitt *et al.*, 2010), interfiere con el control hipotalámico de hormonas hipofisarias e induce la actividad de la enzima aromatasa (McKinlay *et al.*, 2008); también ha sido demostrado que puede afectar la metamorfosis en renacuajos, y causar hermafroditismo y feminización en machos de anfibios, entre otros efectos (Carr *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2006, 2010; Brodeur *et al.*, 2013, Rutkoski *et al.*, 2018).

Por otro lado, posteriormente a haber declarado a la atrazina como un compuesto no perjudicial para la salud humana en el año 2006, el comité científico de la USEPA decidió reevaluar esta decisión, debido al reporte de datos epidemiológicos que sugirieron la asociación de la exposición al herbicida con el riesgo de contraer distintos tipos de cáncer e infertilidad, y a un incremento de casos de diabetes gestacional (Fan *et al.*, 2007; Erickson, 2010).

BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE CRUSTÁCEOS

Vitelogénesis

En las hembras de crustáceos decápodos la vitelogénesis es un proceso clave para el crecimiento ovárico, involucrando la síntesis de lipoproteínas

esenciales para el desarrollo del embrión (Harrison, 1990; Quackenbush, 1991; Charmantier, 1997; Tsukimura, 2001). El mayor componente de ese material nutritivo está dado por las vitelinas (Vn) que derivan a su vez, de una lipoproteína compleja conocida como vitelogenina (Vg) (Huberman, 2000).

Es importante destacar que el sitio de síntesis de la Vg puede variar en los distintos grupos de crustáceos; en algunas especies, tales como la langosta de agua dulce *Procambarus clarkii* y el cangrejo azul *Callinectes sapidus*, se ha documentado que la síntesis de Vg ocurre principalmente dentro del mismo ovario, siendo las células foliculares las responsables de la producción de las proteínas del vitelo y de su transferencia a los oocitos (Kulkarni *et al.*, 1991; Lee y Watson, 1995). Investigaciones realizadas en otros crustáceos, entre los cuáles se cuentan varias especies de cangrejos (Paulus y Laufer, 1987), la langosta marina *Homarus americanus* (Dehn *et al.*, 1983), el camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (Sagi *et al.*, 1995) y el langostino *Penaeus monodon* (Tseng *et al.*, 2001), afirman que el hepatopáncreas es el principal sitio de vitelogénesis extraovárica, esencial para el crecimiento exponencial del ovario.

El ciclo del desarrollo oocitario comienza con una etapa de proliferación gonial, durante la cual sólo se verifica mitosis de las gonias, en un ovario aún inmaduro. A esta etapa le sigue la etapa vitelogénica que comprende a su vez dos fases: pre-vitelogénesis o también llamada vitelogénesis primaria o endógena, y vitelogénesis secundaria o exógena (Charniaux-Cotton, 1985; Kulkarni *et al.*, 1991; Abdu *et al.*, 2000; Tsukimura, 2001). Comúnmente, durante la etapa vitelogénica la acumulación de vitelo en los oocitos ocurre ya sea por síntesis en el propio ovario

(vitelogénesis endógena) o por producción en sitios extraováricos (vitelogénesis exógena), tales como el hepatopáncreas (Charniaux-Cotton, 1985; Wilder *et al.*, 2010). Desde estos sitios el vitelo es exportado hacia la hemolinfa para su posterior incorporación al ovario (Tsukimura, 2001). La Vg es incorporada por los oocitos mediante endocitosis, por medio del receptor de Vg (VgR) presente en la membrana de estas células (Wilder *et al.*, 2010). En este estadio, los oocitos se encuentran rodeados por células foliculares que también participan en la captación de Vg y que, eventualmente, pueden incluso producirla y transferirla luego a los oocitos. El citoplasma de los oocitos se carga entonces de plaquetas vitelinas, principalmente por la incorporación de la Vg extraoocitaria proveniente del hepatopáncreas o eventualmente de otro tejido (cuerpos grasos, en el caso de los peracáridos), así como desde las propias células foliculares que lo rodean. Las puestas de huevos que se producen durante el período reproductivo de los crustáceos son viables siempre que la acumulación previa de vitelogenina en los oocitos en crecimiento haya sido normal (Van Herp, 1993).

Los niveles de vitelogenina pueden emplearse, en varias especies de crustáceos, como buenos indicadores del estado reproductivo de las hembras (Huberman, 2000; Tsukimura, 2001; Tahara *et al.*, 2005). Conforme progresa la vitelogénesis, el ovario experimenta importantes cambios; varios autores han propuesto diversas escalas de desarrollo oocitario, basándose en criterios tales como el diámetro, color y tamaño de los oocitos. Más aún, a nivel histológico puede identificarse con precisión el grado de madurez ovárica en base a la observación de distintos cambios microscópicos que suceden en el órgano, tales como la relación de tamaño entre el oocito y su núcleo, y la abundancia y distribución de glóbulos

de lípidos y de vitelo (López Greco *et al.*, 1997; Ando y Makioka, 1998, Abdu *et al.*, 2000; Noro *et al.*, 2008). A su vez, el índice gonadosomático es uno de los métodos cuantitativos más utilizados para la estimación de la actividad reproductiva en varios grupos de invertebrados (Giese y Pearse, 1974), incluyendo a los crustáceos (Chu, 1995; Courtney *et al.*, 1995; Tsuchida y Watanabe, 1997). Usualmente, este índice se define como la relación porcentual entre el peso gonadal fresco y el peso fresco del animal entero. Dado que el desarrollo del ovario ocurre por un incremento en el crecimiento oocitario durante la fase de vitelogénesis secundaria, el índice gonadosomático se utiliza como un indicador de la madurez ovárica (López Greco *et al.*, 1997).

Control endocrino de la reproducción en hembras de crustáceos

En los crustáceos decápodos braquiuros, el crecimiento del ovario y la puesta de huevos ocurren durante la intermuda (Reynolds, 2002). La muda y la reproducción son los dos mayores eventos de inversión energética que involucran la movilización de reservas orgánicas, desde los depósitos de almacenamiento hacia la epidermis y diversos tejidos, respectivamente; ambos procesos poseen un importante control neuroendocrino. En particular, el crecimiento gonadal en hembras de crustáceos se encuentra estimulado por factores ambientales tales como la temperatura y el fotoperíodo (Fingerman, 1995), que a su vez disparan complejas interacciones entre diferentes componentes del sistema endocrino (Charmantier, 1997; Fingerman, 1997).

El principal componente regulatorio endocrino de los crustáceos decápodos es el complejo conocido como “órgano X - glándula del seno” ubicado en los pedúnculos oculares (Cooke y Sullivan, 1982; Fingerman, 1987) (Figura 2), que conforma un sistema neuroendocrino productor de una gran variedad de neurohormonas. En el órgano X (OX) se alojan los somas neuronales que proyectan sus axones hacia la glándula del seno (GS), donde inicialmente se almacenan y luego se secretan varias neurohormonas que controlan procesos tales como la muda, la reproducción, la dispersión de pigmentos, entre otros (Fingerman, 1997). De este modo, la GS queda definida como un órgano neurohemal que actúa como reservorio de las neurohormonas que son sintetizadas en los cuerpos o somas del OX, para que sean luego secretadas hacia la hemolinfa (Gabe, 1966; Fingerman y Nagabhushanam, 1992).

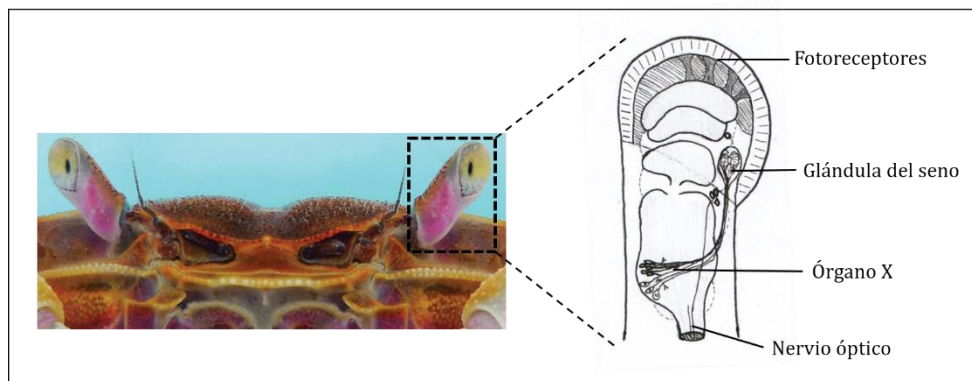


Figura 2. Esquema del sistema neuroendocrino ubicado en los pedúnculos oculares de crustáceos.

Entre la diversidad de hormonas secretadas por dicho complejo, se encuentra la hormona inhibidora de las gonadas (GIH, según sus siglas en inglés). Por medio de estudios de ablación peduncular, se estimuló una rápida maduración ovárica en hembras del camarón *Palaemon serratus*, evidenciando así la existencia

de un factor inhibitorio en los pedúnculos oculares (Subramoniam, 1999; Fingerman, 1995); posteriormente, esta técnica fue utilizada en distintas especies para estimular el crecimiento ovárico y la puesta de huevos (Makinouchi y Primavera, 1987; Stella *et al.*, 2000).

Si bien el principal blanco de la GIH serían los sitios extraováricos de síntesis de Vg (hepatopáncreas o cuerpos grasos), existe una fuerte evidencia que indica que un efecto directo de esta hormona ocurriría sobre el propio ovario, inhibiendo la captación de la Vg por parte de los oocitos (Charniaux-Cotton, 1985) o, la síntesis de Vg por el propio ovario (Van Herp, 1993; Lee y Walker, 1995). Por otro lado, la GIH junto con otras neurohormonas pedunculares tales como la hormona inhibidora de la muda (MIH), la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH) y la hormona hiperglucemiante (CHH), pertenecen a una misma familia de neuropéptidos, dada la homología observada en sus secuencias de aminoácidos (Keller, 1992, Van Herp *et al.*, 1998).

El cerebro (o ganglio cerebral) y el ganglio torácico (GT) son otras estructuras neurosecretoras que producen moléculas con actividad neurohormonal. El GT corresponde a un centro nervioso principal, derivado de la fusión de varios pares de ganglios en un cordón nervioso ventral. De acuerdo a lo propuesto por Fingerman (1997), el GT secretaría un neuropéptido denominado factor estimulante de las gonadas (GSF) que estimularía la vitelogénesis, favoreciendo, por ejemplo, la incorporación de Vg a las células foliculares que rodean al oocito, beneficiando así el crecimiento gonadal (Nagaraju, 2011). Otros

autores han propuesto que el GSF podría ser una isoforma de la CHH, expresada en la cadena ganglionar ventral (De Kleijn y Van Herp, 1998; Fanjul-Moles, 2006).

El ovario de las hembras de crustáceos también cumple una función endocrina; existen evidencias sobre la síntesis de esteroides por parte de este órgano, así como de acumulación de estas hormonas en el mismo (Thongbuakaew *et al.*, 2016; Charmantier, 1997; Fingerman, 1997). Dentro del grupo de los esteroides sexuales se encuentran los denominados “esteroides tipo vertebrados”, habiéndose identificado en crustáceos al estradiol (E_2), en su forma 17β -estradiol y a los progestágenos, en sus formas 17α -hidroxiprogesterona (17PG), 20α -hidroxiprogesterona y 6β -hidroxiprogesterona (Warrier *et al.*, 2001). La expresión de receptores y de enzimas esteroideogénicas relacionadas con la síntesis de estas hormonas fueron reportadas en el camarón *Macrobrachium rosenbergii* (Thongbuakaew *et al.*, 2016). Ciertos autores ponen en duda la existencia de la maquinaria necesaria, en invertebrados, para la síntesis de esteroides (Scott, 2018); sin embargo, son varios los estudios en los cuales fue determinada la presencia de estos esteroides así como su actividad y funcionalidad (Paolucci *et al.*, 2002; Coccia *et al.*, 2010). Se han observado correlaciones positivas entre los niveles de Vg en hemolinfa y los niveles de 17PG y E_2 circulantes, tanto en camarones como en cangrejos (Quinitio, *et al.*, 1994; Shih, 1997). Varios ensayos *in vivo* realizados en la langosta *Cherax albidus*, revelan que el E_2 y la 17PG causaron un incremento de la expresión y concentración de Vg, en función de la fase del ciclo reproductivo en que se encontraban las hembras (Coccia *et al.*, 2010); mientras que en estudios *in vitro*, se pudo observar el efecto directo de 17PG sobre el crecimiento ovárico en la especie en estudio *N. granulata* (Zapata *et al.*, 2003).

El crecimiento ovárico depende también de las prostaglandinas, cuyos niveles en ovario cambian en función del desarrollo oocitario (Tahara y Yano, 2004, 2003; Yano, 1985). Si bien hay pocos estudios realizados en crustáceos, se sabe que las prostaglandinas están involucradas en la síntesis de esteroides sexuales (Han *et al.*, 2010) y, dada su naturaleza autócrina y/o parácrina, podrían ser mediadores del efecto estimulante de 17PG y otros esteroides en el ovario.

Por otra parte, los crustáceos presentan, además del ovario, otras glándulas endocrinas no nerviosas cuyas secreciones también pueden estimular el crecimiento gonadal. Por un lado, se puede nombrar al órgano mandibular (OM) que es una glándula par que se encuentra a ambos lados del cefalotórax, cercana a la articulación entre la mandíbula y el apodema en el cual toma inserción el músculo aductor mandibular posterior (Sagi *et al.*, 1991). La principal hormona secretada por este órgano es el sesquiterpenoide metil farnesoato (MF), que es estructuralmente y funcionalmente similar a la hormona juvenil III de los insectos (Fingerman, 1995; Webster, 1998; Laufer y Biggers, 2001); su síntesis y secreción se encuentra controlada negativamente por la MOIH (Huberman, 2000; Nagaraju, 2007). El MF se encuentra asociado a la síntesis y/o captación de Vg durante la vitelogénesis secundaria (Huberman, 2000; Nagaraju, 2007). Estudios *in vitro* realizados sobre el ovario de distintas especies de crustáceos, reportan un crecimiento oocitario significativo frente a la administración de MF; tal es el caso del camarón *Penaeus vannamei* (Tsukimura y Kamemoto, 1991), el cangrejo *Oziotelphusa senex senex* (Nagaraju *et al.*, 2006) y, de las especies en estudio *N. granulata* (Zapata *et al.*, 2003) y *P. clarkii* (Rodríguez *et al.*, 2002). Los resultados

indican que este juvenoide actúa directamente sobre el ovario y probablemente también sobre el hepatopáncreas.

Otra glándula endocrina par es el órgano Y (OY). Su origen es ectodérmico, y se encuentra ubicado en el segmento maxilar de la cabeza, en posición lateroventral, por debajo de la inserción del músculo aductor externo de la mandíbula. Éste órgano sintetiza la hormona ecdisona, un ecdiesterioide que desencadena y dirige el proceso de muda, regulando de este modo el crecimiento somático (Mykles, 2011). Se ha reportado que, en varias especies de decápodos, esta hormona cumple una función importante en la regulación de la vitelogénesis, la maduración ovárica y la síntesis de proteínas, especialmente en aquellas especies en las cuáles la muda y la puesta de huevos son eventos próximos en el tiempo (Subramonian, 2000; Nagaraju, 2011). La síntesis de ecdiesteroides por el OY se encuentra regulada negativamente por la MIH, secretada por el complejo órgano X - glándula del seno (Chang *et al.*, 1993; Fingerman y Nagabhusanam, 1997; Huberman, 2000)

En la Figura 3 se esquematiza de manera integral y a modo de resumen de esta sección, el control endocrino involucrado en la regulación del proceso de vitelogénesis en hembras de crustáceos decápodos.

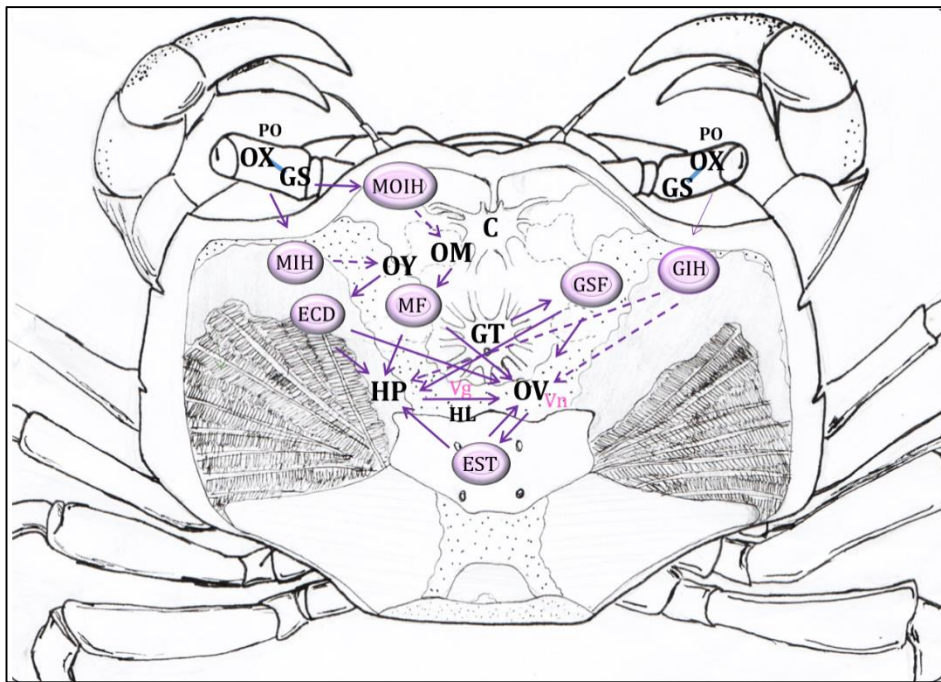


Figura 3. Control endocrino de la reproducción en hembras de crustáceos. PO: pedúnculo ocular, OX: órgano X, GS: glándula del seno, OM: órgano mandibular, C: cerebro, GT: ganglio torácico, HP: hepatopáncreas, OV: ovario, HL: hemolinfa, GIH: hormona inhibidora de las gonadas, GSF: factor estimulante de las gonadas, MOIH: hormona inhibidora del órgano mandibular, ECD: ecdiesteroides, MF: metil farnesoato, EST: esteroides, Vn: vitelinas y Vg: vitelogenina. Las flechas continuas indican secreciones y efectos estimulatorios y las flechas punteadas indican efectos inhibitorios. Adaptado de Rodríguez et al. (2007) y Nagaraju (2011).

ESPECIES EN ESTUDIO

❖ *Neohelice granulata*

Distribución y hábitat

La especie *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata* (Dana, 1851) pertenece taxonómicamente al grupo de crustáceos del orden Decapoda, infraorden Brachyura, superfamilia Grapsidae y familia Varunidae. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de la Costa Atlántica de Sudamérica, en

ambientes estuariales de Argentina y Brasil, siendo particularmente abundante en las costas de la Bahía Samborombón. En esta bahía desembocan importantes cursos de agua, como los ríos Salado y Samborombón, y varios canales artificiales (Figura 4).

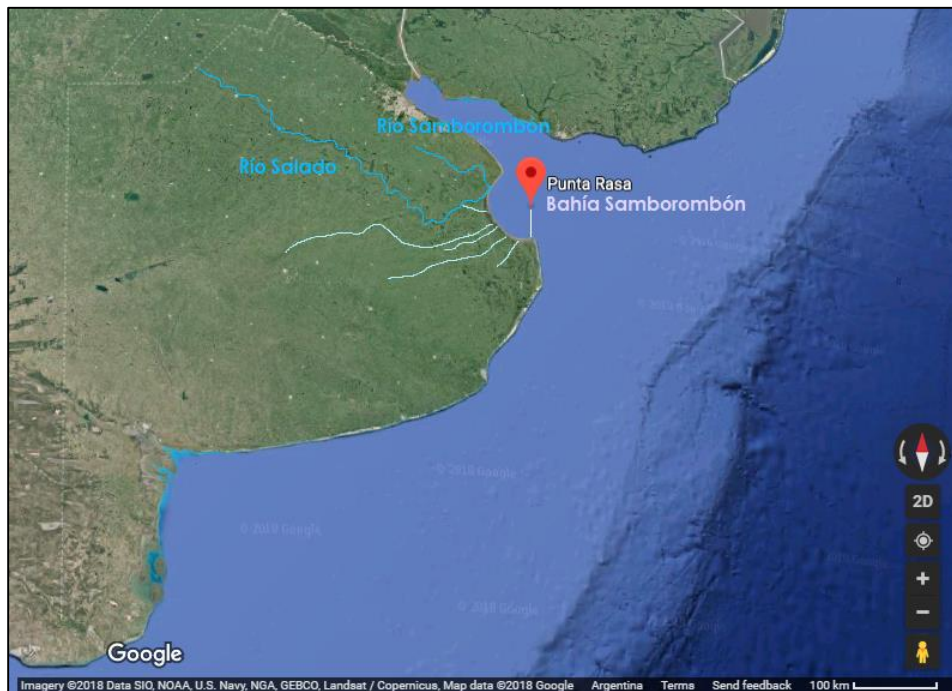


Figura 4. Cursos de agua de la Bahía Samborombón, provincia de Buenos Aires. En color celeste se observan los ríos Salado y Samborombón; en color blanco, mencionados en dirección norte-sur, los canales 15, 9, A, 1 y la ría de Ajó. Imagen de elaboración propia a partir de Google Earth.

Particularmente, la zona externa del estuario contiene aguas salobres de salinidad variable según las mareas, los vientos predominantes y los aportes de agua dulce de la cuenca. El clima que predomina en la región es templado-húmedo, y las temperaturas oscilan entre los 10 y 25 °C a lo largo del año (Urien, 1972). La costa de la Bahía Samborombón está formada en su franja intermareal por sedimento fangoso, en el cual predomina el limo arcilloso y la arcilla; estos sedimentos constituyen el sustrato propicio para el asentamiento de una

comunidad de organismos denominada “cangrejal” (Cabrera, 1953; Urien, 1972) (Figura 5).



Figura 5. Cangrejal situado en Punta Rasa en la Bahía Samborombón, provincia de Buenos Aires.

En la zona supralitoral del cangrejal, *N. granulata* convive con el cangrejo violinista *Uca uruguayensis*, mientras que la zona infralitoral se encuentra habitada por la especie *Cyrtograpsus angulatus*. La construcción de cuevas en el fango por parte de los cangrejos le confiere características especiales al suelo del cangrejal, mejorando la aireación, el aumento del drenaje y el reciclado de nutrientes (Botto e Irigoyen, 1972). Este comportamiento posibilita el crecimiento y distribución de la vegetación halófila típica del estuario del Río de la Plata, que contribuye a la formación del detrito que integra los sedimentos de la bahía, siendo la principal vía de flujo de energía entre los organismos autótrofos y heterótrofos del estuario. La fauna abarca una gran cantidad de aves tales como cisnes, gansos, gaviotas y

flamencos, y una importante riqueza ictícola destacándose el pejerrey (*Odontesthes sp.*), la lisa (*Mugil liza*), la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) y negra (*Pogonias chromis*), el lenguado (*Paralichthys orbignianus*) y la pescadilla real (*Macrodon ancylodon*); entre los mamíferos acuáticos, los principales representantes son las nutrias, los carpinchos, los delfines y las toninas.

Problemática ambiental

Entre los años 2001 y 2011, el mercado de agroquímicos en nuestro país experimentó una expansión de gran magnitud, incrementando el consumo de 73 a 236 millones de kg por año (CASAFE, 2012). Más del 30% de la producción de maíz a nivel nacional se encuentra concentrada en la provincia de Buenos Aires (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, SIIA, 2012) y, a su vez, algunas zonas próximas al curso del río Salado presentan niveles de producción elevados respecto del total de la provincia; como ser el caso de las localidades de Junín (7,67%), Lincoln (15,25 %), Bragado (6,26%) y 25 de Mayo (10,37%). Por este motivo, resulta esperable encontrar elevadas concentraciones de herbicidas, en particular de atrazina, en la Bahía Samborombón (Figura 6).

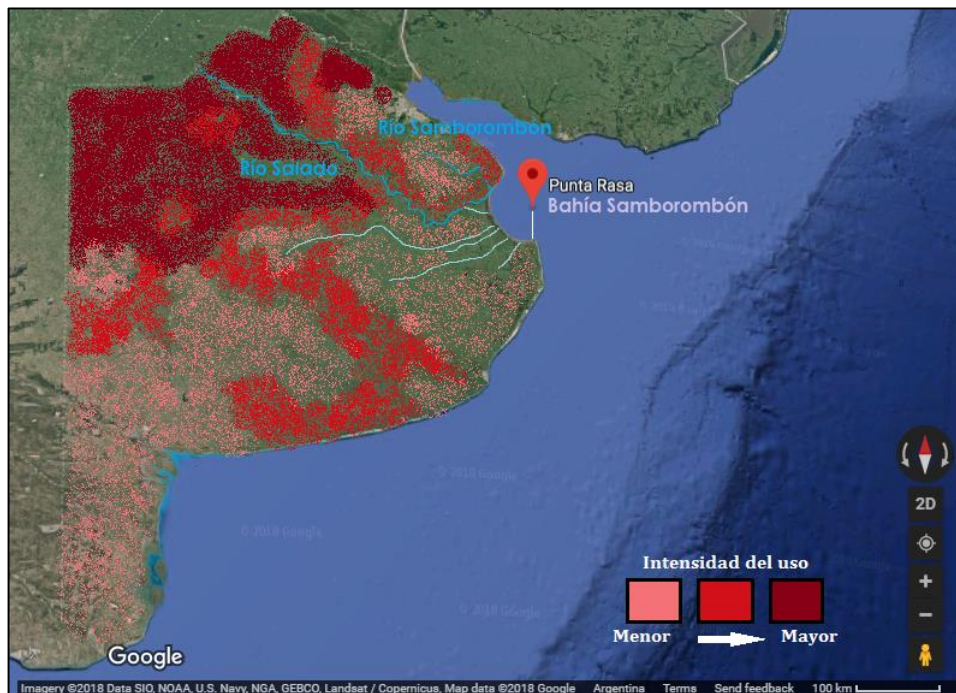


Figura 6. Uso estimado de agroquímicos en campos de cultivo de la provincia de Buenos Aires. El color rojo más intenso implica una mayor utilización de agroquímicos. Imagen de elaboración propia a partir de Google Earth, adaptada de Colombo y Sarandón (2015).

Las cuevas en los cangrejales de la bahía actúan como trampas pasivas de sedimento, detritos, herbicidas y otros plaguicidas, ya que las mismas permanecen abiertas durante las crecidas (Menone *et al*, 2004; Escapa *et al*, 2008). Dado que los niveles más elevados de atrazina presentes en cuerpos de agua se registran durante la primavera tardía e inicios del verano (Thurman *et al.*, 1991), los mismos coinciden con el período reproductivo de *N. granulata*, que comprende varias puestas y remaduraciones del ovario (López Greco y Rodríguez, 1999); de este modo, la presencia del herbicida podría afectar un proceso clave para la supervivencia de esta especie.

Biología general de la especie

Como particularidades morfológicas, la especie *N. granulata* (Figura 7) presenta un cefalotórax deprimido dorsoventralmente, de superficie rugosa con regiones bien marcadas, y con un profundo surco central y anterior que divide a la región frontal en dos; también exhibe un borde anterolateral con dos dientes (espinas) no muy pronunciados que sobresalen levemente del contorno general del caparazón.



Figura 7. Ejemplar hembra de la especie *Neohelice granulata*.

Estos cangrejos presentan dimorfismo sexual, siendo el macho de mayor tamaño que la hembra, con quelas notoriamente de mayor tamaño, que presentan además pequeñas protuberancias o granulaciones dispuestas irregularmente, dedos lisos y el borde interno dentado. Los adultos alcanzan una talla de unos 3 a 5 cm de ancho de caparazón y su coloración suele variar según la alimentación,

aunque generalmente el dorso del mismo es gris pardo, las quelas y pereiópodos son más claros, y ventralmente suelen ser rosados.

La especie se encuentra perfectamente adaptada a la vida fuera del agua ya que sus branquias están encerradas en cámaras branquiales, que les permiten conservar una cierta cantidad de agua para el intercambio gaseoso (Péqueux, 1995). Estos cangrejos presentan una dieta omnívora-detritívora, predominando en su alimentación restos de plantas halófitas, detritos, diversos invertebrados y algas unicelulares; eventualmente, pueden practicar el canibalismo o comportarse como carroñeros, alimentándose de ejemplares de su misma especie o de otras, tales como peces y aves (Oliver *et al.*, 1972; Spivak, 2010). Este tipo de hábito alimenticio otorga a la especie una gran importancia ecológica, dada su ubicación en la cadena trófica, en la cual participa como vector de transferencia de energía desde el ambiente semi-terrestre al acuático, siendo, por ejemplo, un componente importante en la dieta de peces de interés comercial como la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) (Sánchez *et al.*, 1991) o como parte de la alimentación de aves costeras migratorias, como es el caso de la gaviota (*Larus atlanticus*) y el ostrero pardo (*Haematopus palliatus*) (Martinetto *et al.*, 2007).

Ciclo reproductivo

La biología reproductiva de *N. granulata* ha sido bien caracterizada. El ciclo reproductivo anual comprende tres períodos claramente diferenciables: pre-reproductivo (invierno), reproductivo (primavera-verano) y post-reproductivo (otoño). Durante el período pre-reproductivo se verifica el crecimiento ovárico en

las hembras, previo a la época de desove (Zapata *et al.*, 2003), en términos de síntesis e incorporación de Vg como componente precursor del vitelo, esencial para la puesta normal de huevos y para el desarrollo posterior de los embriones (López Greco y Rodríguez, 1997, 1999). Durante el período reproductivo se verifica la mayor frecuencia de apareamientos; la fecundación es interna, pudiendo la hembra almacenar los espermatozoides hasta el momento de la fecundación de los huevos. Además, cada hembra puede desovar hasta tres o cuatro veces durante este período (López Greco y Rodríguez, 1999). Una vez producido el desove (huevos fecundados), la hembra incuba los huevos adheridos a sus pleópodos durante 20 a 30 días, y finalizado el tiempo de incubación, migra hacia zonas del estuario donde la temperatura y la salinidad son adecuadas para la eclosión y supervivencia de las larvas; la cantidad de huevos maduros desovados y de larvas eclosionadas se encuentra en el orden de los 30.000 por hembra (Botto e Irigoyen, 1979). Se ha observado que la coloración de los huevos desovados varía según el grado de desarrollo, desde el violeta al pardo-amarillento, variando también el diámetro máximo entre 0,36 y 0,42 mm (Botto e Irigoyen, 1979).

En los braquiuros, la eclosión de las larvas de un mismo desove se produce en forma sincrónica y, como se ha visto en otras especies de cangrejos, existe una relación entre el desove, la eclosión, el ciclo lunar y las mareas. En el caso de *N. granulata*, la eclosión tiene mayormente lugar entre el cuarto creciente y la luna llena (López Greco y Rodríguez, 1999). Durante los 15 a 20 días posteriores a la eclosión, se suceden cuatro estadios larvales (zoea I a IV; Boschi *et al.*, 1967); la zoea IV sufre una metamorfosis hacia larva megalopa, que finalmente regresa a la costa donde muda al primer estadio juvenil, el cual posee las patas locomotoras

bien desarrolladas. Este cangrejo juvenil, coloniza el ambiente costero adecuando las estructuras encargadas de la osmorregulación; ya en el estuario, continúa mudando hasta alcanzar la madurez sexual, y el tamaño y la condición de adulto al término de unos dos a tres años (López Greco y Rodríguez, 1996).

En la Figura 8 se esquematiza el ciclo de vida completo de la especie.

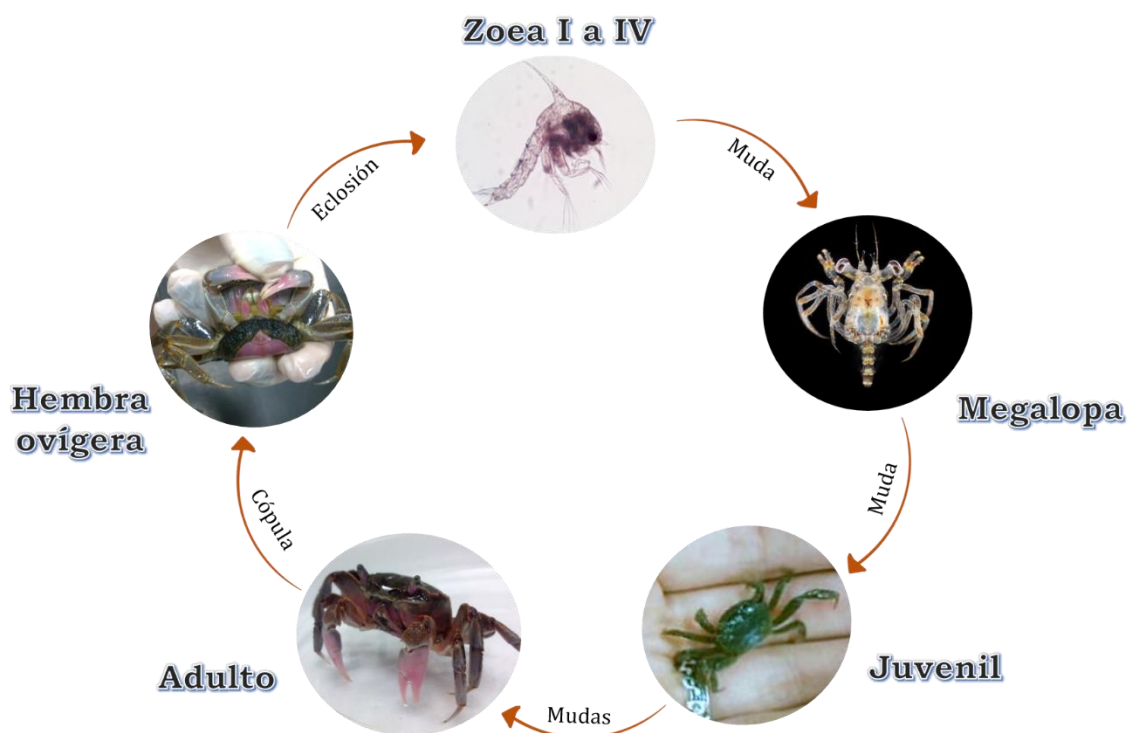


Figura 8. Ciclo de vida del cangrejo de estuario *Neohelice granulata*.

Finalmente, durante el período post-reproductivo el ovario permanece inactivo o quiescente; en esta época ocurre en los animales adultos el proceso de muda, mediante el cual los cangrejos crecen en tamaño.

La especie como modelo de estudio

Debido a la tolerancia de los adultos de *N. granulata* a un amplio rango de salinidades, que van desde el agua dulce hasta condiciones hipersalinas, y también a su tolerancia a condiciones hipóxicas, la especie se convirtió en un modelo estándar para estudios de adaptaciones fisiológicas y bioquímicas en ambientes de transición (Spivak, 2010).

Algunos de los aspectos de la biología de *N. granulata* que han sido estudiados se encuentran relacionados con el crecimiento (D'Incao *et al.*, 1993), la reproducción (Stella *et al.*, 1996; López Greco y Rodríguez, 1999), el desarrollo embrionario y larval (Rieger y Nakagawa, 1995; Zapata *et al.*, 2001; Lavolpe *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2015), el metabolismo (Cervino *et al.*, 1995), el control hormonal (Santos y Colares, 1986; Santos y Stefanello, 1991), la neurofisiología, el comportamiento y la ecología de la especie (Maldonado, 2002; Bianchini *et al.*, 2008; Fanjul *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009); y en particular, ha sido utilizado como modelo de estudio para investigaciones previas que evaluaron los efectos de plaguicidas y otros contaminantes sobre la reproducción y la osmorregulación (Medesani *et al.*, 2004; Rodríguez y Pisanó, 1993; Rodríguez Moreno *et al.*, 2003; Beltrame *et al.*, 2011, Avigliano *et al.*, 2018). Además, esta especie es representativa de la biología reproductiva de los denominados “crustáceos superiores” o malacostracos, que incluyen otras formas tales como langostas, camarones y anfípodos. En particular, el ovario de *N. granulata*, presenta características similares a las de otros cangrejos braquiuros y ha mostrado ser un

buen órgano indicador del daño histopatológico por efecto de contaminantes (Rodríguez *et al.*, 1994; Álvarez *et al.*, 2015; Avigliano *et al.*, 2018).

