

TRABAJOS ORIGINALES / ORIGINAL ARTICLES

EMPLEO DE LA REGENERACIÓN DE LA PLANARIA DE AGUA DULCE *GIRARDIA FESTAE* (BORELLI, 1898) (TRICLADIDA: DUGESIIDAE) PARA EVALUAR LA TOXICIDAD DEL CARBOFURANO*

EMPLOYMENT OF REGENERATION OF FRESHWATER PLANARIAN *GIRARDIA FESTAE* (BORELLI, 1898) (TRICLADIDA: DUGESIIDAE) TO EVALUATE TOXICITY OF CARBOFURAN

José Iannacone^{1,2} & Miguel Tejada¹

Fecha de recepción: 06 de enero de 2006, fecha de aceptación: 30 de mayo de 2006.

Forma de citar: Iannacone, J & Tejada, M. 2007. *Empleo de la regeneración de la planaria de agua dulce Girardia festae (Borelli, 1898) (Tricladida: DugesIIDae) para evaluar la toxicidad del carbofurano*. Neotropical Helminthology, vol. 1, no. 1, pp. 7-13.

Resumen

El uso de plaguicidas en el mundo aumenta en forma desproporcionada cada día, por lo que se necesitan urgentemente adecuados agentes bioindicadores. Para una oportuna evaluación del riesgo ambiental de los ambientes acuáticos dulceacuícolas en Perú, se requiere el empleo de organismos biológicos como la planaria de agua dulce *Girardia festae* (Borelli, 1898) (Tricladida: DugesIIDae). Las planarias son importantes componentes de los ecosistemas límnicos, algunas tienen amplia distribución geográfica, son sensibles a contaminantes, poseen alta capacidad de regeneración y son de fácil cultivo en el laboratorio. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto subletal del insecticida carbofurano sobre la regeneración de *G. festae*. Se evaluaron planarias seccionadas en tres niveles (cefálico, medio y caudal) realizando dos cortes transversales (amputación prefaringeal y postfaringeal) en el plano dorso-ventral y se individualizaron en un medio control (agua de grifo autoclavada) y en dos diluciones del carbofurano (1,17 mg L⁻¹ y 2,34 mg L⁻¹) en envases plásticos de 30 mL. El bioensayo ecotoxicológico se concluyó a 17 días de exposición hasta lograr la regeneración completa de las planarias. La parte media regenerada logró un mayor porcentaje de crecimiento en el control en comparación con las dos concentraciones de carbofurano. En contraste se observó la hormesis, en las partes cefálicas y caudales regeneradas, al lograr un mayor porcentaje de crecimiento en 2,34 mg de carbofurano L⁻¹ en comparación con el control.

Palabras clave: bioensayo – carbofurano – ecotoxicología – *Girardia* – planarias – regeneración.

Abstract

The worldwide use of pesticides disproportionately increases every day. For this reason, appropriated bioindicator agents are urgently needed. For a suitable environmental risk assessment of freshwater aquatic environment in Peru, employment of biological organism like freshwater planarian *Girardia festae* (Borelli, 1898) (Tricladida: DugesIIDae) is required. Planarians are main component of limnetic ecosystems, some are wide geographic distributed, sensitive to pollutants, capable of regenerating and easily cultured in laboratory conditions. The aim of the current research was to evaluate the sublethal effects of the insecticide carbofuran on regeneration of *G. festae*. Planarians were sectioned in three levels (head, middle and tail) by performing two transversal cuts (prepharyngeal and postpharyngeal amputation) in a dorso-ventral plane. They were individualized in control medium (sterilized tap water) and two dilutions of carbofuran (1.17 mg L⁻¹ and 2.34 mg L⁻¹) in plastic vessels of 30 mL. Ecotoxicological bioassays were concluded at 17 days of exposure until to complete planarian regeneration. The regenerate middle part of the planarians in control medium raised a higher percentage of growth compared to the two concentrations of carbofuran. On the contrary, hormesis in head and tail parts raised a higher percentage of growth in 2.34 mg carbofuran L⁻¹ compared to the control.

