

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
DOCTOR EN BIOLOGÍA  
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE  
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE**

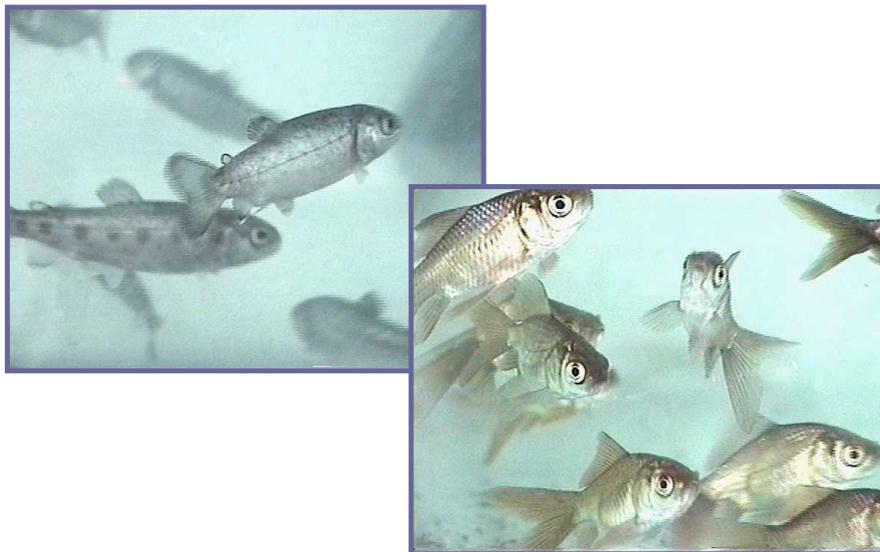


**EVALUACIÓN DE LAS RESPUESTAS MOLECULARES  
PRODUCIDAS POR LA EXPOSICIÓN DE PECES A PLAGUICIDAS  
FOSFORADOS Y CARBAMATOS**

**ANA FERRARI**

**DIRECTOR: Dra. ANA PECHEN de D'ANGELO**

**CODIRECTOR: Dr. ANDRÉS VENTURINO**



**LIBIQUIMA- Facultad de Ingeniería- Universidad Nacional del Comahue**

**- Abril 2004 -**

***Dedico esta tesis y agradezco:***

*A mis padres por darme apoyo constante y por educarme en el respeto a la honestidad y al esfuerzo.*

*A Julio por acompañarme durante todo momento, por su apoyo, su amor y su confianza y por ser mi fuerza para seguir adelante en el trabajo y en la vida.*

# ÍNDICE

□ <b>AGRADECIMIENTOS</b>	Pág. I
□ <b>RESUMEN</b>	Pág. XX
□ <b>ABSTRACT</b>	Pág. XXII
□ <b>I. INTRODUCCIÓN</b>	Pág. 1
<b>1. Plaguicidas y el Hombre</b>	Pág. 1
<b>2. Insecticidas</b>	Pág. 4
2.1 Mecanismos Comunes Toxicidad de Organofosforados y Carbamatos	Pág. 4
2.2 Organofosforados	Pág. 5
2.2.1 Metabolismo de los Organofosforados	Pág. 7
2.2.2 Mecanismo de Acción de los Organofosforados	Pág. 12
2.2.2.1 Reacciones de la Enzima Fosforilada: Reactivación y envejecimiento	Pág. 14
2.3 Carbamatos	Pág. 15
2.3.1 Metabolismo de los Carbamatos	Pág. 17
2.3.2 Mecanismo de Acción de los Carbamatos	Pág. 18
<b>3. Dinámica en el Medio Ambiente</b>	
<b>y Contaminación de Sistemas Acuáticos</b>	Pág. 20
3.1 Volatilización	Pág. 22
3.2 Lixiviación, percolado y escurrimiento superficial	Pág. 23
<b>4. Bioacumulación en Organismos Acuáticos</b>	Pág. 25

<b>5. Toxicidad</b>	Pág. 29
<b>5.1 Biomarcadores</b>	Pág. 32
5.1.1 Acetilcolinesterasa (AChE)	Pág. 36
5.1.2 Carboxilesterasas (Aliesterasas)	Pág. 38
5.1.3 Sistema de defensa antioxidante	Pág. 39
5.1.4 Inducción de proteínas de estrés	Pág. 42
5.1.5 Señalización celular. Fosforilación de proteínas	Pág. 43
<b>6. Importancia de los peces en los estudios ecotoxicológicos</b>	Pág. 44
<b>□ HIPÓTESIS</b>	Pág. 47
<b>□ OBJETIVOS</b>	Pág. 48
<b>□ II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	Pág. 49
<b>1. Material Biológico</b>	Pág. 49
<b>2. Insecticidas Utilizados</b>	Pág. 49
<b>3. Materiales</b>	Pág. 50
<b>4. Diseño Experimental</b>	Pág. 51
4.1 Condiciones generales de ensayo	Pág. 51
4.2 Protocolos de exposición	Pág. 52
4.2.1 Toxicidad Aguda	Pág. 52
4.2.2 Actividad de Esterasas	Pág. 53
4.2.3 Inhibición y Recuperación de Esterasas	Pág. 53
4.2.4 Inhibición y Recuperación de Esterasas en Exposiciones Reiteradas	Pág. 54
4.2.5 Efecto de Insecticidas sobre el Sistema Antioxidante y la Enzima Detoxificante Aliesterasa	Pág. 54

4.2.6 Ensayos para Evaluar el Perfil de Fosforilación Proteica	Pág. 55
4.2.7 Ensayos para Evaluar los Niveles de Citocromo P450 1A	Pág. 55
4.2.8 Evaluación de los Niveles de Proteínas de Estrés	Pág. 55
<b>5. Determinaciones enzimáticas y espectrofotométricas</b>	Pág. 55
5.1 Determinación de la Actividad de Acetilcolinesterasa	Pág. 55
5.2 Determinación de Carboxilesterasas (Aliesterasas)	Pág. 57
5.3 Determinación de Proteínas Totales	Pág. 57
5.4 Determinación de Glutación reducido endógeno (GSH)	Pág. 58
5.5 Determinación de la actividad de Catalasa	Pág. 58
5.6 Determinación de la actividad de Glutación-S-Transferasa	Pág. 59
5.7 Cuantificación de peróxidos lipídicos	Pág. 60
5.7.1 Preparación de los extractos lipídicos	Pág. 60
5.7.2 Determinación de peróxidos lipídicos	Pág. 60
5.8 Determinación de fosfolípidos	Pág. 61
<b>6. Fosforilación de Proteínas</b>	Pág. 62
6.1 Preparación de las muestras	Pág. 62
6.2 Reacción de fosforilación	Pág. 62
<b>7. Separación electroforética de las proteínas</b>	Pág. 63
7.1 En geles desnaturalizantes: SDS-PAGE	Pág. 63
7.1.1 Composición de los geles	Pág. 63
7.1.2 Preparación de las muestras	Pág. 64
7.1.3 Separación electroforética	Pág. 64
7.2 En Geles Nativos	Pág. 64
7.2.1 Preparación de las muestras	Pág. 65
<b>8. Revelado de Geles</b>	Pág. 65

8.1 Tinción Inespecífica	Pág. 65
8.2 Determinación de Actividades de Esterasas en Gel	Pág. 65
8.2.1 Actividad de Esterasas Totales	Pág. 65
8.2.2 Actividad de Colinesterasas	Pág. 66
8.3 Revelado con Anticuerpos Específicos	Pág. 66
8.3.1 Electrotransferencia	Pág. 66
8.3.2 Tinción con Anticuerpos Específicos	Pág. 67
8.4. Revelado por Autorradiografía	Pág. 68
<b>9. Biodistribución del Paratión</b>	Pág. 68
9.1 Exposición a paratión	Pág. 68
9.2 Extracción y cuantificación	Pág. 69
<b>10. Extracción y Cuantificación de Insecticidas por Cromatografía Gaseosa</b>	Pág. 69
10.1 Extracción	Pág. 69
10.2 Cuantificación	Pág. 70
<b>11. Decontaminación del Material Utilizado</b>	Pág. 70
<b>12. Análisis Estadísticos</b>	Pág. 71
<b>□ III. RESULTADOS</b>	Pág. 73
<b>1. Toxicidad Aguda</b>	Pág. 73
<b>2. Blancos Primarios de Acción</b>	Pág. 75
2.1 Inhibición de la Actividad de Esterasas	Pág. 75
2.1.1 ChE cerebral de <i>C. auratus</i>	Pág. 75
2.1.2 ChE cerebral y muscular de <i>O. mykiss</i>	Pág. 78
2.2 Aliesterasa hepática de <i>O. mykiss</i>	Pág. 82

<b>2.3 Inhibición y Recuperación de la Actividad de Esterasas</b>	Pág. 84
2.3.1 Juveniles de <i>C. auratus</i>	Pág. 84
2.3.2 Juveniles de <i>O. mykiss</i>	Pág. 88
2.3.2.1 Aliesterasa cerebral	Pág. 91
2.3.3 Inhibición y Recuperación de colinesterasa cerebral y muscular de <i>O. mykiss</i> luego de exposiciones reiteradas a MeAz	Pág. 93
<b>2.4 Evaluación del Efecto del Metil Azinfos sobre el Patrón de Isoenzimas de Esterasas Cerebrales</b>	Pág. 96
<b>3. Biodistribución del Paratión en <i>Cyprinus carpio</i></b>	Pág. 98
<b>4. Evaluación del Sistema Antioxidante</b>	Pág. 100
4.1 Contenido de Glutatión Reducido Endógeno	Pág. 100
4.2 Actividad Enzimática de la Glutatión-S-Transferasa	Pág. 103
4.3 Actividad Enzimática de Catalasa	Pág. 106
4.4 Niveles Hepáticos de Citocromo P450 1A en <i>O. mykiss</i>	Pág. 109
<b>5. Evaluación del patrón de Fosforilación de Proteínas</b>	Pág. 110
5.1 Puesta a punto del tiempo adecuado de fosforilación	Pág. 110
5.2 Efecto de la exposición a insecticidas sobre la fosforilación proteica	Pág. 111
5.2.1 Fracción Nuclear Hepática	Pág. 111
5.2.2 Fracción Nuclear Cerebral	Pág. 114
<b>6. Proteínas de Estrés</b>	Pág. 116
6.1 Proteína Hsp 60	Pág. 116
6.2 Proteína Hsp 70	Pág. 118
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	Pág. 121
<b>1. Toxicidad Aguda</b>	Pág. 121

---

<b>2. Relación entre Mortalidad e Inhibición de Esterasas</b>	Pág. 123
2.1 Colinesterasas cerebral y muscular	Pág. 123
2.2 Aliesterasas	Pág. 127
<b>3. Inhibición y Recuperación de Esterasas</b>	Pág. 128
3.1 Colinesterasas cerebral y muscular	Pág. 128
3.2 Aliesterasas	Pág. 132
<b>4. Utilidad de ChE como biomarcador a campo</b>	Pág. 133
<b>5. Biodistribución del Paratión</b>	Pág. 135
<b>6. Efectos sobre el Sistema Antioxidante</b>	Pág. 137
6.1 El Sistema Antioxidante como Biomarcador	Pág. 147
<b>7. Efectos Sobre la Fosforilación de proteínas</b>	Pág. 148
<b>8. Proteínas de Estrés</b>	Pág. 152
<b>□ V. CONCLUSIONES</b>	Pág. 159
<b>□ VI. PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	Pág. 161
<b>□ VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	Pág. 163
<b>□ VIII. PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES     A CONGRESOS</b>	Pág. 198

# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## A. TABLAS

Tabla 1: Clasificación de los plaguicidas según los organismos blanco	Pág 2
Tabla 2: Pérdidas mundiales en cultivos de cereales por acción de plagas (%)	Pág 2
Tabla 3: Ventas Anuales de Insecticidas Organofosforados en Argentina	Pág 3
Tabla 4: Biomarcadores de Peces apropiados para su implementación en Evaluaciones de Riesgo Ambiental	Pág 35
Tabla 5: Toxicidad aguda del paratión, metil azinfos y carbarilo sobre juveniles de <i>Carassius auratus</i>	Pág 74
Tabla 6: Toxicidad aguda del metil azinfos y carbarilo sobre juveniles de trucha arcoiris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Pág 75
Tabla 7: Concentración Inhibitoria Cincuenta (CI <sub>50</sub> ) para ChE de <i>O. mykiss</i>	Pág 82
Tabla 8: Análisis de biomarcadores en hígado y cerebro de <i>C. carpio</i>	Pág 99

## B. FIGURAS

### I. Introducción

Figura 1: Estructura básica de los organofosforados y ejemplos	Pág 6
Figura 2: Metabolismo de un xenobiótico vía fase I y/o II	Pág 8
Figura 3: Activación y detoxificación metabólica del paratión	Pág 9

Figura 4: Reacción de la enzima AChE con el sustrato natural: acetilcolina	Pág 13
Figura 5: Reacción de los OFs con la enzima AChE	Pág 14
Figura 6: Estructura química del ácido carbámico y algunos insecticidas N-metil carbamatos	Pág 16
Figura 7: Reacción de los carbamatos con la enzima AChE	Pág 18
Figura 8: Aplicación foliar de plaguicidas en montes frutales del Alto Valle de Río Negro y Neuquén con máquina fumigadora	Pág 21
Figura 9: Representación esquemática de los principales fenómenos implicados en la dinámica de plaguicidas	Pág 22
Figura 10: Modelo de bioacumulación para organismos acuáticos	Pág 25
Figura 11: Dibujo esquemático de un pez mostrando los procesos de captación y eliminación de compuestos químicos	Pág 27
Figura 12: Relación entre biodisponibilidad de los contaminantes, concentraciones a nivel de blancos, efectos moleculares y efectos ecotoxicológicos	Pág 29
Figura 13: Representación esquemática del orden secuencial de respuestas al estrés producido por contaminantes en sistemas biológicos	Pág 33
Figura 14: Formas moleculares de AChE	Pág 37
Figura 15: Sistemas de protección contra metabolitos reactivos de oxígeno.	Pág 41

## **II. Materiales y Métodos**

Figura 16: Ilustración de las peceras utilizadas para el desarrollo experimental	Pág 52
---	--------

### III. Resultados

Figura 17: Actividad específica de ChE cerebral de <i>C. auratus</i> en función de la concentración de MeAz	Pág 76
Figura 18: Actividad específica de ChE cerebral de <i>C. auratus</i> en función de la concentración de paratión	Pág 77
Figura 19: Actividad específica de ChE cerebral de <i>C. auratus</i> en función de la concentración de carbarilo	Pág 77
Figura 20: Actividad específica de ChE cerebral de <i>O. mykiss</i> en función de la concentración de MeAz	Pág 80
Figura 21: Actividad específica de ChE muscular de <i>O. mykiss</i> en función de la concentración de MeAz	Pág 80
Figura 22: Actividad Específica de ChE cerebral de <i>O. mykiss</i> en función de la concentración de carbarilo	Pág 81
Figura 23: Actividad Específica de ChE muscular de <i>O. mykiss</i> en función de la concentración de carbarilo	Pág 81
Figura 24: Actividad específica de AliE hepática de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz	Pág 83
Figura 25: Actividad específica de AliE hepática de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de carbarilo	Pág 83
Figura 26: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE cerebral de <i>C. auratus</i> expuestos a 0,1 mg/L de MeAz	Pág 85
Figura 27: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE cerebral de <i>C. auratus</i> expuestos a 0,1 mg/L de paratión	Pág 85
Figura 28: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE cerebral de <i>C. auratus</i> expuestos a 3 mg/L de carbarilo	Pág 87

Figura 29: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE muscular de <i>C. auratus</i> expuestos a 3 mg/L de carbarilo	Pág 87
Figura 30: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE cerebral de <i>O. mykiss</i> expuestos a 1 µg/L de MeAz	Pág 88
Figura 31: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE muscular de <i>O. mykiss</i> expuestos a 1 µg/L de MeAz	Pág 89
Figura 32: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE cerebral de <i>O. mykiss</i> expuestos a 500 µg/L de carbarilo	Pág 90
Figura 33: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE muscular de <i>O. mykiss</i> expuestos a 500 µg/L de carbarilo	Pág 91
Figura 34: Inhibición y recuperación de la actividad específica de AliE cerebral de <i>O. mykiss</i> expuestos a 1 µg/L de MeAz	Pág 92
Figura 35: Inhibición y recuperación de la actividad específica de AliE cerebral de <i>O. mykiss</i> expuestos a 500 µg/L de carbarilo	Pág 93
Figura 36: Actividad específica de ChE cerebral de <i>O. mykiss</i> por exposiciones reiteradas a 1 µg/L de MeAz	Pág 95
Figura 37: Actividad específica de ChE muscular de <i>O. mykiss</i> por exposiciones reiteradas a 1 µg/L de MeAz	Pág 95
Figura 38: Perfil de isoenzimas de esterases cerebrales y musculares controles de <i>C. auratus</i> y <i>O. mykiss</i>	Pág 96
Figura 39: Perfil de isoenzimas de esterases cerebrales de <i>O. mykiss</i> por exposiciones reiteradas a 1 µg/L de MeAz	Pág 97
Figura 40: Distribución de paratión en órganos de <i>C. carpio</i> a distintos tiempos de exposición	Pág 98

Figura 41: Contenido de glutatión reducido (GSH) en hígado de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz	Pág 101
Figura 42: Contenido de glutatión reducido (GSH) en riñón de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz	Pág 101
Figura 43: Contenido de glutatión reducido (GSH) en hígado de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de carbarilo	Pág 102
Figura 44: Contenido de glutatión reducido (GSH) en riñón de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de carbarilo	Pág 103
Figura 45: Actividad específica de GST hepática de juveniles de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz	Pág 104
Figura 46: Actividad específica de GST en riñón de juveniles de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz	Pág 104
Figura 47: Actividad específica de GST hepática de juveniles de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de carbarilo	Pág 105
Figura 48: Actividad específica de GST en riñón de juveniles de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de carbarilo	Pág 105
Figura 49: Actividad específica de catalasa en hígado de juveniles de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz	Pág 106

Figura 50: Actividad específica de catalasa en riñón de juveniles de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz	Pág 107
Figura 51: Actividad específica de catalasa hepática de juveniles de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de carbarilo	Pág 108
Figura 52: Actividad específica de catalasa en riñón de juveniles de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de exposición y la concentración de carbarilo	Pág 108
Figura 53: Citocromo P450 1 A (CYP1A) en hígado de <i>O. mykiss</i>	Pág 109
Figura 54: Fosforilación de proteínas cerebrales de <i>O. mykiss</i> en función del tiempo de incubación con $^{32}\text{P}\gamma$ -ATP	Pág 110
Figura 55: Fracción nuclear de hígado de <i>O. mykiss</i> expuestos a 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ de MeAz	Pág 112
Figura 56: Perfil proteico de la fracción nuclear de hígado de <i>O. mykiss</i> expuestos a 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ de MeAz	Pág 112
Figura 57: Fracción nuclear de hígado de <i>O. mykiss</i> expuestos a 3 $\text{mg}/\text{L}$ de carbarilo	Pág 113
Figura 58: Perfil Proteico de la fracción nuclear de hígado de <i>O. mykiss</i> expuestos a 3 $\text{mg}/\text{L}$ de carbarilo	Pág 113
Figura 59: Fracción nuclear de cerebro de <i>O. mykiss</i> expuestos 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ de MeAz	Pág 114
Figura 60: Perfil proteico de la fracción nuclear de cerebro de <i>O. mykiss</i> expuestos a 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ de MeAz	Pág 115
Figura 61: Fracción nuclear de cerebro de <i>O. mykiss</i> expuestos a 3 $\text{mg}/\text{L}$ de carbarilo	Pág 115

Figura 62: Perfil proteico de la fracción nuclear de cerebro de <i>O. mykiss</i> expuestos a 3 mg/L de carbarilo	Pág 116
Figura 63: Proteína Hsp 60 presente en cerebro de <i>C. auratus</i> controles y expuestos a paratión	Pág 117
Figura 64: Perfil proteico de homogenados totales de cerebro de <i>C. auratus</i>	Pág 117
Figura 65: Proteína Hsp/hsc 70 presente en cerebro de <i>C. auratus</i> controles y expuestos a MeAz	Pág 119
Figura 66: Proteína Hsp/hsc 70 presente en cerebro de <i>C. auratus</i> controles y expuestos a carbarilo	Pág 119
Figura 67: Proteína Hsp/hsc 70 presente en cerebro y músculo de <i>O. mykiss</i> controles y expuestos a carbarilo	Pág 120
Figura 68: Proteína Hsp/hsc 70 presente en cerebro y músculo de <i>O. mykiss</i> controles y expuestos a MeAz	Pág 120
Figura 69: Proteína Hsp/hsc 70 presente en hígado de <i>O. mykiss</i> controles y expuestos a MeAz o carbarilo	Pág 120

#### **IV. Discusión**

Figura 70: Diagrama propuesto de las vías de acción del MeAz en juveniles de <i>O. mykiss</i>	Pág 156
Figura 71: Diagrama propuesto de las vías de acción del carbarilo en juveniles de <i>O. mykiss</i>	Pág 158

## ABREVIATURAS EMPLEADAS

2-4 D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

2-PAM: piridina 2-aldoxima.

ACh: acetil colina.

AChE: acetilcolinesterasa.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Ah-R: receptor de grupos arilo.

AliE: aliesterasas.

ALT: alanina transaminasa.

AMPc: adenosilmonofosfato cíclico.

ANOVA: análisis de la varianza.

AP-1: factor de transcripción "activator protein" sensible al estado redox.

ARE: elemento de respuesta antioxidante.

ASB: Albúmina de suero bovina.

ASB: albúmina de suero bovina.

AST: aspartato transaminasa.

ATP: adenosina trifosfato.

ATPasas: enzimas que hidrolizan ATP.

BCF: factor de bioconcentración.

BCIP: 5-bromo-4-cloro-indolil-fosfato.

BHT: hidroxitolueno butilado.

BMF: factor de biomagnificación.

BuChE: butirilcolinesterasa.

CarbE: carboxilesterasa.

CAT: catalasa.

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitro benceno.

CG: cromatografía gaseosa.

ChE: colinesterasa.

CI<sub>50</sub>: concentración inhibitoria cincuenta.

CKII: proteína quinasa caseína II.

CL<sub>10</sub>: concentración letal diez.

CL<sub>50</sub>: concentración letal cincuenta.

CL<sub>90</sub>: concentración letal noventa.

c-Myc: factor de transcripción de respuesta temprana c-Myc

CRE: “ cyclic AMP response element”, elemento de respuesta a AMPc

CREB: proteína de unión al CRE.

CYP1A: citocromo P450 1A.

DL<sub>50</sub>: dosis letal cincuenta.

DS: desvío estándar.

DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico.

E<sub>2</sub>: Estradiol.

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético.

EGTA: ácido etilenglicol bis-β-amino etileter N,N' tetraacético.

ERK: quinasas de proteínas reguladas por señales extracelulares.

ES: error estándar.

G6PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

GPx: glutatión peróxidasa.

GR: glutatión reductasa.

GSH: glutatión (tripeptido γ-L-Glutamil-L-cisteinilglicina) reducido.

GST: glutatión S-transferasa.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno.

HCl: ácido clorhídrico.

Hepes: ácido N(2 hidroxietil)piperazina N'2 etano sulfónico.

Hsc: “heat shock cognate” proteínas de estrés constitutivas.

HSF-1: “heat shock factor”, factor de transcripción de las Hsp.

Hsp: “heat shock proteins”, proteínas de estrés.

IARC: “International Agency for Research on Cancer”.

Ig: inmunoglobulina.

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

- JUNK: quinasa c-Jun-N-terminal.
- KDa: kilo dalton.
- LSD: mínima diferencia significativa.
- mA: miliamperios.
- MAPK: proteína quinasas dependiente de mitógenos.
- MDA: malondialdehído.
- MeAz: metil azinfos.
- NADPH: nicotinamida adenina di-nucleótido fosfato (forma reducida).
- NBT: Azul nitro-tetrazolio.
- NF- $\kappa$ B: factor de transcripción NF- $\kappa$ B.
- NOEC: concentraciones de efecto no observable para mortalidad.
- NS: estadísticamente no significativo.
- OC(s): organoclorado(s).
- OF(s): organofosforado(s).
- OFM: oxidasas de función mixta.
- P53: proteína P53, factor de transcripción pro-apoptótico.
- PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida.
- PCB(s): bifenilo(s) policlorado(s).
- PKC: proteína quinasa C.
- PMSF: fluoruro de fenilmetil sulfonilo.
- Ptn: paratión.
- PVDF: fluoruro de polivinilideno.
- ROS: especies reactivas de oxígeno.
- SDS: sodio dodecil sulfato.
- SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.
- Ser: serina.
- SOD: superóxido dismutasa.
- TBA: ácido tiobarbitúrico.
- TBARS: Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.

TCA: ácido tricloroacético.

TCDD: 2,3,7,8-tetra-clorodibenzo-*p*-dioxina.

Thr: treonina.

TMB-4: cloruro de trimetileno bis-4 formilpiridina.

TMP: 1,1,3,3,-tetrametoxipropano.

Tris: Tris-(hidroxiaminometano).

Tyr: tirosina.

UDP: uranosil difosfato

UDPGT: UDP-glucuroniltransferasas.

USA: Estados Unidos.

USEPA: Agencia Nacional de Protección Ambiental de Estados Unidos.

UV: ultravioleta.

WHO: World Health Organization.

XRE: elemento de respuesta a xenobióticos (DRE: elemento de respuesta a dioxinas).

$\mu$ Ci: microCurie.

## RESUMEN

La región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén es una zona de cultivo intensivo de frutales con una alta tasa de aplicación de agroquímicos de las familias de organofosforados y carbamatos. Debido a que el principal blanco de acción de estos plaguicidas es la enzima acetilcolinesterasa presente en el sistema nervioso y uniones neuromusculares de la mayoría de los animales, afectan tanto a los organismos a los cuales están dirigidos como a aquellos que no constituyen su blanco específico.

En esta tesis se evaluaron biomarcadores bioquímicos y moleculares de exposición a plaguicidas organofosforados: (metil azinfos y paratión) y carbamatos (carbarilo) en peces juveniles, para identificar aquellos más sensibles que permiten predecir efectos deletéreos sobre las especies. Se evaluó así mismo, la relación entre inhibición de colinesterasas y mortalidad.

La toxicidad aguda de ambos organofosforados fue mayor que la correspondiente al carbarilo para los juveniles de *Carassius auratus* (carasius) y *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoiris). La susceptibilidad de ambas especies frente a los organofosforados evidenció diferencias importantes, resultando la trucha arcoiris 1000 veces más sensible a metil azinfos ( $CL_{50}$ : 7,2  $\mu\text{g/L}$ ) que el carasius ( $CL_{50}$  7180  $\mu\text{g/L}$ ). La toxicidad aguda del carbarilo estuvo en el mismo orden de magnitud para ambas especies.

Las colinesterasas cerebral y muscular resultaron fuertemente inhibidas a concentraciones subletales (7 a 100 veces menores a la  $CL_{50}$ ) de los organofosforados alcanzando el 80-95% de inhibición sin observarse síntomas evidentes de intoxicación, hecho que sugiere que otros blancos podrían ser responsables de los efectos letales. Con carbarilo, se requieren para ambas especies concentraciones 340 a 400 veces mayores para lograr una inhibición equivalente de las enzimas. Las cinéticas de inhibición y recuperación de colinesterasa por exposición a organofosforados revelaron que se requieren tiempos mayores a 35 días para lograr la recuperación de la actividad enzimática

a valores controles, mientras que 4 días son suficientes para recuperar la actividad de las enzimas luego de la exposición a carbarilo. La exposición de juveniles de *Cyprinus carpio* (carpa) a la concentración subletal de 50 µg/L de <sup>14</sup>C-paratió reveló una bioacumulación preferente en hígado, con concentraciones 4 a 6 veces más altas que en otros órganos. Los biomarcadores evaluados en este órgano, glutatión reducido, peróxidos lipídicos, no revelaron efecto del insecticida; mientras que la colinesterasa cerebral resultó inhibida en un 90%. El análisis de blancos secundarios en juveniles de *O. mykiss* expuestos a metil azinfos y carbarilo demostró efectos a nivel del sistema antioxidante y detoxificante en hígado y riñón, disminuyendo el contenido de glutatión reducido endógeno y alterándose la actividad de la catalasa y glutatión S-transferasa. Se observaron efectos relevantes sobre la fosforilación proteica en diferentes órganos. No se observó inducción de proteínas de estrés por exposición a estos insecticidas pero sí un alto nivel constitutivo de Hsp 60 y Hsp 70 que tendría un efecto protector sobre la especie. Se observó también la inducción del citocromo P450-1A en hígado de *O. mykiss* por exposición a carbarilo.

Se concluye que la colinesterasa constituye un biomarcador perdurable en el tiempo, resultando útil para señalar eventos de contaminación por estos tóxicos aun después de la desaparición de los mismos en el cuerpo de agua. Sin embargo, la falta de correlación entre la inhibición de la enzima blanco de cerebro y la mortalidad indica que la sola inhibición de esta enzima no podría ser la causa principal de toxicidad aguda y que el análisis de los mecanismos de acción secundarios debe ser considerado. Los efectos del metil azinfos y carbarilo a nivel del sistema antioxidante de *O. mykiss* revelan la capacidad de inducir estrés oxidativo y destacan la utilidad del glutatión reducido y la catalasa como biomarcadores. Las proteínas de estrés, en estas especies, no resultan buenos biomarcadores para las familias de plaguicidas analizadas. En cambio, si lo serían las alteraciones en la fosforilación proteica, que proveen una herramienta interesante para monitorear la cascada de señalización celular y el funcionamiento normal de la célula.

## ABSTRACT

The high application rate of pesticides against fruit tree pests in Río Negro and Neuquén Valley produces an important impact on the present organisms from neighbor ecosystems. The organophosphates and carbamates are the most frequently used pesticides in this region as well as in the world. The acetylcholinesterase, present in the nervous system and the neuromuscular junction, is the principal molecular target in most of the animals. Therefore, these pesticide families affect both the target and non-target species.

Biochemical and molecular biomarkers of organophosphates (azinphos methyl and parathion) and carbamate (carbaryl) exposure were evaluated in juvenile fish in order to identify the most sensitive ones. In addition, the relationship between cholinesterase inhibition and mortality was determined.

The organophosphates showed higher acute toxicity to *Carassius auratus* (goldfish) and *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) than the toxicity of carbamate. The toxicity of azinphos methyl was 1000-fold higher in rainbow trout ( $CL_{50}$  7,2  $\mu\text{g/L}$ ) than the one observed in goldfish ( $CL_{50}$  7180  $\mu\text{g/L}$ ). The acute toxicity of carbaryl was in the same order of magnitude for both species.

The brain and muscle cholinesterases were strongly inhibited following exposure to sub lethal concentrations of organophosphates (7 to 100-fold smaller than the  $CL_{50}$ ). However, there were not evident symptoms of intoxication at the 80-95% cholinesterase inhibition suggesting that other targets could be responsible for the lethal effects. On the other hand, concentrations of carbaryl 340- to 400-fold higher are required in order to achieve an equivalent enzyme inhibition for both species. The kinetics of both inhibition and recovery of cholinesterase showed that 4 days are required for a complete enzyme recovery after carbaryl exposure whereas, more than 35 days are needed for the recovery after organophosphate exposure.

The exposure of juvenile *Cyprinus carpio* (carp) at a sub lethal concentration of 50 µg/L of 14C-parathion revealed 4 to 6-fold higher bioaccumulation in liver than the one observed in other organs. While brain cholinesterase was 90% inhibited at this concentration, other biomarker assayed (reduced-glutathione, lipid peroxide) didn't reveal the insecticide effect.

The analysis of secondary targets in juvenile *O. mykiss* exposed to azinphos methyl and carbaryl showed effects on the antioxidant and detoxifying system in liver and kidney. The observed effects were a decrease in the content of reduced-glutathione and an alteration in catalasa and glutathione S-transferase activities. There were also effects on protein phosphorylation in different organs. There was no induction of heat shock proteins due to insecticide exposure, however the high level of Hsp 60 and Hsp 70 observed would have a protective effect on this species. Nevertheless, induction of cytochrome P450-1A in the liver of *O. mykiss* due to carbaryl exposure was observed.

We conclude that cholinesterase constitutes a useful biomarker of exposure to these pesticide families, even after their disappearance in the aquatic ecosystems. However, the lack of correlation between the brain target enzyme and mortality suggests that cholinesterase inhibition would not be the main event of acute toxicity. The ability of azinphos methyl and carbaryl to produce oxidative stress in *O. mykiss* revealed the usefulness of reduced-glutathione and catalase as biomarkers. On the other hand, the stress proteins did not appear to be a good indicator of these pesticide exposures whereas the protein phosphorylation may provide a useful tool to track the cascade of cellular signaling and normal cell function.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. PLAGUICIDAS Y EL HOMBRE

Desde la antigüedad el hombre ha estado interesado en controlar los organismos que resultan dañinos para su salud o sus sistemas productivos. Con el surgimiento de la agricultura intensiva, se ha impuesto el uso de compuestos producidos y aplicados a tal fin, denominados plaguicidas.

Los plaguicidas se definen como cualquier sustancia o mezcla de ellas destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar plagas. Los organismos plaga pueden ser insectos, roedores, malezas, así como huéspedes de otros organismos no deseados (Costa 1997).

Existen numerosas clasificaciones de los plaguicidas, una de ellas se realiza sobre la base de los organismos que son su blanco de acción. Utilizando este criterio es posible diferenciar entre otros, insecticidas, funguicidas, herbicidas, rodenticidas, etc. (Tabla 1).

Los plaguicidas son probablemente el grupo de compuestos tóxicos que tiene mayor diseminación en el ambiente. Para mediados de la década de 1980 la aplicación mundial de los mismos se estimó en tres millones de toneladas por año (IARC 1991). Estos compuestos difieren con otras sustancias químicas nocivas en que son necesariamente tóxicos para los sistemas biológicos y son depositados deliberadamente en el ambiente (Chambers y Carr 1995). A pesar de estas características, la necesidad de una alta productividad de los sistemas agrícolas para satisfacer los requerimientos del mundo actual, hace que sea imposible, en lo inmediato, prescindir de su uso. La tabla 2 destaca el elevado porcentaje de pérdidas en agricultura, particularmente en cultivos de cereales, debido a la acción de diversas plagas.

**Tabla 1 Clasificación de los plaguicidas según los organismos blanco**

Plaguicida	Organismo blanco	Principal Modo de Acción	Ejemplos
Insecticidas	Insectos	Acción neurotóxica	Organofosforados
			Carbamatos
			Piretroides
			Organoclorados
Fungicidas	Hongos	Desacoplantes	Pentaclorofenol
		Inhibidores de germinación de esporas, o de crecimiento del micelio	Hexaclorobenzeno Dicarboximidias Ditiocarbamatos
Herbicidas	Vegetales	Inhibidores de la fotosíntesis, respiración, o síntesis proteica	Tiazinas Bipiridilos (Paraquat)
		Mimetizantes de la acción de hormonas vegetales	Acetanilidas (Alaclor) Clorofenoxidos (2,4 D)
Rodenticidas	Roedores	Anticoagulantes	Superwarfarínicos
		Producen edema pulmonar masivo	Tioureas Derivados del ácido
		Interferencia en el metabolismo	fluoroacetico

**Tabla 2: Pérdidas mundiales en cultivos de cereales por acción de plagas (%)**

Cultivos	Plagas			Total
	Malezas	Enfermedades	Insectos	
Trigo	10	9	5	24
Maíz	13	10	13	36
Sorgo	18	10	9	37
Avena	10	10	7	27
Cebada	9	8	4	21
Centeno	15	3	2	20
Arroz	11	9	28	48

(Bulacio y col. 2001).

En Argentina, al igual que en otras regiones del mundo, la explotación fruti-hortícola constituye una importante actividad económica. Se destaca la producción de manzanas y peras siendo la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén la principal región productora del país. En esta región el uso de plaguicidas para control de plagas es una práctica común. Los insecticidas más utilizados pertenecen al grupo de los organofosforados y carbamatos. Aproximadamente 1.527.742 Kg de fosforados fueron aplicados anualmente en esta región en los años 1995-1998 (Loewy y col. 2003) (Tabla 3). El uso intensivo de estos compuestos en conjunto con las prácticas agrícolas vigentes y la topografía del terreno estimula la contaminación de sistemas aledaños a las zonas de cultivo.

**Tabla 3: Ventas Anuales de Insecticidas Organofosforados en Argentina**

Compuesto	Años			
	1995	1996	1997	1998
Metil azinfos	412692	609158	635100	422700
Clorpirifos	21000	40000	45800	43000
Fosmet	96600	184400	210698	6200
Metidatión	58100	35400	52500	66900
<b>Ventas Totales</b>	1099614	1861665	1787772	1361917

Ventas expresadas en Kg.

Las ventas en la región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén están consideradas como el 80% del total de ventas de insecticidas en el país (Tomado de Loewy y col. 2003).

## **2. INSECTICIDAS**

Los insecticidas son un grupo particular de plaguicidas que se han desarrollado para el control de insectos y son ampliamente empleados en agricultura y en el control de plagas domésticas. Otro uso sumamente importante es en salud pública, en el control de vectores de enfermedades como malaria, oncocercosis, chagas, etc.

La mayoría de los insecticidas ejercen su acción tóxica en las especies blanco afectando el sistema nervioso. Es justamente debido a su acción neurotóxica y al alto grado de conservación del sistema nervioso, que se ven afectados otros organismos “no blanco”, principalmente animales, tanto invertebrados como vertebrados.

Dentro del grupo de insecticidas se pueden encontrar diferentes clases de acuerdo a su estructura química. Los más utilizados en la actualidad son los organofosforados, carbamatos y piretroides mientras que los organoclorados, que tienen excelentes propiedades insecticidas, han sido ampliamente utilizados en el pasado pero son escasamente empleados en la actualidad debido a su alta persistencia en el ambiente y su magnificación a lo largo de la cadena trófica. Los compuestos más inofensivos para el ambiente, entre los citados, son los piretroides. Los organofosforados y carbamatos poseen en cambio una alta toxicidad aguda acompañada de baja persistencia (Costa 1997).

### **2.1 Mecanismos Comunes de Toxicidad de Organofosforados y Carbamatos.**

Los plaguicidas carbamatos y organofosforados (OFs) actúan como compuestos neurotóxicos al inhibir a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) que cumple un papel fundamental en el sistema nervioso central y periférico catalizando la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh). Cuando la

enzima es inhibida por OFs o carbamatos la ACh se acumula en la hendidura sináptica provocando la sobre-estimulación de los receptores colinérgicos pudiendo llegar hasta la saturación de los mismos (Matsumura 1986). Los síntomas de intoxicación con estos compuestos incluyen los correspondientes a una crisis colinérgica. Sus principales manifestaciones en el hombre son: aumento de las secreciones, fasciculación muscular, alteraciones cardiovasculares, miosis y efectos en el sistema nervioso central, como confusión mental, dolor de cabeza, debilidad, convulsiones, y finalmente coma. En caso de exposición masiva la muerte ocurre por asfixia (Costa 1997, Chambers 1992). En animales vertebrados los síntomas varían de acuerdo a la especie siendo algunos semejantes a los expuestos anteriormente. En el caso de los peces, es probable que la causa de muerte sea también la asfixia debido a una combinación de factores que incluyen la parálisis de los músculos que mueven el agua a través de las branquias, bradicardia inducida colinérgicamente y desviación de la sangre en los filamentos debido a una resistencia branquial incrementada (Zinkl y col. 1991).

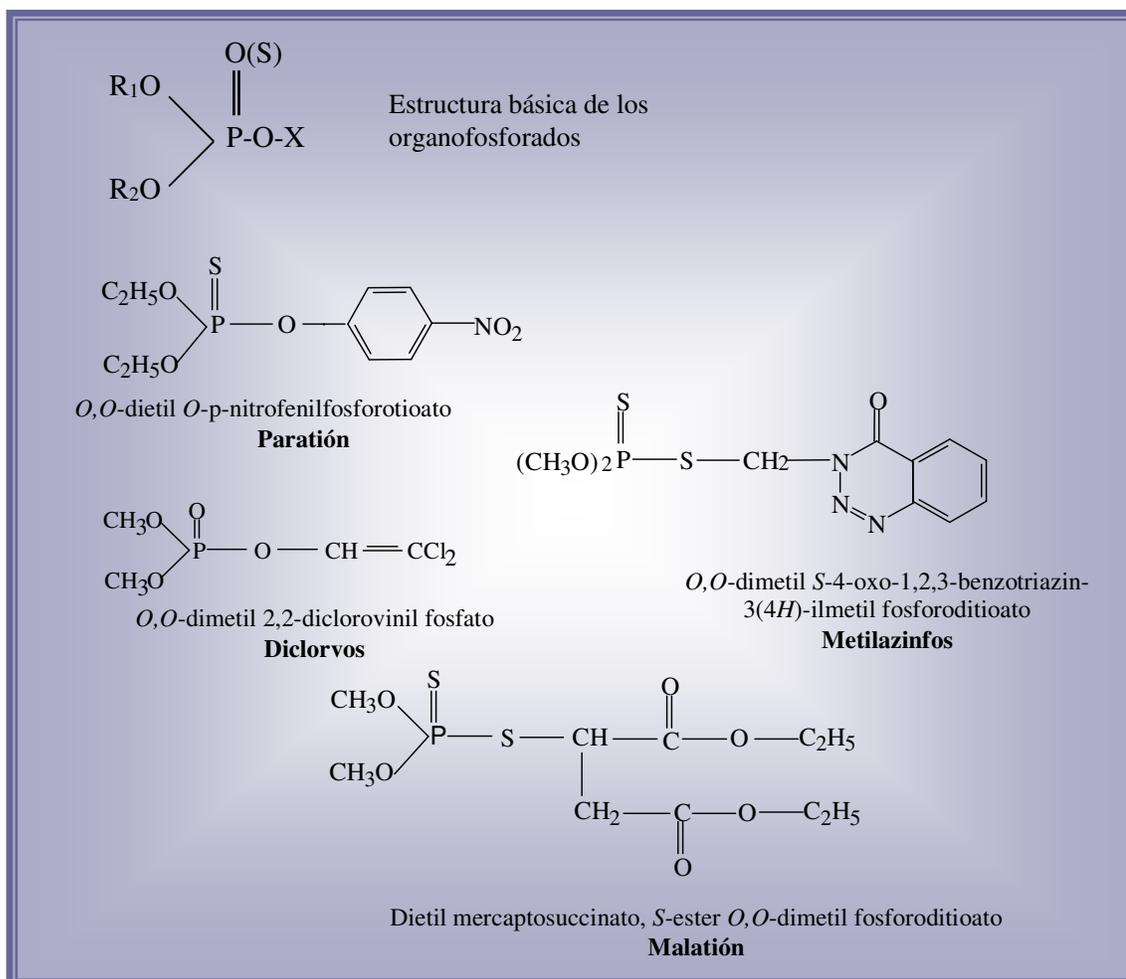
## **2.2 Organofosforados**

Los ésteres organofosforados representan el principal grupo de insecticidas en uso en estos días. Como se ha mencionado previamente, su acción tóxica se vincula con la inhibición de la enzima AChE en los terminales colinérgicos del sistema nervioso central, periférico y autónomo así como en las terminales neuromusculares.

Son un grupo químico diverso y su clasificación es compleja; sin embargo, comparten una estructura común derivando del ácido fosfórico.

En los OFs utilizados, cuatro átomos están directamente unidos al fósforo central, generalmente tres por enlaces simples y uno con un enlace covalente coordinado, representado comúnmente como un enlace covalente doble. Este

último enlace es con un átomo de oxígeno o de azufre (Ecobicon 1982). Dos de los restantes sustituyentes pueden ser cadenas alquilo, tanto metilo, etilo o propilo, o grupos arilo, unidos mediante un oxígeno, un azufre o un nitrógeno al fósforo; mientras que el enlace restante del fósforo pentavalente se realiza con un grupo que varía ampliamente entre los compuestos y se denomina grupo saliente (Costa 1997) (Figura 1).



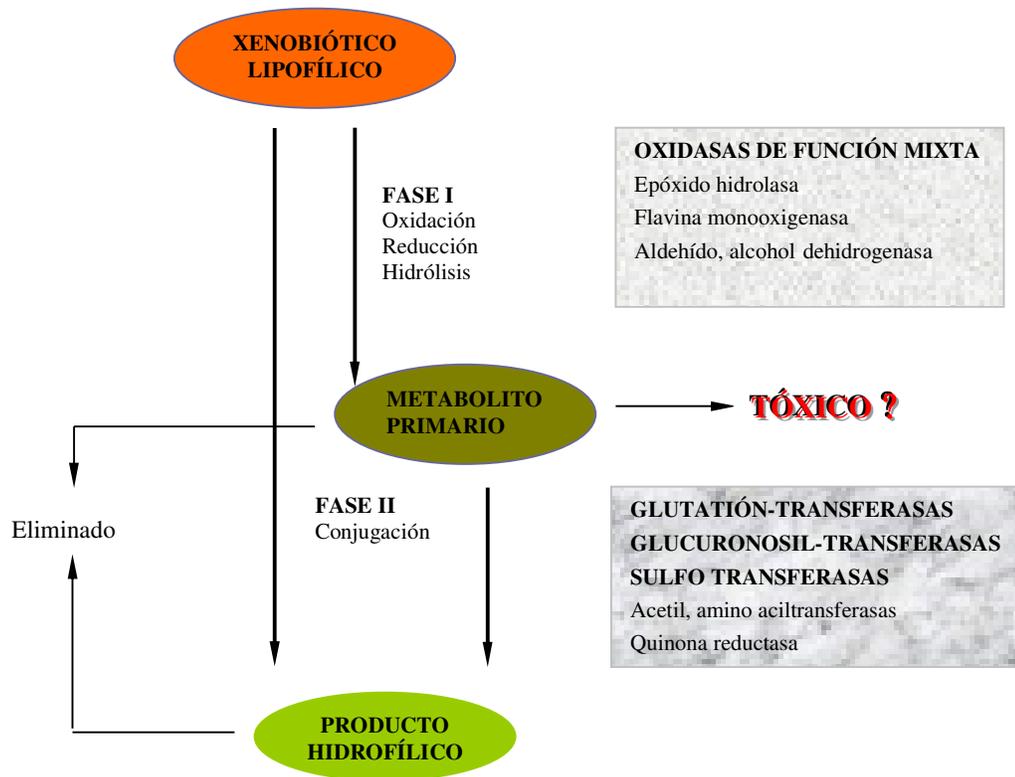
**Figura 1: Estructura básica de los organofosforados y ejemplos.** P fósforo pentavalente, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> (grupos sustituyentes), X grupo saliente.

Frecuentemente los compuestos OFs han sido denominados organofosfatos debido a que los triésteres del ácido fosfórico, los fosfatos, son los prototipos de la familia. En estos compuestos los cuatro átomos que rodean al fósforo son de oxígeno, por lo cual son altamente reactivos. No obstante, más

numerosos son los OFs que portan el grupo P=S como los fosforotioatos que incluyen insecticidas importantes como el paratión entre otros y los fosforoditioatos en los que el segundo átomo de azufre forma un tioester. A este grupo pertenecen el malatión y el metil azinfos (Figura 1). Los fosfortiolatos se consideran más tóxicos y se utilizan frecuentemente como insecticidas en suelos. Otros grupos mas pequeños incluyen a las fosforamidas y a los fosfonatos (Chambers 1992).

### **2.2.1 Metabolismo de los Organofosforados**

Luego de su absorción por los organismos los compuestos OFs sufren reacciones de biotransformación. En general, los xenobióticos son transformados a metabolitos menos tóxicos y más polares que pueden ser eliminados más fácilmente del organismo. Dos grupos de reacciones enzimáticas están involucrados en la detoxificación de estos compuestos químicos. Los procesos metabólicos primarios o detoxificaciones de Fase I incluyen reacciones enzimáticas oxidativas, reductivas e hidrolíticas para formar metabolitos reactivos o de mayor polaridad. El proceso secundario o detoxificación de Fase II conjuga los metabolitos resultantes de las reacciones de Fase I con sustituyentes endógenos para aumentar su solubilidad en agua y su posibilidad de ser eliminados por orina (Ecobicon 1982). En algunos casos, el metabolito producido en la fase I puede resultar más tóxico que el xenobiótico original. En la figura 2 se ilustran algunos de los tipos de reacciones enzimáticas características de las fases I y II.



**Figura 2: Metabolismo de un xenobiótico vía fase I y/o II.** En peces los procesos cuantitativamente más importantes de fase I son los oxidativos (letras mayúsculas), y de fase II son la conjugación con el glutatión para compuestos electrofílicos y con el ácido glucurónico para compuestos nucleofílicos (letras mayúsculas) (Adaptado de George 1994).

En el metabolismo de los OFs en particular los P=S, algunas de las reacciones de fase I conducen a la activación de esos compuestos, es decir, generan metabolitos más tóxicos que los primitivos. Ejemplo de esto es la reacción denominada desulfuración oxidativa. Por el contrario, la detoxificación metabólica de los OFs se realiza principalmente por el clivaje de alguno de los grupos unidos al átomo de fósforo, lo cual usualmente da lugar a una molécula cargada negativamente, que es menos activa como agente anticolinesterásico, y al mismo tiempo más hidrosoluble y por lo tanto fácilmente eliminada del organismo (Jokanović 2001).

Las reacciones que involucran una activación de los OFs son diversas, entre ellas se distingue la desulfuración oxidativa, la oxidación del grupo tioéter, oxidación de grupos amida e hidroxilación de cadenas laterales (Eto 1974).

La activación de los fosforotioatos, fosforoditioatos y fosforotiolotionatos a sus correspondientes formas oxón ocurre en insectos y en vertebrados a través de la desulfuración oxidativa. Un clásico ejemplo de la misma es la conversión de paratión a paraoxón (Figura 3). Esta reacción es catalizada por enzimas de fase I denominadas en conjunto oxidasas de función mixta (OFM) y requiere de la presencia de NADPH y oxígeno molecular. Estas enzimas incluyen al sistema dependiente de citocromo P450.

Algunos OFs que contienen tioéteres pueden ser activados por monooxigenasas en plantas y animales. La reacción ocurre en dos pasos formándose primero los sulfóxidos y luego las sulfonas. Otras reacciones que conducen a la activación de OFs son la oxidación de grupos amida y la hidroxilación de grupos alquilo. La hidroxilación de sustituyentes alquilo del anillo de algunos OFs produce metabolitos reactivos como ésteres fosfato o cetonas; por ejemplo en la oxidación del diazinon y el fenitroton.

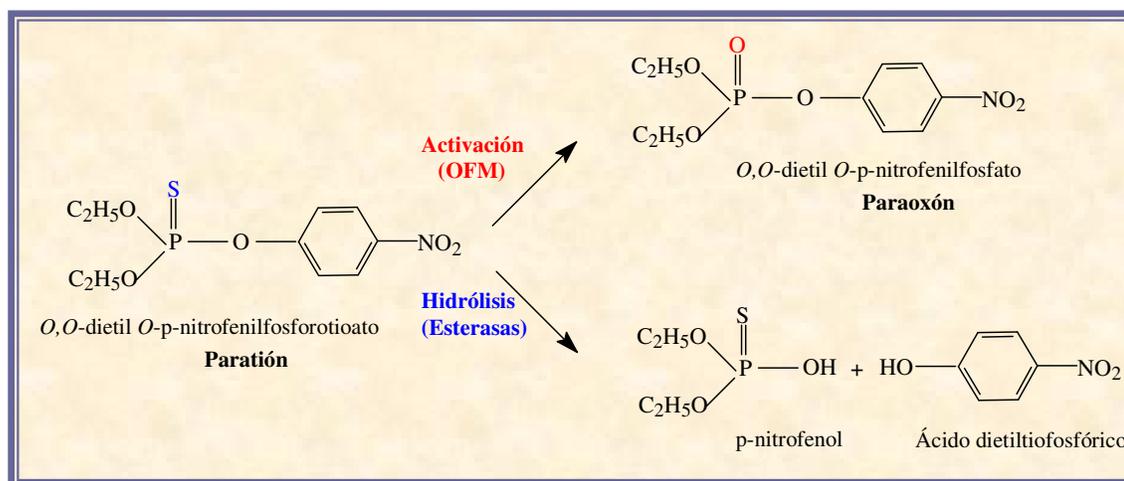


Figura 3: Activación y detoxificación metabólica del paratión.

Como ya se ha mencionado previamente, la detoxificación involucra la ruptura de enlaces de diferentes grupos con el fósforo, estos pueden ser anhídridos (P=O, P=S y P-F) y uniones de tipo alquilester. Una reacción importante de detoxificación de OFs es la hidrólisis enzimática por esterasas. Existen distintos tipos de actividades de esterasas que actúan sobre los OFs. En primer lugar, las fosfotriesterasas, denominadas también A-esterasas, son hidrolasas de triésteres fosfóricos (Vilanova y Sogorb 1999). Estas a su vez puede dividirse en dos grupos: arildialquilesterasas (EC 3.1.8.1) y diisopropilfluorofosfatasas (EC 3.1.8.2). Ambas requieren la presencia de cationes divalentes y por tanto son inhibidas por agentes quelantes. Los productos de hidrólisis pueden ser dialquilfosfato y aril alcohol (hidrólisis del paraoxon) o ácido diisopropilfosfórico y fluor (hidrólisis del DFP).

Las enzimas carboxilesterasas (CarbE EC 3.1.1.1) son capaces de catalizar la hidrólisis de ésteres carboxílicos presentes en algunos OFs como el malatión y malaoxón (Fukuto y Metcalf 1969). Los productos de esta reacción son los monoácidos de malatión o malaoxón que son inactivos. Estas enzimas son ubicuas en la naturaleza aunque en insectos presentan menos actividad que en mamíferos y otros vertebrados (Hodgson y col. 1991). Esta diferencia en la capacidad catalítica entre especies posibilita que estos compuestos sean buenos insecticidas pero presenten baja toxicidad para mamíferos y otros vertebrados. Asimismo, las CarbE participan en la detoxificación de OFs de otras maneras. Una de ellas por unión directa a los OFs, lo cual disminuye la concentración libre de estos compuestos con capacidad de interactuar con la enzima AChE en tejidos vitales (Maxwell 1992). Esta forma de detoxificación involucra además la fosforilación del residuo de serina del sitio activo en la CarbE (inhibición) con pérdida del grupo saliente, acompañada de una alta capacidad de reactivación espontánea (Jokanović 1996, Dettbarn y col. 1999). Este proceso es particularmente importante en las exposiciones crónicas o subcrónicas a bajas concentraciones de OFs.

La O-dealquilación oxidativa, oxidación de los triésteres del ácido fosfórico a diésteres, es también una reacción importante en la detoxificación de los OFs catalizada por las OFM, en la cual se rompe la unión entre oxígeno y el grupo alquilo. Los productos formados son el derivado monoalquilado y el aldehído. Además, otras enzimas como las glutatión S-transferasas (GSTs) y monooxigenasas microsomaes también producen O-dealquilación de los OFs (Jokanović 2001).