Por otro lado, la especie presenta grandes ventajas para el trabajo experimental, debido a su fácil muestreo, mantenimiento y supervivencia en condiciones de laboratorio debido a su tamaño, ciclo reproductivo y elevado potencial reproductivo. Las densas poblaciones de *N. granulata*, particularmente en Punta Rasa, garantizan su disponibilidad durante todo el año, sin que su utilización para fines experimentales afecte el equilibrio poblacional.

❖ *Procambarus clarkii*

Distribución y hábitat

La langosta de agua dulce *Procambarus clarkii* (Girard, 1852), es una especie oriunda de la cuenca del Misisipi que se ha expandido e invadido extensas áreas en Estados Unidos debido a su gran capacidad de adaptación, tolerancia y alta tasa reproductiva (Figura 9). Esta especie ha sido introducida en diversos países como Francia, España, Japón, Hawái, República Dominicana y países del este de África, por ser objeto de un importante uso en la industria alimenticia, siendo una especie muy apreciada gastronómicamente, lo cual ha llevado a que se cultive de forma tanto intensiva como extensiva. Actualmente es la langosta de agua dulce más extendida en el mundo; debido a esto, su introducción ha llegado a causar cambios drásticos en la composición de la flora nativa y en las comunidades de animales (Schleifstein y Fedeli, 2003).

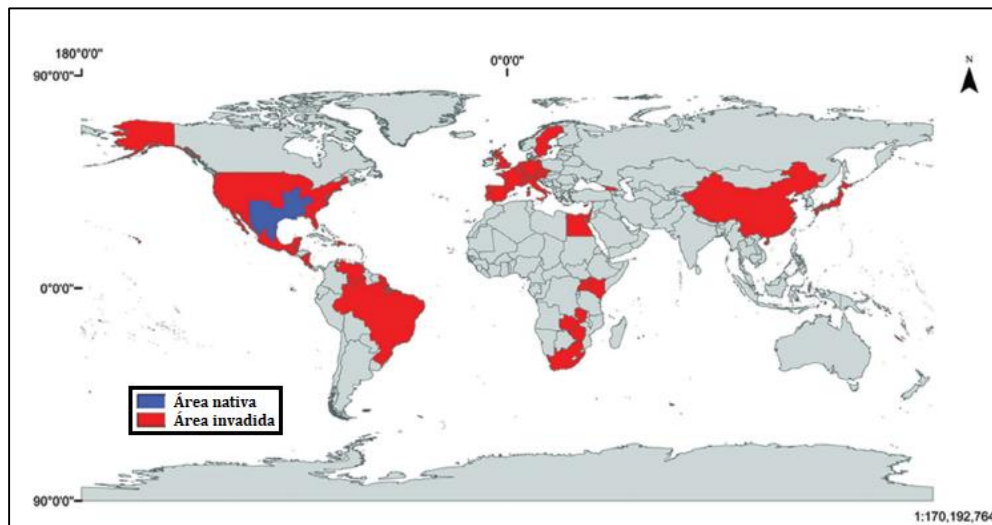


Figura 9. Distribución nativa e invasiva de *Procambarus clarkii* en el mundo. Adaptado de Loureiro *et al.* (2015).

Esta especie se encuentra tanto en ambientes de agua dulce lénticos y lóticos, como ser arroyos, pantanos, acequias, ciénagas, estanques de fondos y orillas fangosas de hojarasca con mucha materia orgánica, donde habitualmente realizan galerías durante las temporadas secas. Comúnmente habita zonas con densa vegetación, especialmente entre raíces y rizomas de la vegetación de ribera (Girard, 1852). Es una especie de fácil adaptación, capaz de colonizar numerosos lugares fuertemente antropizados, tales como estanques en parques e infraestructuras hidráulicas. De este modo, tiene el potencial de servir como nueva fuente de alimento en los ecosistemas invadidos (Savini *et al.*, 2010); en Europa, se ha reportado que las grandes densidades de *P. clarkii* llevaron a un aumento en la cantidad de garzas y cormoranes (Gherardi y Barbaresi 2000; Rodríguez *et al.* 2005).

Problemática ambiental

El Delta del río Misisipi abarca alrededor del 65% de todas las áreas agrícolas en Estados Unidos, y su calidad de agua ha sido monitoreada desde 1995 para evaluar el impacto de los herbicidas y plaguicidas utilizados en las prácticas agrícolas (Moore *et al*, 2007). El herbicida atrazina es uno de los plaguicidas más utilizados en ese país (Rebich *et al*, 2004; Weiner y Sandheinrich, 2010) (Figura 10), aplicándose alrededor de 22 millones de kg por año (Graziano *et al*, 2006; USEPA, 2002); ha sido, además, el más frecuentemente encontrado en los cuerpos de agua dulce monitoreados (Gilliom *et al*, 2006; Benotti *et al*, 2009).

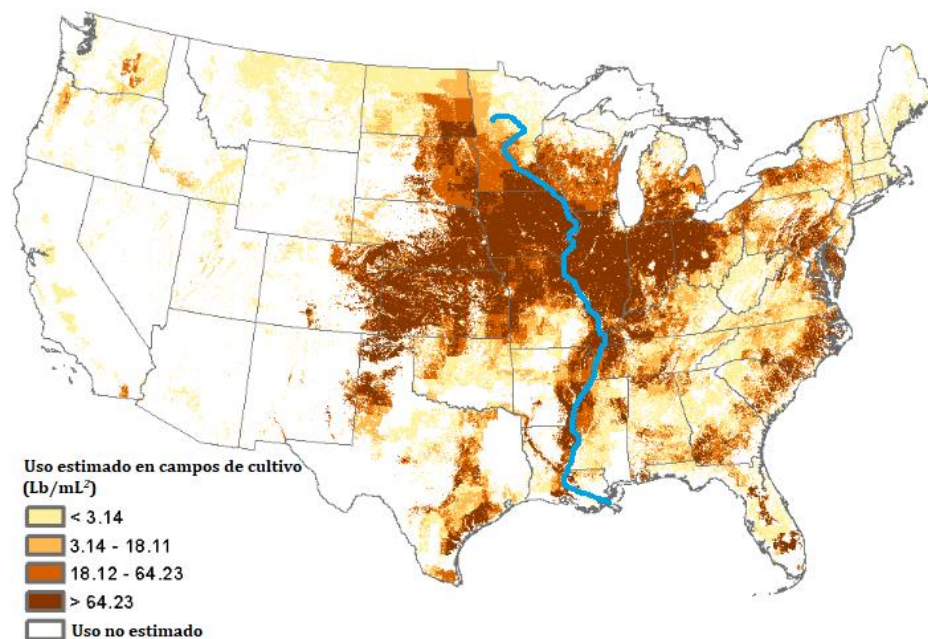


Figura 10. Uso estimado de atrazina (lb/mL²) en campos de cultivo de Estados Unidos.

En color celeste se observa el río Misisipi. Adaptado de USGS (2016).

En estudios realizados en la Cuenca del Misisipi, se ha demostrado la presencia de atrazina en el 97% de las muestras de agua recolectadas (Rebich *et al.*, 2004); además, se pudo determinar que entre los diferentes herbicidas detectados en el río Misisipi, la atrazina era transportada en mayores concentraciones en comparación con los restantes plaguicidas (Clark y Goolsby, 2000). Otros estudios sugieren que las concentraciones frecuentemente detectadas pueden presentar riesgos tanto para los seres humanos como para otros organismos, y constituir una seria amenaza para el medio ambiente (Wu *et al.*, 2010).

Los criaderos de *P. clarkii* en Louisiana se encuentran estrechamente relacionados con el cultivo de arroz (Huner y Barr, 1991); debido a esto, la especie es comúnmente expuesta a una variedad de herbicidas y plaguicidas utilizados de rutina en este cultivo; sin embargo, no se ha reportado hasta la fecha suficiente información que avale o demuestre un efecto de la atrazina sobre esta especie de crustáceo.

Biología general de la especie

La langosta *P. clarkii* (Figura 11) comparte las características generales del orden Decapoda; taxonómicamente pertenece al infraorden Astacidae, superfamilia Parastacoidea y familia Cambaridae. Presenta un cefalotórax convexo y rugoso, con un rostro estrecho y alargado hacia la base del mismo, con espinas marginales cerca del extremo. Sus quelas presentan varias hileras de tubérculos y

espinas, y la boca de su quelípedo se encuentra bien definida, con una saliente particular en el carpopodito (Arrignon, 1985). La variación de color de esta especie puede deberse a cambios fisiológicos en los estadios juveniles, donde predomina el color marrón verdoso, que luego se transforma al rojo oscuro característico de los adultos.



Figura 11. Ejemplar hembra de la especie *Procambarus clarkii*.
Cortesía de Gerard Lacz.

La especie presenta un marcado dimorfismo sexual; los machos tienen el primer par de pleópodos modificado en dos órganos copuladores, con los que deposita el esperma en un receptáculo seminal que se encuentra en el esternum de las hembras y próximo a los gonoporos, en el cual puede permanecer viable durante varios meses o hasta que la hembra realice una muda (Mingorance y Gómez, 2002); este dimorfismo sexual no se aprecia hasta que los ejemplares alcanzan una talla aproximada de 3,5 cm. El crecimiento de esta especie se encuentra determinado por factores tales como la disponibilidad del alimento, la calidad del agua y la temperatura. De este modo, los adultos pueden alcanzar una longitud total de 20 cm (Holdich, 1999).

Estas langostas son omnívoras, pero también pueden comportarse como detritívoras; cerca del 20% de la dieta consiste en anélidos, insectos, huevos de peces, y materia orgánica relativamente inerte (Huner y Meyers, 1979). En su hábitat natural han sido clasificados como carnívoros obligados, lo que significa que pueden subsistir a partir de materia orgánica vegetal, pero requieren alguna forma de materia orgánica animal en su dieta para su óptimo crecimiento y salud.

La especie ocupa una posición importante en la estructura trófica de los ambientes invadidos, interactuando con los diferentes niveles y generando cambios sustanciales en el funcionamiento del ecosistema (Dorn y Wojdak, 2007).

Ciclo reproductivo

La langosta *P. clarkii* es considerada una especie con estrategia “r”, es decir, con un ciclo de vida corto y una alta tasa de fecundidad (ISSG, 2011).

La especie presenta una alta frecuencia de cópulas entre fines de mayo y principio de junio (Huner y Barr, 1984). El apareamiento ocurre en aguas abiertas hacia fines de la primavera, cuando el nivel del agua es elevado; para que la cópula sea efectiva, los machos deben ser del mismo tamaño o levemente mayores que las hembras, ya que éste debe manipularla, dejándola en posición ventral, para depositar su espermatóforo en el receptáculo seminal de la hembra. Luego de la cópula, o de un intento de la misma, es posible que los ejemplares presenten mutilación de alguno de sus apéndices (Ameyaw-Akumfi, 1981).

Las hembras de *P. clarkii* desovan hacia fines del verano y durante todo el otoño; los oocitos se fecundan en su tránsito por los oviductos, ya que sincrónicamente se produce la rotura del espermatóforo y posterior liberación de los espermatozoides. En un primer momento, los huevos quedan sueltos, y expuestos a cualquier alteración que eventualmente puede generar que la puesta se pierda (Sukô, 1958); casi inmediatamente, la hembra secreta una sustancia pegajosa de color blanquecino a través de unas glándulas situadas en la cara ventral de sus urópodos, que en poco tiempo hace posible que los huevos fecundados queden adheridos a los pleópodos o apéndices abdominales (Mingorance y Gómez, 2002).

Una vez con la puesta adherida a su cuerpo, la hembra busca refugio y prácticamente no se alimenta, mostrando una conducta muy agresiva cuando otros ejemplares se acercan. El número de huevos varía generalmente entre los 100 y 700, según el tamaño de la hembra, la densidad de la población de la especie, y la temperatura del agua (Alcorlo *et al.*, 2008). Durante el período de incubación del desove, la hembra oxigena y limpia los huevos fecundados con movimientos del abdomen y los urópodos. A lo largo del desarrollo embrionario, se observa un cambio secuencial en la coloración del huevo que progresa del verde oliva al violeta y luego al marrón.

La especie presenta un desarrollo de tipo directo, el crecimiento larvario tiene lugar en el interior del huevo y luego de la eclosión emergen crías con morfología similar a la de una langosta adulta. Además, como ya se mencionó más

arriba, existe una clara diferencia de coloración entre los juveniles y los ejemplares adultos (Mingorance y Gómez, 2002). El tiempo que tardan en eclosionar los huevos es muy variable, siendo de aproximadamente 40 días, dependiendo básicamente de la temperatura. Por lo general, esta especie presenta un mínimo de 11 mudas desde el estadio juvenil al adulto; esto suele tomar de 3 a 9 meses, dependiendo de las condiciones ambientales, calidad del agua y temperatura, siendo estos últimos dos factores los más limitantes (Reynolds, 2002, Avault y Hunner, 1993).

En la Figura 12 se esquematiza el ciclo de vida completo de la especie.



Figura 12. Ciclo de vida de la langosta de agua dulce *Procambarus clarkii*.

La especie como modelo de estudio

La langosta *P. clarkii* ha sido considerada como especie modelo para una gran variedad de estudios debido a que, al igual que la especie *N. granulata*, es representativa de la biología de la mayoría de los crustáceos decápodos. Por esta razón, la biología reproductiva de esta especie se encuentra extensamente estudiada. Por ejemplo, el ciclo del ovario de esta langosta ha sido completamente caracterizado por Kulkarni *et al.* (1991).

Por otro lado, debido a su gran adaptación y tolerancia y a su capacidad de habitar una amplia gama de ambientes acuáticos, junto con su importancia económica, *P. clarkii* se ha convertido en un importante organismo modelo en la investigación sobre infecciones virales (Chen *et al.*, 2013), comportamiento animal (Tattersall *et al.*, 2012) y estrés ambiental (Tan *et al.*, 2012); también ha sido utilizada en actividades de control biológico (Correia y Anastácio, 2008).

Existen varios trabajos en los cuales se ha estudiado la bioacumulación de metales pesados en diferentes tejidos y órganos de esta especie, así como estudios en los cuales se ha considerado a *P. clarkii* una especie centinela para la obtención de biomarcadores de toxicidad (Alcorlo *et al.*, 2006; Goretti *et al.*, 2016). Además, se ha observado que la exposición a plaguicidas, como el glifosato, altera parámetros relacionados con la tasa metabólica y las reservas energéticas (Frontera *et al.*, 2014).

OBJETIVO GENERAL

El **objetivo general** del trabajo consistió en evaluar los efectos del herbicida atrazina, a concentraciones subletales, sobre la reproducción y su control endocrino en crustáceos decápodos.

Cada uno de los objetivos específicos se desarrolla en los próximos capítulos de la presente tesis, junto con las hipótesis pertinentes.

CAPÍTULO I

“Evaluación *in vivo* del efecto del herbicida atrazina sobre el crecimiento ovárico, en el cangrejo de estuario *Neohelice granulata*.”

HIPÓTESIS

A continuación, se plantean las hipótesis de trabajo que fueron puestas a prueba experimentalmente en hembras adultas de *N. granulata*:

- a. *El herbicida atrazina, en su formulación comercial (Gesaprim 90 WDG®) y en el formulado experimental, reduce la proporción de oocitos maduros y el tamaño oocitario.*
- b. *El herbicida atrazina, en su formulación comercial (Gesaprim 90 WDG®) y en el formulado experimental, reduce el contenido total de proteínas vitelogénicas presentes en el ovario y hepatopáncreas, así como los niveles circulantes de vitelogenina.*
- c. *El herbicida atrazina, en su formulación comercial (Gesaprim 90 WDG®) y en el formulado experimental, reduce los niveles normales de las principales reservas energéticas.*
- d. *El formulado comercial de atrazina (Gesaprim 90 WDG®) interfiere sobre el control endocrino del crecimiento ovárico, alterando el efecto de neurohormonas secretadas desde los pedúnculos oculares.*

Se realizaron dos experimentos *in vivo* a fin de corroborar las hipótesis planteadas, cuyos correspondientes objetivos específicos se detallan a continuación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Experimento in vivo I

Evaluar mediante ensayos *in vivo* los efectos subletales del herbicida atrazina sobre el crecimiento oocitario, el contenido total de proteínas vitelogénicas y los niveles de las principales reservas energéticas, en hembras adultas de *N. granulata*, durante el período pre-reproductivo.

Experimento in vivo II

Identificar posibles interferencias del herbicida atrazina sobre el control endocrino ejercido por neurohormonas secretadas desde los pedúnculos oculares, en hembras adultas de *N. granulata*, durante el período pre-reproductivo.

METODOLOGÍA

Condiciones generales de experimentación

A fin de poner a prueba las hipótesis planteadas, se utilizó una metodología enmarcada dentro de los lineamientos para bioensayos toxicológicos con animales acuáticos, establecidos por varias organizaciones internacionales competentes en el tema (APHA, 2005). En todos los experimentos, se respetó el código de ética para experimentación animal, establecido por la Declaración de Helsinki.

Muestreo y aclimatación de los animales

Los ensayos fueron realizados durante el período pre-reproductivo (invierno), en el cual se verifica el crecimiento ovárico de las hembras previo a la época de desove (Zapata *et al.*, 2003). Para llevar a cabo los experimentos, las hembras de *N. granulata* fueron recolectadas a campo en el cangrejal ubicado en Punta Rasa, provincia de Buenos Aires (36° 18' 16,5" S -56° 46' 18,6" O, extremo sur de la Bahía Samborombón), contando con la colaboración de los grupos de investigación del Instituto de Fisiología y Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE - FCEN - UBA). Dicha zona es considerada libre de contaminación por estar ubicada en la boca del estuario, dónde la dilución con agua de mar es muy significativa. Los animales fueron trasladados en acuarios de plástico rectangulares con agua del sitio de recolección y con acceso a respiración aérea hasta el laboratorio. Durante el período de aclimatación, de dos semanas de duración, los

animales fueron alimentados y mantenidos en los acuarios con refugios artificiales y aireación constante.

Ensayos in vivo

Una vez finalizado el período de aclimatación, se registró el peso inicial de cada animal empleando una balanza digital Ohaus® (precisión: $\pm 0,01$ g), asignándose al azar los animales a cada tratamiento. En ambos experimentos, cada hembra fue aislada en un recipiente de vidrio de 13 cm de diámetro y 1 L de capacidad, conteniendo 400 mL de agua de dilución, a fin de trabajar con unidades experimentales independientes (Figura 13). Eventualmente, una alícuota de la solución stock del herbicida fue agregada al agua de dilución, en los tratamientos correspondientes. Como agua de dilución (presente en todos los recipientes, incluyendo el tratamiento control) se utilizó agua salina preparada a partir de sales artificiales para agua de mar “Tetra Marine Salt Pro” (Tetra®), y agua de red declorada mediante estacionamiento (dureza: 80 mg/L como equivalentes de CaCO_3). Previamente el agua de red fue tratada mediante una serie de filtros (Hidroquil®), a saber: de lana de vidrio (para material en suspensión), carbón activado (para trazas de compuestos orgánicos) y resina de intercambio iónico (para trazas de metales pesados).



Figura 13. Hembras de *N. granulata* colocadas en frascos de vidrio durante el ensayo in vivo, bajo condiciones controladas de fotoperíodo, temperatura, pH y aireación.

Los ensayos se llevaron a cabo a 25 ± 1 °C de temperatura, con un fotoperíodo de 14:10 hs (luz:oscuridad), salinidad final de 12 g/L, pH del agua= $7,6 \pm 0,5$ y aireación constante. Dichas condiciones fueron establecidas sobre la base de numerosos estudios previos realizados en esta especie estuarial (Medesani *et al.*, 2004; Rodríguez y Pisanó, 1993; Rodríguez Moreno, 2003; Álvarez *et al.*, 2015).

Diseño experimental

A partir de una formulación comercial en gránulos del herbicida atrazina (Gesaprim 90 WDG[®], lote: 084, inertes y humectantes no declarados), que contiene un 90% del principio activo, se preparó semanalmente una solución stock a partir de una solución madre concentrada de 2 g/L del formulado en agua bidestilada. Por otro lado, además de la solución mencionada, se preparó una formulación experimental, a partir del principio activo de atrazina (pureza del 96%, lote: 25-372, IPESA S.A.[®]), disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) en una relación 1:25 p/v, dado que el principio activo puro posee baja solubilidad en agua. Las concentraciones utilizadas fueron establecidas a partir de un ensayo preliminar que tuvo como finalidad determinar los niveles de atrazina que crónicamente provocaron efectos letales significativos.

Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones semi-estáticas, con renovación del medio dos veces a la semana; las hembras fueron alimentadas mediante una dieta consistente en un formulado estandarizado. La composición pormenorizada de la dieta utilizada se indica en la Tabla 6 como anexo (ver Anexo: *Composición de la dieta base*). El alimento balanceado fue manufacturado en el laboratorio mediante un dispositivo extrusor, y secado en estufa a 60 °C durante 24 hs, a fin de obtener una consistencia firme y estable en agua durante al menos 3 hs. La cantidad de alimento suministrado se ajustó al 2% de la biomasa/día y cada pieza de alimento (pellet) fue fraccionada idénticamente a fin de obtener un peso seco de entre 0,12 y 0,14 g y una longitud de 1 cm por unidad.

Complementariamente, tres veces por semana se suministraron pequeñas ramas de la planta acuática *Elodea sp* a todos los grupos.

Validación de concentraciones nominales

A fin de validar las concentraciones nominales a las cuales se expusieron los animales, se tomaron muestras de 15 mL del agua de los recipientes a tiempo 0 y 72 hs de realizado el recambio del medio, para estimar la máxima variación de las concentraciones de exposición. Tales muestras fueron analizadas en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA) perteneciente al Departamento de Química de la Universidad de la Plata. Para esto, las muestras fueron filtradas por membrana de nylon de 0,45 μm y los filtrados fueron analizados por cromatografía líquida (HPLC) acoplada a un detector de espectrometría de masas de cuádruplo (modelo VL - Agilent®). Se utilizó una columna de X-SELECT C18 de 75 x 4,6 mm, usando como fase móvil una mezcla de ACN: fórmico (0,1%) a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. Los iones se generaron en una fuente ESI, en modo positivo, operando por monitoreo del ión selectivo (SIM) para los iones protonados $[\text{M-H}]^+$ y los fragmentos derivados de la relación isotópica de cloro $m/z = 216, 218, 174$ y 176 . Como control de calidad analítico se utilizó un trazador isotópico de ATZ- ^5D siguiendo sus iones característicos $m/z = 221$ y 223 . Todos los iones monitoreados son los recomendados por el United States Geological Survey (USGS). Finalmente, para la cuantificación se aplicó el método del estándar externo en condiciones idénticas de análisis que las muestras.

➤ **Experimento *in vivo* I**

Para evaluar el efecto *in vivo* de atrazina, tanto del formulado comercial como del formulado experimental, se realizaron dos ensayos que comprendieron, cada uno de ellos, tres meses de duración de modo de abarcar el período pre-reproductivo completo.

Para cada ensayo se utilizaron hembras adultas de *N. granulata*, con un peso promedio de $12,07 \pm 0,14$ g, asignándose al azar entre 10 y 15 animales a cada tratamiento. Las concentraciones nominales del principio activo de las formulaciones de atrazina ensayadas fueron 0,05 mg/L; 0,5 mg/L y 5 mg/L, quedando definidos los siguientes grupos experimentales:

- **C:** hembras control, sin agregado del herbicida, con o sin vehículo de dilución.
- **0,05 ATZ:** hembras expuestas a 0,05 mg/L del formulado comercial o del formulado experimental de atrazina.
- **0,5 ATZ:** hembras expuestas a 0,5 mg/L del formulado comercial o del formulado experimental de atrazina.
- **5 ATZ:** hembras expuestas a 5 mg/L del formulado comercial o del formulado experimental de atrazina.

Obtención de muestras biológicas

Al finalizar el ensayo, se registró el peso fresco de cada animal empleando una balanza digital Ohaus® (precisión: $\pm 0,01$ g), y se les extrajo una muestra de hemolinfa de entre 100 y 200 μL , mediante aguja 27G y jeringa de tuberculina, desde la base del 4º o 5º par de pereiópodos (patas caminadoras). Cada muestra fue recogida en un tubo eppendorf conteniendo 15 μL de oxalato de potasio al 10% y el inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,01 mM, en una relación 3:1 (v/v), a fin de evitar la coagulación de la hemolinfa y la degradación de las proteínas presentes en la misma. A continuación, los animales fueron anestesiados sumergiéndolos completamente en un baño de agua fría a 0 °C durante 5 min, para posteriormente ser sacrificados. Utilizando bisturí y pinza de disección, se obtuvieron las muestras de ovario, hepatopáncreas, y músculo de las quelas y se registraron los pesos frescos de los órganos empleando una balanza digital Ohaus® (precisión: $\pm 0,0001$ g). Las muestras fueron guardadas en tubos eppendorf y conservadas a -20 °C, hasta su posterior procesamiento, a fin de determinar diversas variables incluidas en el listado que se indican a continuación.

Variables analizadas

❖ Supervivencia, porcentaje de hembras ovígeras y eventos de muda

Durante el ensayo, los animales fueron inspeccionados diariamente, registrándose la fecha de muda, su condición (ovígera/no ovígera), o eventual

muerte. Los individuos que murieron durante el experimento fueron descartados y al finalizar el ensayo se determinaron los porcentajes de supervivencia, de hembras ovígeras y de hembras que mudaron.

❖ *Ganancia en peso e índices gonadosomático y hepatosomático*

Con los datos del peso fresco de todos los animales y los pesos frescos de sus respectivos ovarios y hepatopáncreas, se calculó la ganancia en peso (GP) y los índices gonadosomático (IG) y hepatosomático (IH), según las siguientes fórmulas:

- **GP** = (peso final / peso inicial) x 100.
- **IG** = (Peso fresco gonadal / peso fresco corporal) x 100.
- **IH** = (Peso fresco hepatopancreático / peso fresco corporal) x 100.

❖ *Reservas energéticas*

a) Niveles de glucógeno en tejidos y órganos

Los niveles de glucógeno fueron determinados en las muestras de músculo y hepatopáncreas de cada hembra mediante el método de Van Handel (1965), modificado para la especie en estudio. Se tomaron fragmentos de 40 a 80 mg de los tejidos y órganos extraídos al finalizar el ensayo, que fueron colocados en tubos de ensayo con 0,4 mL de KOH al 30%. Más tarde, los tubos fueron incubados en un baño térmico a 100 °C durante 2 hs. Una vez retiradas las muestras del baño, se

dejaron enfriar en hielo. A continuación, se agregaron dos gotas de Na_2SO_4 saturado para precipitar el glucógeno. Posteriormente, se agregaron 0,9 mL de etanol 96%, y se centrifugaron los tubos utilizando una centrífuga modelo CM 2036 (Rolco®), durante 10 min a 3.500 rpm. Finalizada la centrifugación, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 0,3 mL de agua bidestilada, tomándose 0,1 mL de cada muestra y adicionado 0,1 mL de HCl 4 N para hidrolizar el glucógeno en moléculas de glucosa. Se preparó posteriormente una curva de calibración (0 a 0,2 mg/mL) a partir de diluciones de una solución estándar de glucógeno de 5 mg/mL como patrón; tanto la curva como las muestras fueron neutralizadas con Na_2CO_3 . Finalmente, la concentración de glucógeno en los tejidos fue cuantificada como glucosa, mediante el método de la glucosa oxidasa, utilizando un kit colorimétrico (Wiener Lab®), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las absorbancias de las muestras fueron medidas por duplicado en un espectrofotómetro MQII (Zeiss®), a una longitud de onda de 505 nm.

b) Niveles de glucosa en hemolinfa

Los niveles de glucosa fueron determinados tomando 20 μL de las muestras de hemolinfa extraídas al finalizar el ensayo, mediante el método de la glucosa oxidasa recién mencionado (kit de Wiener Lab®). Las absorbancias de las muestras fueron medidas por duplicado en un espectrofotómetro MQII (Zeiss®) a una longitud de onda de 505 nm.

c) Niveles de lípidos en tejidos y órganos

Los lípidos totales presentes en las muestras de músculo y hepatopáncreas fueron determinados realizando la extracción de lípidos mediante el método de Folch (1957). Para esto, se tomaron fragmentos de los tejidos y órganos extraídos al finalizar el ensayo, que fueron pesados y homogeneizados adicionando un volumen de 20 mL por g de tejido de una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 (v/v); los homogenatos fueron mantenidos en tubos de vidrio a 4 °C, durante 24 hs. Posteriormente, cada muestra fue filtrada y recolectada en tubos cónicos graduados para la medición del volumen resultante. Luego, se agregó solución fisiológica fría al 0,9% en una relación 1:5 (v/v) con respecto al volumen resultante. A continuación, las muestras fueron centrifugadas utilizando una centrífuga modelo CM 2036 (Rolco®) durante 10 min a 2.000 rpm; la fase superior de las muestras fue descartada y se registró el volumen resultante. Se repitieron los últimos pasos agregando solución fisiológica y centrifugando, sin descartar la fase superior. Luego, los tubos fueron conservados a 4 °C por 24 hs. Transcurrido este tiempo, se retiró la fase superior y se tomaron 20 µL de cada muestra para realizar el dosaje y la cuantificación de lípidos totales por el método de Frings y Dunn (1970). Las muestras fueron incubadas a 100 °C en baño térmico, durante 10 min. A continuación, los tubos se dejaron enfriar en hielo y se agregaron 2,5 mL de solución de vainillina a cada muestra. Finalmente, se preparó una curva de calibración (0 a 0,2 mg/mL) utilizando aceite de oliva de 1 mg/mL como patrón. Las absorbancias de las muestras fueron medidas por triplicado empleando un espectrofotómetro MQII (Zeiss®), a una longitud de onda de 530 nm.

d) Niveles de proteínas en tejidos y órganos

La concentración de proteínas presentes en el músculo de las quelas y en el hepatopáncreas fue determinada mediante el método de Lowry (1951). Para realizar la extracción, se tomaron fragmentos de 40 a 80 mg del hepatopáncreas extraído al finalizar el ensayo, que fueron colocados en tubos de ensayo con 0,4 mL de KOH al 30%. Más tarde, los tubos fueron incubados en un baño térmico a 100 °C durante 2 hs. Para proceder con la determinación de proteínas, se tomaron 20 µL de cada muestra que fueron colocados en un nuevo tubo de ensayo; a continuación, se prepararon los reactivos A, B y C (ver Anexo: *Recetas*). Siguiendo con el protocolo, se adicionaron 2 mL del Reactivo C a todos los tubos, incubando las muestras durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 0,2 mL de Folin 1N, incubando durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se preparó una curva de calibración (0 a 0,2 mg/mL) utilizando seroalbúmina bovina (BSA; Sigma Chemical Co.®) a 1 mg/mL como patrón. La absorbancia de cada muestra fue medida en un espectrofotómetro MQII (Zeiss®), a una longitud de onda de 650 nm.

❖ *Contenido total de proteínas vitelogénicas*

El contenido total de proteínas vitelogénicas (Vg y Vn) en las muestras de ovario, hepatopáncreas y hemolinfa provenientes de los ensayos *in vivo*, fue determinado mediante la técnica inmunoenzimática ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) de tipo indirecto.

Con el fin de desarrollar un bioensayo sensible y específico, se realizó una purificación de la lipoproteína vitelogenina (Vg) para la posterior obtención del anticuerpo primario anti-Vg, a partir de ovarios maduros de *N. granulata* (ver Anexo: *Purificación de la lipoproteína vitelogenina para la posterior obtención del anticuerpo primario anti-vitelogenina*). Para llevar a cabo la purificación y la obtención del anticuerpo primario, se trabajó en colaboración con el Dr. Carlos Fernando García, perteneciente al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP - CONICET), dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de La Plata. Luego de la puesta a punto de la técnica, se procedió a la medición de las muestras obtenidas en los ensayos.

Procesamiento de muestras de ovario y hepatopáncreas

Para la determinación del contenido total de proteínas vitelogénicas, las piezas de ovario y hepatopáncreas fueron cortadas en fragmentos de entre 0,1 y 0,2 g y homogeneizados en buffer fosfato de sodio conteniendo inhibidor de proteasas PMSF (0,01 mM) en una relación 1:3 (p/v). Cada homogenato resultante fue centrifugado utilizando una centrífuga modelo EPF-12R (Presvac®) a 10.000xg durante 25 min a 4 °C. Finalizada la centrifugación se descartó el pellet, y el sobrenadante obtenido fue llevado a un volumen final de 5 mL con solución de buffer fosfato salino (PBS) 1X para ser ultracentrifugado a 100.000xg durante 50 min a 4 °C, utilizando una ultracentrífuga modelo XL-90 (Beckman Coulter®) con rotor 90Ti. Los sobrenadantes resultantes (fracción citosólica) fueron conservados en tubos Khan a -80 °C, hasta su posterior análisis. Tanto en las muestras de

ovario y hepatopáncreas, como en las de hemolinfa, se determinó el contenido total de proteínas vitelogénicas presentes mediante la técnica inmunoenzimática ELISA.

Técnica inmunoenzimática ELISA

Las muestras fueron diluidas en buffer coating, en una relación 1:3 (p/v) para el ovario y hepatopáncreas, y 1:10 (v/v) para la hemolinfa. La curva estándar de Vg (0 a 270 ng) fue preparada a partir de una solución de Vg purificada de ovario de *N. granulata*, diluida 1:1000. A continuación, se sembraron por triplicado 50 µL de cada concentración de la curva, así como 50 µL de cada muestra, en placas de 96 pocillos (PolySorp®).

La primera incubación de las muestras se realizó en cámara húmeda durante 90 min a 37 °C. Una vez finalizada, se descartó el contenido total de las placas y se realizó un lavado agregando 300 µL de PBS 1X por pocillo. A continuación, se procedió al bloqueo de sitios inespecíficos con 300 µL de PBS 1X, conteniendo leche descremada en polvo (Sancor®) al 6%. Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Transcurrido este período, se realizaron tres lavados con PBS-Tween al 0,05%. Luego, se adicionó a cada pocillo un volumen de 50 µL del anticuerpo primario anti-Vg de *N. granulata*, en una dilución 1:4000, realizada en PBS-Tween al 0,05% conteniendo leche descremada en polvo al 6%. Las placas fueron incubadas durante 2 hs a 37 °C en cámara húmeda, y transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados sucesivos de cada placa con PBS-Tween al 0,05%. A continuación, se adicionó a cada pocillo un volumen de 50 µL del anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado con HRP

peroxidasa (Bio-Rad laboratories®) en una dilución 1:2000 para las muestras de hepatopáncreas y 1:3000 para las muestras de ovario y hemolinfa, en PBS-Tween al 0,05% conteniendo leche descremada en polvo al 6%. La incubación de las placas con el anticuerpo secundario se realizó en cámara húmeda durante 2 hs a 37 °C. Finalizada esta incubación, se efectuaron cuatro lavados con PBS-Tween al 0,05%, colocando a continuación en cada pocillo 100 µL de solución de revelado, con ABTS como cromógeno, e incubando luego durante 15 min a temperatura ambiente. Por último, la reacción colorimétrica se detuvo mediante el agregado de 100 µL por pocillo de ácido oxálico al 2%. Las absorbancias de las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro Optima FLUOstar (BMG LabTech®), a una longitud de onda de 420 nm.

Para el cálculo de los niveles finales de Vg en las muestras analizadas, se utilizó una fórmula que integra el algoritmo de la curva de calibración de la Vg (ng/µL y absorbancia obtenida en nm) con la lectura de absorbancia para cada una de las muestras, la lectura del blanco, la dilución de las muestras y la concentración sembrada por placa. Tanto en las muestras de ovario como de hepatopáncreas, el contenido de Vg se expresó en µg/g o µg/órgano, mientras que para las muestras de hemolinfa la concentración de Vg se expresó en ng/µL.