Keywords: bioassay – carbofuran – ecotoxicology – *Girardia* – planarians – regeneration.

1 Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

2 Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

(*) Este estudio fue presentado en calidad de resumen a las Jornadas Internacionales Rioplatenses de Toxicología y Ecotoxicología realizado el 1 y 2 de junio, 2005 en Montevideo, Uruguay.

INTRODUCCIÓN

El empleo de los plaguicidas en las prácticas agrícolas aumenta de forma desproporcionada cada día en el mundo (Dobšiková, 2003). Muchos plaguicidas producen efectos tóxicos en los organismos no objetivos del control y provocan efectos deletéreos en los ecosistemas (Iannacone & Lamas, 2003; Tazza, 2005). Los plaguicidas pueden producir un impacto negativo en los ecosistemas agrícolas (Carvalho *et al.*, 2005).

El carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-ilmetilcarbamato, $C_{12}H_{15}NO_3$) es un carbamato sistémico de efecto insecticida, acaricida y nematocida, y con bajo efecto residual (Verma & Dhillon, 2003; Mascolo *et al.*, 2005; Tazza, 2005). Como resultado de su amplio uso, se le puede encontrar en el suelo, en las aguas superficiales, en los alimentos y en la fauna silvestre (Dobšiková, 2003). En los ambientes acuáticos, la toxicidad del carbofurano es influenciada por las poblaciones microbianas presentes en los sedimentos, puede degradarse en aguas neutras y moderadamente alcalinas (Mascolo *et al.*, 2005). El carbofurano causa necrosis difusa, desarrreglo cordal, individualización de hepatocitos y cambios en el metabolismo de lípidos en peces (Begum & Vijayaraghavan, 2001; Sarkar *et al.*, 2005).

El Phylum Platyhelminthes (helmintos planos) comprende aproximadamente 50 000 especies que habitan una gran variedad de nichos ecológicos (Littlewood & Bray, 2001). Los Platyhelminthes son considerados organismos biológicos importantes, por ocupar una posición clave en la evolución de los metazoarios, como miembros basales de los bilateria y por ser el cuarto phylum animal más grande de la tierra (Newmark & Sánchez-Alvarado, 2002). Dentro de los Platyhelminthes, las planarias dulceacuícolas (Turbellaria: Tricladida) tienen una elevada plasticidad y la habilidad de regenerar completamente a partir de pequeños fragmentos (1/279 de un organismo adulto), este fenómeno es conocido por más de 200 años (Hauser *et al.*, 1979; Hauser *et al.*, 1980; De Vries & Sluys, 1991; Sanchez-Alvarado *et al.*, 2002). El fenómeno de regeneración morfoláctico epimórfico blastemal en los modelos con planarias (Gehrke-Friedrich & Hauser, 1982; Sánchez-Alvarado, 2000; Salo & Baguna, 2002), provee una única oportunidad de estudiar el mecanismo de control de la pluripotencialidad celular de las células madres "stem cells" mesenquimales de-

nominadas neoblastos (Newmark & Sánchez-Alvarado, 2000; Newmark & Sánchez-Alvarado, 2002).

Debido a su extraordinaria capacidad para la regeneración y para la reproducción asexual, las planarias han sido empleadas como organismos modelo para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que conducen a la regeneración tisular (Santos & Hauser, 1984; Hauser & Santos, 1985; Shinozawa *et al.*, 1995; Guecheva *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2004; Reddien *et al.*, 2004; Sánchez-Alvarado, 1999; Coward *et al.*, 2005). Las planarias son importantes componentes de los ecosistemas límnicos, algunas tienen amplia distribución geográfica, son sensibles a contaminantes, poseen alta capacidad de regeneración y son de fácil cultivo bajo condiciones de laboratorio (Nano *et al.*, 2002; Souza & Leal-Zanchet, 2002; Inoue *et al.*, 2004; Sánchez-Alvarado, 2004).