Otra reacción de detoxificación se denomina de-arilación oxidativa. Esta reacción es catalizada por las OFM microsomaes que en presencia de oxígeno y NADPH pueden realizar tanto la desulfuración oxidativa (activación) como el clivaje de la unión entre el fósforo y el éster con el grupo arilo (detoxificación). Ambas reacciones comparten un intermediario común inestable (Chambers 1992). La de-arilación oxidativa produce como resultado los productos de hidrólisis, en el caso del paratión el ácido dietiltiofosfórico y p-nitrofenol ambos inactivos.

Es importante detallar el papel que cumple el tripéptido  $\gamma$ -L-Glutamil-L-cisteinilglicina denominado glutatión reducido (GSH) y las enzimas GSTs (EC 2.5.1.18) en la detoxificación de compuestos OFs. Las diferentes formas de GSTs tienen importancia en la conjugación de diversos compuestos exógenos que poseen sustituyentes electrofílicos. En el metabolismo de los OFs algunos de los sustratos son conjugados directamente con el GSH, mientras que otros deben ser transformados primero en metabolitos electrofílicos. Existen numerosas reacciones de detoxificación de los OFs catalizadas por estas enzimas (Motoyama y Dauterman 1980). Una de ellas es la conjugación O-alquil que ocurre en la demetilación del metil azinfos, malatión, metilparatión y metilparaoxón. Las enzimas GST muestran una marcada afinidad por los OFs que contienen grupos metoxi mientras que esta ruta metabólica es insignificante para aquellos compuestos que poseen grupos etoxi. Otra importante reacción ocurre al conjugarse el grupo arilo del grupo saliente, por ejemplo en el caso del

paración, con el GSH. En otras reacciones, un radical del grupo arilo o directamente el fósforo del OF se conjuga con el GSH.

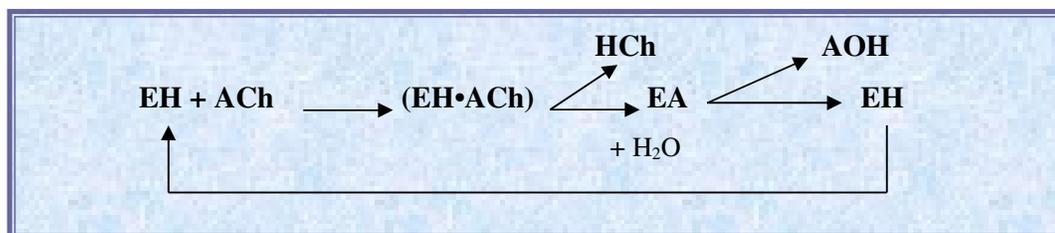
La importancia relativa de los diferentes mecanismos de detoxificación presentes en las especies influye en la tolerancia de las mismas a la presencia de estos compuestos. En general las enzimas GST son más activas en mamíferos que en insectos brindando una toxicidad selectiva de ciertos compuestos. Estos mecanismos metabólicos de detoxificación están presentes asimismo en diversas especies de peces (George 1994).

### **2.2.2 Mecanismo de Acción de los Organofosforados**

La inhibición de la enzima AChE por los insecticidas OFs ocurre por una reacción química en la cual un residuo de serina del sitio activo de la enzima es fosforilado de manera análoga a la acetilación que ocurre durante el proceso catalítico del sustrato endógeno (ACh). El sitio activo de la enzima AChE consiste en dos dominios principales, el sub-sitio esterásico en el cual se encuentra el residuo de serina activo, el grupo imidazol de un residuo de histidina además de un grupo ácido de tirosina (tríada catalítica), y el sub-sitio aniónico donde se une el amonio cuaternario positivo de la ACh. La enzima posee una zona hidrofóbica contigua a ambos sub-sitios que es importante para la unión de sustratos con grupos arilos (Quinn 1987, Fukuto 1990).

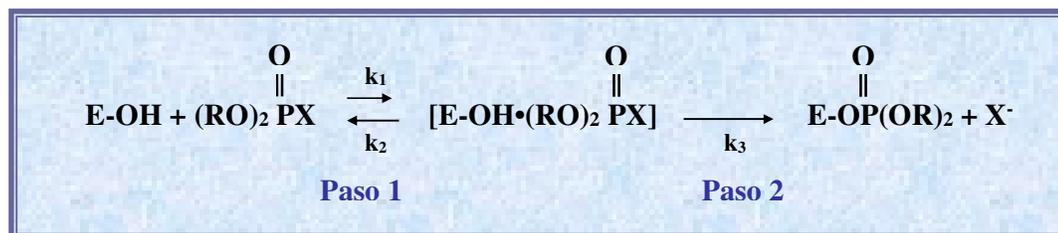
El mecanismo por el cual AChE hidroliza al neurotransmisor ACh involucra varios pasos. El sustrato ACh es atraído al sitio activo de la enzima por interacción electrostática sobre la carga positiva de su amina cuaternaria, formando un complejo enzima-sustrato reversible. Se produce luego la acetilación del residuo de serina del sitio esterásico, catalizado por los grupos imidazol y ácido presentes en la tríada catalítica, con la liberación de colina que es reabsorbida por el terminal presináptico. Un tercer paso involucra la rápida deacetilación regenerándose la enzima libre (Fukuto 1990, Matsumura

1985). El proceso global puede sintetizarse con las ecuaciones representadas en la figura 4.



**Figura 4: Reacción de la enzima AChE con el sustrato natural: acetilcolina.** EH es la enzima, EH•ACh es el complejo enzima-sustrato, EA es la enzima acetilada, HCh es la colina liberada y AOH el ácido acético.

Al contrario de la enzima acetilada que sufre rápidamente hidrólisis para dar ácido acético y enzima libre, la enzima fosforilada por reacción con los OFs es altamente estable y carente de capacidad esterásica siendo prácticamente irreversible su inactivación. La reacción de inhibición ocurre en dos pasos sucesivos ilustrados en la Figura 5. El primer paso es la formación del complejo enzima-inhibidor, donde  $K_d$  es la constante de disociación del complejo en la enzima y el OF libre ( $K_d = k_2 / k_1$ ). Este paso puede ser reversible. El segundo paso involucra la transferencia de un átomo de hidrógeno de la enzima al grupo saliente X y la unión del átomo de fósforo del OF al oxígeno de la serina, lo que provoca la liberación del grupo saliente y la fosforilación de la enzima. La constante de fosforilación  $k_3$  o  $k_p$  es una medida de la reactividad del OF. La constante de inhibición bimolecular  $k_i$ , depende de las dos constantes mencionadas ( $k_i = k_p / K_d$ ) y es un parámetro muy útil en la estimación de la potencia inhibitoria de los diferentes OFs (Fukuto 1990, Matsumura 1985). La propiedad más importante para que un OF tenga alta capacidad anticolinesterásica es que su átomo de fósforo sea altamente reactivo. Sin embargo, en algunos casos, las propiedades estéricas fundamentales en el primer paso del proceso inhibitorio pueden ser también relevantes para determinar la capacidad anticolinesterásica (Hansch y Deutsh 1966).



**Figura 5: Reacción de los OFs con la enzima AChE.** E-OH es la enzima,  $\text{EOH} \cdot (\text{RO})_2\text{P}(=\text{O})\text{X}$  es el complejo enzima-inhibidor,  $\text{X}^-$  corresponde al grupo saliente,  $\text{E-OP}(=\text{O})-(\text{OR})_2$  es la enzima fosforilada.

### 2.2.2.1 Reacciones de la Enzima Fosforilada: Reactivación y Envejecimiento

La enzima fosforilada puede sufrir reacciones posteriores. Dos procesos resultan de interés, la reactivación y el envejecimiento. La reactivación es la remoción del OF por hidrólisis, regenerándose la enzima activa por liberación del dialquilfosfato de la molécula primitiva de insecticida. Aunque en el caso de los OFs este proceso es extremadamente lento a nulo, la tasa de reactivación varía considerablemente dependiendo de la naturaleza de los grupos alquilo presentes en cada OF. La enzima fosforilada con OFs dimetilados se reactiva más rápidamente. Adicionalmente, la naturaleza de la enzima también es importante, dado que la tasa de reactivación de las colinesterasas y pseudocolinesterasas pueden variar de una especie a otra y entre tejidos (Matsumura 1985).

Por otra parte, el proceso de reactivación puede acelerarse en gran medida por medio de ciertos agentes químicos como las oximas o aminas cuaternarias (Wilson y col. 1992). Estos compuestos químicos actúan como aceptores para una segunda transfosforilación, y son muy importantes como terapia química en la intoxicación con anticolinesterásicos. Entre ellos, los más conocidos y empleados son las sales de la piridina-2-aldoxima cuaternaria (2-PAM) y las oximas bis-cuaternarias como el cloruro de trimetileno bis-4 formilpiridina (TMB-4).

El segundo proceso que puede sufrir la enzima fosforilada es el envejecimiento, que consiste en la de-alquilación del OF, conduciendo a una enzima AChE-mono-alquilfosforilada que es refractaria a la reactivación. El proceso de envejecimiento es más rápido cuando los grupos presentes son metoxi que cuando son etoxi, mientras que las AChE fosforiladas con OF que contienen grupos n-propoxi casi no experimentan envejecimiento. A pesar de los numerosos esfuerzos realizados, aún no se ha conseguido un reactivador de la enzima envejecida. En este caso, la recuperación de la actividad en el organismo depende exclusivamente de la síntesis *de novo* de la enzima (Chambers 1992).

## **2.3 Carbamatos**

Los carbamatos, en su mayoría, son derivados sintéticos del compuesto natural fisostigmina o eserina, un alcaloide aislado de las semillas de la planta de Calabar *Physostigma venenosum*. Este compuesto es anticolinesterásico debido a que tiene un arreglo espacial y estructural semejante al sustrato natural de la enzima AChE, la acetilcolina.

La estructura básica de los carbamatos es el ácido carbámico, monoamida del dióxido de carbono, que se descompone rápidamente en este último y amonio (Figura 6). El ácido carbámico puede ser estabilizado por uniones éster con grupos arilo o alquilo originándose compuestos con propiedades insecticidas. La mayoría de los compuestos utilizados en la actualidad son N-metil carbamatos en los cuales el grupo unido al oxígeno es un arilo, un heterociclo o una oxima (Figura 6).

A mediados de los años 1930s se sintetizaron ditiocarbamatos que resultaron excelentes fungicidas y herbicidas pero no presentaban propiedades insecticidas. El primer insecticida carbamato fue el Dimetan (5,5-dimetil-3-oxo-1 ciclohexenil-1 N, N-dimetilcarbamato). En 1956 se introduce un

nuevo insecticida carbamato, el carbarilo, en el cual el grupo arilo es el alfa-naftil. Este insecticida ha sido y es actualmente el carbamato más utilizado debido a su baja toxicidad en mamíferos ( $DL_{50}$  500-700 mg/Kg), a que es fácilmente biodegradable pero estable frente al calor y luz, y es un insecticida de amplio espectro siendo efectivo contra una gran variedad de insectos (Matsumura 1985).

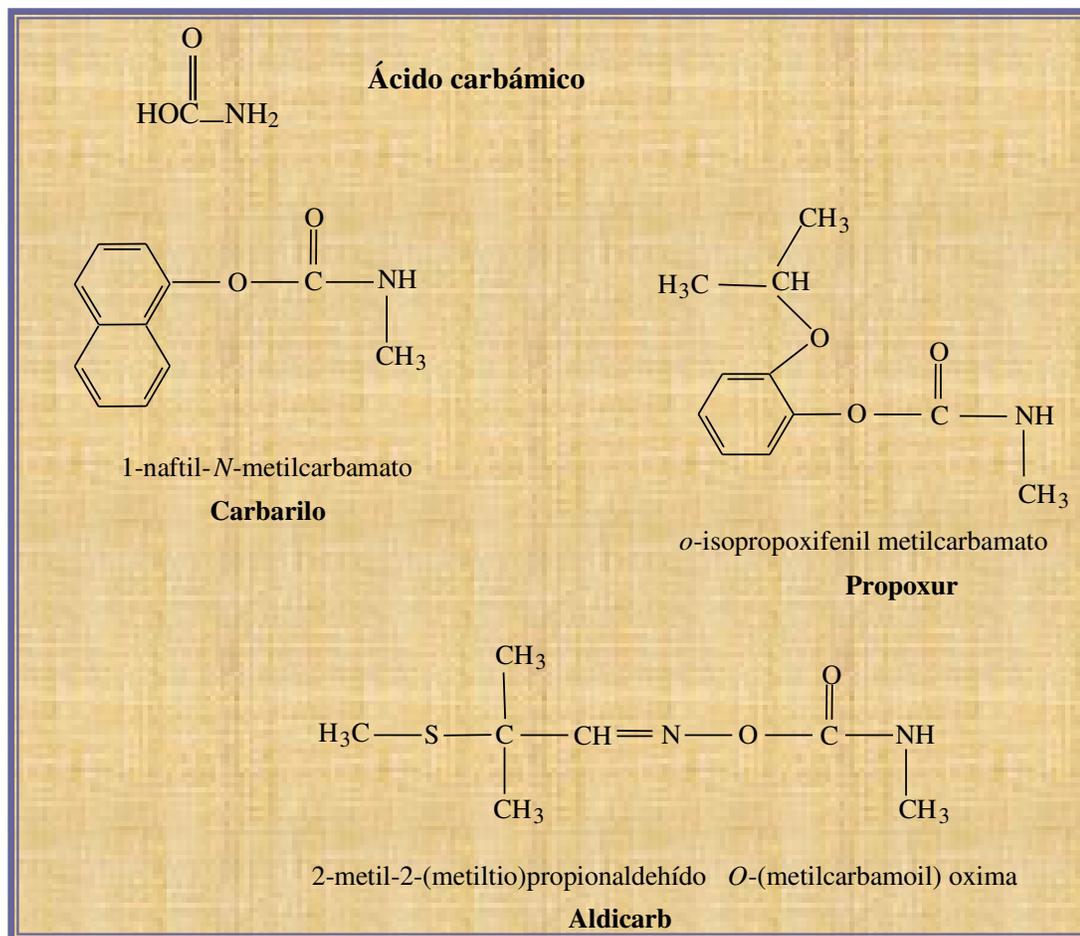


Figura 6: Estructura química del ácido carbámico y algunos insecticidas N-metil carbamatos.

### 2.3.1 Metabolismo de los Carbamatos

La principal ruta de metabolismo de los carbamatos es la oxidación asociada a las enzimas OFM. Los productos de la oxidación pueden resultar más o menos tóxicos que los productos de origen, pero generalmente no pierden totalmente su toxicidad. Debido a esto, las reacciones de conjugación de los metabolitos generados por oxidación cobran singular importancia, siendo esta segunda ruta altamente relevante para la detoxificación de los carbamatos. Las reacciones de hidrólisis generalmente son de menor importancia, pero tanto éstas como las de conjugación son claramente vías de detoxificación.

Las reacciones de oxidación pueden clasificarse en dos grandes grupos: hidroxilación de los anillos y oxidación de las cadenas laterales. En todos los casos se introduce inicialmente un átomo de oxígeno a la molécula (Fukuto 1972). Se citan como ejemplo la hidroxilación de los grupos alquilo sustituyentes del grupo arilo, la N-demetilación de aminas unidas al grupo arilo, y la O-dealquilación de las cadenas sustituyentes del grupo arilo. Puede ocurrir también la hidroxilación del grupo N-metilo así como la S-oxidación o sulfoxidación de los tioéteres.

En el metabolismo de algunos carbamatos pueden formarse ácidos mercaptúricos como consecuencia final de la conjugación de metabolitos con el GSH por las enzimas S-alquil o S- aril transferasas.

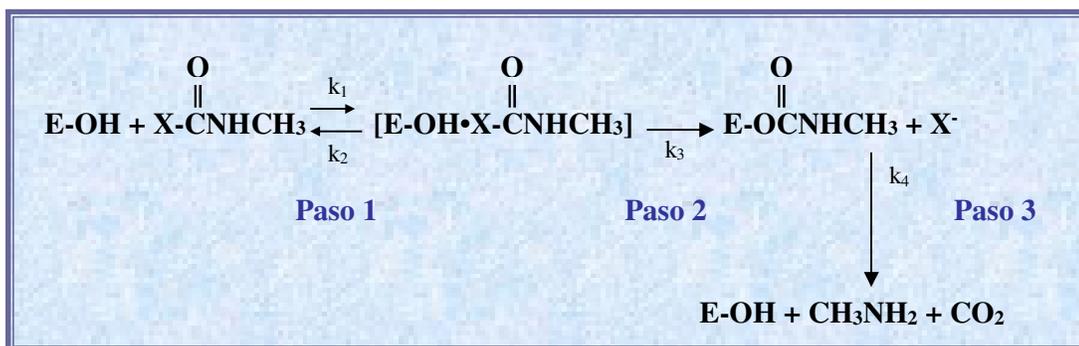
Dado que los carbamatos son ésteres capaces de sufrir hidrólisis por enzimas estereras, de acuerdo a la estructura de cada compuesto carbamato y a la especie o tejido a considerar, esta ruta metabólica de detoxificación podrá adquirir mayor o menor relevancia (Matsumura 1985). En la mayoría de los insectos, por ejemplo, el carbarilo es escasamente metabolizado por la vía hidrolítica (Ecobicon 1982). Los productos de hidrólisis enzimática son similares o idénticos a los obtenidos por hidrólisis química, un aril-alcohol más el ácido carbámico metilado o dimetilado. Este último es inestable, como se ha

mencionado anteriormente, y rápidamente se descompone en dióxido de carbono y metil o dimetilamina.

### 2.3.2 Mecanismo de Acción de los Carbamatos

Estos insecticidas al igual que los OFs son agentes anticolinesterásicos. Los ésteres de carbamatos a diferencia de algunos OFs como los fosforotioatos y fosforoditioatos, no requieren activación para ejercer su acción anticolinesterásica, por tanto son inhibidores directos de la enzima. Además de su efecto sobre AChE, inhiben también esterasas presentes en otros tejidos, como la butirilcolinesterasa plasmática y las carboxilesterasas o aliesterasas (AliE) no específicas. Sin embargo el papel fisiológico de estas esterasas no está claro, excepto por la posible capacidad de hidrólisis sobre los mismos ésteres carbámicos. Ciertos carbamatos como la eserina inhiben específicamente AChE pero no AliE, mientras que otros son potentes inhibidores de estas enzimas (Matsumura 1985).

El mecanismo de inhibición de la enzima AChE por los insecticidas carbamatos es semejante al descrito para los OFs, sin embargo existen diferencias importantes en la reactivación de la enzima. En la figura 7 podemos evidenciar los pasos de la reacción de los carbamatos con la enzima AChE.



**Figura 7: Reacción de los carbamatos con la enzima AChE.** E-OH es la enzima, E-OH•XC(=O)NHCH<sub>3</sub> es el complejo enzima-inhibidor, E-OC(=O)NHCH<sub>3</sub> es la enzima carbamilada, X<sup>-</sup> es el grupo saliente liberado, CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> es metilamina y CO<sub>2</sub> es el dióxido de carbono.

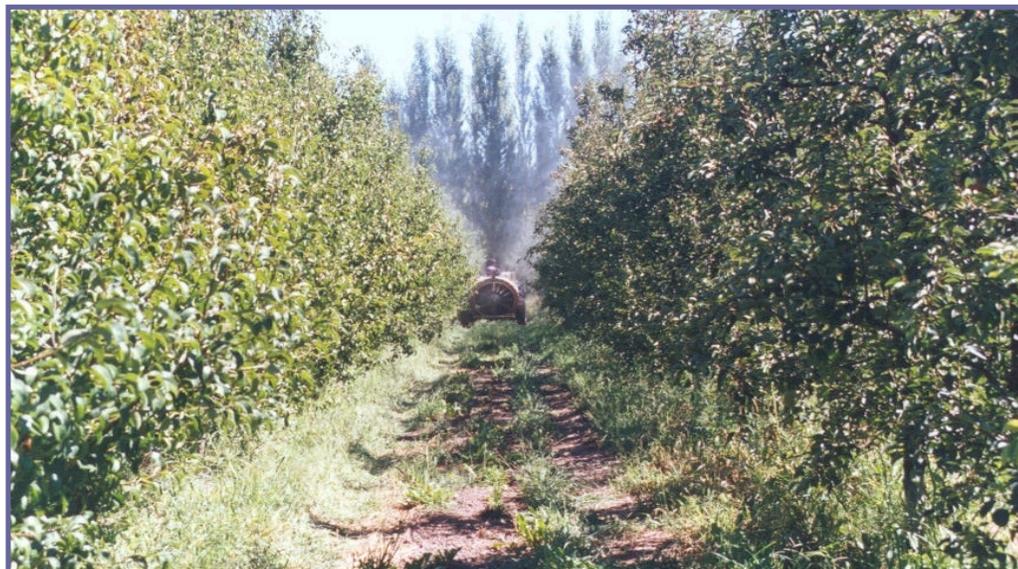
El primer paso consiste en la formación de un complejo enzima-inhibidor. Este paso es reversible, por lo cual el complejo puede disociarse liberando la enzima y el carbamato. El segundo paso consiste en la carbamilación del residuo de serina del sitio esterásico de la enzima produciendo la inhibición de la misma y la liberación del grupo saliente (X). El tercer paso involucra la hidrólisis de la enzima carbamilada en presencia de agua regenerando la enzima activa y liberando el ácido mono o dimetilcarbámico que luego se descompone rápidamente a metil o dimetilamina y dióxido de carbono. Este paso constituye una diferencia marcada entre la inhibición producida por OFs y carbamatos. La regeneración de la enzima carbamilada por hidrólisis espontánea es mucho más rápida comparada con la regeneración espontánea de la enzima fosforilada (Fukuto 1990, Costa 1997). Por esta razón, la inhibición de AChE por OFs se considera irreversible mientras que algunos autores consideran la inhibición por carbamatos como un proceso reversible. Sin embargo, sólo el primer paso es estrictamente reversible debido a que la reactivación espontánea de la enzima carbamilada no restituye el insecticida original.

Otra diferencia entre ambos insecticidas anticolinesterásicos radica en que mientras en el caso de los OFs se requiere una alta reactividad para lograr una mayor potencia inhibitoria, en el caso de los carbamatos se requiere un buen ajuste entre el compuesto y el sitio activo de la enzima. Los carbamatos con constante  $K_d$  menor (afinidad mayor) son mejores anticolinesterásicos.

### **3. DINÁMICA EN EL MEDIO AMBIENTE Y CONTAMINACIÓN DE SISTEMAS ACUÁTICOS**

La mayor fuente de contaminación por plaguicidas proviene de los residuos resultantes de la aplicación de los mismos para el control de plagas en la agricultura o en el control de vectores de enfermedades humanas. Otras fuentes de contaminación son los plaguicidas utilizados en áreas urbanas, y los desechos industriales. También contribuyen a la contaminación ambiental derrames que ocurren durante el transporte, distribución y almacenamiento de los plaguicidas (Matsumura 1985). Cualquiera sea el origen de la contaminación, los plaguicidas entran en el ambiente, son absorbidos por los diversos constituyentes del mismo y transportados a otros lugares por movimientos de agua y aire. También pueden ser transformados química y biológicamente en compuestos de menor o mayor toxicidad. Las propiedades físicas y químicas de los compuestos son importantes para predecir el destino de los plaguicidas en el ambiente. Las rutas de disipación desde el sitio de aplicación estarán influenciadas también por los sistemas agrícolas y el método de aplicación (Plimmer 1988). La figura 8 ilustra el método de aplicación de plaguicidas más comúnmente empleado en los montes frutales del Alto Valle de Río Negro y Neuquén.

Gran parte de los insecticidas OFs y carbamatos se descomponen lentamente en agua o pH ácido pero rápidamente en medio alcalino. En el caso de los carbamatos, los hidroxilos presentes en el medio alcalino se unen al insecticida formando un compuesto intermediario que luego se escinde liberando un alcohol y el ión metilo o dimetilcarbamilo, el cual posteriormente puede unirse a un protón y finalmente descomponerse en dióxido de carbono y metilamina. La estabilidad de estos compuestos se ve también severamente afectada por la fotodegradación por ondas ultravioleta cortas y por oxidación debida a la exposición al aire (Ecobicon 1982).



**Figura 8: Aplicación foliar de plaguicidas en montes frutales del Alto Valle de Río Negro y Neuquén con máquina fumigadora** (Foto gentileza de Liliana Cichón INTA Alto Valle).

Los insecticidas OFs y carbamatos son aplicados directamente en el suelo para su absorción vía sistémica o sobre las superficies foliares. Sin embargo, aunque la aplicación se realice sobre las superficies foliares, la mayor proporción se deposita finalmente sobre la superficie del suelo durante la aplicación o un corto tiempo después, si se producen lluvias o se efectúa riego por aspersión. En algunos casos puntuales los OFs pueden ser aplicados directamente sobre cuerpos de agua (Racke 1992). Varios procesos de transporte y degradación de estos insecticidas interactúan para determinar su destino final en el ambiente. Los procesos de transporte que determinan la redistribución de los residuos incluyen movimientos de aire (volatilización y dispersión de aerosoles) y agua (lixiviado y escurrimiento superficial) (Figura 9).

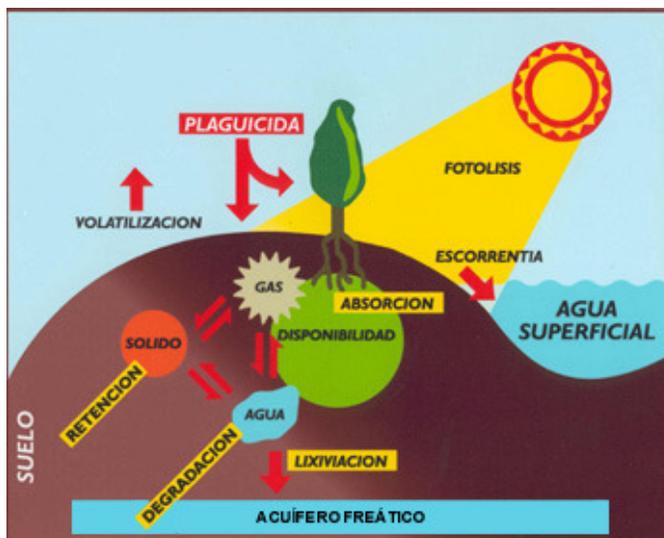


Figura 9: Representación esquemática de los principales fenómenos implicados en la dinámica de plaguicidas (Tomado de Loewy 2000).

### 3.1 Volatilización

Durante el proceso de aplicación de los insecticidas mediante vaporizadores existe una alta probabilidad de pérdida por evaporación y desplazamiento del aerosol. Los insecticidas OFs y carbamatos presentan un amplio rango de presiones de vapor. Por lo tanto la volatilización puede ser importante para algunos compuestos más que para otros (Racke 1992). Estos compuestos también pueden ingresar a la atmósfera con el vapor de agua o adsorbidos en partículas. Los plaguicidas volatilizados regresan a los ecosistemas terrestres o acuáticos ya sea por deposición de las partículas como por precipitaciones en forma de lluvia, nieve o granizo, o depositados como niebla (Plimmer 1988). Las precipitaciones pluviales son una vía importante de entrada de plaguicidas y otros contaminantes atmosféricos a los diferentes cuerpos de agua (Glotfelty y col. 1987). Glotfelty y col. (1987) han encontrado plaguicidas como el paratión, malatión, diazinon y paraoxón entre otros, en las nieblas en diversas localidades agrícolas de California, USA. La relevancia ambiental de la volatilización de los residuos de OFs y carbamatos es baja

comparada con otros compuestos más persistentes debido a que en la atmósfera estos dos grupos de insecticidas están sujetos a fotodegradación (Racke 1992).

### **3.2 Lixiviación, percolado y escurrimiento superficial**

En el ambiente, el agua puede proveer el mejor medio de transporte de sustancias de un lugar a otro. La carga de plaguicidas está generalmente confinada a las capas superficiales del suelo. La lixiviación involucra el movimiento de residuos de plaguicida a través de los perfiles del suelo hacia el agua subterránea con el agua de percolado. El flujo de agua a través de la estructura porosa del suelo es lento y los insecticidas son removidos del mismo por procesos de absorción y adsorción y biodegradación por lo cual se dificulta su llegada al agua subterránea. Sin embargo, existen mecanismos por los cuales estos compuestos pueden ser transportados rápidamente al agua subterránea. Un mecanismo es el flujo rápido del agua infiltrada a través de macroporos del suelo ocasionados por la descomposición de materia orgánica o el accionar de invertebrados. Otro mecanismo es el transporte de los insecticidas formando complejos con coloides móviles arcillosos o de materia orgánica (Vinton y col. 1983).

Otra ruta potencial de movimiento de insecticidas es el transporte con el agua o sedimentos sobre la superficie de los campos fumigados, o escurrimiento superficial. De acuerdo a la solubilidad de cada compuesto los residuos pueden moverse en la fase soluble o adsorbidos a las partículas que son erosionadas del suelo. Bajo condiciones normales de precipitación, esta vía de pérdida de insecticida no resulta muy importante. Sin embargo, sí puede serlo cuando se produce una erosión severa debido a la ocurrencia de tormentas de alta intensidad poco después de la aplicación de los plaguicidas (Racke1992), o debido al riego por inundación en ciertas zonas agrícolas.

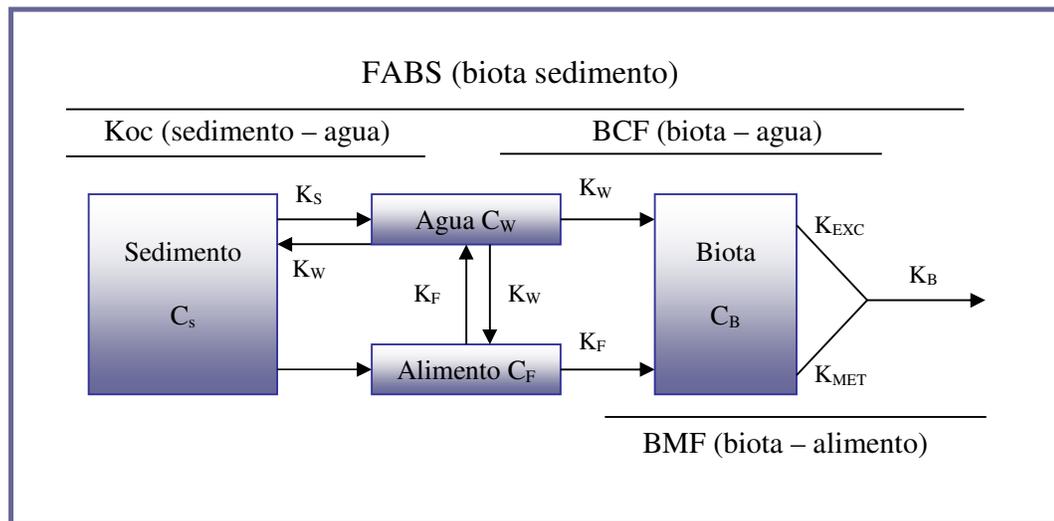
En algunos casos aislados los insecticidas pueden ser aplicados directamente sobre cuerpos de agua para controlar larvas acuáticas de diferentes especies plaga como mosquitos. La entrada indirecta de estos compuestos a los sistemas acuáticos puede ocurrir por dispersión de los aerosoles, volatilización y en menor medida por escurrimiento superficial de residuos. Los OFs y carbamatos aplicados directamente el agua o que llegan de manera indirecta, tienden a disiparse rápidamente de la columna de agua por partición con el sedimento, por volatilización, fotodegradación, hidrólisis y degradación microbiana.

Sin embargo, en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén se detectó la presencia de los insecticidas OFs metil azinfos, fosmet, dimetoato y metidation y del carbamato carbarilo en aguas superficiales y subterráneas (Loewy y col 1999, 2002). El metil azinfos fue el residuo que se detectó con mayor frecuencia debido a su uso frecuente en el control de las principales plagas de la fruticultura.

Hay que considerar, que si bien la mayoría de los insecticidas OFs y carbamatos se hallan en los sistemas acuáticos de agua dulce en concentraciones muy bajas para causar la muerte inmediata de la biota (Loewy y col. 2002), su recurrente aplicación y la bioacumulación de los mismos puede causar en ultima instancia disfunciones que reducen la supervivencia de los organismos expuestos (De La Vega Salazar y col. 1997).

## 4. BIOACUMULACIÓN EN ORGANISMOS ACUÁTICOS

Los compuestos químicos hidrofóbicos y persistentes pueden acumularse en los organismos acuáticos a través de diferentes vías: por captación directa desde el agua por las branquias y la piel (bioconcentración); por la incorporación de partículas suspendidas (ingestión); o por la consumición de alimento contaminado (biomagnificación) (Van der Oost y col. 2003). Los contaminantes presentes en la biota están determinados por las cinéticas de captación y eliminación que son características tanto de los compuestos químicos como de los organismos. La figura 10 ilustra el modelo de la distribución de los contaminantes en los diferentes compartimentos presentes en los sistemas acuáticos y su acumulación en la biota.



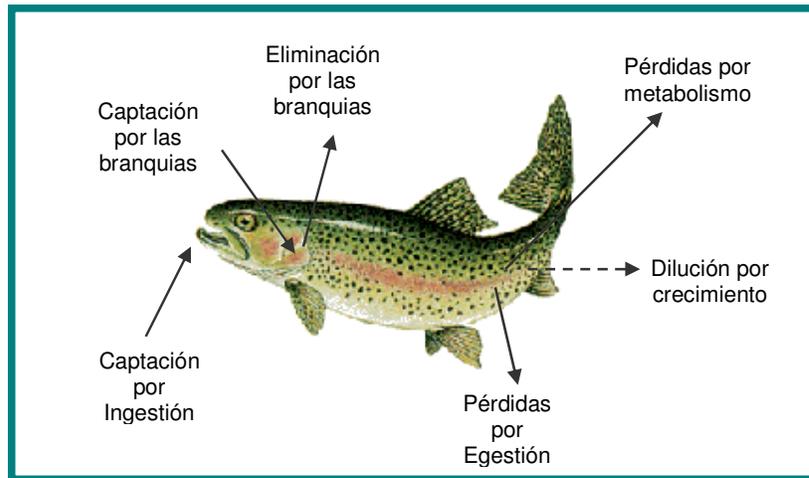
**Figura 10: Modelo de bioacumulación para organismos acuáticos.**  $K_{OC}$  coeficiente de absorción,  $BCF$ : factor de bioconcentración,  $BMF$ : factor de biomagnificación,  $FABS$  factor de acumulación biota-sedimento,  $C$ : concentración y  $K$  constante de velocidad de intercambio. Los subíndices  $S$ ,  $W$ ,  $F$ ,  $B$ ,  $EXC$  y  $MET$  se refieren a sedimento, agua, alimento, biota, excreción y metabolismo respectivamente (Adaptada de Van der Oost y col. 1996).

El factor de bioconcentración (BCF) se define como la proporción de la concentración del compuesto químico en el organismo entero con respecto a la concentración en el agua, una vez alcanzado el estado estacionario (Serrano y col. 1997a).

El factor de biomagnificación (BMF) es el cociente entre la concentración del compuesto químico en la biota y la concentración del mismo en el alimento, una vez alcanzado el estado estacionario (Mackay y Clark 1991).

Los insecticidas OCs y otros compuestos orgánicos como los bifenilos policlorados (PCBs) son compuestos altamente estables y persistentes además de lipofílicos, por lo cual, tienden a bioconcentrarse en los organismos acuáticos y su biomagnificación a lo largo de la cadena trófica es sumamente significativa. Los residuos de OCs se pueden encontrar en aire, suelo y agua, así como también en organismos acuáticos incluidos peces e incluso en diversos tejidos humanos (Olsson y col. 1999, Valters y col. 1999).

Los insecticidas OFs y carbamatos han reemplazado a los OCs por presentar ventajas indudables como su baja persistencia y su fácil metabolización. Sin embargo, estos insecticidas son compuestos lipofílicos en su gran mayoría, y por tanto tienden a bioconcentrarse en los organismos acuáticos, aunque es escasa o nula su biomagnificación. Efectivamente, la vía de ingestión con el alimento no constituye la principal ruta de entrada en el caso de los OFs y carbamatos. El agua, por el contrario, provee un excelente medio de transporte de estos insecticidas y la mayoría de los organismos acuáticos presentan además extensas superficies de contacto con la misma (Matsumura 1985). En los peces, la captación de oxígeno mediante la ventilación branquial facilita la captación simultánea de los compuestos químicos presentes en el agua. Los diferentes mecanismos de incorporación y eliminación en los peces están resumidos en la figura 11. El crecimiento si bien no es un método de eliminación de tóxicos, conduce a una disminución en la concentración de los mismos por incremento de la masa corporal.



**Figura 11: Dibujo esquemático de un pez mostrando los procesos de captación y eliminación de compuestos químicos (Adaptado de Mackay y Clark 1991).**

Gran cantidad de estudios realizados a campo o en laboratorio, señalan la capacidad de los organismos de bioacumular insecticidas OFs y carbamatos. Datta y col. (1998) han informado la presencia de clorpirifos en renacuajos de la rana arborícola (*Hyla regilla*) y trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) que habitaban aguas de sistemas pluviales cercanos a los cultivos en California. Estudios de laboratorio realizados con bivalvos de agua dulce o marinos han demostrado su capacidad de bioacumulación de compuestos OFs (Serrano y col. 1997b, Dauberschmidt y col. 1997). También se ha comprobado en laboratorio la alta capacidad de bioconcentración de OFs y carbamatos en diversas especies de peces, aunque su eliminación resulta también relativamente rápida (El-Alfy y col. 2002, Perkins y Schlenk 2000, Sancho y col. 1998, Tsuda y col. 1996).

Knuth y col. (2000) evaluaron la persistencia y distribución del OF metil azinfos en un mesocosmos litoral. El tiempo medio de disipación ( $TD_{50}$ ) luego de la aplicación aérea de  $20 \mu\text{g/L}$  fue de 2 días, mientras que para disipar el 95 por ciento se necesitó 10,2 días. Estos autores encontraron también una bioacumulación máxima en peces adultos *Pimephales promelas* (fathead minnows) luego de tres horas de aplicado el insecticida. A pesar de la rápida captación del insecticida, no se detectaron residuos en peces luego de 8 días. También observó bioacumulación del metil azinfos en las macrófitas a las 24 horas posteriores a su aplicación.

Asimismo, en diversos organismos acuáticos presentes en el embalse de Ignacio Ramírez de Méjico, incluidos peces autóctonos e introducidos, se encontró metilparatió (OF) en cantidades varios ordenes de magnitud mayores a las halladas en agua y sedimentos. Este embalse recibe irrigación de zonas aledañas de cultivos agrícolas (De La Vega Salazar y col. 1997). Los autores observaron una alta bioconcentración en huevos y larvas de peces vivíparos endémicos de esa zona, indicando un riesgo de declinación del tamaño de esas poblaciones. Estudios posteriores en esa misma región revelaron concentraciones del orden de los  $\mu\text{g/L}$  de los OFs metilparatió y malatió en agua, en el fito y zooplancton, como también en músculo de peces (Favari y col. 2002). La presencia de estos insecticidas en ambientes acuáticos, incluso en concentraciones bajas o por tiempos reducidos, implica un riesgo debido a su bioacumulación y a su potencial toxicidad para los organismos acuáticos.

## 5. TOXICIDAD

La presencia de contaminantes en el ambiente representa en sí misma un riesgo para los seres vivos. Sin embargo, para poder predecir o evaluar la magnitud de ese riesgo, se deben establecer conexiones entre los valores externos de exposición, los niveles internos de contaminación de tejidos y la aparición de efectos adversos (Van der Oost y col. 2003). Resulta necesario por lo tanto, evaluar la toxicidad en los organismos, lo cual está relacionado con la mortalidad, la manifestación de síntomas clínicos o la presencia de alteraciones específicas. La relación entre niveles tóxicos en los organismos y la respuesta a los mismos es bastante compleja y depende de varios factores toxicocinéticos y genéticos (Gil y Pla 2001). Los efectos ecotoxicológicos son dependientes de las fracciones biodisponibles de los contaminantes, y de las concentraciones en los blancos que a su vez inducen efectos moleculares que originan manifestaciones tóxicas en los organismos (Figura 12).

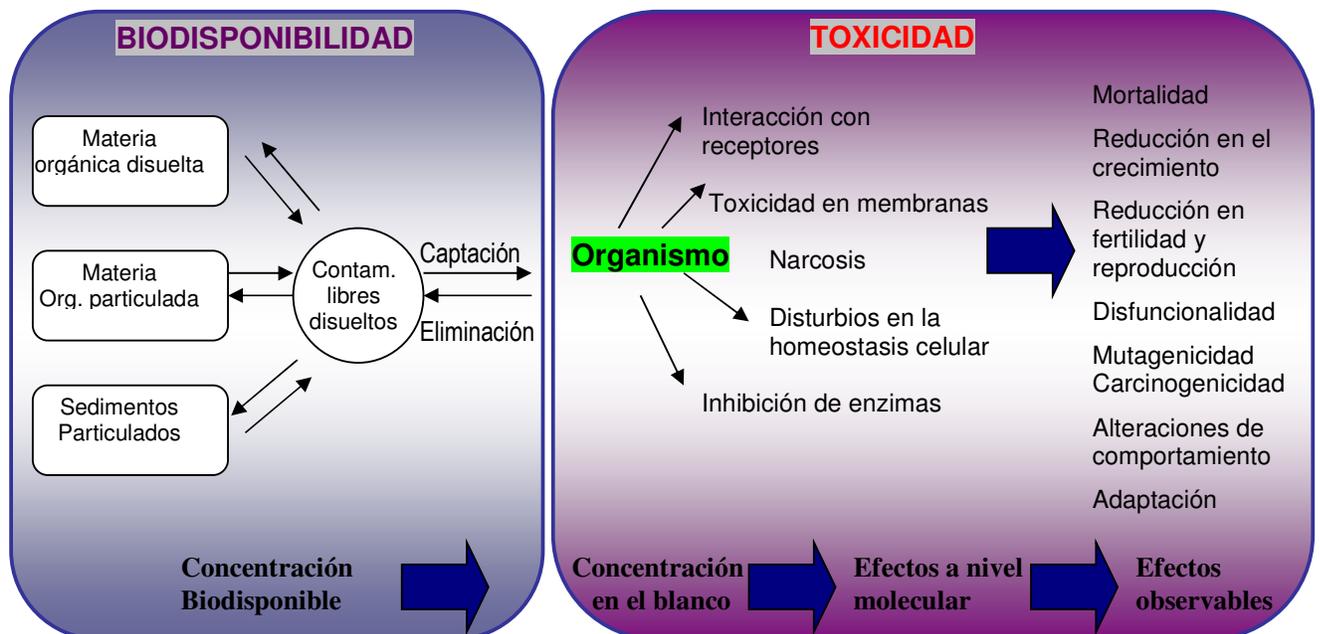


Figura 12: Relación entre biodisponibilidad de los contaminantes, concentraciones en el blanco, efectos moleculares y respuestas observadas (Adaptado de Escher y col. 1997).

Uno de los parámetros más convenientes y directos para medir el efecto de contaminantes, sobre la vida silvestre es la “dosis letal cincuenta” o “concentración letal cincuenta” (CL<sub>50</sub>), que se define como la concentración que produce una mortalidad del cincuenta por ciento de los organismos expuestos (Matsumura 1985). Los valores de CL<sub>50</sub> pueden establecer una estimación inicial de la toxicidad de una determinada sustancia y pueden ser utilizados para monitorear la toxicidad de efluentes o proveer un punto de partida para la investigación de tópicos más complejos en toxicología (Sprague 1988). Los datos de toxicidad aguda revelan la susceptibilidad relativa de los organismos a los plaguicidas y a otros xenobióticos, y permiten realizar comparaciones entre diversas especies o grupos de organismos.

No obstante, los datos obtenidos de los ensayos de toxicidad aguda no representan de manera cabal los riesgos ecológicos de un determinado plaguicida (Matsumura 1985). Las concentraciones de los insecticidas en los ecosistemas acuáticos o terrestres raramente alcanzan concentraciones letales, a pesar de lo cual su presencia produce efectos en los organismos no blanco que deben ser evaluados. Las respuestas de los organismos a las concentraciones subletales pueden ser separadas en respuestas del organismo completo, como reproducción y crecimiento, y respuestas dentro del organismo (Sprague 1988). Estas últimas involucran el uso de técnicas bioquímicas y fisiológicas y permiten la determinación de mecanismos de toxicidad de los contaminantes.

**El mecanismo de toxicidad fue definido por la Agencia de protección Ambiental de Estados Unidos (1997) como “los principales pasos que conducen a un efecto adverso de salud luego de la interacción de un plaguicida con blancos biológicos”. Los mecanismos de toxicidad pueden ser descritos con el conocimiento profundo de las cascadas de efectos que siguen a la interacción del compuesto químico con sus blancos biológicos (Pope 1999).**

En el caso de los insecticidas OFs y carbamatos como ya ha sido mencionado previamente, el mecanismo de toxicidad más conocido es la interacción con la enzima AChE y su posterior inhibición. Sin embargo, varios estudios sugieren que algunos OFs poseen sitios de acción adicionales o secundarios capaces de modificar la progresión de los pasos subsiguientes a la inhibición de AChE.

Los OFs fosforilan un residuo de serina en el sitio activo de AChE pero son capaces además de fosforilar residuos de serina presentes en otras enzimas. Una molécula blanco para algunos OFs es la esterasa neurotóxica, cuya inhibición se correlaciona con el inicio de la neurotoxicidad retardada (Richardson 1984). Algunos insecticidas OFs a altas concentraciones, incluido el metil azinfos, pueden unirse *in vitro* con receptores colinérgicos nicotínicos en el órgano eléctrico del torpedo (Eldefrawi y Eldefrawi 1983). Estos insecticidas pueden incluso actuar como agonistas de receptores muscarínicos a concentraciones menores (Van den Beukel y col. 1996). El carbarilo por otra parte, puede provocar una desensibilización de receptores muscarínicos en peces de manera dependiente de la concentración (Jones y col. 1998). Este mismo compuesto es capaz de unirse al receptor de grupos arilo (Ah-R) que actúa como factor de transcripción e induce la síntesis del citocromo P450 1A (Denison y col. 1998).

Otros efectos no colinérgicos han sido observados en diferentes especies, entre ellos alteraciones en el sistema esquelético (Karen y col. 2001, Meneely y Wyttembach 1989), en los parámetros hematológicos (Jyothi y Narayan 1999, Singh y Sharma 1998), en actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo (Ramaswamy y col. 1999, Rao y Rao 1983), y alteraciones histopatológicas diversas (Dutta y col. 1998, Richmonds y Dutta 1989, Fanta y col. 2003). Además, el paratión y otros OFs afectan la permeabilidad y composición lipídica de las membranas biológicas (Magnarelli y Pechén de D'Angelo 1997, Lopes y col. 1997). Mientras que compuestos de ambos grupos afectan de diversas maneras a los sistemas antioxidantes y de detoxificación de

xenobióticos (Anguiano y col. 2001, Oruç y Üner 2000, Panemangalore y Bebe 2000, Yarsan y col 1999, Hai y col. 1997a).

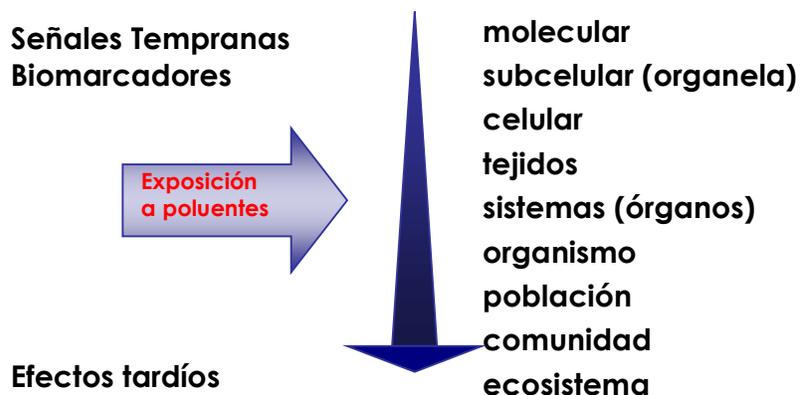
## **5.1 Biomarcadores**

Uno de los métodos para cuantificar la interacción de los seres vivos con los xenobioticos es el monitoreo a través de los denominados biomarcadores (Gil y Pla 2001). Este término en un sentido amplio, incluye cualquier medición que refleje una interacción entre un sistema biológico y un peligro potencial tanto químico como físico o biológico (WHO 1993). Peakall (1994) lo define como un cambio en una respuesta biológica (molecular, celular, fisiológico o comportamental) que puede relacionarse a la exposición a los efectos tóxicos de químicos ambientales. Walker y col. (1996) lo define como una respuesta biológica a un agente químico o grupo de agentes químicos pero no la sola presencia del agente o sus metabolitos en el cuerpo. Los biomarcadores son medidas realizadas en los fluidos celulares, en células o tejidos que indican modificaciones bioquímicas o celulares debido a la presencia y magnitud de los contaminantes (NRC 1987).

Otros autores han diferenciado entre biomarcador y bioindicador (Van Gestel y Van Brummelen 1996). El primero es cualquier respuesta a un químico ambiental al nivel sub-individual, medido en un organismo o en sus productos indicando una desviación del estatus normal que no se puede detectar en el organismo entero. Un bioindicador se define como un organismo que brinda información sobre las condiciones ambientales de su hábitat por su presencia o ausencia, o por su comportamiento.

Los efectos deletéreos sobre las poblaciones son difíciles de detectar porque la mayor parte de los mismos tienden a manifestarse luego de largos períodos. Esto conduce a que cuando finalmente se tornan claros, el proceso destructivo ha avanzado mas allá del punto en el cual se podría revertir. Esto último pone de manifiesto la necesidad de establecer señales de alarma

tempranas, que reflejen las respuestas biológicas a las sustancias tóxicas de origen antropogénico o ambiental. En la figura 13 se visualiza el orden secuencial de las respuestas de los sistemas biológicos al estrés inducido por contaminantes.



**Figura 13:** Representación esquemática del orden secuencial de respuestas al estrés producido por contaminantes en sistemas biológicos (Modificado de Bayne y col. 1985).

El biomarcador ideal debería poseer determinadas características:

- que el muestreo y análisis sean simples de realizar y de bajo costo,
- que sea específico para un tipo particular de exposición,
- que refleje un cambio temprano, subclínico y reversible,
- que la línea de base esté bien definida para distinguir entre variaciones naturales y estrés inducido por contaminación,
- que su uso sea éticamente aceptable.

Pocos biomarcadores cumplen con la totalidad de estos requisitos. Existen marcadores específicos como AChE o ALAD (dehidratasa del ácido aminolevulínico) y otros inespecíficos como los efectos sobre el sistema inmune o el daño en el ADN.

Además, los biomarcadores pueden ser subdivididos en tres clases, biomarcadores de exposición, efecto, y susceptibilidad (NRC 1987, WHO 1993). Los primeros involucran la detección y medida de una sustancia exógena o su metabolito, o el producto de interacción de un xenobiótico y una molécula o

célula. Los biomarcadores de efecto incluyen alteraciones bioquímicas, fisiológicas u otras en los tejidos o fluidos de un organismo que puedan ser reconocidas y vinculadas con daño a la salud. Por último, los biomarcadores de susceptibilidad indican la habilidad de un organismo (inherente o adquirida) para responder a la exposición de un determinado xenobiótico, incluyendo factores genéticos, características de los receptores o polimorfismos enzimáticos que alteran la susceptibilidad de un organismo a la exposición.

La división entre biomarcadores de exposición y de efecto no siempre es clara, la mayoría de los biomarcadores son efectos biológicos o bioquímicos luego de una cierta exposición, lo cual los convierte en indicadores tanto de exposición como de efecto (Van der Oost y col. 2003).

Diversos parámetros bioquímicos han sido evaluados por sus respuestas frente a sustancias tóxicas y su uso potencial como biomarcadores en peces y otros organismos. Entre ellos figuran las enzimas de detoxificación de xenobióticos y sus metabolitos así como también los blancos específicos de cada contaminante. La enzima AChE ha sido y es muy utilizada como biomarcador específico de exposición/efecto para los insecticidas OFs y carbamatos en diversos organismos acuáticos y terrestres. Sin embargo, recientemente se ha incrementado el interés en analizar la potencial aplicación de blancos secundarios de acción de estos compuestos como biomarcadores (Pope 1999). Entre ellos, los compuestos y las enzimas relacionadas con la defensa celular antioxidante, el metabolismo, la inducción de proteínas y los efectos sobre la señalización celular.

Los biomarcadores que han sido más extensivamente estudiados en peces son las enzimas involucradas en la detoxificación de xenobióticos y sus metabolitos. En estos organismos, el hígado es el órgano comúnmente involucrado en la detoxificación de compuestos extraños a través de los sistemas enzimáticos de biotransformación y antioxidantes. Las enzimas del sistema de oxidasas de función mixta (OFM) son sensibles a determinados grupos de contaminantes ambientales y han sido muy utilizadas como

biomarcadores de exposición. El citocromo P450 1A, uno de los componentes de los sistemas enzimáticos de OFM, es el biomarcador más estudiado y utilizado para el monitoreo de contaminación en ambientes acuáticos, particularmente en peces (Bard y col. 2002, Web y Gagnon 2002, Ghosh y col. 2000, Egaas y col. 1999). En la tabla 4 se detallan los principales biomarcadores que se analizan en peces a fin de evaluar la exposición a o el efecto de los contaminantes ambientales en los ecosistemas acuáticos.

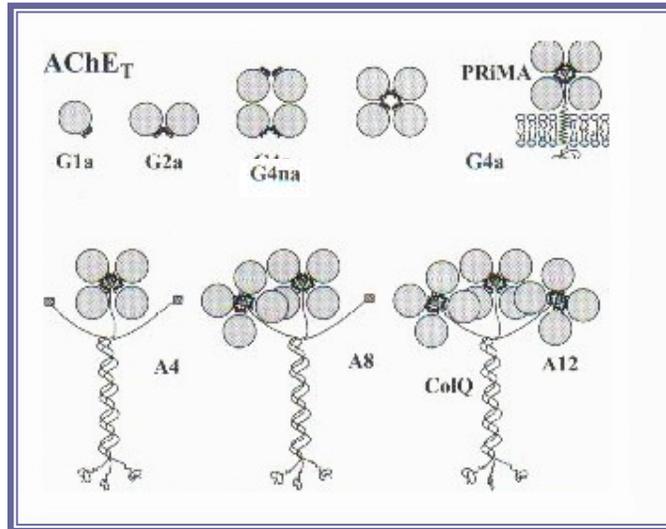
**Tabla 4: Biomarcadores de peces apropiados para su implementación en evaluaciones de riesgo ambiental**

<b>BIOMARCADORES</b>		<b>Ejemplos</b>
Enzimas de Biotransformación	- Fase I	Oxidasas de Función mixta, Citocromo P450-1A (CYP1A)
	- Fase 2	Glutación S-Transferasa, GST UDPGT: UDP-glucuroniltransferasas
Enzimas Antioxidantes		Catalasa, Superóxido dismutasa
Productos de Bitransformación		Metabolitos Biliares
Proteínas		Proteínas de estrés (HSP)
		Metalotioneínas(MT)
		Proteínas de Resistencia a Múltiples xenobióticos (MXR)
Parámetros Hematológicos		Transaminasas Séricas (AST, ALT)
Parámetros Inmunológicos		Estatus de linfocitos y leucocitos
Disrupción endocrina reproductiva		Vitelogenina (VTG), Proteína de la zona radiada (ZRP)
Parámetros Neurotóxicos		Acetilcolinestrerasa (AChE)
Parámetros Genotóxicos		Aductos de ADN, daño en el ADN
Parámetros Histopatológicos y Morfofisiológicos		Índice hepatosomático, factor de condición (FC)

### 5.1.1 Acetilcolinesterasa (AChE)

La enzima acetilcolinesterasa AChE (EC 3.1.1.7) está presente en el sistema nervioso central y periférico. Como ha sido mencionado previamente, su función es hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina (ACh). Este es liberado en respuesta a un potencial de acción que llega al terminal presináptico colinérgico y difunde a través de la hendidura sináptica para unirse a su receptor en la membrana postsináptica. Eventualmente originará un potencial de acción en la neurona postsináptica o la contracción del músculo en el caso de uniones neuromusculares. La enzima AChE rápidamente hidroliza la ACh impidiendo su acumulación y la subsiguiente sobre-estimulación del receptor colinérgico (Quinn 1987).