❖ **Tamaño y proporción de los oocitos**

Una porción del ovario de cada hembra fue procesada mediante técnicas histológicas de rutina (López Greco *et al.*, 1997), para determinar bajo microscopio

óptico el estadio de maduración ovárica y los posibles efectos histopatológicos por exposición al herbicida. Para esto, al finalizar el ensayo las piezas de ovario fueron fijadas en solución de Bouin (ver Anexo: *Recetas*), deshidratadas luego en una serie de alcoholes en graduación creciente y aclaradas en xilol. Posteriormente, las piezas fueron incluidas en parafina (Paraplast®) y se realizaron cortes de aproximadamente 5 a 8 μm de espesor, empleando un ultramicrótomo de rotación modelo RM2125 RTS (Leica®). Finalmente, los cortes fueron coloreados con hematoxilina-eosina. Se decidió realizar cortes histológicos únicamente de los ovarios provenientes de hembras expuestas a la concentración más alta de atrazina (5 mg/L) basándose en los resultados obtenidos al analizar las variables medidas previamente del *Experimento in vivo I*.

Se seleccionó una porción representativa de cada corte del ovario, por animal, a fin de determinar tanto la proporción relativa de los diferentes tipos oocitarios, como el área de los mismos, utilizando un microscopio óptico modelo CX-31 (Olympus®). Los oocitos se caracterizaron como pre-vitelogénicos, intermedios o vitelogénicos según su tamaño y grado de basofilia. Para evaluar las proporciones, se analizaron tres secciones en cada corte del ovario de cada hembra, mediante una cuadrícula de 100 puntos montada sobre un lente ocular de 8x combinado con un lente objetivo de 40x. Para determinar el tamaño oocitario a partir del área, se estimó tanto el diámetro mayor (M) como el diámetro menor (m), sólo de los oocitos en los cuales podía observarse su núcleo a fin de minimizar el sesgo dado por el nivel de corte. Las mediciones se realizaron utilizando una regla micrométrica calibrada contra una placa con 1/100 mm de separación (Leitz

Wetzlar®). Al igual que en estudios previos (Rodríguez y Medesani, 1994), se calculó el área de los oocitos según la siguiente fórmula: $\text{Área} = (\pi / 4) \times M \times m$.

➤ **Experimento *in vivo* II**

El segundo experimento realizado comprendió un mes de duración, dentro del período pre-reproductivo de la especie. Se utilizaron hembras adultas de *N. granulata* con un peso promedio de $11,60 \pm 0,03$ g, a las cuales se les ablacionó uno o ambos pedúnculos oculares dependiendo del tratamiento. Para esto, los animales fueron anestesiados sumergiéndolos completamente en un baño de agua fría a 0 °C durante 5 min y a continuación, utilizando tijera y pinza de disección, se procedió a la ablación de los pedúnculos oculares en su articulación con el cefalotórax. Una vez realizada la ablación, se cauterizó la herida mediante un soldador eléctrico de punta fina. A continuación, se asignaron al azar entre 10 y 15 animales a cada tratamiento. La concentración nominal del principio activo del formulado comercial de atrazina ensayado fue de 5 mg/L; se decidió utilizar ésta concentración basándonos en los resultados obtenidos en el *Experimento in vivo I*, quedando definidos los siguientes grupos experimentales:

- **C:** hembras control, sin agregado del herbicida.
- **5 ATZ:** hembras expuestas a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina.
- **C-UNI:** hembras control, sin agregado del herbicida, con ablación de un pedúnculo ocular.
- **5 ATZ-UNI:** hembras expuestas a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina, con ablación de un pedúnculo ocular.

- **C-BI:** hembras control, sin agregado del herbicida, con ablación de ambos pedúnculos oculares.
- **5 ATZ-BI:** hembras expuestas a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina, con ablación de ambos pedúnculos oculares.

Obtención de muestras biológicas

Al finalizar el ensayo (día 30), se registró el peso fresco de cada animal empleando una balanza digital Ohaus® (precisión: $\pm 0,01$ g). Más tarde, los animales fueron anestesiados sumergiéndolos completamente en un baño de agua fría a 0 °C durante 5 min, para posteriormente ser sacrificados. A continuación, utilizando bisturí y pinza de disección, se extrajo el ovario de cada animal y se registró el peso fresco del órgano mediante una balanza digital Ohaus® (precisión: $\pm 0,0001$ g). Las muestras fueron guardadas en tubos eppendorf y conservadas a -20 °C, hasta su posterior procesamiento, a fin de determinar diversas variables incluidas en el listado que se indican a continuación.

Variables analizadas

❖ *Contenido total de proteínas vitelogénicas*

El contenido total de proteínas vitelogénicas presentes en el ovario fue determinado mediante la técnica ELISA, siguiendo el mismo protocolo detallado para el *Experimento in vivo I* (ver Metodología: *Contenido total de proteínas vitelogénicas*).

❖ **Tamaño y proporción de los oocitos**

Una porción del ovario de cada hembra fue procesada mediante técnicas histológicas de rutina, para determinar bajo microscopio óptico el estadio de maduración ovárica y los posibles efectos histopatológicos por exposición al herbicida, siguiendo con el mismo protocolo detallado en el *Experimento in vivo I* (ver Metodología: *Tamaño y proporción de los oocitos*).

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo*, se emplearon los programas R Studio (versión 3.5.0) y GraphPad Prism (versión 5.0). A fin de comparar entre grupos experimentales las variables registradas, se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, seguido de comparaciones múltiples, o bien, el Test *T* de Student (Sokal y Rohlf, 1981), dependiendo del experimento, teniendo en cuenta que se hubieran cumplido previamente los supuestos correspondientes. En caso de no cumplirse el supuesto de homogeneidad, se modelaron las varianzas para corregir la falta de homocedasticidad utilizando el paquete “nlme” en R (Pinheiro *et al.*, 2013). Todas las comparaciones *a posteriori* fueron realizadas mediante el test de Tukey. Los porcentajes de mortalidad, mudas y hembras ovígeras fueron comparados entre tratamientos (como proporciones), mediante el Test Exacto de Fisher (Sokal y Rohlf, 1981). En todos los casos el nivel de confianza utilizado fue del 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Validación de concentraciones nominales

El análisis de las muestras de agua correspondientes a tiempo 0 y 72 hs, permitió verificar que las concentraciones nominales de atrazina inicialmente definidas se encontraban próximas al promedio de las concentraciones medidas, a los dos tiempos considerados. Algunas de las mediciones muestran niveles sensiblemente menores, y esto es debido a posibles interacciones del herbicida tanto con elementos del sistema (por ejemplo, el vidrio), como con las sales presentes en el agua de dilución. Esta interacción inicial (tiempo 0) puede desaparecer a lo largo del ensayo debido a modificaciones generadas por la presencia del animal en el medio, que altera las condiciones del agua (Marino, comunicación personal) (Tabla 1).

| [ATZ] nominal (mg/L) | Tiempo (hs) | [ATZ] formulado comercial (mg/L) | [ATZ] formulado experimental (mg/L) |
|----------------------|-------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| 0 (control) | 0 | 0,00 | 0,00 |
| | 72 | 0,00 | 0,00 |
| 0,05 | 0 | 0,02 | 0,02 |
| | 72 | 0,07 | 0,03 |
| 0,5 | 0 | 0,35 | 0,13 |
| | 72 | 0,22 | 0,23 |
| 5 | 0 | 2,93 | 1,64 |
| | 72 | 2,80 | 2,82 |

Tabla 1. Concentraciones nominales del formulado comercial y del formulado experimental de atrazina (ATZ), en comparación con las concentraciones validadas medidas en muestras de agua a tiempo 0 y 72 hs.

➤ **Experimento in vivo I**

❖ ***Supervivencia, porcentaje de hembras ovígeras y eventos de muda***

Al término del *Experimento in vivo I* no se detectó una mortalidad significativa ($p > 0,05$) en las hembras expuestas durante tres meses, tanto al formulado comercial como al formulado experimental de atrazina, en comparación con el tratamiento control (Tablas 2 y 3). Esto fue consistente con los resultados esperados, ya que se utilizaron concentraciones de atrazina que habían demostrado ser subletales en ensayos piloto. En cuanto al porcentaje de mudas y de hembras ovígeras, tampoco fueron detectadas diferencias significativas ($p > 0,05$) en los tratamientos con atrazina con respecto al grupo control.

| [ATZ] formulado comercial (mg/L) | N _i | N _f | Mortalidad (%) | Mudas (%) | Ovígeras (%) |
|----------------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------|--------------|
| 0 (control) | 15 | 12 | 0 | 0 | 20 |
| 0,05 | 15 | 11 | 6,67 | 0 | 20 |
| 0,5 | 15 | 9 | 13,33 | 6,67 | 20 |
| 5 | 15 | 7 | 33,33 | 6,67 | 13,33 |

Tabla 2. Supervivencia (porcentaje de mortalidad), porcentaje de mudas y porcentaje de hembras ovígeras registrado en los diferentes grupos experimentales al finalizar el ensayo. N_i= número de individuos al comienzo del ensayo. N_f= número de individuos utilizados al finalizar el ensayo para la medición de las diferentes variables, excluyendo las hembras muertas y en condición de ovígera.

| [ATZ] formulado experimental (mg/L) | N _i | N _f | Mortalidad (%) | Mudas (%) | Ovígeras (%) |
|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------|--------------|
| 0 (control) | 11 | 9 | 9,09 | 0 | 9,09 |
| 0,05 | 13 | 10 | 15,38 | 0 | 7,69 |
| 0,5 | 13 | 10 | 15,38 | 0 | 7,69 |
| 5 | 15 | 8 | 40 | 6,67 | 0 |

Tabla 3. Supervivencia (porcentaje de mortalidad), porcentaje de mudas y porcentaje de hembras ovígeras registrado en los diferentes grupos experimentales al finalizar el ensayo. N_i= número de individuos al comienzo del ensayo. N_f= número de individuos utilizados al finalizar el ensayo para la medición de las diferentes variables, excluyendo las hembras muertas y en condición de ovígera.

❖ **Ganancia en peso**

Si bien se observaron variaciones en la ganancia en peso determinada en las hembras expuestas a ambos formulados de atrazina, los valores obtenidos no

presentaron diferencias significativas ($p>0,05$) en comparación con el grupo control (Figura 14).

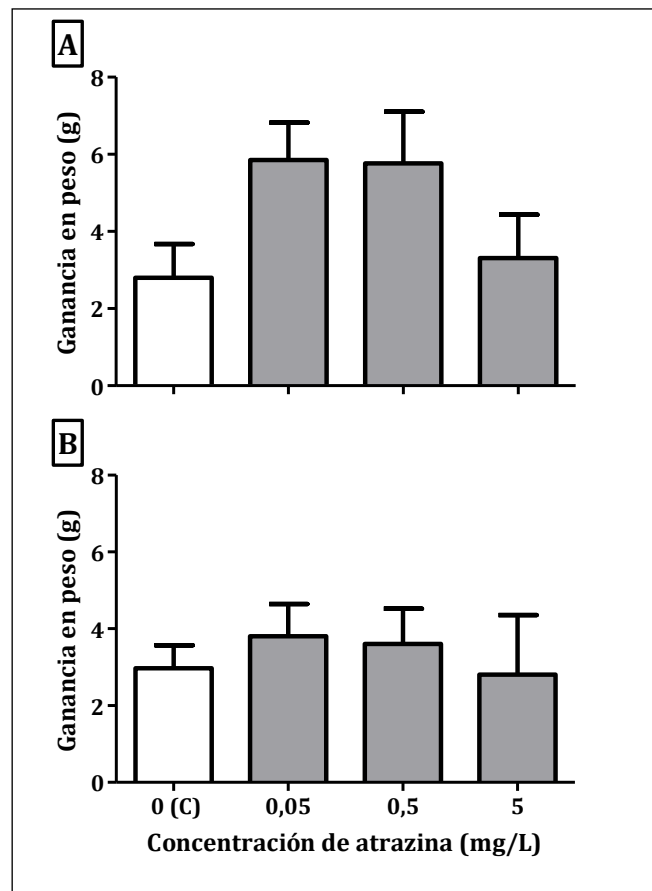


Figura 14. Ganancia en peso (g) en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

❖ Índices gonadosomático y hepatosomático

La Figura 15.A muestra una clara tendencia al descenso del IG a medida que la concentración del formulado comercial de atrazina aumenta. Si bien no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, en las hembras expuestas a la concentración más alta del formulado comercial se observa una disminución del IG de aproximadamente el 50% en comparación con el control.

En cuanto a las hembras expuestas al formulado experimental de atrazina (Figura 15.B), el IG se mantuvo en valores similares a los registrados en el grupo control.

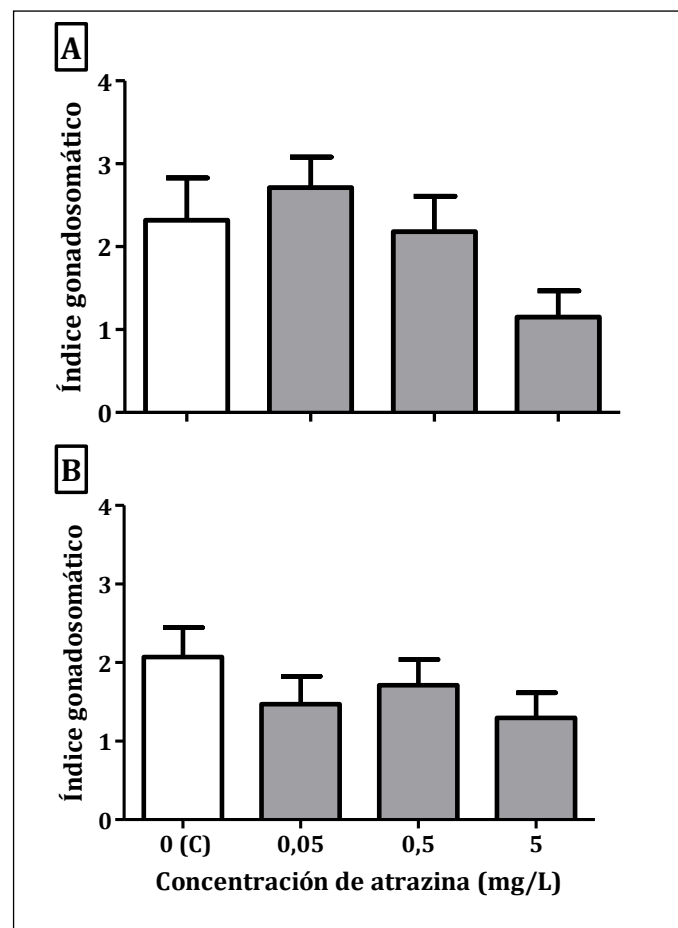


Figura 15. Índice gonadosomático calculado en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo *in vivo*. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

Con respecto al IH, los valores en los animales expuestos tanto al formulado comercial como al formulado experimental, fueron similares a los observados en los animales control, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (Figura 16).

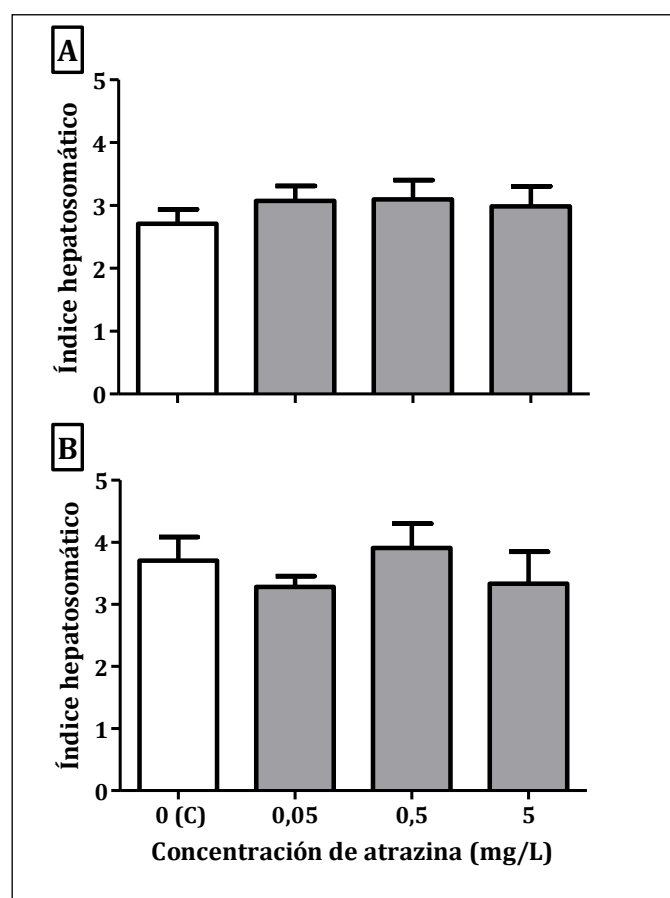


Figura 16. Índice hepatosomático calculado en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

❖ *Reservas energéticas*

a) Niveles de glucógeno en tejidos y órganos

Los niveles de glucógeno determinados en el músculo de la quela de las hembras expuestas a las tres concentraciones del formulado comercial de atrazina, presentaron una disminución significativa ($p < 0,05$) con respecto al control (Figura 17.A). Por el contrario, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los niveles de glucógeno determinados en el músculo de la quela de las hembras

expuestas al formulado experimental de atrazina, con respecto al tratamiento control (Figura 17.B).

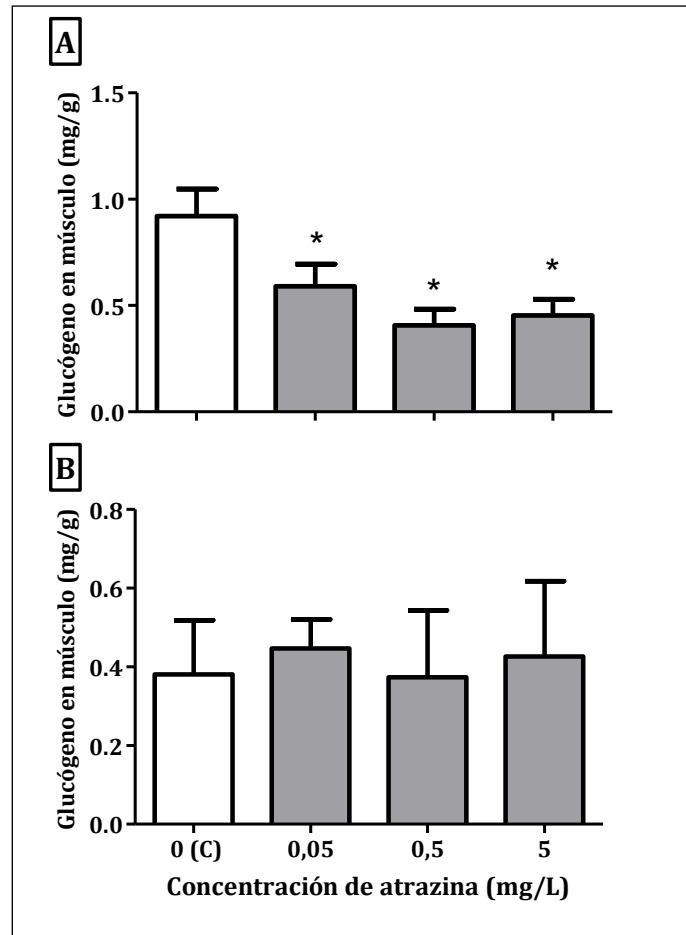


Figura 17. Niveles de glucógeno (mg/g) en el músculo de la quela en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

En cuanto al hepatopáncreas, si bien se observó un descenso en los niveles de glucógeno a la concentración más alta del formulado comercial de atrazina, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al tratamiento control (Figura 18.A). Por otro lado, los valores en los animales expuestos al

formulado experimental (Figura 18.B), fueron similares a los observados en los animales control, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

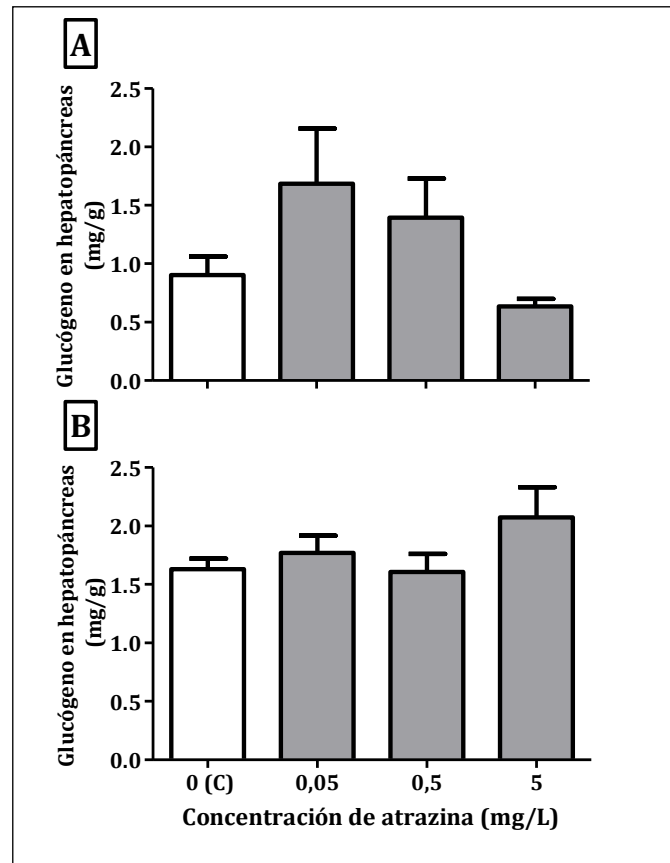


Figura 18. Niveles de glucógeno (mg/g) en el hepatopáncreas en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

b) Niveles de glucosa en hemolinfa

Al analizar el nivel de glucosa en hemolinfa, se observó una tendencia al descenso en aquellas hembras expuestas al formulado comercial de atrazina (Figura 19.A), no detectándose, sin embargo, diferencias significativas ($p>0,05$).

Tampoco se observaron diferencias en el caso de las hembras expuestas al formulado experimental, en comparación con el control ($p > 0,05$) (Figura 19.B).

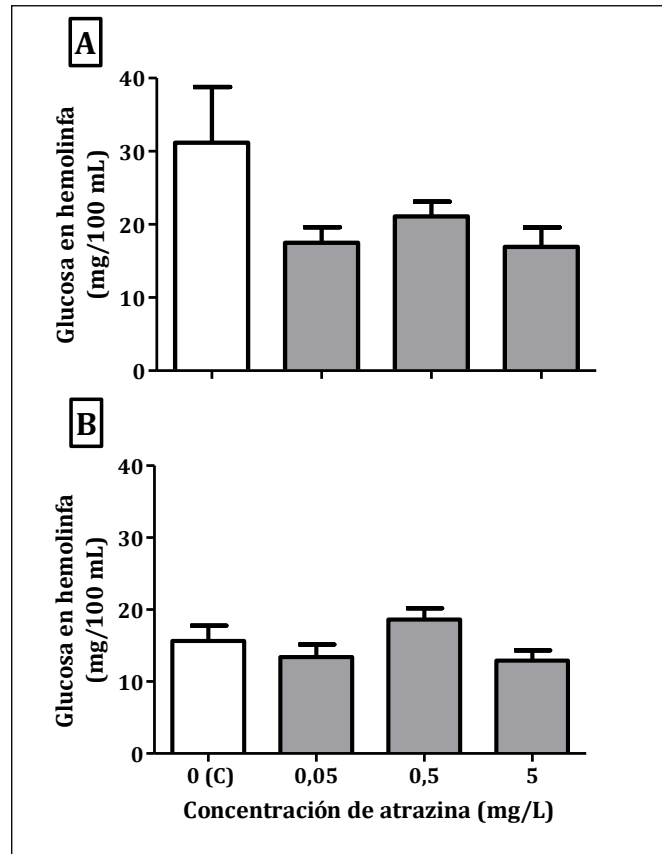


Figura 19. Niveles de glucosa hemolinfática (mg/100 mL) en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

c) Niveles de lípidos en tejidos y órganos

Al medir los niveles de lípidos tanto en músculo de la quela como en el hepatopáncreas (Figuras 20.A y 21.A), observamos una leve tendencia a la disminución de esta reserva, sin detectarse diferencias significativas ($p > 0,05$) cuando los animales fueron expuestos al formulado comercial de atrazina. En cuanto a las hembras expuestas al formulado experimental, tampoco se detectaron

cambios significativos ($p>0,05$) en el nivel de lípidos, ni en el músculo de la quela, ni en el hepatopáncreas ($p>0,05$) (Figuras 20.B y 21.B).

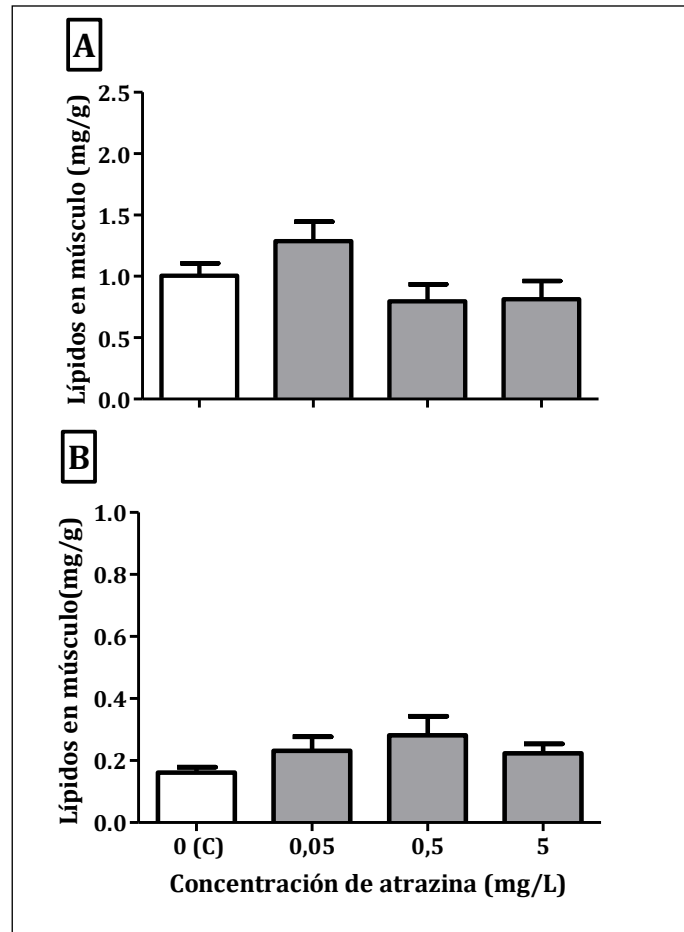


Figura 20. Niveles de lípidos (mg/g) en el músculo de la quela en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

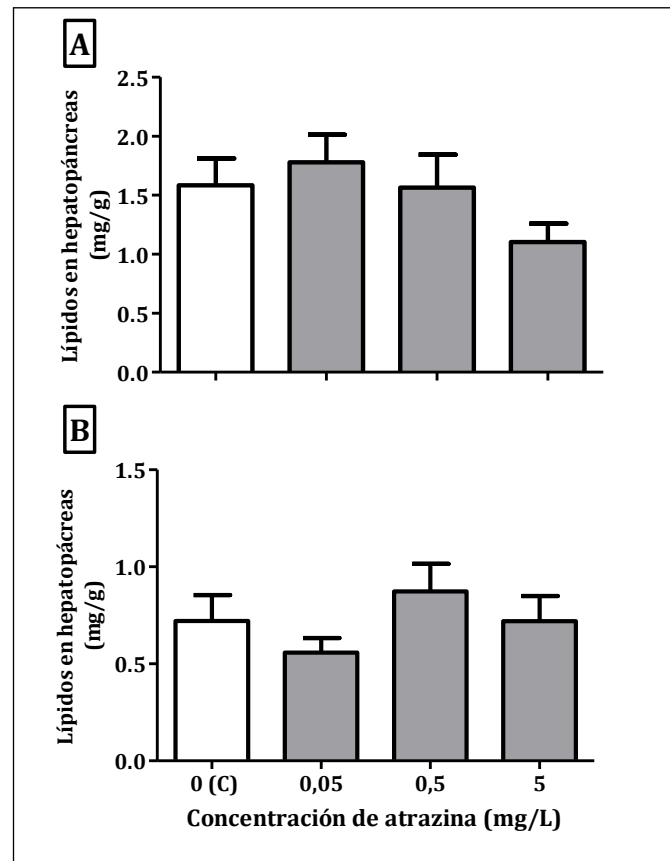


Figura 21. Niveles de lípidos (mg/g) en el hepatopáncreas en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

d) Niveles de proteínas en tejidos y órganos

Los niveles de proteínas determinados en el músculo de la quela en las hembras expuestas a la concentración más alta del formulado comercial, fueron significativamente menores ($p < 0,05$) en comparación con el grupo control (Figura 22.A). Este efecto también se observó en las hembras expuestas a las tres concentraciones del formulado experimental (Figura 22.B), encontrando niveles de proteínas en músculo significativamente más bajos ($p < 0,05$) en comparación con el grupo control.

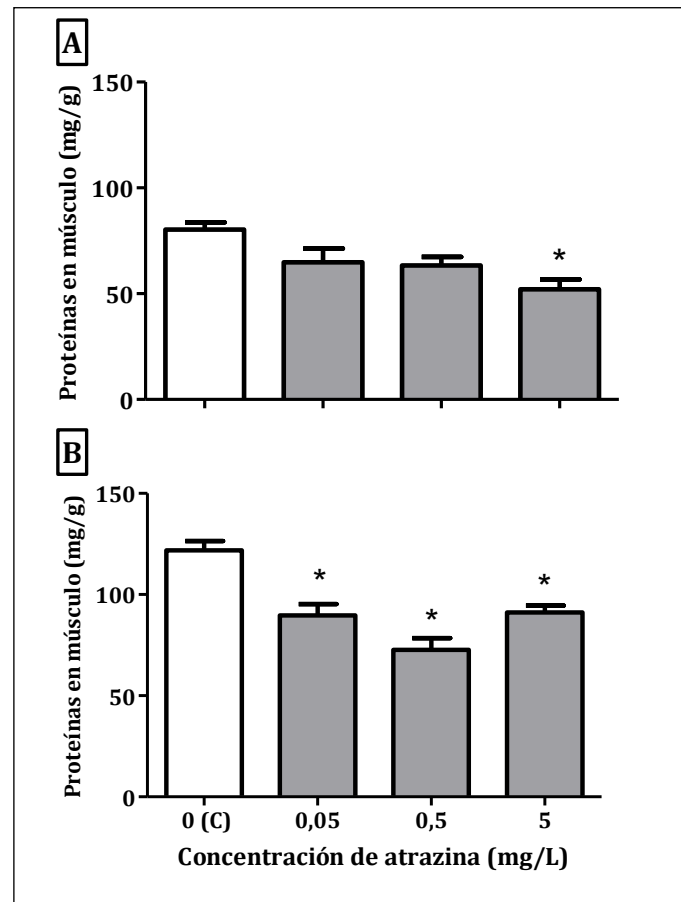


Figura 22. Niveles de proteínas (mg/g) en el músculo de la quela en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

En la Figura 23.A se muestran los niveles de proteínas determinados en el hepatopáncreas de hembras expuestas al formulado comercial de atrazina, que no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en comparación con el grupo control. Por otro lado, si bien se observó un descenso en los niveles de proteínas a las concentraciones más altas del formulado experimental de atrazina, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al tratamiento control (Figura 23.B)

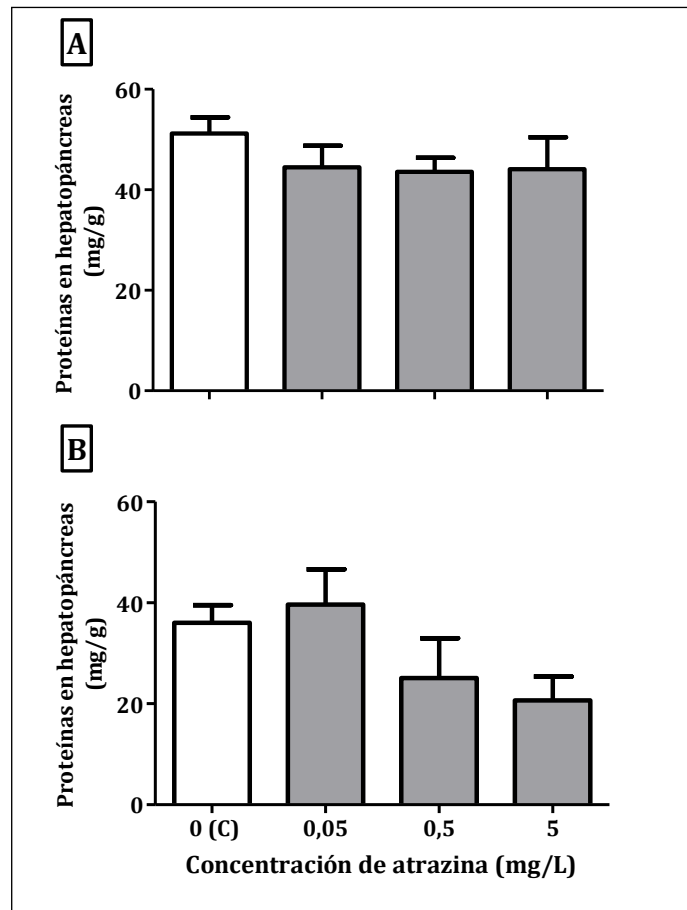


Figura 23. Niveles de proteínas (mg/g) en el hepatopáncreas en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo *in vivo*. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

❖ **Contenido total de proteínas vitelogénicas**

Con respecto al contenido de proteínas vitelogénicas determinado al finalizar el ensayo *in vivo*, los ovarios de las hembras expuestas a la concentración más alta (5 mg/L) del formulado comercial de atrazina mostraron un contenido más bajo en comparación con el grupo control, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando se considera el contenido de Vg en el ovario entero (Figura 24.A).

Por el contrario, no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el contenido de proteínas vitelogénicas determinado en el ovario de hembras expuestas al formulado experimental, en comparación con el grupo control (Figura 24.B).

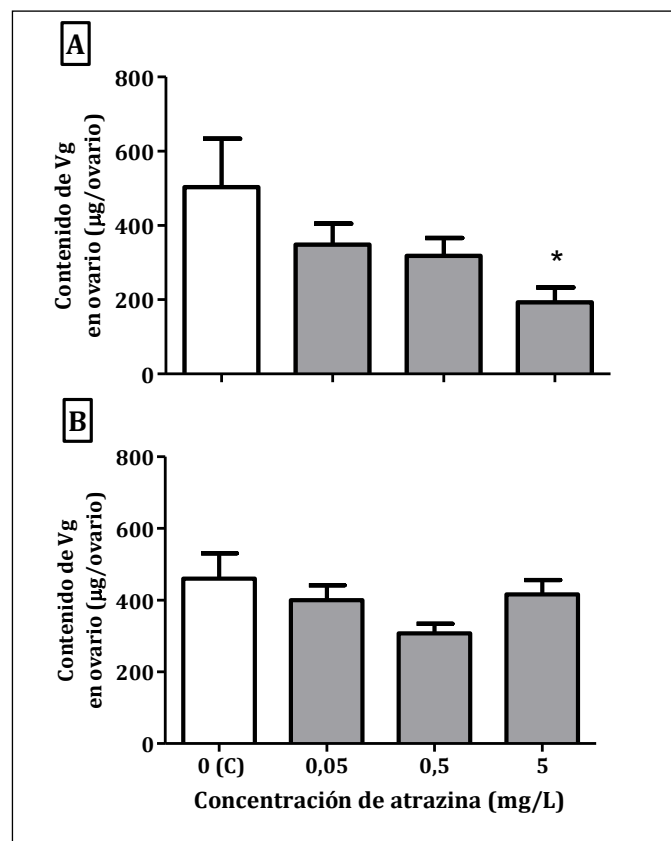


Figura 24. Contenido de proteínas vitelogénicas ($\mu\text{g/ovario}$) en ovario al término del ensayo in vivo. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto al grupo control.

A su vez, el contenido de Vg en el hepatopáncreas mostró un aumento significativo ($p<0,05$) en las hembras expuestas a las concentraciones de 0,05 y 0,5 mg/L del formulado comercial, en comparación con el grupo control (Figura 25.A). Al medir este parámetro en las hembras expuestas al formulado experimental, no se observaron cambios significativos ($p>0,05$) (Figura 25.B).