Para la evaluación del riesgo ambiental de los ambientes acuáticos dulceacuícolas en Perú, se requiere el uso de adecuados organismos biológicos como la planaria de agua dulce *Girardia festae* (Borelli, 1898) (Turbellaria: Dugesiiidae). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto subletal del carbofurano (Furadán 4F®) sobre la regeneración de *G. festae*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Planarias

La colecta de la planaria de agua dulce *G. festae* se realizó en el río Lurín, Pachacamac, Lima, Perú (76°46' LW y 12°05' LS) durante agosto del 2004. Se empleó como carnada de atracción al hígado fresco de pollo, y se esperó entre 15-20 min para que las planarias sean atraídas al atrayente por quimiotaxis. Posteriormente, los individuos fueron llevados al Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma. En el agua del río Lurín fue cambiada por agua de grifo de clorinada, autoclavada e hiperoxigenada por 8 h. Las planarias fueron colocadas individualmente en envases plásticos de 30 mL de capacidad bajo condiciones no controladas de temperatura fluctuantes entre 22 ± 4 °C. Las condiciones térmicas empleadas correspondieron al promedio de temperatura de la ciudad de Lima, Perú. En el Laboratorio, las planarias fueron alimentadas semanalmente con hígado de pollo. 48 h previo a los experimentos, las planarias no se alimentaron (Oviedo *et al.*, 2003).

Carbofurano

La solución madre se preparó a partir del Furadán 4F® (1200 mg IA L⁻¹), (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7il-metilcarbamato; Cl₂H₁₅NO₃; CAS N° 1563-66-2; peso molecular = 221,3; solubilidad en agua = 700 mg L⁻¹; punto de fusión = 153-154°C; dosis de aplicación = 0,5 a 10 lbs IA acre⁻¹; toxicidad = extremadamente tóxico; formulación = pasta fluida; clasificación toxicológica = Ia; Registro 103-96-AG-SENASA, Perú), tomando 2,5 mL del producto y se le agregó 250 mL de agua de grifo de clorinada, autoclavada e hiperoxigenada por 8 h. Luego a partir de diluciones sucesivas, se obtuvieron dos concentraciones: 1,17 mg L⁻¹ y 2,34 mg L⁻¹, respectivamente. Ambas concentraciones, luego de ser preparadas fueron almacenadas en envases de plástico de 250 mL de capacidad. El factor de dilución empleado para las dos concentraciones fue de 0,5.

Bioensayo

Las tres planarias seleccionadas entre 8,5 a 12,1 mm de longitud total, fueron seccionadas en tres niveles (cefálico, medio y caudal) y se realizaron dos cortes transversales (amputación prefaringeal y posfaringeal) en el plano dorso-ventral (Oviedo *et al.*, 2003). Cada una de las tres secciones, se individualizaron en 20 mL del medio control (agua de grifo autoclavada) y en las dos diluciones del carbofurano (1,17 mg IA L⁻¹ y 2,34 mg IA L⁻¹) en envases plásticos de 30 mL de capacidad cubiertos con papel aluminio. Las soluciones y los envases fueron renovados semanalmente. El bioensayo ecotoxicológico se concluyó a los 17 días de exposición hasta lograr la regeneración completa de las planarias en el control (Piontek, 1984; Inoue *et al.*, 2004). Siete lecturas fueron realizadas a los 5, 7,

8, 9, 13, 16 y 17 días de exposición. En cada lectura se procedió a extraer a cada planaria y fue colocada en una lámina portaobjeto de vidrio para ser fotografiada bajo un microscopio estereoscópico de 10 x de aumento. Con el fin de favorecer la inmovilización de las planarias para una adecuada medición fueron colocadas por menos de un minuto a 4 °C de refrigeración. Finalmente, cada individuo de cada concentración fue medido por triplicado en cada una de sus tres secciones en mm con la ayuda de un papel milimetrado. Durante el bioensayo las planarias de agua dulce no fueron alimentadas.