Esta enzima posee diferentes formas moleculares, que corresponden a variadas estructuras cuaternarias y además a diferentes modos de anclaje de la enzima. En invertebrados, principalmente en insectos, esta multiplicidad de formas se debe a la presencia de varios genes codificantes. Sin embargo, en vertebrados ésta se debe principalmente a una modificación luego de la transcripción (Massoulié y col. 1999). Las formas moleculares se pueden ser agrupadas en dos clases principales, las formas globulares (G) y las formas asimétricas (A) (Quinn 1987). Las primeras consisten en monómeros ( $G_1$ ), o dímeros ( $G_2$ ) y tetrámeros ( $G_4$ ) de la enzima, en los cuales las unidades catalíticas están unidos por puentes disulfuro. Las formas asimétricas contienen diferentes dominios: las unidades catalíticas, las colas de colágeno y/o las colas hidrofóbicas (Figura 15). La forma asimétrica  $A_{12}$  es la principal AChE presente en las uniones neuromusculares de vertebrados (Gašperšič y col. 1999), mientras que otras moléculas con colas de colágeno, además de una forma  $G_4$  con cola hidrofóbica, son importantes en las sinapsis entre neuronas. La variedad de sistemas en los cuales funciona la enzima AChE, sistema nervioso central y periférico además de músculo y otros órganos, probablemente explica la multiplicidad de sus formas (Massoulié y col. 1999).



**Figura 14: Formas moleculares de AChE.** G1a, G2a y G4a : formas globulares anfifílicas, G4na: tetramero soluble, PRIMA G4a: tetramero asociado a membrana, A4 y A 8: formas asimétricas con cola de colágeno, A12: forma asimétrica con hidrofóbica (col Q) (Adaptado de Massoulié 2002).

Además de la enzima AChE presente generalmente en la membrana postsináptica o hendidura sináptica y que hidroliza predominantemente al sustrato ACh, existen otras colinesterasas (ChEs) capaces de catalizar la hidrólisis de otros sustratos, predominantemente ésteres de colina. Entre ellas se encuentra la butirilcolinesterasa (BuChE) presente en plasma de vertebrados así como en diversos órganos y que ha sido denominada falsa colinesterasa en oposición a la AChE (verdadera ChE) (Corbett 1974, Habig y Di Giulio 1991). Se desconoce la función fisiológica de esta enzima pero ella así como otras colinesterasas también son inhibidas por OFs y carbamatos. Las ChEs pueden encontrarse en varios tejidos desde cerebro, músculo, plasma y en membrana de eritrocitos y linfocitos; así como también están ampliamente distribuidas en el reino animal encontrándose tanto en vertebrados como en invertebrados (Matsumura 1986). Las diferentes ChEs pueden distinguirse debido a poseer cinéticas diferentes y responder de manera distintiva a la presencia de inhibidores específicos (Massoulié y col. 1999). Recientemente se ha propuesto que diferentes variantes postranscripcionales de la enzima AChE tienen además de su capacidad catalítica funciones estructurales en tejidos no colinérgicos. Se ha comprobado que estas AChEs juegan un papel importante afectando la

proliferación y el desarrollo celular en sangre, hueso, retina así como también en tejidos neuronales (Grisaru y col. 1999).

En diversos organismos vertebrados e invertebrados los plaguicidas OFs y carbamatos producen inhibición de la enzima ChE a concentraciones letales y subletales (Alves y col. 2002, Varo y col. 2002, Ramírez Mora y col. 2000, Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot 2000, Ibrahim y col. 1998, Scaps y col. 1997). Estas evidencias han permitido que la enzima de ambos grupos de animales, incluidos los peces teleósteos, haya sido utilizada como biomarcador en estudios de monitoreo de contaminación a campo (Forget y col. 2003, Roméo y col. 2003, De la Torre y col. 2002, Dellali y col. 2001, Kirby y col. 2000, Gruber y Munn 1998).

### **5.1.2 Carboxilesterasas (Aliesterasas)**

Las CarbE (EC 3.1.1.1) son enzimas que tienen un residuo de serina en el sitio activo e hidrolizan de manera bifásica ésteres y tio-ésteres o grupos amida presentes en los ácidos carboxílicos. Se denominan también Aliesterasas y pertenecen al grupo de las B-esterasas (Barron y col. 1999). Son inhibidas por OFs, sin embargo al no reaccionar con ésteres cargados positivamente, la inhibición con carbamatos ocurre solamente a altas concentraciones de los mismos (Jokanović 2001). Tienen importancia en el metabolismo de lípidos, esteroides y numerosas drogas como salicilatos. Es posible encontrarlas en microsomas de numerosos tejidos, si bien se sintetizan en el hígado.

Debido a su papel en la detoxificación de ciertos OFs, además de ser enzimas inhibidas por estos compuestos, se ha intentado evaluar su actividad en diversos tejidos y en diferentes especies (Venturino y col. 2001, Barron y col. 1999, Dettbarn y col. 1999, Chanda y col. 1997, Boone y Chambers 1997). Asimismo, se las ha considerado biomarcadores de exposición a OFs en varios grupos de vertebrados (Sanchez y col. 1997, Caballero y col. 1991) incluyendo

diversas especies de peces (Denton y col. 2003, Wogram y col. 2001, Boone y Chambers 1996).

### **5.1.3 Sistema de Defensa Antioxidante**

Durante el metabolismo de los organismos aeróbicos se generan metabolitos reactivos del oxígeno (ROS), que son esencialmente radicales libres que contienen oxígeno. Si bien los ROS se generan endógenamente por un proceso metabólico normal, se ven incrementados por factores exógenos como la radiación solar, toxinas fúngicas o plaguicidas (Miller y Brzezinska-Slebodzinska 1993). Los radicales libres generados pueden iniciar peroxidación lipídica produciendo daño en las membranas biológicas u oxidar proteínas, polisacáridos o incluso el ácido desoxirribonucleico (ADN). El estrés oxidativo se produce generalmente cuando la capacidad antioxidante celular es superada por los ROS generados por el metabolismo de plaguicidas u otros xenobióticos, algunos de los cuales incluso modulan la expresión de las enzimas antioxidantes (Janssens y col. 2002). Bajo estas circunstancias los ROS interactúan con las macromoléculas lo cual conduce a la peroxidación lipídica y daño celular, y adicionalmente pueden activar señales moleculares conduciendo tanto a la apoptosis como a la proliferación celular y dar lugar a lesiones pre-neoplásicas (Panemangalore y Bebe 2000). Finalmente se puede llegar a una condición fisiológica alterada de los organismos, reducción en el crecimiento, y a la muerte si son afectados tejidos esenciales (Janssens y col. 2002).

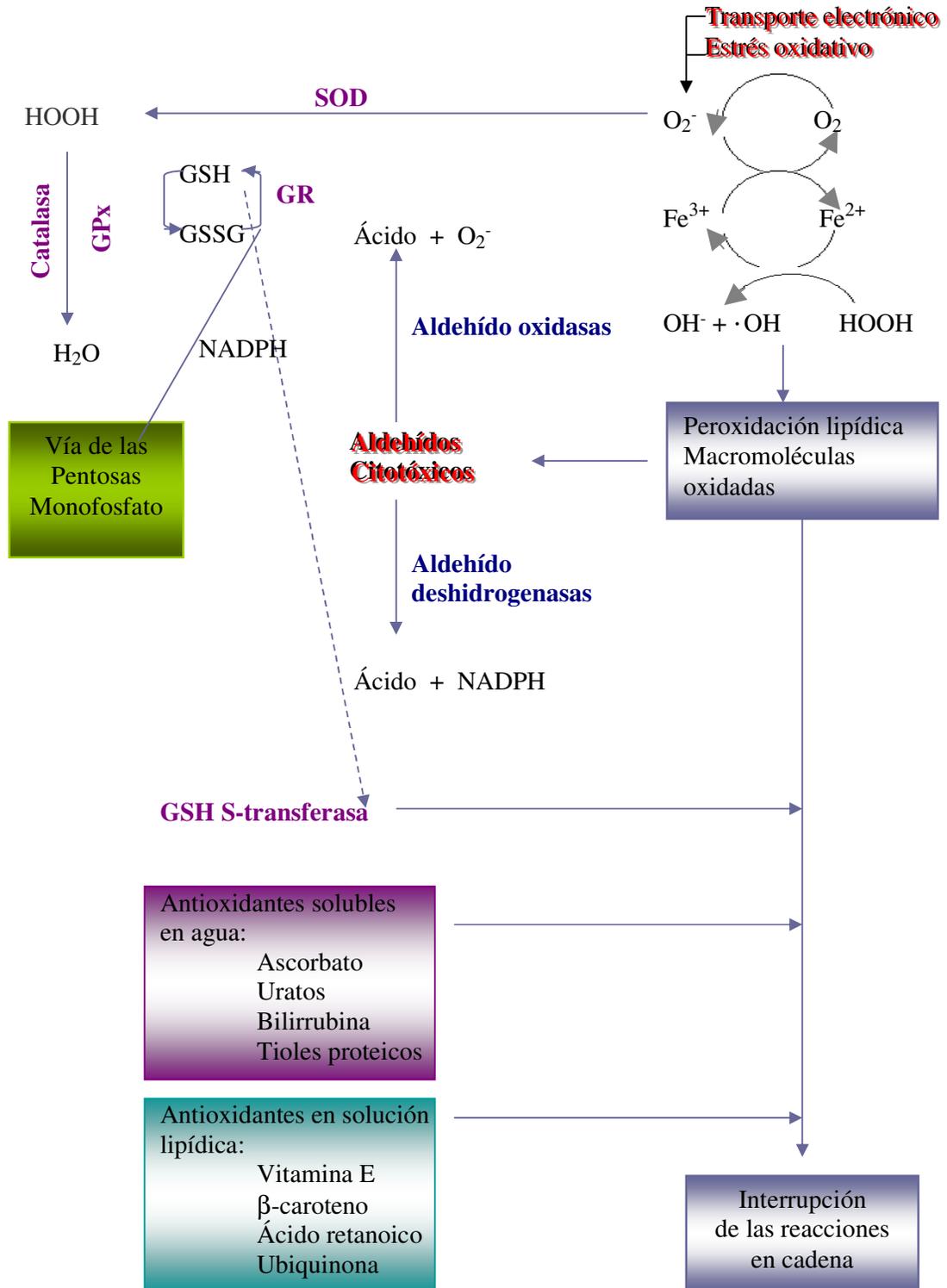
La sensibilidad de las células a los oxidantes es modulada por diversas enzimas antioxidantes como la catalasa (E.C. 1.1.1.6, CAT), glutatión peroxidasa (E.C. 1.11.1.9, GPx), superóxido dismutasa (E.C. 1.15.1.1, SOD), glutatión reductasa (E.C., 1.6.4.2, GR) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.49, G6PD) (Oruç y Üner 2000). También participan en el control del estado redox celular compuestos antioxidantes como la vitamina E, el ácido ascórbico, los

tioles proteicos y el GSH. El GSH es un compuesto presente en la mayoría de las células que participa además en el metabolismo y la detoxificación de numerosos xenobióticos. Este tripéptido es co-sustrato de las enzimas GST, involucradas en la conjugación de xenobióticos y sus metabolitos, y de las glutatión peroxidasa. La figura 16 resume todo el sistema de protección antioxidante.

Una estrategia para detectar la presencia de xenobióticos prooxidantes en organismos acuáticos es el empleo de biomarcadores indicativos de las alteraciones en el sistema de defensa antioxidante en peces (Stephensen y col. 2002).

La catalasa es una enzima ubicua que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno produciendo agua y oxígeno. Junto con la GPx constituye la defensa antioxidante celular clave contra los peróxidos. Su actividad se ha visto modificada en diferentes organismos por la exposición a contaminantes ambientales (Ventura y col. 2002, Gultekin y col. 2000, Jett y Navoa 2000, Bainy y col. 1996).

El contenido de GSH es crítico para la homeostasis de los grupos tioles celulares y para la protección celular contra daños inducidos por radicales libres (Halliwell y Gutteridge 1989). Este tripéptido se encuentra en altas concentraciones en la mayoría de las células y participa en diversas reacciones del metabolismo celular (Della Morte y col. 1994). Una disminución del 20-30% de los niveles de GSH puede deteriorar la capacidad de respuesta antioxidante y puede conducir a daño y muerte celular (Jokanović 2001). El contenido de GSH endógeno y los tioles ácido solubles son parámetros evaluados en estudios de laboratorio con organismos acuáticos, en especial en peces, y en monitoreos a campo (Cossu y col. 2000, Almar y col. 1998, Lindström-Seppä y col. 1996).



**Figura 15: Sistemas de protección contra metabolitos reactivos de oxígeno.** SOD: enzima superóxido dismutasa, GPx: enzima glutatión peroxidasa, GR: enzima glutatión reductasa, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado, NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (Adaptado de Miller y Brzezinska-Slebodzinska 1993).

Las GSTs son un grupo de enzimas multifuncionales involucradas en la biotransformación y detoxificación de xenobióticos, incluidos varios insecticidas (Smith y Litwack 1980). Están ampliamente distribuidas y han sido identificadas en procariotas, y diversos eucariotas como levaduras, plantas, insectos, peces, anfibios y mamíferos, entre otros. Además de conjugarse el GSH con diferentes xenobióticos, cumplen una función antioxidante conjugando también productos de ruptura de peróxidos lipídicos.

Otro indicador relevante frente a la exposición a compuestos oxidantes es la peroxidación lipídica que ha sido evaluada a través del análisis de la producción de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Yarsan y col. 1999, Hai y col. 1997a, Rudneva-Titova y Zherko 1994).

#### **5.1.4 Inducción de Proteínas de Estrés**

Desde hace un tiempo, se observó que la respuesta de los organismos al estrés provocado por calor involucraba en la mayoría de los casos la inducción de la síntesis de proteínas denominadas Hsp ("heat shock proteins") (Lindquist y Craig 1988). Actualmente es sabido que las Hsp son familias de proteínas que se expresan en respuesta a una gran variedad de agentes estresantes tanto bióticos como abióticos, por lo cual se denominan de una manera más general como proteínas de estrés (Iwama y col. 1998). El término proteínas de estrés podría incluir también a otros grupos de proteínas que son inducidas en respuesta al estrés, como las metalotioneínas o las enzimas dependientes del citocromo P450.

Las proteínas Hsp y sus correspondientes genes codificantes, se encuentran entre las más conservadas en la naturaleza y existen en diversos organismos desde las arqueobacterias, hasta levaduras, plantas y animales. Tanto en ausencia como en presencia de estrés, juegan un papel fundamental en el plegamiento, ensamblaje y translocación correcta de las proteínas celulares, así como en la regulación de interacciones entre hormonas y sus receptores

(Thomas y col. 1997, Parsell y Lindquist 1993, Welch 1993). La nomenclatura y clasificación de las Hsp se realiza en base a su peso molecular, considerándose también la secuencia de ADN y a su reactividad cruzada con anticuerpos (Iwama y col. 1998). La mayoría puede ser asignada a las familias Hsp100, Hsp 90, Hsp 70 y Hsp 60 y la clase de las Hsp de bajo peso molecular (LMW).

En estudios ecotoxicológicos con especies acuáticas las Hsp más estudiadas han sido las correspondientes a las familias Hsp 60 y 70 (Aït-Aïssa y col. 2003, Tedengren y col. 1999, Karouna-Renier y Zehr 1999, Hassanein y col. 1999, Wheelock y col. 1999, De Wachter y col. 1998, Werner y Nagel 1997). Sin embargo su implementación como biomarcador es aún discutida debido a la variabilidad estacional propia de los niveles de estas proteínas, su variabilidad intrapoblacional, y a su alta inespecificidad sumado a los elevados niveles basales presentes en algunas especies (Lacorn y col. 2001, Pyza y col. 1997, Fader y col. 1994).

### **5.1.5 Señalización Celular. Fosforilación de Proteínas**

La fosforilación y de-fosforilación proteica es un mecanismo importante de regulación de la actividad de enzimas, elementos del citoesqueleto, canales iónicos, etc. (Corso y Thompson 2001). Constituye un componente fundamental de la transducción de señales asociada a los diferentes receptores y sus correspondientes ligandos y las fosfoproteínas efectoras pueden modular el metabolismo, el crecimiento y la diferenciación celular (Thomas y col. 2000).

Aproximadamente un tercio de las proteínas eucarióticas pueden ser fosforiladas (Dombrádi y col. 2002). Las proteínas quinasas pertenecen a una gran superfamilia de proteínas que incorporan fosfatos a residuos de serina (Ser), treonina (Thr) o tirosina (Tyr) de sus proteínas blanco. Las fosfatasa de proteínas son menos numerosas pero más diversas, y pueden ser agrupadas en cuatro familias diferentes de acuerdo a su especificidad de sustrato, su mecanismo catalítico y su secuencia aminoacídica (Dombrádi y col. 2002).

Algunos contaminantes son capaces de interferir en la señalización celular y en las cascadas de fosforilación proteica de diversas maneras. Del mismo modo que la inducción de proteínas de estrés, metalotioneínas, o enzimas dependientes de citocromo P450, las alteraciones en los perfiles de fosforilación proteico en distintos órganos son indicativas del efecto de los xenobióticos, en este caso como disruptores de la señalización y por tanto del funcionamiento celular. Estos mecanismos están siendo dilucidados recientemente y su utilidad en peces no ha sido estudiada aún convenientemente.

## **6. IMPORTANCIA DE LOS PECES EN LOS ESTUDIOS ECOTOXICOLÓGICOS**

Por muchas razones, las especies de peces han atraído el interés en estudios que evalúan las respuestas biológicas y bioquímicas a los contaminantes ambientales (Powers 1989). Los peces presentan características que los hacen adecuados para el monitoreo de la calidad de los ecosistemas acuáticos. Pueden ser encontrados virtualmente en todos los sistemas acuáticos tanto de agua dulce como salobre o salada, y juegan en los mismos un papel ecológico clave en las redes alimenticias transfiriendo energía de los niveles tróficos inferiores a los superiores (Beyer 1996). Además son importantes debido a que pueden captar contaminantes presentes tanto en la columna de agua como en el material particulado o incluso sedimentado de acuerdo a su modo de vida pelágico o bentónico. Por lo anteriormente expuesto, el estudio de la captación de los contaminantes y de las respuestas de los peces a los mismos toma por tanto relevancia ecológica. Más aun, la mayor parte de los biomarcadores utilizados en la actualidad puede ser aplicados en estudios de laboratorio o campo que involucren peces. Por lo cual, aun con la limitación debido a su alta movilidad, los peces se consideran generalmente como los

organismos más factibles para el monitoreo de la polución en ambientes acuáticos (Van der Oost y col. 2003).

Los mecanismos mediante los cuales los organismos se adaptan al estrés ambiental han llamado la atención de numerosos bioquímicos y fisiólogos comparativos. Los peces son buenos modelos por la gran variedad de hábitat en los que viven, razón por la cual deben adaptarse a parámetros ambientales diversos, como temperatura, salinidad, oxígeno, pH (Powers 1989). Estos parámetros son relativamente fáciles de medir bajo condiciones controladas de laboratorio. Una gran variedad de estudios se han realizado a fin de evaluar como afectan diferentes parámetros ambientales a biomarcadores de peces ampliamente utilizados en el monitoreo de la contaminación acuática.

La selección de las especies se realiza generalmente en base a criterios de importancia de acuerdo a los objetivos planteados en cada estudio ecotoxicológico. Algunas especies de peces poseen importancia comercial o de recreación, mientras que otras por representar poblaciones amenazadas, ser endémicas de cierto lugar o ser predadores claves de los ecosistemas en los que habitan constituyen excelentes modelos de estudio (Stephan y Mount 1973). El monitoreo de contaminación en peces no es importante solo desde el punto de vista ecológico del mantenimiento de las poblaciones sino por motivos económicos debido a la explotación pesquera y por el peligro potencial para el hombre debido a su consumo.

En el presente trabajo se utilizaron juveniles de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoiris) de la familia Salmonidae y juveniles de peces teleósteos de las especies *Cyprinus carpio*, (carpa) y *Carassius auratus* (carasius) pertenecientes a la familias Cyprinidae. La selección de juveniles para el trabajo experimental se basó en los antecedentes que señalan que los peces en estadios larvales y juveniles generalmente son más sensibles a la inhibición de ChE por agentes anticolinesterásicos y que esta inhibición puede tener consecuencias más relevantes en su supervivencia o incluso en su desarrollo (Dutta y col. 1995, Phillips y col. 2002b). Por otra parte, el mantenimiento de los peces en

condiciones estáticas controladas de laboratorio con densidad de cargas bajas que garanticen buena disponibilidad de oxígeno resulta más factible utilizando ejemplares de menor tamaño que los adultos.

El trabajo de esta tesis se centro en la búsqueda de biomarcadores en *O. mykiss* debido a que es una especie aclimatada y presente en los cuerpos de agua de la región y por lo tanto los resultados poseen una aplicación potencial a campo. Esta especie presenta una gran importancia económica para la zona, tanto en la industria alimenticia, como en la deportiva y turística por motivos recreacionales. Además, ha sido utilizada como modelo en numerosos estudios sobre la biología de peces, fisiológicos y toxicológicos (Beauvais y col. 2000 y 2001, Barron y col. 1999, Fenet y col. 1998, Lindström-Seppä y col. 1996, Abbas y col. 1996). Es importante destacar, asimismo, su alta sensibilidad a la contaminación acuática, y que ha sido reconocida como especie indicadora por la agencia ambiental de Estados Unidos (USEPA 1996). Sin embargo, la biología reproductiva de la misma hacía imposible tener disponibilidad de juveniles del tamaño utilizado para los experimentos a lo largo del año, limitándose la misma a los meses comprendidos entre diciembre y marzo. Por lo cual se realizaron experimentos complementarios evaluando algunos de los biomarcadores en ejemplares de las especies *C. auratus* y *C. carpio*.

*C. auratus* y *C. carpio* son dos especies exóticas ampliamente utilizadas como modelo en diversos estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos con diversos contaminantes incluyendo insecticidas anticolinesterásicos, así como en estudios ecotoxicológicos (Bretaud y col. 2002, De la Torre y col. 2002, Saglio y Trijasse 1998, Gruber y Munn 1998, Oruç y Üner 1998, Hai y col. 1997a y b, Saglio y col. 1996, Rand y col. 1975). Los ejemplares de ambas especies son fáciles de mantener en condiciones controladas de laboratorio y se encuentran disponibles en un período más prolongado a lo largo del año. Sin embargo presentan en general menor sensibilidad a los contaminantes y se emplearon a fin de realizar estudios comparativos.

## HIPÓTESIS

En el Alto Valle del Río Negro y Neuquén la práctica de monocultivos fundamentalmente de frutales de pepita y carozo ha favorecido la aparición de numerosas plagas. El control de las mismas trae aparejado la aplicación masiva de plaguicidas, lo que constituye un peligro potencial para la biota y hace que sea necesaria la evaluación de los efectos sobre los organismos a los cuales no estaban dirigidos.

Los efectos de insecticidas OFs y carbamatos han sido asociados fundamentalmente a la inhibición de su blanco primario, la enzima Acetilcolinesterasa, lo cual produce apertura continua del canal iónico asociado al receptor colinérgico y provoca la muerte del animal.

La hipótesis de trabajo es que estos efectos agudos deben ser precedidos o acompañados por otras alteraciones manifiestas a nivel molecular que estarían relacionadas principalmente con:

- ❖ El efecto de los plaguicidas sobre las membranas biológicas, su primer lugar de interacción, afectando enzimas y receptores.
- ❖ La respuesta celular al efecto de los plaguicidas a nivel de las enzimas que protegen contra el estrés oxidativo y compensan efectos deletéreos, incluyendo la inducción de mecanismos detoxificantes.

La identificación y caracterización de estos mecanismos, su secuencia de aparición temporal, así como su correlación con alteraciones morfológicas, de comportamiento y/o mortalidad en peces, permitirá seleccionar biomarcadores de toxicidad que señalen con mayor precisión los efectos subletales.

## **OBJETIVO GENERAL**

**Identificar los biomarcadores más sensibles de toxicidad en peces para plaguicidas organofosforados y carbamatos.**

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Evaluar la sensibilidad de la ChE de peces como biomarcador de OFs y carbamatos comparando diferentes órganos y evaluando las cinéticas de inhibición y recuperación.
- ❖ Determinar si existe una correlación entre inhibición de colinesterasas, mortalidad y síntomas neurológicos y de comportamiento.
- ❖ Conocer los efectos de estos insecticidas sobre el sistema de defensa antioxidante de juveniles de peces analizando el potencial uso como biomarcadores.
- ❖ Evaluar la inducción de proteínas de estrés y la alteración de la fosforilación de proteínas como marcadores moleculares de exposición/efecto a organofosforados y carbamatos en juveniles de peces.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para el desarrollo del trabajo experimental se emplearon ejemplares de peces de las siguientes especies:

- Peces juveniles de la familia Cyprinidae, especies: - *Cyprinus carpio* (carpa), peso promedio:  $2,6 \text{ g} \pm 1,3$ . - *Carassius auratus* (carasius), peso promedio  $3 \text{ g} \pm 2$ . Los peces fueron obtenidos de un local comercial.
- Peces juveniles de la especie *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco-iris), familia Salmonidae. Peso promedio ( $2,73 \pm 0,78 \text{ g}$ ). Las truchas arco-iris fueron obtenidas de la piscicultura del Centro Regional Universitario Bariloche de la Universidad Nacional del Comahue.

### 2. INSECTICIDAS UTILIZADOS

- Organofosforados (OF):

Paratión, O, O-dietil O-p-nitrofenilfosforotioato, (Estándar EPA y ChemService 99,2 % de pureza).

<sup>14</sup>C-Paratión (Sigma, marca uniforme en anillo, diluido en paratión estándar EPA, 200 Bq/ $\mu\text{g}$ )

Metil Azinfos, O,O-dimetil S-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-ilmetil fosforoditioato, (Dr. Ehrenstorfer 99 % de pureza y ChemService 99 % de pureza).

- Carbamatos:

Carbarilo, 1-naphthyl methylcarbamate, (ChemService 99 % de pureza).

Los insecticidas metil azinfos y carbarilo se utilizan comúnmente en los tratamientos de frutales de la zona. El paratión fue prohibido en el año 1997 por su alta toxicidad, a pesar de lo cual existe aún un uso clandestino del mismo. Los trabajos de Loewy y col. (1999, 2002 y 2003) describen la detección de estos compuestos en cuerpos de agua de la región.

### **3. MATERIALES**

El glutatión ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina, glutatión reducido), la bisacrilamida y la sacarosa fueron comprados en Fluka Chem. A. G, Buchs SG.

El CDNB (1-cloro-2,4-dinitro benceno), el DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), el yoduro de acetiltiocolina, la albúmina de suero bovina (ASB), p-nitofenilbutirato, la leupeptina, la apoprotinina, el PMSF (floruro de fenilmetil sulfonilo) y el 1,1,3,3,-tetrametoxipropano (TMP), Hepes (ácido N(2 hidroxietil)piperazina N'2 etano sulfónico), el EDTA (ácido etilendiamino tetraacético), el EGTA (ácido etilenglicol bis- $\beta$ amino etileter N,N' tetraacético), el 2 $\beta$ -mercaptoetanol y el azul de Coomasie fueron comprados al laboratorio SIGMA Chemical Company (USA).

La acrilamida, las sales de fosfato de sodio y potasio, el Tris-(hidroxiaminometano), el colorante Rojo Ponceau y el sodio dodecil sulfato (SDS) fueron comprados a MERCK, Darmstadt, Germany.

Se utilizaron membranas de nitrocelulosa 0,45  $\mu$ m (SIGMA Chemical Company USA) y membranas de floruro de polivinilideno (PVDF) (NEN Life Science, Boston, USA).

Se utilizó solución centelladora "Optifase Hisafe 3" Perkin Ellmer, Wallac.

El resto de las drogas y solventes utilizados fueron de calidad analítica.

## **4. DISEÑO EXPERIMENTAL:**

### **4.1 Condiciones Generales de Ensayo**

Los peces fueron aclimatados a las condiciones de laboratorio al menos dos semanas antes de realizar los ensayos, mantenidos a baja densidad (1,5-2 g de pez por L de agua) en peceras de vidrio (50 X 40 X 40 cm) con agua de canilla filtrada y declorinada. Las condiciones del agua fueron las siguientes: temperatura  $20 \pm 1$  °C para los juveniles de *C. auratus* y *C. carpio* y  $16 \pm 1$  °C para juveniles de *O. mykiss*; pH: 7,4-7,6; oxígeno disuelto:  $7 \pm 1$  mg/L y fotoperíodo de 12 h luz-12 h oscuridad.

Los carasius y las carpas fueron alimentados una vez al día hasta saciedad con comida comercial en escamas de Tetra-fish. Los juveniles de trucha arco-iris fueron alimentados una vez diariamente hasta saciedad con alimento balanceado para truchas. Los peces fueron ayunados 48 horas antes de comenzar los ensayos y durante todo el período de exposición. En los ensayos de inhibición y recuperación de la actividad de ChE los peces fueron alimentados diariamente durante el período correspondiente a la recuperación.

Todos los ensayos fueron realizados en condiciones estáticas en acuarios de 20 litros, con aireación constante, en cuarto climatizado y conteniendo agua con las características mencionadas anteriormente (Figura 16).

Las soluciones acuosas conteniendo las concentraciones correspondientes de los insecticidas fueron preparadas disolviendo el estándar puro en acetona, diluyéndolo posteriormente con las cantidades apropiadas de agua dentro de las peceras. La concentración de acetona en las peceras con insecticida y control fue en todos los casos igual al 0,05%.

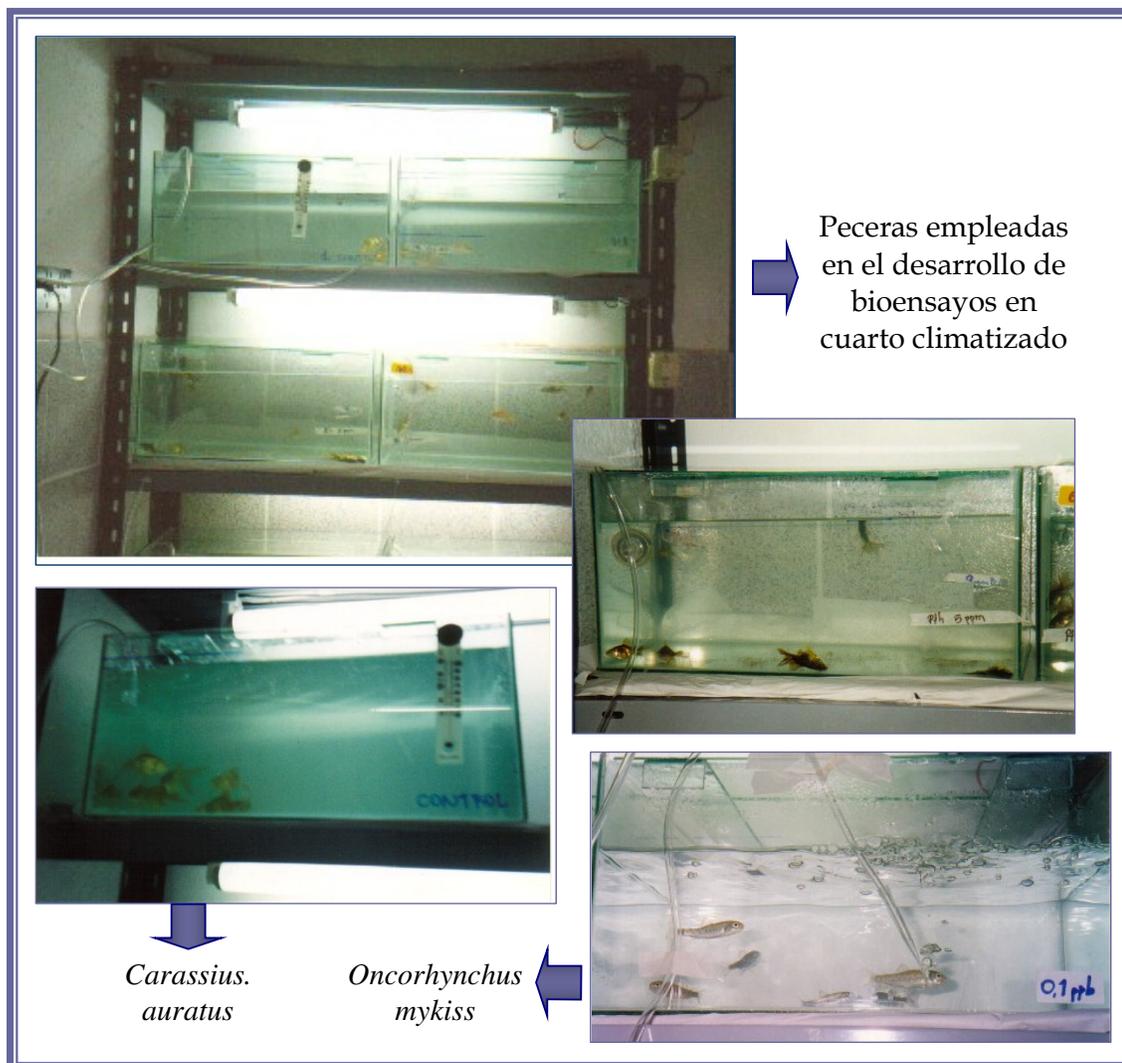


Figura 16: Ilustración de las peceras utilizadas para el desarrollo experimental.

## 4.2 Protocolo de exposición

### 4.2.1 Toxicidad Aguda

Los ensayos de toxicidad aguda y actividad de esterases en función de la concentración de cada insecticida fueron realizados siguiendo el protocolo de USEPA 1996, para organismos acuáticos, utilizando juveniles de *C. auratus* y *O. mykiss*. Se colocaron 8 peces por pecera (1 pez cada 2 litros de agua). Las diferentes concentraciones de plaguicida y el correspondiente control se realizaron al menos por duplicado. Las concentraciones medidas luego de

extracción y cuantificación por cromatografía gaseosa (secciones II-10.1 y II-10.2) resultaron entre un 89 y 101% de las concentraciones nominales. El tiempo de exposición se estableció en 96 horas conforme lo recomendado para ensayos de toxicidad aguda en peces, macroinvertebrados y anfibios (Stephan 1975). Los peces fueron observados cada 12 horas registrándose el número de individuos muertos y observando la existencia de signos visibles de intoxicación aguda. La condición de mortalidad se determinó mediante la ausencia de movimientos respiratorios branquiales e inmovilidad corporal.

#### **4.2.2 Actividad de Esterasas**

La actividad de ChEs cerebrales y musculares se determinó según se indica en la sección II-5.1, una vez finalizado el tiempo de 96 horas de exposición a concentraciones subletales o en al menos tres peces que sobrevivieron a las concentraciones letales empleadas en los ensayos de toxicidad aguda. Los ensayos a concentraciones subletales se realizaron manteniendo las condiciones de carga de pez por litro y replicados detalladas en la sección II-4. 2.2. Estos ensayos se realizaron con paratión, MeAz y carbarilo empleando juveniles de *C auratus* y con MeAz y carbarilo empleando juveniles de *O. mykiss*.

#### **4.2.3 Inhibición y Recuperación de Esterasas**

En los ensayos para evaluar el perfil de inhibición y recuperación de enzimas esterasas, los peces fueron expuestos durante 96 horas a una concentración subletal del insecticida correspondiente a la mínima concentración subletal que produce la máxima inhibición en las curvas de concentración-respuesta y luego transferidos a peceras conteniendo agua libre de tóxico por tiempos que variaron de 96 horas a 35 días.

Se determinó la actividad de las enzimas colinesterasas (acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa) y aliesterasas cerebral a 24, 48 y 96 horas de exposición a una concentración subletal de los insecticidas estudiados y a diferentes tiempos luego de transferir los juveniles a medios libres de

plaguicida, según las técnicas indicadas en las secciones II-5.1 y II-5.2. Se realizaron estos ensayos con ejemplares de las especies *C. auratus* y *O. mykiss*.

#### **4.2.4 Inhibición y Recuperación de Esterasas en Exposiciones Reiteradas**

En los ensayos de exposiciones reiteradas con MeAz, se realizaron 3 periodos de exposición de 48 horas seguidos inmediatamente cada uno por su correspondiente período de 7 días de recuperación en medio libre de insecticida. En cada exposición a MeAz se colocó a los peces (juveniles de *O. mykiss*) en agua fresca conteniendo nueva solución de plaguicida. En cada tiempo se determinaron las actividades de esterazas de acuerdo a lo indicado en las secciones II-5.1.

#### **4.2.5 Efecto de Insecticidas sobre el Sistema Antioxidante y la Enzima Detoxificante Aliesterasa**

Se expusieron juveniles de trucha arcoiris siguiendo las condiciones detalladas en el punto 4.1 (9 peces por pecera en 18L, cada concentración al menos por duplicado) a concentraciones subletales de metil azinfos (2,5 y 5 µg/L) o carbarilo (1 y 3 mg/L) durante 24, 48, y 96 horas. Se determinó la actividad de las enzimas catalasa y glutatión-S-transferasas (GST), y el contenido de GSH endógeno en hígado y riñón de peces controles y expuestos; según se indica en las secciones II-5.5, II-5.6 y II-5.4.

Adicionalmente se midió la actividad de AliE hepática según la técnica detallada en la sección II-5.2.

#### **4.2.6 Ensayos para evaluar el Perfil de Fosforilación Proteica**

Juveniles de trucha arcoiris (8 peces por pecera, por duplicado) fueron expuestas *in vivo* a concentraciones subletales de MeAz (5 µg/L) y carbarilo (3 mg/L) durante 24 horas, siguiendo las condiciones detalladas en la sección 4.1, y posteriormente fueron procesados para realizar el protocolo de fosforilación proteica *in vitro* (sección II-6).

#### **4.2.7 Ensayos para Evaluar los Niveles de Citocromo P450 1A**

Se expusieron juveniles de trucha arcoiris para evaluar la inducción del citocromo P450 1A, durante 24 horas a concentraciones subletales de MeAz (5 µg/L), y carbarilo (3 mg/L). Las muestras de hígado obtenidas en este ensayo fueron utilizadas asimismo para evaluar los niveles de proteína Hsp 70.

#### **4.2.8 Evaluación de los Niveles de Proteínas de Estrés**

Las muestras provenientes del fraccionamiento de homogenados obtenidos de cerebro de *C. auratus* y de cerebro, músculo e hígado de *O. mykiss* provenientes de los ensayos detallados en las secciones correspondientes al punto II- 4, fueron empeladas para el análisis de proteínas Hsp 60 y 70 por la técnica de tinción con anticuerpo detallada en la sección II-8.3.

## **5- DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS Y ESPECTROFOTOMÉTRICAS**

### **5.1 Determinación de la Actividad de Acetilcolinesterasa**

La actividad enzimática de AChE se determinó de acuerdo al método de Ellman y col. (1961) con algunas modificaciones, en al menos tres peces sobrevivientes de cada una de las concentraciones testadas en los diferentes

ensayos (sección II- 4.2). Cada concentración se realizó al menos por duplicado. La actividad se analizó además en ensayos de Inhibición y recuperación (sección II- 4.2.3) y exposiciones reiteradas (sección II-4.2.4).

Los peces fueron colectados en hielo, lavados en agua helada, pesados y muertos por decapitación. Todo el cerebro se extrajo y se homogeneizó en 10 volúmenes de buffer Tris/HCl 20 mM, pH: 7,5 conteniendo 0,5 mM EDTA. Se extrajo músculo de la porción dorsal central de los juveniles y luego de pesado se homogeneizó en 10 volúmenes del mismo buffer.

La medición cinética de la actividad de AChE se realizó a temperatura ambiente en un volumen final de 1,03 mL de buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 8 conteniendo 5,5-ditio-2-bis-nitrobenzoato (DTNB), 0,75 mM acetiltiocolina iodada y 40-50 mg de proteína total de cerebro. En músculo la medición de la actividad enzimática de ChE se realizó siguiendo la técnica antes mencionada, utilizando como sustrato acetiltiocolina, y colocando en cada cubeta de medida 13-27 mg de proteínas correspondientes al sobrenadante de 3000 x g obtenido en centrífuga refrigerada a 4°C.

El delta de absorbancia se registró de manera continua durante al menos 2 minutos a una longitud de onda de 412 nm en espectrofotómetro (Shimadzu UV-visible) y fue corregido por absorbancia de la muestra e hidrólisis espontánea no enzimática del sustrato.

La actividad específica se expresa como  $\mu\text{mol}$  de acetiltiocolina hidrolizada/ (minuto) (mg proteína). Los cálculos se realizaron empleando el coeficiente de extinción molar del DTNB  $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Debido a que el sustrato utilizado fue acetiltiocolina la enzima medida en cerebro corresponde mayoritariamente a la acetilcolinesterasa (AChE) pero como no se ha utilizado inhibidores selectivos específicos se la denominará colinesterasa (ChE).

## **5.2 Determinación de Carboxilesterasas (Aliesterasas)**

La actividad de las carboxilesterasas (aliesterasas) cerebrales y hepáticas se realizó siguiendo la técnica de Caballero y col. (1991) con algunas modificaciones.

En cerebro, la actividad se midió en el homogenado entero utilizado para la medición de ChE, en buffer Tris/HCl 20 mM, pH:7,5 conteniendo 0,5 mM EDTA. En hígado se utilizó el sobrenadante de 3000 x g del homogenado al 5% peso en volumen en buffer 66 mM pH 7 con sacarosa 25 mM.

Se utilizó como sustrato p-nitrofenilbutirato 1 mM final (disuelto previamente en acetona) en un volumen final de 2,5 mL de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8,0, conteniendo 5% de acetona, y 50 mg de proteínas de sobrenadante de hígado o 40 mg de proteínas de homogenado de cerebro.

El cambio en la absorbancia a 400 nm de longitud de onda fue monitoreado espectrofotométricamente de manera continua por al menos 2 minutos. La actividad específica se expresó como  $\mu\text{moles de p-nitrofenol producidos}/(\text{minuto}) (\text{mg de proteína})$  utilizando el coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol  $18,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Los valores se corrigieron por hidrólisis espontánea no enzimática del sustrato.

## **5.3 Determinación de Proteínas Totales**

El contenido de proteínas totales en cada órgano se determinó de acuerdo al método espectrofotométrico de Lowry y col. (1951) utilizando una curva de calibración con albúmina bovina.

## **5.4 Determinación de Glutación Reducido Endógeno (GSH)**

La determinación del GSH se realizó por el método de Ellman (1959), con algunas modificaciones, como tioles no proteicos (Anguiano y col. 2001). Tort y col. (1996) utilizaron esta técnica para cuantificar el contenido de GSH en hígado de *O. mykiss* y establecieron que los niveles citosólicos de tioles no proteicos correspondían principalmente al GSH.

Las muestras de los diferentes tejidos fueron homogeneizadas en 10 volúmenes de buffer fosfato 66 mM pH 8. Las proteínas se precipitaron mezclando un volumen del homogenado de tejido con un volumen de ácido sulfosalisílico (10%) o de ácido tricloroacético (10%). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10000 x g en microcentrifuga de mesa durante 15 minutos, y se determinó en el sobrenadante el contenido de sulfhídridos no proteicos.

Se colocó de hasta 100 µl de sobrenadante en un volumen final de 1,1 mL conteniendo buffer fosfato 0,25 M, pH 8 y 5,5-ditio-2-bis-nitrobenzoato (DTNB) 1,5 mM. La absorbancia se midió luego de 15 minutos de incubación, en espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm. El contenido de GSH se cuantificó utilizando una curva de calibración de con GSH puro entre 0 y 8 nmoles. El contenido de GSH se expresó por mg de proteína total en homogenado o por g de peso fresco del órgano correspondiente.

## **5.5 Determinación de la Actividad de Catalasa**

Los órganos, hígado y riñón fueron extraídos de los peces expuestos y controles, en cada uno de los tiempos de exposición correspondientes de acuerdo al diseño de cada ensayo, pesados, y homogeneizados en 5 volúmenes de buffer fosfato de sodio 66 mM pH 7 con sacarosa 25 mM. Se trabajó luego con el sobrenadante de 3000 x g obtenido en centrífuga refrigerada a 4 ° C.

La actividad de catalasa se determinó registrando espectrofotométricamente de manera continua la disminución de la absorbancia del peróxido de hidrógeno a una longitud de onda de 240 nm (Beers y Sizer 1952).

En un volumen final de 3 mL de buffer 50 mM pH 7 conteniendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 mM se colocaron 9-11 mg de proteínas del sobrenadante de 3000 x g del homogenado de hígado o 35-50 mg de proteínas de sobrenadante de riñón en cubeta de cuarzo y se registró de manera continua, a 25 ° C, la disminución de la absorbancia a 240 nm. Los valores de caída en la absorbancia fueron corregidos por hidrólisis espontánea no enzimática del sustrato.

La actividad específica de catalasa se expresó como mmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hidrolizados/(minuto) (mg de proteína). Para los cálculos de la actividad específica se utilizó el coeficiente de absortividad molar del peróxido de hidrógeno, 40 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## **5.6 Determinación de la Actividad de Glutación-S-Transferasa (GST)**

La actividad de la enzima GST se determinó de acuerdo al método de Habig y col. (1974) con pequeñas modificaciones.

La enzima se determinó en sobrenadante de hígado y riñón homogeneizados previamente en 5 volúmenes de buffer fosfato de sodio 66 mM pH 7 con sacarosa 25 mM y centrifugados durante 15 minutos a 3000 x g a 4 ° C.

La mezcla de reacción contenía 0,5 mM de CDNB disuelto en acetonitrilo y 2,5 mM de GSH como sustratos; 9-14 mg de proteínas de sobrenadante de riñón o 14-18 mg de proteínas de sobrenadante de hígado, en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6,5 en un volumen final de 1 mL.

EL cambio en la absorbancia se registró de manera continua a 340 nM de longitud de onda y la actividad se expresó como μmoles de CDNB conjugado

por minuto por mg de proteína, utilizando el coeficiente de extinción molar para el CDNB de  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Los valores de actividad fueron corregidos por reacción química espontánea entre ambos sustratos.

## **5.7 Cuantificación de Peróxidos Lipídicos**

### **5.7.1 Preparación de los Extractos Lipídicos**

La obtención de los mismos se realizó de acuerdo a la técnica de Folch y col. (1957). El hígado fue extraído de los peces, pesado, homogeneizado en cloroformo:metanol (1:1). El homogenado fue centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue separado, colocado en tubo de vidrio con tapón esmerilado al que se le añadieron los mL de cloroformo necesarios para obtener una concentración de cloroformo:metanol 2:1. Se re-extrajo el precipitado con 2 mL de cloroformo:metanol (2:1) y se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante fue separado y combinado con el anterior, lavado con 0,2 veces el volumen con KCl al 0,88% con agitación. Una vez separadas las dos fases, la acuosa fue descartada y la interfase fue lavada dos veces con cloroformo:metanol: KCl 0,88% (3:48:47) (Fase superior teórica) sin agitación. El extracto lipídico así obtenido fue gaseado con  $\text{N}_2$  y guardado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta el momento de ser utilizado. Al momento de realizar las determinaciones el extracto fue evaporado hasta sequedad bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  y resuspendido en 0,5 mL de cloroformo:metanol (2:1). Siempre se trabajó bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  para evitar la oxidación.

### **5.7.2 Determinación de Peróxidos Lipídicos**

Se determinó la concentración de peróxidos lipídicos por el método del ácido tiobarbitúrico, en extracto lipídico. (Asakawa y Matsushita 1980).

En cada tubo de reacción se colocó, el extracto lipídico de las muestras (0,1 a 0,2 ml) en acetona y se agregaron 2 mL de ácido tiobarbitúrico 0,36% (TBA), 1 mL de ácido tricloroacético 35% (TCA), 0,1 mL sulfato férrico 100mM,

1 μmol de hidroxitolueno butilado (BHT). Luego de calentar a 100 °C durante 15 minutos y dejar enfriar se extrajo el producto de reacción con el agregado de 1 mL de ácido acético glacial y 2 mL de cloroformo. La lectura se realizó a una longitud de onda de 532 nm. Se realizó una curva de calibración con 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) de 0 a 20 nmoles como generador de MDA. Los resultados se expresaron como nmol TBARS (especies reactivas del ácido tiobarbitúrico)/mg fosfolípidos.

## **5.8 Determinación de Fosfolípidos**

La determinación de fosfolípidos se realizó por el método de Rouser y col. (1970).

Se tomaron 0,1 mL de extracto lipídico obtenido según la técnica detallada en la sección 5.7.1, se colocaron en tubo de vidrio y se evaporaron a sequedad. Luego se incorporó a cada tubo 0,65 mL de ácido perclórico 70% y se calentó a 160 °C hasta decoloración completa (30 a 40 minutos). Cuando los tubos se enfriaron completamente se agregó a cada uno 3,3 mL de agua destilada y posteriormente los reactivos: molibdato de amonio 2,5% (0,5 mL) y ácido ascórbico 10% 0,5 mL. Se calentaron las muestras 5 minutos a 100 °C desarrollándose coloración azul.

Los tubos de reacción se analizaron en espectrofotómetro a 797 nm de longitud de onda y se cuantificaron utilizando una curva de calibración de estándar de fosfato inorgánico de 0 a 4 μg. Se realizó un blanco de reactivos evaporando a sequedad 0,1 mL de cloroformo metanol 1:1 y siguiendo todos los pasos posteriores de la técnica detallados anteriormente.

## 6. FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS

La fosforilación de proteínas se realizó de acuerdo a la técnica de Rubin y col. (1982) adaptada por Randi y col. 1998, con algunas modificaciones menores.

### 6.1 Preparación de las muestras

Finalizado el ensayo (sección 4.5), los peces fueron colocados en hielo, pesados y se extrajo el cerebro e hígado completos. Luego de pesar los órganos éstos fueron homogeneizados en 10 volúmenes de buffer Hepes 25 mM pH 7,4 conteniendo sacarosa 250 mM y los inhibidores de proteasas, aprotinina (2  $\mu$ M) y PMSF (2  $\mu$ g/ml). Las muestras se colocaron inmediatamente en centrífuga refrigerada (4 °C) para obtener las fracciones de trabajo. Se centrifugó a 1000 x g 15 minutos para obtener la fracción nuclear (precipitado). El procedimiento se repitió tres veces y posteriormente el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 20000 x g 30 minutos para obtener la fracción mitocondrial (hígado) y mitocondrial/sinaptosomal (cerebro).

### 6.2 Reacción de fosforilación

La reacción de fosforilación se realizó de manera inmediata a la obtención de las fracciones subcelulares. Se utilizó como buffer de reacción Hepes 50 mM pH 7,0 conteniendo: 30 mM  $MgCl_2$ , 0,32 mM EGTA y 10mM de 2 $\beta$ -mercaptoetanol. En cada tubo de reacción se colocó en un volumen final de 100  $\mu$ l; 100 o 150  $\mu$ g de proteína de la fracción correspondiente (resuspendidas en buffer de reacción), iniciando la reacción con el agregado de ATP 2 $\mu$ M, 20  $\mu$ Ci de  $^{32}P\gamma$ ATP. Luego de 1, 5 o 10 minutos de incubación en un baño a 30 °C con agitación, la reacción se finalizó con el agregado de 50  $\mu$ L de buffer de "cracking" concentrado (buffer Tris 30 mM pH 7,8, SDS 9% p/v, 2 $\beta$ -mercaptoetanol 6% v/v, sacarosa 10% p/v, azul de bromofenol 2% p/v). Las muestras fueron calentadas posteriormente a 100 °C durante 3 minutos.

Se incluyeron también en el ensayo los inhibidores específicos de tirosina fosfatasas (ortovanadato, 200  $\mu\text{M}$ ) y de tirosina quinasas (genisteína, 2,5  $\mu\text{M}$ ) colocándolos en el medio de reacción, y preincubando durante 10 minutos antes de iniciar la reacción con  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ .

Posteriormente las muestras se guardaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta ser procesadas por electroforesis de proteínas (SDS-PAGE 10%) seguida de autorradiografía (sección II-7.1).

## **7- SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS**

### **7.1 En geles desnaturalizantes: SDS-PAGE**

La electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida SDS-PAGE se realizó según la técnica de Laemmli (1970). Se utilizó el equipo Mini Protean II de BioRad y Hoefer miniVe, Amersham Pharmacia Biotech, para geles verticales en placa.

#### **7.1.1 Composición de los geles**

Los porcentajes de acrilamida/bisacrilamida del gel de separación variaron entre 7 y 12%, y en el gel de concentración fue del 5%. La proporción de acrilamida /bisacrilamida se mantuvo constante (30 / 0,8 % p/v).

- La composición final del gel de separación fue Tris-HCl 375 mM pH 8,8 conteniendo EDTA 2 mM; SDS 0,1% p/v; y cantidad necesaria de acril/bisacrilamida (30,8 %p/v).

- La composición final del gel de concentración fue Tris-HCl 125 mM pH 6,8 conteniendo EDTA 2 mM, SDS 0,1% p/v, y cantidad necesaria de acril/bisacrilamida (30,8 %p/v).

- El buffer de electrodo utilizado fue Tris 50mM - Glicina: 0,38 M; pH 8,3; SDS: 0,1%.

### 7.1.2 Preparación de las muestras

Se mezcló 1 volumen de homogenado con 1 volumen de buffer de "cracking" (buffer de siembra):  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  pH 7,5, 2,5% p/v, SDS 5 % p/v,  $\beta$  mercapto etanol 1 % v/v, sacarosa (o glicerol) 10 % p/v, y como marcador de frente azul de bromofenol 2% p/v.

Las muestras provenientes de fosforilación *in vitro* en las que la incubación finaliza con el agregado de buffer de "cracking" concentrado, se sembraron directamente en los geles de SDS-PAGE correspondientes.