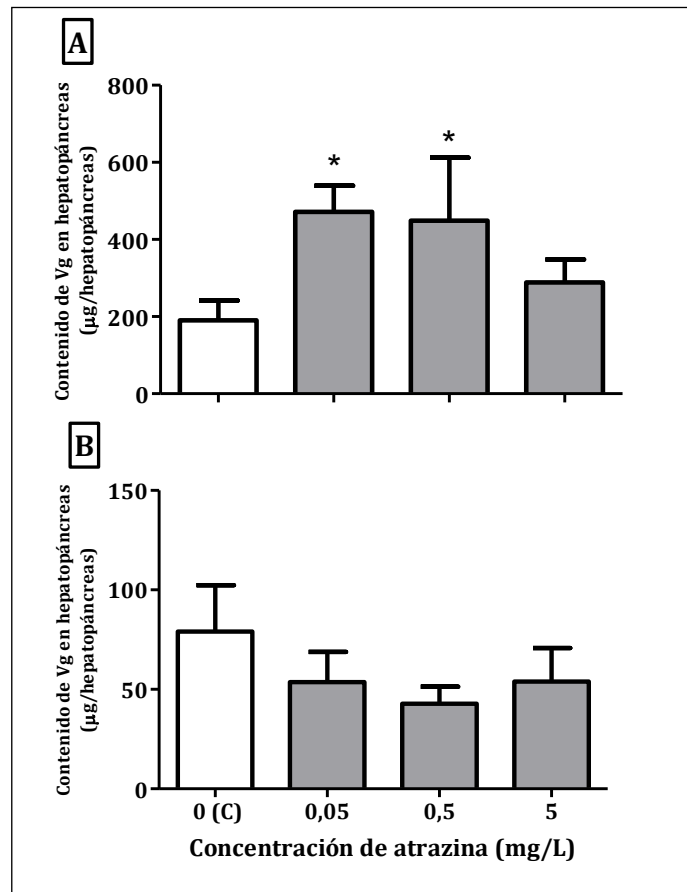


Figura 25. Contenido de proteínas vitelogénicas ($\mu\text{g}/\text{hepatopáncreas}$) en el hepatopáncreas al término del ensayo in vivo. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

Por otra parte, el contenido de Vg circulante fue similar en todos los tratamientos, tanto en las hembras expuestas al formulado comercial, como en las tratadas con el formulado experimental (Figura 26), sin encontrarse diferencias significativas ($p > 0,05$) con los respectivos grupos control.

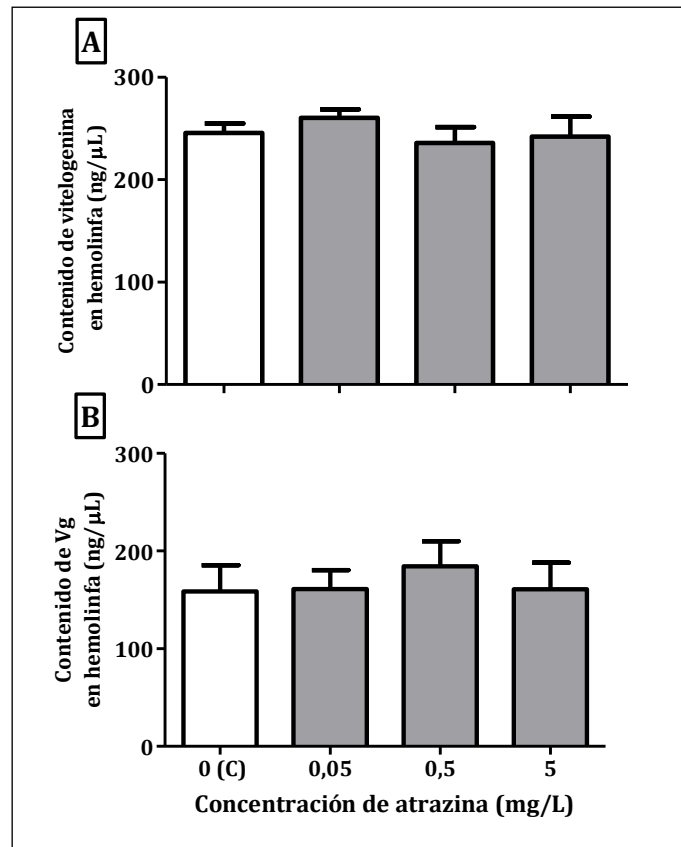


Figura 26. Contenido de proteínas vitelogénicas (ng/μL) en la hemolinfa de los diferentes grupos experimentales al término del ensayo *in vivo*. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

❖ **Tamaño y proporción de los oocitos**

En el análisis histológico de los cortes realizados en el ovario se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) en el tamaño de los oocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos, en las hembras expuestas a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina, en comparación con el tratamiento control (Figura 27.A). Por el contrario, en ningún caso se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el tamaño oocitario para las hembras expuestas al formulado experimental, en comparación con el control (Figura 27.B).

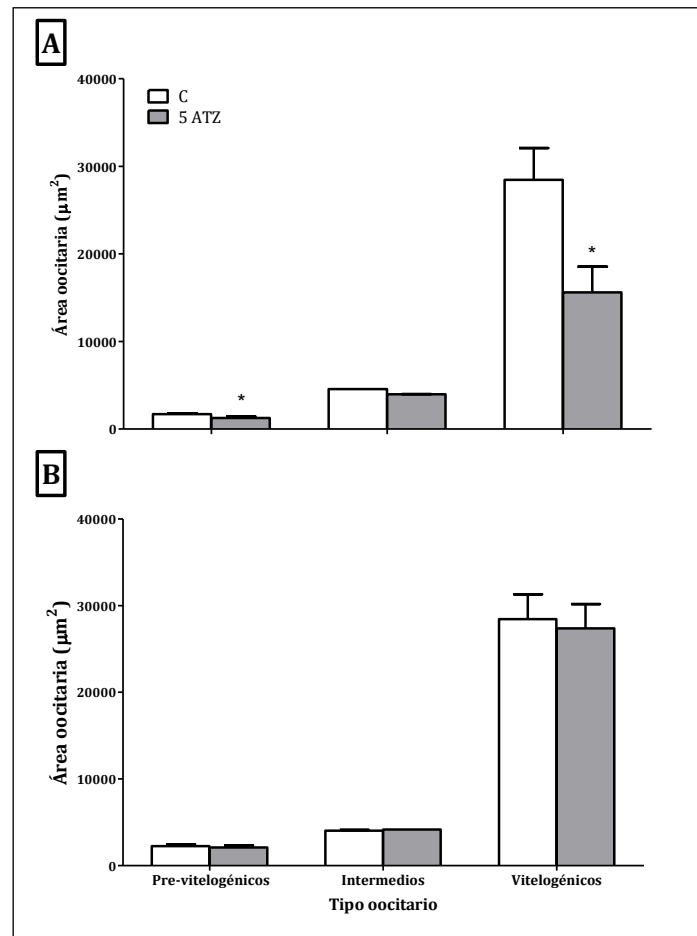


Figura 27. Área relativa de los diferentes tipos de oocitos (μm^2) en el ovario de hembras control (C) y expuestas al 5mg/L de atrazina (ATZ) al término del ensayo in vivo. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

Por otra parte, más allá de no encontrarse diferencias significativas ($p > 0,05$), se observó un leve incremento en la proporción de oocitos pre-vitelogénicos e intermedios, y un descenso en la proporción de oocitos vitelogénicos en los ovarios de hembras expuestas a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina. (Figura 28.A) Estos resultados también fueron observados en los ovarios de las hembras expuestas al formulado experimental (Figura 28.B).

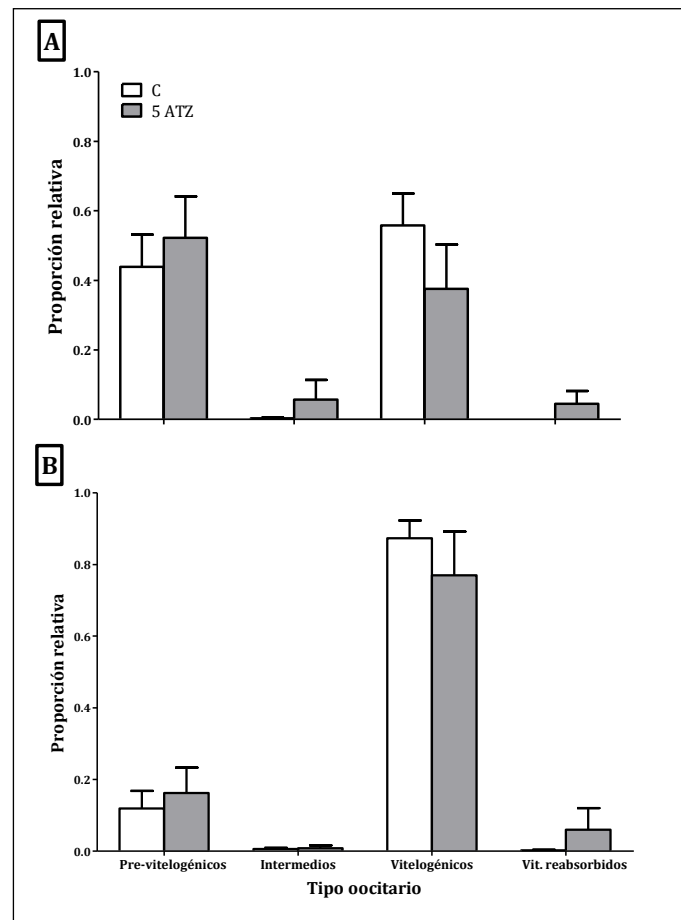


Figura 28. Proporción relativa de los diferentes tipos de oocitos en el ovario de hembras control (C) y expuestas a 5 mg/L de atrazina (ATZ) al término del ensayo in vivo. A: hembras expuestas al formulado comercial de atrazina. B: hembras expuestas al formulado experimental de atrazina. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

En la Figura 29 se muestran tres secciones histológicas del ovario de hembras de *N. granulata*, correspondientes al tratamiento control (A) y al tratamiento 5 mg/L del formulado comercial de atrazina (B y C). En la primera imagen (A), se observan tanto oocitos pre-vitelogénicos como vitelogénicos; mientras que en la segunda imagen (B), se observan oocitos pre-vitelogénicos e intermedios, destacándose además la presencia de un importante número de oocitos pre-vitelogénicos en reabsorción, posiblemente sufriendo un proceso de autólisis, dado los evidentes signos de cariorrexis (deterioro del núcleo). Más aún, en la última imagen (C) se distinguen únicamente oocitos pre-vitelogénicos,

indicando un grado de madurez ovárica claramente menor en las hembras expuestas a 5 mg/L de atrazina, en comparación con el control.



Figura 29. Secciones histológicas de ovario de hembras de *N. granulata*: A: ovario control con oocitos pre-vitelogénicos (P) y vitelogénicos (V) normales. B: ovario con oocitos pre-vitelogénicos (P), intermedios (I) y en reabsorción (R) de hembras expuestas al formulado comercial de atrazina (5 mg/L). C: ovario conteniendo sólo oocitos pre-vitelogénicos (P) y en reabsorción (R) de hembras expuestas al formulado comercial de atrazina (5 mg/L). Barra= 50 μ m.

➤ **Experimento in vivo II**

A continuación, se muestran los resultados de las variables analizadas para evaluar si los efectos del formulado comercial de atrazina observados en el *Experimento in vivo I* podrían ser atribuidos, al menos en parte, a una interferencia del herbicida sobre el control endocrino que ejercen las neurohormonas de origen peduncular sobre el proceso de vitelogénesis.

❖ ***Contenido total de proteínas vitelogénicas***

Con respecto al contenido de proteínas vitelogénicas determinado al finalizar el *Experimento in vivo II*, los ovarios de las hembras intactas que fueron expuestas a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina, mostraron un menor contenido de Vg en comparación con el grupo control; en particular, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) al determinar el contenido de Vg en el ovario entero (Figura 30.A). Estas diferencias dejan de ser significativas ($p > 0,05$) al evaluar el contenido de proteínas vitelogénicas en los ovarios de las hembras con ablación de uno y de ambos pedúnculos oculares, expuestas a la misma concentración de atrazina (Figuras 30.B y 30.C).

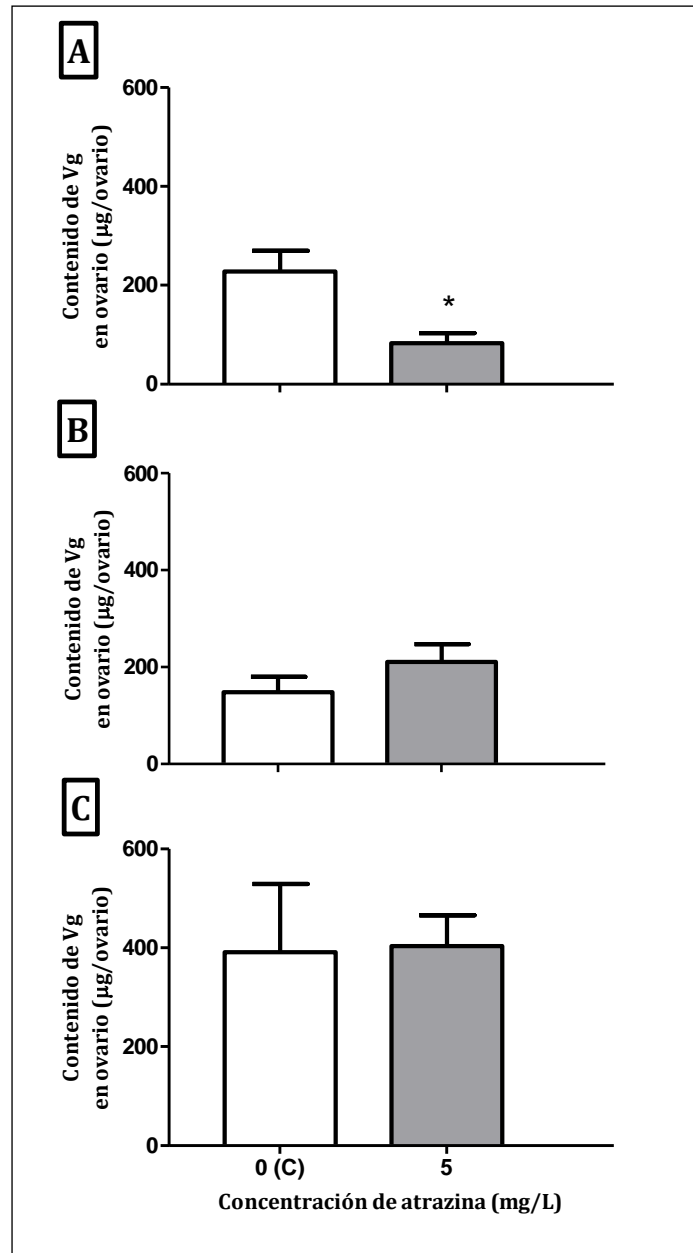


Figura 30. Contenido de proteínas vitelogénicas ($\mu\text{g}/\text{ovario}$) en el ovario de hembras control y expuestas al formulado comercial de atrazina al término del ensayo *in vivo* II. A: animales intactos. B: animales con ablación de un pedúnculo ocular. C: animales con ablación de ambos pedúnculos oculares. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

❖ *Tamaño y proporción de los oocitos*

En el análisis histológico de los cortes realizados en el ovario se observó un claro descenso, aunque no significativo ($p>0,05$), en el tamaño de los oocitos vitelogénicos de hembras intactas expuestas a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina, con respecto al grupo control (Figura 31.A); esta tendencia no fue observada cuando las hembras expuestas a atrazina se encontraban ablacionadas de uno o de ambos pedúnculos oculares (Figuras 31.B y 31.C).

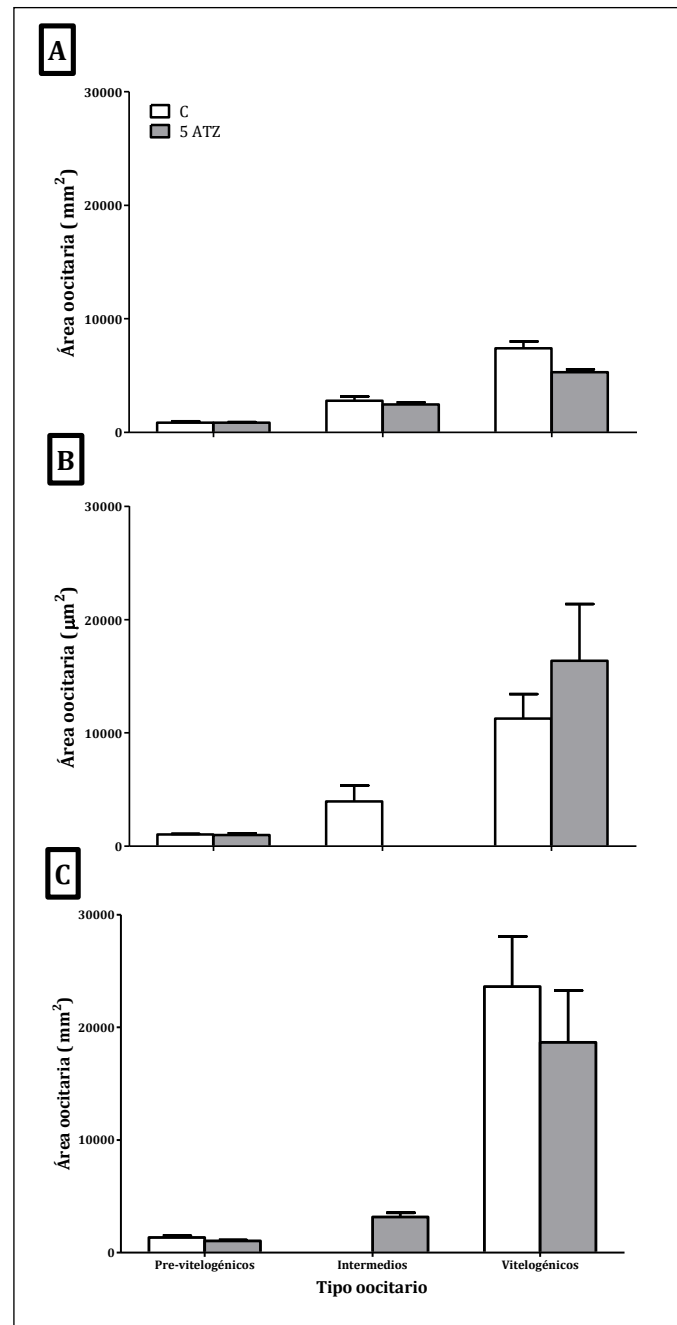


Figura 31. Área relativa de los diferentes tipos de oocitos (μm^2) en el ovario de hembras control (C) y expuestas a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina (ATZ) al término del ensayo in vivo. A: animales intactos. B: animales con ablación de un pedúnculo ocular. C: animales con ablación de ambos pedúnculos oculares. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

Por otro lado, se observó un incremento en la proporción de oocitos previtelogénicos e intermedios y un descenso significativo ($p < 0,05$) de alrededor del 60% en la proporción de oocitos vitelogénicos, junto a un aumento en las reabsorciones de los mismos, en los ovarios de hembras intactas expuestas al formulado comercial de atrazina (Figura 32.A), en comparación con las proporciones alcanzadas en los respectivos controles.

Cuando las hembras fueron uni-ablacionadas y expuestas al formulado comercial, la proporción de los diferentes tipos de oocitos siguió un patrón similar al observado en las hembras intactas, sin presentar diferencias significativas ($p > 0,05$); se observa sin embargo un aumento en la proporción de oocitos previtelogénicos y vitelogénicos reabsorbidos, y un descenso de oocitos vitelogénicos de un 40% (Figura 32.B).

En cuanto a los resultados obtenidos en las hembras ablacionadas de ambos pedúnculos oculares y expuestas al formulado comercial, se pudo observar que disminuyen claramente las diferencias en las proporciones de los diferentes tipos de oocitos al comparar con el grupo control. Tanto la proporción de oocitos previtelogénicos como de vitelogénicos reabsorbidos son muy similares entre el grupo expuesto y el control, y se observa un menor descenso en la proporción de oocitos vitelogénicos en las hembras expuestas en comparación con los animales intactos y ablacionados de uno de sus pedúnculos oculares, siendo tan solo un 20% menor a la proporción de oocitos vitelogénicos en el grupo control (Figura 32.C).

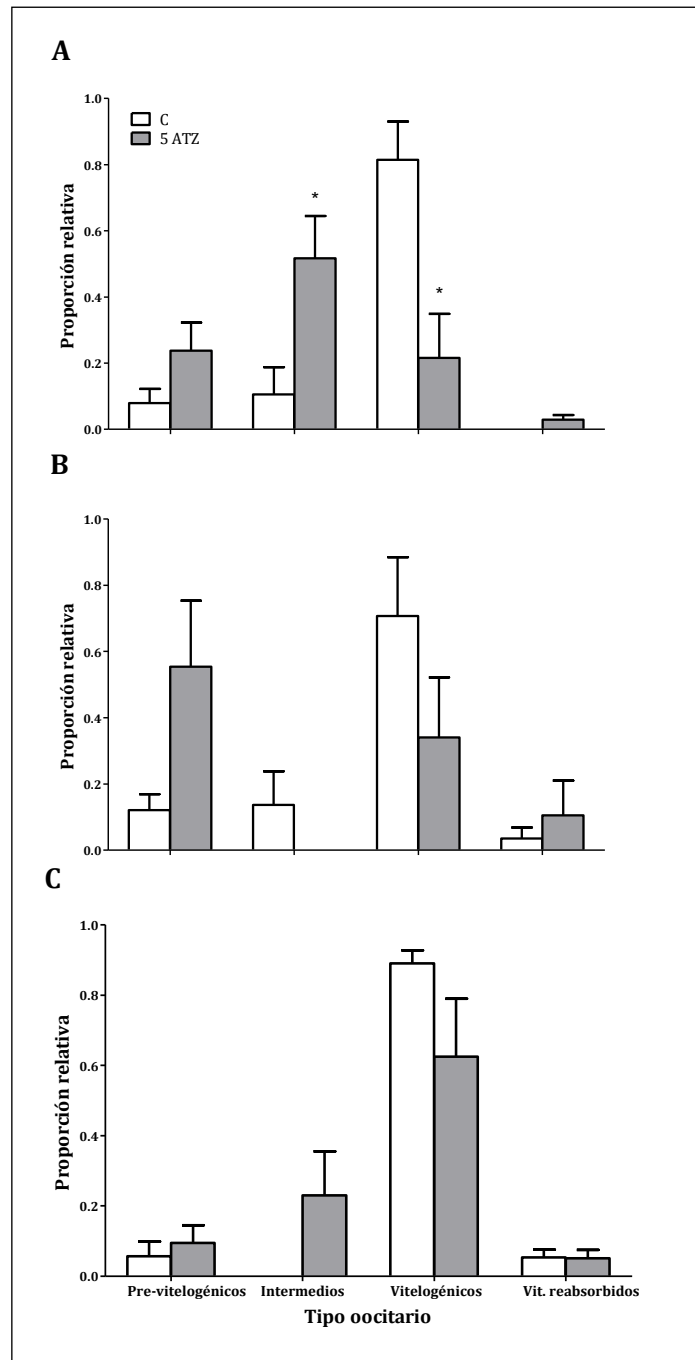


Figura 32. Proporción relativa de los diferentes tipos de oocitos en el ovario de hembras control (C) y expuestas a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina (ATZ) al término del ensayo in vivo II. A: animales intactos. B: animales con ablación de un pedúnculo ocular. C: animales con ablación de ambos pedúnculos oculares. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

DISCUSIÓN

El presente Capítulo tuvo como objetivo evaluar el efecto *in vivo* del herbicida en estudio, sobre el crecimiento ovárico en el cangrejo *N. granulata*. Los ensayos fueron realizados dentro del período pre-reproductivo, el cual es crítico para la reproducción de la especie debido a que durante este período se verifica el crecimiento ovárico de las hembras previo a la época de desove (Zapata *et al.*, 2003).

La concentración más baja utilizada en los experimentos (0,05 mg/L) se encuentra incluida dentro del intervalo de concentraciones ambientales reportadas para atrazina (USEPA, 2002; Vonberg *et al.*, 2014). Si bien las dos concentraciones más altas (0,5 y 5 mg/L) fueron más elevadas que aquellas comúnmente encontradas en el ambiente, estarían representando los casos más extremos o desfavorables, representando zonas consideradas como “hot spots” (cursos de agua cercanos a campos fumigados, por ejemplo), o bien debido a condiciones climáticas particulares (Graymore *et al.*, 2001; De Gerónimo *et al.*, 2014). Por otra parte, las concentraciones nominales de atrazina utilizadas fueron levemente mayores al promedio de las concentraciones finales analizadas, probablemente debido a la interferencia de las sales presentes en el agua de dilución. De este modo, se pudo comprobar que no hubo un descenso significativo del herbicida, asegurando así una exposición relativamente constante de los animales. Dado que, al término del primer experimento, el porcentaje de mortalidad en las hembras expuestas a ambos formulados de atrazina resultó ser

estadísticamente similar a la registrada en el control, se asumió que la eventual mortalidad encontrada no es un factor que pudiese sesgar la comparación entre controles y tratados con atrazina.

En términos reproductivos, el ovario del cangrejo *N. granulata* ha demostrado ser sumamente sensible frente a la exposición a diferentes contaminantes como, por ejemplo, metales pesados, paratión, 2-4D y glifosato, entre otros (Rodríguez y Pisanó, 1993; Rodríguez et al., 1994; Medesani *et al.*, 2004; Avigliano *et al.*, 2018). En un trabajo previo llevado a cabo durante el período reproductivo de la especie en estudio, se observó también un efecto claramente significativo del mismo formulado comercial utilizado en la presente Tesis sobre el crecimiento de ovarios en remaduración (Álvarez *et al.*, 2015).

Se ha reportado para la especie en estudio que a medida que avanza el período pre-reproductivo, el ovario crece continuamente, reflejándose por lo tanto en un incremento gradual del IG (López Greco y Rodríguez, 1999). En nuestro primer ensayo, las hembras expuestas a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina, presentaron un IG un 50% más bajo que el registrado en las hembras control, mostrando un efecto negativo sobre el crecimiento del ovario.

El análisis histológico del ovario de las hembras expuestas a 5 mg/L, mostró un descenso significativo en el tamaño de los oocitos, tanto pre-vitelogénicos como vitelogénicos. Este resultado estaría indicando que el herbicida afecta negativamente la síntesis de la Vg en el propio ovario, y probablemente también la incorporación de vitelo a los oocitos durante la vitelogénesis exógena, y/o su

degradación. Estos cambios en el tamaño se vieron apoyados por las mediciones del contenido de proteínas vitelogénicas en el ovario, el cual se redujo significativamente en las hembras expuestas a 5 mg/L del formulado comercial.

Por otro lado, si bien no se encontraron diferencias significativas, es importante resaltar que al analizar la proporción oocitaria encontramos una elevada proporción de oocitos pre-vitelogénicos e intermedios, una menor proporción de oocitos vitelogénicos y un aumento en las reabsorciones de los mismos, en los ovarios de las hembras expuestas al formulado comercial de atrazina; estos resultados son consistentes con el descenso en el tamaño oocitario y en el IG, comentados en el párrafo anterior. Además, estas observaciones concuerdan con los resultados previos reportados en la misma especie (Álvarez *et al.*, 2015), en donde se evidenció un retraso en el crecimiento ovárico durante el período reproductivo, afectando el proceso de remaduración temprana del ovario en hembras ovígeras expuestas a 5 mg/L del formulado Gesaprim 90 WDG®. De manera similar a lo observado en el presente trabajo, los ovarios presentaron una alta proporción de oocitos pre-vitelogénicos y una proporción reducida de oocitos vitelogénicos.

Al analizar el IH de las hembras, no se detectaron cambios significativos entre los diferentes grupos experimentales; esta respuesta del hepatopáncreas ha sido observada en trabajos previos realizados en la especie *N. granulata*, así como en la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, tanto en el período pre-reproductivo como en los demás períodos del ciclo; sin embargo, al evaluar los niveles de Vg en este órgano, encontramos una acumulación significativa en las

hembras expuestas a las concentraciones más bajas del formulado comercial de atrazina (0,05 y 0,5 mg/L). En diversas especies de cangrejos (Charmantier, 1997; Nagaraju, 2011), se ha observado que el hepatopáncreas cumple un papel relevante en la vitelogénesis como fuente extraovárica de producción de Vg que será incorporada por los oocitos a medida que ocurre el intenso crecimiento ovárico durante el período pre-reproductivo. Entre las hormonas estimulantes del proceso de vitelogénesis, con efectos sobre el hepatopáncreas, se han propuesto a los esteroides sexuales 17PG y E₂ (Warrier *et al.*, 2001; Meunpol *et al.*, 2007); es por ello que una posible explicación a la falta de correlación entre la inhibición observada en el ovario y el aumento en la síntesis de Vg en el hepatopáncreas, se deba a que el herbicida provoca un incremento en la secreción de las hormonas mencionadas, posiblemente desde el ovario, y que este aumento sea el responsable del incremento en el contenido de Vg hepatopancreático. Otra alternativa, sería que el herbicida afecte de manera directa la secreción de Vg desde el hepatopáncreas, provocando su acumulación en este órgano y alterando de este modo la fase extraovárica del proceso de vitelogénesis. De todas maneras, este posible efecto del formulado comercial de atrazina no pudo observarse al ensayar la concentración más elevada (5 mg/L). Las hembras expuestas a esta concentración, presentaron un contenido de Vg en el hepatopáncreas similar al de las hembras control. Tal vez, una mayor concentración del herbicida afecta no solo la secreción de Vg, lo cual provocaría que se acumulara, sino que también podría disminuir su síntesis, quedando contrarrestada la acumulación de Vg en el hepatopáncreas por el descenso en su producción.

En cuanto a los cambios significativos observados en las reservas energéticas, tanto en los niveles de glucógeno como en el contenido de las proteínas totales en las hembras expuestas a atrazina, los resultados pueden ser interpretados como una respuesta fisiológica compensatoria frente a un estrés inespecífico causado por el herbicida. En trabajos realizados en invertebrados acuáticos por Sokolova *et al.* (2012), se evidenció que el estrés crónico provoca un consumo de reservas energéticas tales como el glucógeno, lípidos y proteínas, siendo ésta la última reserva consumida. Teniendo en cuenta que en nuestro estudio la fuente de proteínas se vio afectada en las hembras expuestas, y considerando que la Vg representa la principal proteína en los oocitos maduros, es posible que durante el estrés crónico al que estuvieron expuestos los animales la Vg haya sido utilizada, al menos en parte, como fuente proteica para hacer frente al estrés. Si bien no se observaron diferencias entre los grupos experimentales al determinar la GP, los animales podrían estar sacrificando, durante el cuadro de estrés crónico, parte de la energía destinada al crecimiento somático, así como reduciendo energía que sería utilizada para propósitos reproductivos. En trabajos previos realizados en crustáceos se ha demostrado que los niveles de glucosa hemolinfática pueden ser buenos indicadores de diferentes condiciones de estrés (Reddy *et al.*, 1996; Webster, 1996; Lorenzon, 2005). Sin embargo, en el presente trabajo los niveles de este parámetro fueron similares entre los grupos experimentales.

Hasta aquí, podemos decir que los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* estarían indicando que existe una clara inhibición del desarrollo ovárico que se verifica durante el extenso período pre-reproductivo, en las hembras expuestas al formulado

comercial de atrazina, sugiriendo un posible papel del herbicida como desorganizador endocrino. Varios trabajos sugieren también esta última posibilidad; en peces y otros vertebrados se ha reportado que la atrazina inhibe la maduración gonadal (Tillitt *et al.*, 2010), interfiere con el control hipotalámico de hormonas hipofisarias e induce la actividad de la enzima aromatasa (McKinlay *et al.*, 2008); en el caso particular de los crustáceos, se ha demostrado que dicho herbicida antagoniza el efecto de hormonas juvenoides (Palma *et al.*, 2009) y altera la diferenciación sexual en especies como *Daphnia* sp. (Dodson *et al.*, 1999) y *C. quadricarinatus* (Mac Loughlin *et al.*, 2016).

Es importante destacar que los efectos significativos se han observado principalmente al ensayar el formulado comercial de atrazina Gesaprim 90 WDG® (pureza del 90% del principio activo), en comparación con el formulado experimental (pureza del 96% del principio activo); evidentemente existe una toxicidad diferencial entre ambas formulaciones, y probablemente esta diferencia se deba a la presencia de excipientes en el formulado comercial, generando un efecto sinérgico entre los excipientes y el principio activo y/o al incremento en la biodisponibilidad del herbicida. Las formulaciones comerciales se encuentran diseñadas precisamente para facilitar el ingreso a las malezas a través de la cutícula vegetal, incrementando y potenciando de este modo la actividad del herbicida. Estudios realizados en mamíferos por Brand y Mueller (2002), muestran que los coadyuvantes de las formulaciones comerciales de atrazina son capaces de aumentar su permeabilidad a través de la piel de mamíferos, en comparación con formulaciones experimentales (disolución del principio activo puro con solventes orgánicos); esta información es muy relevante al momento de analizar las diferencias encontradas en el presente estudio entre las dos formulaciones (comercial y experimental). Los excipientes son denominados por los productores

como “elementos inertes”, muchas veces no declarados, ya que es considerado secreto industrial o información de carácter confidencial (Mesnage *et al.*, 2014); así se explica porque dos productos de distintos fabricantes, que contienen un mismo ingrediente activo, concentración y estado físico, manifiesten diferentes grados de eficacia. Varias pruebas reglamentarias de seguridad para la aplicación de los plaguicidas, actualmente solo se realizan con el ingrediente activo, asumiendo que los demás ingredientes no tienen ningún efecto (Cox y Sorgan, 2006). Esto significa que, en algunos casos, no se expresa la toxicidad total de las formulaciones, incluidas las utilizadas tanto en la agricultura como en los jardines domésticos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* de exposición de los animales a diferentes concentraciones de un formulado comercial y otro experimental, consideramos que podrían ser de ayuda para establecer una línea de base sobre los efectos producidos por el formulado Gesaprim 90 WDG®, aportando de este modo información útil para exigir nuevos informes sobre la evaluación de la toxicidad de las formulaciones comerciales.

Con el fin de evaluar, mediante ensayos *in vivo*, si los efectos del formulado comercial de atrazina observados en el *Experimento I* podían ser atribuidos a una interferencia del herbicida sobre el control endocrino que ejercen las neurohormonas de origen peduncular en el proceso de vitelogénesis, se realizó un experimento empleando hembras de *N. granulata* con ablación de sus pedúnculos oculares. La ablación peduncular es una técnica comúnmente utilizada para estimular la maduración ovárica y la puesta de huevos en crustáceos (Makinouchi y Primavera, 1987; Stella *et al.*, 2000).

Las hembras intactas expuestas a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina, presentaron un área similar en los diferentes tipos de oocitos a la observada en las hembras expuestas a la misma concentración en el *Experimento I*. Sin embargo, en este segundo experimento no se detectaron diferencias significativas respecto al grupo control, probablemente debido a que el tiempo de exposición tuvo una duración de un mes, mientras que el *Experimento I* se extendió por tres meses. Al analizar el área de los diferentes tipos de oocitos en las hembras expuestas y ablacionadas de uno o de ambos pedúnculos oculares, no se observaron diferencias con respecto a los correspondientes grupos control, aunque sí se observó en todos los grupos el típico efecto de la ablación peduncular, es decir, un aumento muy importante en el tamaño de los oocitos vitelogénicos, en comparación con las hembras intactas. Se ha reportado previamente que la ablación de uno o de ambos pedúnculos produce en la especie en estudio el aumento de entre el 50 y 100% del área de los oocitos vitelogénicos (Stella *et al.*, 2000). Sin embargo, al realizar el análisis de las proporciones oocitarias, encontramos diferencias entre las hembras intactas y ablacionadas de sus pedúnculos oculares. Así, en el ovario de las hembras intactas expuestas se observó un incremento en la proporción de los oocitos pre-vitelogénicos e intermedios, y un descenso significativo de alrededor del 60% en la proporción de oocitos vitelogénicos, con respecto a las hembras intactas control, junto a un aumento en las reabsorciones de los mismos; estas diferencias fueron similares a las encontradas en el *Experimento I*, realizado con hembras intactas. Por el contrario, cuando las hembras ablacionadas de uno o ambos pedúnculos oculares fueron expuestas al formulado comercial, no se observaron diferencias en las

proporciones oocitarias entre el grupo expuesto y el grupo control. Los efectos del herbicida observados en el tamaño y en la proporción de los oocitos, tuvieron un correlato con las mediciones del contenido de Vg en ovario; las hembras intactas expuestas presentaron un menor contenido de Vg, mientras que los animales con ablación de uno o ambos pedúnculos oculares, expuestos a la misma concentración, no presentaron diferencias con respecto a sus respectivos grupos control.