Análisis de datos

Se empleó el ANDEVA (Análisis de Varianza), previa transformación de los datos a logaritmo X+1, con el fin de ajustar los datos a la distribución normal (Zar, 1996), para determinar si existían diferencias significativas entre los tiempos de exposición (5, 7, 8, 9, 13, 16 y 17 días) y entre los tres niveles seccionados (cefálico, medio y caudal) de las planarias. En el caso de existir diferencias significativas se realizó una prueba de significación DVS (Diferencia Verdaderamente Significativa) de Tukey. Se empleó la prueba de Levine para el cálculo de la homogeneidad de las varianzas. Para el cálculo de las estadísticas descriptivas e inferenciales se empleó el paquete estadístico SPSS® v.12,0.

RESULTADOS

La capacidad de regeneración de *G. festae* fue diferente entre las dos concentraciones de carbofurano y las tres secciones evaluadas (Fig. 1 al 3).

Figura 1. Capacidad de regeneración en mm en las tres secciones de corte de *G. festae* en el control de 0 a 17 días de exposición.

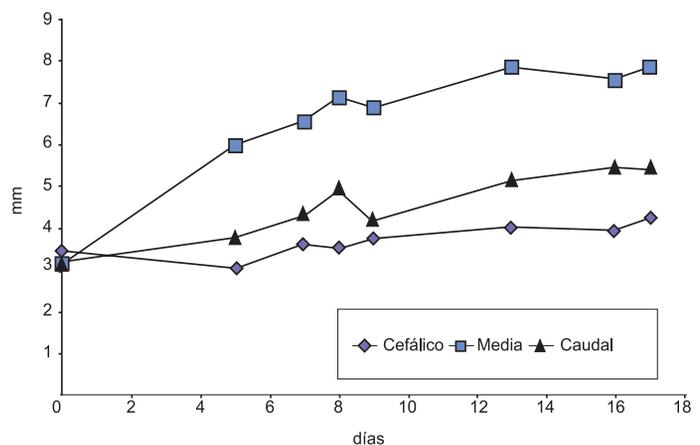


Figura 2. Capacidad de regeneración en mm en las tres secciones de corte de *G. festae* a 1,17 mg carbofurano L⁻¹ de 0 a 17 días de exposición.

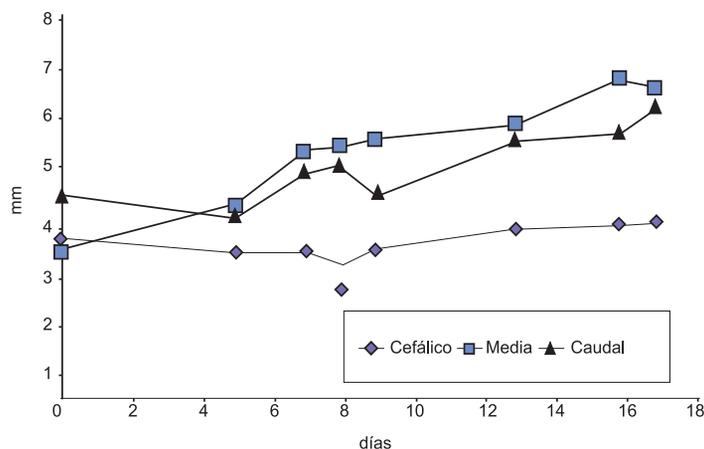
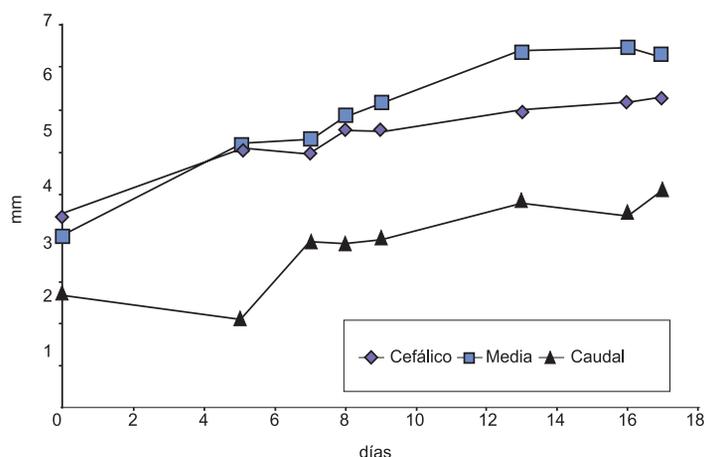