### 7.1.3 Separación Electroforética

La corrida electroforética se realizó a intensidad de corriente constante de 20 mA por gel, aproximadamente 2,0 -2,5 horas. Posteriormente se procedió al revelado detallado en secciones II- 8.1 y II- 8.3.

## 7.2 En Geles Nativos

Se realizaron electroforesis discontinuas y en condiciones no desnaturalizantes siguiendo la técnica de Davis (1964). El porcentaje de acrilamida de los geles de corrida fue del 7,5% y el de los geles de concentración del 2,5%. La proporción de acrilamida /bisacrilamida se mantuvo constante 30/0,8 % p/v para los geles de separación y 10/2,5 p/v para los geles de concentración.

- La composición final del gel de separación fue Tris-HCl 375 mM pH 8,9 conteniendo cantidad necesaria de acril/bisacril-amida (30,8 %p/v).
- La composición final del gel de concentración fue Tris-HCl 125 mM pH 6,8 conteniendo cantidad necesaria de acril/bisacril-amida (12,5 %p/v).
- El buffer de electrodo utilizado fue Tris 50mM, Glicina 0,38 M, pH 8,3.

Las corridas electroforéticas se realizaron a intensidad constante de 15 a 20 mA por gel a 4°C.

### **7.2.1 Preparación de las muestras**

Las muestras de cerebro y músculo fueron homogeneizadas en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,5 conteniendo 10% de sacarosa. Antes de la siembra se agregó el colorante y marcador de frente azul de bromofenol (1% p/v).

## **8. REVELADO DE GELES**

### **8.1 Tinción Inespecífica**

La tinción inespecífica de proteínas totales luego de la separación electroforética de las proteínas se realizó con azul brillante de Coomassie. Los geles se colocaron en la solución colorante (metanol 40% v/v, ácido acético 10% v/v, y azul brillante de Coomassie 0,1%) hasta tinción total y se decoloraron hasta la aparición de bandas nítidas en la solución decolorante (40% v/v y ácido acético 10% v/v).

### **8.2 Determinación de Actividades de Esterasas en Gel**

#### **8.2.1 Actividad de Esterasas Totales**

La actividad de esterasas totales en gel “en condiciones nativas” se determinó incubando el gel al finalizar la corrida electroforética en 100 mL de Buffer Fosfato 0,05 M, pH 6,5 conteniendo 2 mL de cada uno de los sustratos empleados:  $\alpha$ -naftil acetato 2% v/v en acetona y  $\beta$ -naftil acetato 2% v/v en acetona; y 2 mg del colorante Fast Garnet (Sigma).

Luego de la aparición de bandas nítidas se descartó la solución y se lavó el gel con agua destilada, colocándolo luego en una solución de ácido acético 7,5 N.

### **8.2.2 Actividad de Colinesterasas**

La actividad de ChE en gel “en condiciones nativas” se determinó siguiendo la técnica de Karnovsky y Roots (1964). El gel se incubó en agitación y oscuridad 30 a 60 minutos en un volumen final de 20 mL conteniendo 13 mL de Buffer acetato de sodio 0,1 M pH 5,6; el sustrato acetiltiocolina iodada 10 mg; 2 mL de citrato de sodio 0,1 M; 2 mL de sulfato de cobre 30 mM; 1 mL de agua destilada y 1 mL de ferricianuro de potasio 5 mM. La reacción se frenó descartando la solución de incubación y lavando el gel con agua destilada. Luego se lo colocó en una solución de ácido acético 7,5 N.

### **8.3 Revelado con Anticuerpos Específicos**

Previamente a realizar la tinción con un anticuerpo específico las proteínas se electro-transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa o PVDF.

#### **8.3.1 Electrotransferencia**

La transferencia del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa o PVDF se realizó siguiendo la técnica de Towbin y col. (1979). Se utilizó como buffer de transferencia Tris 20 mM pH 8,3 conteniendo glicina 150 mM y metanol 20 % v/v.

La membrana de PVDF se activó previamente 1 minuto en metanol y se enjuagó posteriormente en agua destilada durante 5 minutos. La membrana correspondiente y los papeles de filtro se colocaron en buffer de transferencia durante 20 minutos. Al término de la corrida electroforética el gel se equilibró durante 10 minutos en buffer de transferencia.

La transferencia se realizó a 100 V constantes durante 1 a 2 horas o a 60 V constantes durante toda la noche (a 4°C).

Las membranas se tiñeron de manera reversible con una solución de Rojo Ponceau (0,5% p/v en ácido acético 0,1% v/v) durante 5 a 10 minutos, destiñendo con agua destilada durante 1 a 2 minutos a fin de verificar la correcta transferencia de las proteínas. Posteriormente se destiñeron completamente con agua destilada para proceder a la tinción con anticuerpos específicos.

### **8.3.2 Tinción con Anticuerpos Específicos**

La tinción con anticuerpos específicos ("western blot") se realizó utilizando un sistema amplificado de biotina /avidina fosfatasa alcalina.

Se utilizaron como anticuerpos primarios las siguientes inmunoglobulinas G de ratón :

-Anti-Hsp 60 (monoclonal, contra la proteína Hsp 60 recombinante humana, Sigma).

-Anti-Hsp 70 (monoclonal, contra la forma inducible de Hsp70 recombinante humana, Stressgen).

-Anti Hsp/hsc 70 (monoclonal, contra las isoformas inducible y constitutiva Hsp/Hsc 70 recombinante humana, Stressgen).

-Anti-CYP1A (monoclonal, contra péptido sintético correspondiente a la secuencia de aminoácidos 277-294 del citocromo P450 1A de *O. mykiss*, Biosense Lab.).

Se empleó como anticuerpo secundario (para detectar los anticuerpos primarios) suero de cabra contra el fragmento Fab de inmunoglobulina G de ratón ("anti-mouse" IgG Sigma), conjugado con biotina. La biotina forma un complejo específico con avidina acoplada a fosfatasa alcalina (Sigma). La detección y desarrollo de color se realizó con los sustratos para la enzima fosfatasa alcalina, 5-bromo-4-cloro-indolil-fosfato (BCIP) y azul nitro-tetrazolio (NBT), generándose un producto precipitado e insoluble color púrpura.

Se utilizaron las siguientes soluciones buffer de incubación y lavado:

- Buffer TBS: Tris-HCl 50 mM pH 7, cloruro de sodio 200 mM.
- Buffer TBST: Tris-HCl 50 mM pH 7, cloruro de sodio 200 mM, detergente tween 20 0,05% v/v.
- Buffer TBS-albumina: Tris-HCl 50 mM pH 7, cloruro de sodio 200 mM, albumina bovina 3% p/v.
- Buffer Sustrato: buffer Tris 100 mM pH 9,5; NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM.

#### **8.4. Revelado por Autorradiografía**

Los geles de electroforesis proteica obtenidos al sembrar las muestras provenientes de la fosforilación *in vitro*, fueron sometidos a electrotransferencia a membranas de PVDF o fueron secados para posteriormente exponer a las placas radiográficas en oscuridad.

La exposición en oscuridad y a -20°C fue de 20 a 30 días, al termino de los cuales las placas de rayos X (CP- BU AGFA) fueron reveladas empleando revelador radiográfico para revelado manual (AGFA) y fijador radiográfico (AGFA).

Las imágenes digitales de las los “western blot” y las autorradiografías fueron analizadas por el programa Image/J (disponible en el sitio de Internet <http://rbs.info.nih.gov>).

### **9. BIODISTRIBUCIÓN DEL INSECTICIDA PARATIÓN**

#### **9.1 Exposición a paratión**

Juveniles de carpa fueron expuestos a la concentración subletal de 50 µg/L de <sup>14</sup>C-Paratión (Sigma, marca uniforme en anillo, diluido en paratión Estándar EPA, 200 Bq/µg) durante 24, 48 y 96 horas. Finalizado el tiempo de

exposición los peces fueron colocados en hielo, pesados, y se separó y pesó el hígado, cerebro, branquias, y la carcaza.

## **9.2 Extracción y cuantificación**

Se realizó la extracción del paratión en cada órgano y carcaza de los peces utilizando en cada caso 10 volúmenes de acetona. Se efectuó una re-extracción con otros 10 volúmenes de acetona y agregó más solvente para llevar las muestras a un volumen fijo. Se tomaron alícuotas entre 0,4 y 2 ml para realizar la cuantificación. Los estudios comparativos por cromatografía gaseosa indican que no se producirían metabolitos radiactivos del paratión que se co-extraigan en la fase orgánica, dentro de los ocho días de exposición en sistemas acuáticos multiespecíficos (Venturino y col. 1999).

La cuantificación del paratión se realizó por centelleo líquido en el contador Wallac WIN spectral, utilizando solución centelladora "Optifase Hisafe 3" de Perkin Ellmer.

## **10. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE INSECTICIDAS POR CROMATOGRFÍA GASEOSA**

### **10.1 Extracción**

Se realizó una extracción liquido-liquido, utilizando un litro de muestra de la solución de insecticida OF o carbamato de las peceras y tres porciones de 75, 75, y 50 mL de cloruro de metileno (US-EPA 1984). En cada paso se agitó en ampolla de decantación 2 minutos dejando reposar posteriormente al menos 10 minutos, hasta la separación completa de las fases.

Los extractos de las muestras se concentraron en evaporador rotativo, con aplicación de vacío y posteriormente en tubo cónico bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y

finalmente se resuspendieron en 1 mL de hexano antes de su inyección en el cromatógrafo gaseoso.

## **10.2 Cuantificación**

La cuantificación se realizó por cromatografía gaseosa utilizando el método de estándar externo, con un detector nitrógeno/fósforo en el caso de los OFs, y FID para el carbamato.

## **11. DECONTAMINACIÓN DEL MATERIAL UTILIZADO**

Al finalizar los ensayos se colocó hidróxido de sodio técnico en las peceras conteniendo solución de insecticidas carbamatos o fosforados durante 48 horas. Estos insecticidas se hidrolizan completamente en medio alcalino en menos de 24 horas. Posteriormente se descartó la solución y se decontaminaron las peceras 24 horas más con detergente para material de laboratorio (Extran alcalino, Merck). A continuación se lavaron con el mismo detergente. Finalmente se realizó un enjuague con acetona pura calidad analítica y posteriormente nuevamente con abundante agua. Se realizaron controles de contaminación remanente analizando por cromatografía gaseosa muestras del agua de las peceras. Las mismas no se reutilizaron hasta tanto no estuvieran libres de todo residuo (nivel de detección inferior al límite de detección del método).

Todo el material de vidrio y descartable utilizado se decontaminó sumergiendo en solución de hidróxido de sodio 2N durante 24 horas. Luego se enjuagó y se colocó en sonicador durante 40 minutos, en solución de Extran alcalino.

Los restos biológicos no utilizados en los ensayos fueron colocados en un recipiente conteniendo hidróxido de sodio 2N antes de proceder a su descarte.

Con el material utilizado con  $^{32}\text{P}$  se procedió de acuerdo a las normativas vigentes de la Autoridad Regulatoria Nacional. Todo el material fue aislado convenientemente y transcurrido el tiempo necesario para el decaimiento de la actividad fue descartado de la manera habitual.

## **12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Las concentraciones letales cincuenta, noventa y diez ( $\text{CL}_{50}$ ,  $\text{CL}_{90}$  y  $\text{CL}_{10}$ ) y sus correspondientes intervalos del 95% de confianza fueron calculadas por análisis probit (Finney 1971).

Las concentraciones de efecto no observable para mortalidad (NOEC) fueron calculadas por análisis de la varianza y test a posteriori de la mínima diferencia significativa (ANOVA-LSD), como la máxima concentración que no presentó diferencias significativas con el control. Los valores de efecto esperado a dichas concentraciones fueron estimados de la regresión probit de acuerdo a lo propuesto por Crane y Newman (2000).

Los resultados obtenidos de las cuantificaciones de actividad enzimática y otras medidas espectrofotométricas se analizaron por análisis de varianza (ANOVA-LSD). En los ensayos de inhibición y recuperación de la actividad enzimática de ChE, los datos fueron analizados por ANOVA FACTORIAL considerando como variables independientes tiempo de exposición y tratamiento (control y expuestos al insecticida correspondiente), evaluándose la interacción entre variables.

En todos los casos en los que se aplicó ANOVA, la normalidad de los datos se evaluó por el test de Lilliford y mediante el grafico de probabilidad logarítmica. La homoscedasticidad se evaluó por el test de Levene.

La concentración inhibitoria cincuenta considerando como efecto la ChE cerebral o muscular, se calculó por regresión no lineal, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Remanente} = \frac{\text{Actividad Control}}{1 + \left( \frac{[\text{Ins}]}{\text{CI}_{50}} \right)^n}$$

Donde, [Ins]: es la concentración del insecticida y  $\text{CI}_{50}$ : es la concentración inhibitoria cincuenta.

La comparación entre los valores obtenidos de  $\text{CI}_{50}$  para cerebro y músculo de *O. mykiss* se realizó mediante una prueba de hipótesis utilizando el test de "Student".

## III. RESULTADOS

### 1. TOXICIDAD AGUDA

Los valores de  $CL_{50}$  a 96 horas de exposición de los insecticidas ensayados en *Carassius auratus* y *Oncorhynchus mykiss* se presentan en las tablas 5 y 6. Al comparar las correspondientes  $CL_{50}$  obtenidas tanto con carasius como con trucha arcoiris, se observa para ambas especies una mayor susceptibilidad a los OFs ensayados que a carbarilo. Sin embargo, los juveniles de trucha arcoiris resultaron 771 veces más susceptibles a metil azinfos que a carbarilo, mientras que los carasius resultaron sólo 2 veces más susceptibles a los OFs que al carbamato (Tablas 5 y 6). Se observó también que la respuesta a los tóxicos presenta diferencias sustantivas entre especies. Los juveniles de *O. mykiss* fueron 1000 veces más susceptibles que los juveniles de *C. auratus* a metil azinfos, mientras que la susceptibilidad de *O. mykiss* al carbarilo fue 2,6 veces mayor que la de carasius.

Las curvas probit de concentración respuesta obtenidas en todos los casos presentan una elevada pendiente evidenciando una respuesta muy homogénea a los tóxicos. Esto se evidencia en el estrecho rango de concentraciones contenido entre los valores de  $CL_{10}$  y  $CL_{90}$  (Tablas 5 y 6).

Se determinaron además los valores de NOEC como la mayor concentración que no presentan efectos significativos por ANOVA respecto de los controles, considerando mortalidad como punto final del ensayo. Los datos se presentan en las tablas 5 y 6. De acuerdo al análisis probit los valores de NOEC en todos los casos tendrían una probabilidad de mortalidad menor o igual al 1%, excepto para carbarilo en *C. auratus* que fue del 2%.

En los juveniles de ambas especies se observaron signos visibles de intoxicación a concentraciones en las cuales se produjo mortalidad. En

presencia de los OFs (3 mg/L de MeAz y 5 mg/L de Ptn para *C. auratus* y 0,004 mg/L de MeAz para *O. mykiss*) se evidenciaron pérdidas del equilibrio, alteraciones en la natación de los peces, hiper-reactividad frente a estímulos e inmovilidad por contracción muscular junto con hiperventilación de branquias antes de la muerte. En algunos peces luego de la exposición a MeAz, se observaron derrames vasculares en la zona ocular y opercular. En presencia del carbarilo se observó una disminución en la movilidad general del pez, pérdida del equilibrio y contracción generalizada del cuerpo.

**Tabla 5: Toxicidad aguda del paratión, metil azinfos y carbarilo sobre juveniles de *Carassius auratus***

Plaguicidas	Mortalidad			
	CL <sub>50</sub> <sup>a, b</sup> (95% IC)	CL <sub>90</sub> <sup>a, b</sup> (95% IC)	CL <sub>10</sub> <sup>a, b</sup> (95% IC)	NOEC <sup>b, c</sup>
<b>Paratión</b>	6,5 (5,6 - 7,1)	7,7 (6,9 - 12,6)	5,2 (3,1 - 5,8)	2,5 (<LC1, n.e.)
<b>Metil Azinfos</b>	7,2 (6,4 - 8,2)	9,2 (8,1 - 13,6)	5,6 (3,9 - 6,4)	3,0 (<LC1, n.e.)
<b>Carbarilo</b>	13,9 (12,1 - 15,9)	18,0 (15,8 - 29,7)	10,6 (6,4 - 12,2)	9,0 (LC2, 4,1-10,9)

a: Calculado por análisis probit.

b: Concentraciones nominales en mg/L, los valores medidos por CG difieren menos de un 10% en todos los casos.

c: NOEC determinado por ANOVA. Valores esperados de efecto y limites de confianza determinados por análisis probit. n.e = IC no estimable por la regresión.

**Tabla 6: Toxicidad aguda del metil azinfos y carbarilo sobre juveniles de *Oncorhynchus mykiss***

Plaguicidas	Mortalidad			
	CL <sub>50</sub> <sup>a,b</sup> (95% IC)	CL <sub>90</sub> <sup>a,b</sup> (95% IC)	CL <sub>10</sub> <sup>a,b</sup> (95% IC)	NOEC <sup>b,c</sup>
<b>Metil Azinfos</b>	0,007 (0,004 - 0,009)	0,012 (0,010 - 0,026)	0,004 (0,001 - 0,006)	0,003 (LC1, 0,000 - 0,0004)
<b>Carbarilo</b>	5,40 (4,27 - 6,18)	8,12 (6,90 - 13,70)	3,60 (1,65 - 4,46)	2,6 (LC1, 0,90-3,79)

a: Calculado por análisis probit.

b: Concentraciones nominales en mg/L, los valores medidos por CG difieren menos de un 10% en todos los casos.

c: NOEC determinado por ANOVA. Valores esperados de efecto y límites de confianza determinados por análisis probit.

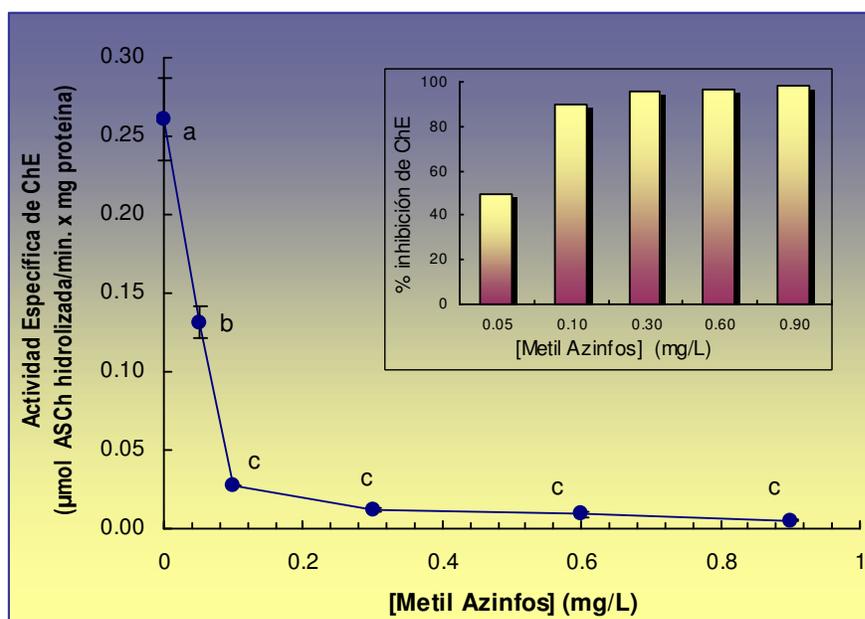
## 2. BLANCOS PRIMARIOS DE ACCIÓN

### 2.1 Inhibición de la Actividad de Esterasas

#### 2.1.1 ChE cerebral de *C. auratus*

La actividad de ChE cerebral de *C. auratus* disminuyó de manera pronunciada y en forma dependiente de la concentración luego de 96 horas de exposición a concentraciones subletales de MeAz (Figura 17). La concentración subletal de 0,05 mg/L (144 veces menor que la CL<sub>50</sub>) produjo una inhibición del 50% de la actividad control de la enzima (concentración inhibitoria cincuenta CI<sub>50</sub> 0,05 ± 0,002 mg/L), y por encima de 0,1 mg/L del insecticida se alcanzó una inhibición de ChE del 90-95%, sin observarse mortalidad ni signos externos evidentes de intoxicación. Todas las concentraciones ensayadas provocaron una inhibición altamente significativa con respecto al control.

De manera similar a lo ocurrido en presencia de MeAz, la actividad de ChE cerebral de *C. auratus* presentó una inhibición dependiente de la concentración luego de 96 horas de exposición a concentraciones subletales de Ptn (Figura 18). La concentración subletal de 0,05 mg/L de Ptn (130 veces menor que la CL<sub>50</sub>) provocó una disminución de la actividad enzimática del 86% y superando los 0,1 mg/L se obtuvo más del 90% de inhibición enzimática. Al igual que con MeAz esta pronunciada inhibición no provocó mortalidad en los peces ensayados, así como tampoco las alteraciones en el comportamiento observadas al ensayarse concentraciones letales. El valor de CI<sub>50</sub> obtenido fue << 0,05 mg/L.



**Figura 17:** Actividad Específica de ChE cerebral de *C. auratus* en función de la concentración de MeAz, luego de 96 horas de exposición. Los valores de dos experimentos (media  $\pm$  ES de cuadruplicados) con distinta letra difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ) por ANOVA-LSD. Inserto: Porcentaje de inhibición de ChE respecto al control.

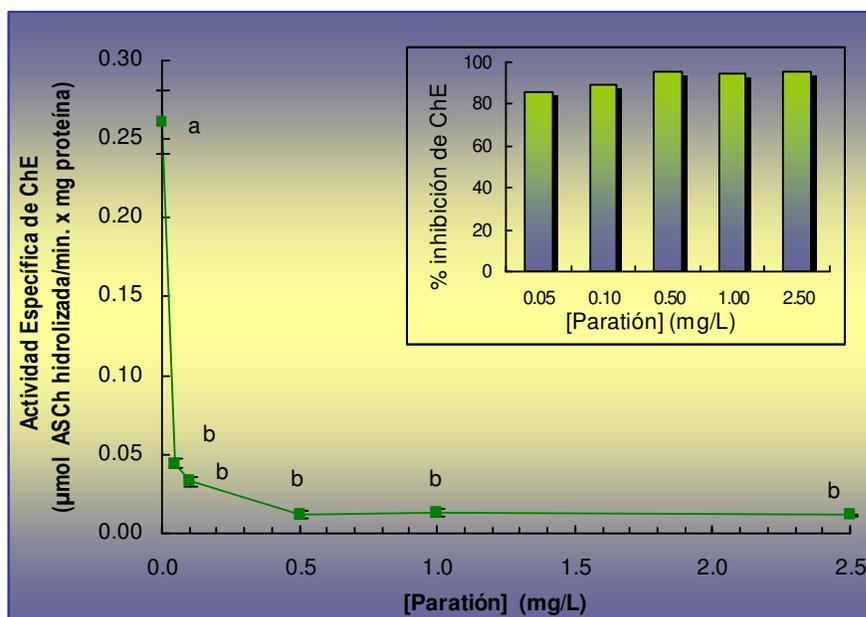


Figura 18: Actividad Específica de ChE cerebral de *Carassius auratus* en función de la concentración de paratión luego de 96 horas de exposición. Los valores de dos experimentos (media  $\pm$  ES de cuadruplicados) con distinta letra difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ). Inserto: Porcentaje de inhibición de ChE respecto al control.

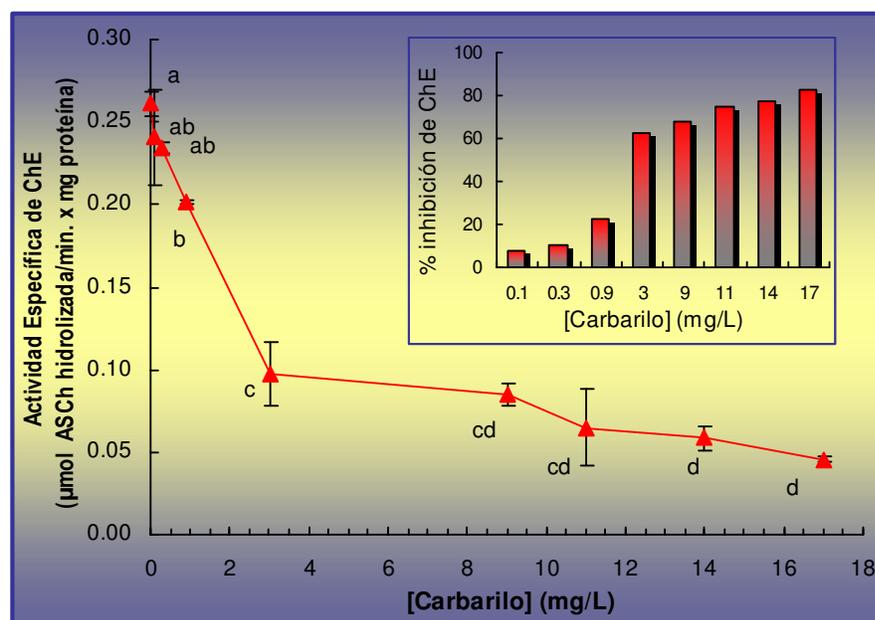


Figura 19: Actividad Específica de ChE cerebral de *Carassius auratus* en función de la concentración de carbarilo luego de 96 horas de exposición. Los valores de dos experimentos (media  $\pm$  ES de cuadruplicados) con distinta letra difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ). Inserto: Porcentaje de inhibición de ChE respecto al control.

El carbarilo resultó un inhibidor menos potente de la enzima cerebral de *C. auratus* a concentraciones subletales comparado con los dos insecticidas OFs ensayados. El valor de  $CI_{50}$  obtenido es más de 50 veces mayor que el correspondiente a MeAz y Ptn ( $2,62 \pm 0,580$  mg/L). La menor concentración que produjo una inhibición significativa (23%) fue de 0,9 mg/L. A concentraciones mayores, que resultaron letales, se alcanzó una inhibición máxima del 86%. El perfil del gráfico incluido en el inserto mostró un aumento gradual de la inhibición en función de la concentración del insecticida (Figura 19).

### **2.1.2 ChE cerebral y muscular de *O. mykiss***

La actividad de ChE cerebral de *O. mykiss* expuestos 96 horas a MeAz disminuyó abruptamente en forma dependiente de la concentración, de manera semejante a lo observado con *C. auratus*, aunque las concentraciones efectivas fueron de 2 a 3 órdenes de magnitud menores (Figura 20), así como también el valor de  $CI_{50}$  obtenido (Tabla 7). La menor concentración ensayada (0,1  $\mu$ g/L) no presentó una inhibición significativa. En todas las demás concentraciones ensayadas el valor de ChE cerebral presentó diferencias significativas con el valor control. Con 0,5  $\mu$ g/L se alcanzó el 52% de inhibición y con concentraciones mayores de 3  $\mu$ g/L y 10  $\mu$ g/L se obtuvo una inhibición casi completa de la enzima, del 90% y 94% respectivamente (Figura 20). Sin embargo hay que destacar que la concentración de 3  $\mu$ g/L no produjo mortalidad alguna de los juveniles de *O. mykiss* a pesar de la alta inhibición de ChE cerebral observada. Esta situación se asemeja a la encontrada en *C. auratus* expuestos a concentraciones subletales de los OFs.

La ChE muscular resultó inhibida por el MeAz en forma dependiente de la concentración. Sin embargo, fueron necesarias concentraciones mayores (2 a 3 veces) del insecticida para provocar una inhibición similar a la obtenida con enzima cerebral (Tabla 7, Figuras 20 y 21). Efectivamente, la inhibición de la enzima muscular resultó significativa solo a partir de 3  $\mu$ g/L, en parte debido a

la dispersión de los valores controles y también a la escasa inhibición alcanzada con las concentraciones menores (0,1 a 1 µg/L). Con una concentración de 10 µg/L (1,4 veces mayor que la  $CL_{50}$ ) se alcanza una inhibición casi total de la enzima (96%). El valor de  $CI_{50}$  de la enzima ChE fue 2 veces menor para la enzima cerebral que para la correspondiente de músculo (Tabla 7).

Luego de la exposición a carbarilo, se observó también una disminución de la actividad de ChE cerebral de *O. mykiss* pronunciada y dependiente de la concentración. La menor concentración ensayada correspondiente a 0,005 mg/L causó una inhibición enzimática significativa del 37%. A partir de la siguiente concentración ensayada (0,010 mg/L) la caída de la actividad específica de ChE resultó altamente significativa con respecto al control, alcanzando un 94% con las concentraciones mayores (5,9 a 6,78 mg/L) (Figura 22).

Coincidentemente a lo observado para el MeAz, la ChE de músculo presentó una inhibición dependiente de la concentración de carbarilo, pero en menor proporción que la observada en cerebro. Esta diferencia de inhibición de la enzima cerebral y muscular se observa en los valores de  $CI_{50}$  obtenidos en cada caso. Puede observarse además que las diferencias en las  $CI_{50}$  sobre la ChE cerebral y muscular fueron más notorias para carbarilo (14x) que para MeAz (2,5x) (Tabla 7). La disminución de la actividad luego de la exposición a 0,005 mg/L no fue significativa. Luego de la exposición a 0,05 mg/L la inhibición resultó estadísticamente significativa (27%) y a partir de la concentración de 5,9 mg/L la inhibición fue prácticamente total (92%) (Figura 23).

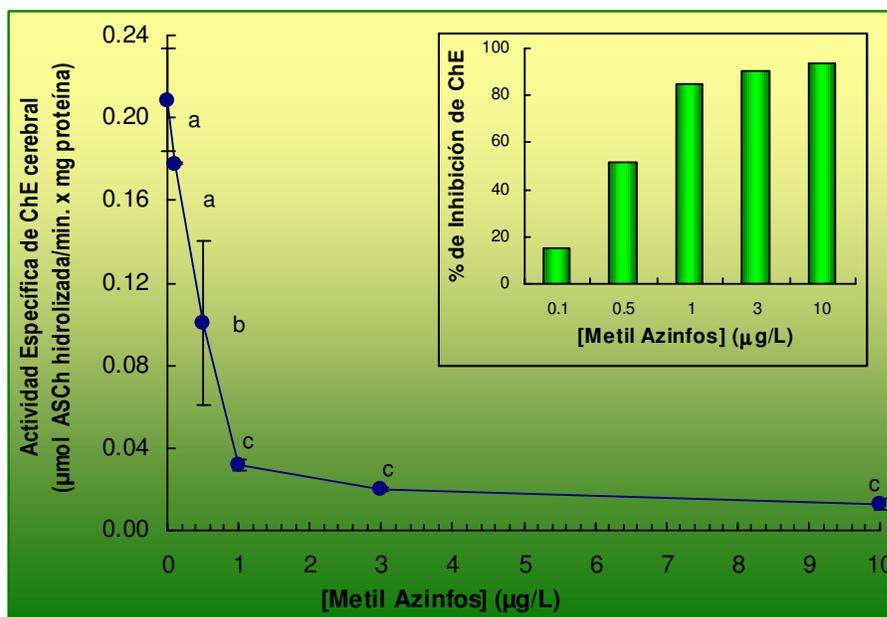


Figura 20: Actividad Específica de ChE cerebral de *O. mykiss* en función de la concentración de MeAz luego de 96 horas de exposición. Los valores (media  $\pm$  ES de triplicados) con distinta letra difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ). Inserto: Porcentaje de inhibición de ChE respecto al control.

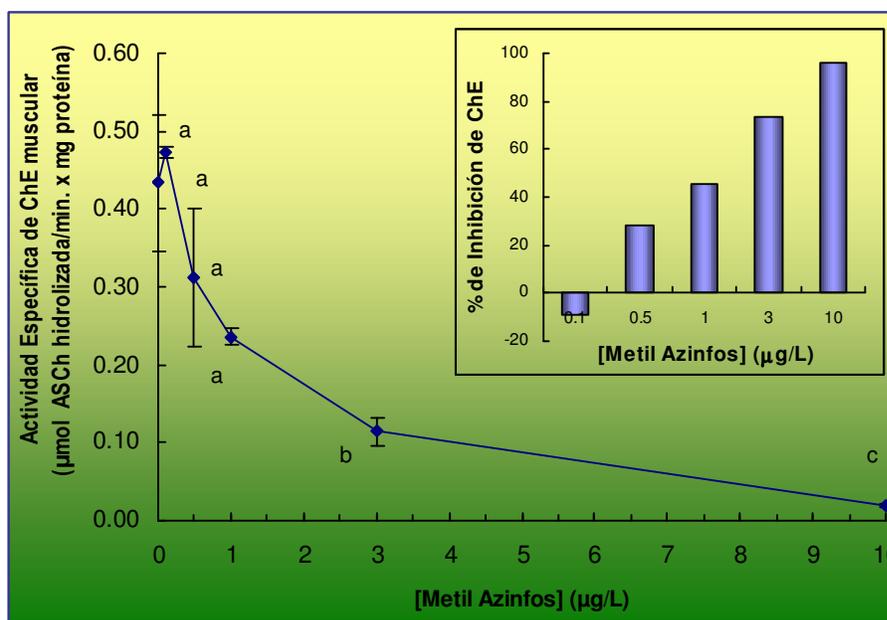


Figura 21: Actividad Específica de ChE muscular de *O. mykiss* en función de la concentración de MeAz luego de 96 horas de exposición. Los valores (media  $\pm$  ES de triplicados) con distinta letra difieren significativamente por ANOVA-LSD ( $p \leq 0,05$ ). Inserto: Porcentaje de inhibición de ChE respecto al control.

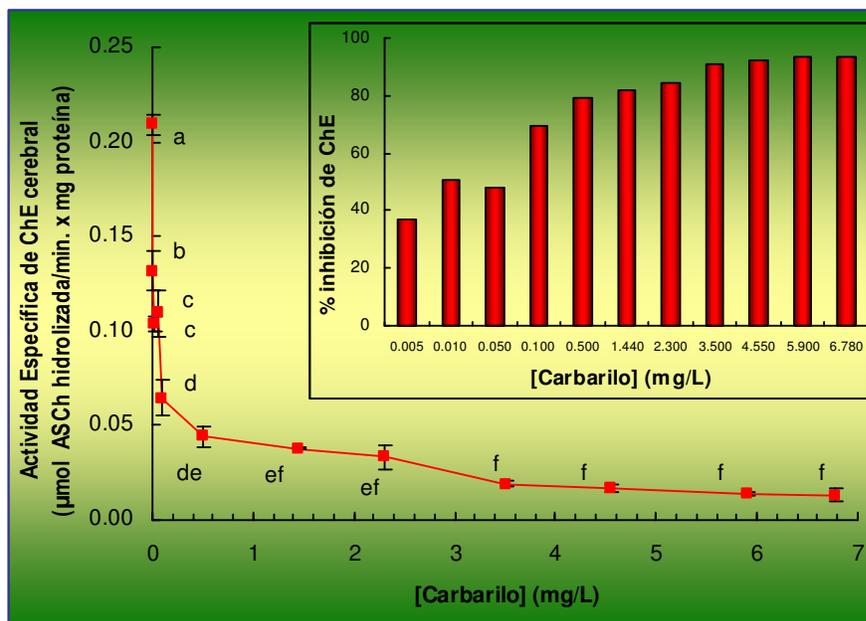


Figura 22: Actividad Específica de ChE cerebral de *O. mykiss* en función de la concentración de carbarilo (96 h-exposición).. Los valores de dos experimentos (media  $\pm$  ES de triplicados) con distinta letra difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ) por ANOVA-LSD. Inserto: Porcentaje de inhibición de ChE respecto al control.

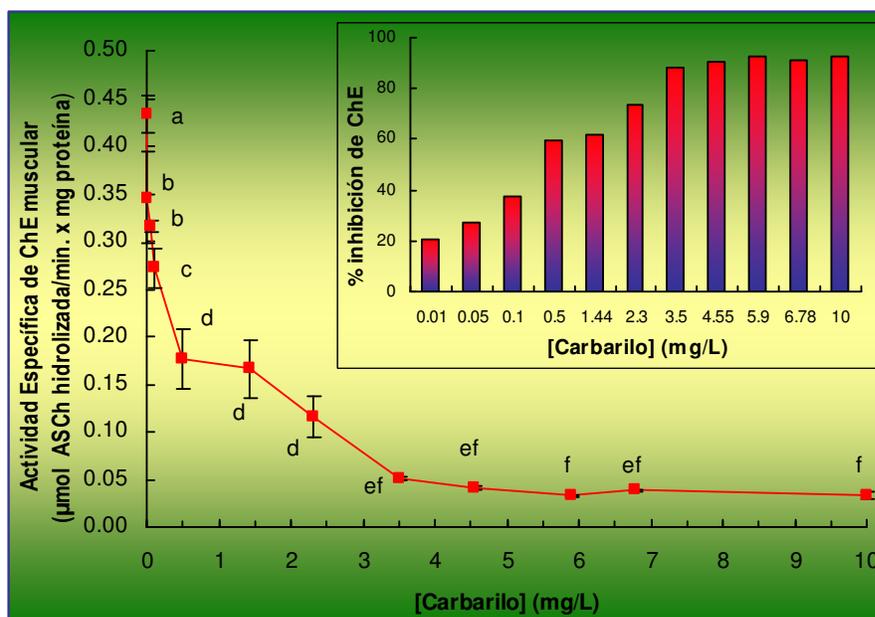


Figura 23: Actividad Específica de ChE muscular de *O. mykiss* en función de la concentración de carbarilo (96 h-exposición).. Los valores (media  $\pm$  ES de triplicados) con distinta letra difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ) por ANOVA-LSD. Inserto: Porcentaje de inhibición de ChE respecto al control.

**Tabla 7: Concentración Inhibitoria Cincuenta (CI<sub>50</sub>) para ChE de *Oncorhynchus mykiss***

Insecticidas	CI <sub>50</sub> (µg/L) <sup>a</sup>	
	ChE cerebral	ChE muscular
Metil Azinfos	0,42 ± 0,11	1,05 ± 0,23*
Carbarilo	19,24 ± 4,49	270 ± 62,23*

a: Calculada por regresión no lineal. Valores ajustados a partir de datos de las figuras 21, 22, 23 y 24.

\*Denota diferencias significativas con el valor de CI<sub>50</sub> correspondiente a cerebro, calculadas por prueba t, p < 0,01.

## 2.2 Aliesterasa hepática de *O. mykiss*

Se determinó la actividad de AliE hepática en experimentos realizados a fin de evaluar su capacidad detoxificante en *O. mykiss*. La enzima resultó significativamente inhibida a concentraciones subletales de MeAz y de carbarilo. Concentraciones de 2,5 y 5 µg/L de MeAz causaron una inhibición de la actividad enzimática en forma dependiente de la concentración y del tiempo siendo de 19% y 38 % a las 24 horas y alcanzando una disminución del 47% y 55% respectivamente a las 96 horas (Figura 24).

Del mismo modo a lo ocurrido en la exposición a MeAz, la actividad de AliE hepática mostró una inhibición significativa luego de la exposición a 1 y 3 mg/L de carbarilo que varió entre un 60% a las 24 horas hasta un 70% de inhibición al finalizar el ensayo (Figura 25). Al analizar el comportamiento en función del tiempo se destaca una mayor rapidez en la cinética de inhibición de la enzima en presencia de carbarilo, comparado a lo ocurrido en la exposición a MeAz, sin observarse diferencias significativas entre las 24 y 96 horas de exposición. Las concentraciones de este último insecticida ensayadas fueron 3 órdenes de magnitud mayores que las ensayadas con MeAz.

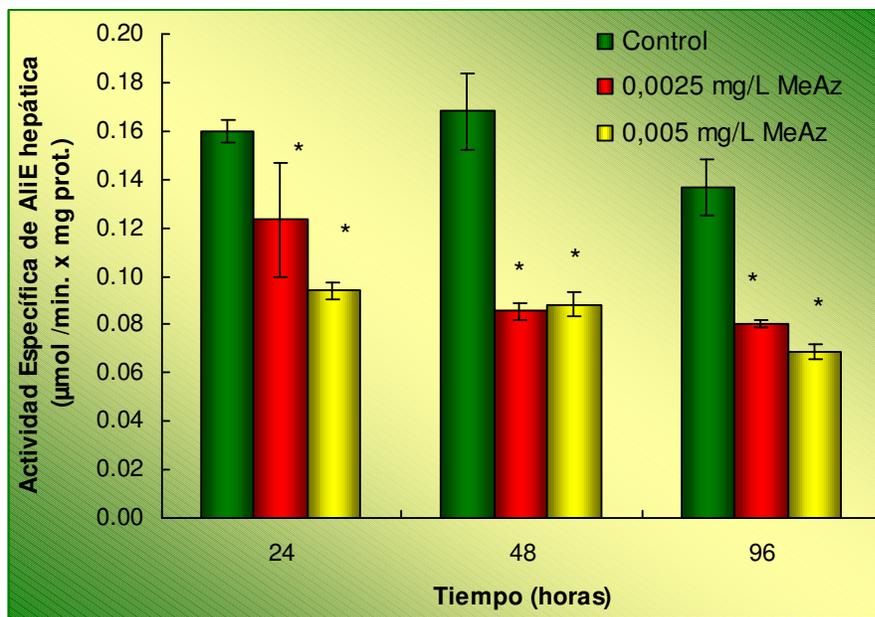


Figura 24: Actividad específica de AliE hepática de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz. (Los valores corresponden a la media  $\pm$  ES de triplicados. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,01$  por ANOVA-LSD).

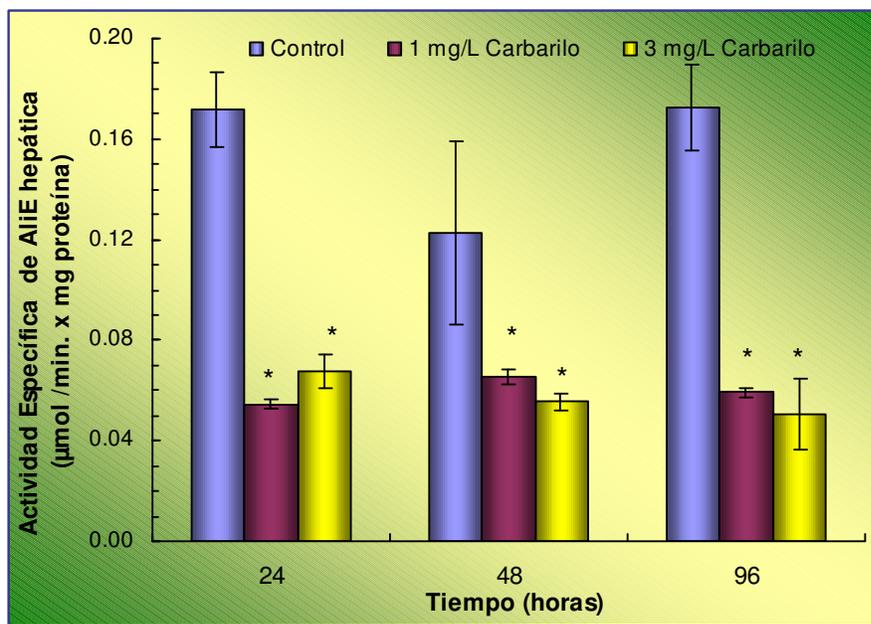


Figura 25: Actividad específica de AliE hepática de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de carbarilo. (Los valores corresponden a la media  $\pm$  ES de triplicados. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,01$  por ANOVA-LSD).

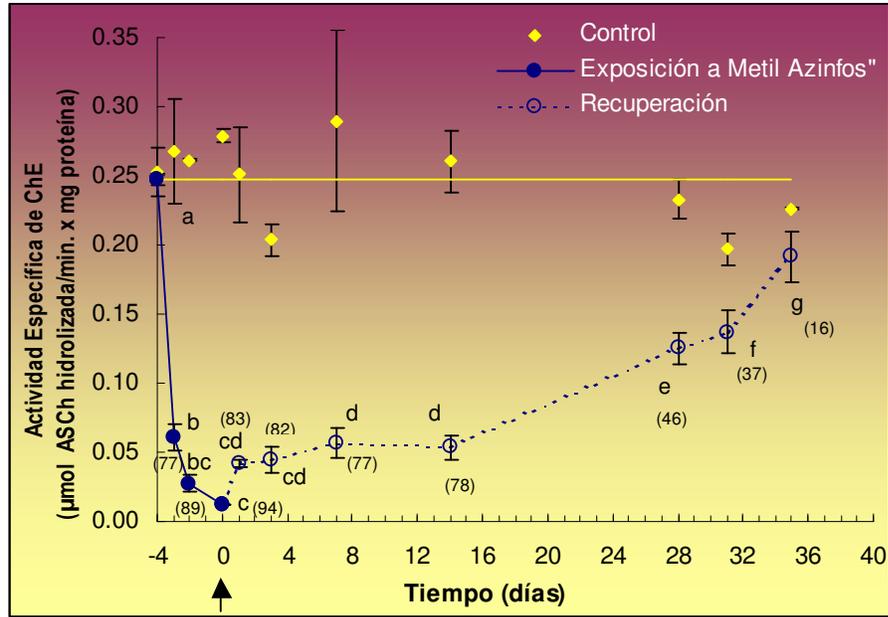
## 2.3 Inhibición y Recuperación de la Actividad de Esterasas

### 2.3.1 Juveniles de *C. auratus*

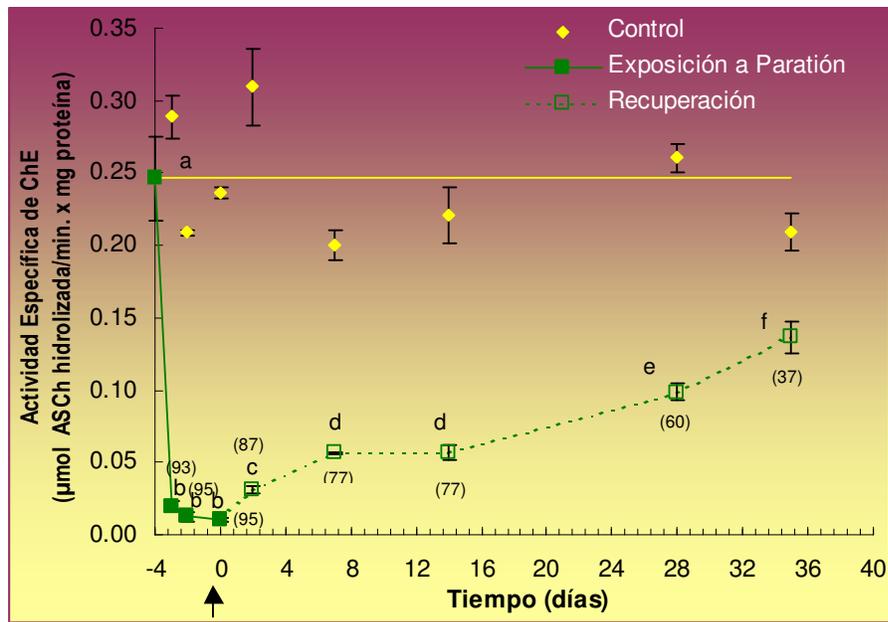
Los perfiles de inhibición y recuperación de la actividad enzimática de ChE se evaluaron determinando la actividad de la enzima a 24, 48 y 96 horas de exposición a una concentración subletal de los insecticidas estudiados y a diferentes tiempos luego de transferir los juveniles a medios libres de plaguicida. La concentración utilizada en cada caso correspondió a la mínima concentración subletal que produjo la máxima inhibición de ChE en las curvas de concentración-respuesta. También se midió la actividad de butirilcolinesterasa (BChE), siendo la proporción de la misma en cerebro de *C. auratus* despreciable con respecto a la ChE total. Se determinó asimismo el perfil de inhibición y recuperación de la actividad enzimática de AliE cerebral.

La inhibición alcanzada en la ChE cerebral de juveniles de *C. auratus* luego de 24 horas de exposición a 0,1 mg/L MeAz resultó del 77%, estadísticamente diferente a la obtenida al finalizar el período de 96 horas de exposición (94%). Durante el período de recuperación, la actividad de la enzima se incrementó en las primeras 72 horas un 5%, aumento leve que sin embargo resultó estadísticamente significativo. Un incremento mayor de la actividad de la enzima pudo observarse a largo plazo, luego de 35 días de exposición, alcanzándose un 84% de la actividad control. Si bien la recuperación no fue total, no se encontraron diferencias significativas con el valor control en ese punto (Figura 26).

El perfil de inhibición y recuperación de la ChE cerebral de *C. auratus* expuestos a 0,1 mg/L de paratión fue similar al obtenido con MeAz. La inhibición de la enzima varió desde un 93% a las 24 horas hasta un 95% a las 96 horas. Los valores de actividad obtenidos en función del tiempo de exposición no resultaron estadísticamente diferentes entre sí (Figura 27).



**Figura 26: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE cerebral de *C. auratus* expuestos a 0,1 mg/L de MeAz.** El tiempo cero (0) indica la finalización de los 4 días de exposición y el inicio del período de recuperación. Los valores (media  $\pm$  ES de cuadruplicados de tratamiento) con distinta letra difieren significativamente entre sí ( $p \leq 0,05$ ) por ANOVA-LSD. ( ) Porcentaje de Inhibición.



**Figura 27: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE cerebral de *C. auratus* expuestos a 0,1 mg/L de paratión.** El tiempo cero (0) indica la finalización de los 4 días de exposición y el inicio del período de recuperación. Los valores (media  $\pm$  ES de cuadruplicados de tratamiento) con igual letra no difieren significativamente entre ( $p \leq 0,05$ ) por ANOVA-LSD. ( ) Porcentaje de Inhibición.

En el período de recuperación, la actividad de ChE remanente presentó un leve incremento luego de 48 horas, siendo el valor alcanzado significativamente diferente del correspondiente a las 96 horas de exposición. La recuperación resultó altamente significativa a partir de los 7 días de haber sido transferidos los juveniles al medio libre de insecticida. Sin embargo al finalizar el período de recuperación ensayado (35 días) sólo se alcanzó un 63% del valor de actividad control. Todos los valores de actividad durante la exposición y recuperación resultaron diferentes de los valores controles en forma altamente significativa (Figura 27).

El perfil obtenido luego de la exposición a 3 mg/L de carbarilo resultó sustancialmente diferente de los obtenidos con ambos OFs ensayados. La inhibición enzimática se mantuvo en un 71% al 68% luego de 24 a 96 horas de exposición. La recuperación de la actividad fue más rápida, y se alcanzó el 60% del valor control luego de 8 horas desde la transferencia de los peces a medio libre de insecticida. El aumento posterior fue más gradual llegando la actividad remanente al 75% del valor control luego de 96 horas de recuperación (Figura 28).

El perfil temporal de inhibición y recuperación de ChE muscular de *C. auratus* expuestos a 3 mg/L de carbarilo resulta similar al cerebral. Luego de una inhibición del 83% alcanzado a las 96 horas de exposición, se produjo un incremento inicial de la actividad arribando al valor control luego de 96 horas de recuperación (Figura 29).

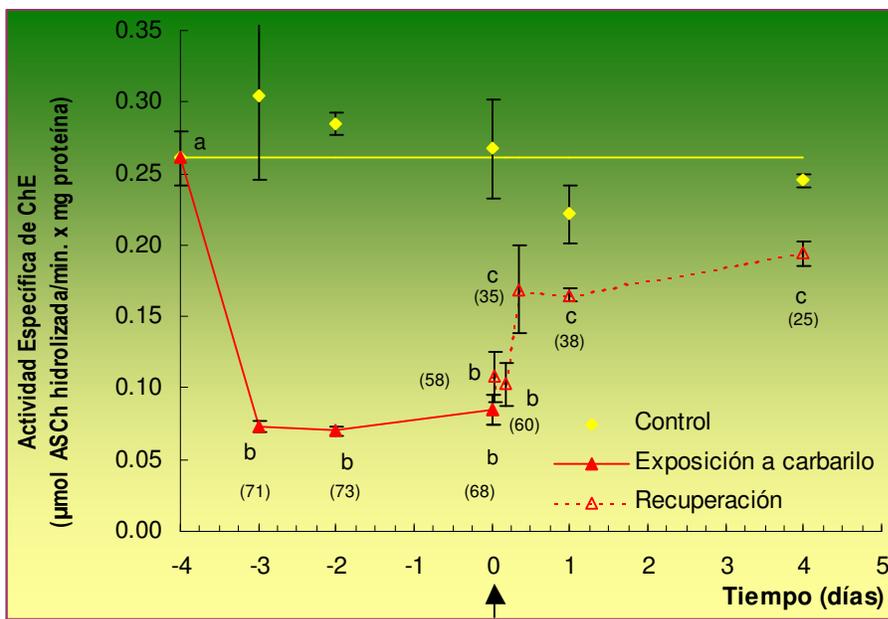


Figura 28: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE cerebral de *C. auratus* expuestos a 3 mg/L de carbarilo. El tiempo cero (0) indica la finalización de los 4 días de exposición y el inicio del período de recuperación. Los valores (media  $\pm$  ES de cuadruplicados de tratamiento) con igual letra no difieren significativamente entre sí al nivel de  $p \leq 0,05$  por ANOVA-LSD. ( ) Porcentaje de Inhibición.

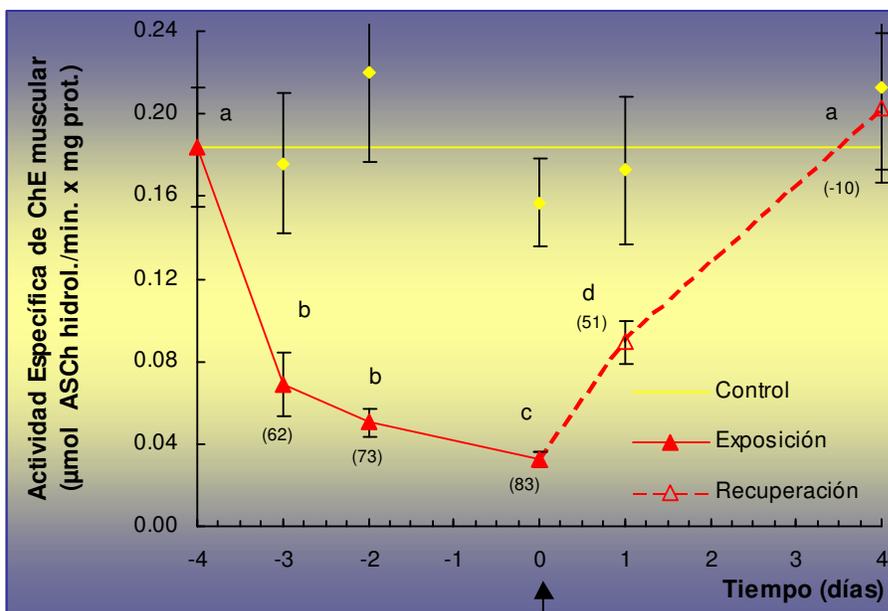


Figura 29: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE muscular de *C. auratus* expuestos a 3 mg/L de carbarilo. El tiempo cero (0) indica la finalización de los 4 días de exposición y el inicio del período de recuperación. Los valores (media  $\pm$  ES de cuadruplicados de tratamiento) con igual letra no difieren significativamente entre sí al nivel de  $p \leq 0,05$  por ANOVA-LSD. ( ) Porcentaje de Inhibición.