Según Charmantier (1997), el crecimiento de los oocitos en el ovario está determinado principalmente por la disminución gradual de la GIH, sintetizada y secretada por la GS ubicada en los pedúnculos oculares; por lo tanto, si la secreción de esta hormona aumenta cuando en el ovario está ocurriendo el proceso de vitelogénesis, podría explicarse en las hembras intactas la reducción en la proporción de los oocitos vitelogénicos y posiblemente también el aumento en la proporción de oocitos vitelogénicos en reabsorción. Del mismo modo, es posible que este posible incremento de GIH, desencadene la concomitante disminución en la secreción del GSF, producido en el GT (Fingerman y Nagabhushanam, 1997), o bien la menor secreción de otras hormonas estimulantes del crecimiento gonadal, tales como los esteroides sexuales y el metil farnesoato. Esta posible alteración hormonal podría explicar por qué el ovario de los animales intactos, expuestos al herbicida, no madura correctamente. Finalmente, podría ocurrir que no solo las vías de secreción hormonal se encuentren afectadas, sino también, o alternativamente, podrían verse alteradas las vías de degradación y/o de transducción de las hormonas involucradas en el proceso de vitelogénesis.

CAPÍTULO II

“Evaluación *in vitro* del efecto del herbicida atrazina sobre el control endocrino del crecimiento ovárico, en el cangrejo de estuario *Neohelice granulata*.”

HIPÓTESIS

A continuación, se plantean las hipótesis de trabajo que fueron puestas a prueba experimentalmente en hembras adultas de *N. granulata*:

- a. *Las hormonas esteroideas y juvenoides estimulan, in vitro, el crecimiento ovárico.*
- b. *El formulado comercial de atrazina (Gesaprim 90 WDG®) actúa, in vitro, como un desorganizador endocrino, alterando la estimulación del crecimiento ovárico ejercida por las hormonas esteroideas y juvenoides.*
- c. *El formulado comercial de atrazina (Gesaprim 90 WDG®) interfiere, in vitro, sobre el control endocrino del crecimiento ovárico, alterando la secreción y/o el efecto de neurohormonas secretadas desde los pedúnculos oculares.*

Se realizaron tres experimentos a fin de corroborar las hipótesis planteadas, cuyos correspondientes objetivos específicos se detallan a continuación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Experimento *in vitro* I

Evaluar mediante ensayos *in vitro*, el efecto estimulante de hormonas esteroideas y juvenoides sobre el contenido total de proteínas vitelogénicas en el ovario de hembras adultas de *N. granulata*, durante el período pre-reproductivo.

Experimento *in vitro* II

Evaluar mediante ensayos *in vitro*, la posible interferencia del herbicida atrazina con el efecto estimulante de hormonas esteroideas y juvenoides sobre el contenido total de proteínas vitelogénicas en el ovario de hembras adultas de *N. granulata*, durante el período pre-reproductivo.

Experimento *in vitro* III

Evaluar mediante ensayos *in vitro*, la posible interferencia del herbicida atrazina con el efecto de neurohormonas secretadas desde los pedúnculos oculares sobre el contenido total de proteínas vitelogénicas en el ovario de hembras adultas de *N. granulata*, durante el período pre-reproductivo.

METODOLOGÍA

Ensayos in vitro

Los ensayos fueron realizados durante el período pre-reproductivo de *N. granulata*, utilizando los ovarios de hembras muestreadas durante ese período y mantenidas en stock, siguiendo las mismas condiciones generales de experimentación detalladas en el Capítulo I. De este modo, se asignaron 12 animales a cada serie experimental, proporcionando de cada hembra una pieza similar de ovario a cada uno de los tratamientos (diseño de bloques al azar).

Obtención de muestras biológicas

Los animales fueron anestesiados sumergiéndolos completamente en un baño de agua fría a 0 °C durante 5 min, para posteriormente ser sacrificados. A continuación, utilizando bisturí y pinza de disección, se realizó la disección del ovario completo de cada animal y se procedió a pesarlo empleando una balanza digital Ohaus® (precisión: ± 0,0001 g); una vez pesado, cada ovario se fragmentó en al menos cuatro piezas de 0,1 a 0,3 g. Cada porción de ovario, correspondiente a un determinado tratamiento, fue colocada en un pocillo de una placa de cultivo estéril de 12 pocillos (Nest Biotech Co. Ltd.®). Cada pocillo fue previamente cargado con 2 mL de medio de cultivo “M199” (Sigma Chemical Co.®), disuelto en una solución salina para crustáceos (Cooke *et al.*, 1977) modificada para la especie en estudio (Medesani *et al.*, 2015), (ver Anexo: *Recetas*). Posteriormente, se agregó

a cada pocillo la correspondiente hormona u órgano endocrino, y/o una alícuota del formulado comercial del herbicida atrazina, si correspondiese (Figura 33).

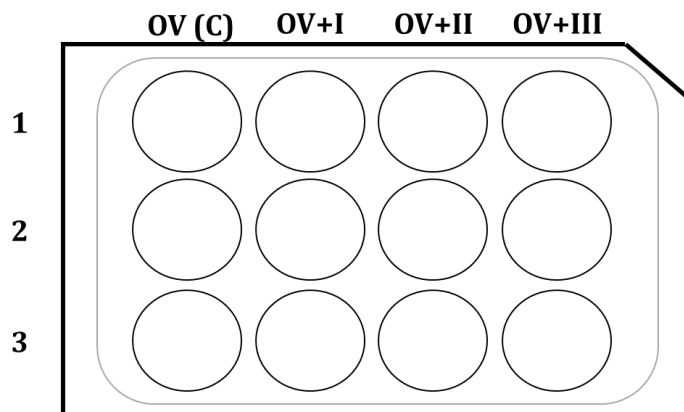


Figura 33. Esquema del diseño experimental de cada ensayo *in vitro*, ejemplificando la distribución en los 12 pocillos de la placa de cultivo de las diferentes condiciones ensayadas. OV (C): pieza de ovario control. OV+I, OV+II, OV+III: piezas de ovario incubadas con el tratamiento correspondiente, según el diseño de cada ensayo. Las filas 1, 2 y 3 corresponden a porciones similares del ovario de una misma hembra.

Diseño experimental

Para cada uno de los experimentos *in vitro* realizados, se estableció el siguiente diseño experimental:

➤ **Experimento *in vitro* I**

Para evaluar el efecto concentración-respuesta de las hormonas esteroideas y juvenoides, se incubaron piezas de ovario adicionando alícuotas de 20 μL de las hormonas a ensayarse en las concentraciones de 1,5; 5 y 15 μM , a partir de una solución stock concentrada; del mismo modo, en los grupos control se adicionó una alícuota de 20 μL de etanol absoluto (vehículo) a una concentración de 9,4

mL/L, presente en la mayor concentración de hormona. Las hormonas utilizadas fueron 17PG, E₂ (Sigma Chemical Co.®) y MF (Echelon Biosciences Inc®). Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- 1) **OV (C)**: pieza ovárica + etanol absoluto
- 2) **OV + I**: pieza ovárica + 1,5 µM de hormona X
- 3) **OV + II**: pieza ovárica + 5 µM de hormona X
- 4) **OV + III**: pieza ovárica + 15 µM de hormona X

➤ **Experimento *in vitro* II**

En base a los resultados obtenidos a partir del *Experimento in vitro I*, se llevó a cabo un segundo experimento para evaluar el efecto del herbicida atrazina en presencia o ausencia de las hormonas ensayadas. Para esto, se incubaron piezas de ovario con una alícuota de cada hormona a la concentración que demostró tener un efecto significativo en el *Experimento in vitro I*, junto con una segunda alícuota de 20 µL del formulado comercial de atrazina, a partir de una solución stock concentrada, de manera que la concentración final atrazina en el pocillo fuera de 5 mg/L. Se decidió utilizar ésta concentración basándose en los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* detallados en el Capítulo I.

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- 1) **OV (C)**: pieza ovárica + etanol absoluto
- 2) **OV + I**: pieza ovárica + 5 mg/L de atrazina
- 3) **OV + II**: pieza ovárica + 1,5 μ M de hormona X
- 4) **OV + III**: pieza ovárica + 5 mg/L atrazina + 1,5 μ M de hormona X

➤ **Experimento *in vitro* III**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de los experimentos *in vivo* detallados en el *Capítulo I*, se incubaron piezas de ovario en presencia o ausencia de pedúnculos oculares. Para completar el diseño experimental, se adicionó una alícuota de 20 μ L del formulado comercial de atrazina, a partir de una solución stock concentrada. La concentración final en el pocillo fue de 5 mg/L, quedando definidos los siguientes grupos experimentales:

- 1) **OV (C)**: pieza ovárica
- 2) **OV + I**: pieza ovárica + 5 mg/L atrazina
- 3) **OV + II**: pieza ovárica + pedúnculo ocular
- 4) **OV + III**: pieza ovárica + 5 mg/L atrazina + pedúnculo ocular

Para cada hembra utilizada, el grupo número 3 recibió uno de sus pedúnculos, mientras que el grupo número 4 recibió el pedúnculo contralateral de

la misma hembra, siguiendo el mismo diseño de bloques al azar utilizado para la asignación de las piezas de ovario.

Para los tres *Experimentos in vitro*, las placas fueron incubadas durante 24 hs dentro de una cámara de cultivo bajo condiciones reguladas de humedad y de temperatura (25 ± 1 °C), en oscuridad constante y con atmósfera controlada de CO₂ al 5%. Finalizado el período de incubación, las piezas de ovario fueron retiradas de los pocillos y colocadas en tubos eppendorf, los cuales se conservaron a -20 °C hasta su posterior procesamiento. En cada una de las piezas ováricas se determinaron las variables que se indican a continuación.

Variables analizadas

❖ *Contenido total de proteínas vitelogénicas*

El contenido total de proteínas vitelogénicas presentes en cada pieza de ovario fue determinado mediante la técnica ELISA, siguiendo el mismo protocolo detallado en el Capítulo I (ver Metodología: *Contenido total de proteínas vitelogénicas*).

❖ *Proporción oocitaria (en el Experimento in vitro III)*

Una porción de cada pieza de ovario fue procesada mediante técnicas histológicas de rutina, para determinar bajo microscopio óptico la proporción de los diferentes tipos de oocitos y los posibles efectos histopatológicos por

exposición al herbicida, empleando el mismo protocolo detallado en el Capítulo I (ver Metodología: *Tamaño y proporción de los oocitos*).

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* se aplicó el mismo procedimiento empleado en el Capítulo I, utilizando los programas R Studio (versión 3.5.0) y GraphPad Prism (versión 5.0). A fin de comparar entre grupos experimentales las variables registradas, se aplicó un ANOVA en un diseño de bloques al azar seguido de comparaciones múltiples, o bien, el Test *T* de Student (Sokal y Rohlf, 1981), dependiendo del experimento, teniendo en cuenta que se hubieran cumplido previamente los supuestos de dichos test. En todos los casos el nivel de confianza utilizado fue del 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

➤ **Experimento *in vitro* I**

❖ ***Contenido total de proteínas vitelogénicas***

En la Figura 34 puede observarse el contenido de Vg en las piezas de ovario incubadas *in vitro* con las diferentes concentraciones de las hormonas ensayadas (17PG, MF y E₂). Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) únicamente en las piezas de ovario que fueron incubadas con la hormona 17PG a una concentración de 1,5 μM al estimar el contenido de Vg en el ovario; ninguna de las concentraciones de MF o E₂ ensayadas, modificaron el contenido de proteínas vitelogénicas en las piezas de ovario incubadas con estas hormonas.

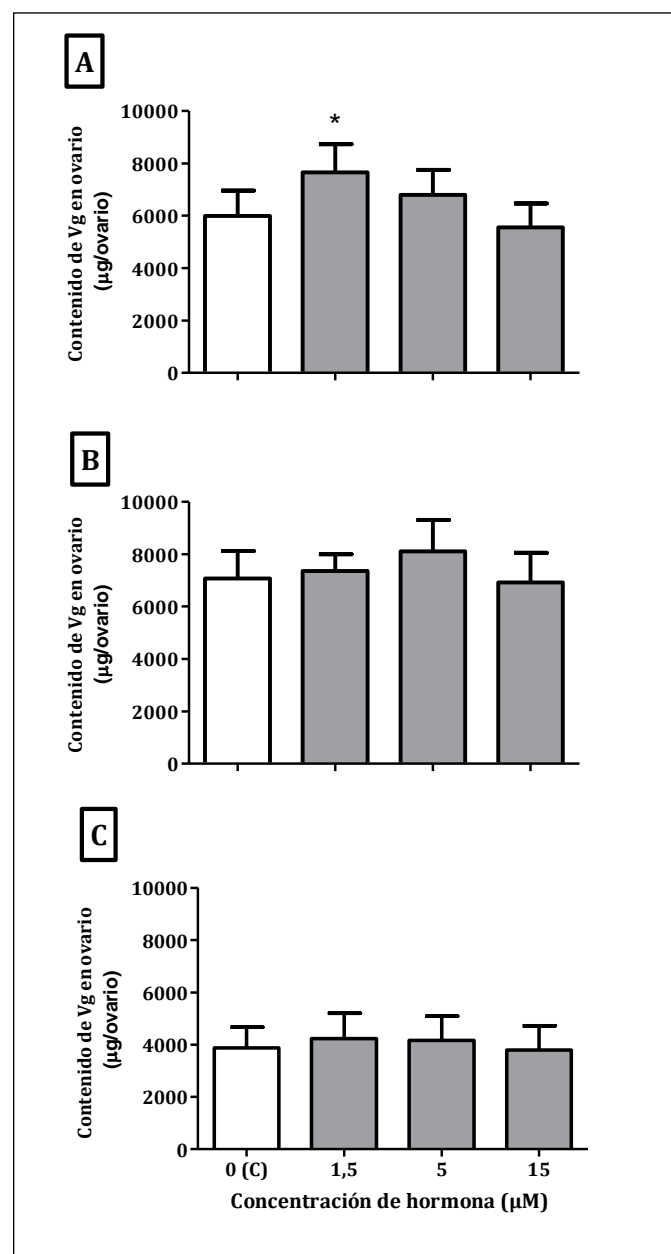


Figura 34. Contenido de proteínas vitelogénicas ($\mu\text{g}/\text{ovario}$) en las piezas de ovario incubadas *in vitro* con tres concentraciones (1,5; 5 y 15 μM) de hormona y su correspondiente control (C). A, B y C: piezas de ovario incubadas con 17PG, E_2 y MF, respectivamente. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

➤ **Experimento *in vitro* II**

❖ ***Contenido total de proteínas vitelogénicas***

Luego de determinar, mediante el experimento anterior, que solamente la 17PG a 1,5 μM produjo un incremento significativo en el contenido de Vg en el ovario, se procedió a incubar las piezas de ovario con dicha hormona, con o sin la adición de una alícuota del formulado comercial de atrazina. Se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) del contenido de Vg en las piezas de ovario que fueron incubadas únicamente con la hormona 17PG (1,5 μM), con respecto al control, tanto con o sin la adición del formulado comercial de atrazina a la concentración de 5 mg/L (Figura 35).

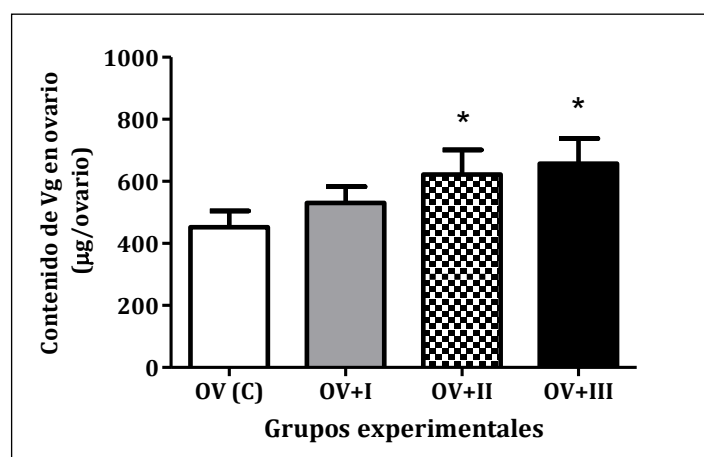


Figura 35. Contenido de proteínas vitelogénicas ($\mu\text{g}/\text{ovario}$) en piezas de ovario incubadas *in vitro*. OV (C): pieza de ovario control. OV+I: pieza de ovario incubado con el formulado comercial de atrazina (5 mg/L). OV+II: pieza de ovario incubado con la hormona 17PG (1,5 μM). OV+III: pieza de ovario incubado con el formulado comercial de atrazina (5 mg/L) y con la hormona 17PG (1,5 μM). Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

➤ **Experimento *in vitro* III**

A continuación, se muestran los resultados del ensayo diseñado para evaluar si el formulado comercial de atrazina interfiere *in vitro* con el control endocrino ejercido por las neurohormonas de origen peduncular.

❖ ***Proporción oocitaria***

La Figura 36 muestra la proporción relativa de los diferentes tipos de oocitos observados al término de la incubación *in vitro*. Las piezas de ovario incubadas durante 24 hs en presencia del herbicida y de un pedúnculo ocular mostraron una proporción significativamente ($p < 0,05$) menor de oocitos vitelogénicos, no observándose diferencias significativas ($p > 0,05$) en las restantes proporciones.

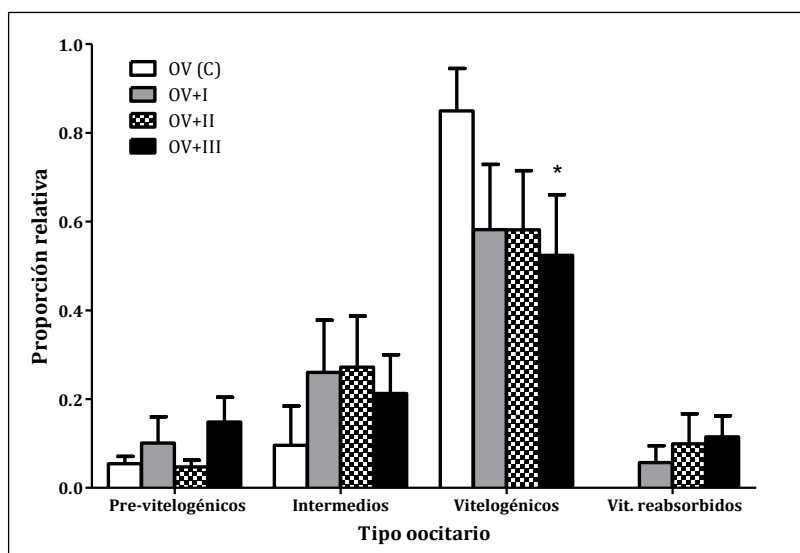


Figura 36. Proporción relativa de los diferentes tipos de oocitos en piezas de ovario incubadas *in vitro*. OV (C): pieza de ovario control. OV+I: pieza de ovario incubado con el formulado comercial de atrazina (5 mg/L). OV+II: pieza de ovario incubado con un pedúnculo ocular. OV+III: pieza de ovario incubado con el formulado comercial de atrazina (5 mg/L) y con un pedúnculo ocular. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente capítulo se discuten teniendo presentes los resultados de los experimentos *in vivo* reportados en el Capítulo I, a fin de integrarlos en una interpretación más abarcativa. Es importante destacar que en esta clase de ensayos, al no haber Vg extraovárica disponible para ser incorporada por los oocitos, todo tipo de alteración en el contenido de proteínas vitelogénicas observada en el ovario estuvo necesariamente relacionado con cambios en la síntesis endógena.

En el primer experimento realizado para determinar el efecto concentración-dependiente de las hormonas esteroideas y juvenoides sobre el crecimiento ovárico, únicamente la incubación de las piezas de ovario con una concentración de 1,5 μM de la hormona 17PG fue capaz de estimular el desarrollo del ovario, en términos de un mayor contenido de Vg. Estos resultados muestran un efecto directo de concentraciones bajas de la 17PG durante el periodo pre-reproductivo sobre el ovario, posiblemente estimulando la síntesis de Vn endógena, ya sea en los propios oocitos y/o en las células foliculares que los rodean. Diversos ensayos *in vitro* han reportado efectos estimulatorios de estas hormonas sobre el desarrollo ovárico en crustáceos; de este modo, se pudo evidenciar el efecto directo de la 17PG en la misma especie en estudio durante el período reproductivo, en términos de la incorporación de leucina tritiada a las proteínas ováricas totales (Zapata *et al.*, 2003). Un efecto estimulate *in vivo* de la 17PG, en términos de un aumento significativo del diámetro oocitario, fue

observado en el cangrejo *O. senex senex* (Reddy *et al.*, 2006) y en el camarón *P. monodon* (Merlin *et al.*, 2015).

Las concentraciones más altas ensayadas de la 17PG (5 y 15 μM) no mostraron un efecto estimulante en el período ensayado, y eso puede deberse a uniones inespecíficas de la hormona en exceso, que podría provocar la estimulación de otras vías no vinculadas con la síntesis de Vg. Por ejemplo, podrían activarse vías relacionadas con enzimas de detoxificación que impedirían ver el efecto hormonal esperado.

Cuando las piezas de ovario fueron incubadas con las hormonas MF y E₂, no pudo evidenciarse un efecto directo sobre el ovario en ninguna de las concentraciones ensayadas. Estos resultados fueron similares a los observados previamente en nuestro laboratorio (Medesani *et al.*, 2015), dónde se encontró un claro efecto estimulador de MF *in vivo* sobre el crecimiento ovárico, pero no en los ensayos *in vitro*. En varios estudios, se menciona el rol inhibitorio de MF sobre algunos aspectos de la reproducción tales como el desarrollo ovárico, el número de desoves y la fecundidad relativa (Marsden *et al.*, 2008; Tsukimura *et al.*, 2006). Sin embargo, existen fuertes evidencias del efecto estimulante que ejerce esta hormona sobre la reproducción de crustáceos (Huberman, 2000; Okumura, 2004; Nagaraju, 2007); además, existen trabajos que demuestran un efecto estimulador *in vitro* de MF en el ovario de la langosta *P. clarkii* (Rodríguez *et al.*, 2002). Una posible explicación sobre la ausencia de un efecto *in vitro* de MF sobre el ovario de *N. granulata*, es que esta hormona podría estar ejerciendo su efecto de manera indirecta. Es decir, que el efecto estimulador observado en los trabajos citados

fuera ejercido por otras hormonas estimulantes gonadales, cuya secreción podría estar inducida por el MF.

Por otro lado, estudios *in vivo* e *in vitro* realizados en camarones y cangrejos, indican que si bien el E₂ presenta una correlación positiva con la síntesis de Vg tanto en ovario como en hepatopánceas, tal correlación dependía de las dosis ensayadas y del período del ciclo reproductivo en que se encontraban las hembras (Coccia *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2018); más aún, el mecanismo de acción de esta hormona en crustáceos es aún desconocido (Yano y Hoshino, 2006; Subramoniam, 2017; Pan *et al.*, 2018;).

En el segundo experimento *in vitro*, se observó un incremento significativo en el contenido de Vg en las piezas de ovario que fueron incubadas únicamente con 17PG, así como en aquellos ovarios incubados con la combinación de la hormona y el formulado comercial de atrazina a la concentración de 5 mg/L; la ausencia de diferencias entre estos dos tratamientos nos permite suponer que el herbicida no estaría afectando el modo de acción de la 17PG sobre este órgano. Además, la incubación del ovario con el formulado ensayado (sin adición de hormona) demuestra que el herbicida por sí solo no ejerce un efecto directo sobre el crecimiento ovárico durante el período ensayado.

En relación al efecto de la 17PG sobre el ovario, los resultados de este experimento fueron consistentes con los obtenidos en el primer experimento *in vitro*, y permiten confirmar y ampliar la información reportada en investigaciones previas (Zapata *et al.*, 2003; Medesani *et al.*, 2015) sobre el efecto inductor de la

hormona 17PG sobre el proceso de vitelogénesis en hembras de *N. granulata* durante el período pre-reproductivo.

Los resultados del tercer experimento *in vitro* mostraron que la proporción de oocitos vitelogénicos se redujo significativamente sólo en aquellas piezas de ovario que fueron incubadas en presencia de un pedúnculo ocular y del formulado comercial. Estos resultados estarían confirmando que el herbicida no produce un efecto directo sobre el ovario, sino que su acción se manifestaría cuando se incorpora al medio de incubación el pedúnculo ocular donde se encuentra la GS.

Extrapolados estos resultados a un contexto *in vivo*, el posible incremento en la secreción de GIH desde los pedúnculos oculares podría inhibir alguna vía estimulante del crecimiento gonadal como, por ejemplo, la secreción de GSF desde el GT, o bien impedir directamente en el ovario que los oocitos avancen en su maduración, pudiendo darse ambas alternativas al mismo tiempo. Si bien el principal blanco de la GIH serían los sitios extraováricos de síntesis de Vg (por ejemplo, cuerpos grasos y hepatopáncreas), existe una fuerte evidencia que indica que un efecto directo de GIH ocurriría sobre los mismos ovarios inhibiendo la captación de la Vg por parte de los oocitos (Charniaux-Cotton, 1985), o bien, la síntesis de Vg por el propio ovario (Lee y Walker, 1995). Con respecto a esto, Nagaraju (2011) propuso dos vías fisiológicas por las cuales se podría llegar a explicar la inhibición de la captación de Vg causada por esta hormona. Una de las vías propuestas indica que la GIH se uniría a la Vg, imposibilitando la unión de la proteína al VgR; la otra propone que la GIH se uniría al VgR, bloqueando de esta manera el sitio de unión de la proteína.

Es importante destacar que, si bien al comienzo del período pre-reproductivo los valores iniciales de GIH son elevados, es esperable que a medida que avanza este período su nivel vaya disminuyendo permitiendo así el desarrollo normal del ovario (Zapata *et al.*, 2001). Si tal disminución no ocurre, o no lo hace a un ritmo normal, el crecimiento de ovario se vería inhibido o retrasado. Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* de la presente Tesis sugieren que el formulado comercial de atrazina podría estar actuando como un desorganizador endocrino, al no permitir el descenso normal de GIH durante el período pre-reproductivo.

Finalmente, estos resultados *in vitro* fueron consistentes con los obtenidos en los ensayos *in vivo*, que mostraron un descenso del crecimiento oocitario por efecto del formulado comercial de atrazina, en términos de un contenido de vitelogenina en el ovario y un tamaño de oocitos vitelogénicos significativamente menor, y de una menor proporción de tales oocitos. De esta manera, se integran evidencias obtenidas tanto *in vivo* como *in vitro* que reafirman la hipótesis sobre el papel relevante del formulado comercial de atrazina como desorganizador endocrino del crecimiento oocitario de crustáceos.

CAPÍTULO III

“Evaluación *in vivo* del efecto del herbicida atrazina sobre el crecimiento ovárico, en la langosta de agua dulce *Procambarus clarkii*.”

HIPÓTESIS

A continuación, se plantean las hipótesis de trabajo que fueron puestas a prueba experimentalmente en hembras adultas de *P. clarkii*:

- a. *El formulado comercial de atrazina (Gesaprim 90 WDG®) produce alteraciones en la proporción oocitaria y en el tamaño de los oocitos.*
- b. *El formulado comercial de atrazina (Gesaprim 90 WDG®) reduce los niveles de expresión relativa de ARNm de la vitelogenina sintetizada en el ovario y hepatopáncreas.*
- c. *El formulado comercial de atrazina (Gesaprim 90 WDG®) reduce el contenido total de proteínas vitelogénicas presentes en el ovario y hepatopáncreas, así como los niveles circulantes de estas proteínas.*
- d. *El formulado comercial de atrazina (Gesaprim 90 WDG®) produce alteraciones en la relación normal de esteroides sexuales.*
- e. *El formulado comercial de atrazina (Gesaprim 90 WDG®) reduce los niveles de las principales reservas energéticas y produce estrés oxidativo.*

A partir de dichas hipótesis se elaboraron los siguientes objetivos específicos:

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar en hembras adultas de *P. clarkii* mediante ensayos *in vivo*, los efectos subletales del herbicida atrazina sobre el crecimiento ovárico, la expresión relativa de ARNm de la lipoproteína vitelogenina, el contenido total de proteínas vitelogénicas y los niveles circulantes de esteroides sexuales.

Determinar los efectos subletales del herbicida atrazina sobre los niveles circulantes de glucosa y lactato, los niveles de glutatión, la peroxidación lipídica y los niveles de las principales reservas energéticas.

METODOLOGÍA

Los ensayos realizados en el presente Capítulo se llevaron a cabo en Pensilvania (Estados Unidos), en el laboratorio del Dr. Itzick Vatnick, perteneciente al Departamento de Biología de la Universidad de Widener. Además, se contó con la colaboración de la Dra. Patricia Silveyra perteneciente a los Departamentos de Pediatría, y Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Estatal de Pensilvania.

Condiciones generales de experimentación

A fin de poner a prueba las hipótesis planteadas, se utilizó una metodología enmarcada dentro de los lineamientos para bioensayos toxicológicos con animales acuáticos, establecidos por varias organizaciones internacionales competentes en el tema (APHA, 2005). En todos los experimentos, se respetó el código de ética para experimentación animal de la Declaración de Helsinki.

Muestreo y aclimatación de animales

Para llevar a cabo los experimentos, se adquirieron langostas adultas de *P. clarkii* del proveedor “Carolina Biological Supply”, ubicado en Carolina del Norte, Estados Unidos. Una vez en el laboratorio, las langostas fueron sexadas y separadas en acuarios de vidrio rectangulares. Durante el período de aclimatación,

de dos semanas de duración, los animales fueron mantenidos en los acuarios con refugios artificiales y aireación constante.

Ensayos in vivo

Una vez finalizado el período de aclimatación, se asignaron al azar los animales a cada tratamiento. Durante el ensayo, cada hembra fue aislada en un recipiente de plástico de 13 cm de diámetro, conteniendo 400 mL de agua de dilución, a fin de trabajar con unidades experimentales independientes (Figura 36). Eventualmente, una alícuota de la solución stock del herbicida fue agregada al agua de dilución, en los tratamientos correspondientes. Como agua de dilución (presente en todos los recipientes, incluyendo el tratamiento control) se utilizó agua de red declorada (dureza: 125 mg/L como equivalentes de CaCO_3).



Figura 36. Hembras de *P. clarkii* en frascos de plástico durante el ensayo in vivo bajo condiciones controladas de fotoperíodo, temperatura, pH y aireación.

Los ensayos se llevaron a cabo a 22 ± 1 °C de temperatura, con un fotoperíodo de 14:10 hs (luz: oscuridad), pH del agua = $7,6 \pm 0,2$ y aireación constante.

Diseño experimental

A partir de la formulación comercial de atrazina (Gesaprim 90 WDG®), que presenta un 90% del principio activo, se preparó semanalmente una solución stock a partir de una solución madre concentrada de 2 g/L del formulado en agua bidestilada, siguiendo con el mismo protocolo descrito para los ensayos realizados en la especie *N. granulata* (Capítulo I de la presentes Tesis).

Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones semi-estáticas, con renovación del medio dos veces a la semana; las hembras fueron alimentadas mediante una dieta compuesta de gránulos de alimento balanceado “Tetra Color” (Tetra®, con un 47,5% de proteína). El experimento comprendió un mes de duración, asignándose al azar entre 10 y 15 hembras adultas de *P. clarkii* a cada tratamiento. Las concentraciones nominales del principio activo del formulado comercial ensayadas fueron 1 y 5 mg/L, quedando definidos los siguientes grupos experimentales:

- **C:** hembras control, sin agregado del herbicida.
- **1 ATZ:** hembras expuestas a 1 mg/L del formulado comercial del herbicida atrazina.
- **5 ATZ:** hembras expuestas a 5 mg/L del formulado comercial del herbicida atrazina.

Validación de concentraciones nominales

A fin de validar las concentraciones nominales a las cuales se expusieron los animales, se tomaron muestras de 15 mL del agua de los recipientes a tiempo 0 y 72 hs de realizado el recambio del medio, para estimar la máxima variación de las concentraciones de exposición. Para esto, se utilizó un kit de ELISA para detección de atrazina (Abraxis®), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las absorbancias de las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro SoftMax Pro (Molecular Devices®), a una longitud de onda de 450 nm.

Obtención de muestras biológicas

Al finalizar el ensayo (día 30) se registró el peso fresco de cada animal empleando una balanza digital Mettler Toledo® (precisión: $\pm 0,01$ g), y se les extrajo posteriormente una muestra de hemolinfa de entre 200 a 300 μ L, mediante agujas 29G y jeringa de tuberculina, desde la base del 4º o 5º par de pereiópodos (patas caminadoras). Cada muestra fue recogida en tubos eppendorf conteniendo 15 μ L de oxalato de potasio al 10% e inhibidor de proteasas PMSF (0,01 mM), en una relación 3:1 (v/v), para evitar la coagulación de la hemolinfa y la degradación de las proteínas presentes en la misma. Más tarde, los animales fueron anestesiados sumergiéndolos completamente en un baño de agua fría a 0 °C durante 5 min, para posteriormente ser sacrificados. A continuación, utilizando bisturí y pinza de disección, se obtuvieron muestras de ovario, hepatopáncreas y músculo abdominal, y se registraron los pesos frescos de estos tejidos empleando

una balanza digital Ohaus® (precisión: $\pm 0,0001$ g). Las muestras fueron guardadas en tubos eppendorf y conservadas a -20 °C, hasta su posterior procesamiento, a fin de determinar diversas variables incluidas en el listado que se indican a continuación:

Variables analizadas

❖ Supervivencia, porcentaje de hembras ovígeras y eventos de muda

Los animales fueron inspeccionados diariamente, registrándose la fecha de muda, su condición (ovígera/no ovígera) o eventual muerte. Los individuos que murieron durante el experimento fueron descartados, y al finalizar el ensayo se determinó la supervivencia, el porcentaje de hembras ovígeras y el porcentaje de hembras que mudaron su exoesqueleto.

❖ Ganancia en peso e índices gonadosomático y hepatosomático

Con los datos del peso fresco de todos los animales, y los pesos frescos de sus respectivos ovarios y hepatopáncreas disecados, se calcularon los índices gonadosomático (IG) y hepatosomático (IH), según las siguientes ecuaciones:

- $IG = (\text{Peso fresco gonadal} / \text{peso fresco corporal}) \times 100.$
- $IH = (\text{Peso fresco hepatopancreático} / \text{peso fresco corporal}) \times 100.$

❖ **Reservas energéticas**

Niveles de proteínas en músculo

Los niveles de proteínas totales en el músculo abdominal fueron cuantificados mediante el método de Bradford (1976), adaptado a la especie en estudio. Los tejidos fueron homogeneizados en solución de PBS 1X en una relación 1:1 (p/v). Más tarde, se tomaron 20 μ L de cada homogenato y se mezclaron con 980 μ L de reactivo de Bradford. Los tubos fueron invertidos tres veces e incubados a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se agregaron 300 μ L de cada muestra, por triplicado, en placas de 96 pocillos. Finalmente, se preparó una curva de calibración (0 a 0,2 mg/mL) utilizando como patrón BSA (Sigma Chemical Co.[®]), a una concentración de 1 mg/mL. Las absorbancias de las muestras y de la curva fueron medidas en un espectrofotómetro SoftMax Pro (Molecular Devices[®]), a una longitud de onda de 590 nm.