Figura 3. Capacidad de regeneración en mm en las tres secciones de corte de *G. festae* a 2,34 mg carbofurano L⁻¹ de 0 a 17 días de exposición.



Al examinar la sección cefálica de *G. festae* a 1,17 mg IA L⁻¹ de carbofurano, no encontramos diferencias notorias en la regeneración a través de los 17 días de exposición ($F = 2,4$; $p = 0,08$) (Fig. 2). En cambio, existieron diferencias en la sección cefálica en el control ($p = 4,01$; $p = 0,01$) y en 2,34 mg IA L⁻¹ de carbofurano ($F = 5,45$; $p = 0,004$), a los 13 y 8 días, respectivamente. En la sección media de *G. festae*, observamos diferencias significativas en el control ($F = 9,77$; $p = 0,00$), a 1,17 mg IA L⁻¹ ($F = 22,17$; $p = 0,00$) y a 2,34 mg IA L⁻¹ de carbofurano ($F = 11,04$; $p = 0,00$), a los 5, 7 y 5 días, respectivamente en comparación con el día 0. En adición, en la sección caudal de *G. festae*, observamos diferencias significativas en el control ($F = 6,22$; $p = 0,001$), a 1,17 mg IA L⁻¹ ($F = 3,73$; $p = 0,01$) y a 2,34 mg IA L⁻¹ de carbofurano ($F = 20,55$; $p = 0,00$), a los 8, 17 y 7 días, respectivamente en comparación con el día 0. La parte media regenerada logró un mayor porcentaje de crecimiento en el control (149,5%) al compararse con las dos concentraciones de

carbofurano (en 1,17 mg L⁻¹ de 90,4% y en 2,34 mg L⁻¹ de 106,4%) a los 17 días de exposición. En contraste, observamos en las partes cefálicas y caudales regeneradas, un mayor porcentaje de crecimiento en 2,34 mg de carbofurano L⁻¹ (sección cefálica = 62,3% y sección caudal = 93,17%) en comparación con el control (sección cefálica = 22,6% y sección caudal = 69,7%) y con la concentración de 1,17 mg de carbofurano L⁻¹ (sección cefálica = 7,3% y sección caudal = 37,6%).

DISCUSIÓN

El carbofurano es un plaguicida altamente tóxico para peces al presentar valores de CL₅₀ (Concentración letal media) menores a 1 mg L⁻¹ (Dobšíková, 2003). Los resultados del carbofurano sobre el invertebrado *Daphnia magna* (Strauss, 1820) difieren en un orden de magnitud al ser comparados con los resultados de otros organismos acuáticos (CL₅₀ = 0,047 mg L⁻¹ a 24 h de exposición y CL₅₀ = 0,018 mg L⁻¹ a 48 h de ex-

posición) (Dobšíková, 2003). Las dos concentraciones evaluadas de carbofurano sobre *G. festae* en el presente trabajo se encuentran ligeramente sobre los valores de CL_{50} para peces e invertebrados acuáticos registrados en la literatura científica. Por otro lado, la concentración ambientalmente esperada de carbofurano en el agua es de $0,48 \text{ mg L}^{-1}$, menor a las concentraciones empleadas en el presente estudio sobre *G. festae*.