### 2.3.2 Juveniles de *O. mykiss*

Los juveniles de *O. mykiss* expuestos a la concentración subletal de  $1\mu\text{g/L}$  de MeAz durante 24 horas, presentaron una inhibición del 58% de su ChE cerebral. Posteriormente, a las 96 horas la actividad alcanzó una inhibición mayor del 70% con respecto al control que sin embargo no resultó significativamente diferente del valor obtenido luego de 24 horas de exposición (Figura 30).

De manera similar a lo ocurrido con *carasius*, la recuperación de la actividad de ChE fue lenta, percibiéndose un leve aumento significativo de la actividad remanente luego del primer día y observándose aún una inhibición significativa del 38% luego de 21 días de recuperación (Figura 30).

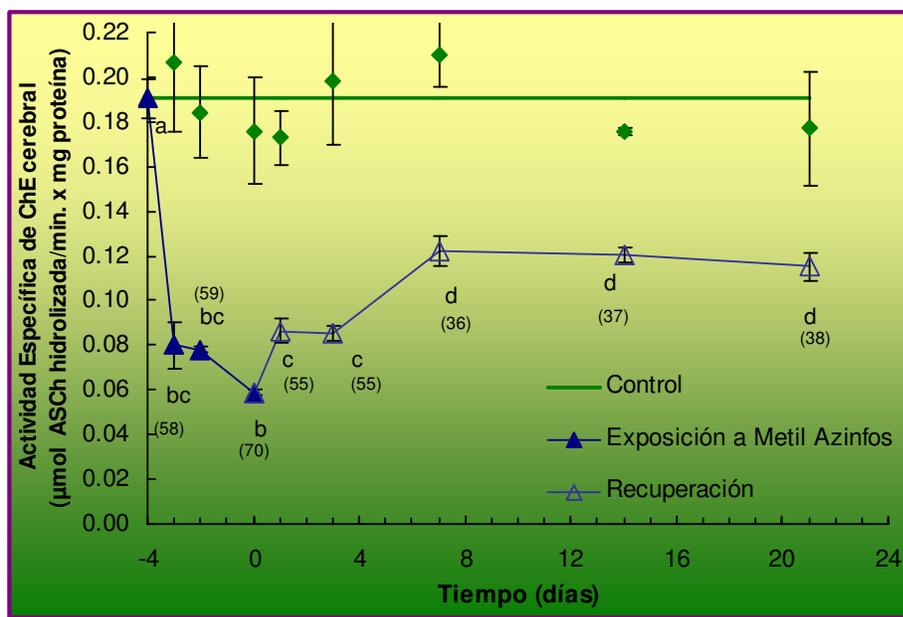
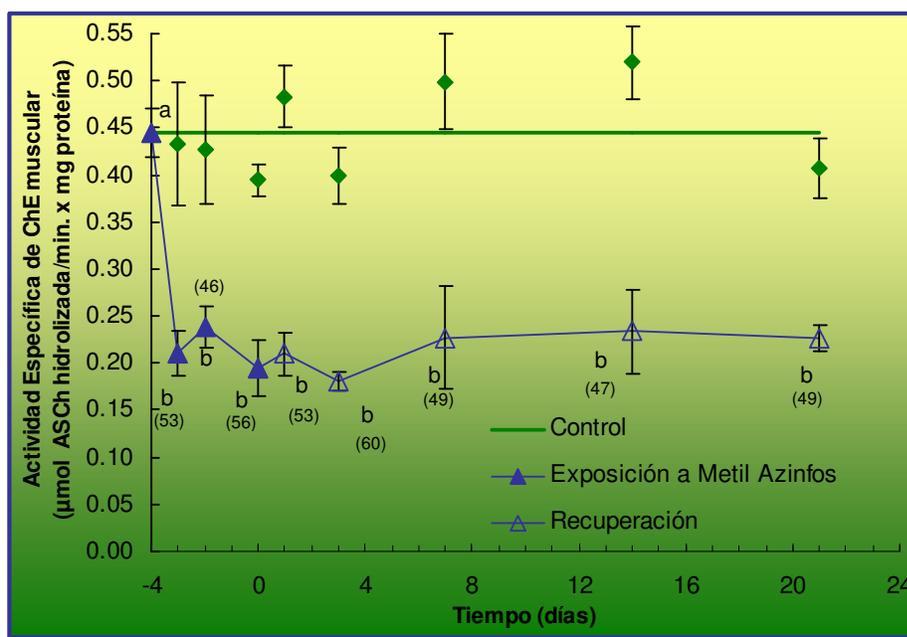


Figura 30: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE cerebral de *O. mykiss* expuestos a  $1\mu\text{g/L}$  de MeAz. El tiempo cero (0) indica la finalización de los 4 días de exposición y el inicio del período de recuperación. Los valores (media  $\pm$  ES de cuadruplicados de tratamiento) con igual letra no difieren significativamente entre sí al nivel de  $p \leq 0,05$  por ANOVA-LSD. ( ) Porcentaje de Inhibición.

El perfil de inhibición y recuperación de ChE muscular obtenido luego de la exposición a la misma concentración subletal de MeAz ( $1 \mu\text{g/L}$ ) presentó diferencias con el perfil cerebral anteriormente descrito. Durante el período de exposición, la inhibición obtenida fue menor que la de ChE cerebral. A las 24 horas de exposición dicha inhibición resultó del 51% alcanzando el valor de 55% a las 96 horas (Figura 31).

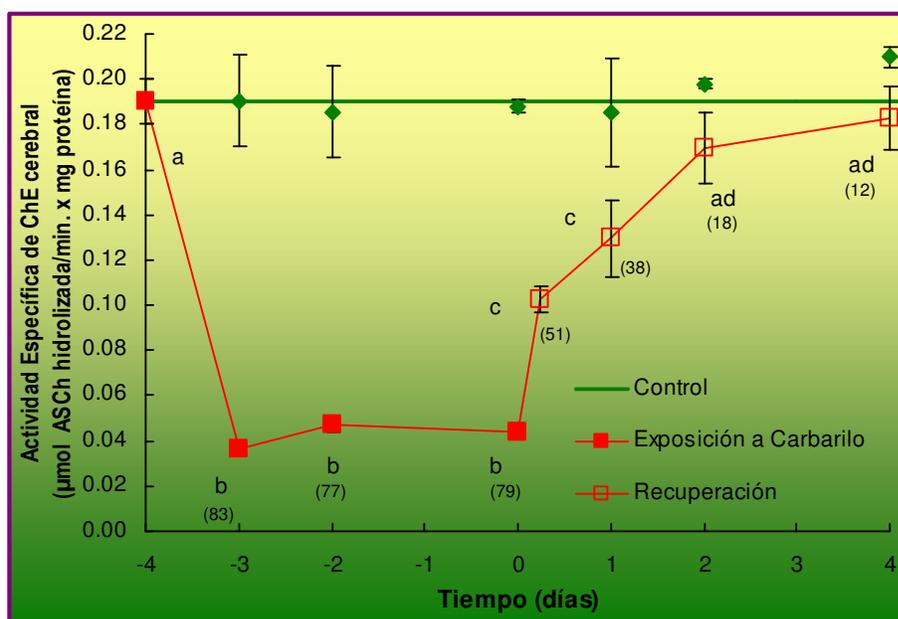
Luego de transferidos los juveniles a medio libre de insecticida, no se observó recuperación significativa de la actividad remanente de ChE muscular con respecto a la encontrada al finalizar el período de exposición. Efectivamente, la actividad mantuvo el mismo nivel de inhibición, con escasas variaciones, luego de 21 días de recuperación (Figura 31).



**Figura 31: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE muscular de *O. mykiss* expuestos a  $1 \mu\text{g/L}$  de MeAz.** El tiempo cero (0) indica la finalización de los 4 días de exposición y el inicio del período de recuperación. Los valores (media  $\pm$  ES de cuadruplicados de tratamiento) con igual letra no difieren significativamente entre sí al nivel de  $p \leq 0,05$  por ANOVA-LSD. ( ) Porcentaje de Inhibición.

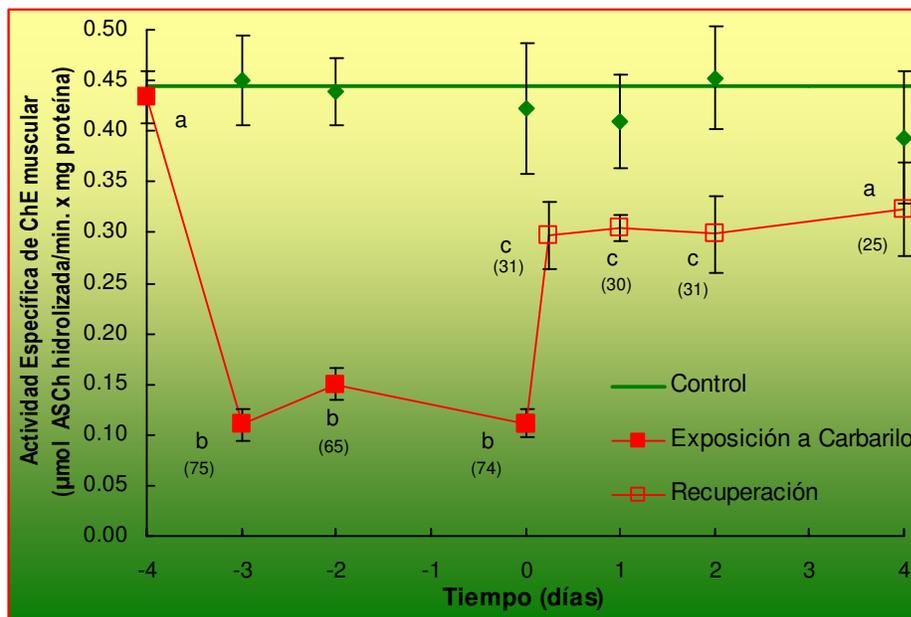
Los juveniles de *O. mykiss* expuestos a 500  $\mu\text{g}/\text{L}$  de carbarilo presentaron una disminución de la actividad de ChE cerebral entre 83 % y 79% desde las 24 a las 96 horas de tratamiento. De igual forma que lo observado en carasius, la recuperación de la actividad resultó más rápida luego de la exposición a carbarilo que en el caso del MeAz. Luego de 6 horas en medio sin insecticida, la ChE cerebral presentó un incremento de su actividad significativo con respecto a las 96 horas de exposición alcanzando 49% de la actividad control (51% inhibición). A las 96 horas de recuperación la actividad alcanzó un 88%, valor que no resultó significativamente diferente del control (Figura 32).

Un perfil similar presentó la cinética de inhibición recuperación de la ChE muscular. La inhibición alcanzada en el tiempo de exposición a 500  $\mu\text{g}/\text{L}$  fue del 74%. Se observó una rápida recuperación de la actividad remanente, presentando a las 6 horas de recuperación una inhibición de sólo el 31%. A las 96 horas de recuperación la actividad remanente de ChE muscular alcanzó el 75% con respecto al valor control (Figura 33).



**Figura 32: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE cerebral de *O. mykiss* expuestos a 500  $\mu\text{g}/\text{L}$  de carbarilo.** El tiempo cero (0) indica la finalización de los 4 días de exposición y el inicio del período de recuperación. Los valores (media  $\pm$  ES de cuadruplicados) con igual letra no difieren significativamente entre sí al nivel de  $p \leq 0,05$  por ANOVA-LSD.

( ) Porcentaje de Inhibición.



**Figura 33: Inhibición y recuperación de la actividad específica de ChE muscular de *O. mykiss* expuestos a 500 µg/L de carbarilo.** El tiempo cero (0) indica la finalización de los 4 días de exposición y el inicio del período de recuperación. Los valores (media ± ES de cuadruplicados de tratamiento) con igual letra no difieren significativamente entre sí al nivel de  $p \leq 0,05$  por ANOVA-LSD. ( ) Porcentaje de Inhibición.

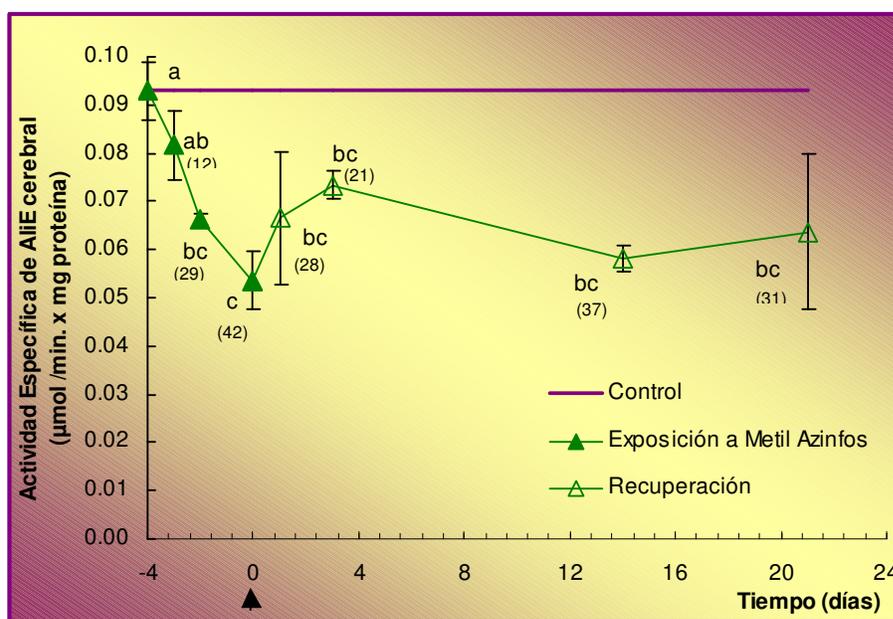
### 2.3.2.1 Aliesterasa cerebral

En los ensayos de exposición y posterior recuperación se determinó de manera adicional la actividad de la enzima AliE presente en el cerebro de los juveniles de *O. mykiss*.

La enzima mostró una inhibición por exposición a MeAz que resultó dependiente del tiempo. Luego de 24 horas de exposición a 1 µg/L de MeAz la inhibición fue del 12% alcanzando posteriormente una inhibición mayor (42%) luego de 96 horas (Figura 34).

Entre las 24 y 72 horas iniciales del período de recuperación en medio libre de insecticida, se observó un incremento aparente en la actividad enzimática de la AliE cerebral disminuyendo la inhibición hasta un 28 y 21%. Sin embargo, el mismo no fue estadísticamente significativo, sin verificarse una efectiva recuperación al término de 21 días (Figura 34).

El comportamiento de la enzima AliE cerebral frente al carbarilo fue levemente diferente del observado para la ChE cerebral y muscular. La inhibición resultó más pronunciada a las 24 horas, y la actividad aumentó a partir de este punto incluso durante el período que restaba de exposición al insecticida (Figura 35). La inhibición alcanzada a las 24 horas de exposición a carbarilo fue del 62%, y a las 96 horas fue de 48%. La actividad observada al finalizar el período de exposición se mantuvo sin cambios luego de 6 horas de transferencia a medio sin insecticida. Tampoco se observó una recuperación significativa al cabo de 24 y 96 horas de recuperación. Al final del ensayo la actividad enzimática remanente se mantuvo en un 75% del valor control (Figura 35).



**Figura 34: Inhibición y recuperación de la actividad específica de AliE cerebral de *O. mykiss* expuestos a 1 µg/L de MeAz.** El tiempo cero (0) indica la finalización de los 4 días de exposición y el inicio del período de recuperación. Los valores (media ± ES de cuadruplicados de tratamiento) con igual letra no difieren significativamente entre sí al nivel de  $p \leq 0,05$  por ANOVA-LSD. ( ) Porcentaje de Inhibición.

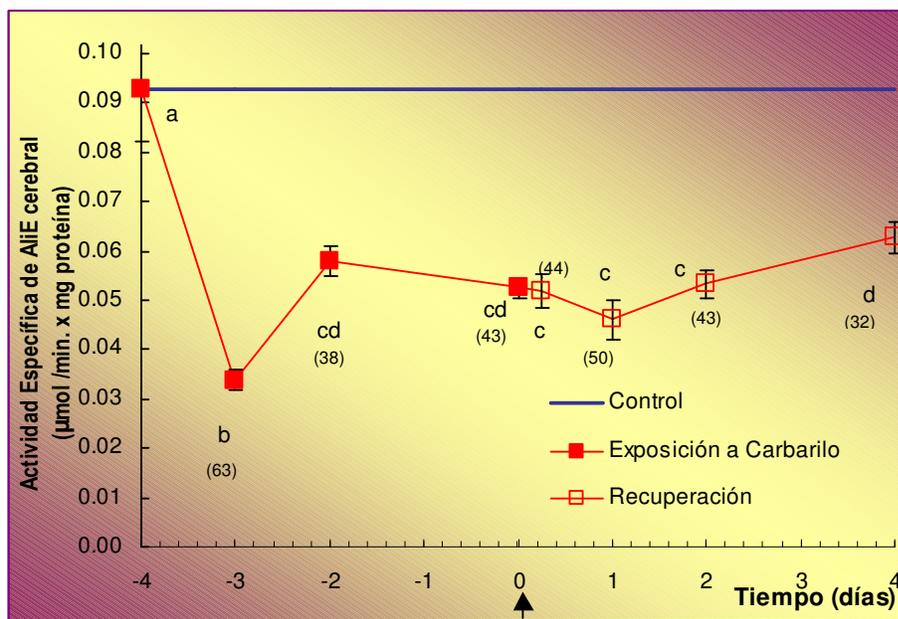


Figura 35: Inhibición y recuperación de la actividad específica de AliE cerebral de *O. mykiss* expuestos a 500 µg/L de carbarilo. El tiempo cero (0) indica la finalización de los 4 días de exposición y el inicio del período de recuperación. Los valores (media ± ES de cuadruplicados de tratamiento) con igual letra no difieren significativamente entre sí al nivel de  $p \leq 0,05$  por ANOVA-LSD. ( ) Porcentaje de Inhibición.

### 2.3.3 Perfil de Inhibición y Recuperación de la Actividad de Colinesterasa Cerebral y Muscular de *O. mykiss* luego de Exposiciones Reiteradas a Metil Azinfos

La figura 36 muestra la fluctuación de los valores de actividad de la enzima ChE cerebral de *O. mykiss* en cada uno de tres sucesivos periodos de exposición a MeAz (2 días) y recuperación en medio libre de insecticida (7 días). Luego de 48 horas de exposición a la concentración subletal de 1 µg/L de MeAz, la enzima ChE cerebral resultó altamente inhibida en un 85%. Al término del primer período de recuperación, se observó un aumento de la actividad que no resultó estadísticamente significativo, observándose aún un porcentaje de inhibición del 58% con respecto al control. El segundo período de exposición provocó la caída de la actividad enzimática nuevamente. La inhibición alcanzada fue del 88%. Luego de los 7 días subsiguientes en ausencia

del tóxico, la actividad se recuperó de manera significativa con respecto al valor correspondiente al segundo periodo de exposición, alcanzando un 59% de la actividad control. De todas maneras aun persistía una inhibición altamente significativa (41%).

El tercer periodo de exposición e inhibición resultó semejante al segundo. La inhibición alcanzada fue del 87% y la recuperación posterior si bien fue significativa con respecto al periodo de exposición no alcanzó al 45% de la actividad control. Al finalizar el tercer periodo y luego de 27 días de experimento, las exposiciones reiteradas y discontinuas a una concentración subletal de MeAz mantuvieron la actividad enzimática por debajo del 50% con respecto al control.

La ChE muscular se comportó de manera semejante, aunque las fluctuaciones de los valores entre exposición y recuperación resultaron menos pronunciadas, en concordancia con lo observado en la figura 31 por exposición única al insecticida (Figura 37).

La inhibición del 49% observada al termino de las primeras 48 horas de exposición, disminuyó hasta un 30% al finalizar los 7 días correspondientes al primer período de recuperación. La segunda exposición a MeAz provocó una caída mayor en la actividad de ChE, significativa con respecto al valor control y al valor de la primera recuperación (64% inhibición). El valor de actividad remanente alcanzado luego del segundo período de recuperación fue menor al del primer período, presentando una inhibición del 43%, sin embargo ambos valores no difieren de manera significativa. El tercer período resultó muy similar al segundo. Al finalizar el último período de recuperación la actividad enzimática se encontraba inhibida en un 40%.

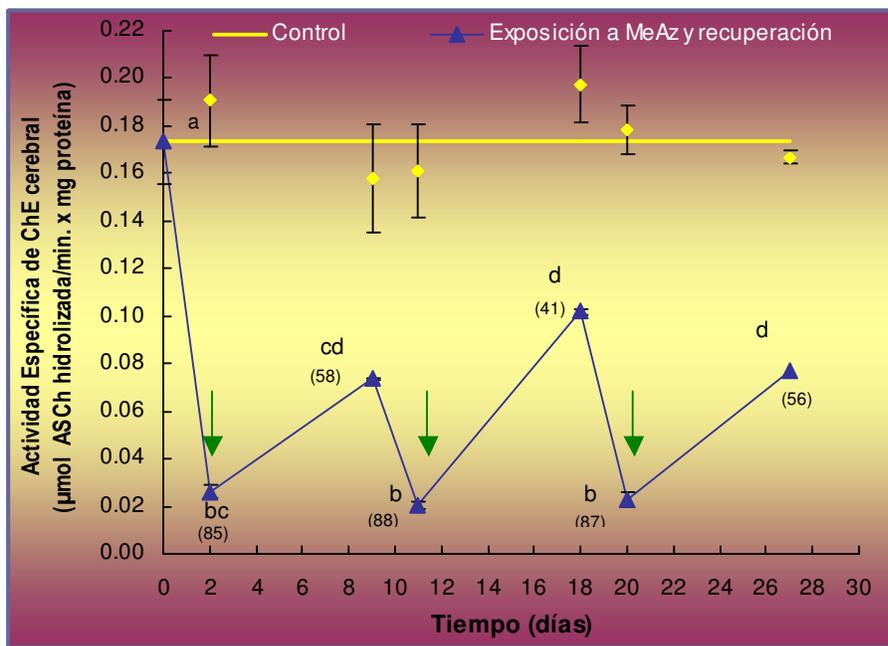


Figura 36: Actividad Específica de ChE cerebral de *O. mykiss* por exposiciones reiteradas a 1 μg/L de MeAz. Las flechas verdes señalan el fin de cada período de 48 horas de exposición y el inicio de 7 días subsiguientes de recuperación. Los valores (media ± ES de cuadruplicados) con distinta letra difieren significativamente entre sí (p<0,05) por ANOVA-LSD. ( ) Porcentaje de Inhibición.

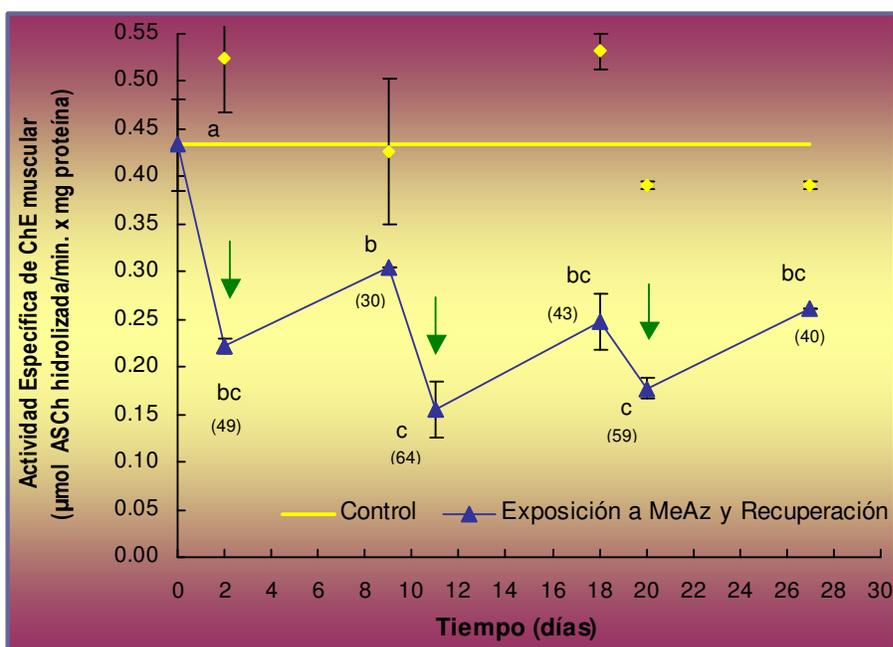
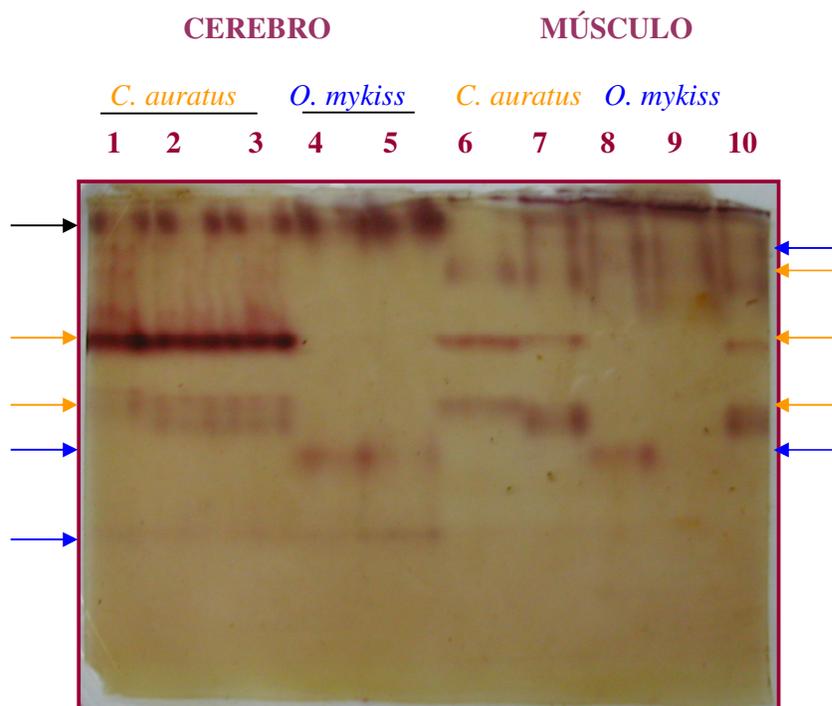


Figura 37: Actividad específica de ChE muscular de *O. mykiss* por exposiciones reiteradas a 1 μg/L de MeAz. Las flechas verdes señalan el fin de cada período de 48 horas de exposición y el inicio de 7 días subsiguientes de recuperación. Los valores (media ± ES de cuadruplicados) con distinta letra difieren significativamente entre sí (p<0,05) por ANOVA-LSD. ( ) Porcentaje de Inhibición.

## 2.4 Evaluación del Efecto del Metil Azinfos sobre el Patrón de Isoenzimas de Esterasas Cerebrales

Se evaluó el patrón de esterasas cerebrales y musculares presentes en juveniles controles de ambas especies, *C. auratus* y *O. mykiss*, según la técnica de electroforesis en condiciones nativas seguida de revelado específico por actividad enzimática descriptas en las secciones II-7.2 y II-8.2. La figura 38 muestra que el patrón de esterasas totales difiere notablemente entre ambas especies, mientras que es similar entre cerebro y músculo dentro de la misma especie.

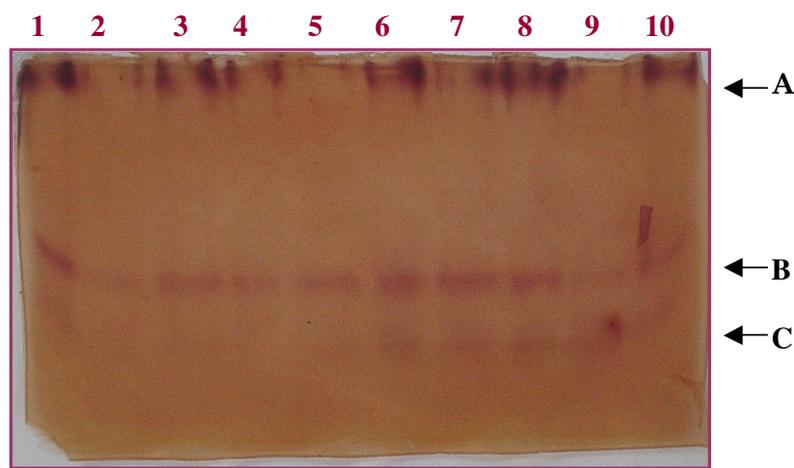


**Figura 38: Perfil de isoenzimas de esterasas cerebrales y musculares controles de *C. auratus* y *O. mykiss*.** Calles 1 a 3- esterasas cerebrales de *C. auratus*, 4 y 5 - esterasas cerebrales de *O. mykiss*, 6, 7 y 10- esterasas musculares de *C. auratus*, 8 y 9- esterasas musculares de *O. mykiss*.

En calles 1 a 5 se sembró 100 µg de proteínas, calles 6 a 10 se sembró 70 µg de proteínas de sobrenadante 3000 x g.

Las flechas a izquierda del gel señalan las isoenzimas de cerebro, las flechas a derecha del gel señalan las isoenzimas de músculo. Color negro: isoenzima presente en ambas especies, color naranja isoenzima de *C. auratus*, color azul isoenzima de *O. mykiss*.

Se evaluó además el efecto de las exposiciones reiteradas a MeAz en el patrón de isoenzimas de esterasas de *O. mykiss*, revelando la actividad de esterasas totales. Según se observa en la calle 2 de la figura 39, la exposición a 1  $\mu\text{g/L}$  de MeAz provocó una disminución semejante en la actividad de todas las isoenzimas presentes en cerebro. Durante los sucesivos períodos en medio libre de insecticida la recuperación resultó semejante en todas las isoenzimas detectadas (calles 4, 7 y 10). Se realizó también un revelado específico para AChE con el cual se detectó solo una banda (datos no mostrados) que correspondió a la banda A de la figura 39: Las bandas B y C corresponden a enzimas con actividad aliesterasa.

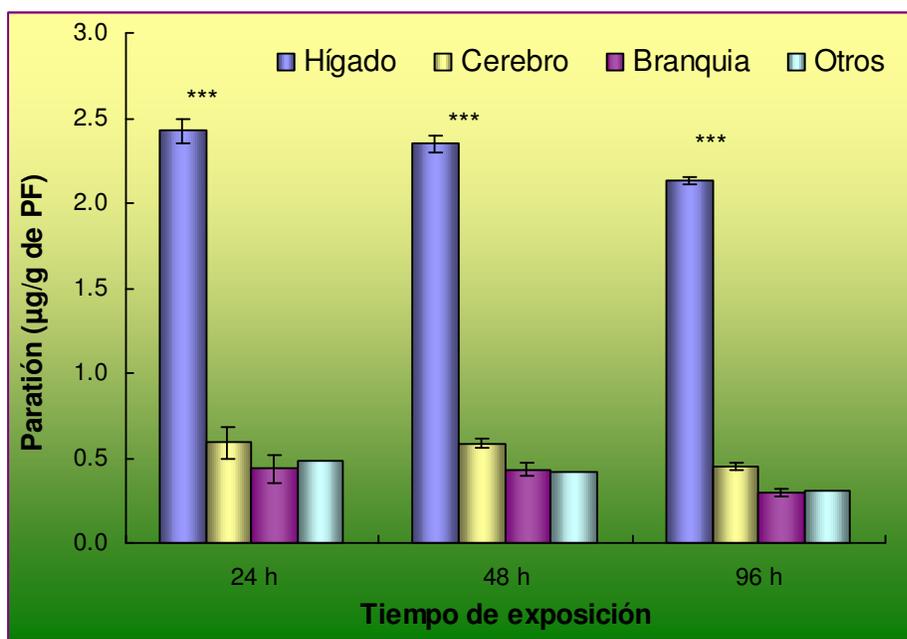


**Figura 39: Perfil de isoenzimas de esterasas cerebrales de *O. mykiss* por exposiciones reiteradas a 1  $\mu\text{g/L}$  de MeAz.** Calles: 1- Control, 2-Primera exposición 48 h a MeAz 1  $\mu\text{g/L}$ , 3- Control, 4- Primera Recuperación 7 días, 5-Segunda exposición 48 h a MeAz 1  $\mu\text{g/L}$ , 6-control, 7- Segunda recuperación 7 días, 8-control, 9- Tercera exposición 48 h a MeAz 1  $\mu\text{g/L}$ , 10- Tercera Recuperación 7 días. Las flechas indican las bandas con actividad esterasa. En cada calle se sembró 100  $\mu\text{g}$  de proteínas.

### 3. BIODISTRIBUCIÓN DE PARATIÓN Y BIOMARCADORES EN *Cyprinus carpio*

Para completar los estudios presentados y de acuerdo a la disponibilidad en el mercado de plaguicidas marcados radiactivamente se decidió estudiar la distribución por órgano de alguno de los plaguicidas utilizados en esta tesis. Se evaluó la distribución por órganos de paratión marcado con  $^{14}\text{C}$  en *Cyprinus carpio* expuestos a la concentración subletal de  $50 \mu\text{g/L}$  (Ver secciones II-9).

El paratión se distribuyó en forma órgano-específica en el hígado, con concentraciones 4 a 6 veces más altas que en otros órganos (Figura 40). El cerebro acumuló paratión en forma semejante a branquias y otros tejidos en general. Los valores de concentración no variaron significativamente entre las 24 y 96 horas de exposición para cada órgano.



**Figura 40: Distribución de paratión en órganos de *C. carpio* a distintos tiempos de exposición.**

Medias  $\pm$  ES de cuadruplicados para la determinación del compuesto por centelleo líquido en extractos de acetona. \*\*\* diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre órganos determinadas por ANOVA de dos factores y test LSD a posteriori; efectos en tiempo de exposición, NS ( $p = 0,24$ ), interacción de factores NS ( $p = 0,99$ ).

Adicionalmente se analizaron distintos biomarcadores en hígado y cerebro de los especímenes de *C. carpio* expuestos. A la concentración empleada (50 µg/L), el paratión no afectó en forma significativa el índice hepatosomático, los niveles de GSH expresados en base al peso fresco de hígado, ni la producción de peróxidos lipídicos en dicho órgano (Tabla 8). Sin embargo, el insecticida provocó una caída significativa del contenido de proteínas totales hepáticas.

La evaluación de AChE cerebral indicó una alta y significativa inhibición ya desde las 24 horas de exposición a paratión, que alcanzó un 89% de inhibición al final del experimento (Tabla 8). A pesar de la alta inhibición alcanzada en la ChE cerebral no se produjo mortalidad ni se registraron signos visibles de intoxicación aguda en los peces expuestos.

**Tabla 8: Análisis de biomarcadores en hígado y cerebro de *C. carpio***

Tiempo	HÍGADO				CEREBRO
	Índice hepatosomático	Proteína total	GSH	Lipoperóxidos	AChE cerebral
	(mg PF hígado/ g PF total)	(mg/mg PF)	(µg/mg PF)	(nmol TBARS/ mg fosfolípido)	(nmol sustrato/min/mg PF)
0 h	4,08 ± 0,73	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,03	52,98 ± 1,58	28,4 ± 2,5 <sup>a</sup>
24 h	3,25 ± 0,66	---	---	---	3,9 ± 1,1 <sup>b</sup>
48 h	2,94 ± 0,42	0,07 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,02	50,85 ± 5,30	3,8 ± 1,0 <sup>b</sup>
96 h	2,92 ± 0,54	---	---	---	2,8 ± 0,2 <sup>b</sup>

Media ± ES de cuadruplicados; <sup>a,b</sup> denotan diferencias significativas (p<0,05) determinado por ANOVA-LSD.

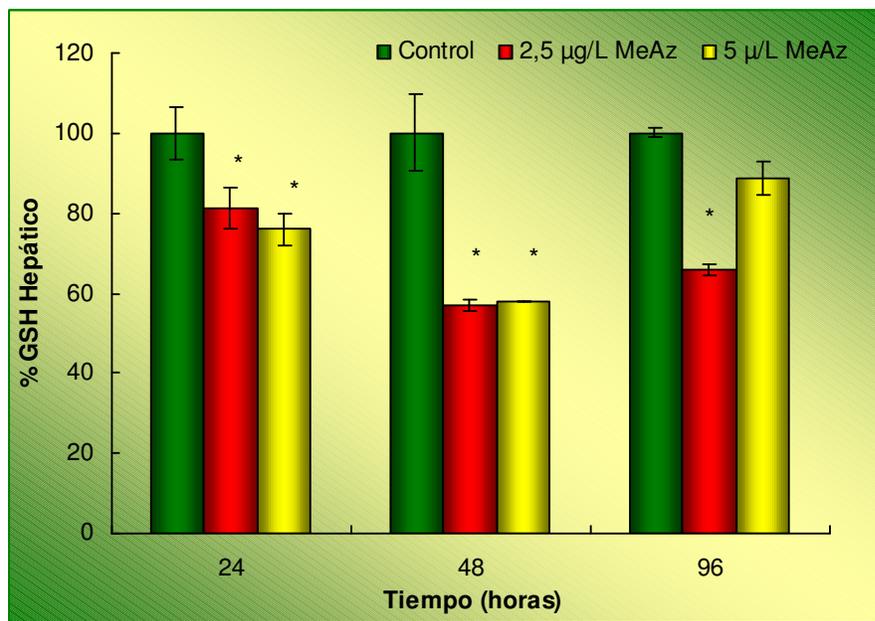
## **4. EVALUACIÓN DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE**

Se analizaron también las actividades enzimáticas de la catalasa y glutatión-S-transferasa (GST) y el contenido de GSH en hígado y riñón, los principales órganos encargados de la detoxificación y eliminación de xenobióticos en juveniles de *Oncorhynchus mykiss*. Se realizaron estudios en función del tiempo de exposición (24, 48 y 96 horas) a concentraciones subletales de los insecticidas MeAz y carbarilo (Ver secciones II-4.1, II-4.2.5, II-5.4, II-5.5 y II-5.6). Adicionalmente se determinaron los niveles de citocromo P450 1A en hígado de *O. mykiss* a fin de evaluar si la exposición a estos insecticidas provocaba la inducción de este biomarcador (Sección II-8.3).

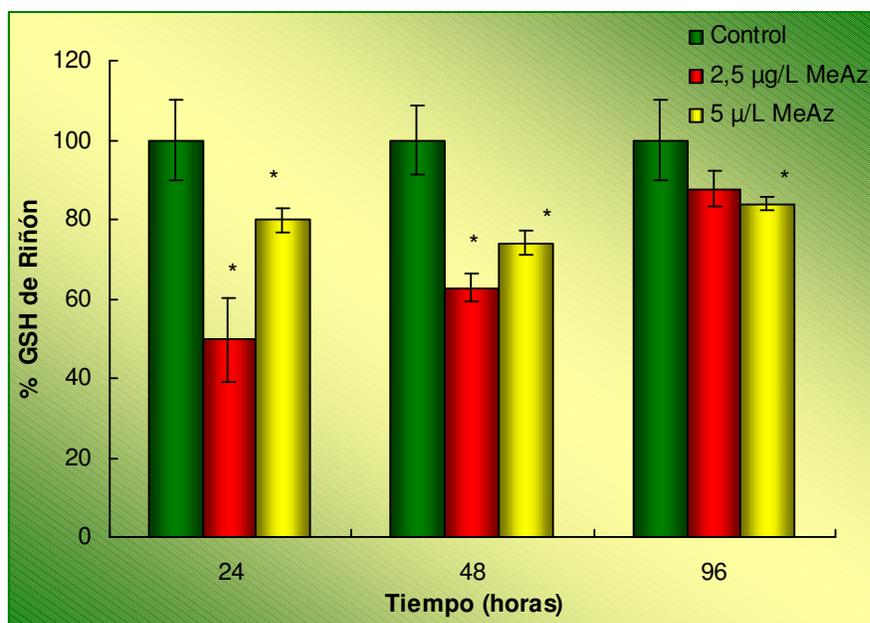
### **4.1 Contenido de Glutatión Reducido Endógeno**

El MeAz provocó una disminución importante del contenido de GSH endógeno en ambos órganos estudiados, hígado y riñón. En el hígado de los peces expuestos a 2,5 µg/L y 5,0 µg/L, el contenido de GSH disminuyó de manera significativa (19 y 20% a 24 horas de exposición). La disminución fue más pronunciada a las 48 horas de exposición en ambas concentraciones (43 y 42 % respectivamente). A las 96 horas, el porcentaje de GSH con respecto al control no mostró una disminución significativa a la máxima concentración ensayada, mientras que a la concentración menor (2,5 µg/L) la reducción resultó aún significativa (33%) (Figura 41).

En riñón, el GSH disminuyó de manera significativa en ambas concentraciones ensayadas a 24 y 48 horas de exposición. A las 96 horas, la disminución resultó significativa sólo en los peces expuestos a 5 µg/L (Figura 42).



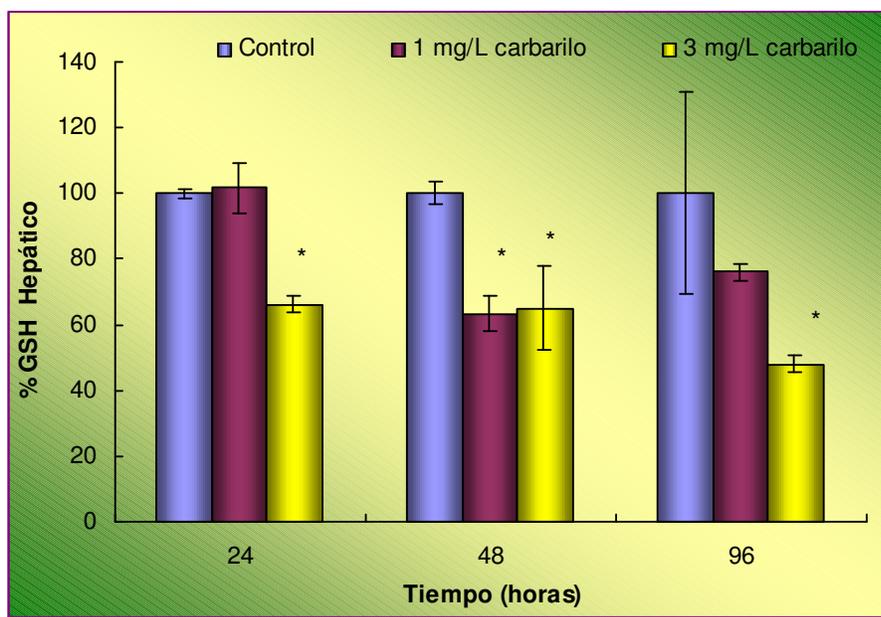
**Figura 41:** Contenido de glutatión reducido (GSH) en hígado de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS de triplicados de tratamiento. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$  por ANOVA-LSD. Valor control promedio de GSH  $36,4 \pm 1,75$ .



**Figura 42:** Contenido de glutatión reducido (GSH) en riñón de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS de triplicados de tratamiento. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$  por ANOVA-LSD. Valor control promedio de GSH  $33,5 \pm 2,4$ .

Las concentraciones subletales de carbarilo experimentadas correspondieron a 1 y 3 mg/L. La mayor concentración (3 mg/L) provocó una disminución estadísticamente significativa del GSH hepático en todos los tiempos ensayados (34, 35 y 52% respectivamente). La concentración de 1 mg/L, provocó una disminución del 37% a las 48 horas de exposición que resultó significativa (Figura 43). La reducción del GSH hepático por exposición a 3 mg/L de carbarilo resultó drástica a las 96 horas (52%).

En riñón, la máxima concentración produjo una reducción significativa (20%) a las 48 horas de exposición. Ambas concentraciones de carbarilo provocaron una disminución significativa y semejante del GSH (37 %) a las 96 horas de exposición (Figura 44).



**Figura 43: Contenido de glutatión reducido (GSH) en hígado de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de carbarilo.** Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS de triplicados de tratamiento. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$  por ANOVA-LSD. Valor control promedio de GSH  $41,9 \pm 3,5$ .

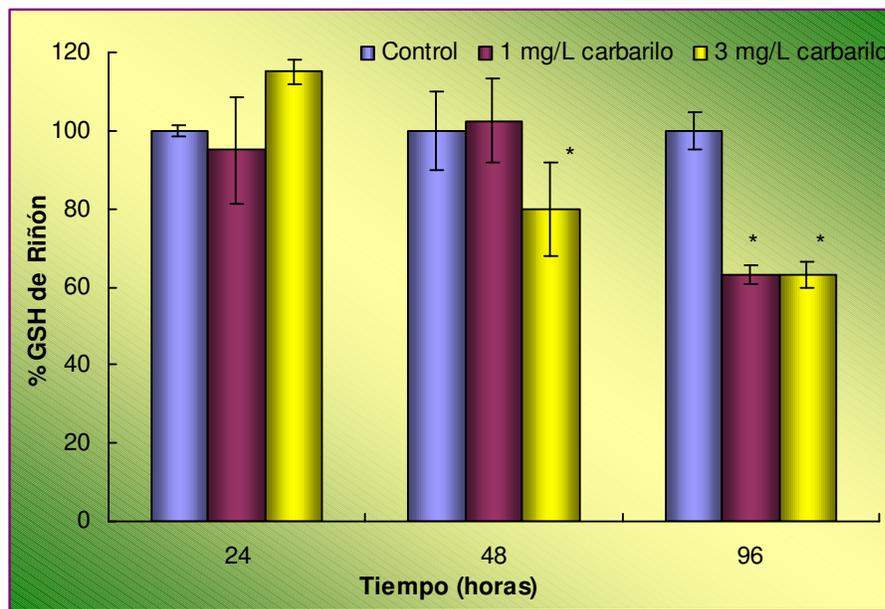


Figura 44: Contenido de glutatión reducido (GSH) en riñón de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de carbarilo. (Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS de triplicados de tratamiento. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$ ). Valor control promedio de  $34,9 \pm 0,88$ .

## 4.2 Actividad Enzimática de la Glutatión-S-Transferasa

En los juveniles de *O. mykiss* expuestos a MeAz la actividad enzimática de GST hepática presentó valores cercanos al control. Si bien, a las 48 horas de exposición a la máxima concentración ensayada ( $5 \mu\text{g/L}$ ) se observó un aumento aparente de la actividad enzimática, éste no resultó significativo y no se sostuvo hasta la finalización del ensayo (Figura 45). En riñón, la actividad de la enzima GST tendió a ser menor en peces expuestos sin resultar significativas las diferencias observadas con los valores de actividad control (Figura 46).

Luego de 24 horas de exposición a  $3 \text{ mg/L}$  de carbarilo se observó un aumento significativo de la actividad de GST tanto en hígado como en el riñón, sin embargo la inducción de la actividad no se sostuvo en el tiempo (Figuras 47 y 48).

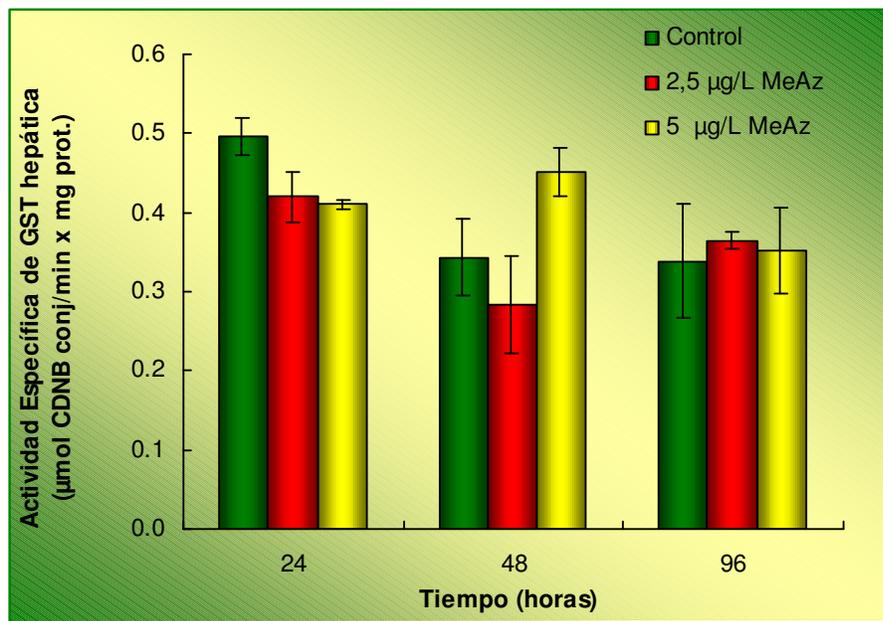


Figura 45: Actividad específica de GST hepática de juveniles de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS de triplicados de tratamiento. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$  por ANOVA-LSD.

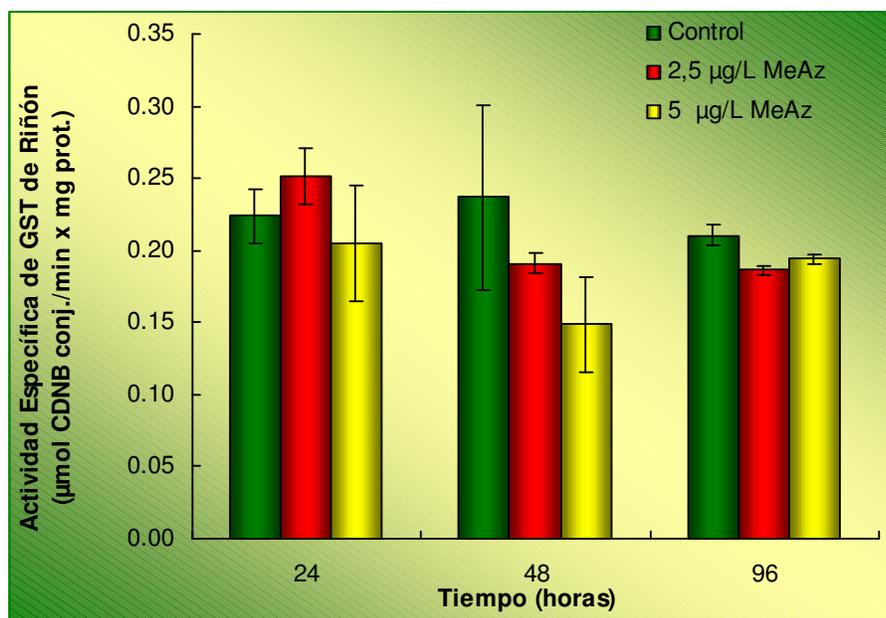


Figura 46: Actividad específica de GST en riñón de juveniles de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS de triplicados de tratamiento. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$  por ANOVA-LSD.

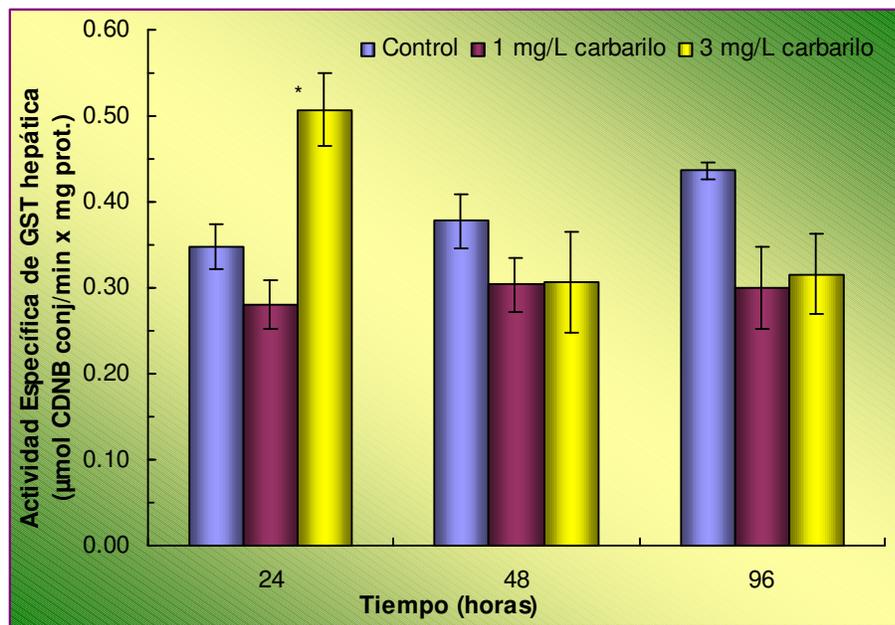


Figura 47: Actividad específica de GST en hígado de juveniles de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de carbarilo. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS de triplicados de tratamiento. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$  por ANOVA-LSD.

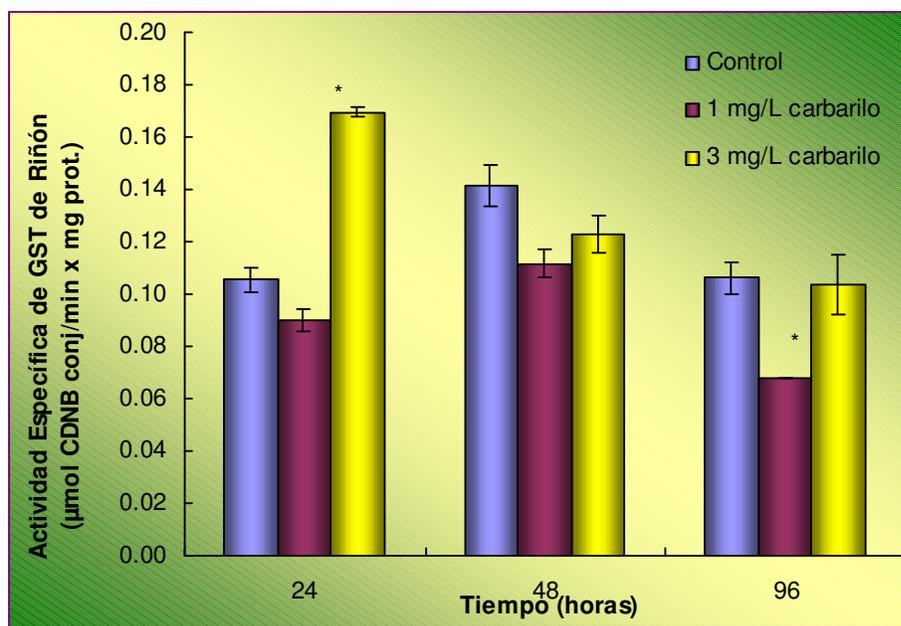


Figura 48: Actividad específica de GST en riñón de juveniles de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de carbarilo. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS de triplicados de tratamiento. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$  por ANOVA-LSD.

### 4.3 Actividad Enzimática de Catalasa

La actividad de la catalasa hepática disminuyó con respecto al control debido a la exposición a concentraciones subletales de MeAz. La disminución resultó significativa a 48 horas de exposición, para ambas concentraciones ensayadas (17% y 18% respectivamente), y para 5 µg/L a las 24 y 96 horas de exposición (13 y 27% de disminución respectivamente) (Figura 49).

De manera similar, la actividad de catalasa de riñón de peces expuestos a MeAz disminuyó en ambas concentraciones y todos los tiempos ensayados. La disminución resultó significativa a las 48 y 96 horas de exposición. Al finalizar el ensayo el valor de actividad enzimática resultó un 37% y 42% menor que el valor control para 2,5µg/L y 5 µg/L de MeAz respectivamente (Figura 50).