❖ ***Niveles circulantes de esteroides sexuales***

Los niveles circulantes de E₂ y testosterona (T) fueron medidos en las muestras de hemolinfa de las hembras, mediante kits de ELISA específicos para la determinación de dichas hormonas (Cayman[®]). Adicionalmente, la hemolinfa de algunos machos stocks (N=12) fue extraída al final del ensayo, para realizar las mismas determinaciones con propósitos comparativos.

Las muestras fueron diluidas en un buffer ELISA, a una dilución 1:10 para las hembras y 1:100 para los machos, y se realizó una curva estándar (6,6 a 4000 pg/mL, en el caso de E₂ y 3,9 a 500 pg/mL, en el caso de T) con los reactivos incluidos en el kit, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Más tarde, se adicionaron 50 µL de cada concentración de la curva estándar, así como 50 µL de cada muestra, por duplicado, en placas de 96 pocillos. Las absorbancias de las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro SoftMax Pro (Molecular Devices®), a una longitud de onda de 412 nm.

❖ ***Parámetros de estrés metabólico y oxidativo***

a) Niveles de glucosa en hemolinfa

Los niveles de glucosa en hemolinfa fueron determinados mediante el kit comercial “Glucose Colorimetric assay” (Cayman®). Para esto, las muestras fueron diluidas en buffer de glucosa, a una dilución 1:10 y se realizó una curva estándar (0 a 0,05 mg/mL) con los reactivos incluidos en el kit, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Más tarde, se adicionaron 15 µL de cada concentración de la curva estándar, así como 15 µL de cada muestra por duplicado, en placas de 96 pocillos, y se continuó con el protocolo indicado por el fabricante. Las absorbancias de las muestras fueron más tarde medidas en un espectrofotómetro SoftMax Pro (Molecular Devices®), a una longitud de onda de 515 nm.

b) Niveles de lactato en hemolinfa

Los niveles de lactato en hemolinfa fueron determinados mediante el kit comercial “L-Lactate assay” (Cayman®). Para esto, las muestras fueron diluidas en buffer de lactato, a una dilución 1:10 seguido de una dilución 1:2 en ácido metafosfórico (MPA) para precipitar las proteínas. Se realizó una curva estándar (0 a 0,1 mg/mL) con los reactivos incluidos en el kit, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Más tarde, se adicionaron 20 µL de cada concentración de la curva, así como 20 µL de cada muestra por duplicado, en placas de 96 pocillos, y se continuó con el protocolo indicado por el fabricante. Las absorbancias de las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro de fluorescencia SpectraMax M5 (Molecular Devices®), a una longitud de onda de excitación y emisión de 535 y 590 nm, respectivamente.

c) Niveles de TBARS en hepatopáncreas

Como marcador de riesgo de estrés oxidativo se analizó la peroxidación de lípidos. Para esto, se utilizaron piezas de hepatopáncreas de 25 mg, que fueron homogeneizadas en 250 µL de buffer RIPA y centrifugadas a 1.600xg durante 10 min a 4 °C. Luego, con el sobrenadante obtenido, se determinaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) mediante el kit colorimétrico “TBARS (TCA method) assay” (Cayman®). Se realizó una curva estándar (0 a 0,4 mg/mL) con los reactivos incluidos en el kit. Para ello, se adicionaron 100 µL de cada concentración de la curva, así como 100 µL de cada muestra por duplicado, en

placas de 96 pocillos, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las absorbancias de las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro SoftMax Pro (Molecular Devices®), a una longitud de onda de 530 nm.

d) Niveles de glutatión en hepatopáncreas

Para determinar los niveles de glutatión reducido se utilizaron piezas de hepatopáncreas de 20 mg, que fueron homogeneizadas en 100 µL de buffer MES y centrifugadas a 10.000xg durante 15 min a 4 °C. Más tarde, con el sobrenadante obtenido, se determinaron los niveles de glutatión mediante el kit comercial “Glutathione assay” (Cayman®). De este modo, se realizó una curva estándar (0 a 0,16 mg/mL) con los reactivos incluidos en el kit. Luego, se adicionaron 50 µL de cada concentración de la curva estándar, así como 50 µL de cada muestra por duplicado, en placas de 96 pocillos, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las absorbancias de las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro SoftMax Pro (Molecular Devices®), a una longitud de onda de 410 nm.

❖ Expresión relativa de ARNm de vitelogenina

Al finalizar el ensayo, una porción del ovario y hepatopáncreas de cada hembra fue congelada en nitrógeno líquido y conservada a -80 °C hasta su posterior procesamiento, para determinar la expresión relativa del ARNm de Vg. Para extraer el ARN, cada porción de órgano fue pulverizada en nitrógeno líquido y el polvo obtenido fue homogenizado en TRIzol (Life Technologies®); la homogeneización se realizó mediante una serie de agujas 18G, 21G y 23G,

acopladas a una jeringa de 1 mL. Los homogenatos resultantes fueron centrifugados a 2000 rpm durante 5 min, en una centrífuga modelo 5415D (Eppendorf®). Cada sobrenadante recolectado fue purificado utilizando el kit comercial “Direct-zol RNA MiniPrep” (Zymo Research®), que permite obtener ARN total libre de ADN, mediante una columna Zymo-Spin IIC y digestión con la enzima ADNasa I. El ARN purificado fue cuantificado utilizando un nanodrop (Thermo Fisher®), mientras que la calidad y la ausencia de ADN genómico fueron verificadas con un Bioanalyzer 2100 (Agilent Genomics®). A continuación, cada ARN obtenido fue retrotranscrito mediante el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems®), en presencia de inhibidor de ARNasas, de acuerdo a el protocolo descrito por el fabricante. El ADN copia (ADNc) resultante fue diluido con agua libre de ARNasas, para la cuantificación de transcritos mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real; para esto se utilizaron cebadores específicos (Tabla 4) para Vg de *P. clarkii* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/KR135171.1>) y se utilizó ARNr 18s como control de normalización, el cual fue validado para la especie (Jiang *et al.*, 2015). Para las reacciones de PCR se mezclaron 10 ng (18s) o 40 ng (Vg) de ADNc con 5 µL de Power Up SYBR Green Master Mix (Life Technologies®) y cebadores específicos a una concentración final de 10 mM, en un volumen final de 10 µL.

| | |
|------------------------|---------------------------|
| Vg sentido | 5'-CCAGAAGACGCCACAAGAA-3' |
| Vg antisentido | 5'-CAGAAGGCATCAGCCAATC-3' |
| 18s sentido | 5'-TCCGCATCACACTCACGT-3' |
| 18s antisentido | 5'-TGGAACCCTCTCCACAGG-3' |

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados para la técnica PCR en tiempo real.

Las muestras de PCR fueron corridas por triplicado en placas de 384 pocillos, utilizando un termociclador de PCR en tiempo real 7900 HT (Applied Biosystems®), bajo las siguientes condiciones: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 2 min, y 40 ciclos a 95 °C durante 15 seg y a 60 °C durante 1 min. Cada muestra fue analizada por triplicado, junto con controles sin molde para monitorear contaminación con ADN. Los productos acumulados de ADN fueron monitoreados por el sistema de detección del equipo, y los resultados fueron registrados y guardados continuamente en tiempo real durante la reacción. Estos resultados fueron posteriormente validados, mediante la realización de curvas de disociación de los productos de PCR luego de la amplificación. De este modo, para cada gen amplificado se realizó una curva de disociación aumentando la temperatura de 65 a 95 °C, con aumentos progresivos de 0,5 °C; la fluorescencia de los productos fue registrada en simultáneo, para corroborar la especificidad de la amplificación. Finalizada la reacción, el tamaño del producto fue verificado corriendo una alícuota de la reacción en un gel de agarosa al 2% (ver Anexo: *Recetas*). Adicionalmente, los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit “QIAquick PCR Purification” (QIAGEN®) y enviados a la compañía Genewiz® para confirmar su secuencia.

La cantidad relativa de ARNm en cada muestra fue estimada por el método de cuantificación relativa, en el cual se comparan el valor del ciclo en el que se alcanza el umbral de detección de fluorescencia (en inglés cycle threshold - Ct) para el gen de interés y el Ct para el gen de normalización. El valor de Ct corresponde al ciclo de la PCR en el cual la fluorescencia alcanza un valor determinado (threshold). El Ct de cada muestra fue calculado como el umbral de fluorescencia (Rn) utilizando el programa QuantStudio Real Time PCR (Applied Biosystems®), con un umbral fijo de 0,4 Rn y una línea de base automática. La cantidad relativa de ARNm de Vg fue normalizada en cada muestra con el valor de ARNr 18s, para su expresión como unidades relativas, utilizando el método descrito por Livak *et al.* (2001).

❖ ***Contenido total de proteínas vitelogénicas***

El contenido total de proteínas vitelogénicas en ovario, hepatopáncreas y hemolinfa fue determinado mediante la técnica ELISA, siguiendo con el mismo protocolo de procesamiento de muestras biológicas detallado en el Capítulo I (ver *Metodología: Procesamiento de muestras de ovario y hepatopáncreas*), bajo las condiciones recomendadas por Ferré *et al.* (2012).

Técnica inmunoenzimática ELISA

Las muestras fueron diluidas en buffer coating, en una relación 1:3 (p/v) para el ovario y hepatopáncreas, y 1:10 (v/v) para la hemolinfa. La curva estándar

de Vg (0 a 270 ng) fue preparada con una solución de Vg purificada de ovario de *C. quadricarinatus*, diluida 1:5000. A continuación, se adicionaron 50 µL de cada concentración de la curva, así como 50 µL de cada muestra, por triplicado, en placas de 96 pocillos (Corning®).

La primera incubación de las placas se realizó durante 90 min en cámara húmeda a 37 °C. Una vez finalizada esta incubación, se descartó el contenido total de las placas y se realizó un lavado agregando 300 µL de PBS 1X por pocillo. A continuación, se procedió al bloqueo de sitios inespecíficos con 300 µL de PBS 1X, conteniendo BSA al 2%. Las placas fueron incubadas durante 2 hs a 37 °C en cámara húmeda y transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados sucesivos de cada placa con PBS-Tween al 0,05%. Luego, se adicionó a cada pocillo un volumen de 50 µL del anticuerpo primario anti-Vg de *C. quadricarinatus*, en una dilución 1:800 realizada en PBS-Tween al 0,05% conteniendo BSA al 0,4%. Las placas fueron incubadas durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Transcurrido este período, se realizaron tres lavados sucesivos de cada placa con PBS-Tween al 0,05%. A continuación, se adicionó un volumen de 50 µL por pocillo del anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado con HRP peroxidasa (Bio-Rad laboratories®) en una dilución 1:500 en PBS-Tween al 0,05% conteniendo BSA al 0,4%. La incubación de las placas con el anticuerpo secundario se realizó en cámara húmeda durante 2 hs a 37 °C. Finalizada esta incubación, se efectuaron cuatro lavados con PBS-Tween al 0,05%, colocando a continuación en cada pocillo 100 µL de solución de revelado, con ABTS como cromógeno, e incubando durante 15 min a temperatura ambiente. Por último, la reacción colorimétrica se detuvo mediante el agregado a cada pocillo de 100 µL de ácido oxálico al 2%. Las

absorbancias de las muestras fueron medidas en un espectrofotómetro SpectraMax M190 (Molecular Devices®), a una longitud de onda de 415 nm.

Para el cálculo de los niveles finales de Vg en las muestras analizadas, se aplicó la misma fórmula empleada en el Capítulo I (ver Metodología: *Técnica inmunoenzimática ELISA*).

❖ ***Tamaño oocitario***

Una porción del ovario de cada hembra fue procesada mediante técnicas histológicas de rutina, para determinar bajo microscopio óptico el estadio de maduración ovárica y los posibles efectos histopatológicos por exposición al herbicida. Para esto, al finalizar el ensayo las piezas de ovario fueron fijadas en paraformaldehído al 10%, deshidratadas en una serie de alcoholes en graduación creciente, y aclaradas en xilol. Posteriormente, las piezas fueron incluidas en parafina (Paraplast®) y se realizaron cortes de aproximadamente 5 a 8 μm de espesor, empleando un ultramicrotomo automático (Tissue-Tek®). Finalmente, los cortes fueron coloreados con hematoxilina-eosina.

Se seleccionó una porción representativa de cada corte del ovario, por animal, a fin de determinar el área de los diferentes tipos de oocitos, mediante el uso de un microscopio óptico modelo BX51 (Olympus®). Los oocitos se caracterizaron como pre-vitelogénicos, intermedios o vitelogénicos según su tamaño y grado de basofilia. Para determinar el tamaño oocitario, se tomaron las

mediciones del diámetro de los oocitos como fue detallado en el Capítulo I (ver Metodología: *Tamaño y proporción de los oocitos*).

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* se aplicó el mismo procedimiento empleado en el Capítulo I, utilizando los programas R Studio (versión 3.5.0) y GraphPad Prism (versión 5.0). En todos los casos el nivel de confianza utilizado fue del 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Validación de concentraciones nominales

El análisis de las muestras de agua correspondientes a tiempo 0 y 72 hs, permitió verificar que las concentraciones nominales inicialmente definidas se encontraban próximas al promedio de las concentraciones validadas mediante la técnica ELISA, a los dos intervalos de tiempo mencionados (Tabla 5).

| [ATZ] nominal (mg/L) | Tiempo (hs) | [ATZ] formulado comercial (mg/L) |
|---------------------------------|------------------------|---|
| 0 (control) | 0 | 0,00 |
| | 72 | 0,05 |
| 1 | 0 | 0,59 |
| | 72 | 1,65 |
| 5 | 0 | 3,72 |
| | 72 | 5,97 |

Tabla 5. Concentraciones nominales del formulado comercial de atrazina (ATZ), en comparación con las concentraciones validadas medidas en muestras de agua a tiempo 0 y 72 hs.

❖ *Supervivencia, porcentaje de hembras ovígeras y eventos de muda*

La supervivencia de los individuos expuestos durante un mes al formulado comercial de atrazina (porcentaje de mortalidad), así como el porcentaje de hembras ovígeras y los eventos de muda, se muestran en la Tabla 6. No se

encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$) en el porcentaje de mortalidad. En cuanto al porcentaje de mudas y de hembras ovígeras, tampoco fueron detectadas diferencias significativas ($p>0,05$) con respecto al grupo control.

| [ATZ] formulado comercial (mg/L) | N_i | N_f | Mortalidad (%) | Mudas (%) | Ovígeras (%) |
|----------------------------------|-------|-------|----------------|-----------|--------------|
| 0 (control) | 12 | 10 | 0 | 8,33 | 8,33 |
| 1 | 8 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 12 | 12 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 6. Supervivencia (porcentaje de mortalidad), porcentaje de mudas y porcentaje de hembras ovígeras registrados en los grupos experimentales al finalizar el ensayo. N_i = número de individuos al comienzo del ensayo. N_f = número de individuos utilizados al finalizar el ensayo para la medición de las diferentes variables, excluyendo las hembras muertas y en condición de ovígera.

❖ Índices gonadosomático y hepatosomático

Se observó un incremento significativo ($p<0,05$) en el IH de hembras expuestas a las dos concentraciones ensayadas del formulado comercial de atrazina (1 mg/L y 5 mg/L). Por el contrario, las variaciones observadas en el IG de las hembras expuestas no mostraron diferencias significativas ($p>0,05$) con respecto al grupo control (Figura 37).

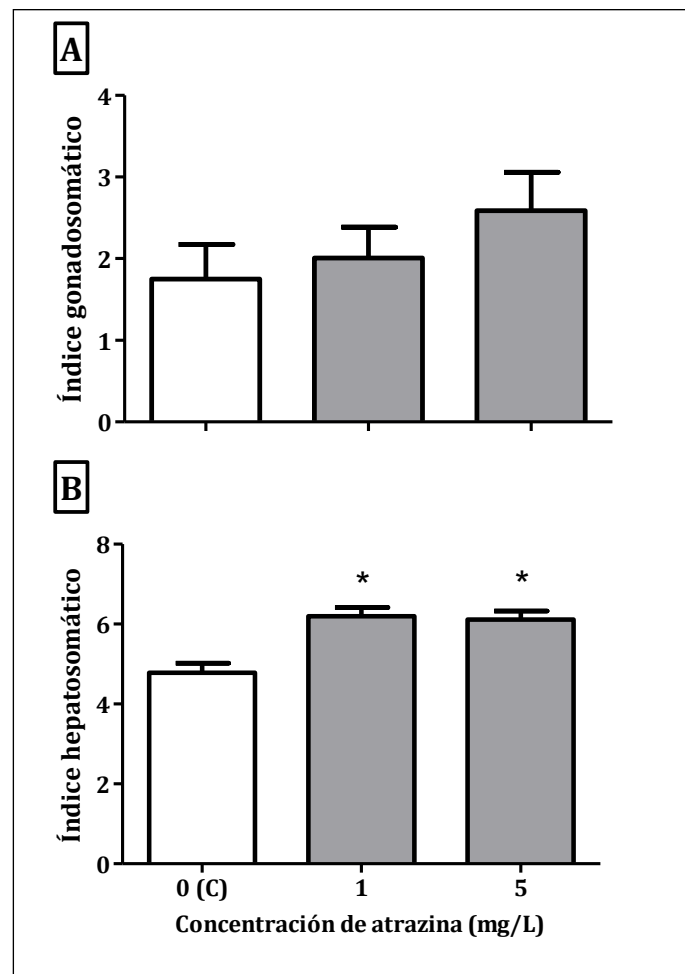


Figura 37. Índices calculados en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. A: Índice gonadosomático. B: Índice hepatosomático. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

❖ *Reservas energéticas*

Niveles de proteínas en músculo

Los niveles de proteínas totales, detectados en el músculo abdominal de las hembras expuestas al formulado comercial, no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en comparación con el grupo control (Figura 38).

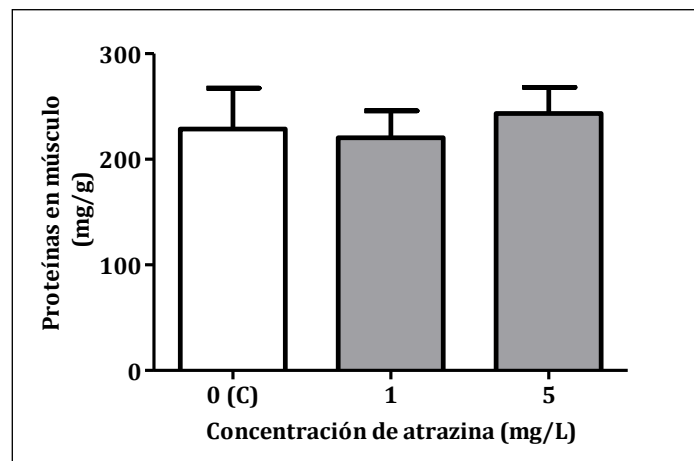


Figura 38. Niveles de proteínas (mg/g) en el músculo abdominal de los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

❖ Niveles circulantes de esteroides sexuales

Si bien no fueron detectadas diferencias significativas ($p > 0,05$) en los niveles hemolinfáticos de T (Figura 39.B), se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en los niveles circulantes de E_2 , en las hembras expuestas a 5 mg/L de atrazina, en comparación con el grupo control (Figura 39.A). La proporción T/ E_2 fue de 3,7 en las hembras control y de 1,1 en las hembras expuestas a la concentración más alta de atrazina. A modo de referencia, cabe mencionar que la proporción T/ E_2 en los machos control fue estimada en 38,5.

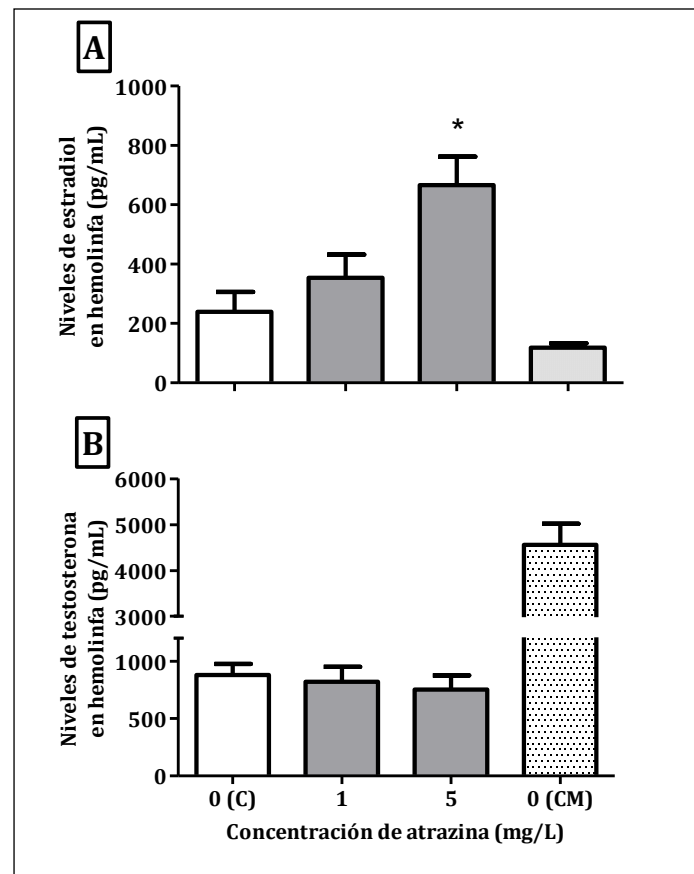


Figura 39. Niveles hemolinfáticos de esteroides sexuales (pg/mL) en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. A: niveles de E₂. B: niveles de T. Los valores se expresan como la media ± el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control. Los datos de los machos control (CM) se encuentran incluidos con propósitos comparativos.

❖ *Parámetros de estrés metabólico y oxidativo*

Niveles de glucosa y lactato en hemolinfa

Si bien los niveles de la glucosa hemolinfática tienden a disminuir levemente en las hembras expuestas a la mayor concentración de atrazina, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al grupo control (Figura 40); por el contrario, los niveles de lactato en hemolinfa se vieron aumentados de manera significativa ($p < 0,05$) en las hembras expuestas a 5 mg/L (Figura 41).

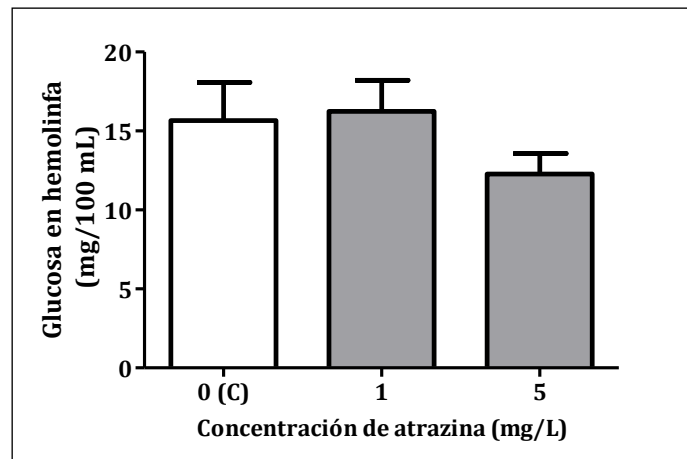


Figura 40. Niveles de glucosa hemolinfática (mg/100 mL) de los diferentes grupos experimentales al término del ensayo *in vivo*. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

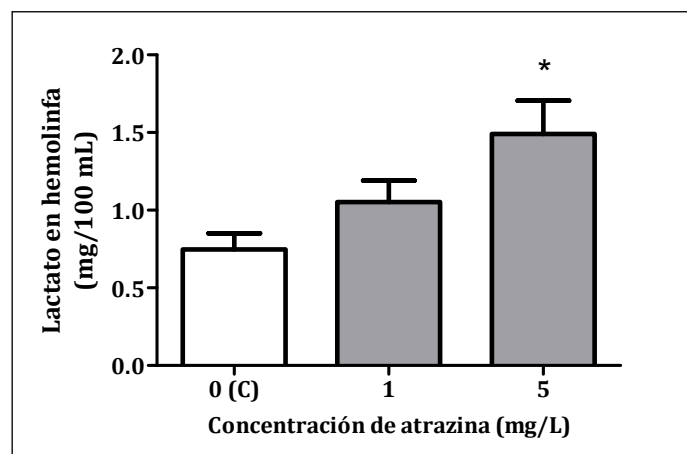


Figura 41. Niveles de lactato hemolinfático (mg/100 mL) de los diferentes grupos experimentales al término del ensayo *in vivo*. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

Niveles de glutatión y TBARS en hepatopáncreas

Un marcado y significativo ($p < 0,05$) aumento en los niveles de glutatión fue observado en el hepatopáncreas de las hembras expuestas a 5 mg/L, en

comparación tanto con el control, como con las hembras expuestas a la concentración más baja de atrazina (Figura 42). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la peroxidación lipídica, estimada mediante TBARS, entre los grupos experimentales (Figura 43).

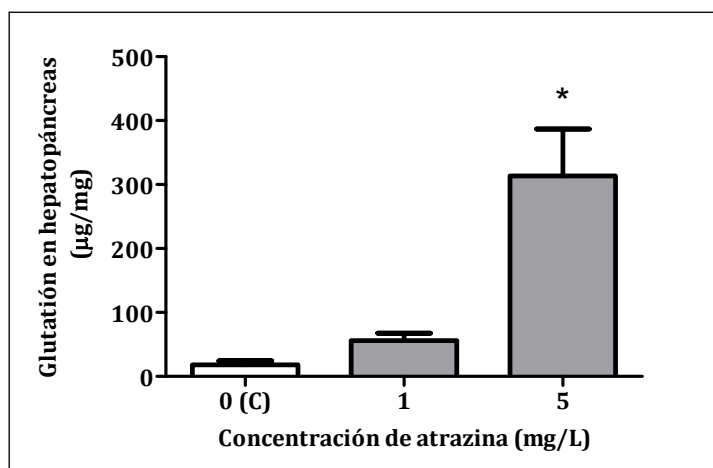


Figura 42. Niveles de glutatión ($\mu\text{g}/\text{mg}$) en el hepatopáncreas de los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

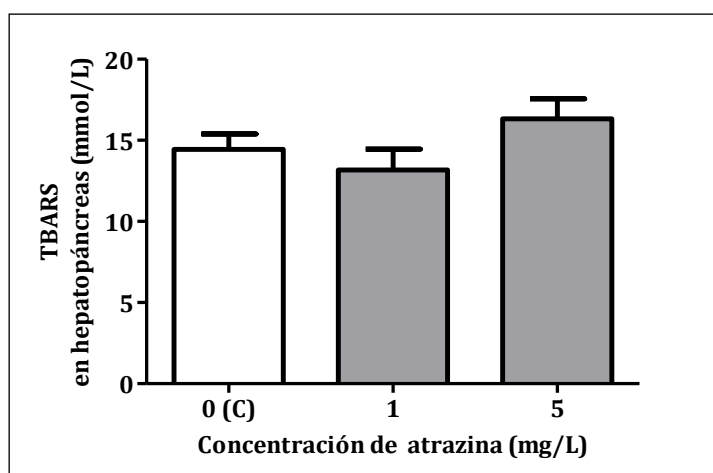


Figura 43. Niveles de TBARS ($\mu\text{mol}/\text{L}$) en el hepatopáncreas de los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

❖ *Expresión relativa de ARNm de vitelogenina*

Un descenso en la expresión relativa de Vg, tanto en el ovario como en el hepatopáncreas, fue observado en el grupo expuesto a atrazina siendo significativamente más bajo ($p < 0,05$) en las hembras expuestas a la concentración de 5 mg/L respecto al grupo control. (Figura 44)

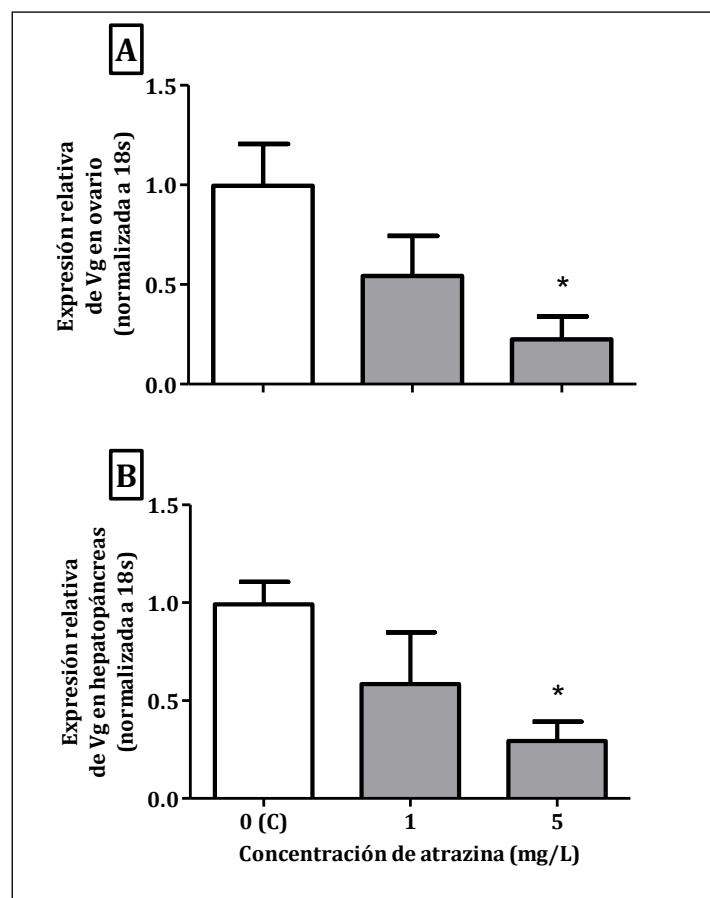


Figura 44. Expresión relativa de ARNm de Vg en A: ovario y B: hepatopáncreas, en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo in vivo. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

❖ *Contenido total de proteínas vitelogénicas*

Más allá de no mostrar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) con respecto al grupo control, un descenso de aproximadamente el 40% en el contenido de proteínas vitelogénicas fue observado en el ovario de las hembras expuestas a las dos concentraciones de atrazina ensayadas (Figura 45.A).

En cuanto al contenido de proteínas vitelogénicas en el hepatopáncreas y en la hemolinfa, los resultados indicaron una ausencia de diferencias ($p > 0,05$) entre los tratamientos y el grupo control, alcanzando todos los grupos experimentales niveles de Vg similares (Figuras 45.B y 45.C).

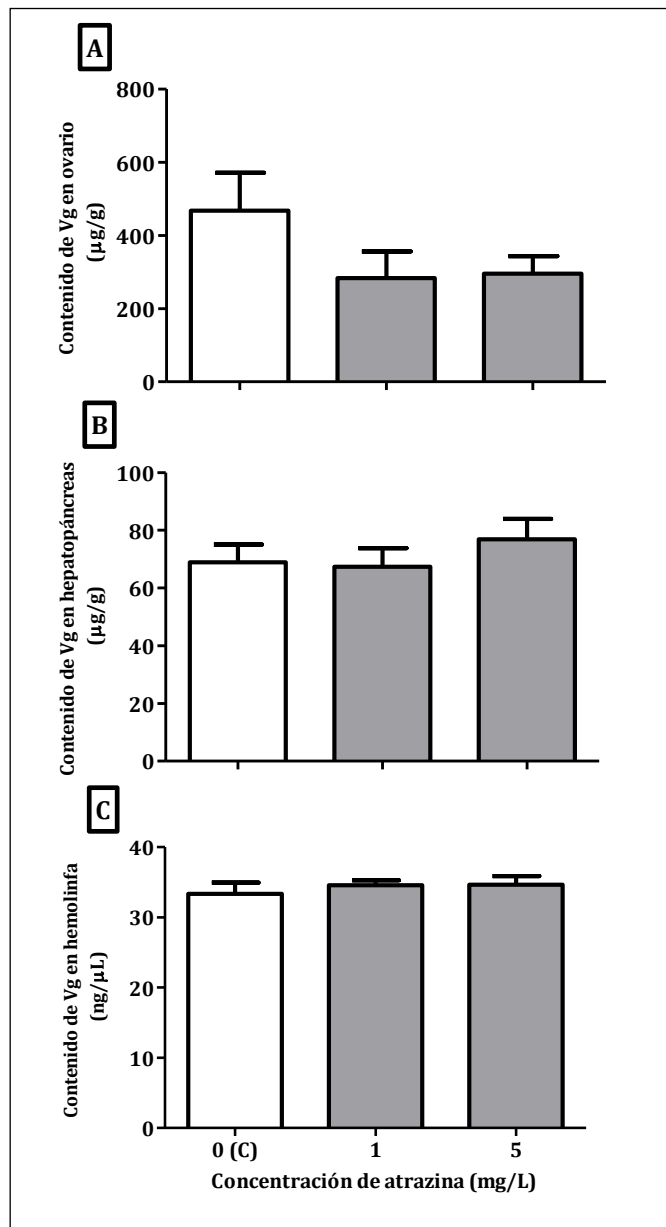


Figura 45. Contenido de proteínas vitelogénicas ($\mu\text{g/g}$) en A: ovario, B: hepatopáncreas y C: hemolinfa, en los diferentes grupos experimentales al término del ensayo *in vivo*. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar.

❖ **Tamaño oocitario**

En el análisis histológico de los cortes realizados en el ovario, se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) en el tamaño de los oocitos vitelogénicos en el

grupo de animales expuestos a la menor concentración de atrazina (1 mg/L), en comparación con el grupo control; además, se encontró una disminución significativa ($p < 0,05$) en el tamaño de los oocitos pre-vitelogénicos en las hembras expuestas a ambas concentraciones, respecto al grupo control (Figura 46).

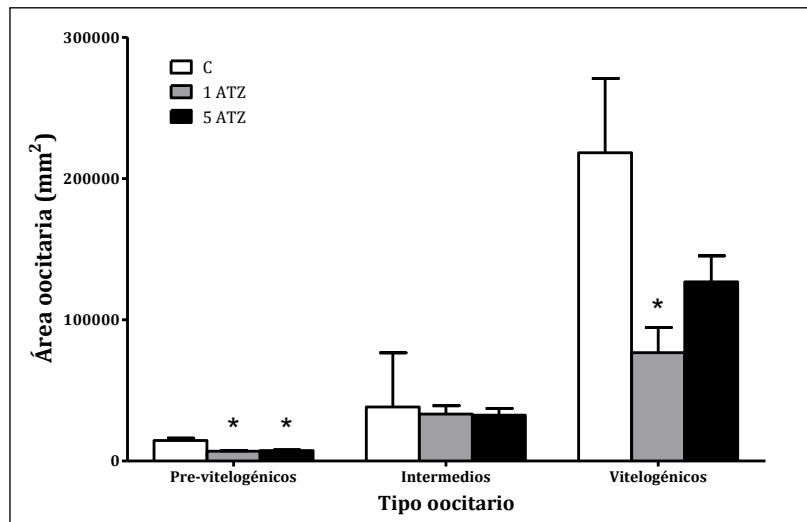


Figura 46. Área relativa de los diferentes tipos de oocitos (μm^2) en el ovario de hembras control (C) y expuestas a 1 y 5 mg/L del formulado comercial de atrazina (ATZ) al término del ensayo in vivo. Los valores se expresan como la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

En la Figura 47 se muestran dos secciones histológicas de ovario de hembras de *P. clarkii*, correspondientes al tratamiento control (A) y al tratamiento 1 mg/L del formulado comercial de atrazina (B). En la primera imagen (A) se observan oocitos vitelogénicos normales; mientras que en la segunda imagen (B) se observan oocitos vitelogénicos tempranos, indicando un grado de madurez ovárica menor en las hembras expuestas a 1 mg/L de atrazina que en el control.

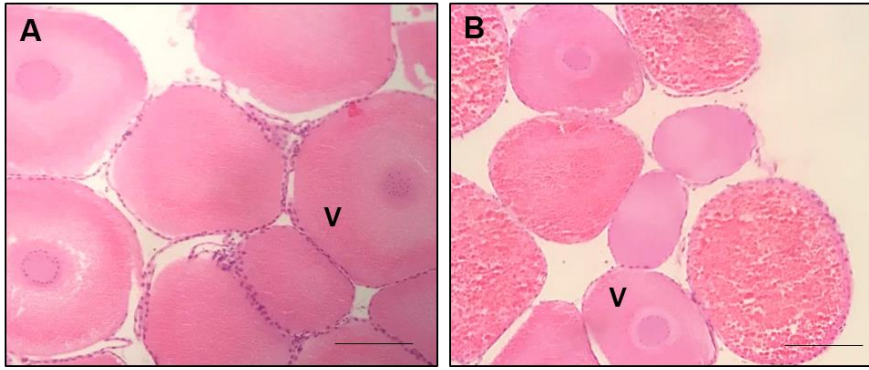


Figura 47. Secciones histológicas de ovario de hembras de *P. clarkii*: A: ovario control conteniendo solo oocitos vitelogénicos (V) normales. B: ovario con oocitos vitelogénicos tempranos (V) de hembras expuestas al formulado comercial de atrazina (1 mg/L). Barra= 10 μ m.