En el presente estudio se ha observado a los 5 días de exposición en la sección cefálica del control y en la concentración de $1,17 \text{ mg IA L}^{-1}$ de carbofurano; así como, en la sección caudal a $1,17 \text{ mg IA L}^{-1}$ y a $2,34 \text{ mg de carbofurano L}^{-1}$, una disminución en el tamaño de *G. festae* en comparación con el día 0. Newmark & Sánchez-Alvarado (2002) atribuyen el fenómeno de decrecimiento en planarias dulceacuícolas a condiciones limitantes nutricionales y a que pueden disminuir a un tamaño que es más pequeño que en el momento de la eclosión. Considerando que los individuos de *G. festae* no fueron alimentados durante los 17 días del bioensayo, este hecho pudo influenciar que existiera una disminución en algunas lecturas del tamaño de la sección en comparación a la lectura anterior.

La toxicidad del carbofurano es altamente dependiente de la duración, frecuencia, intensidad de exposición y la susceptibilidad del organismo evaluado, siendo este último influenciado por la edad, sexo, vigor y variación genética (Trotter *et al.*, 1991; Antón *et al.*, 1993; Dobšíková, 2003; Iesce *et al.*, 2006). Así, la parte media regenerada de *G. festae* logró un mayor porcentaje de crecimiento estadísticamente significativo en el control en comparación con la menor concentración de carbofurano. En contraste, se observó ligeramente una hormesis, en las partes cefálicas y caudales regeneradas, al lograr un mayor porcentaje de crecimiento estadísticamente significativo en $2,34 \text{ mg de carbofurano L}^{-1}$ en comparación con el control. Morse (1998) señala que la hormesis u hormoligosis es el fenómeno por el cual cantidades pequeñas de un agente estresante, entre ellos los insecticidas, puede ser útil para un organismo en ambientes subóptimos, este fenómeno ocurre en numerosos invertebrados.

Shinozawa *et al.* (1995) indica que la regeneración de la sección cefálica puede ser influenciada por efectos térmicos (80°C por 30 min) y sustancias químicas, mientras que la sección caudal permanece invariable. Nuestros

resultados mostraron que la capacidad de regeneración de la sección cefálica y caudal en el control y las diferentes concentraciones fue diferente.

Se ha encontrado que la planaria de agua dulce *Girardia tigrina* (Girard, 1850) (Tricladida: Turbellaria) es poco afectada por el resmetrin, temefos y la ciromazina. Sin embargo, el metopreno y el benzil-1,3 benzodioxole no provocaron ningún efecto sobre este turbelario (Nelson *et al.*, 1994; Villar *et al.*, 1994). Debido a la extraordinaria capacidad de regeneración de la planaria de agua dulce, *G. festae*, ésta puede ser un organismo adecuado para evaluar la ecotoxicidad de plaguicidas, como el carbofurano (Sánchez-Alvarado, 2004), en comparación con peces, invertebrados y algas dulceacuícolas (Antón *et al.*, 1993; Dobšíková, 2003; Iesce *et al.*, 2006), debido a que son representativos del bentos dulceacuícola, son sensibles a contaminantes, poseen alta capacidad de regeneración y son de fácil cultivo bajo condiciones de laboratorio

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Hugo Gonzales, catedrático y Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma (URP), Lima, Perú por las sugerencias críticas al presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antón, F A, Laborda, E, Laborda, P & Ramos, E. 1993. *Carbofuran acute toxicity to freshwater algae and fish*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 50, pp. 400-406.
- Begum, G & Vijayaraghavan, S. 2001. *Carbofuran toxicity on total lipids and free fatty acids in the air breathing fish during exposure and cessation of exposure-in vivo*. Environmental Monitoring Assessment, vol. 70, pp. 233-239.
- Carvalho, G A, Morais, A A, Rocha, L C D, Godoy, M S & Cosme, L. V. 2005. *Selectividade de inseticidas para ovos e ninfas de Orius insidiosus (Say)* (Hemiptera: Anthocoridae). Neotropical Entomology, vol. 34, pp. 423-427.
- Coward, S J, Hirsh, F M & Taylor, J H. 2005. *Thymidine kinase activity during regeneration in the planarian Dugesia doroccephala*. Journal of Experimental Zoology, vol. 173, pp. 269-277.
- De Vries, E & Sluys, R. 1991. *Phylogenetic rela-*