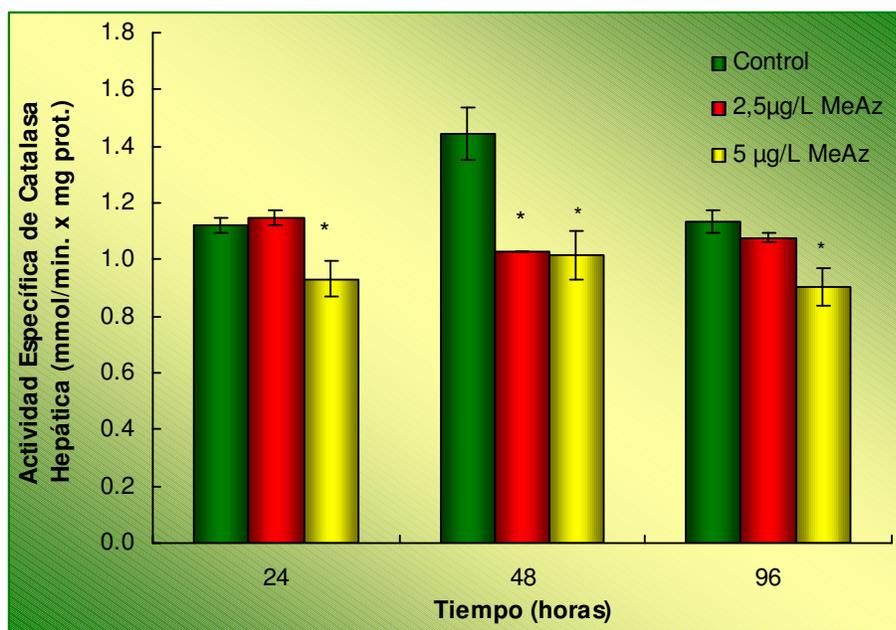
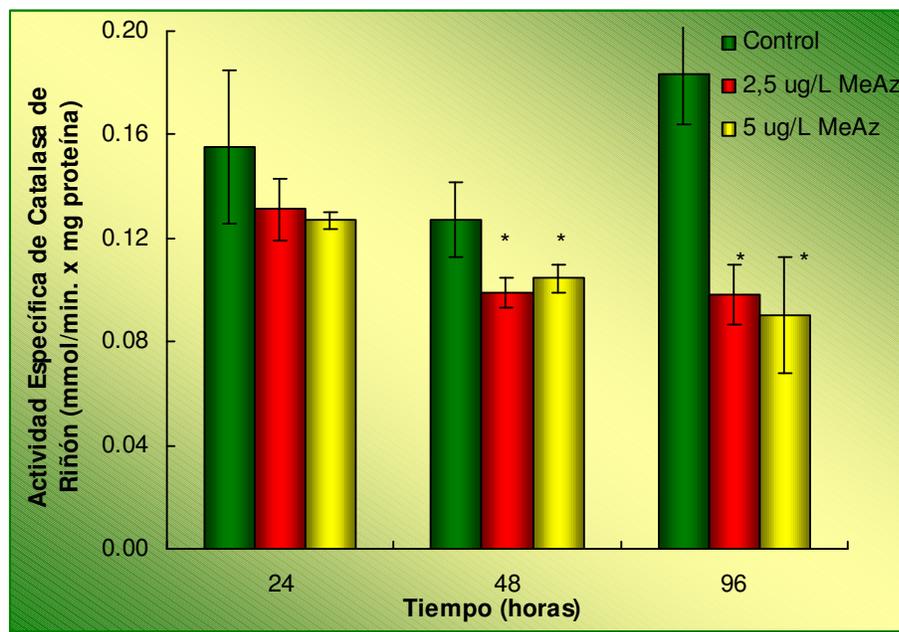


Figura 49: Actividad específica de catalasa en hígado de juveniles de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS de triplicados de tratamiento. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$  por ANOVA-LSD.



**Figura 50: Actividad específica de catalasa en riñón de juveniles de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de MeAz.** (Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS de triplicados de tratamiento. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$ ).

Por exposición al insecticida carbarilo, la respuesta de la catalasa hepática resultó diferente de la obtenida con la enzima de riñón y también de la observada por exposición a MeAz. En hígado se advirtió un aumento de actividad enzimática para ambas concentraciones, 1 y 3 mg/L, luego de 24 horas de exposición (36% y 70% respectivamente), de manera semejante a lo observado por exposición a este compuesto para la enzima GST. Esa inducción se mantiene luego de 48 horas de exposición a la concentración menor alcanzando un 54%. Finalmente, disminuye la actividad con respecto al control en ambas concentraciones ensayadas al término de las 96 horas de exposición (31% y 33% de disminución respectivamente) (Figura 51).

Contrariamente, los valores de actividad enzimática de la catalasa de riñón resultaron próximos a los controles demostrando sin embargo, una tendencia a disminuir. La disminución resultó significativa al término de las 96 horas de exposición a 3 mg/L de carbarilo (20%) (Figura 52).

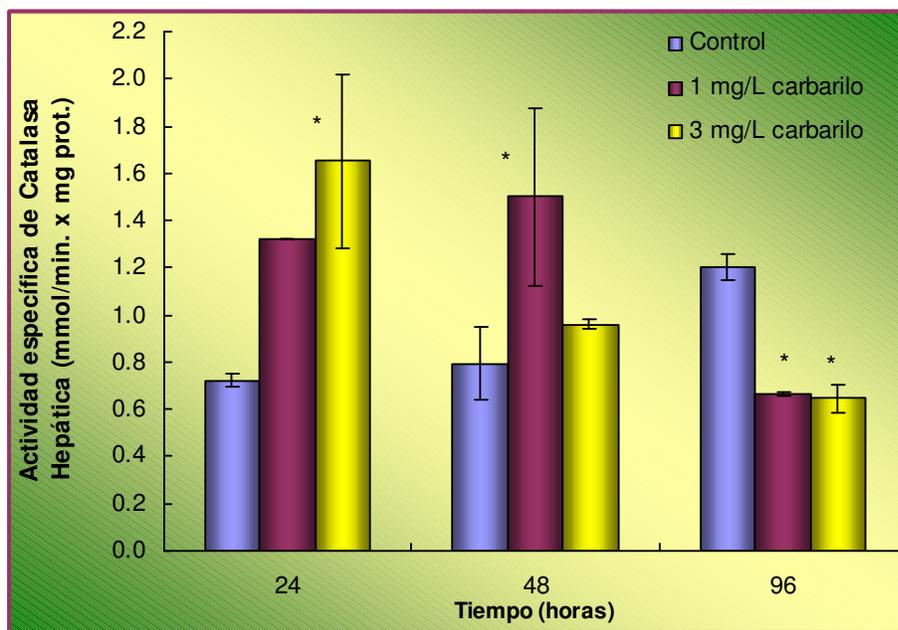


Figura 51: Actividad específica de catalasa hepática de juveniles de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de carbaryl. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS de triplicados de tratamiento. \* Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$  por ANOVA-LSD.

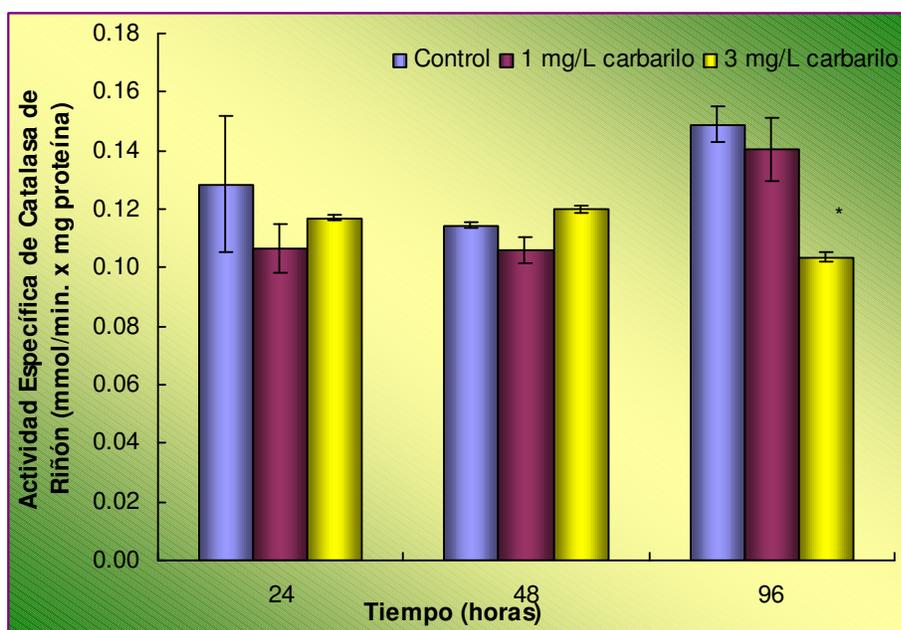
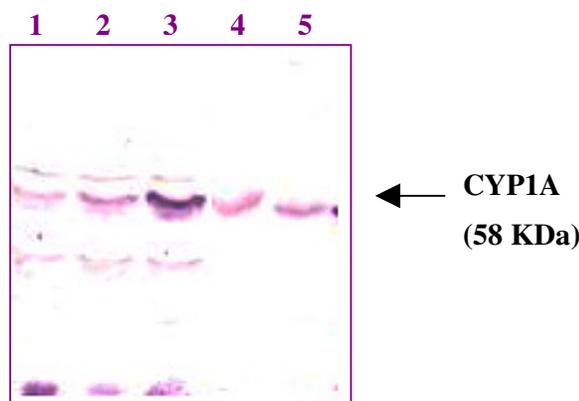


Figura 52: Actividad específica de catalasa en riñón de juveniles de *O. mykiss* en función del tiempo de exposición y la concentración de carbaryl. Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS de triplicados de tratamiento. \*Denota diferencias significativas con respecto al control  $p < 0,05$  por ANOVA-LSD.

## 4.4 Niveles Hepáticos de Citocromo P4501A en *O. mykiss*

Se analizó la expresión de la enzima citocromo P450 1A (CYP1A) en hígado de *O. mykiss* expuestos a 5µg/L de MeAz o 3mg/L de carbarilo durante 24 horas, por SDS-PAGE seguido de tinción con anticuerpo específico según se explica en secciones II-7.1y II-8.3.

Se observó inducción del CYP1A hepático por exposición a carbarilo, el análisis densitométrico de las bandas demostró una inducción de 1,4 veces el valor control. No se observó inducción por exposición a MeAz (Figura 53).

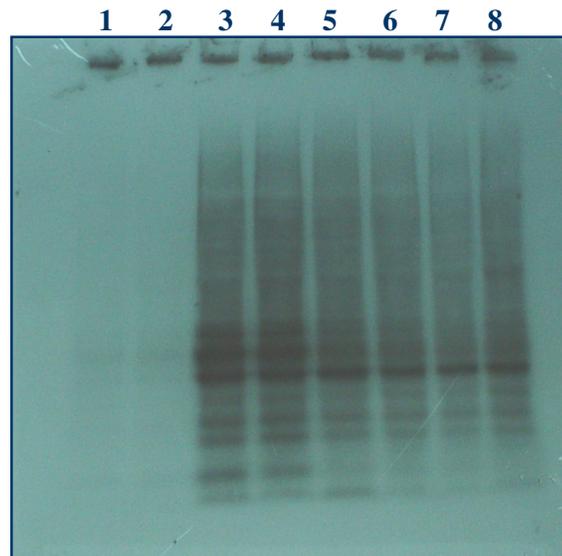


**Figura 53: Citocromo P450 1A (CYP1A) en hígado de *O. mykiss*.** Calles: 1-control, 2 - MeAz 5 µg/L, 3- carbarilo 3 mg/L, 4- control, 5- 1µg/L MeAz. Exposición *in vivo* durante 24 horas. (En cada calle se sembraron 100 µg de proteína de sobrenadante de 40000 x g). Se utilizó el anticuerpo monoclonal IgG<sub>3κ</sub> de ratón contra CYP 1A de *O. mykiss*.

## 5. EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS

### 5.1 Puesta a punto del tiempo adecuado de fosforilación

El patrón de fosforilación proteico correspondiente a la fracción precipitado de 20000 x g de cerebro de trucha arcoiris fue analizado luego de ensayar diferentes tiempos de incubación con  $^{32}\text{P}\gamma$ -ATP (Ver sección II-6). Fue posible observar una marca más intensa de las bandas proteicas fosforiladas luego de 1 minuto de incubación, mientras que disminuyó notablemente la marca al incubar la fracción durante 5 y 10 minutos (Figura 54). Estos resultados señalaron que el tiempo de incubación *in vitro* correspondiente a 1 minuto resulta más adecuado para analizar los patrones de fosforilación de juveniles de *O. mykiss* previamente expuestos a insecticidas, a fin de evitar la disminución de la marcación por efecto de las fosfatasas. En la figura 54 las calles 1 y 2 corresponden al control a tiempo cero. La escasa o nula marca obtenida en las mismas demuestra el bajo fondo inespecífico de la técnica utilizada.



**Figura 54: Fosforilación de proteínas cerebrales de *O. mykiss* en función del tiempo de incubación con  $^{32}\text{P}\gamma$ -ATP.** Calles: 1 y 2- control a tiempo cero, 3 y 4- un minuto, 5 y 6 cinco minutos, 7 y 8 diez minutos. Las proteínas correspondientes a la fracción precipitado de 20000 x g del homogenado de cerebro fueron separadas por SDS-PAGE luego de la fosforilación, transferidas a membrana de PVDF y reveladas por autorradiografía. Gel representativo de dos experimentos independientes con muestras analizadas por triplicado.

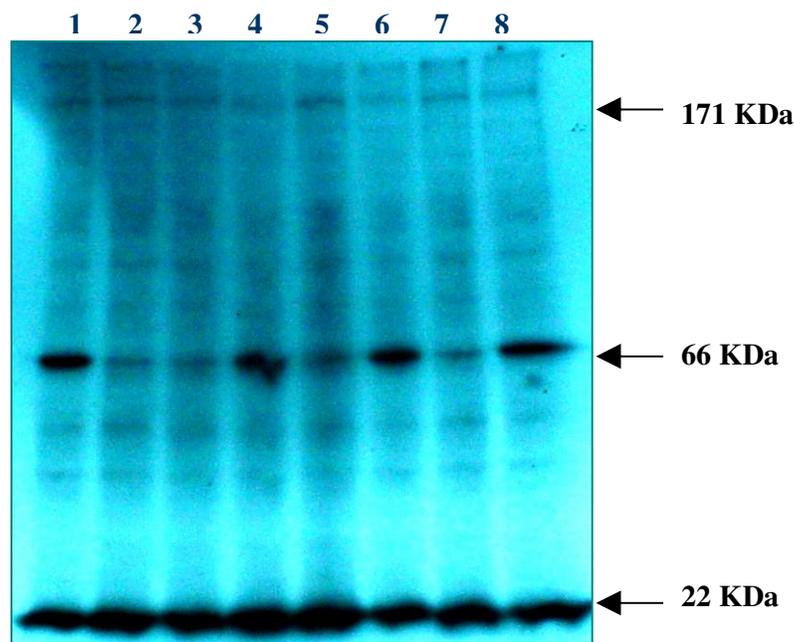
## **5.2 Efecto de la exposición a insecticidas sobre la fosforilación proteica**

Se observaron alteraciones notorias de los niveles de fosforilación proteica en distintos órganos (cerebro e hígado) de juveniles de *O. mykiss* expuestos in vivo 24 horas a MeAz (5 µg/L) y carbarilo (3 mg/L). Los cambios se produjeron principalmente en la fracción nuclear mientras que la fracción correspondiente a mitocondrias y sinaptosomas no presentó cambios que sean recurrentes en todos los ensayos realizados.

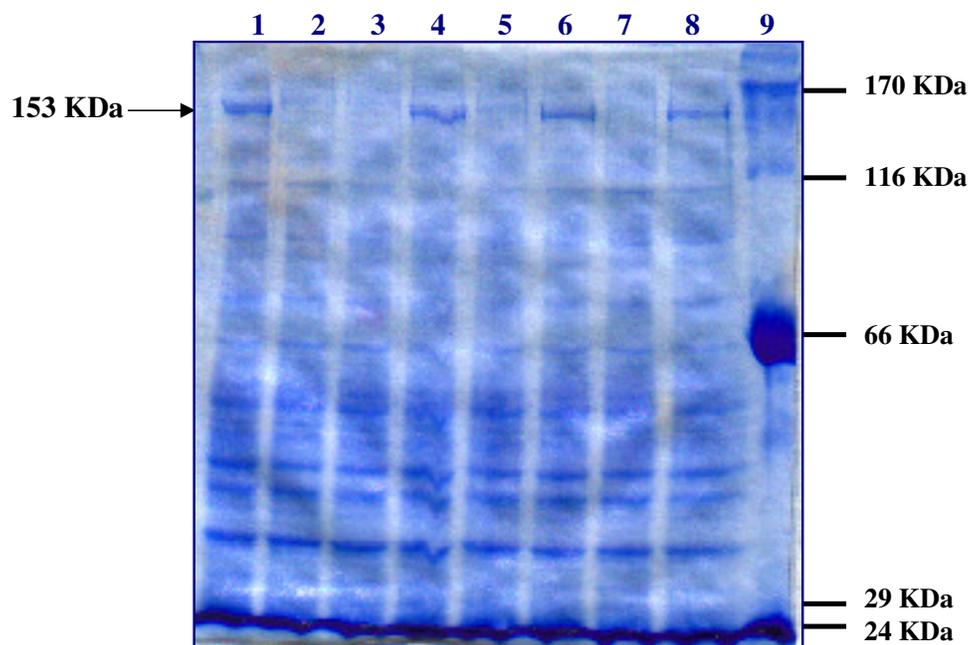
### **5.2.1 Fracción Nuclear Hepática**

En la fracción nuclear hepática de peces expuestos tanto a MeAz como a carbarilo se pudo ver una reducción importante en la fosforilación de una banda proteica de 66 KDa y un incremento en la fosforilación de una banda correspondiente a 171 KDa (Figuras 55 y 57). Con carbarilo se advierte también una disminución en la banda de 53 KDa y un aumento en la banda de 137 KDa. Estos efectos fueron independientes de la presencia/ausencia de los inhibidores de ATPasas y fosfatasas, ortovanadato y de tirosina quinasas, genisteína. Con MeAz se observó además un aumento en la fosforilación de la banda de 22 KDa, que resulta más acentuado en presencia de ortovanadato (Figura 57).

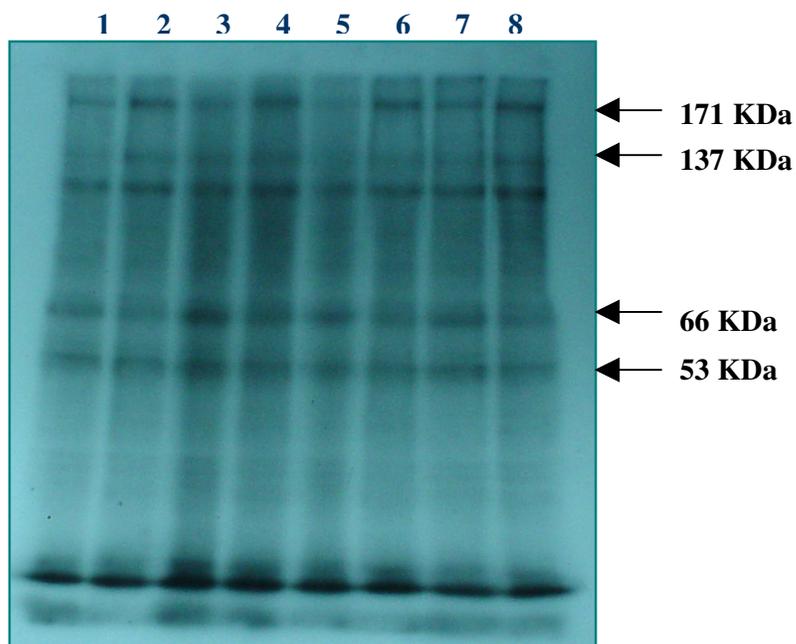
Las alteraciones observadas en la fosforilación proteica no se correspondieron con cambios en la masa de las proteínas según se observó en los correspondientes perfiles proteicos analizados por SDS-PAGE y tinción inespecífica (Figuras 57 y 59). Si bien, en la fracción nuclear de hígado de juveniles de *O. mykiss* expuestos a MeAz se advierte una disminución en la masa proteica de 153 KDa este cambio no modificó el perfil de fosforilación observado en la autorradiografía correspondiente.



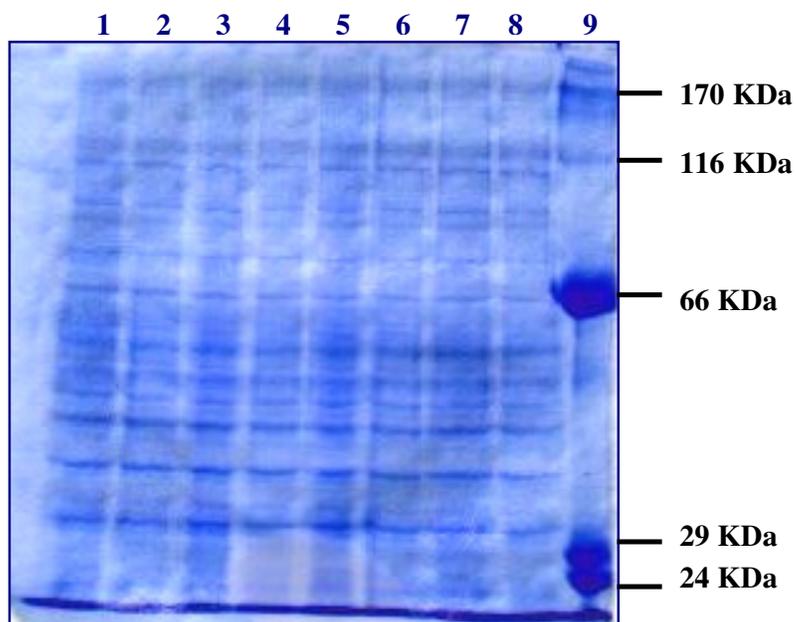
**Figura 55:** Fracción nuclear de hígado de *O. mykiss* expuestos a 5 µg/L de MeAz. Calles: 1- control, 2 y 3-MeAz, 4-control + ortovanadato, 5-MeAz + ortovanadato, 6-control + genisteína, 7-MeAz + genisteína, 8-control. Figura representativa de muestras analizadas por triplicado.



**Figura 56:** Perfil Proteico de la fracción nuclear de hígado de *O. mykiss* expuestos a 5 µg/L de metil-azinfos (MeAz). Calles: 1- control, 2 y 3-MeAz, 4-control + ortovandato, 5-MeAz + ortovandato, 6-control + genisteína, 7-MeAz + genisteína, 8-control, 9- marcadores de peso molecular. En cada calle se sembró 40µg de proteína. Gel correspondiente a autorradiografía presentada en la figura 55.



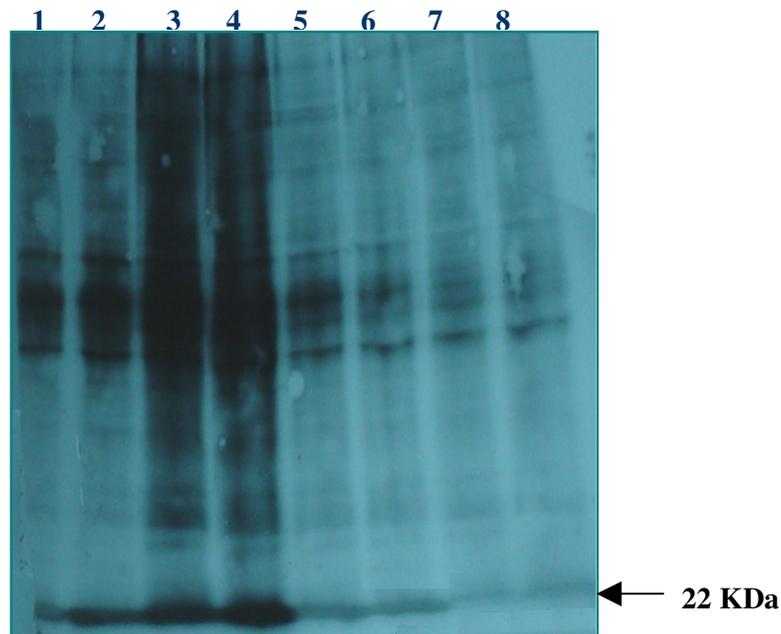
**Figura 57: Fracción nuclear de hígado de *O. mykiss* expuestos a 3 mg/L de carbarilo.** Calles: 1 y 7- control, 2 y 8- carbarilo, 3-control + ortovandato, 4- carbarilo + ortovandato, 5-control + genisteína, 6-carbarilo + genisteína. Figura representativa de muestras analizadas por triplicado.



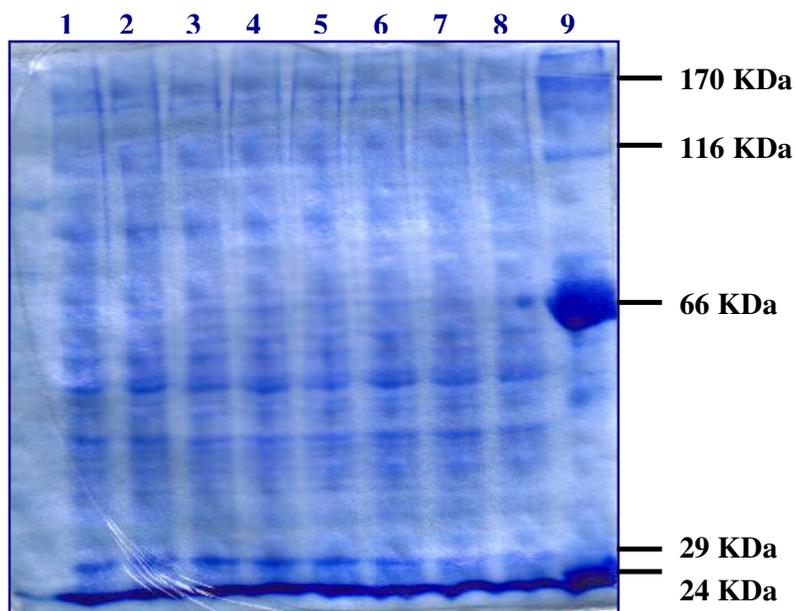
**Figura 58: Perfil proteico de la fracción nuclear de hígado de *O. mykiss* expuestos a 3 mg/L de carbarilo.** Calles: 1 y 7- control, 2 y 8- carbarilo, 3-control + ortovanadato, 4- carbarilo + ortovanadato, 5-control + genisteína, 6-carbarilo + genisteína, 9- marcadores de peso molecular. En cada calle se sembró 40 $\mu$ g de proteína. Gel correspondiente a autorradiografía presentada en la figura 57.

### 5.2.2 Fracción Nuclear Cerebral

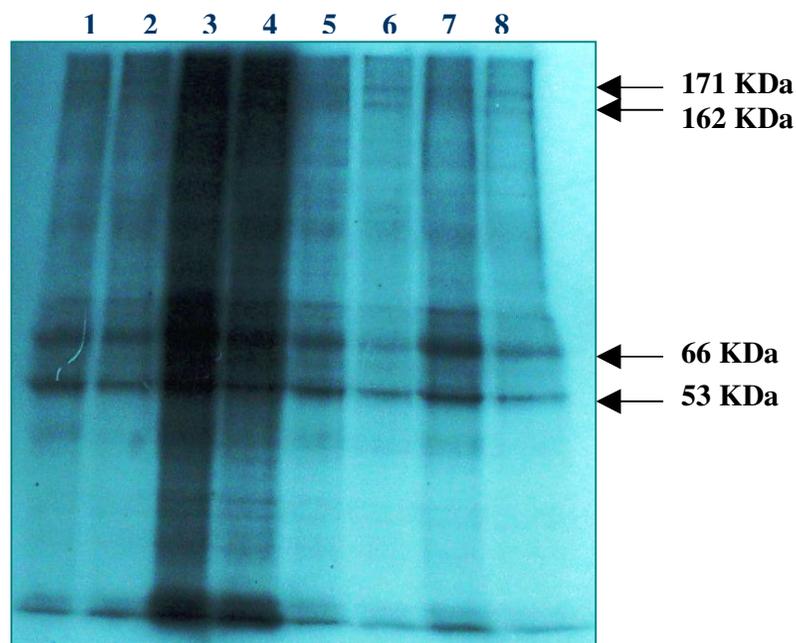
El MeAz produjo un aumento de la fosforilación de la banda de 22 KDa en la fracción nuclear de cerebro en presencia y ausencia de ortovanadato (Figura 59). El carbarilo provocó la disminución de las bandas correspondientes a 66 KDa y 53 KDa en la fracción nuclear de cerebro de truchas arcoiris expuestas y el aumento de la banda correspondiente a 171 KDa, de manera análoga a lo indicado en hígado. Se pudo observar asimismo un incremento en la fosforilación de una banda de aproximadamente 162 KDa en peces expuestos (Figura 61). El cambio advertido en la fosforilación de esta banda proteica (162 KDa) se pudo observar también en como un aumento de la masa correspondiente en el gel desnaturalizante teñido para visualizar el perfil de proteínas totales (Figura 62). A diferencia de lo ocurrido con carbarilo, no se observaron cambios por exposición a MeAz en el perfil de proteínas nucleares analizadas por SDS-PAGE y tinción inespecífica (Figura 60).



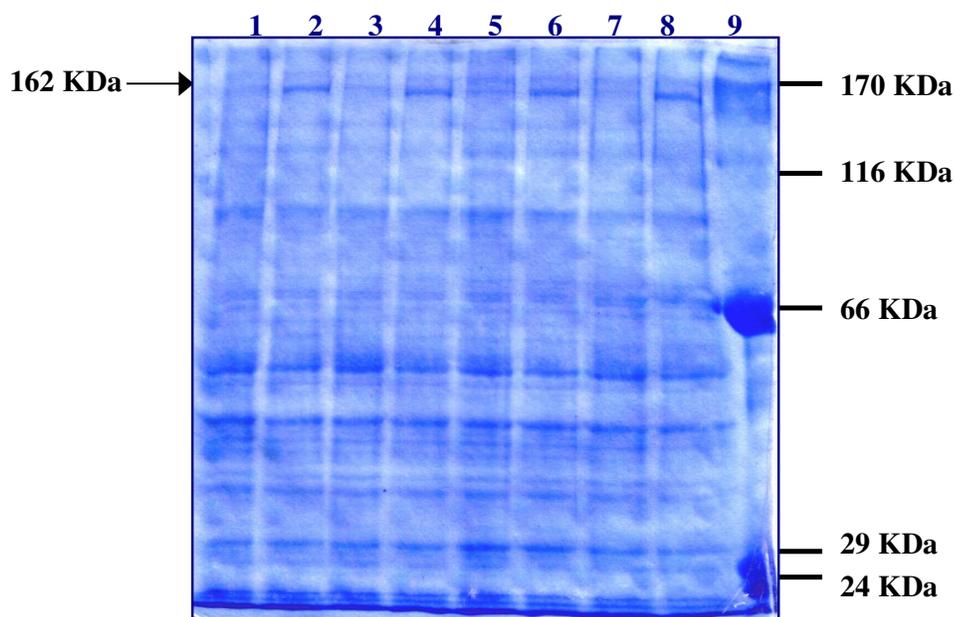
**Figura 59:** Fracción nuclear de cerebro de *O. mykiss* expuestos a 5  $\mu\text{g/L}$  de MeAz. Calle: 1-control, 2-MeAz, 3-control + ortovanadato, 4-MeAz + ortovanadato, 5-control + genisteína, 6-MeAz + genisteína, 7-control (5 minutos incubación), 8-MeAz (5 minutos incubación). Figura representativa de muestras analizadas por triplicado.



**Figura 60: Perfil proteico de la fracción nuclear de cerebro de *O. mykiss* expuestos a 5 µg/L de MeAz.** Calle: 1-control, 2-MeAz, 3 y 7 control + ortovanadato, 4 y 8-MeAz + ortovanadato, 5-control + genisteína, 6-MeAz + genisteína, 9- marcadores de peso molecular. En cada calle se sembró 40µg de proteína. Gel representativo de muestras analizadas por triplicado.



**Figura 61: Fracción nuclear de cerebro de *O. mykiss* expuestos a 3 mg/L de carbarilo.** Calles: 1 y 7-control, 2 y 8-carbarilo, 3-control + ortovandato, 4-carbarilo + ortovandato, 5-control + genisteína, 6- carbarilo + genisteína. Figura representativa de muestras analizadas por triplicado.



**Figura 62:** Perfil proteico de la fracción nuclear de cerebro de *O. mykiss* expuestos a 3 mg/L de carbarilo. Gel-SDS: Calles: 1 y 7-control, 2 y 8-carbarilo, 3-control + ortovanadato, 4-carbarilo + ortovanadato, 5-control + genisteína, 6- carbarilo + genisteína. En cada calle se sembró 40µg de proteína. Gel correspondiente a autorradiografía presentada en la figura 61.

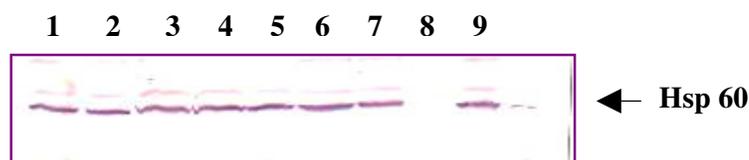
## 6. PROTEÍNAS DE ESTRÉS

Se evaluó la presencia de Hsps en cerebro de *C. auratus* luego de la exposición a los insecticidas MeAz, paratión y carbarilo y en cerebro, músculo e hígado de *O. mykiss* luego de la exposición a MeAz y carbarilo (secciones II-4.2.8 y II-8.3).

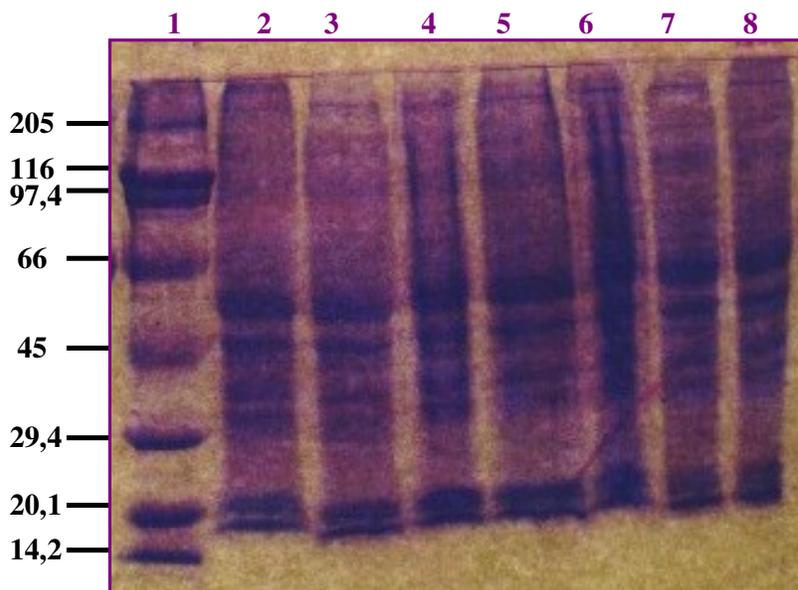
### 6.1 Proteína Hsp 60

La proteína Hsp60 se detectó en cerebro de carasius controles y expuestos a concentraciones crecientes de paratión (0,05 a 2,5 mg/L). Los niveles encontrados en cada tratamiento fueron semejantes a los hallados en el control (Figura 63). No existen por tanto, diferencias que evidencien inducción de dicha proteína por efecto del plaguicida. La banda proteica detectada por el anticuerpo tiene un peso molecular de aproximadamente 65 KDa.

Coincidentemente, los perfiles de proteínas totales analizados por electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida y teñidos con azul de Coomasie, no mostraron diferencias entre controles y expuestos al insecticida (Figura 64).



**Figura 63: Proteína Hsp 60 presente en cerebro de *C. auratus* controles y expuestos a paratión.** Calles: 1 y 9 - control, 2- Ptn 0,05 mg/L, 3- Ptn 0,10 mg/L, 4- Ptn 0,5 mg/L, 5- Ptn 1 mg/L, 6- Ptn 2,5 mg/L, 7- Ptn 5 mg/L. En cada calle se sembró 80  $\mu$ g de proteína. Figura representativa de muestras analizadas por triplicado.



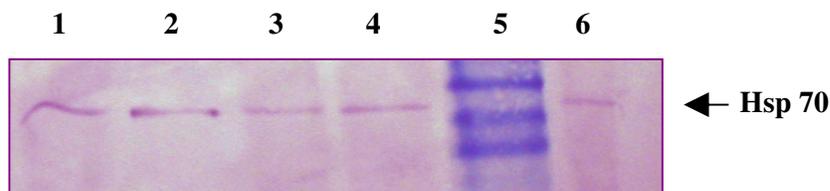
**Figura 64: Perfil proteico de homogenados totales de cerebro de *C. auratus*.** Calles: 1- Marcadores de PM (KDa), 2 y 8- control, 3- Ptn 0,05 mg/L, 4- Ptn 0,10 mg/L, 5- Ptn 1 mg/L, 6- Ptn 2,5 mg/L, 7- Ptn 5 mg/L. En cada calle se sembró 80  $\mu$ g de proteína. Gel representativo de muestras analizadas por triplicado.

Esta misma proteína Hsp 60 fue detectada en cerebro de *C. auratus* controles y expuestos a la concentración subletal de 0,1 mg/L de paratión y MeAz en “dot blot”. Coincidentemente no se observó inducción de la misma debido a la exposición a este insecticida. Los análisis de “dot blot” realizados con este mismo anticuerpo (contra Hsp 60) sobre muestras controles provenientes de cerebro, y músculo de *O. mykiss* revelaron la presencia de niveles constitutivos de estas proteínas en juveniles de esta especie.

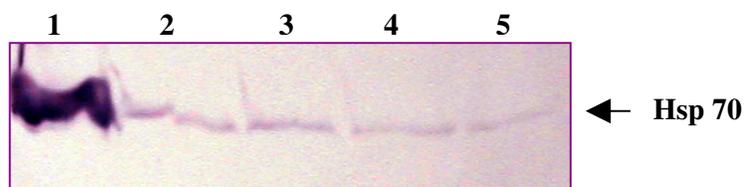
## **6.2 Proteína Hsp 70**

Los análisis realizados con el anticuerpo contra Hsp70 que reconoce únicamente la isoforma inducible de esa proteína no arrojaron resultados positivos en cerebro, músculo e hígado de carasius controles o expuestos a diferentes concentraciones de metil azinfos, pero sí detectaron de manera tenue la proteína Hsp70 recombinante humana utilizada como control positivo (datos no mostrados).

Al utilizar un anticuerpo contra Hsp70 que reconoce ambas isoformas, constitutiva e inducible, se detectó la presencia de esta proteína en cerebro de carasius controles y en expuestos a MeAz (3 y 7 mg/L) y a carbarilo (11, 14 y 17 mg/L) (Figuras 66 y 67). De igual forma a lo observado previamente para la proteína Hsp 60, no hubo inducción de Hsp 70 por efecto de los insecticidas MeAz y carbarilo, a las concentraciones y tiempos ensayados.

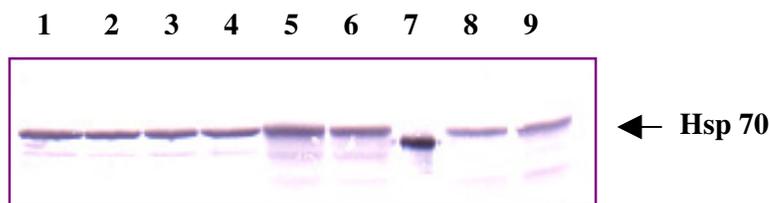


**Figura 65: Proteína Hsp/hsc 70 presente en cerebro de *C. auratus* controles y expuestos a MeAz.** Calles: 1- MeAz 7 mg/L, 2-Hsp70 recombinante humana, 3- Control, 4 - MeAz 3 mg/L, 5- marcadores de peso molecular (de arriba hacia abajo: 84, 58 y 48,5 KDa), 6-Rec MeAz 7 mg/L. Calles 2 a 5 se sembró 80  $\mu$ g de proteína. Figura representativa de muestras analizadas por triplicado.



**Figura 66: Proteína Hsp/hsc 70 presente en cerebro de *C. auratus* controles y expuestos a carbarilo.** Calles: 1- Hsp 70 recombinante humana, 2- control, 3-carbarilo 11 mg/L, 4- carbarilo 14 mg/L, 5- carbarilo 17 mg/L, Calles 2 a 5 se sembró 80  $\mu$ g de proteína. Figura representativa de muestras analizadas por triplicado.

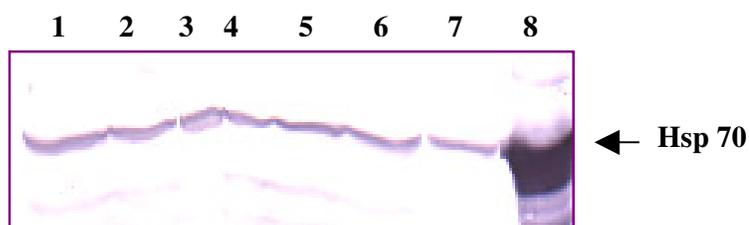
Los niveles de Hsp/hsc 70 en cerebro de *O. mykiss* luego de 96 horas de exposición a concentraciones crecientes de carbarilo no resultaron diferentes de los hallados en peces control. Tampoco se observó inducción de esta proteína en músculo por exposición a este insecticida (Figura 67). Coincidentemente, la exposición a MeAz no provocó la inducción de la proteínas Hsp/hsc 70 en cerebro o músculo de estos mismos peces (Figura 68). La exposición a concentraciones subletales de ambos insecticidas no generó inducción de esta misma Hsp en hígado de *O. mykiss* (Figura 69).



**Figura 67: Proteína Hsp/hsc 70 presente en cerebro y músculo de *O. mykiss* controles y expuestos a carbarilo.** Calles: 1-6: Muestras de cerebro. 1- control, 2- 3,5 mg/L carbarilo, 3- 4,55 mg/L carbarilo, 4- 5,9 mg/L carbarilo, 5- 6,78 mg/L carbarilo, 6- 10 mg/L carbarilo, 7- Hsp 70 recombinante humana, 8- control músculo, 9- 3,5 mg/L carbarilo músculo. Calles 1 a 6 se sembró 100  $\mu$ g de proteína, calles 8 y 9 se sembró 80  $\mu$ g proteína. Figura representativa de muestras analizadas por triplicado.



**Figura 68: Proteína Hsp/hsc 70 presente en cerebro y músculo de *O. mykiss* controles y expuestas a MeAz** Calles: 1-3 y 5-7: Muestras de cerebro. 1- control, 2- MeAz 10 $\mu$ g/L, 3- MeAz 12,5 $\mu$ g/L, 4- Hsp 70 recombinante humana, 5- control, 6- MeAz 1 $\mu$ g/L, 7-MeAz 5  $\mu$ g/L, 8- control músculo, 9- MeAz 10 $\mu$ g/L músculo. Calles 1-3 y 5-7: se sembró 100  $\mu$ g de proteína, calles 8 y 9 se sembró 80  $\mu$ g proteína. Figura representativa de muestras analizadas por triplicado.



**Figura 69: Proteína Hsp/hsc 70 presente en hígado de *O. mykiss* controles y expuestos a MeAz o carbarilo.** Calles: 1-control, 2- MeAz 5  $\mu$ g/L, 3- carbarilo 3 mg/L, 4- control + E<sub>2</sub>, 5- carbarilo 3 mg/L+ E<sub>2</sub>, 6 y 7- 1 $\mu$ g/L MeAz. Exposición *in vivo* durante 24 horas. El E<sub>2</sub> se suministró por inyección intraperitoneal 10  $\mu$ M (En cada calle se sembraron 100  $\mu$ g de proteína de sobrenadante de 40000  $\times$  g). Figura representativa de muestras analizadas por triplicado.

## IV. DISCUSIÓN

### 1. TOXICIDAD AGUDA

Los ensayos de toxicidad aguda realizados con *Carassius auratus* y *Oncorhynchus mykiss* revelaron que los juveniles de ambas especies resultaron más sensibles a los insecticidas OFs ensayados, que al carbarilo. Sin embargo, es necesario destacar que la toxicidad de ambas especies frente a los OFs evidenció diferencias importantes (Tablas 5 y 6). En efecto, los valores encontrados de 96-CL<sub>50</sub> muestran que los juveniles de trucha arcoiris (*O. mykiss*) resultaron extremadamente sensibles al insecticida MeAz, siendo el valor de CL<sub>50</sub> para esta especie 1000 veces menor que el hallado para los juveniles de carassius (*C. auratus*). La toxicidad del MeAz para juveniles de trucha arcoiris aclimatadas y presentes en los cuerpos de agua de las provincias de Río Negro y Neuquén, resultó similar a la informada para esta misma especie con ejemplares del hemisferio norte (Macek y Mc Allister 1970).

A partir del análisis del valor de 96-CL<sub>50</sub> obtenido en este estudio para *C. auratus* se demuestra que los juveniles de esta especie son mucho más tolerantes al MeAz que otras especies de peces. Efectivamente, los valores hallados en otros estudios revelan que los carassius resultaron 1304, 225, 112,5 y 10,35 veces más tolerantes que la trucha arcoiris (*O. mykiss*) (Johnson y Finley 1980); el pez momia *Fundulus heteroclitus* (Benke y col. 1974); fathead minnows *Pimephales promelas* (Geiger y col. 1990) y la carpa (*Cyprinus carpio*) (Pimentel 1971) respectivamente.

Para la especie *C. auratus*, la toxicidad del paratión y MeAz resultó similar, siendo el primero levemente (1,12 veces) más toxico. Al comparar la toxicidad de este insecticida con los valores hallados para otras especies se observa que el paratión resulta 18,0, 22,9 y 96,9 veces menos toxico para el carassius con respecto al pez mosquito (*Gambusia affinis*) (Chambers y Yarbrough

1974), la trucha arcoiris (*O. mykiss*) (Pimentel 1971) y el pez sol (*Lepomis macrochirus*) (US-EPA 1972).

El carbarilo resultó menos tóxico que los OFs para ambas especies. Sin embargo, la diferencia de toxicidad entre ambos grupos de insecticidas fue mucho mayor en trucha arcoiris, siendo el carbarilo 771 veces menos tóxico que el MeAz. Para el carasius la diferencia de toxicidad entre ambos insecticidas resultó solamente 2 veces menor para el carbarilo. Al comparar la toxicidad del carbamato en ambas especies se encuentra una marcada diferencia a lo ocurrido con el MeAz. Los valores de 96-CL<sub>50</sub> estimados para trucha arcoiris y carasius no resultaron tan diferentes, siendo de todas maneras 2,6 veces más sensible la trucha arcoiris.

De manera similar a lo observado para los OFs, el carbarilo resultó 18,7 y 2,05 veces menos tóxico para el carasius que para la perca (*Perca flavescens*) (Pimentel 1971), y el pez sol (*L. macrochirus*) (US-EPA 1972). Estos datos muestran que existen marcadas diferencias en la susceptibilidad a OFs y carbamatos entre especies de peces. Comparado con otras especies de peces de agua dulce el carasius puede ser considerado como relativamente tolerante a esas clases de insecticidas (Macek y Mc Allister 1970). Por el contrario la trucha arcoiris es considerada una de las más sensibles a estos compuestos (Chambers y Carr 1995), incluso dentro de los peces de agua fría en general más sensibles que los peces de aguas cálidas.

Por otra parte, si bien los juveniles de *C. auratus* demostraron ser más tolerantes a la exposición a insecticidas OFs y carbamatos de acuerdo a los resultados analizados previamente, resultan sensibles al compararlos con los valores de CL<sub>50</sub> hallados para otros organismos acuáticos como los embriones y larvas del sapo común (*Bufo arenarum*) (Ferrari y col. 2003). Las diferencias observadas entre los juveniles de peces y las larvas de *B. arenarum* podrían atribuirse a diferente sensibilidad de la enzima blanco, ya que las larvas no solo resultaron menos susceptibles que ambas especies de peces sino además menos sensibles a la inhibición de su ChE por exposición a los OFs MeAz y paratión y

al carbarilo. Coincidentemente, Shapira y col. (1998) señalaron la baja toxicidad del paraoxón hacia renacuajos de *Xenopus* atribuyendo sus resultados a la insensibilidad del sitio activo de la AChE de anfibios. Por este motivo si bien en estudios de riesgo ambiental se recomienda utilizar especies pertenecientes a diferentes taxones, sería más conveniente emplear juveniles de peces que embriones y larvas de anfibios para evaluar efectos anticolinésterásicos en cuerpos de agua superficiales.

La diferente susceptibilidad de las especies a la intoxicación con distintos plaguicidas OFs y carbamatos puede reflejar diferencias en la cinética de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los compuestos y/o diferencias en la sensibilidad de la enzima blanco acetilcolinesterasa (Chambers y Carr 1995).

Se discutirán a continuación aspectos referentes a la inhibición de esterasas de peces por exposición a insecticidas anticolinésterásicos y su relación con la mortalidad de estos organismos.

## **2 RELACIÓN ENTRE MORTALIDAD E INHIBICIÓN DE ESTERASAS**

### **2.1 Colinesterasas cerebral y muscular**

La sensibilidad de la ChE cerebral a la inhibición por OFs y carbamatos ha sido propuesta como el principal determinante de la toxicidad aguda *in vivo* (Matsumura 1985, Chambers 1992, Costa 1997). Sin embargo, los juveniles de carasius y de trucha arcoiris fueron capaces de sobrevivir a altas inhibiciones de la enzima, ya sea por exposición a concentraciones subletales de OFs o de carbarilo (Figuras 17-23), mientras que los efectos fisiológicos agudos se hicieron evidentes a concentraciones mayores cercanas a las respectivas 96h-CL<sub>50</sub>s. La CI<sub>50</sub> para la ChE cerebral de carasius expuestos a MeAz o paratión fue

140 veces menor que la correspondiente  $CL_{50}$ . Por lo tanto la insensibilidad relativa de estos peces a estos insecticidas no se podría relacionar con una captación reducida de estos compuestos, ya que la actividad enzimática resultó efectivamente inhibida de manera dependiente de la concentración. Del mismo modo, la  $CI_{50}$  para trucha arcoiris obtenida con carbarilo resultó 284 veces menor que su correspondiente  $CL_{50}$ . Los juveniles de trucha arcoiris expuestos a carbarilo fueron capaces de sobrevivir a una inhibición del 82% de su ChE cerebral sin experimentar mortalidad. No ocurre lo mismo en el caso del MeAz ya que para esta especie la diferencia entre  $CL_{50}$  y  $CI_{50}$  (16,6 veces menor) no fue tan importante. La cercanía entre  $CI_{50}$  y  $CL_{50}$  ocurre de manera similar para carasius frente al carbarilo, en este caso la primera es solo 5,3 veces menor que la segunda. Los resultados indican que la relación entre susceptibilidad e inhibición de ChE *in vivo* no puede generalizarse debido a que factores numerosos y complejos convergen en la acción tóxica.

La ChE cerebral de carasius resultó fuertemente inhibida a concentraciones subletales de ambos OFs ensayados. Concentraciones superiores a 0,1 mg/L causaron una inhibición casi total de la actividad enzimática. Para la trucha arcoiris, la inhibición a concentraciones de MeAz alejadas de las letales no fue tan marcada, sin embargo es importante considerar que se produce una alta inhibición (70%) a concentraciones varios ordenes de magnitud menores a las efectivas con carasius. Esto se evidencia al comparar las respectivas  $CI_{50}$  para el OF. La  $CI_{50}$  para ChE cerebral de trucha arcoiris fue dos ordenes de magnitud menor que la correspondiente a carasius (Tabla 7). Como se ha analizado previamente, la diferencia en susceptibilidad a este insecticida entre ambas especies es mucho mayor (tres ordenes de magnitud) señalando la divergencia entre inhibición de ChE y efectos letales.

El carbarilo en ambas especies fue un inhibidor menos potente de la ChE cerebral que los OFs, según las  $CI_{50}$  estimadas. Coincidentemente a lo que ocurre para el MeAz, la ChE de trucha arcoiris resultó más sensible que la

enzima de carasius a la inhibición por este insecticida. Efectivamente la  $CI_{50}$  fue 138 veces menor que la obtenida para carasius.

Weiss (1958) señaló que la inhibición de ChE tan baja como un 8% era letal para algunas especies de peces mientras que otras sobrevivían. Weiss (1961) y Zinkl y col. (1991) propusieron que a la  $CL_{50}$  la depresión de la actividad de ChE cerebral era de un 70-90%. Sin embargo los resultados obtenidos con carasius y trucha arcoiris demuestran que esos porcentajes de inhibición de ChE pueden ocurrir a concentraciones subletales y pueden ser tolerados por los peces sin producirse mortalidad. Resultados similares han sido informados en otras especies de peces (Fulton y Key 2001, Gruber y Munn 1998, Heath 1987).

En vertebrados terrestres y acuáticos la inhibición de AChE cerebral por exposición a OFs o carbamatos tanto *in vivo* como *in vitro* así como de otras colinesterasas, y su correlación con la toxicidad aguda ha sido objeto de numerosos estudios (Sanchez-Hernández y Walker 2000, Coppage 1972). Los niveles de inhibición de AChE para provocar la mortalidad varían entre los diferentes grupos de vertebrados, en general los mamíferos y aves soportan una inhibición entre 40-60%, mientras que en los peces existe una gran variabilidad entre las especies. Corroboramos aquí que algunas especies de peces son capaces de soportar más de 80-90% de inhibición de AChE cerebral sin experimentar mortalidad (Fulton y Key 2001, Chambers y Carr 1995, Heath 1987).

Al comparar los gráficos de inhibición de ChE cerebral y muscular de trucha arcoiris en función de la concentración de ambos insecticidas MeAz y carbarilo, se observa que la ChE muscular es menos sensible a la inhibición a concentraciones subletales. Esto se comprueba al comparar las  $CI_{50}$  correspondientes (0,42 y 1,05  $\mu\text{g/L}$  para cerebro y músculo frente a MeAz; 19,24 y 270  $\mu\text{g/L}$  para cerebro y músculo frente a carbarilo) (Tabla 7). Sin embargo a

concentraciones iguales o superiores a la  $CL_{50}$  se observa una inhibición semejante o incluso mayor a la observada en cerebro.