DISCUSIÓN

Uno de los objetivos principales del presente Capítulo, fue determinar si los resultados obtenidos previamente en el cangrejo estuarial *N. granulata* se podían generalizar a otras especies representativas de crustáceos superiores; para ello, se decidió validar tales resultados en la langosta de agua dulce *P. clarkii*. Otro de los objetivos importantes del presente Capítulo fue aprovechar las ventajas de este segundo modelo experimental para medir variables adicionales y complementarias a las determinadas previamente en *N. granulata*, a fin de poder ampliar el conocimiento sobre los efectos del formulado comercial de atrazina en crustáceos decápodos.

En el presente estudio, se pudo demostrar que las concentraciones ensayadas del formulado comercial de atrazina (1 y 5 mg/L) fueron subletales para la especie en estudio, ya que no observamos una mortalidad significativa. En cuanto a las diferentes variables analizadas, encontramos un descenso significativo en la expresión de los transcritos de Vg en el ovario y hepatopáncreas, así como una reducción en el tamaño de oocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos en las hembras expuestas. Estos resultados se vieron acompañados de un menor contenido de proteínas vitelogénicas en el ovario, a ambas concentraciones de atrazina ensayadas.

Por otro lado, se observó que la proporción normal de T/E₂ de *P. clarkii*, fue muy diferente entre ambos sexos, siendo de 3,7 en hembras y diez veces mayor en

machos (38,5). Proporciones similares a estas, han sido reportadas en otras especies de langostas de agua dulce (Mirheydari *et al.*, 2013, 2014). Las hembras expuestas a 5 mg/L de atrazina no presentaron cambios en los niveles hemolinfáticos de T, pero sí mostraron niveles incrementados de E₂. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en estudios realizados en hembras del camarón *Neocaridina denticulata* expuestas a insecticidas clorados, donde se observó un aumento tanto de E₂ como de Vg (Huang *et al.*, 2006). Más aún, en machos de la misma especie los mismos autores encontraron un descenso de T en correlación con la inducción de Vg y modificaciones en los apéndices copuladores (Huang *et al.*, 2004).

Si bien existen publicaciones que indican que la atrazina podría inducir la actividad de la enzima aromatasa en varias especies de vertebrados, provocando un aumento de estrógenos (Hayes *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2008), hasta el momento no existen evidencias que demuestren la expresión de esta enzima en crustáceos, pero sí han sido identificadas otras enzimas de la vía esteroidogénica (Swevers *et al.*, 1991). De todas maneras, es posible que alguna otra vía enzimática involucrada en la síntesis de estrógenos pudiera encontrarse potenciada en *P. clarkii* por efecto del herbicida. En un estudio realizado en juveniles de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, la exposición a 2,5 mg/L de atrazina provocó un incremento en la proporción de hembras (Mac Loughlin *et al.*, 2016), posiblemente por el aumento observado en los niveles circulantes de E₂, o algún otro estrógeno.

Por lo tanto, el efecto inhibitorio de atrazina sobre la expresión relativa y contenido de Vg no estaría relacionado con un descenso en la secreción de

esteroides sexuales, en particular de E₂. Este resultado descarta esa posible vía de interferencia hormonal del formulado comercial de atrazina, brindando así un apoyo adicional a los resultados de desorganización hormonal reportados en los Capítulos I y II, es decir, que el retraso observado en el crecimiento ovárico de las hembras expuestas al herbicida, estaría muy relacionado con una interferencia del formulado comercial sobre la secreción de neurohormonas pedunculares.

Si bien, se ha observado una correlación positiva entre los niveles circulantes de E₂ y Vg en camarones y cangrejos (Qunitio *et al.*, 1994; Warriier *et al.*, 2001; Coccia *et al.* 2010; Merlin *et al.*, 2015), esto no fue evidente en el presente estudio, ya que observamos un incremento en los niveles de E₂, pero un descenso significativo de la expresión relativa de Vg en ovario, así como del contenido de Vg en este mismo órgano en las hembras expuestas al herbicida. Una posible explicación para esta aparente contradicción podría ser que, durante las primeras semanas del experimento *in vivo*, hayan aumentado los niveles de E₂ inducidos por el herbicida, y que estos niveles hayan sido capaces de estimular la síntesis de Vg (principalmente en el hepatopáncreas) y su acumulación en el ovario; pero que hacia el final del ensayo haya ocurrido un efecto inhibitorio de atrazina sobre la expresión relativa de Vg, tanto en ovario como en hepatopáncreas, y que éste efecto sea más relevante que la estimulación ejercida por los estrógenos. Esta hipótesis se encuentra apoyada, por un lado, por el aumento significativo del IH en las hembras expuestas a las dos concentraciones ensayadas de atrazina, posiblemente como un efecto estimulador temprano del E₂ sobre el hepatopáncreas; por otro lado, si bien la expresión relativa de Vg al final del experimento resultó inhibida, no se observó una disminución significativa en IH e

IG, ni en el contenido de Vg en el ovario, sugiriendo que podría haber ocurrido una acumulación compensatoria temprana de Vg en el ovario; y por último, la ausencia de diferencias en el tamaño oocitario en los ovarios de las hembras expuestas a 5 mg/L de atrazina, podría estar en correlación con el aumento significativo de E₂ observado a esa misma concentración.

En el Capítulo I se observó que la exposición a bajas concentraciones (0,05 y 0,5 mg/L) del formulado comercial de atrazina, favorece la acumulación de Vg en el hepatopáncreas de *N. granulata* durante el período pre-reproductivo. Un patrón similar, pero en otra escala temporal, parecería ocurrir en *P. clarkii*. Si bien no se han realizado mediciones a tiempos intermedios, es posible que el herbicida induzca la acumulación de Vg en el ovario y hepatopáncreas a tiempos cortos de exposición (por ejemplo, un mes), ya sea por un aumento del E₂ o por otro tipo de mecanismo; y que, a tiempos largos de exposición, inhiba la síntesis de Vg por un mecanismo de acción que no se relacionaría con la regulación de esteroides sexuales. El herbicida podría afectar la producción de Vg mediante diferentes procesos; una posibilidad podría ser la interferencia con la regulación endocrina de la reproducción en las vías inhibitorias de este proceso (como ser la neurohormona GIH), o sobre otras vías estimuladoras, entre las que se pueden mencionar al MF, la 17PG y al GSF, entre otros posibles candidatos (Fingerman, 1997; Nagaraju, 2011).

Otro tema a ser considerado, es el efecto del herbicida sobre el metabolismo y sobre diferentes parámetros relacionados al estrés oxidativo. Las hembras expuestas a atrazina no presentaron alteraciones en el contenido de proteínas

totales del músculo abdominal; pero sí presentaron un incremento en los niveles hemolinfáticos de lactato, lo que indicaría que estaría ocurriendo un esfuerzo metabólico extra para obtener la energía requerida frente al estrés causado durante la exposición al herbicida. De acuerdo a Santos y Keller (1993), el lactato estimula la secreción de la hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH), propuesta como una “hormona del estrés” (Chang *et al.*, 1999), que deriva en una alta exportación de glucosa a la hemolinfa como sustrato para una mayor anaerobiosis. Por lo tanto, si bien se observó en los animales expuestos un nivel relativamente estable de glucosa hemolinfática, este balance sería probablemente el resultado del aumento de exportación de glucosa desde el hepatopáncreas, por un lado, junto con un posible aumento en la tasa metabólica evidenciado por la alta producción de lactato, por otro.

Con respecto al estrés oxidativo que puede desencadenar la exposición a ciertos contaminantes ambientales, existen estudios previos realizados en moluscos que demuestran que la mezcla de atrazina con glifosato causa peroxidación lipídica y daño del ADN en varios tejidos (Dos Santos y Martinez, 2014). Si bien en el presente estudio no se vió afectada la peroxidación lipídica (estimada mediante los niveles de TBARS), se detectó un aumento significativo en los niveles de glutatión reducido en las hembras expuestas a 5 mg/L de atrazina. Tal incremento parecería haber sido suficiente para proteger a los lípidos del organismo frente a la incidencia de las especies reactivas de oxígeno, típicamente producidas durante el estrés oxidativo. Estos resultados son similares a los observados en el camarón de agua dulce *Palaemonetes argentinus* expuesto a

atrazina, en el cual la inducción de varias enzimas antioxidantes previno la peroxidación lipídica (Griboff *et al.*, 2014).

En su conjunto, los resultados obtenidos en este Capítulo muestran una clara inhibición del desarrollo ovárico en hembras de *P. clarkii* expuestas al formulado comercial de atrazina, y en particular, a la concentración más alta ensayada, siendo en este sentido similares a los resultados obtenidos en la especie *N. granulata*. Más aún, parte de la información obtenida en *P. clarkii* complementa a la obtenida en *N. granulata*, permitiendo así entender con mayor profundidad la manera en que el herbicida en estudio actúa sobre el potencial reproductivo de los crustáceos superiores.

CONCLUSIONES

- ❖ La exposición *in vivo* de hembras adultas de *N. granulata* a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina, provocó un descenso en el contenido de Vg en ovario, una disminución en el tamaño de los oocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos y una menor proporción de oocitos que ingresan a vitelogénesis secundaria, evidenciando un retraso en el crecimiento ovárico.

- ❖ La exposición de las hembras al formulado comercial de atrazina, provocó un descenso en el contenido de glucógeno y proteínas en el músculo de la quela de las hembras, posiblemente como respuesta compensatoria al efecto estresante inespecífico del herbicida.

- ❖ La ausencia de diferencias significativas en la mayoría de los experimentos realizados con el formulado experimental (96% del principio activo de atrazina), estaría revelando una toxicidad diferencial entre éste formulado y el formulado comercial, asociada posiblemente a la presencia de excipientes en éste último.

- ❖ La exposición de hembras con ablación de ambos pedúnculos oculares a 5 mg/L del formulado comercial atrazina, no provocó cambios en las variables analizadas; por lo tanto, el retraso en el crecimiento ovárico podría deberse a una interferencia del herbicida con la regulación hormonal (inhibitoria) del proceso de vitelogénesis desde los pedúnculos oculares.

- ❖ Los ensayos *in vitro* realizados confirman que el formulado comercial de atrazina estaría actuando como un desorganizador endocrino, estimulando la secreción de la neurohormona peduncular GIH y, en consecuencia, afectando negativamente el crecimiento ovárico. Además, no se encontraron efectos *in vitro* del herbicida sobre la estimulación del ovario por hormonas sexuales.

- ❖ La exposición de hembras adultas de *P. clarkii* a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina provocó un descenso en la expresión relativa de ARNm de Vg tanto en ovario como en hepatopáncreas; además, se observó un menor contenido de Vg en el ovario, y una disminución del tamaño de los oocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos tanto para animales expuestos a 1 como a 5 mg/L; esta inhibición del crecimiento ovárico fue similar a la observada en *N. granulata*.

- ❖ El incremento en los niveles circulantes de E₂ observado en las hembras expuestas al formulado comercial estaría evidenciando que el descenso en la expresión relativa y en el contenido de Vg no estaría asociado a cambios en los niveles circulantes de esteroides sexuales. El aumento de E₂ circulante podría estimular tempranamente el crecimiento del ovario, el cual finalmente resultó inhibido debido a otros efectos del formulado comercial, tales como la interferencia con la secreción de hormonas pedunculares.

- ❖ El aumento en los niveles de lactato en las hembras expuestas a 5 mg/L del formulado comercial de atrazina, revela que ocurre un esfuerzo metabólico extra en los animales para obtener la energía requerida frente a la exposición al herbicida. El incremento observado en los niveles de glutatión reducido parece haber sido suficiente para proteger a los lípidos de las especies reactivas de oxígeno, típicamente producidas durante el estrés oxidativo.

- ❖ En su conjunto, los resultados obtenidos evidencian que el formulado comercial de atrazina utilizado, altera la dinámica normal del crecimiento gonadal en hembras de las dos especies de crustáceos estudiadas y, por lo tanto, podría afectar de manera directa a sus poblaciones, poniendo de manifiesto los efectos nocivos de este tipo de sustancias para el ambiente y los seres vivos que habitan en él.

- ❖ Finalmente, es nuestra intención que los resultados de la presente Tesis sean un aporte significativo a la problemática ambiental, permitiendo demostrar los riesgos del uso actual y cotidiano del herbicida ensayado.

BIBLIOGRAFÍA

Abdu, U.; Yehezkel, G.; Sagi, A. (2000). Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrate Reproduction and development* 37: 75-83.

Abdu, U.; G. Yehezkel; S. Weil; T. Ziv; A. Sagi. (2001). Is the unique negatively charged polypeptide of crayfish yolk HDL a component of crustacean vitelin?. *J. Experimental Zoology* 290: 218-226.

Alcorlo, P., Otero, M., Crehuet, M., Baltanás, A., Montes, C. (2006). The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). *Sci Total Environ*, 366(1), 380-390.

Alcorlo, P., Geiger, W., Otero, M. (2008). Reproductive biology and life cycle of the invasive crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapoda) in diverse aquatic habitats of South-Western Spain: Implications for population control. *Fundamental and Applied Limnology*, 173(3), 197-212.

Alonso, L.; Demetrio, P.; Etchegoyen, M.; Marino, D. (2018). Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Sci. Total Environ.*, 645, 89–96.

Álvarez, N., Avigliano, L., Mac Loughlin, C., Rodríguez, E. (2015). The adverse effect of the herbicide atrazine on the reproduction in the intertidal varunid crab *Neohelice granulata* (Dana, 1851). *Regional Studies in Marine Science*, 1, 1-6.

Ameyaw-Akumfi, C. (1981). Courtship in the crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) (Decapoda, Astacidea). *Crustaceana*, 40: 57-64.

Ando, H.; Makioka, T. (1998). Structure of the ovary and mode of oogenesis in a freshwater crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Zoological Science* 15: 893-901.

APHA. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. In. Washington, DC: American Public Health Association.

Arancibia, F. (2013). Challenging the Bioeconomy: The Dynamics of Collective Action in Argentina. *Technol Soc* 35(2):79-92.

Arrignon, J. (1985). La cría del cangrejo. Zaragoza, España. Edit. Acribia SA. 201 p.

Atanor. (2012). Agroquímicos: Atrazina.

Avault J. W. y J.V. Hunner, (1993). Crawfish culture in the United States. Publishing Company Inc. Westport, Connecticut. U.S.A. En: Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United States.

Avigliano, L., Canosa, I.S., Medesani, D.A., Rodríguez, E.M. (2018). Effects of glyphosate on somatic and ovarian growth in the estuarine crab *Neohelice*

granulata, during the pre-reproductive period. *Water, Air and Soil Pollution*, 229 (2): 44.

Beltrame, M.O., De Marco, S.G. y Marcovecchio J.E. (2011). The burrowing crab *Neohelice granulata* as potential bioindicator of heavy metals in estuarine systems of the Atlantic coast of Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 172 (1-4):379-389.

Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Stanford, B. D., Snyder, S. A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ Sci Technol*, 43(3), 597-603.

Bianchini, A., Machado Lauer, M., Maia Nery, L.E., Pinto Colares, E., Monserrat, J. M., Dos Santos Filho E.A. (2008). Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 151 (3): 423-436.

Boschi, E. E., Scelzo, M. A., Goldstein, B. (1967). Desarrollo larval de dos especies de crustáceos decápodos en el laboratorio, *Pachycheles haigade* Rodrigues da Costa (Porcellanidae) y *Chasmagnathus granulata* (Grapsidae). *Boln. Inst. Biol. Har., Mar del Plata*, 12, 1-44.

Bossi, R., Vejrup, K. V., Mogensen. B. B., H., Asman W. A. (2002) Analysis of polar pesticides in rainwater in Denmark by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr A*, 957, 27-36.

Botto, J. L., Irigoyen, H. R. (1972). Biología de la comunidad del cangrejal. Contribución al conocimiento biológico del cangrejo estuarino *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del Río Salado, provincia de Buenos Aires.: Memorias de Seminario sobre Ecología bentónica y sedimentación de la Plataforma Continental del Atlántico Sur.

Botto, J. L., Irigoyen, H. R. (1979). Bioecología de la Comunidad del Cangrejal. I. Contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del Río Salado, Provincia de Buenos Aires.: Seminario sobre Ecología Bentónica y sedimentación de la Plataforma Continental del Atlántico Sur. UNESCO.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

Brand, R. M., Mueller, C. (2002). Transdermal penetration of atrazine, alachlor, and trifluralin: effect of formulation. *Toxicol Sci*, 68(1), 18-23.

Brodeur, J. C., Sassone, A., Hermida, G. N., Codugnello, N. (2013). Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. *Ecotoxicol Environ Saf*, 92, 10-17.

Brun, G. L., MacDonald, R. M., Verge, J., Aubé, J. (2008). Long-term atmospheric deposition of current-use and banned pesticides in Atlantic Canada; 1980-2000. *Chemosphere*, 71(2), 314-327.

Cabrera, A. L. (1953). *Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires*. Acme S.A, Buenos Aires. 589 pp.

Carr, J. A., Gentles, A., Smith, E. E., Goleman, W. L., Urquidi, L. J., Thuett, K., Van Der Kraak, G. (2003). Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environ Toxicol Chem*, 22(2), 396-405.

CASAFE. (2012). *Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes*.

Cervino, C. O.; Medesani, D. A. y E. M. Rodríguez. (1995). Effects of feeding on metabolic rate of the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachuyra). *Nauplius* 3: 155-162.

Chang, E. S., Bruce M. J., Tamone S. L. (1993). Regulation of crustacean molting: a multi-hormonal system. *Am. Zool.* 33: 324- 329.

Chang, E. S., Chang, S. A., Beltz, B. S., and Kravitz, E. A. (1999). Crustacean hyperglycemic hormone in the lobster nervous system: localization and release from cells in the subesophageal ganglion and thoracic second roots. *J Comp Neurol*, 414(1), 50-56.

Charniaux Cotton, H. (1985). Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *American Zoology* 25: 197-206.

Charmantier, G. (1997). Hormonal regulation of growth and reproduction in crustaceans. *Recent Advances in Marine Biotechnology*, 1, 109-161.

Chaulet, A., Medesani, D. A., Freitas, J., Cervino, A., Cervino, N., Rodríguez, E. M. (2012). Induction of somatic growth in juvenile crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda,Parastacidae), by ecdysone and insulin growth factor. *Aquaculture*, 370, 1-6.

Chen A.J., Gao L., Wang X.W., Zhao X.F., Wang J.X. (2013). Sumo-conjugating enzyme E2 UBC9 mediates viral immediate-early protein sumoylation in crayfish to facilitate reproduction of white spot syndrome virus. *J Virol* 87: 636–647.

Chernyak, S. M., Rice, C. P., McConnell L., M. (1996). Evidence of currently used pesticides in air, ice, fog, seawater and surface microlayer in the Bering Sea and Chukchi Seas. *Mar Pollut Bull.*, 32, 410-419.

Chu, K.H. (1995). Aspects of reproductive biology of the shrimp *Metapenaeus joyneri* from the Zhujiang Estuary, China. *Journal of Crustacean Biology*, Lawrence, 15: 214-219.

Clark, G. M., Goolsby, D. A. (2000). Occurrence and load of selected herbicides and metabolites in the lower Mississippi River. *Sci Total Environ*, 248(2-3), 101-113.

Coccia, E., De Lisa, E., Di Cristo, C., Di Cosmo, A., and Paolucci, M. (2010). Effects of estradiol and progesterone on the reproduction of the freshwater crayfish *Cherax albidus*. *Biol Bull*, 218(1), 36-47.

Colombo J. C., Sarandón S. J. (2015). Relevamiento de la utilización de agroquímicos en la Provincia de Buenos Aires. Defensor del Pueblo-UNLP, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Cooke, I. M.; R. E. Sullivan. (1982). Hormones and Neurosecretion. H.L. Atwood and D. C. Sandeman, eds. En: *The Biology of Crustacea*. Academic Press, New York. Vol. 3: 205-290.

Cooke, I. M., Haylett, B. A., Weatherby, T. M. (1977). Electrically Elicited Neurosecretory and Electrical Responses of the Isolated Crab Sinus Gland in Normal and Reduced Calcium Salines. *Journal of Experimental Biology*, 70(1), 125-149.

Correia, A. M., P. M. Anastácio. (2008). Shifts in aquatic macroinvertebrate biodiversity associated with the presence and size of an alien crayfish. *Ecological Research* 23:729- 734

Courtney, A.J., Montgomery, S.S., Die, D.J., Andrew, N.L., Cosgrove, M.G., Blount, C., (1995). Maturation in the female eastern king prawn *Penaeus plebejus* from coastal waters of eastern Australia, and considerations for quantifying egg production in penaeid prawns. *Mar. Biol.* 122, 547–556.

Cox, C., Surgan, M. (2006). Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environ Health Perspect*, 114(12), 1803-1806.

De Kleijn, D.P.V.; Van Herp, F. (1998). Involvement of the hyperglycemic neurohormone family in the control of reproduction in decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development* 33: 263-272.

Da Cunha, J., Bellini, I., Pinelli, L., Fernández, A., Davyt, D. (2012). Determinación de atrazina e intermediarios de biodegradación en un medio de cultivo líquido para el enriquecimiento de consorcios microbianos. 7mo Congreso de Medio Ambiente. UNLP.

De Gerónimo, E., Aparicio, V. C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., and Costa, J. L. (2014). Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere*, 107, 423-431.

Dehn, P.F; D.E. Aiken; S.L. Waddy. (1983). Aspects of vitellogenesis in the lobster *Homarus americanus*. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1161: 24.

D’Incao, F.; Rufino, M. L.; Da Silva, K. G.; Da Costa Braga, A., L. H. Cunha Marques. (1993). Crescimento de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851, em um marisma do estuário da Lagoa dos Patos, RS (Decapoda: Grapsidae). *Rev. Brasil. Bio.* 53: 637-643.

- Dreon, M.S.; H. Heras; R.J.Pollero. (2003) . Metabolism of ovorubin, the major egg lipoprotein from the apple snail. *Molecular and Cellular Biochemistry* 243: 9-14.
- Dodson, S. I., Merritt, C. M., Shannahan, J. P., Shults, C. M. (1999). Low exposure concentrations of atrazine increase male production in *Daphnia pulex*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(7), 1568-1573.
- Dorn, N. J., Wojdak, J. M. (2004). The role of omnivorous crayfish in littoral communities. . *Oecologia*, 140(1), 150-159.
- Dos Santos, K. C., Martinez, C. B. (2014). Genotoxic and biochemical effects of atrazine and Roundup®, alone and in combination, on the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 100, 7-14.
- Erickson, B. E. (2010). Atrazine debate intensifies. *Chem. Eng. News*, 88(41), 31-33.
- Escapa, M., Perillo, G., Iribarne, O. (2008). Sediment dynamics modulated by burrowing crab activities in contrasting SW Atlantic intertidal habitats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 80(3), 365-373.
- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Nawata, H. (2007). Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environ Health Perspect*, 115(5), 720-727.
- Fanjul, E., Grela M.A., Canepuccia, A. y Iribarne O. (2008). The Southwest Atlantic intertidal burrowing crab *Neohelice granulata* modifies nutrient loads of phreatic waters entering coastal area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79 (2): 300-306.
- Fanjul-Moles, M.L. (2006). Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142C: 390-400.
- Ferré, L. E., Medesani, D. A., García, C. F., Grodzielski, M., Rodríguez, E. M. (2012). Vitellogenin levels in hemolymph, ovary and hepatopancreas of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) during the reproductive cycle. *Rev Biol Trop*, 60(1), 253-261.
- Fingerman, M. (1987). "The endocrine mechanism of crustaceans". *J. Crus. Biol.*, 7; 1-24.
- Fingerman, M.; R. Nagabhushanam. (1992). Control of the release of crustacean hormones by neuroregulators. *Comp. Biochem. Physiol.* 102C (3): 343-352.
- Fingerman, M. (1995). Endocrine mechanism in crayfish, with emphasis on reproduction and neurotransmitter regulation of hormone release. *American Zoology* 35: 68-78.
- Fingerman, M. (1997). Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective, and introspective analysis. *Physiol Zool*, 70(3), 257-269.

Fingerman, M.; R. Nagabhushanam. (1997). Roles of neuroregulators in controlling the release of the growth and reproductive hormones in crustacea. Fingerman M., Nagabhushanam R., Thompson F. (eds) Oxford and IBH Publishing Co. New Delhi. En: Recent advances in Marine Biotechnology. Volume 1:179-201.

Frontera, J.L., Gillette, N., Hull, B., Korang, J., Amorim, C., Vatnick, I. y Rodríguez, E.M. (2014). Effects of glyphosate and polyoxyethylene amine on metabolic rate and energy reserves of *Procambarus clarkii* juveniles. Open Environmental Science, 8: 49-53.

Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem, 226(1), 497-509.

Frings, C. S., Dunn, R. T. (1970). A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. Am J Clin Pathol, 53(1), 89-91.

Fuentes, R. (1992). Características de los principales grupos de herbicidas. Valdivia, Chile.: Instituto de Producción y Sanidad Vegetal.

Gabe, M., (1966) Neurosecretion. Pergamon Press, Oxford. 872.

García, F.; M.R. González-Baró; H. Garda; M. Cunningham. R. Pollero. (2004). Fenitrothion- induced structural and functional perturbations in the yolk lipoproteins of the shrimp *Macrobrachium borellii*. Lipids, Vol 39 (4): 389-396.

García, C.F.; M. Cunningham; J.L. Soluages; H.A. Garda; R. Pollero. (2006). Structural characterization of the lipovitellin from de shrimp *Macrobrachium borellii*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 145: 365-370.

García, F., M.L. Cunningham; H. Garda; H. Heras. (2008). Embryo lipoproteins and yolk lipovitellin consumption during embryogenesis in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae). Comparative Biochemistry and Physiology, par B 151: 317-322.

Gherardi F., Barbaresi S. (2000). Invasive crayfish: Activity patterns of *Procambarus clarkii* the rice fields of the Lower Guadalquivir. Archiv. Fur Hydrobiologie. 150 (1): 153-168

Gherardi, F., Acquistapace, P. (2007). Invasive crayfish in Europe: The impact of *Procambarus clarkii* on the littoral community of a Mediterranean lake. Freshwater Biology, 52(7), 1249-1259.

Giese, A.C.; Pearse J.C. (1974). Introduccion: general principles. Giese A.C. and Pearse J.S., eds. Reproduction of Marine Invertebrales. Vol. I. Academic press, New York. 1-49.

Gilliom, R., Barbash, J., Crawford, C., Hamilton, P., Martin, J., and Nakagaki, N. (2006). The Quality of Our Nation's Waters - Pesticides in the Nation's Streams and Ground Water, 1992-2001. U.S. Geological Survey Circular, 1291-1172

Goolsby D. A., Thurman E. M., Pomes M. L., Meyer M. T. (1997). Herbicides and their metabolites in rainfall: origin, transport, and deposition patterns across the Midwestern and Northeastern United States, 1990–1991. *Environmental Science and Technology*, 31, 1325–1333.

Goretti, E., Pallottini, M., Ricciarini, M. I., Selvaggi, R., Cappelletti, D. (2016). Heavy metals bioaccumulation in selected tissues of red swamp crayfish: an easy tool for monitoring environmental contamination levels. *Science of The Total Environment*, 559, 339-346.

Graymore, M., Stagnitti, F., Allinson, G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ Int*, 26(7-8), 483-495.

Graziano, N., McGuire, M. J., Roberson, A., Adams, C., Jiang, H., Blute, N. (2006). 2004 National Atrazine Occurrence Monitoring Program using the Abraxis ELISA method. *Environ Sci Technol*, 40(4), 1163-1171.

Griboff, J., Morales, D., Bertrand, L., Bonansea, R. I., Monferrán, M. V., Asis, R., and Amé, M. V. (2014). Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes argentinus*: the protective effect of vitamin E. *Ecotoxicol Environ Saf*, 108: 1-8.

Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun, J., Choi, K., Khim, J.S., Zhang, X.W., Giesy, J.P., (2010). Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquat. Toxicol.* 98: 256–264.

Hansen, M., Treviño Quintanilla, M., Marquez Pacheco, H., Villada Canela, M., GonzaleaMarquez, M., Guillen Garces, R., Hernandez Antonio, A. (2013). Atrazina: un herbicida polémico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29: 65-84.

Harrison, K.E. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *Journal of Shellfish Research* 9 (1):1-28.

Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(10), 4612-4617.

Hayes, T. B., Stuart, A. A., Mendoza, M., Collins, A., Noriega, N., Vonk, A., Kpodzo, D. (2006). Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17beta-estradiol): Support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environ Health Perspect*, 114 Suppl 1, 134-141.

Holdich, D. M. (1999). The negative effects of established crayfish populations. (F. a. H. Gherardi, D.M. Ed. *Crayfish in Europe as Alien Species (How to make the best of a bad situation?)*. Rotterdam, Netherlands.

Huang D.J., Wang S.Y., Chen H.C. (2004). Effects of the endocrine disrupter chemicals chlordane and lindane on the male green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*). *Chemosphere*. 57, 1621-7.

Huang D.J., Chen H., Wu J.P., Wang S.Y. (2006). Reproduction obstacles for the female green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*) after exposure to chlordane and lindane. *Chemosphere*. 64, 11-16.

Huberman, A. (2000). Shrimp endocrinology. *Aquaculture*, 191(1-3), 191-208.

Huner, J. V., Meyers, S. P. (1979). Dietary Protein Requeriments of the Red Crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard) (Decapoda-Cambaridae), grown in a closed system. *Proc. World Maricul. Soc.*, 10, 751-760.

Huner, J. V., Barr, J. E. (1984): Red swamp crawfish: biology and exploitation. Louisiana Sea Grant College Program, Center for Wetland Resources, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana.

Huner, J. V., Barr, J. E. (1991). Red Swamp Crawfish: Biology and Exploitation. (B. Rouge Ed.). Louisiana: Louisiana Sea Grant College Program.

Invasive Species Specialist Group (ISSG). (2011). www.issg.org

Jablonowski, N. D., Schäffer, A., Burauel, P. (2011). Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. *Environ Sci Pollut Res Int*, 18(2) 328-331.

Jiang, H., Qian, Z., Lu, W., Ding, H., Yu, H., Wang, H., Li, J. (2015). Identification and Characterization of Reference Genes for Normalizing Expression Data from Red Swamp Crawfish *Procambarus clarkii*. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(9), 21591-21605.

Khalaila, I.; J. Peter-Katalinic; C. Tsang; C.M. Radcliffe; E.D. Aflalo; D.J. Harvey; R.A. Dwek; P.M.Rudd; A. Sagi. (2004). Structural characterization of the N-glycan moiety and site of glycosylation in vitellogenin from the decapod crustacean *Cherax quadricarinatus*. *Glycobiology* 14(9): 767-774.

Keller, R. (1992). Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia* 48, 439-448.

Kogan Alterman, M. (1992). Malezas: Ecofisiología y estrategias de control. Editorial: Santiago: Pontificia Univ. Católica de Chile, Facultad de Agronomía. 402 pp.

Kogan, M., y Pérez, A. (2003). Herbicidas: fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción. Santiago, Chile. Universidad Católica de Chile.

Kulkarni, G. K., Glade, L., Fingerman, M. (1991). Oogenesis and effects of neuroendocrine tissues on in vitro synthesis of protein by the ovary of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *J. Crust. Biol.*, 11, 513-522.

Lascombe, I., Beffa, D., Rüegg, U., Tarradellas, J., Wahli, W. (2000). Estrogenic activity assessment of environmental chemicals using in vitro assays: identification of two new estrogenic compounds. *Environ Health Perspect*, 108(7), 621-629.

Laufer, H.; W.J. Biggers. (2001). Unifying concepts learned from methyl farnesoate for invertebrate reproduction and post-embryonic development. *Amer. Zool.* 41: 442-457.

Lavolpe, M., López Greco, L.S., Kesselman, D. y Rodríguez, E.M. (2004). Differential toxicity of copper, zinc, and lead during the embryonic development of *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura, Varunidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 (4): 960-967.

Lee, R. F., A. Walker. (1995). Lipovitellin and lipid droplet accumulation in oocytes during ovarian maturation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 271(5), 401-412.

Liu, M., Pan, J., Liu, Z., Cheng, Y., Gong, J., Wu, X. (2018). Effect of estradiol on vitellogenesis and oocyte development of female swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture*, 486, 240-245.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.

Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., Gawlik, B. M. (2010). Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res*, 44(14), 4115-4126.

López Greco, L.S., Rodríguez, E.M. (1996). Talla funcional reproductiva de *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura, Grapsidae). Libro del IX Congreso Latinoamericano de Acuicultura, Coquimbo, Chile, 154-157.

López Greco, L., Stella, V., Rodríguez, E. (1997). Size at the onset of the sexual maturity in *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Nauplius*, 5(2), 65-75.

López Greco, L.; Rodríguez, E. M. (1999). Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae). *Cahiers de Biologie Marine*, 40, 155-164.

Lorenzon S. (2005). Hyperglycemic stress response in Crustacea. *Invertebr. Surviv. J.* 2: 132-141.

Loureiro, T. G., Anastácio, P. M., Araujo, P. B., Souty-Grosset, C., Almerão, M. P. (2015). Red swamp crayfish: biology, ecology and invasion - an overview. *Nauplius*, 23(1), 1-19.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., FarrARR, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.

Maldonado, H. (2002). Crustaceans as models to investigate memory illustrated by extensive behavioral and physiological studies in *Chasmagnathus*. En: Wiese K. (ed.) The Crustacean Nervous System. Springer, Berlin, Heidelberg, 314-327.

Mac Loughlin, C., Canosa, I. S., Silveyra, G. R., López Greco, L. S., Rodríguez, E. M. (2016). Effects of atrazine on growth and sex differentiation, in juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 131, 96-103.

Makinouchi, S., Honculada-Primavera, J. (1987). Maturation and spawning of *Penaeus indicus* using different ablation methods. *Aquaculture*, 62, 1, 73-81.

Marsden, G., Hewit, D., Boglio, E., Mather, P., Richardson, N. (2008). Methyl Farnesoate inhibition of late stage ovarian development and fecundity reduction in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 208(1-4), 242-246.

Martinetto, P., Valiñas, M., Palomo, G., Iribarne, O. (2007). Negative interactions between two SW Atlantic intertidal crabs in soft-bottom habitats. *Marine Biology*, 151(4), 1479- 1490.

McKinlay, R., Plant, J. A., Bell, J. N., Voulvoulis, N. (2008). Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environ Int*, 34(2), 168-183.

Medesani, D. A., López Greco, L. S., Rodríguez, E. M. (2004). Interference of cadmium and copper with the endocrine control of ovarian growth, in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Aquat Toxicol*, 69(2), 165-174.

Medesani, D. A., Ferré, L. E., Canosa, I. S., Silveyra, G. R., Rodríguez, E. M. (2015). Induction of vitellogenesis by 17-hydroxyprogesterone and methyl farnesoate during post-reproductive period, in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 59(2), 104-110.

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

Merlin, J., Mohanlal, D. L., Balasubramanian, C. P., Sherly, T., Subramoniam, T., Syamadaya, J. (2015). Induction of vitellogenesis and reproductive maturation in tiger shrimp, *Penaeus monodon* by 17 β -estradiol and 17 α -hydroxyprogesterone: in vivo and in vitro studies. *Invertebrate Reproduction and Development*, 59(3), 166-175.

Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J. and Séralini, G.-E. (2014). Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed research international*, 2014.

Meunpol, O., Iam-Pai, S., Suthikrai, W., Piyatiratitivorakul, S. (2007). Identification of progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone in polychaetes (*Perinereis* sp.) and the effects of hormone extracts on penaeid oocyte development in vitro. *Aquaculture*, 270(1-4), 485-492.