- relationships of the genus *Dugesia* (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola). *Journal of Zoology*, vol. 223, pp. 103-116.
- Dobšiková, R. 2003. *Acute toxicity of carbofuran to selected species of aquatic and terrestrial organisms*. *Plant Protection Science*, vol. 39, pp. 103-108.
- Gehrke-Friedrich, S & Hauser, J. 1982. *Morphogenesis of regenerating fragments of Dugesia schubarti*. *Experimental Cell Biology*, vol. 50, pp. 61-71.
- Guecheva, T, Henriques, J A & Erdtmann, B. 2001. *Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay)*. *Mutation Research*, vol. 497, pp. 19-27.
- Hauser, J, Dias, M G & Gehrke-Friedrich, S. 1980. *Processos histomorfológicos na regeneração em uma cauda de Dugesia schubarti (Marcus, 1946)*. *Acta Biologica Leopoldensia*, vol. 2, pp. 183-196.
- Hauser, J & Santos, W. H. 1985. *Studies of regeneration in the Dugesia anderlani Kawakatsu & Hauser, 1983. I Part – Regeneration of the amputated head. Morphological study*. *Acta Biologica Leopoldensia*, vol. 7, pp. 163-174.
- Hauser, J, Silveira, D & Carvalho, I M. 1979. *Observations on the regeneration rhythm of a new head in different regions of the body of Dugesia schubarti*. *Acta Biologica Leopoldensia*, vol. 2, pp. 225-236.
- Hwang, J. S, Kobayashi, C, Agata, K, Ikeo, K & Gjobori, T. 2004. *Detection of apoptosis during planarian regeneration by the expression of apoptosis-related genes and TUNEL assay*. *Gene*, vol. 333, pp. 15-25.
- Iannacone, J & Lamas, G. 2003. *Efectos toxicológicos de extractos de molle (Schinus molle) y lantana (Lantana camara) sobre Chrysoperla externa (Neuroptera: Chrysopidae), Trichogramma pintoi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y Copidosoma koehleri (Hymenoptera: Encyrtidae) en el Perú*. *Agricultura Técnica (Chile)*, vol. 63, pp. 347-360.
- Iesce, M R, della Greca, M, Cermola, F, Rubino, M, Isidori, M & Pascarella, L. 2006. *Transformation and ecotoxicity of carbamic pesticides in water*. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 13, pp. 105-109.
- Inoue, T, Kumamoto, H, Okamoto, K, Umesono, Y, Sakai, M, Sánchez, A A & Agata, K. 2004. *Morphological and functional recovery of the planarian photosensing system during head regeneration*. *Zoological Science*, vol. 21, pp. 275-283.
- Littlewood, T J & Bray, R A. (eds) 2001. *Interrelationships of the Platyhelminthes*, Taylor and Francis, London and New York.
- Mascolo, G, Lopez, A, Detomaso, A. & Guzzella, L. 2005. *UV degradation of carbofuran insecticide in aqueous solution: identification and toxicity evolution of by-products*. *Water Supply*, vol. 4, pp. 313-319.
- Morse, J G. 1998. *Agricultural implications of pesticide-induced hormesis of insects and mites*. *Human and Experimental Toxicology*, vol. 17, pp. 266-269.
- Nano, G M, Binello, A, Bianco, M A, Ugazio, G & Burdino, S. 2002. *In vitro tests to evaluate potential biological activity in natural substances*. *Fito-terapia*, vol 73, pp. 140-146.
- Nelson, F R, Gray, J & Aikhionbare, F. 1994. *Tolerance of the planarian Dugesia tigrina (Tricladida: Turbellaria) to pesticides and insect growth regulators in a small-scale field study*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, vol. 10, pp. 104-105.
- Newmark, P A & Sánchez-Alvarado, A. 2000. *Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians*. *Developmental Biology*, vol. 220, pp. 142-153.
- Newmark, P A & Sánchez-Alvarado, A. 2002. *Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics*. *Nature Reviews Genetics*, vol. 3, pp. 210-220.
- Oviedo, N J, Newmark, P .A. & Sánchez-Alvarado, A. 2003. *Allometric scaling and proportion regulation in the freshwater planarian Schmidtea mediterranea*. *Development Dynamic*, vol. 226, pp. 326-333.
- Piontek, M. 1984. *The regenerating ability of the planarian Dugesia tigrina (Girard) and the possibility of its use in reproduction of this species*. *Acta Hydrobiologica*, vol. 25/26, pp. 81-86.
- Reddien, P. W. & Sánchez-Alvarado, A. 2004. *Fundamentals of planarian regeneration*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 20, pp. 725-757.
- Salo, E & Baguna, J. 2002. *Regeneration in plana-*