Fulton y Key (2001) han señalado que la sensibilidad de la enzima ChE de músculo en varias especies es semejante a la de cerebro mientras que en otras especies se ha visto que puede ser mucho menos sensible. En mamíferos la causa de la muerte inducida por la inhibición de AChE cerebral se debe a la falla respiratoria (Chambers y Carr 1995), la cual podría ser también un problema en los peces. Si la inhibición de AChE es realmente el mecanismo de toxicidad aguda, debe asumirse que algún pool esencial de AChE debe llegar a un nivel umbral de inhibición antes de que ocurra la muerte. Pero Perkins y Schlenk (2000) comprobaron que no existían diferencias en la actividad de AChE en peces vivos y muertos indicando que la sola reducción de su actividad no es suficiente para causar la muerte. Estos autores encontraron que la AChE muscular del bagre (*Ictalurus punctatus*) no fue afectada de manera significativa a bajas concentraciones del insecticida carbamato aldicarb mientras que la enzima cerebral resultaba inhibida en un 63%, por lo cual sugieren que la inhibición de AChE muscular es un factor más importante en la mortalidad de estos silúridos expuestos, ya que ésta representa el pool más grande de ChE en el cuerpo del pez y resulta importante al controlar la función muscular. En este sentido, Bretau y col. (2000) encuentran mayor actividad de ChE en el músculo de carasius no expuestos comparada con la actividad cerebral. Asimismo, informan que el insecticida carbamato, carbofuran, a bajas concentraciones, inhibe de manera significativa la ChE cerebral pero no la enzima muscular. Coincidentemente, nosotros hemos demostrado que en *O. mykiss* existen diferencias en la sensibilidad frente a MeAz y carbarilo de la enzima blanco de cerebro y músculo (Tabla 7). En efecto, se requieren concentraciones mayores de ambos insecticidas para lograr una inhibición significativa de la enzima muscular (Figuras 20-23). Esto sustentaría la propuesta de una mayor importancia de la enzima muscular en la determinación de la mortalidad en peces. Sin embargo, los juveniles de esta especie son capaces de sobrevivir con inhibiciones superiores al 70% de la enzima muscular. De manera similar,

Bretau y col. (2000) observaron que a concentraciones mayores del insecticida carbofuran (500 µg/L) se consigue una inhibición del 86-93% de la ChE muscular sin que se produzca mortalidad alguna de los peces. Por lo cual, la relación entre inhibición de ChE muscular y mortalidad en peces aun no se ha podido establecer de manera clara, si bien en nuestro sistema queda claro que a las concentraciones en que se inhibe la enzima muscular ya se encuentra fuertemente inhibida la enzima de cerebro.

## 2.2 Aliesterasas

La enzima AliE hepática resultó significativamente inhibida en presencia de concentraciones subletales de MeAz y carbarilo. Las AliEs son generalmente más sensibles a la inhibición por OFs que por carbamatos (Jokanović 2001). En nuestro caso debido a las grandes diferencias de susceptibilidad que presentan los juveniles de trucha arcoiris a estos dos insecticidas, las concentraciones de carbarilo empleadas fueron 3 órdenes de magnitud mayores que las de MeAz, por lo cual si bien los porcentajes de inhibición observados son mayores para el carbarilo la sensibilidad al OF resulta mucho mayor (Figuras 24 y 25).

La cinética de inhibición de la enzima por el carbamato resultó más rápida, hecho que se puede adjudicar en parte a que este compuesto no requiere activación para ejercer su acción antiesterásica, a diferencia del MeAz. En este ultimo caso la inhibición obtenida luego de 24 horas de exposición resultó menor que la alcanzada a tiempos mayores (48 y 96 horas) (Figura 24).

La baja velocidad de inhibición de la AliE hepática en presencia de MeAz señala además que estas enzimas no ofrecen una protección importante a las ChEs cerebrales o musculares frente a este insecticida. Esto mismo fue observado en ejemplares del pez mosquito (*Gambusia affinis*) expuestos a metil paratión, en los cuales la inhibición de las ChEs cerebrales y musculares fue mayor y más rápida que la correspondiente a las AliEs hepáticas (Boone y Chambers 1996). Sin embargo, estos autores encontraron que las AliEs de peces

resultaron capaces de proveer una efectiva protección contra otros OFs (Boone y Chambers 1996, 1997). La mayor rapidez de inhibición de las AliEs hepáticas de *O. mykiss* frente a carbarilo sumado a una sensibilidad semejante de estas con respecto a la ChEs cerebral y muscular muestra que en este caso sí ofrecen protección actuando como blancos primarios alternativos.

La utilidad de estas enzimas como biomarcadores de exposición a OFs y carbamatos ha sido revalorizada actualmente, fundamentalmente la actividad presente en plasma que sirve como biomarcador no destructivo (Sanchez y col. 1997). Por otra parte, se ha comprobado que la inhibición de las AliEs hepáticas por OFs y carbamatos provoca una disminución en la capacidad detoxificante de otros compuestos contaminantes. La exposición a combinaciones de OFs y piretroides genera en larvas de peces un efecto sinérgico debido a la disminución en la detoxificación de estos últimos por parte de las AliEs. (Denton y col. 2003).

Por tanto, las AliEs son importantes no sólo como blanco específico de OFs y carbamatos sino debido al papel que ocupan en la detoxificación de estos mismos agentes y de otros compuestos que poseen ésteres carboxílicos.

### **3. INHIBICIÓN Y RECUPERACIÓN DE ESTERASAS**

#### **3.1 Colinesterasas cerebral y muscular**

Los juveniles de *C. auratus* fueron capaces de sobrevivir luego de 96 horas de exposición a MeAz o paratión con una inhibición de la ChE cerebral entre 77 y 95%. En ambos casos más de 35 días de recuperación en agua libre de insecticida son necesarios para restaurar la mayor parte de la actividad enzimática (Figuras 26 y 27). El tratamiento con carbarilo a concentraciones 30 veces mayores produjo una inhibición menos pronunciada de la enzima en el periodo de exposición de 96 horas, y la recuperación posterior resultó mucho más rápida (Figura 28). La duración del efecto luego de la exposición subletal

no sólo es dependiente de la concentración sino también del compuesto (Sancho y col. 1997). La recuperación luego de la exposición a carbarilo ocurre en menos de una semana mientras que los tiempos de recuperación para OFs deben multiplicarse por cuatro o más.

La inhibición perdurable de ChE observada con MeAz y paratión, junto a su baja tasa de reactivación espontánea y su capacidad de envejecimiento (Wallace 1992) indica que la recuperación de la enzima cerebral de *carasius* debe ocurrir mayoritariamente por nueva síntesis de enzima. Sin embargo, la contribución del proceso de recuperación para explicar las diferencias en susceptibilidad observada en el *carasius* parece ser mínima ya que cinéticas similares de recuperación han sido descriptas para especies con  $CL_{50}$  menores y con correlaciones más cercanas entre inhibición de ChE y mortalidad (Sancho y col. 1997, Boone y Chambers 1996, Benke y Murphy 1974).

Efectivamente, un comportamiento similar se observó en ChE cerebral de trucha arcoiris expuestas a una concentración subletal de MeAz 100 veces menor que la empleada en los ensayos con *carasius*. Estos peces sobrevivieron a una inhibición de ChE cerebral del 70% obtenida luego de 96 horas de exposición, y luego de 21 días de recuperación en agua libre de insecticida no se logró la restauración de la actividad enzimática a los valores controles (Figuras 30 y 31). Similarmente a lo ocurrido con *carasius*, la exposición de juveniles de arcoiris a una concentración 6 veces menor de carbarilo, produjo una inhibición importante (80%) de la ChE cerebral pero su recuperación resultó más rápida alcanzándose los valores controles en aproximadamente 4 días (Figuras 32 y 33). Por tanto, si bien las concentraciones utilizadas con esta especie son menores a las empleadas con *carasius*, las cinéticas de inhibición y recuperación de la enzima luego de la exposición a MeAz y carbarilo resultan semejantes entre ambas especies y no aportan elementos para explicar las diferencias encontradas para las mismas en la susceptibilidad a estos compuestos.

La enzima muscular de trucha arcoiris, sin embargo, presentó diferencias con respecto a la cerebral luego de la exposición a MeAz. En el período de

recuperación, no se observó restauración de la actividad enzimática significativa aún luego de 21 días de la transferencia de los peces a medio no contaminado. Debido a que el principal mecanismo de recuperación de la actividad en el caso de la enzima fosforilada ocurre por síntesis de nueva enzima, es probable que las diferencias observadas se deban a desiguales tasas de síntesis de ChE asociada a cada tejido u órgano específico.

El perfil de inhibición y recuperación de la actividad muscular de *O. mykiss* expuestas a carbarilo resultó semejante al obtenido con la ChE cerebral. La restauración de la actividad enzimática a valores normales se alcanzó luego de 4 días de recuperación. Coincidentemente, el comportamiento de la enzima muscular de carasius expuestos a carbarilo, mostró un perfil similar al de la ChE cerebral de esa especie. La recuperación de la actividad de ChE inhibida por carbarilo, u otros carbamatos, puede ocurrir a través de reactivación espontánea y nueva síntesis de enzima. En los experimentos realizados la enzima de carasius y de trucha aumentó su actividad luego de pocas horas de transferidos a medio sin insecticida. La rápida recuperación de la actividad de la enzima inhibida por carbarilo se puede atribuir a la alta velocidad de reactivación espontánea de la ChE carbamilada y a la ausencia de envejecimiento (Costa 1997). Kuhr y Dorrough (1976) informaron un tiempo de vida media para la reactivación de la enzima carbamilada de 30-40 minutos, resultando en una recuperación completa luego de algunas horas. Sin embargo, en ambas especies de peces, tanto en cerebro como en músculo, luego del aumento inicial de la actividad de ChE, se necesitó tiempo extra de varios días para lograr una total recuperación de la actividad enzimática. Esto sugiere que ambos mecanismos, la reactivación espontánea y la síntesis *de novo* de enzima participan en el proceso completo de restauración de la actividad.

Las cinéticas de inhibición y recuperación de la actividad de ChE obtenidas para *O. mykiss* y *C. auratus* ejemplifican el comportamiento de esta enzima frente a una exposición continua a una concentración subletal seguida

de período variable de recuperación en agua libre de tóxico. Sin embargo, la exposición de las comunidades acuáticas a los contaminantes frecuentemente ocurre en pulsos siguiendo los ritmos reales de aplicación de los productos más que de manera continua. Algunos estudios han mostrado que el impacto de la exposición en pulsos de organismos acuáticos a contaminantes puede resultar bastante diferente de la exposición continua (Kallander y col. 1997, Parson y Surgeoner 1991, Siem y col. 1984). Los ensayos realizados en el presente trabajo de exposición reiterada de juveniles de *O. mykiss* a una concentración subletal de MeAz (1 µg/L) simulan la entrada del insecticida a los cuerpos de agua aledaños a las zonas de cultivo como consecuencia de las fumigaciones seguidas de lluvia o riego abundante. En concordancia con lo observado en los ensayos de exposición continua, la actividad de ChE cerebral y muscular se vio fuertemente inhibida en cada pulso de contaminación y los 7 días de recuperación subsiguientes en medio sin insecticida no fueron suficientes para lograr la restauración de la misma (Figuras 36 y 37). La nueva exposición al insecticida OF provocó en cada caso la inhibición de las ChEs y consecuentemente una demora en el tiempo de recuperación. Luego de 21 días de la primera exposición persistió un elevado porcentaje de inhibición (40%). Sin embargo, no se pudo observar un aumento en la susceptibilidad de los peces ni en la sensibilidad de la enzima cerebral y muscular debido a las exposiciones reiteradas al insecticida. La preexposición al compuesto no produjo adaptación apreciable, la capacidad de recuperación de la actividad de ChE en cada uno de los períodos subsiguientes a cada exposición no disminuyó o aumentó significativamente. Esto mismo se evidenció al analizar el perfil de esterasas totales por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. La disminución de la actividad por exposición a MeAz se produjo de igual manera en todas las bandas detectadas, tanto la que presentaba actividad colinésterásica como las correspondientes a AliEs, y esto se repitió de igual forma en las sucesivas exposiciones sin observarse cambios con respecto a la primera exposición (Figura 39). Durante el primer período de recuperación no se advirtió la aparición de nuevas bandas con actividad o el incremento mayor

de actividad de unas con respecto a las otras del perfil, y esto mismo se observó en los períodos siguientes de recuperación sin producirse cambios con respecto al primero.

Coincidentemente con lo observado en los ensayos de inhibición y recuperación luego de una sola exposición a MeAz, tanto la inhibición como la posterior recuperación de la actividad de la enzima muscular resultan menores que la cerebral.

Los resultados indican que la tasa de síntesis *de novo* de enzima en ambos órganos, principal modo de recuperación de la actividad de la enzima fosforilada, no resultó afectada por la exposición en pulsos.

### **3.2 Aliesterasas**

Al analizar el perfil de inhibición y recuperación de AliE cerebral por exposición a MeAz se observa una inhibición menor y más lenta de esta enzima con respecto a las ChEs cerebral y muscular (Figura 34) que podría deberse a una menor afinidad de esta enzima por este OF, lo cual disminuiría su papel protector de las ChEs como blanco alternativo. El perfil de recuperación de la actividad luego de la exposición a MeAz (Figura 34) resulta semejante al observado para las ChEs (Figuras 30 y 31) indicando que ocurre fundamentalmente por síntesis *de novo* de enzima. En el caso del carbarilo se observó una recuperación de la actividad enzimática aún antes de transferir los juveniles a medio libre de insecticida (Figura 35). El aumento rápido y significativo de actividad se asocia fundamentalmente con la reactivación espontánea por hidrólisis, de manera similar a lo ocurrido con la ChE de *C. auratus* y *O. mykiss*. La reactivación de AliE cerebral resulta en este caso más rápida, lo cual se corresponde con la mayor tasa de reactivación adjudicada a estas enzimas (Jokanović 1996, Dettbarn y col. 1999). Sin embargo no se logra la recuperación total de la actividad enzimática indicando que se requiere además la síntesis de nueva enzima para alcanzar los valores de actividad control. El escaso incremento de la actividad durante el período subsiguiente a la

exposición a carbarilo en concordancia con lo observado para MeAz, sugiere una baja velocidad de síntesis de nueva enzima.

#### **4. UTILIDAD DE CHE COMO BIOMARCADOR A CAMPO**

En general, las diversas ChE presentes en los peces teleósteos resultan buenos biomarcadores de exposición a agentes anticolinesterásicos en estudios de monitoreos a campo (Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot 2000, Kirby y col. 2000, Sturm y col. 1999, Gruber y Munn 1998). La enzima ChE, se considera un biomarcador específico para los insecticidas carbamatos y OFs (Edwards y Fisher 1991). Sin embargo, recientemente se ha cuestionado su especificidad (Guilhermino y col. 1998), debido a que algunos estudios revelan inhibiciones de estas enzimas provocadas por la presencia de contaminantes no considerados agentes anticolinesterásicos. En este sentido, varios autores han observado inhibiciones significativas a campo y en estudios de laboratorio por exposición a metales como el cadmio, cromo o mercurio, detergentes y surfactantes o diferentes herbicidas (Ferrari y col. 2002, Hassanein 2002, De la Torre y col. 2000, Bretauud y col. 2000, Guilhermino y col. 1998). Hay que destacar, sin embargo, que los porcentajes de inhibición alcanzados luego de cortas exposiciones a concentraciones subletales de agentes anticolinesterásicos son significativamente mayores que los producidos por otros contaminantes. En el presente estudio, los altos porcentajes de inhibición de esta enzima observados tanto en carasius como en trucha arcoiris, por exposición a concentraciones subletales de MeAz, paratión y carbarilo, sustentan su validez como biomarcador específico. Señalan asimismo sus ventajas debido a que es altamente sensible y revela la presencia de los tóxicos de manera temprana, sin que se observe mortalidad, e incluso a concentraciones muy alejadas de las que producen los efectos toxicológicos agudos.

Además, la prolongada inhibición de la ChE de carasius y trucha arcoiris luego de exposición a concentraciones subletales de los OFs, remarca su

utilidad como biomarcador de exposición/efecto de estos plaguicidas. Efectivamente, un breve y bajo pulso de contaminación de cuerpos de agua con estos compuestos provocaría una disminución de la actividad enzimática de ChE, la cual sería estable por mucho tiempo, incluso cuando la presencia del compuesto tóxico no pudiera ser detectada por métodos analíticos.

Debido a su uso como biomarcador es importante conocer los factores que puedan afectar de manera natural los valores de actividad de estas enzimas en los diversos organismos. En este sentido numerosos investigadores han evaluado el efecto de diversos parámetros físico-químicos sobre la actividad de la ChE basal en diferentes especies de peces (Rattner y Fairbrother 1991, Booth y col. 2000, Beauvais y col. 2002, Phillips y col. 2002a). Generalmente la actividad de ChEs de peces resulta estable frente a variaciones de temperatura, no se modifica por anestésicos o por almacenamiento en frío y sólo puede sufrir variaciones al existir diferencias marcadas en el tamaño y largo total de los peces (Beauvais y col. 2002, Richmonds y Dutta 1992).

La relevancia de la ChE de peces como biomarcador que permita predecir efectos deletéreos a niveles de organización mayores podría discutirse debido a la falta de correlación con la mortalidad analizada previamente. Sin embargo, si bien en el laboratorio altas inhibiciones de ChE no provocan mortalidad, hay que tener en cuenta que varios estudios han correlacionado la inhibición de estas enzimas con alteraciones importantes del comportamiento. Beauvais y col. (2000 y 2001) observaron en ejemplares de trucha arcoiris una correlación positiva entre actividad de ChE y velocidad de natación, así como también con la distancia alcanzada, ambos parámetros eran afectados por la exposición a carbarilo y malatión. Saglio y col. (1996) y Bretaud y col. (2002) muestran en carasius alteraciones de comportamiento luego de exposiciones cortas a concentraciones subletales del carbamato carbofuran capaces de provocar inhibiciones significativas de la AChE cerebral. Las alteraciones más frecuentes corresponden a incremento en las actividades de búsqueda de refugio y alteraciones diversas en la conducta natatoria de los peces,

disminuyendo además la atracción por el alimento; si bien estos efectos se revierten luego de cierto tiempo de exposición posiblemente por efectos compensatorios. Dutta y col. 1992 observaron en pez sol (*L. macrochirus*) modificaciones significativas en el comportamiento optomotor necesario para la búsqueda de comida, orientación hacia el olor y huida de los predadores debido a la inhibición de la AChE cerebral por exposición al OF diazinon. Las notorias modificaciones del comportamiento asociadas a la inhibición de la ChE señalan que, en las condiciones imperantes a campo, la reducción de la actividad de esta enzima podría disminuir las probabilidades de supervivencia de los peces. Esta reducción podría deberse a la incapacidad de huir de un predador, de buscar alimento, de atraer parejas o de migrar; provocando en ultima instancia también una disminución en la densidad de las poblaciones (Beauvais y col. 2000 y 2001, Dutta y col. 1992, Grue y col. 1991). Por tanto, la ChE se considera actualmente no solo un buen biomarcador de exposición/efecto sino también un indicador de probable efecto a nivel ecológico. Actualmente se considera cada vez más relevante encontrar vinculaciones entre los biomarcadores a nivel bioquímico y las implicancias a niveles mayores de complejidad ecológica, a fin de predecir con mayor exactitud el impacto de los contaminantes sobre las poblaciones (Van der Oost y col. 2003).

## **5. BIODISTRIBUCIÓN DEL PARATIÓN**

El ensayo de exposición de *C. carpio* a <sup>14</sup>C-paratión señala el papel del hígado como órgano crítico concentrador del insecticida (Figura 40). La concentración del insecticida en el hígado ocurre tempranamente desde las 24 horas iniciales y persiste hasta la finalización del ensayo, sin observarse una redistribución a otros órganos. A diferencia de lo ocurrido con el paratión, estudios de toxicocinética de metales realizados en carpa y otros peces señalan que inicialmente estos compuestos se acumulan en el hígado y posteriormente existe una redistribución al riñón a mediano y largo plazo (Schultz y col. 1996, Ferrari y col. 2002). La concentración hallada en los otros órganos analizados así

como en el pez entero, no varia significativamente durante el tiempo de exposición señalando que se alcanza rápidamente, en un tiempo menor a 24 horas, el estado estable de manera similar a lo ocurrido en hígado. Esto mismo fue observado en ejemplares de anguila europea expuestas a concentraciones similares del OF fenitrotión (Sancho y col. 1998).

A pesar del papel del hígado como órgano bioconcentrador, considerando los biomarcadores analizados, la única manifestación significativa de daño hepático a causa de la concentración subletal de paratión fue la disminución de proteínas totales (Tabla 8). Si las concentraciones de GSH se expresan en base al contenido de proteína total, resultan significativamente aumentadas en hígado de pez expuesto ( $5,35 \pm 0,001$  nmol/ mg proteína en controles vs  $9,85 \pm 0.002$  nmol/ mg proteína a las 48 horas de exposición), actuando también como biomarcador de efecto.

El cerebro concentró paratión en forma semejante a branquias y otros tejidos, pero se comportó como principal órgano blanco, presentando una inhibición de AChE del 86% al 89% durante todo el experimento (Tabla 8). La ChE de carpa se comportó de manera semejante a lo observado en *C. auratus* expuestas a la misma concentración de este insecticida, presentando a las 96 horas una inhibición del 90%. Coincidentemente a lo observado en carasius, pese a los altos niveles de inhibición de la ChE cerebral de carpa, no se registró mortalidad ni se observaron signos externos visibles de intoxicación aguda que delatasen la exposición al insecticida. Esto ultimo remarca nuevamente la disociación entre inhibición de ChE cerebral y mortalidad considerada previamente.

La toxicocinética sugiere que si bien este OF es bioconcentrado en hígado, la detección temprana de contaminación por niveles subletales a través de biomarcadores puede ser más adecuada en órganos diana, como cerebro. No obstante, la alta capacidad de bioconcentración de insecticida observada en el hígado revaloriza la búsqueda de indicadores hepáticos.

## 6. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA ANTIOXIDANTE

Los sistemas de defensa antioxidante, presentes en todas las células aeróbicas, neutralizan los intermediarios reactivos de compuestos químicos generados por vías metabólicas endógenas y/o metabolismo de xenobióticos. (Winston y Di Giulio 1991). Estos sistemas están involucrados asimismo en reacciones enzimáticas que eliminan compuestos químicos o metabolitos electrofílicos, y reducen peróxidos orgánicos (Yu 1994). Es importante destacar que la actividad de los sistemas antioxidantes puede verse tanto incrementada como inhibida bajo estrés químico, y que la naturaleza de la respuesta depende de la intensidad y duración del estrés aplicado así como de la susceptibilidad de los organismos expuestos.

Los resultados obtenidos luego de la exposición de juveniles de *O. mykiss* a concentraciones subletales de MeAz y carbarilo señalan, con algunas diferencias, efectos relevantes sobre el sistema de defensa antioxidante, y destacan el papel de este sistema en la modulación de los efectos tóxicos de estos insecticidas. Asimismo, remarcan su utilidad como biomarcadores para este caso particular, en concordancia con lo establecido para otros compuestos xenobióticos (Pandey y col. 2003, Almar y col. 1998, Bainy y col. 1996).

Las deficiencias en el sistema antioxidante y las alteraciones en la actividad de enzimas involucradas en el estrés oxidativo observadas en *O. mykiss* por exposición a insecticidas afectan además la capacidad de sus células de defenderse y responder a estrés oxidativo inducido por otros contaminantes.

El MeAz a concentraciones subletales es capaz de producir una disminución significativa del contenido de GSH endógeno tanto en hígado como en riñón de juveniles de *O. mykiss*. La máxima caída se observó luego de 48 horas de exposición (Figuras 41 y 42). La disminución del contenido de GSH hepático también se produjo por exposición a carbarilo alcanzando un 50% de

disminución a la concentración más alta ensayada (Figura 43). En riñón se observa un comportamiento similar (Figura 44).

El GSH es un antioxidante esencial que actúa tanto de manera directa como reductor así como también como sustrato de enzimas antioxidantes y asegura la reducción de oxidantes y la neutralización de peróxidos. El GSH no sólo es un cofactor esencial de varias enzimas como las GST y GPx sino también un “barredor” directo de oxiradicales (Regoli y Wiston 1999). Debido a que este tripéptido es uno de los principales compuestos antioxidantes presentes en la célula, su disminución conduce a un desbalance del equilibrio redox y disminuye la capacidad de protección frente a otros xenobióticos, principalmente frente a aquellos metabolizados por enzimas detoxificantes que lo utilizan como cofactor. Efectivamente, proponemos que la disminución significativa de este tripéptido producida por OFs y carbamatos en *O. mykiss* conduce a una situación de estrés oxidativo y resulta extremadamente perjudicial para la homeostasis celular.

Dierickx (1998) encontró una disminución del contenido de GSH en células FHM de peces por tratamiento con 27 compuestos químicos diferentes, incluyendo metales tóxicos, aldehídos, ácidos orgánicos, y compuestos inorgánicos. El alto número de compuestos químicos que provocan una depleción del GSH endógeno en estas células confirma la importancia generalizada de este tripéptido en los procesos de detoxificación (Chasseaud 1979). Coincidentemente con los resultados mostrados, la exposición a insecticidas produce el mismo efecto sobre el GSH en otros organismos. Anguiano y col. (2001) observaron una disminución importante del GSH en larvas del sapo común *Bufo arenarum* expuestos a diversos plaguicidas. En este caso los autores encontraron una correlación entre los niveles disminuidos del tripéptido y el aumento de la actividad de la enzima GST. Hai y col. (1997a) observaron una disminución en el contenido de GSH en hígado y riñón de carpas expuestas al OF diclorvos. Banks y Soliman (1997) demostraron que el herbicida carbamato benomil produce la reducción significativa del contenido de GSH hepático conjuntamente con el aumento de hidroperóxidos séricos en

ratas y Della Morte y col. (1994) encontraron asimismo disminuciones importantes del GSH en estos organismos causadas por el OF metil paratión. Finalmente, en diferentes especies de invertebrados bivalvos marinos, el plaguicida fenitrotión provocó una disminución significativa del contenido de GSH en la glándula digestiva, músculo y branquias, y la relación entre glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) se encontró fuertemente correlacionada con la mortalidad (Peña-Lopis y col. 2002).

La reducción del contenido de GSH ha sido asociada con aumento de la mortalidad en diversos organismos, mientras que la capacidad de mantenimiento de valores altos de este compuesto ha demostrado otorgar resistencia a plaguicidas (Peña-Lopis y col. 2002). En este sentido, niveles de depleción del GSH semejantes a los observados en este estudio causan pérdida de viabilidad embrionaria en *B. arenarum* (Venturino 1995). Adicionalmente, Peña y col. (2000) encontraron que los ejemplares de anguila europea (*Anguilla anguilla*) capaces de inducir la síntesis de GSH en el hígado debido a la exposición a tiobencarb mostraban una mayor longevidad que aquellas que perdían la homeostasis del glutatión. De igual manera, anguilas expuestas al herbicida molinato mostraron una correlación positiva entre el contenido de GSH y el tiempo transcurrido hasta la muerte de los organismos (Peña-Lopis y col. 2001). El deterioro en el estado redox del glutatión puede derivar en la inducción de muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis conduciendo en última instancia a la muerte del organismo.

La depleción del GSH observada en este trabajo por exposición a MeAz y a carbarilo podría asociarse a la oxidación del mismo por parte de la enzima glutatión peroxidasa como respuesta a un aumento de radicales libres, así como a una oxidación no enzimática por acción directa de algunos de estos compuestos (Almar y col. 1998, Hai y col. 1997b). Además, la caída del contenido de GSH provocada por el MeAz o su metabolito activo MeAz oxón puede atribuirse, en parte, al empleo de este tripéptido como sustrato de la enzima GST para las reacciones de conjugación detoxificantes de fase II, como se discutirá más adelante.

Por otra parte, se observó en los peces expuestos a la máxima concentración ensayada de MeAz una recuperación hasta alcanzar los valores controles, luego de la caída inicial del contenido de GSH hepático (Figura 41). Este hecho señala un probable efecto del estrés oxidativo sobre las enzimas que sintetizan el GSH (Mulcahy y col. 1997). Ciertamente las enzimas que participan en la síntesis de GSH se encuentran reguladas por este tripéptido, por lo cual luego de una disminución inicial del mismo, puede existir una regulación positiva de las enzimas que participan en su síntesis (Choi y col. 1997). Algunos estudios previos han demostrado asimismo, la importancia de la duración de la exposición a xenobióticos en el efecto de los mismos sobre el contenido de GSH. En este sentido, tres días de exposición de peces a fuel oil disminuye los niveles de GSH, mientras que luego de 21 días de exposición estos resultan incrementados (Steadman y col. 1991). Hayes y McMellan (1999) han señalado que la inducción de enzimas involucradas en la biosíntesis del GSH conduce a un incremento en los niveles celulares de este tripéptido lo cual provee de una capacidad buffer contra el daño oxidativo. Algunos estudios informan incrementos en el contenido de GSH inducidos por contaminación. Pandey y col. (2003) sostienen que los altos niveles de GSH encontrados en el pez de río *Wallago attu* proveniente de zonas contaminadas indican el papel protector y adaptativo del GSH contra el estrés oxidativo inducido por compuestos químicos. Coincidentemente, Lindström-Seppä y col. (1996) afirman que los niveles incrementados de GSH en hígado, corazón, músculo y sangre de *O. mykiss* muestran la capacidad de este pez para lidiar con el estrés oxidativo provocado por estrés físico. Stephensen y col. (2002) evaluaron el contenido de GSH hepático de *O. mykiss* luego de la exposición a paraquat y menadiona y observaron aumentos significativos con respecto a los valores controles. En el presente estudio, la disminución en el contenido de GSH por exposición a carbarilo fue más relevante al finalizar el ensayo por lo cual no fue posible observar recuperación alguna debida a retroalimentación.

Conjuntamente con el análisis del contenido de GSH en hígado y riñón de juveniles de *O. mykiss* se evaluó el comportamiento de las enzimas GST por exposición a MeAz y carbarilo. Estas enzimas son trascendentales en la detoxificación de xenobióticos actuando como enzimas conjugantes de fase II y están implicadas en el metabolismo de estos insecticidas. En nuestro laboratorio se ha demostrado la importancia de esta vía en el establecimiento de tolerancia a OFs en anfibios (Anguiano y col. 2001, Venturino 1995). Los OFs comúnmente metabolizados por esta vía son los derivados metilados, como es el caso del MeAz o del malatión. Además, la metabolización de estos compuestos por esta enzima de fase II ha sido comprobada en varias especies de vertebrados (Ecobicon 1982). El carbarilo, sin embargo es detoxificado preferentemente por hidrólisis o por conjugación con glucurónidos por las UDP-glucuroniltransferasas (UDPGT) (Matsumura 1985). No obstante, se ha observado la carbamilación del grupo sulfhidrilo del GSH liberándose el metabolito 1-naftol, en una reacción semejante a la que ocurre en la inhibición de las esterasas (Baille y Slatter 1991). La presencia de las enzimas GST en peces resulta importante, y a pesar de que existe cierta variabilidad entre especies su actividad es comparable a la encontrada en mamíferos (George 1994). La mayoría de las isoformas de GST descritas son citosólicas, sin embargo en trucha arcoiris y otras especies de peces se ha encontrado una forma microsomal hepática (Nimmo y col. 1981). Por otra parte, es importante destacar que algunas isoenzimas exhiben actividad peroxidasa (GSTpx) (Ketteler y col. 1983).

Los resultados obtenidos con truchas expuestas a MeAz señalan una falta de inducción de las enzimas GST hepáticas y renales (Figuras 45 y 46). Es sabido que las enzimas GSTs pueden ser inducidas por compuestos prooxidantes y/o electrófilos a través del elemento de respuesta antioxidante (ARE), por lo cual son utilizadas como biomarcadores (Hayes y Mc Lellan 1999). Los genes que son regulados por el ARE codifican proteínas que ayudan en el control del estado redox celular y defienden a la célula contra el daño oxidativo (Nguyen y col. 2003). El MeAz es un compuesto metabolizado por la

vía detoxificante que involucra a las GST y el GSH (Ecobicon 1992). Sin embargo no fue posible observar inducción por exposición a este insecticida. Coincidentemente con nuestros resultados, concentraciones subletales de MeAz no produjeron inducción de la enzima GST en hígado y riñón de la carpa (*C. carpio*) (Oruç y Üner 2000). Sin embargo, en diversos vertebrados, se han observado alteraciones en la actividad de GST actividades debido a la exposición a otros plaguicidas (Greulich y col. 2002, Stephensen y col. 2002, Anguiano y col. 2001, Wiegand y col. 2001, Holovská y col. 1998). George (1994) sostiene que la inducción de la actividad de GST en peces es generalmente modesta y que debido a la amplia variabilidad entre individuos observada en diversas poblaciones de estos vertebrados, la inducción puede no distinguirse con claridad. En este sentido, existen controversias entre los resultados obtenidos por distintos autores. El tratamiento con potenciales inductores de las GST no provocó aumento significativo de la actividad en algunas especies de peces (Fenet 1998, Lindström-Seppä 1996, Jensen y col. 1991). Sin embargo este aumento si resultó notorio en otros estudios (Egaas y col. 1999, Sandvik y col. 1997). En el pez cebra (*Danio rerio*), la exposición a concentraciones moderadas de atrazina durante el desarrollo ocasionaron la inducción de las enzimas GSTs, mientras que a concentraciones mayores que resultaron tóxicas para los embriones la actividad disminuyó notablemente por debajo de los valores controles (Wiegand y col. 2001). De los datos anteriormente expuestos, resulta evidente que la actividad de GST es dependiente de las diferencias inter-especies, así como también del tipo de xenobiótico, de la concentración y del período de exposición (Oruç y Üner 2000).

El efecto del carbarilo sobre las enzimas GSTs hepáticas y renales resultó diferente al observado con MeAz. Efectivamente, la exposición a la concentración de 3 mg/L de carbarilo produjo un incremento de la actividad de estas enzimas tanto en hígado como en riñón de truchas arcoiris. Esta inducción pudo observarse a 24 horas de haber comenzado la exposición aunque no se mantuvo en el tiempo (Figuras 47 y 48). En este sentido, hay que destacar que los ensayos fueron realizados de manera estática, por lo cual al no renovarse la

solución de plaguicida, la degradación química y microbiológica del mismo podría influir en la falta de una inducción duradera. A diferencia del MeAz, este insecticida no es metabolizado de manera predominante por las enzimas GST, sin embargo se conoce actualmente su capacidad de unirse al receptor de grupos arilo (Ah-R) (Denison y col. 1998). Este receptor es a su vez un factor de transcripción que se une a secuencias XRE (elemento de respuesta a xenobióticos) presentes en el ADN y estimula la síntesis de la apoproteína del citocromo P450 1A (CYP1A) entre otras. Ciertos ligandos del receptor Ah-R son capaces, además, de inducir a las enzimas detoxificantes de fase II como la GST, y son designados inductores bifuncionales (Nguyen y col. 2003). La mayoría de los trabajos que demuestran inducción de estas enzimas en peces informan también la inducción del citocromo P450 1A (CYP1A) (George 1994). En este sentido, Egaas y col. (1999) observaron que el funguicida propiconazol induce en hígado de trucha marrón (*Salmo trutta*), la actividad de CYP1A y la actividad de GST. Los efectos provocados por el carbarilo sobre la GST de trucha arcoiris estarían entonces relacionados al efecto inductor que ejerce este compuesto vía el receptor de grupos arilos. En este sentido, en el presente trabajo se comprobó la inducción del CYP1A en hígado de *O. mykiss* luego de 24 horas de exposición a 3 mg/L de carbarilo (Figura 53), hecho que sugiere que se produce la unión de este insecticida al receptor Ah-R en estos peces y la consecuente activación de genes que están bajo su regulación.

Ambos plaguicidas, el MeAz y el carbarilo, afectaron la actividad de la catalasa. Esta enzima está localizada principalmente en los peroxisomas y conjuntamente con el ciclo del GSH, constituye la principal defensa enzimática celular contra el peróxido de hidrógeno (Dorval y col. 2003). Cabe destacar que la actividad de catalasa control encontrada en hígado de *O. mykiss* resultó un orden de magnitud mayor a la presente en riñón de esa misma especie. Estos resultados coinciden con lo informado por Janssens y col. (2000), quienes luego de analizar numerosas especies de peces pelágicos y bentónicos, encontraron

que la actividad hepática de esta enzima representaba entre un 34 a un 99% de la actividad total de los peces.

La exposición a MeAz provocó en hígado y riñón de *O. mykiss* una disminución significativa de la actividad de la catalasa (Figuras 49 y 50). Por exposición a carbarilo, la actividad específica de esta misma enzima en riñón se redujo por debajo de los valores controles, mientras que en hígado la respuesta resultó diferente (Figuras 51 y 52). En este caso se observó una inducción enzimática en las primeras 24 a 48 horas de exposición a carbarilo y luego decayó la actividad por debajo del control. Es sabido que algunos compuestos que afectan al sistema antioxidante promueven la inducción de la catalasa, cuya función es clave para la defensa contra el daño oxidativo, y que dicha inducción constituye una respuesta adaptativa a la presencia de xenobióticos (Strmac y Braunbeck 2000, Hai y col. 1997a, 1997b). Coincidentemente a lo encontrado en estos estudios, el aumento de la actividad de catalasa hepática de *O. mykiss* observado en presencia de carbarilo, podría ser adjudicado a la inducción de esta enzima al comienzo de la exposición. Esto coincide a su vez con el efecto observado de este mismo compuesto sobre la actividad de GST hepática y renal, y podría vincularse a la capacidad del mismo de unirse al receptor Ah-R induciendo enzimas detoxificantes, según se ha discutido previamente.

No obstante, la disminución significativa encontrada en estos mismos peces por efecto de la exposición a MeAz y la caída de la actividad en hígado al finalizar la exposición al carbarilo podría adjudicarse a la inhibición de la enzima por efecto de los radicales libres, ya que el anión superóxido provoca la inhibición de esta enzima al reducir el hierro (Fe III) presente en su grupo hemo (Kono y Fridovich 1982). Esta inhibición es rápida y puede ser revertida por la enzima SOD. Sin embargo se encontró también una inhibición de esta enzima provocada por el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el cual convierte el hierro presente en el grupo hemo en hierro V (Kono y Fridovich 1982). Resulta importante destacar que la disminución de la catalasa hepática y renal por exposición a MeAz en la trucha arcoiris coincide con una disminución

significativa del GSH en estos mismos órganos. De igual manera la disminución de la actividad de catalasa previamente inducida por carbarilo coincide con la disminución más importante de este tripéptido al finalizar la exposición a este carbamato. Por lo tanto, la disminución del principal compuesto soluble antioxidante, provoca un desbalance en el equilibrio redox, conduciendo a un incremento de radicales libres que afectaría la actividad de la catalasa. El comportamiento de la catalasa frente a carbarilo, en el cual la inducción de la enzima al comienzo de la exposición da paso a una inhibición hacia el término de la misma, ha sido advertido en otras especies. Efectivamente, un comportamiento similar de esta enzima fue observado en el hepatopancreas del cangrejo *Chasmagnatus granulata* por exposición a la hepatotoxina, microcistina (Pinho y col. 2002). La microcistina es una toxina producida por las algas cianofíceas que es detoxificada por conjugación con el GSH por las enzimas GSTs. En ese caso, la actividad de la catalasa resultó inducida a los dos días de iniciado el tratamiento pero disminuyó notoriamente a los 7 días. Esta disminución correspondió con un incremento del consumo de oxígeno en ese órgano y el aumento significativo de los peróxidos lipídicos. De manera similar, el plaguicida organoclorado endosulfan produjo en hígado de *O. mykiss* un aumento de la actividad de la catalasa a concentraciones menores y una disminución de la misma por debajo de los valores controles a concentraciones mayores (Dorval y col. 2003). Es importante señalar que las concentraciones de endosulfan que provocaron la disminución en la actividad de la catalasa hepática produjeron también una caída significativa del contenido de GSH endógeno en ese mismo órgano. Se observa en ese caso, una coincidencia entre las curvas de disminución de GSH y de la actividad de catalasa, de manera análoga a lo indicado en juveniles de esta misma especie por exposición a carbarilo.

En varios sistemas se ha señalado una reducción significativa de la actividad de la catalasa causada por la presencia de diversos xenobióticos entre ellos insecticidas. En este sentido y de manera similar a lo ocurrido por

efecto del MeAz en *O. mykiss*, Gultekin y col. (2000) observaron que la actividad de la catalasa disminuía en eritrocito humano expuestos al OF clorpirifos. Es importante destacar así mismo, que estos autores evidencian además una inhibición directa del insecticida sobre la enzima catalasa purificada y sobre la enzima SOD. Este mismo insecticida provocó una disminución significativa de la catalasa en cerebro de ratas inmaduras (Jett y Navoa 2000). De manera similar, la catalasa hepática fue reducida por exposición dérmica a los OFs acefate y metamidofos en ratas adultas (Panemangalore y Bebe 2000). Otros estudios notificaron la disminución de la actividad de esta enzima por exposición contaminantes ambientales, en peces de ríos contaminados (Pandey y col. 2003).

Como mencionamos anteriormente, la inhibición de la catalasa por efecto del anión superóxido es potencialmente reversible por acción de la enzima SOD (Kono y Fridovich 1982). Un aumento significativo de esta enzima podría prevenir la inhibición de la catalasa, sin embargo, Oruç y Ünner (2000) observaron que la actividad de SOD en *Oreochromis niloticus* no aumentaba por exposición a concentraciones subletales de MeAz entre 24 y 72 horas y disminuía a las 96 horas. Los autores observaron, sin embargo, la inducción de la enzima GPx luego de 96 horas de exposición al insecticida. Adicionalmente, la inhibición de la catalasa no reversible por SOD depende de la acción de otros radicales libres, entre ellos el peróxido de hidrógeno. Se ha propuesto que la inducción de las enzimas citocromo P450 y la disminución del GSH producidas por los metabolitos reactivos de los plaguicidas pueden acrecentar las especies reactivas de oxígeno en las células (Panemangalore y Bebe 2000). Bagchi y col. (1995) demostraron el aumento de especies reactivas de oxígeno en ratas por exposición a diferentes plaguicidas, entre ellos los OFs clorpirifos y fentión. Así mismo varios autores señalan el aumento de especies reactivas de oxígeno en peces como consecuencia de otros contaminantes (Lemaire y Livingstone 1997, Livingstone y col 2000).

## 6.1. La Utilidad del Sistema Antioxidante como Biomarcador

Los resultados sugieren que tanto el MeAz como el carbarilo además de la fuerte inhibición de su blanco primario de acción, la ChE cerebral y muscular, y de otras esterasas, inducen estrés oxidativo como efecto secundario al provocar una disminución del contenido de GSH endógeno y afectar la actividad de la catalasa. Esta última es una enzima fundamental del sistema antioxidante por lo tanto la disminución de su actividad conjuntamente con la disminución en el contenido endógeno de GSH resultan efectos secundarios relevantes de ambos insecticidas ensayados. Estas alteraciones merman la capacidad antioxidante y por tanto la supervivencia a campo de los juveniles de *O. mykiss*, principalmente bajo condiciones que en su conjunto favorecen el estrés oxidativo por la presencia simultánea de otros contaminantes en el medio.

Pandey y col. (2003) sostienen que los biomarcadores de estrés oxidativo, en especial la estimación de las enzimas antioxidantes en peces, pueden ser indicadores útiles de contaminación de los cuerpos de agua. Estudios recientes de monitoreo en ambientes de agua marina y dulce han analizado biomarcadores de estrés oxidativo en peces a fin de caracterizar la distribución geográfica y espacial de los efectos de los contaminantes y predecir riesgos (Ventura y col. 2002, Klumpp y col. 2002, Fenet y col. 1998, Bainy y col. 1996). Almar y col (1998) han encontrado que el sistema del glutatión es un indicador bioquímico sensible de polución química para algunas especies de peces de agua dulce, como *Gobio gobio* y *Rutilus rutilus*. Actualmente, se han establecido modelos útiles para evaluar el daño oxidativo potencial de contaminantes presentes en muestras ambientales, que incluyen la hemólisis de eritrocitos de peces inducida por peróxidos (Janssens y col. 2002) y el uso de células transgénicas de pez cebra (Carvan y col. 2001). En nuestro caso particular, los resultados obtenidos con los insecticidas MeAz y carbarilo, como modelo de otros OFs y carbamatos señalan que el sistema de defensa antioxidante en peces podría considerarse un buen biomarcador a exposiciones subletales, cuando se

lo implementa en conjunto con la evaluación de la actividad de esterasas cerebrales, musculares y hepáticas, revalorizando al igual que Lionetto y col. (2003) el uso integrado de biomarcadores.

## **7. EFECTOS SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS**

A pesar de conocerse vastamente el efecto inhibitorio sobre la enzima AChE, el proceso molecular desde la exposición a OFs y carbamatos hasta la muerte de los organismos no ha sido aún establecido claramente (Peña-Lopis y col 2002). Tampoco ha podido explicarse por este mecanismo la alteración del desarrollo del cerebro y la función cognitiva (Schuh y col. 2002), lo que ha orientado la investigación a la búsqueda de otros mecanismos “no colinérgicos” que pudieran explicar estos efectos. Efectivamente, se han observado numerosos efectos secundarios de estos compuestos que modulan las respuestas agudas y crónicas, como los indicados en juveniles de *O. mykiss* que involucran el sistema de defensa antioxidante, postulando que la citotoxicidad de los OFs puede estar vinculada a la inducción de un programa de muerte celular o apoptosis por múltiples vías, incluyendo la aparición de poros mitocondriales, activación de receptores muscarínicos, activación de caspasas mediada por receptores, o activación de serina-proteasas (Carlson y col. 2000). Más aun, se ha postulado una vía apoptótica dependiente del contenido de GSH que incluye un corrimiento en el estatus redox celular, activación de una isoforma de proteína quinasa C y estimulación de la unión al ADN del factor de transcripción sensible al estado redox, AP-1 (Domenicotti y col. 2000). Las especies reactivas de oxígeno sirven como mediadoras en los programas de muerte celular en respuesta a numerosos tóxicos y condiciones patológicas (Sarafian y Bredesen 1994) y pueden alterar las respuestas transcripcionales para inducir muerte celular por apoptosis (Peña-Lopis y col. 2002). En realidad, muchas de las moléculas señal y vías de señalización celulares como los canales

de  $\text{Ca}^{2+}$ , los factores de transcripción como NF- $\kappa\beta$ , p53, y AP-1 y las proteínas tirosina y serina/treonina quinasas y fosfatasas, están regulados por el estado redox celular (Shi y col. 2003, Kamata y Hirata 1999). Estos antecedentes sugieren que las alteraciones provocadas por el MeAz y el carbarilo sobre el sistema antioxidante de los juveniles de *O. mykiss* podrían tener un correlato sobre la cascada de señalización, que se visualizaría en la modificación de los niveles de fosforilación de las proteínas.

Las evaluaciones de los patrones de fosforilación proteica señalan que la exposición *in vivo* durante 24 horas a concentraciones subletales de MeAz y carbarilo, produce alteraciones evidentes en distintos órganos (cerebro e hígado) de los juveniles de trucha arcoiris (Figuras 55-61). Las modificaciones en la fosforilación de proteínas pueden involucrar alteraciones significativas de la fisiología celular normal a través de la modificación de las respuestas celulares comprometidos en estos procesos (Thomas y col. 2000).

Los resultados demuestran además, que ambos insecticidas afectaron mecanismos comunes del sistema de señalización celular que derivó en la modificación del estado de fosforilación de polipéptidos de 66 KDa (disminución) y 171 KDa (aumento), así como también manifestaron efectos diferenciales de acuerdo a lo observado con el polipéptido de 53 KDa. Los efectos en algunos casos resultaron específicos para cada órgano. En este sentido, el ortovanadato aumentó notablemente la fosforilación proteica basal tanto en peces controles como expuestos a ambos insecticidas, aunque este efecto resultó más notorio en las fracciones de cerebro que en las hepáticas. En cerebro, este incremento en la sensibilidad posibilitó observar diferencias debidas al efecto del plaguicida en la banda proteica correspondiente a 22 KDa. El ortovanadato es un inhibidor de ATPasas y tirosina fosfatasas y/o activador de algunas proteínas tirosina quinasas (Randi y col. 1998). Sin embargo, estos resultados no se condicen con el efecto de la genisteína, un inhibidor de tirosina quinasas, que no modificó el estado de fosforilación de las bandas en controles y tratados. Por tanto, los cambios observados en la fosforilación de las bandas

proteicas en peces expuestos a ambos insecticidas vs controles no pudieron ser adjudicadas a la modificación de la actividad de tirosina quinasas.

La mayoría de los cambios en la fosforilación proteica por carbarilo y MeAz no se correlacionan con aumentos en la masa de las proteínas, según se advierte en los perfiles de los correspondientes geles de SDS, sino a modificaciones en su estado de fosforilación. Sin embargo, para la banda proteica de 162 KDa (de la fracción nuclear de cerebro), se observó un incremento en la masa proteica indicando una inducción de la síntesis de dicha proteína o una relocalización de la misma en la fracción nuclear por efecto del carbarilo (Figura 62), que pudo influir en un aumento de la fosforilación.

Los efectos sobre la fosforilación de proteínas observados con los insecticidas MeAz y carbarilo podrían estar asociados a la alteración del balance redox celular, que inducen estos compuestos, el cual regula numerosas vías de transducción de señales en los que participan proteínas quinasas/fosfatasa. En este sentido, algunos autores han observado que ciertos insecticidas OFs como el clorpirifos y fentión, modifican la actividad de la proteína quinasa C (PKC) implicada en vías de señalización que median procesos fundamentales como la proliferación celular (Bagchi y col. 1997); mientras que otros afectan los niveles de fosforilación de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (Bomser y col. 2002, Bomser y Casida 2000), o interfieren en la formación de segundos mensajeros como el adenosilmonofosfato cíclico (AMPc) (Olivier y col. 2001), o inositol trifosfato (Magnarelli de Potas y Pechén de D'Angelo 1997, Moya y col. 2002). Las formas oxónicas de algunos insecticidas OFs también se unen a receptores muscarínicos modificando los niveles de segundos mensajeros y las cascadas de fosforilación subsiguientes (Ward y Mundi 1996). Nijima y col (2000) observaron un aumento en la fosforilación de proteínas citosólicas en cerebro de rata, además de la activación de la quinasa c-Jun-N-terminal (JUNK) y proteína quinasas dependiente de mitógenos (MAPK), luego del tratamiento con OFs. Todas estas alteraciones conducen en última instancia a modificaciones en la fosforilación de proteínas con consecuencias graves para la vida celular.

Otros grupos de plaguicidas, como algunos organoclorados, piretroides y dioxinas, afectan la actividad de diferentes tirosina quinasas y quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Tessier y Matsumura 2001, Enan y Matsumura 1998, Randi y col. 1998). El compuesto 2,3,7,8 tetraclorodibenzodioxina (TCDD) es uno de los más potentes de la familia de las dioxinas. Se ha comprobado que la mayoría de sus manifestaciones tóxicas que incluyen efectos carcinogénicos, teratogénicos, y sobre la proliferación y diferenciación celular, están coligados a su capacidad de unión al receptor de grupos arilo Ah-R que se traduce posteriormente en la modificación de la actividad de diversas quinasas y no existe acción directa del xenobiótico sobre las mismas (Enan y Matsumura 1996, Enan y col. 1998). Si bien el carbarilo no pertenece estrictamente a este grupo, los efectos provocados sobre la fosforilación de proteínas en cerebro e hígado de *O. mykiss* podrían estar vinculados a su comprobada capacidad de unión al Ah-R (Deninson y col. 1998), aunque esta unión resulta menos fuerte que la del TCDD. Ciertamente, el carbarilo produce una disminución de la fosforilación de las bandas proteicas de 66 KDa y 53 KDa. De manera similar, en fracciones nucleares hepáticas de cerdos de Guinea, el TCDD produce una disminución de la actividad de la quinasa caseína II (CKII) que conduce a una disminución en la fosforilación de sus proteínas sustrato, c-Myc (67 KDa), p53 (53 KDa) y c-jun (39 KDa) y consecuentemente una disminución en la unión del factor de transcripción c-Myc al elemento de respuesta a c-Myc en el ADN (Ashida y col. 2000). Nuestros resultados, si bien no son concluyentes en este aspecto constituyen de por sí una muy interesante perspectiva de avance en la dilucidación de los efectos de los OFs y carbamatos sobre proteínas de regulación temprana y factores de transcripción mediante la detección con métodos específicos. La identificación de las vías de señalización afectadas por estos compuestos es útil para interpretar con mayor precisión los eventos que conducen en última instancia a las manifestaciones tóxicas observadas.

## 8. PROTEÍNAS DE ESTRÉS

Sanders (1993) ha propuesto a las proteínas de estrés (Hsp) como potenciales biomarcadores en estudios de monitoreo ambiental, debido a que son altamente conservadas a lo largo de la evolución desde las bacterias a los humanos. Esta respuesta celular inicialmente observada frente al choque térmico, se ha descrito también en otras fuentes de estrés como exposición a metales pesados, reactivos de sulfhidrilos, análogos de aminoácidos y diversos compuestos biológicos (Aït-Aïssa y col. 2000, Werner y Nagel 1997, Bagchi y col. 1996, Dilorio y col. 1996). El significado de la inducción de las Hsp en respuesta a tales estímulos está directamente asociado al rol de estas proteínas como chaperonas moleculares. En tal sentido, es conocida su función colaborando en el transporte y en el correcto plegamiento de otras proteínas celulares (Horst y col. 1997, Frydman y Höhfeld 1997). La alta conservación del mecanismo de inducción de las Hsp a lo largo de los diferentes taxones, implica que la función de las mismas es crítica para la supervivencia de las especies y que la acumulación de altos niveles de proteínas mal formadas resultaría citotóxica.

Morimoto y col. (1996) han propuesto el modelo de proteotoxicidad que intenta explicar el mecanismo por el cual estas proteínas serían inducidas. Según el mismo, la señal de alarma para la inducción provendría de un alto número de proteínas incorrectamente plegadas provocado por el choque térmico u otro agente estresante, el cual superaría la capacidad normal de replegamiento llevada a cabo por el conjunto de Hsp expresadas constitutivamente en las células. El factor de transcripción correspondiente HSF-1 ("heat shock factor") estaría inhabilitado por la trimerización y unión a proteínas Hsp presentes en el citosol, estas últimas al ser reclutadas lo liberarían, posibilitando la transcripción y posteriormente la síntesis de nuevas Hsp.

A partir de los análisis realizados por tinción con anticuerpo en tejidos de *C. auratus* hemos demostrado la ausencia de inducción de las Hsp luego de la

exposición a diferentes concentraciones de MeAz, paratión y carbarilo. A pesar de ello, las proteínas Hsp 60 y Hsp 70 fueron detectadas en todas las muestras analizadas (Figuras 63, 65-66). La ausencia o débil respuesta de inducción de estas proteínas ha sido señalada actualmente por varios investigadores, así como el cuestionamiento de la utilidad de las mismas como biomarcadores (Lacorn y col. 2001, Pyza y col. 1997).

A diferencia de los mamíferos en los cuales la inducción de Hsp se debe principalmente al estrés térmico, en peces y otros vertebrados ectotérmicos, las Hsp están expresadas de manera constitutiva en grandes cantidades (Yu y col 1994). La presencia de estas proteínas en altos niveles les brindaría una protección anticipada frente a los cambios de temperatura a los que pueden estar sometidos y adicionalmente frente a diversas condiciones de estrés químico (Huey y Bennett 1990). A su vez, permitiría explicar la falta de inducción frente a la exposición de ciertos xenobióticos de acuerdo a lo enunciado en el modelo de proteotoxicidad, según el cual se requiere un daño proteico que supere la capacidad natural de respuesta de estos organismos que es constitutivamente elevada.