Sistema Integrado de Información Agropecuaria, Programa de Servicios Agrícolas Provinciales (SIIA), Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2012. <http://www.sii.gov.ar>

Mingorance, M., y Gómez, J. I. (2002). Una actividad de educación ambiental basada en observaciones del cangrejo de río americano (*Procambarus clarkii*) en el Barranco del Cercado (Tenerife, Islas Canarias). *Ecosistemas*, 11(3).

Mirheydari, S. M., Paolucci, M., Matinfar, A., Ghasemi, S. (2013). Fluctuations of vertebrate-like steroids in the hemolymph of narrow-clawed crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Freshwater Crayfish*, 237-241.

Mirheydari, S. M., Paolucci, M. M., A. Soltani, M., Kamali, A., Asadpour-Ousalou, Y. (2014). Occurrence of vertebrate-like steroids in the male narrow-clawed crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) from Iran during the annual reproductive Cycle. *Global Veterinaria*, 13, 247-254.

Moore MT, Lizotte Jr RE, Knight SS, Smith Jr S, Cooper CM. (2007) Assessment of pesticide contamination in three Mississippi Delta oxbow lakes using *Hyalella azteca*. *Chemosphere*; 67: 2184-91.

Mykles, D.L. (2011). Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 127(3-5):196-203.

Nagaraju, G.P.C.; P.R. Reddy; P.S. Reddy. (2006). In vitro methyl farnesoate secretion by mandibular organs isolated from different molt and reproductive stages of the crab *Oziotelphusa senex senex*. *Fish. Sci.* 72, 410-414.

Nagaraju, G.P.C. 2007. Is methyl farnesoate a crustacean hormone?. *Aquaculture* 272, 39-54.

Nagaraju, G. P. (2011). Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. *J Exp Biol*, 214(Pt 1), 3-16.

Noro, C.; López-Greco, L.S.; Backup, L. (2008). Gonad morphology and type of sexuality in *Parastacus defossus* Faxon 1898, a burrowing, intersexed crayfish from southern Brazil (Decapoda: Parastacidae). *Acta Zoologica (Stockholm)* 89: 59-67.

Oliver, S. R., Escofet, A. A., Penchaszadeh, P., Orensanz, J. M. (1972). Estudios ecológicos de la región estuarial de Mar Chiquita (Buenos Argentina). En: *Las comunidades bentónicas*. *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, 193: 237-262.

Okumura, T. (2004). Perspectives on hormonal manipulation of shrimp reproduction. *JARQ*, 38(1), 49-54.

Palma, P., Palma, V. L., Matos, C., Fernandes, R. M., Bohn, A., Soares, A. M., and Barbosa, I. R. (2009). Effects of atrazine and endosulfan sulphate on the ecdysteroid system of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 74(5), 676-681.

- Pan, J., Liu, M., Chen, T., Cheng, Y., Wu, X. (2018). Immunolocalization and changes of 17 β -estradiol during ovarian development of Chinese mitten crab *Eriocheir Sinensis*. *Cell Tissue Res*, 373(2), 509-520.
- Paolucci, M., Di Cristo, C., Di Cosmo, A. (2002). Immunological evidence for progesterone and estradiol receptors in the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 55-62.
- Paulus, J. E., Laufer H. (1987). Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata* (Decapoda Brachyura). *Int. J. Invert. Reprod.* 11:29-44.
- Phyu, Y. L., Palmer, C. G., Warne, M. S., Hose, G. C., Chapman, J. C., Lim, R. P. (2011). A comparison of mixture toxicity assessment: examining the chronic toxicity of atrazine, permethrin and chlorothalonil in mixtures to *Ceriodaphnia cf. dubia*. *Chemosphere*, 85(10), 1568-1573.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D. (2013). nlme: linear and nonlinear mixed effects models.
- Péqueux, A. (1995). Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology* 15, 1-60
- Quackembush, L.S. (1991). Regulation of vitellogenesis in Penaeid Shrimp. En: DeLoach, P., Dougherty, W.J., Davidson, M.A. (Eds), *Frontiers in Shrimp Research*. Elsevier, Amsterdam, 125-140.
- Qunitio, E., Hara, A., Yamauchi, K., Nakao, S. (1994). Changes in the steroid hormone and vitellogenin levels during the gametogenic cycle of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 109(1), 21-26.
- Radosevich M, Traina S J, Hao Y, Tuovinen O H. (1995). Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Appl Environ Microbiol.* 61:297-301.
- Rebich, R. A., Coupe, R. H., Thurman, E. M. (2004). Herbicide concentrations in the Mississippi River Basin-the importance of chloroacetanilide herbicide degradates. *Sci Total Environ*, 321(1-3), 189-199.
- Reddy, P. S., Katayayani, R. V. and Fingerman, M. (1996). Cadmium and Naphthalene induced hyperglycemia in the fiddler crab *Uca pugilator*: Differential modes of action on the neuroendocrine system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 425-431.
- Reddy, P. R., Kiranmayi, P., Thanuja Kumari, K., Reddy, P. S. (2006). 17 α -Hydroxyprogesterone induced ovarian growth and vitellogenesis in the freshwater rice field crab *Oziotelphusa senex senex*. *Aquaculture*, 254, 1-4.

Reynolds, J.D. (2002). Growth and Reproduction. Biology of freshwater crayfish. Holdich D (Eds). Biology of freshwater crayfish. Nottingham: Blackwell Science: 152-191.

Rieger, P., Nakagawa C. (1995). Desenvolvimento juvenil de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae). Nauplius 3: 59-74.

Rodríguez C.F, Bécares E, Fernández-Aláez M, Fernández-Aláez C. (2005). Loss of diversity and degradation of wetlands as a result of introducing exotic crayfish. Biol. Invas. 7, 75-85.

Rodríguez, E., López Greco, L., Medesani, D., Laufer, H., Fingerman, M. (2002). Effects of methyl farnesoato, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis. General and comparative endocrinology, 125, 34-40.

Rodríguez, E. M., Medesani, D. A., and Fingerman, M. (2007). Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: a review. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 146(4), 661-671.

Rodríguez, E. M., Pisanó, A. (1993). Effects of parathion and 2,4-d to eggs incubation and larvae hatching in *Chasmagnathus granulata* (decapoda, brachyura). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 104(1), 71-78.

Rodríguez, E. M., Schuldt, M., Romano, L. (1994). Chronic histopathological effects of parathion and 2,4-D on female gonads of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). Food Chem Toxicol, 32(9), 811-818.

Rodríguez, E. M. y Medesani, D. A. (1994). Pathological lesions in larvae hatched from ovigerous females of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura) exposed to cadmium. Experientia, 50 (10), 975-977.

Rodríguez E. M., Medesani D. A., Fingerman M. (2007). Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology 146(4), 661-71

Rodríguez Moreno, P. A., Medesani, D. A., Rodríguez, E. M. (2003). Inhibition of molting by cadmium in the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda Brachyura). Aquat Toxicol, 64(2), 155-164.

Rutkoski C.F., Macagnan N., Kolcenti C., Vanzetto G.V., Sturza P.F., Hartmann .A., Hartmann M.T. (2018). Lethal and Sublethal Effects of the Herbicide Atrazine in the Early Stages of Development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae). Arch Environ Contam Toxicol. 74(4), 587-593.

Sagi, A., E. Homola, H. Laufer. (1991). Methyl farnesoate in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: synthesis by the mandibular organ in vitro. and titers in the hemolymph. Comp. Biochem. Physiol. 99B: 879-882.

Sagi, A.; Y. Soroka; E. Snir; O. Chomsky; J. Calderón; Y. Miller. (1995). Ovarian proteína síntesis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Does ovarian vitellin synthesis exists? *Invert. Repr. Devel.* 27: 41-47.

Sánchez-Camazano, M., Lorenzo, L. F., Sánchez-Martín, M. J. (2005). Atrazine and alachlor inputs to surface and ground waters in irrigated corn cultivation areas of Castilla-Leon region, Spain. *Environ Monit Assess*, 105(1-3), 11-24.

Sánchez, M. F., Marí, N. R., Lasta, C. A., Giangioffe, F. (1991). Alimentación de la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) en la Bahía Samborombón. *Frente Marítimo*, 8, 43-50.

Santos, E. A. y E. P. Colares. (1986). Blood glucose regulation in an intertidal crab *Chasmagnathus granatata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* 83 A (4): 673-675.

Santos, E. A. y T. M. Stefanello. (1991). The hemolymph of *Chasmagnathus granatata* Dana 1851 (Decapoda, Grapsidae) as a target tissue of the crustacean hyperglycemic hormone. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 24: 267-270.

Santos, E. A., Keller, R. (1993). Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 106(2), 343-347.

Sanusi, A., Millet, M., Mirabe, P., Wortham, H. (2000). Comparison of atmospheric pesticide concentrations measured at three sampling sites: local, regional and long-range transport. *Sci Total Environ*, 263(1-3), 263-277.

Savini, D., Occhipinti-Ambrogi, A., Marchini, A., Tricarico, E., Gherardi, F., Olenin, S., y Gollasch, S. (2010). The top 27 animal alien species introduced into Europe for aquaculture and related activities. *Ichthyology*, 26(2), 1-7.

Sawasdee, B., Köhler, H. R. (2009). Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). *Chemosphere*, 75(11), 1539-1547.

Schleifstein, M., Fedeli, D. (2003). Louisiana crawfish invade ponds across the globe. *The Times Picayune*: Lunes 14 Abril.

Scott, A. P. (2018). Is there any value in measuring vertebrate steroids in invertebrates?. *Gen Comp Endocrinol.* 265, 77-82

Serrano-Pinto, V.; C. Vazquez-Boucard; H. Villareal-Colmenares. (2003). Yolk proteins during ovary and egg development of mature female freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 134 (1): 33-43.

Shih, J.T. (1997). Sex steroid- like substances in the ovaries, hepatopancreas and body fluid of female *Mictyris brevidactylus*. *Zool. Stud.* 36: 136-145.

Silva, P.V., Luppi, T.A., Spivak, E.D. y Anger, K. (2009). Reproductive traits of an estuarine crab, *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata* (Brachyura: Grapsoidae: Varunidae), in two contrasting habitats. *Scientia Marina*, 73 (1): 117-27.

Singh, S., Kumar, V., Chauhan, A., Datta, S., Wani, A., Singh, N., Singh, J. (2017). Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. *Environ Chem Lett*, 16, 1-27.

Sokal, R. R., y Rohlf, F. J. (1981). *Biometry* (2 ed.). New York: Freeman.

Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., and Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar Environ Res*, 79, 1-15.

Solomon, K. R., Carr, J. A., Du Preez, L. H., Giesy, J. P., Kendall, R. J., Smith, E. E., Van Der Kraak, G. J. (2008). Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *Critical reviews in toxicology*, 38(9), 721-772.

Spivak, E.D. (2010). The crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. *Helgoland Marine Research*, 64 (3): 149-154.

Stella, V. S.; López, L. S. y E. M. Rodríguez. (1996). Fecundity and brood biomass of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura, Grapsidae). *Crustaceana* 69(3): 306-312.

Stella, V. S., López Greco, L., Rodríguez, E. M. (2000). Effects of Eyestalk Ablation at Different Times of the Year on Molting and Reproduction of the Estuarine Grapsid Crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Journal of Crustacean Biology*, 20(1), 239-244.

Subramonian, T. (1999). Endocrine regulation of egg production in economically important crustacean. *Current Science* 76: 350-360.

Subramonian, T. (2000). Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.* 125C: 135-156.

Subramoniam, T. (2017). Steroidal control of vitellogenesis in Crustacea: a new understanding for improving shrimp hatchery production. *Proceedings of the Indian National Sciences Academy* 83(3), 595-610.

Sukô, T. (1958). Studies on the development of the crayfish. Reproductive cycle. *Sci. Rept. Saitama Univ.*, 3(1), 79-91.

Swevers, L., Lambert, J. G., De Loof, A. (1991). Metabolism of vertebrate-like steroids by tissues of three crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99B, 35-41.

Tan S.H., Yuan Z.D., Liu Y.F., Yang Y.N. (2012). Effects of Cd²⁺ on antioxidant system in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*. 23: 2595-2601.

Tahara, D., Yano, I. (2003). Development of hemolymph prostaglandins assay systems and their concentration variations during ovarian maturation in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture* 220, 791–800.

Tahara, D., Yano, I. (2004) "Maturation-related variations in prostaglandin and fatty acid content of ovary in the kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*). "Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology 137, 4: 631-637.

Tahara D., K. Suitoh, H Hattori. (2005). Hemolymph vitellogenin levels during final maturation and post-spawning in the female kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture* 245: 311-319.

Tattersall G.J., Luebbert J.P., LePine O.K., Ormerod K.G., Mercier A.J. (2012). Thermal games in crayfish depend on establishment of social hierarchies. *J Exp. Biol.* 215: 1892–1904.

Thongbuakaew, T., Siangcham, T., Suwansa-ard, S., Elizur, A., Cummins, S.F., Sobhon, P., Sretarugsa, P. (2016). Steroids and genes related to steroid biosynthesis in the female giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Steroids*, 107: 149–160.

Thurman, E. M., Goolsby, D. A., Meyer, M. T., and Kolpin, D. W. (1991). Herbicides in surface waters of the midwestern United States: the effect of spring flush. *Environmental Science and Technology*, 25(10), 1794-1796.

Tillitt, D. E., Papoulias, D. M., Whyte, J. J., Richter, C. A. (2010). Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol*, 99(2), 149-159.

Tseng, D.Y.; Y.N. Chen; G. Koua; C.F. Loa; C.M. Kuo. (2001). Hepatopancreas is the extraovarian site of vitellogenin synthesis in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 129: 909-917.

Tsuchida S, Watanabe S. (1991). Growth and reproduction of the spider crab, *Tiarina cornígera* (Latereille) (Brachyura: Majidae). *Res. Crust.*; 20: 43–55.

Tsukimura, B.; Kamemoto F.I.. (1991). In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 92: 59-66.

Tsukimura, B. (2001). Crustacean vitellogenesis. *American Zoology*, 41: 465-476.

Tsukimura, B., Nelson, W. K., Linder, C. J. (2006). Inhibition of ovarian development by methyl farnesoate in the tadpole shrimp, *Triops longicaudatus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 144(2), 135-144.

Urien, C. M. (1972). Río de la Plata Estuary Environments. En: B.W. Nelson (Ed.), *Environmental framework of coastal plain estuaries*. Geological Society of America, *Memoir* 133: 213-234.

- USEPA (Environmental Protection Agency). (2002). Atrazine - Background and Updates. <https://www.epa.gov/>
- U.S. Geological Survey. (2016). Estimated Annual Agricultural Pesticide Use - Atrazine. <https://water.usgs.gov/>
- Van Handel, E. (1965). Estimation of glycogen in small amount of tissue. *Analytical Biochemistry*, 11, 256-265.
- Van Herp, F. (1993). Importance of reproductive biological knowledge for application of biotechnology in aquaculture: crustaceans as an example. *Journal of Marine Biotechnology* 1: 17-20.
- Van Herp, F., (1998). Molecular, cytological and physiological aspects of the crustacean hyperglycemic hormone family. G.M. Coast y S.G. Webster (eds). En: *Recent Advances in Arthropod Endocrinology*. Cambridge, UK. Cambridge University Press, 53-70.
- Villeneuve, D.L., Blankenship, A.L., Giesy, J.P. (1998). Interactions between environmental xenobiotics and estrogen receptor-mediated responses. En: M.S. Denison, W.G. Helferich (eds.). *Toxicant-Receptor Interactions, Modulation of Signal Transduction and Gene Expression*. CRC Press. 243 pp.
- Vonberg, D., Hofmann, D., Vanderborght, J., Lelickens, A., Köppchen, S., Pütz, T., and Vereecken, H. (2014). Atrazine soil core residue analysis from an agricultural field 21 years after its ban. *J Environ Qual*, 43(4), 1450-1459.
- Warrier, S. R., Tirumalai, R., Subramoniam, T. (2001). Occurrence of vertebrate steroids, estradiol 17beta and progesterone in the reproducing females of the mud crab *Scylla serrata*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 130(2), 283-294.
- Webster S.G. (1996). Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *J. Exp. Biol.* 199: 1579-1585.
- Webster. S.G. (1998). Neuropeptides inhibiting growth and reproduction in crustaceans. In *Recent advances in arthropod endocrinology*. Coast and Webster (eds). Cambridge, USA. Society for experimental Biology, Semunar Series 65: 33-51.
- Wiener J.G., Sandheinrich M. (2010). Contaminants in the Upper Mississippi River: historic trends, responses to regulatory controls, and emerging concerns. *Hydrobiologia* 640 (1): 49-70
- Wilder, M.N; T. Okumura; N. Tsutsui. (2010). Reproductive Mechanisms in Crustacea Focusing on Selected Prawn Species: Vitellogenin Structure, Processing and Synthetic Control. *Aqua-BioSci. Monogr. (ABSM)* 3 (3): 73-110.
- Wu, M., Quirindongo M., Sass J., Wetzler A. (2010). Still Poisoning the Well: Atrazine Continues to Contaminate Surface Water and Drinking Water in the United States. Natural Resources Defense Council: Washington D.C.

Yano, I. (1985). Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp *Metapenaeus ensis*, by progesterone. *Aquaculture* 47:223-229.

Yano, I., Hoshino, R. (2006). Effects of 17 beta-estradiol on the vitellogenin synthesis and oocyte development in the ovary of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 144(1), 18-23.

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

Zapata, V., López Greco, L. S., Medesani, D., and Rodríguez, E. M. (2003). Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulata* induced by hormones and neuroregulators throughout the year. In vivo and in vitro studies. *Aquaculture*, 224(1-4), 339-352.

ANEXOS

❖ *Composición de la dieta base*

La dieta base utilizada estuvo compuesta de un 33,21% de proteínas, 8,96% de lípidos y 26,60% de carbohidratos. Dicha dieta fue formulada en el laboratorio de Fisiología de Crustáceos (FCEN-UBA), a partir de proteínas aportadas en un 50% por harina de pescado y en otro 50% por harina de soja, de acuerdo a Chaulet *et al.* (2012). La composición pormenorizada de la dieta utilizada se indica a continuación en la Tabla 6.

| Componente | Cantidad | Aporte de proteínas (%) | Aporte de lípidos (%) | Aporte de carbohidratos (%) |
|-------------------------------|-----------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Harina de Pescado | 270 g | 17,01 | 2,43 | 0,54 |
| Harina de Soja | 360 g | 16,20 | 2,88 | 1,44 |
| Almidón pre-gelificado | 260 g | 0 | 0 | 24,62 |
| Aceite de Soja | 40 g | 0 | 3,65 | 0 |
| Bentonita | 50 g | 0 | 0 | 0 |
| Vitafac Super Aqua* | 20 g | 0 | 0 | 0 |
| Total | 1000 | 33,21 | 8,96 | 26,60 |

Tabla 6. Composición (g/kg) de la dieta base utilizada en los ensayos. *Suplemento vitamínico fabricado por DSM Productos Nutricionales Argentina S. A.®.

❖ *Purificación de la lipoproteína vitelogenina para la posterior obtención del anticuerpo primario anti-vitelogenina*

A continuación, se detallan las técnicas desarrolladas para la identificación, aislamiento, purificación y caracterización de la lipoproteína Vg, así como para la producción de un anticuerpo primario específico.

Objetivo

El objetivo fue desarrollar un bioensayo sensible y específico, capaz de determinar el contenido total de proteínas vitelogénicas (Vg y Vn) en diferentes órganos de la especie *N. granulata*.

Metodología

Aislamiento y purificación de la vitelogenina

Para realizar el aislamiento y purificación de la Vg de *N. granulata*, se trabajó en colaboración con el Dr. Carlos Fernando García, perteneciente al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP - CONICET), dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de La Plata. Para esto, se siguió el protocolo descrito por Ferré *et al.* (2012), llevado a cabo en la langosta *C. quadricarinatus*.

Se utilizaron tres hembras adultas ovígeras de la especie en estudio, y se realizó un pool con ovarios de un peso húmedo de 9,62 g, correspondiente a ovarios maduros (López Greco *et al.*, 1997). Luego, se efectuó una homogeneización en buffer fosfato de sodio conteniendo inhibidor de proteasas PMSF (0,01 mM), en una relación 1:3 (p/v). El homogenato resultante fue centrifugado utilizando una centrífuga EPF-12R (Presvac®) a 10.000xg durante 25 min, a 4 °C. Finalizada la centrifugación, se descartó el pellet y el sobrenadante

obtenido fue llevado a un volumen final de 5 mL con solución de PBS 1X para ser ultracentrifugado a 100.000xg durante 50 minutos a 4 °C, utilizando una ultracentrífuga XL-90 (Beckman Coulter®) con rotor 90Ti. El sobrenadante resultante (fracción citosólica) fue almacenado en tubos de Khan a -80 °C hasta su posterior aislamiento.

Las proteínas del vitelo ubicadas en la fracción citosólica, denominadas de manera general lipovitelinas, fueron aisladas por ultracentrifugación en columna de gradiente diferencial, utilizando una ultracentrífuga L8 70M (Beckman Coulter®) con rotor Ti de ángulo móvil SW60 a una velocidad de 178.000xg durante 24 hs, a 10 °C. A partir de esto, utilizando una columna de separación basándose en los protocolos estandarizados por Dreon *et al.* (2003) y García *et al.* (2004, 2006, 2008), se identificó un pico correspondiente con una densidad de 1,18 g/mL esperada para Vg (Ferré *et al.*, 2012).

Adicionalmente, se verificó la pureza de la Vg aislada mediante una corrida electroforética en un gel de poliacrilamida en gradiente nativo 4-23% SDS-PAGE, teñido con colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Chemical Co.®). Para esto, se sembraron 7,6; 15,2 y 30,5 µg de la Vg previamente purificada y la corrida electroforética se contrastó con un marcador de peso molecular, en un intervalo de 100 a 800 kDa. Finalmente, la Vg aislada se fraccionó en alícuotas que fueron guardadas en tubos eppendorf, y conservadas a -80 °C hasta su posterior utilización.

En paralelo, se determinó la concentración de proteínas totales presentes en la fracción citosólica mediante el método de Lowry (1951); las absorbancias de las muestras fueron medidas por duplicado en un espectrofotómetro "MQII" (Zeiss®) a una longitud de onda de 650 nm, obteniéndose un valor de concentración de proteínas totales de 86,08 µg/µL.

Producción del anticuerpo primario anti-Vg

El anticuerpo primario anti-vitelogenina (anti-Vg) fue preparado con la colaboración de la Lic. Hebe Goldman, mediante la inmunización de conejos a partir de la inoculación de la lipoproteína purificada previamente. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEN-UBA).

Se tomaron muestras de suero control normal de un conejo blanco neozelandés, antes de iniciar las inoculaciones, y a continuación, se aplicaron tres dosis de antígeno adyuvado cada 21 días vía subcutánea. Para evaluar la evolución de la producción de anticuerpos específicos, diez días después de la segunda dosis, se tomó una muestra exploratoria de sangre de la oreja del animal, se separó el suero y se evaluó la potencia de los anticuerpos específicos.

Finalmente, para la obtención del suero de interés conteniendo los anticuerpos anti-Vg, se realizó una extracción de sangre final de los animales por

punción cardíaca, diez días después de la última dosis. Los sueros inmunes fueron purificados por centrifugación, y se realizaron alícuotas que fueron conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización.

Desarrollo de la técnica Western blot

Para determinar qué subunidad o subunidades de la Vg purificada de *N. granulata* está reconociendo el anticuerpo anti-Vg y, adicionalmente, si ese reconocimiento es equivalente en los diferentes órganos o tejidos en estudio (ovario, hepatopáncreas, hemolinfa), se empleó la técnica Western Blot. Dicha técnica fue llevada a cabo en el Laboratorio de Ecotoxicología Acuática (FCEN - UBA), con la colaboración y supervisión del Dr. Rodrigo Da Cuña. El protocolo empleado para la detección de la Vg fue modificado a partir de investigaciones previas realizadas por García *et al.* (2008) y Ferré *et al.* (2012).

Las muestras de ovario, hepatopáncreas y hemolinfa fueron diluidas en buffer de siembra 5X (ver Anexo: *Recetas*). Antes de comenzar con la siembra, las diluciones fueron colocadas en un baño termostático a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, con el objeto de desnaturalizar las proteínas. A continuación, se realizó una electroforesis en condiciones reductoras, sembrando $30\text{ }\mu\text{g}$ de cada muestra en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, los cuales constaron de un gel concentrador 5% y un gel separador 7,5%. Al mismo tiempo, se sembraron $20\text{ }\mu\text{g}$ de Vg diluida en el mismo buffer de siembra 5X, y en otra calle del gel se sembró una alícuota del marcador de peso molecular “SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard” (Invitrogen®). Adicionalmente, se realizaron controles de omisión del anticuerpo primario anti-

Vg. Posteriormente, la corrida electroforética fue realizada a 100V durante 90 min, en un sistema de electroforesis vertical "Mini-Protean III" (Bio-Rad®) en buffer de corrida.

Las proteínas que corrieron en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciencias Corp.®) de 0,45 µm de tamaño de poro. Para esto, se realizó una transferencia húmeda en buffer de transferencia a 100V durante 90 min, a 4 °C.

Una vez finalizada la electrotransferencia, se tiñó la membrana con Rojo Ponceau S para corroborar la correcta transferencia del procedimiento. A continuación, se efectuó el bloqueo de la membrana para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos con una solución de leche descremada en polvo (Sancor®) y BSA (Sigma Chemical Co.®) al 6% en buffer Tris salino (TBS)-Tween 0,1% durante toda la noche a 4 °C, con agitación constante. Transcurrido este período, se incubó la membrana con el anticuerpo primario en una dilución 1:1000 para las muestras de ovario, hepatopáncreas y hemolinfa, y 1:20.000 para la Vg, utilizando leche descremada en polvo y BSA al 6% en TBS-Tween 0,1% para diluir el anticuerpo; la incubación tuvo una duración de 2 hs a temperatura ambiente y en agitación constante. Finalizada esta etapa, la membrana fue lavada tres veces durante 5 min con TBS-Tween 0,1% en agitación para eliminar restos del anticuerpo primario unido de manera inespecífica. Luego, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-IgG obtenido de cabra y conjugado con HRP peroxidasa (Bio-Rad laboratories®), diluido 1:1000 en leche descremada en polvo al 6% en TBS-Tween 0,1% por una hora, a temperatura ambiente. Tras este tiempo

se repitieron los lavados y se procedió con el revelado. La membrana fue incubada en solución reveladora, preparada con 3,3'-diaminobenzidina tetraclorhidrato (DAB) 0,1% y peróxido de hidrógeno 1%, diluida en buffer Tris-HCl (Dako®), durante 1-2 min, y la reacción fue detenida con agua destilada. Posteriormente, se realizó la adquisición de la imagen para determinar los pesos moleculares de las bandas de interés. El cálculo de los pesos moleculares de las bandas obtenidas se realizó por medio de la comparación y relativización con los estándares de peso molecular.

Resultados

Se aisló y purificó exitosamente la lipoproteína Vg a partir del pool de ovarios de hembras ovígeras de *N. granulata* según el protocolo descrito anteriormente. La pureza de la lipoproteína fue verificada mediante una corrida electroforética (Figura 47), identificándose una banda proteica alrededor de los 520 KDa correspondiente a la Vg en estudio, en coincidencia con lo observado por Ferré *et al.* (2012) en la especie *C. quadricarinatus*.

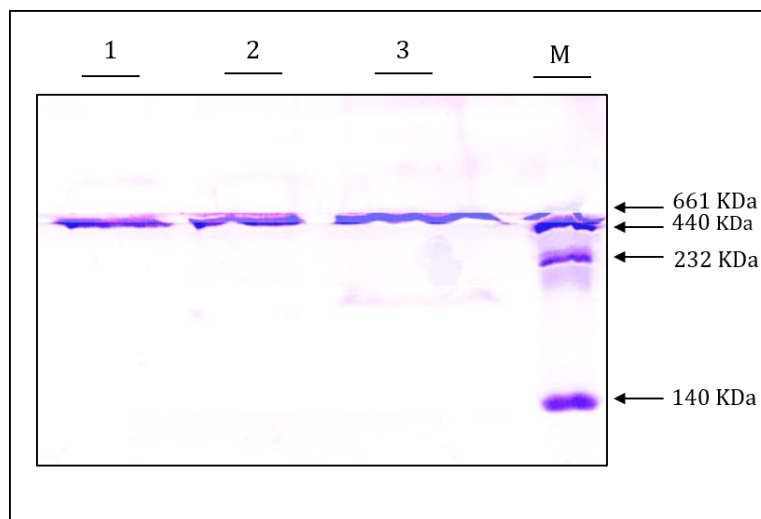


Figura 47. Gel de poliacrilamida realizado para la verificación de la pureza de la lipoproteína Vg aislada de *N. granulata*. Calle 1: 7,5 µg de Vg; calle 2: 15,2 µg de Vg; calle 3: 30,5 µg de Vg; calle M: marcador de peso molecular. A la derecha se indican los pesos moleculares correspondientes al marcador estándar utilizado.

La producción del anticuerpo primario anti-Vg, específico para la especie en estudio, fue realizada satisfactoriamente evidenciándose su especificidad a través de la técnica de Western blot. En la Figura 48 pueden observarse nítidamente las bandas correspondientes a las subunidades peptídicas que conforman la Vg de *N. granulata*. Se identificaron tres subunidades principales, cuyos pesos moleculares establecidos corresponden a 270, 180 y 86 KDa, mostrando similitudes con lo reportado en otras especies de crustáceos (Abdu *et al.*, 2001; Serrano-Pinto *et al.*, 2003; Khalaila *et al.*, 2004). En la calle donde fue sembrada la muestra de ovario se observan varias bandas coincidentes con la corrida de la Vg pura, lo que estaría demostrando que el anticuerpo reconoce en este órgano las subunidades de las Vn allí presentes. Con respecto a las muestras de hepatopáncreas y hemolinfa, el anticuerpo anti-Vg parecería reconocer sólo la subunidad de menor peso molecular (86 KDa). Y en particular, en la calle donde fue sembrada la muestra de

hemolinfa, se observa un espacio en color blanco debido a la saturación de la solución de revelado.

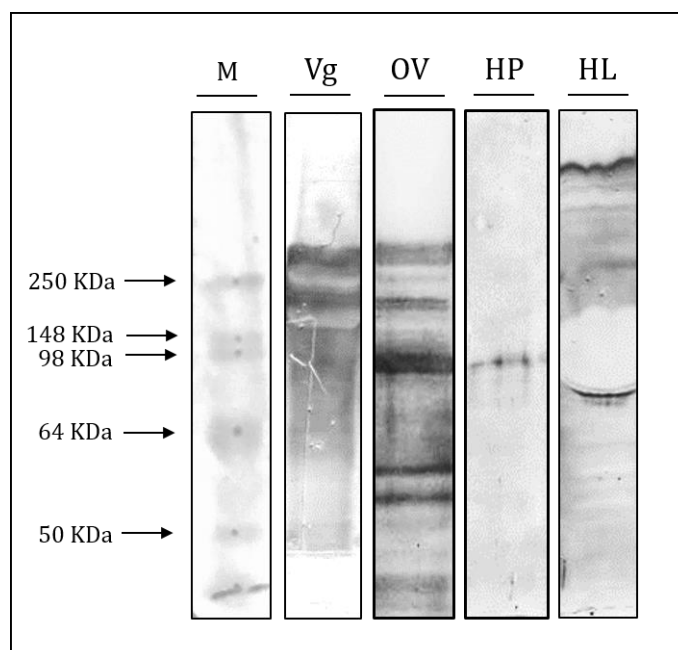


Figura 48. Western blot representativo para la lipoproteína vitelogenina (Vg) de *N. granulata* y muestras de ovario, hepatopáncreas y hemolinfa. Calle Vg: vitelogenina pura; calle OV: muestra de ovario; calle HP: muestra de hepatopáncreas; calle HL: muestra de hemolinfa; calle M: marcador de peso molecular. A la izquierda se indican los pesos moleculares correspondientes al marcador estándar utilizado.

❖ **RECETAS**

Solución de Bouin:

Acido Pícrico: 700 mL

Formol al 40%: 250 mL

Ácido acético glacial: 50 mL

Solución de vainillina (0,016 M):

K₂HPO₄: 57,97 g

Vainillina: 2,4 g

Agua destilada: 1000 mL

Reactivo de Lowry:

Reactivo A:

Na₂CO₃: 20 g

NaOH 0,1N: 1000 mL

Reactivo B:

KNaC₄H₄O₆·4H₂O 2%: 1 mL

CuSO₄ 1%: 1 mL

Reactivo C:

Reactivo A: 50 mL

Reactivo B: 1 mL

Reactivo de Bradford:

Azul de Coomassie: 100 mg

Etanol 96%: 50 mL

H₃PO₄ 85%: 100 mL

Agua destilada: 850 mL

Medio de cultivo:

M 199: 9,9 g

NaHCO₃: 2,2 g

Penicilina G: 60 mg

Estreptomicina: 60 mg

Suero Fetal Bovino: 10 mL

PMSF 0,1 mM: 500 µL

EDTA 1 mM: 10 mL

Solución Salina: 980 mL

pH: 7,4

Solución Salina para medio de cultivo:

NaCl: 20,50 g

KCl: 2,57 g

MgCl₂: 0,94 g

MgSO₄: 0,76

H₃BO₃: 0,99 g

Agua destilada: 1000 mL

pH: 7,4

Geles de agarosa:

Agarosa: 1 g

Buffer TAE: 50 mL

Bromuro de etidio: 2 µL

Técnica ELISA:**Buffer fosfato de sodio (50 mM):**

Na₂HPO₄: 7,1 g

NaCl: 2,92 g

Agua destilada: 1000 mL

pH=7,4

Buffer coating:

Na_2CO_3 : 1,7 g

HNaCO_3 : 2,9 g

Agua destilada: 1000 mL

pH: 9,6

PBS 10X:

NaCl : 80 g

KCl : 20 g

KH_2PO_4 : 20 g

Na_2HPO_4 : 11,5 g

Agua destilada: 1000 mL

pH: 7,4

PBS-Tween 0,05%:

PBS 1X: 1000 mL

Tween: 500 μL

pH: 7,4

BSA 2%:

BSA: 2 g

PBS-Tween: 100 mL

Solución de revelado:

Ácido cítrico: 0,23 g

Na_2HPO_4 : 0,34 g

ABTS: 7,2 mg

H_2O_2 : 2,4 μL

Agua destilada: 24 mL

pH: 5

Técnica Western Blot:**Buffer de siembra 5X:**

Tris base: 0,375 g

SDS: 1 g

Glicina: 1 mL

Azul de bromofenol: punta de espátula

β -mercaptoetanol: 1 mL

Agua destilada: 8 mL

pH: 6,8

Buffer de corrida:

Tris-HCl: 30 g

Glicina: 144 g

SDS: 1 g

Agua destilada: 1000 mL

pH: 6,8

Buffer de transferencia:

Tris Base: 30 g

Glicina: 144 g

Metanol: 200 mL

SDS: 1 g

Agua destilada: 800 mL

pH: 8,3

Gel concentrador 5%:

Acrilamida 30%: 0,375 mL

Buffer stacking (Tris-HCl 2X): 1,125 mL

Agua destilada: 0,75 mL

Persulfato de amonio 10%: 37,5 μ L

TEMED: 3,8 μ L

Gel separador 7,5%:

Acrilamida 30%: 1,25 mL

Buffer separador (Tris-HCl 4X): 1,25 mL

Agua destilada: 2,5 mL

Persulfato de amonio 10%: 33,3 μ L

TEMED: 3,3 μ L

TBS-10X:

Tris-HCl: 24 g

NaCl: 88 g

Agua destilada: 1000 mL

pH: 7,5

TBS-Tween 0,1%:

TBS 1X: 1000 mL

Tween: 1 mL

pH: 7,5

“Efectos del herbicida atrazina sobre el crecimiento ovárico y su control endocrino en crustáceos decápodos”

Lic. Gabriela Romina Silveyra
FCEN-UBA
2019