- rian and other worms: new findings, new tools, and new perspectives. *Journal of Experimental Zoology*, vol. 292, pp. 528-539.
- Sánchez-Alvarado, A. 1999. *Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration*. *Proceedings of the National Academy of Science*, vol. 96, pp. 5049-5054.
- Sánchez-Alvarado, A. 2000. *Regeneration in the metazoans: why does it happen?*. *Bioessays*, vol. 22, pp. 578-590.
- Sánchez-Alvarado, A, Newmark, P A, Robb, S M C & Juste, R. 2002. *The Schmidtea mediterranea database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration*. *Development*, vol. 129, pp. 5659-5665.
- Sánchez-Alvarado, A. 2004. *Regeneration and the need for simpler model organisms*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, vol. 359, pp. 759-763.
- Santos, W H & Hauser, J. 1984. *Irregular formations in the Dugesia schubarti (Marcus, 1946) regenerating process. A contribution to the problem of the axial gradient theory*. *Acta Biologica Leopoldensia*, vol. 6, pp. 231-240.
- Sarkar, B, Chastterjee, A, Adhikari, S & Ayyappan, S. 2005. *Carbofuran –and cypermethrin-induced histopathological alterations in the liver of Labeo rohita (Hamilton) and its recovery*. *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 21, pp. 131-135.
- Shinozawa, T, Shiozaki, S, Ezaki, M, Fujino, H, Tanaka, T & Saheki, T. 1995. *Regulation factors for planarian regeneration*. *Hydrobiologia*, vol. 305, pp. 247-253.
- Souza, S T & Leal-Zanchet, A M. 2002. *Histological and histochemical aspects of the penial glands of Girardia biapertura Sluys, 1997 (Platyhelminthes; Tricladida, Paludicola)*. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 62, pp. 547-555.
- Tazza, M. 2005. *Plaguicidas Ia-Ib en el Perú. Campaña para la Prohibición y Restricción de los Plaguicidas Extremadamente y Altamente Peligrosos*, RAAA (Red de Acción en Alternativas al uso de Agroquímicos), Lima.
- Trotter, D M, Kent, R A & Wong, M P 1991. *Aquatic fate and effect of carbofuran*. *Critical Review of Environmental Contribution*, vol. 21, pp. 137-176.
- Verma, N & Dhillon, S S. 2003. *Biosensors for monitoring insecticides and herbicides - a survey*. *International Journal of Environmental Studies*, vol. 60, pp. 29-43.
- Villar, D, Gonzales, M, Gualda, M J & Schaeffer, D J. 1994. *Effects of organophosphorus insecticides on Dugesia tigrina: cholinesterase activity and head regeneration*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 52, pp. 319-324.
- Zar, J. 1996. *Biostatistical Analysis*, 3th edn, Prentice-Hall, Inc., New Jersey.

Autor para correspondencia / Author to correspondence:

José Iannacone
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma.
Av. Benavides 5440. Santiago de Surco, Lima 33. Lima, Perú.

Correo electrónico: joseiannacone@yahoo.es
Teléfono: (51) - 12573227. Telefax: (051) - 014600930