En carasius controles y expuestos a paratión, el anticuerpo contra Hsp 60 empleado reconoció una proteína de 65 KDa en cerebro (Figura 63). Ejemplares de *C. auratus* aclimatados al menos 5 semanas a 30°C mostraron un incremento en una proteína de 65 KDa en cerebro, hígado y músculo que no se encontraba en los aclimatados a 10°C y que no pertenecía a la familia Hsp70 (Kikuchi y col 1993). Este mismo anticuerpo reconoció tres proteínas Hsp 58, Hsp 61 y Hsp 64 de algunos invertebrados acuáticos (Werner y Nagel 1997). El anticuerpo anti Hsp 60 utilizado es capaz de reconocer ambas isoformas de la proteína, la constitutiva y la inducible. Los niveles observados se deben probablemente a la forma Hsp 60 constitutiva.

El anticuerpo anti-Hsp 70 que reconoce únicamente la forma inducible, sólo reconoció de manera tenue la proteína Hsp 70 recombinante humana utilizada como control positivo (datos no mostrados). Se utilizó por lo tanto, un

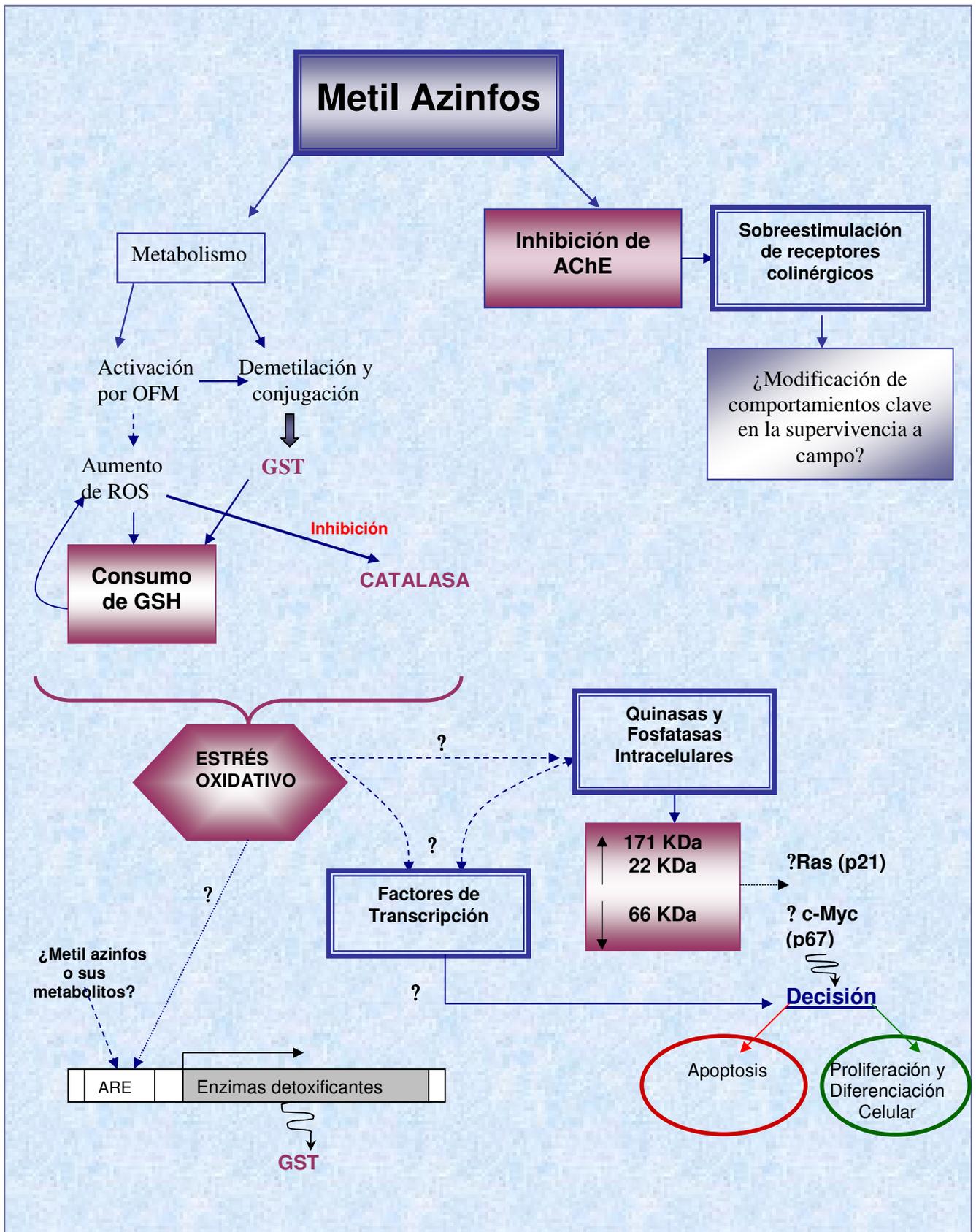
anticuerpo anti Hsp70 que reconoce tanto la isoforma inducible (Hsp70) como la constitutiva (Hsc 70) con el cual fue posible determinar la presencia de esta proteína Hsp/Hsc 70 en homogenados de *C. auratus* y de *O. mykiss* (Figuras 65-69). En ambas especies de peces, la proteína detectada correspondería entonces a la isoforma constitutiva. Estos datos sugieren que la abundancia constante de estas proteínas permitiría proteger de manera anticipada a estos organismos de las agresiones o insultos proteotóxicos (Hightower 1991).

Fader y col. (1994) realizaron determinaciones de Hsp 70 en diversas especies de peces y encontraron variaciones estacionales importantes de estas proteínas, que expresaban niveles más altos en primavera y menores valores en invierno. En el pez *Limanda limanda*, se observaron ciclos anuales de variación de los niveles de Hsp 70 vinculados a cambios en la temperatura y al contenido lipídico, sin observarse inducción por efecto del cadmio u organoclorados (Lacorn y col. 2001). En este sentido, estudios realizados en ciempiés y en pupas de moscas mostraron una gran variabilidad estacional en los niveles de Hsp 70 y resultados inconsistentes al evaluar el efecto de la temperatura y de diversos compuestos químicos como el OF dimetoato, cobre y detergentes (Pyza y col 1997). En estos animales se encontraron niveles altos en los controles y en las muestras obtenidas campo en zonas no contaminadas.

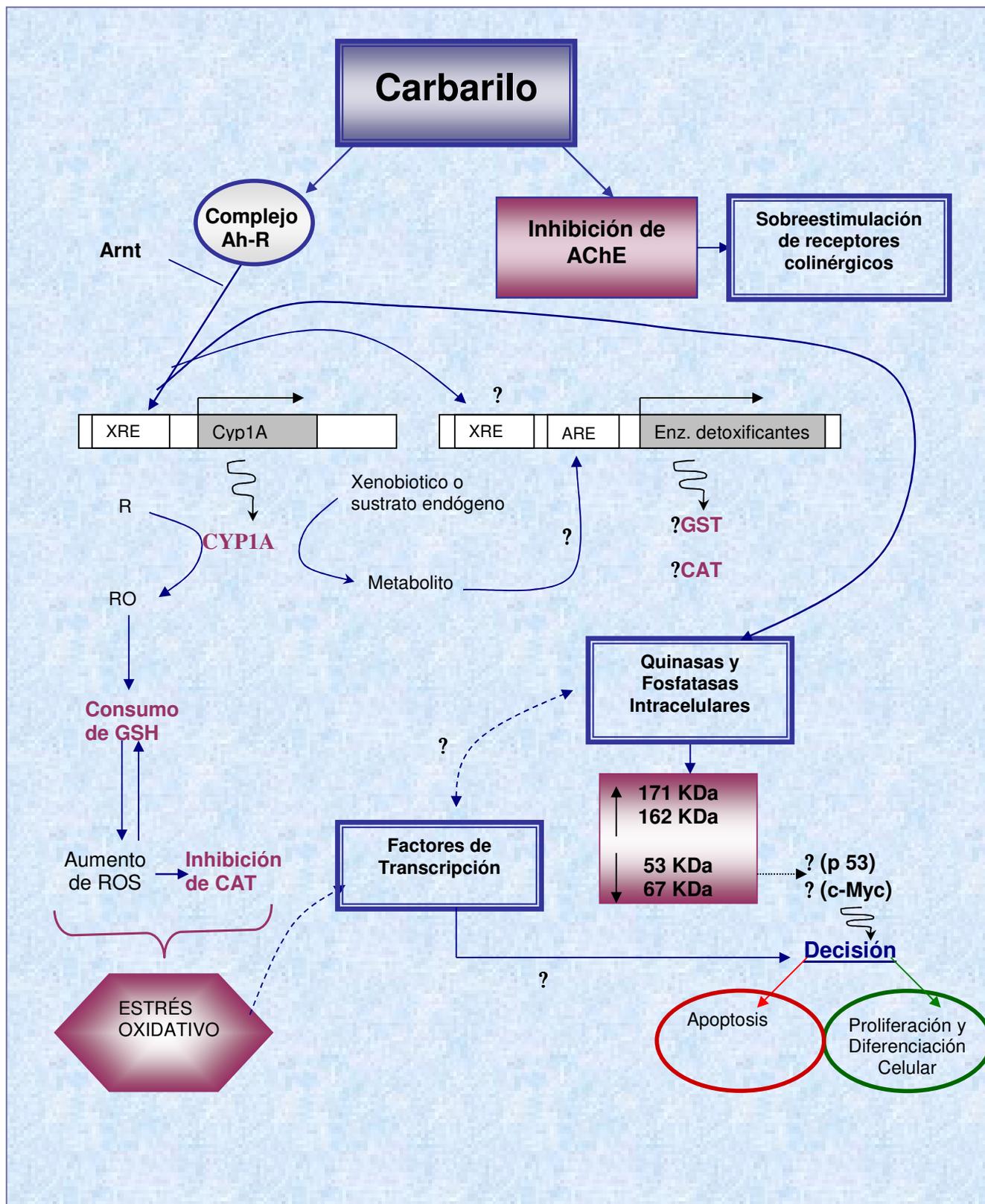
Si bien algunos autores reconocen a las Hsp como bioindicadores útiles en estudios ecotoxicológicos sobre todo en ambientes acuáticos (Hassanein 1999, Karouna-Renier y Zehr 1999) otros concluyen que no puede considerarse como un biomarcador universal para estos estudios y que no son una herramienta práctica para la evaluación de riesgo ambiental (Pyza y col.1997, Hernández y col. 1999). De nuestros datos preliminares se concluye que las Hsp no serían buenos biomarcadores de la contaminación por plaguicidas OFs y carbamatos, siendo necesario caracterizar el complejo papel que juegan estas proteínas en la aclimatación de los organismos dentro de su zona de tolerancia, así como evaluarlas desde una perspectiva molecular, funcional y evolutiva; antes de aplicarlas como biomarcadores de estrés antropogénico (Feder 1999, Fader y col. 1994).

Finalmente podemos concluir, de acuerdo a lo planteado en la hipótesis, que estos insecticidas manifestaron además de la fuerte inhibición de las esterasas, los efectos no colinérgicos que se ilustran en las figuras 70 y 71. En particular para el caso del MeAz el modelo que podría explicar los resultados obtenidos indica un consumo de GSH que conduciría a un aumento de ROS y finalmente a la inhibición de catalasa cuyo resultado sería la promoción del estrés oxidativo. Este último puede modificar factores de transcripción y la cascada de señalizaciones alterando la fosforilación de proteínas clave que controlan la decisión de favorecer la apoptosis o la proliferación y diferenciación celular. En particular y de acuerdo a los pesos moleculares de los polipéptidos afectados podrían estar afectadas las funciones Ras y c-Myc (Figura 70).

En el caso de carbarilo, su capacidad de inducción del CYP1A a través e la activación del receptor Ah-R y su unión al elemento de respuesta a xenobióticos del ADN (XRE), incrementaría el metabolismo de compuestos endógenos y exógenos. Por otra parte, el carbarilo podría actuar como inductor bifuncional activando no solo los genes regulador por Ah-R sino también los regulados por el elemento de respuesta antioxidante (ARE) provocando la inducción temprana de enzimas detoxificantes. La unión al Ah-R, además ha sido asociada a la modificación de quinasas específicas como la inhibición de la caseína quinasa II (CK II) cuyos sustratos son la proteína pro-apoptótica p53, y el factor de transcripción c-Myc. La disminución en la fosforilación de la p53 llevaría a una proliferación celular desmedida implicada en la carcinogénesis. Los ROS generados como consecuencia del aumento del metabolismo por parte de CYP1A llevarían a una disminución del contenido de GSH, con aumento subsiguiente de radicales libres que provocarían posteriormente la inhibición de la catalasa. En conjunto la disminución del GSH y de la actividad de esta enzima conducirían a una situación de estrés oxidativo, que podría afectar a las cascadas de señalización celular y factores de transcripción dependientes del estado redox celular. La decisión final del destino celular dependerá de la integración de todas las señales modificadas por el carbarilo (Figura 71).



**Figura 70: Diagrama propuesto de las vías de acción del metil azinfos en juveniles de *O. mykiss*.** AChE: acetilcolinesterasa, ARE: elemento de respuesta antioxidante, GSH: glutatión reducido, GST: glutatión-S-transferasa, OFM: oxidasas de función mixta, ROS: especies reactivas de oxígeno, ↓disminución de la fosforilación, ↑aumento de la fosforilación, c-Myc: factor de transcripción, Ras: proteína G pequeña.



**Figura 71: Diagrama propuesto de las vías de acción del carbarilo en juveniles de *O. mykiss*.** AChE: acetilcolinesterasa, Ah-R: receptor de grupos arilo, Arnt: proteína transportadora nuclear de Ah-R, ARE: elemento de respuesta antioxidante, CAT: catalasa, CYP1A: citocromo P450 1A, GSH: glutatión reducido, GST: glutatión-S-trasferasa, R: sustrato de CYP1A, RO: metabolito oxidado, ROS: especies reactivas de oxígeno, XRE: elemento de respuesta a xenobióticos ↓disminución de la fosforilación, ↑aumento de la fosforilación.

## V. CONCLUSIONES

Existen marcadas diferencias de susceptibilidad a insecticidas organofosforados y carbamatos entre juveniles de *C. auratus* y *O. mykiss*. La vulnerabilidad de los juveniles de ambas especies de peces al carbamato carbarilo fue menor que para los OFs MeAz y paratión.

Tanto *C. auratus*, *O. mykiss* como *C. carpio* resultaron capaces de sobrevivir a elevados niveles de inhibición de la ChE cerebral señalando que esta no es la causa única y principal de mortalidad.

La insensibilidad relativa de *C. auratus* frente a los insecticidas ensayados no está relacionada con una captación reducida de estos compuestos, ya que la actividad enzimática resultó efectivamente inhibida.

La actividad de la enzima ChE cerebral y muscular de juveniles de peces resulta un excelente biomarcador de exposición a organofosforados y en menor medida a carbamatos, debido a su alta sensibilidad y su alta persistencia en el tiempo aún cuando hubiera desaparecido el insecticida de los cuerpos de agua.

El MeAz y el carbarilo inducen en juveniles de *O. mykiss* estrés oxidativo al disminuir el contenido de GSH endógeno, y afectar la actividad de enzimas como la catalasa. Estas modificaciones pueden ser utilizadas como biomarcadores de efecto en peces a estos insecticidas, en conjunto con la determinación de ChE y AliEs.

**E**l carbarilo es capaz de inducir enzimas detoxificantes de fase I, como el CYP1A hepático de *O. mykiss* probablemente a través de su unión al Ah-R que actuaría a nivel del elemento de respuesta a xenobióticos (XRE) del ADN. La activación de las enzimas detoxificantes de fase II GST y antioxidante CAT podrían asociarse a una capacidad de activación bifuncional de este compuesto actuando a través del elemento de respuesta antioxidante (ARE) del ADN.

**L**os insecticidas MeAz, carbarilo y paratión no afectarían los niveles de expresión de Hsp 60 y Hsp 70 en *C. auratus* y *O. mykiss* evaluados por la técnica de “western blot” indicando que dichas proteínas en estas especies no resultarían buenos biomarcadores para las familias de plaguicidas analizadas.

**L**a exposición a concentraciones subletales de MeAz y carbarilo provoca alteraciones en los patrones de fosforilación de las proteínas nucleares hepáticas y cerebrales, en particular disminuyendo la fosforilación de proteínas de 53 y 66 KDa que podrían corresponder a los factores de transcripción C-myc (p67) y p-53 que intervienen en el control de la apoptosis y proliferación/diferenciación celular. La dilucidación completa de estas alteraciones y los mecanismos de acción subyacentes constituye una línea de avance de esta tesis.

**D**e acuerdo a lo planteado en la hipótesis, estos insecticidas muestran además de la fuerte inhibición de las esterasas, efectos secundarios no colinérgicos que incluyen modificaciones en el sistema de defensa antioxidante y alteraciones en los patrones de fosforilación de proteínas hepáticas y cerebrales, demostrando la importancia de esclarecer todos los aspectos de los mecanismos de acción de estos insecticidas para la evaluación de su toxicidad.

## VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

### **Líneas Moleculares y Bioquímicas**

Resulta interesante plantear como lineamientos futuros a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, el estudio de los cambios inducidos por carbarilo y MeAz, así como otros insecticidas OFs y carbamatos en el comportamiento de los factores nucleares de transcripción claves que están regulados por el estado de fosforilación proteico así como por el estado redox celular. Esto se podrá realizar mediante técnicas de biología molecular como el análisis de movilidad en gel (geles de retardo) para visualizar el efecto de estos plaguicidas sobre el Ah-R, AP-1, NF- $\kappa$ B, CREB entre otros.

Es importante también identificar mediante el uso de anticuerpos específicos las bandas proteicas que manifiestan modificaciones en su estado de fosforilación, para conocer cuales son las vías de señalización afectadas e inferir los efectos citotóxicos resultantes, lo cual deberá complementarse con la cuantificación de actividades de tirosina quinasas y otras quinasas específicas, como la PKC, utilizando sustratos e inhibidores específicos.

## **Líneas de Trabajo a Campo**

Otra línea de trabajo que surge de los resultados obtenidos en este trabajo es la de revalorizar la utilidad a campo de la ChE de peces y los biomarcadores relacionados al sistema de defensa antioxidante. Se podrá realizar esto mediante ensayos con ejemplares enjaulados en zonas de desembocadura de canales colectores de riego, en conjunto con los muestreos de agua para determinar la presencia de plaguicidas que se desarrolla regularmente en nuestro laboratorio. Adicionalmente debería establecerse un sistema de muestreo de peces presentes en diferentes cuerpos de agua de la zona del Alto Valle de Río Negro y Neuquén a fin de determinar los niveles basales de estos biomarcadores y sus variaciones naturales como paso previo a su uso frente a eventuales contaminantes.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas R., Schultz I. R., Doddapaneni S., Hayton W. L. (1996) Toxicokinetics of parathion and paraoxon in rainbow trout after intravascular administration and water exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136: 194-199.
- Aït-Aïssa S., Pandard P., Magaud H., Arrigo A. P., Thybaud E., Porcher J. M (2003) Evaluation of an *in vitro* hsp 70 induction test for toxicity assessment of complex mixtures: comparison with chemical analyses and ecotoxicity tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54: 92-104.
- Aït-Aïssa S., Porcher J. M., Arrigo A. P., Lambré C. (2000) Activation of the hsp 70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology* 145: 147-157.
- Almar M., Otero L., Santos C., Gonzales Gallego J. (1998) Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *J. Environ. Sci. Health. B* 33: 769-783.
- Alves S. R. C., Severino P. C., Ibbotson D. P., Da Silva A. Z., Lopes F. R. A. S., Sáenz L. A., Bainy A. C. D. (2002) Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Mar. Environ. Res.* 54: 241-245.
- Anguiano O. L., Caballero A., Pechen de D'Angelo A. M. (2001) The role of glutathion conjugation in the regulation of early toad embryo's tolerance to pesticides. *Comp. Biochem. Physiol.* 128 C: 35-43.
- Asakawa T., Matsushita S. (1980) Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. *Lipids* 14: 401-406.

- Ashida H., Nagy S., Matsumura F. (2000) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) -induced changes in activities of nuclear protein kinases and phosphatases affecting DNA binding activity of c-Myc and AP-1 in the livers of guinea pigs. *Biochem. Pharmacol.* 59: 741-751.
- Bagchi D., Bagchi M., Hassoun E. A., Stohs S. J. (1995) *In vitro* and *in vivo* generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* 104 (1-3): 129-140.
- Bagchi D., Bagchi M., Tang L., Stohs S. J. (1997) Comparative *in vitro* and *in vivo* protein kinase C activation by selected pesticides and transition metal salts. *Toxicol. Lett.* 91: 31-37.
- Bagchi D., Bahttacharya G., Stohs S. J. (1996) *In vitro* and *in vivo* induction of heat shock (stress) protein (Hsp) gene expression by selected pesticides. *Toxicology.* 112: 57-68.
- Baille T., Slatter J. (1991) Glutathione: a vehicle for the transport of chemical reactive metabolites *in vivo*. *Acc. Chem. Res.* 24: 264-270.
- Bainy A. C. D., Saito E., Carvalho P. S. M., Junqueira V. B. C. (1996) Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from polluted site. *Aquat. Toxicol.* 34: 151-162.
- Banks D., Soliman M. R. I. (1997) Protective effect of antioxidant against benomyl-induced lipid peroxidation and glutathione depletion in rats. *Toxicology* 116: 177-181.
- Bard S. M. Woodin B. R., Stegeman J. J. (2002) Expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpurascens*) exposed to environmental contaminants. *Aquat. Toxicol.* 60: 17-32.

- Barron M. G., Charron K. A., Stott W., Duvall S. (1999) Tissue carboxylesterase activity of rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2506-2511.
- Bayne B. L., Brown D. A., Burns K., Dixon D. R. Ivanovici A., Livingstone D. A., Lowe D. M., Moore M. N., Stebbing A. R. D., Widdings J. (1985) The effects of stress pollution on marine animals. Praeger, New York, USA.
- Beauvais L., Cole K., Atchinson G., Coffey M. (2002) Factors affecting brain cholinesterase activity in Bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Water Air Soil Pollut.* 135: 249-264.
- Beauvais L., Jones S. B., Brewer S. K., Little E. E. (2000) Physiological measures of neurotoxicity of diazinon and malation to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their correlation with behavioral measures. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (7): 1875-1880.
- Beauvais L., Jones S. B., Parris J. T., Brewer S. K., Little E. E. (2001) Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmiun to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotox. Environ. Saf.* 49: 84-90.
- Beers R. F., Sizer I. W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195: 133-140.
- Benke G. M., Cheever K. L., Mirer F. E., Murphy S. D. (1974) Comparative toxicity, anticholinesterase action and metabolism of methyl parathion and parathion in sunfish and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 28: 97-109.
- Benke G. M., Murphy S. D. (1974) Anticholinesterase action of methyl parathion, parathion and azinphosmethyl in mice and fish: Onset and recovery of inhibition. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 12: 117-122.

- Beyer J. (1996) Fish biomarkers in marine pollution monitoring: evaluation and validation in laboratory and field studies. Academic Thesis. University of Bergen, Norway.
- Bomser J. A., Casida J. E. (2000) Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK 44/42) by chlorpyrifos oxon in chinese hamster ovary cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14: 346-353.
- Bomser J. A., Quistad G. B., Casida J. E. (2002) Chlorpyrifos oxon potentiates diacylglycerol-induced extracellular signal-regulated kinase (ERK 44/42) activation, possibly by diacylglycerol lipase inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 178: 29-36.
- Boone J. S., Chambers J. E. (1996) Time course of inhibition of cholinesterase and aliesterase activities, and nonprotein sulphhydryl levels following exposure to organophosphorus insecticides in mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Fund. Appl. Toxicol.* 29: 202-207.
- Boone J. S., Chambers J. E. (1997) Biochemical factors contributing to toxicity differences among clorpyrifos, parathion, and methyl parathion in mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Aquat Toxicol.* 39: 333-343.
- Booth L., Heppelthwaite V., McGlinchy A. (2000) The effect of environmental parameters on growth, cholinesterase activity and glutathione S-transferase activity in the earthworm (*Apporectodea caliginosa*). *Biomarkers* 5: 46-55.
- Bretau S., Saglio P., Saligaut C., Auperin B. (2002) Biochemical and behavioral effects of carbofuran in goldfish (*Carassius auratus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (1): 175-181.
- Bretau S., Toutant J.P., Saglio P. (2000) Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotox. Environ. Saf.* 47: 117-124

- Bulacio L. G., Sain O. L., Martinez S. S. (2001) Fitosanitarios. Riesgos y Toxicidad. UNR Editora, Rosario, Argentina. pp108.
- Caballero de Castro A., Rosembaum E. A., Pechén de D'Angelo A. M. (1991) Effect of malathion on *Bufo arenarum* Hensel development - I. Esterase inhibition and recovery. *Biochem. Pharmacol.* 41 (4): 491-495.
- Carlson K., Jortner B. S., Ehrich M. (2000) Organophosphorus compound-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168 (2): 102-113.
- Carvan M. J., Sonntag D. M., Cmar C. B., Cook R. S., Currand M. A., Miller G. L. (2001) Oxidative stress in zebrafish cells: potential utility of transgenic zebrafish as a deployable sentinel for site hazard ranking. *Sci.Total Environ.* 274: 183-196.
- Chambers H. W. (1992) Organophosphate compounds: An overview. En: *Organophosphates. Chemistry, Fate and Effects*. Ed. Chambers J.E., Levi PE., Academic Press Inc., San Diego, California, USA. Cap 1 pp 3-17.
- Chambers J. E., Carr R. L. (1995) Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicology* 105: 291-304.
- Chambers J. E., Yarbrough J. D. (1974) Parathion and methyl parathion toxicity to insecticide-resistant and susceptible population of mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 11: 315-320
- Chanda S. M., Mortensen S. R., Moser V. C., Padilla S. (1997) Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adults rats: an *in vitro* and *in vivo* comparison. *Fundam. Appl. Toxicol.* 38: 148-157.

- Chasseaud L. F. (1979) The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv. Cancer. Res.* 29: 175-274.
- Choi J., Liu R. M., Forman H. J. (1997) Adaptation to oxidative stress: quinone-mediated protection signaling in rat lung epithelial L2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 53 (7): 987-993.
- Coppage D. L. (1972) Organophosphate pesticides: Specific level of brain AChE inhibition related to death in sheephead minnows. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 101: 534-537.
- Corbett J. R. (1974) The biochemical mode of action of pesticides. Academic Press Inc. London.
- Corso M., Thompson M. (2001) Protein phosphorylation in mitochondria from human placenta. *Placenta* 22: 432-439.
- Cossu C., Doyote A., Babut M., Exinger A., Vasseur P. (2000) Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45: 106-121.
- Costa L. G. (1997) Basic Toxicology of Pesticides. *Occupational Medicine: State of Art Reviews.* Philadelphia, Hanley & Belfus, Inc. 12 (2): 251-267.
- Crane M., Newman M. C. (2000) What level of effect is a no observed effect? *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 516-519.
- Datta S., Hansen L., McConnell L., Baker J., Lenoir J., Seiber J. N. (1998) Pesticides y PCB contaminants in fish and tadpoles from the Kawear River Basin, California. *Bull. Contam. Toxicol.* 60: 829-836.

- Dauberschmidt C., Dietrich D. R., Schlatter C. (1997) Organophosphate in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: Subacute exposure, body burdens, and organ concentrations. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 33:42-46.
- Davis B. J. (1964) Disc electroforesis -II. Method and application to human serum proteins. Ann. NY. Acad. Sci. 121: 404-427.
- De la Torre F. R., Ferrari L., Salibián A. (2002) Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. Comp. Biochem. Physiol. 131 C: 271-280.
- De la Torre F. R., Salibián A., Ferrari L. (2000) Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. Environ. Pollut. 109: 277-282.
- De La Vega Salazar M. Y., Martinez Tabche L., Macias Garcia C. (1997) Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramirez Dam in Mexico. Ecotoxicol. Environ. Saf. 38: 53-62.
- De Wachter B., Scholliers A., Blust R. (1998) Semicuantitative immunobot detection of 70 kDa stress proteins in the carp *Cyprinus carpio*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60: 37-44.
- Della Morte R., Villani G. R. D., Di Martino E., Squillacioti C., De Marco L., Vuotto P., Belisario M. A., Staiano N. (1994) Glutathione depletion induced in rat liver fractions by seven pesticides. J. Biol. Res. -Bool. Soc. It. Biol 8-9, IXX: 185-192.
- Dellali M., Barelli M. G., Romeo M., Aissa P. (2001) The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. Comp. Biochem. Physiol. 130 C: 227-235.

- Denison M. S., Phelan D., Winter G. M., Ziccardi M. H. (1998) Carbaryl, a carbamate insecticide, is a ligand for the hepatic Ah (dioxin) receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152: 406-414.
- Denton D. L., Wheelock C. E., Murria S. A., Deanovic L. A., Hammock B. D., Hinton D. E. (2003) Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22 (2): 336-341.
- Dettbarn W-D., Yang Z. P., Milatovic D. (1999) Different role of carboxylesterase in toxicity and tolerance to paraoxon and DFP. *Chem.-Biol. Interact.* 119/120: 445-454.
- Dierickx P. J. (1998) Increased cytotoxic sensitivity of cultured FHM fish cells by simultaneous treatment with dodecyl sulfate and buthionine sulfoximine. *Chemosphere* 36 (6): 1263-1274.
- Dilorio P. J., Holsinger K., Schultz J. R., Hightower L. E. (1996) Quantitative evidence that both Hsc70 and Hsp 70 contribute to thermal adaptation in hybrids of the livebearing fishes *Poeciliopsis*. *Cell Stress Chap.* 1: 139-147.
- Dombrádi V., Krieglstein J., Klumpp S. (2002) Regulating the regulators. Conference of protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO reports* 3: 120-124.
- Domenicotti C., Paola D., Vitali A., Nitti M., D'Abramo C., Cottalasso D., Maloberti G., Biasi F., Poli G., Chiarpotto E., Marinari U. M., Pronzato M. A. (2000) Glutathione depletion induced apoptosis of rat hepatocytes through activation of protein kinase C novel isoforms and dependent increase in AP-1 nuclear binding. *Free Radical. Biol. Med.* 29 (12): 1280-1290.

- Dorval J., Leblond V. S., Hontela A. (2003) Oxidative stress and loss of cortisol secretion in the adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquat. Toxicol.* 63: 229-241.
- Dutta H. M., Marcelino J., Richmonds C.R. (1992) Brain acetylcholinesterase activity and optomotor behavior in bluegills, *Lepomis macrochirus* exposed to different concentration of diazinon. *Arch. Intern. Physiol. Biochim. Biophys.* 100: 331-334.
- Dutta H. M., Munshi J. D, Dutta G. R., Singh N. K., Adhikari S., Richmonds C. R. (1995) Age related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity of *Heteropneustes fossilis* (Bloch) by malathion. *Comp. Biochem. Physiol.* 11 A: 331-334.
- Dutta H. M., Roy P. K., Singh N. K., Adhikari S., Munshi J. D. (1998) Effects of sublethal levels of malathion on the gills of *Heteropneustes fossilis*: Scanning Electron microscopic study. *J. Environ. Path. Toxicol. Oncol.* 17:51-63.
- Ecobicon D. J. (1982) Pesticides and neurological diseases. CRC Pres, Inc. Boca Raton Florida.
- Edwards C. A., Fisher S. W. (1991) The use of cholinesterase measurement in assessing the impact of pesticides on terrestrial and aquatic invertebrates. En: *Cholinesterase Inhibiting Insecticides. Their Impact on Wildlife and the Environment. Vol 2. Chemicals in Agriculture.* Ed Mineau P. Elsevier, New York, NY, USA, Cap 11 pp 255-275 .
- Egaas E., Sanvik M., Fjeld E., Källqvist T., Goksøyr A., Svensen A. (1999) Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.* 122 C: 337-344.

- El-Alfy A. T., Bernache E., Schlenk D. (2002) Gender differences in the effect of salinity on aldicarb uptake, elimination, and *in vitro* metabolism in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 61: 225-232.
- Eldefrawi M. E., Eldefrawi A. T. (1983) Neurotransmitter receptors as targets for pesticides. *J. Environ. Sci. Health B* 18: 65-88.
- Ellman B. L., Courtney K. D., Andres V., Feartherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95.
- Ellman, B. L. (1959) Tissue sulphydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77.
- Enan E., Dunlap D. Y., Matsumura F. (1998) Use of c-Src and c-Fos knockout mice for the studies on the role of c-Src kinase signaling in the expression of toxicity of TCDD. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 12 (5): 263-274.
- Enan E., Matsumura F. (1996) Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic AH receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem. Pharmacol.* 52: 1599-1612.
- Enan E., Matsumura F. (1998) Activation of c-Neu Tyrosine kinase by o,p'-DDT and  $\beta$ -HCH in cell-free and intact cell preparations from MCF-7 human breast cancer cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 12: 83-92.
- Escher B., Behra R., Eggen R., Fent K. (1997) Molecular mechanisms in ecotoxicology: an interplay between environmental chemistry and biology. *Chimia* 51: 915-921.
- Eto M. (1974) *Organophosphorus Pesticides: Organic and biological chemistry.* CRC Press Inc. Cleveland.

- Fader S. C., Yu Z., Spotila J. (1994) Seasonal variations in the heat shock proteins (hsp 70) in stream fish under natural conditions. *J. Therm. Biol.* 19: 335-341.
- Fanta E., Rios S. A. F., Rom S., Casagrande Vianna A. C., Freiburger S. (2003) Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54: 119-130
- Favari L., Lopez E., Martinez-Tabche L., Díaz-Pardo E. (2002) Effect of insecticide on plankton and fish of Ignacio Ramirez Reservoir (Mexico): A biochemical and biomagnification study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51: 177-186.
- Feder M. E. (1999) Organismal, ecological, and evolutionary aspects of heat-shock proteins and the stress response: established conclusions and unresolved issues. *Amer. Zool.* 39: 857-864.
- Fenet H., Casellas C., Bontoux J. (1998) Laboratory and field-caging studies on hepatic enzymatic activities in the European eel and rainbow trout. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40: 137-143.
- Ferrari A., Anguiano O. L., Soleño J., Venturino A., Pechen de D'Angelo A. M. (2003). Diferente sensibilidad de especies acuáticas a plaguicidas metil azinfos, paratión y carbaril. En: *Toxicología y Química Ambiental. Contribuciones para un desarrollo sustentable*. Proceedings: IV Reunión "Society of Environmental Toxicology and Chemistry" Latinoamericana, Buenos Aires 2001. Publicación SETAC LA. Ed Herkovits J. pp.178-181.
- Ferrari A., Bubach D., Ribeiro Guevara S., Arribére M. A., Venturino A., Pechen de D'Angelo A. M. (2002) Distribución de paratión y mercurio y biomarcadores de efecto en la exposición de *Cyprinus carpio* a concentraciones subletales. *Acta Toxicol. Arg.* 10 (1): 5-10.

- Finney D. J. (1971) Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Folch B. J., Lees M., Stanley S. G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 266: 497-510.
- Forget J., Beliaeff B., Bocquené G. (2003) Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquat. Toxicol.* 62: 195-204
- Frydman J., Höhfeld J. (1997) Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *TIBS* 22: 87-92.
- Fukuto R. T. (1972) Metabolism of Carbamate Insecticides. *Drug Metab. Res.* 1: 11.
- Fukuto R. T. (1990) Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Persp.* 87: 245-254.
- Fukuto R. T., Metcalf R. L. (1969) Metabolism of insecticides in plant and animals. *Ann. NY Acad. Sci.* 160: 97-113.
- Fulton M. H., Key P. B. (2001) Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 37-45.
- Gašperšič R., Kritnik B., Črne-Finderle N., Sketelj J. (1999) Acetylcholinesterase in the neuromuscular junction. *Chem.-Biol. Interact.* 119-120: 301-308.
- Geiger D. L., Brooke L. T., Call D. J. (1990) Acute toxicities of organic chemicals to fathead minnows (*Pimephales promelas*). Vol 5 Center for Lake Superior Environmental Studies, University of Wisconsin, Superior, WI, 332 pp.

- George, A. G. (1994) Enzymology and molecular Biology of Phase II Xenobiotic -Conjugating Enzymes in Fish. En: *Aquatic Toxicology. Molecular, biochemical, and cellular perspectives*. Ed Malins, C. Ostrander G. K. Cap 2, pp 37-85.
- Ghosh M. C., Ghosh R., Ray A. K. (2000) Induction of CYP1A by carbofuran in primary culture of fish hepatocytes. *J. Mol. Toxicol.* 14 (4): 204-209.
- Gil F., Pla A. (2001) Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J. Appl. Toxicol.* 21: 245-255.
- Glotfelty D. E., Seiber J. N., Liljedahl L. A. (1987) Pesticides in fog. *Nature* 325: 602.
- Greulich K., Hoque E., Plugmacher S. (2002) Uptake, metabolism, and effects on detoxication enzymes of isoproturon in spawn and tadpoles of amphibians. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52: 256-266.
- Grisaru D., Sternfeld M., Leedor A., Glick D., Soreq H. (1999) Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.* 264: 672-686.
- Gruber S. J., Munn M. D. (1998) Organophosphate and carbamate insecticides in agricultural waters and cholinesterase (ChE) inhibition in common carp (*Cyprinus carpio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 391-396.
- Grue C. E., Hart A. D. M., Mineau P. (1991) Biological consequences of depressed brain cholinesterase in wildlife. En: *Cholinesterase Inhibiting Insecticides. Their Impact on Wildlife and the Environment. Vol 2. Chemicals in Agriculture*. Ed. Mineau P. Elsevier, New York, NY, USA. Cap. 8 pp 151-210.

- Guilhermino L., Barros P., Silva M. C., Soares A. M. V. M. (1998) Should the use of cholinesterases as specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers* 3: 157-163.
- Gultekin F., Ozturk M., Akdogan M. (2000) The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (*in vitro*). *Arch. Toxicol.* 74: 533-538.
- Habig C., DiGiulio R. D. (1991) Biochemical characteristic of cholinesterase in aquatic organisms. En: *Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment. Vol 2-Chemicals in Agriculture*. Ed. Mineau P. Elsevier, New York, NY, USA, Cap 2 pp19-34.
- Habig W. H., Pabst M. J., Jacoby W. B. (1974) Glutathione S-transferase, the first enzymatic sep in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130-7139.
- Hai D. Q., Varga S. I., Matkovics B. (1997a) Organophosphate effects on antioxidant system of *carp* (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 117: 83-88.
- Hai D. Q., Varga S. I., Matkovics B. (1997b) Effects of diethyl-dithiocarbamate on antioxidant system in carp tissue. *Acta Biol. Hungarica* 48: 1-8.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. (1989) *Free radicals in biology and medicine*, 3<sup>rd</sup> ed. Oxford University Press, Oxford.
- Hansch C., Deustch E. W. (1966) The use of substituent constants in the study of structure activity relationship in cholinesterase inhibitors. *Biochem. Biophys. Acta* 126: 117-128.

- Hassanein H. M. A., Banhawy M. A., Soliman F. M., Abdel-Rehim S. A., Müller W. E. G., Schröder H. C. (1999) Induction of Hsp70 by the Herbicide Oxyfluorfen (Goal) in the Egyptian Nile Fish, *Oreochromis niloticus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37: 78-84.
- Hassanein H. M. A. (2002) Toxicological effects of the herbicide oxyfluorfen on acetylcholinesterase in two fish species: *Oreochromis niloticus* and *Gambusia affinis*. Environ. Sci. Health A. 37(4): 521 -527.
- Hayes J. D., McLellan L. I. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stress. Free Radic. Res. 31 (4): 273-300.
- Heath A. G. (1987) Behavior and nervous system function. En: *Water pollution and fish physiology*. CRC Press, Boca Raton Florida, USA. pp181-196.
- Hernández C., Martín M., Bodega G., Suárez I., Pérez J., Fernández B. (1999) Response of carp central system to hyperammonemic conditions: an immunocytochemical study of glutamine synthetase (GS), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and 70 KDa heat-shock protein (Hsp 70). Aquat. Toxicol. 45: 195-207.
- Hightower L. E. (1991) Heat shock proteins, chaperones and proteotoxicity. Cell 66: 191-197.
- Hodgson E., Silver I. S., Butler L. E., Lawton M. P., Levi P. E. (1991) Metabolism. En: Hayes W. J. Jr. Eds. *Handbook of pesticide toxicology: General Principles*, vol 1. Academic Press. San Diego, USA. pp. 107-167.
- Holovská K., Lenártová V., Rosival I., Kičinková M., Majerčíaková A., Legáth J. (1998) Antioxidant and detoxifying enzymes in the liver and kidney of pheasants after intoxication by herbicides MCPA and ANITEN I. J. Biochem. Mol. Toxicol. 12: 235-244.

- Horst M., Oppliger W., Rospert S., Schönfeld H-J., Schatz G., Hazme A. (1997) Sequential action of two hsp70 complexes during protein import in mitochondria. *EMBO J.* 16 (8): 1842-1849.
- Huey R. B., Bennett A. F. (1990) Physiological adjustments of fluctuating thermal environments: An ecological and evolutionary perspective. En *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Ed. Morimoto R. I., Tissieres A., Georgopoulos C. Cold Spring Harbor Press, New York, USA. pp 37-59.
- IARC (1991) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. Vol 53. Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Ibrahim H., Kheir R., Helmi S., Lewis J., Crane M. (1998) Effects of organophosphorus, carbamate, pyrethroid and organochlorine pesticides, and heavy metal on survival and cholinesterase activity of *Chironomus riparius* Meigen. *Bull. Contam. Toxicol.* 60: 448-455.
- Iwama G. K., Thomas P. T., Forsyth R. B., Vijayan M. M. (1998) Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 8: 35-36.
- Janssens B. J., Le Gall R., Rees J. F. (2002) Peroxide-triggered erythrocytes haemolysis as a model for the study of oxidative damage in marine fishes. *J. Fish Biol.* 61: 71-84.
- Janssens B., Childress J. J., Baguet F., Rees J-F. (2000) Reduced enzymatic antioxidant defense in deep-sea fish. *J. Exp. Biol.* 203: 3717-3725.
- Jensen E. G., Skaare J. U., Egas E., Goksøyr A. (1991) Response of metabolizing enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to endosulfan by enzyme activities and immunological methods. *Aquat. Toxicol.* 21: 81-92.

- Jett D. A., Navoa R. V. (2000) *In vitro* and *in vivo* effects of chlorpyrifos on glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Neurotoxicology* 21: 141-146.
- Johnson W. W., Finley M. T. (1980) Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates, US. Fish and Wildlife Service, Washington DC, USA.
- Jokanović M. (1996) Interaction of organophosphorus compounds with carboxylesterases in the rat. *Arch. Toxicol.* 70: 444-450.
- Jokanović M. (2001) Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicol.* 166: 139-160.
- Jones S. B., King L. B., Sappington L. C., Dwyer F. J., Ellersieck M., Buckler D. R. (1998) Effects of carbaryl, permethrin, 4-nonylphenol, and copper on muscarinic cholinergic receptors in brain of surrogate and listed fish species. *Comp. Biochem. Physiol* 120 C: 405-414.
- Jyothi B., Narayan G. (1999) Certain Pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.). *Food Chem. Toxicol.* 37: 417-421.
- Kallander D. B., Fisher S. W., Lydy M. J. (1997) Recovery following pulsed exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the midge, *Chironomus riparius*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33: 29-33.
- Kamata H., Hirata H. (1999) Redox regulation of cellular signaling. *Cell. Signal.* 11 (1): 1-14.
- Karen D. J., Klaine S. J., Ross P. E. (2001) Further considerations of skeletal system as biomarker of episodic chlorpyrifos exposure. *Aquat. Toxicol.* 52: 285-296.

- Karnovsky M. J., Roots L. (1964) A "direct-coloring" tiochrome method for cholinesterases. *J. Histochem Cytochem* 12: 219-221.
- Karouna-Renier N. K., Zehr J. P. (1999) Ecological implications of molecular biomarkers: assaying sub-lethal stress in the midge *Chironomus tentans* using heat shock protein 70 (Hsp70) expression. *Hydrobiology* 401: 255-264.
- Ketteler B., Coles B., Meyer D. J. (1983) The role of glutathione in detoxication. *Environ. Health Persp.* 49: 59-69.
- Kikuchi K., Watabe S., Suzuki Y., Aida K., Nakajima H. (1993) The 65-KDa cytosolic protein associated with warm temperature acclimatation in goldfish, *Carassius auratus* *J. Comp. Physiol.* 163 B: 349-354.
- Kirby M. F., Morris S., Hurst M., Kirby S. J., Neall P., Tylor T., Fagg A. (2000) The use of cholinesterase activity in flounder (*Platichthys flesus*) muscle tissue as a biomarker of neurotoxic contamination in UK estuaries. *Mar Pollut. Bull.* 40 (9): 780-791.
- Klumpp D. W., Humphrey C., Huasheng H., Tao F. (2002) Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China II. Biomarkers and embryo malformation rates as indicators of pollution stress in fish. *Mar Pollut Bull.* 44 (8): 761-769.
- Knuth M. L., Heinis L. J., Anderson L. E. (2000) Persistence and distribution of azinphos methyl following application to littoral enclosure mesocosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47:167-177.
- Kono Y., Fridovich I. (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol. Chem.* 257:5751-5754.
- Kuhr R. J., Dorough H. W. (1976) Carbamate pesticides: Chemistry, biochemistry and toxicology. CRC Press, Cleveland, OH, USA.

- Lacorn M., Piechotta G., Simat T. J., Kammann U., Wosniok W., Lang T., Müller W. G., Schröder H. C., Jenke H-S., Steinhart H. (2001) Annual cycles of apoptosis, DNA strand breaks, heat shock proteins, and metallothionein isoforms in dab (*Limanda limanda*): influences of natural factors and consequences for biological effect monitoring. *Biomarkers* 6: 108-126.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lemaire P., Livingstone D. R. (1997) Aromatic hydrocarbon quinone-mediated reactive oxygen species production in hepatic microsomes of the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Comp. Biochem Physiol.* 117: 131-139.
- Lindquist S., Craig E. A. (1988) The Heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-677.
- Lindström-Seppä P., Roy S., Huuskonen S., Tossavainen K., Ritola O., Marin E. (1996) Biotransformation and glutathione homeostasis in rainbow trout exposed to chemical and physical stress. *Mar. Environ. Res.* 42: 323-327.
- Lionetto M. G., Caricato R., Giordano M. E., Pascariello M. F., Marinosci L., Schettino T. (2003) Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar. Pollut. Bull.* 46: 324-30.
- Livingstone D. R., Mitchelmore C. L., O'Hara S. C. M., Lemaire P., Sturve J., Förlin L. (2000) Increased potential for NAD(P)H-dependent reactive oxygen species production of hepatic subcellular fractions of fish species with *in vivo* exposure to contaminants. *Mar. Environ. Res.* 50: 57-60.
- Loewy M., Kirs V., Carvajal G., Venturino A., Pechén de D'Angelo A. M. (1999) Ground water contamination by azinfos methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina). *Sci. Total Environ.* 225: 211-218.

- Loewy R. M. (2000) Plaguicidas en aguas subterráneas del Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Fac. Ing., Univ. Nac. Comahue, Neuquen, Argentina.
- Loewy R. M., Carbajal L. G., Novelli M., Pechén de D'Angelo A. M. (2003) Effect of pesticide use in fruit production orchards on shallow ground water. *J. Environ. Sci. Health B.* 38, (3): 317-325.
- Loewy R., Carbajal G., Pechén de D'Angelo A. M. (2002) Residuos de plaguicidas en efluentes de industrias agroalimentarias y aguas superficiales. En: *Toxicología y Química Ambiental. Contribuciones para un desarrollo sustentable*. Proceedings: IV Reunión "Society of Environmental Toxicology and Chemistry" Latinoamericana (SETAC LA), Buenos Aires 2001. Publicación SETAC LA. Ed Herkovits J. pp.193-195.
- Lopes V. I. C. F., Antunes-Madeira M. C., Madeira V. M. C. (1997) Effects of methylparathion on membrane fluidity and its implications for the mechanisms of toxicity. *Toxicol. In Vitro* 11: 337-345.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. S. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Macek K. J., McAllister W. A. (1970). Insecticide susceptibility of some common fish family representatives. *Trans. Am. Fish. Soc.* 99: 20-27.
- Mackay D., Clark K. E. (1991) Predicting the environmental partitioning of organic contaminants and their transfer to biota. En: *Organic contaminants in the environment: Environmental Pathways & Effects*. Ed. Jones K. C. Environmental Management Series, Cairns J, Harrison R. M. Ed. Elsevier, Londres, UK. Cap. 5, pp: 159-188.
- Magnarelli de Potas G., Pechén de D'Angelo A. M. (1997) Organophosphate-induced alterations in acidic phospholipid turnover in human erythrocyte. *Pharmacol. Rev. Comm.* 9: 11-17.

- Massoulié J. (2002) The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* 11: 130-143.
- Massoulié J., Anselmet A., Bon S., Krejci E., Legay C., Morel N., Simon S. (1999) The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chem.-Biol. Interact.* 119-120: 29-42.
- Matsumura F. (1985) *Toxicology of insecticides*, 2<sup>nd</sup> edition. Plenum Press, New York, NY, USA.
- Matsumura F. (1986) *Differential toxicities of insecticides and halogenated aromatics*, 2<sup>nd</sup> edition. Pergamon Press Oxford, England.
- Maxwell D. M. (1992) The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114: 306-312.
- Meneely G. A., Wyttembach Ch. R. (1989) Effects of the organophosphate insecticides diazinon and parathion on Bobwhite quail embryos: skeletal defects and acetylcholinesterase activity. *J. Exp. Zool.* 252: 60-70.
- Miller J. K., Brzezinska-Slebodzinska E. (1993) Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.* 76: 2812-2823.
- Morimoto R. I., Kroeger P. E., Cotto J. J. (1996) The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions. En *Stress inducible Cellular Responses*. Ed. Feige U., Morimoto R. I., Yahara I., Polla B. Basel: Birkhäuser, pp. 139-164.
- Motoyama N., Dauterman W. C. (1980) Glutathione S-transferases: their role in the metabolism of organophosphorus insecticides. *Rev. Biochem. Toxicol.* 2: 49-69.

- Moya M. G., Magnarelli de Potas G., Pechen de D'Angelo A. M. (2002) Alteration of thrombine-signaling mechanism by heptachlor in human platelets. *J. Biochem. Molec. Toxicol.* 16 (4): 189-196.
- Mulcahy R. T., Wartman M. A., Bailey H. H., Gipp J. J. (1997) Constitutive and  $\beta$ -naphthoflavone-induced expression of the human g-Glutamylcysteine Synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE Sequence. *J. Biol. Chem.* 272 (11): 7445-7454.
- Nguyen T., Sheratt P. J., Pickett C. B. (2003) Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 233-260.
- Nijijima H., Nagao M., Nakajima M., Takatori T., Iwasa M., Maeno Y., Koyama H., Isobe I. (2000) The effects of sarin-like and soman-like organophosphorus agents on MAPK and JUNK in rat brains. *For. Sci. Int.* 112: 171-178.
- Nimmo I. A., Coghill D. R., Hayes J. D., Strange R. C. (1981) A comparison of the subcellular distribution, subunit composition and bile-acid binding activity of glutathione S-transferases from trout and rat liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 68 B: 579.
- NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council. (1987) Biological markers in environmental health search. *Environ. Health Persp.* 74: 3-9.
- Olivier K., Liu J., Pope C. (2001) Inhibition of forskolin-stimulated camp formation *in vitro* by paraoxon and chlorpyrifos oxon in cortical slices from neonatal, juvenile, and adults rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15: 263-268.

- Olsson A., Vitinsh M., Plikshs M, Bergman A. (1999) Halogenated environmental contaminants in the perch (*Perca fluviatilis*) from Latvian coastal areas. *Sci. Total Environ.* 239: 19-30.
- Oruç E.Ö., Üner N. (1998) Effects of azinphosmethyl on some biochemical parameters in blood, muscle and liver tissues of *Cyprinus carpio*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 62: 65-71.
- Oruç E.Ö., Üner N. (2000) Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 127 C, 291-296.
- Pandey S., Parvez S., Sayeed I., Haque R., Bin-Hafeez B., Raisuddin S. (2003) Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallagu attu* (Bl. & Schn.) *Sci. Total Environ.* 309 (1-3): 105-115.
- Panemangalore M., Bebe F. N. (2000) Dermal exposure to pesticides modifies antioxidant enzymes in tissues of rats. *J. Environ. Health.* B 35: 399-416.
- Parsell D. A., Lindquist S. (1993) The function of Heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27: 437-496.
- Parson J. T., Surgeoner G. A. (1991) Acute toxicities of permethrin, fenitrothion, carbaryl and carbofuran to mosquito larvae during single- or multiple-pulse exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1229-1233.
- Peakall D. W. (1994) Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1: 55-60.
- Peña S., Peña J. B., Rios C., Sancho E., Fernández C., Ferrando M. D. (2000) Role of glutathione in thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46 (1): 51-56.

- Peña-Lopis S., Ferrando M. D., Peña J. B. (2002) Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. *Chemosphere* 47: 485-497.
- Peña-Lopis S., Peña J. B., Sancho E., Fernandez-Vega C., Ferrando M. D. (2001) Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. *Chemosphere* 45 (1): 51-56
- Perkins E. J., Schlenk D. (2000) *In Vivo* Acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: Role of biotransformation in acute toxicity. *Toxicol. Sci.* 53: 308-315.
- Phillips T. A., Summerfelt R. C., Atchinson G. J. (2002a) Environmental, biological and methodological factors affecting cholinesterase activity walleye (*Stizostedion vitreum*) *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 75-80.
- Phillips T. A., Wu J., Summerfelt R. C., Atchinson G. J. (2002b) Acute Toxicity and cholinesterase inhibition in larval and early juvenile walleye exposed to chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 1469-1474.
- Pimentel D. (1971) Ecological effect of pesticides on non-target organism. U.S. Gov. Printing Office, Washington DC, USA. no.4106-0089.
- Pinho G. L. L., Rosa C. M., Yunes J. S., Bianchini A., Monserrat J. M. (2002) Influência da butionina sulfoximina na toxicidade da microcistina no hepatopâncreas de *Chasmagnatus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Actas de la V Reunión de la SETAC Latino-Americana, "Ecotoxicología e os novos desafios no monitoramento ambiental"*, Victoria, ES, Brasil, 283.
- Plimmer J. R. (1988) Movement of pesticides from the site of application Pesticides in *Food and environmental Implications*, IAEA, Vienna, Austria, 61-77.

- Pope C. N. (1999) Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity?. *J. Toxicol. Environ. Health.* 2: 161-181.
- Powers D. A. (1989) Fish as model systems. *Science* 246: 352-358.
- Pyza E., Mak P., Kramarz P., Laskowski R. (1997) Heat shock proteins (Hsp70) as biomarkers in ecotoxicological studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38: 244-251.
- Quinn D. M. (1987) Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* 87: 955-979.
- Racke K. D. (1992) Degradation of organophosphorus insecticides in environmental matrices. En: *Organophosphates. Chemistry, Fate and Effects.* Ed. Chambers J. E., Levi P. E. Academic Press Inc., San Diego, California, USA. Cap 3 pp 47-78.
- Ramaswamy M., Thangavel P. Y Selvam N. P. (1999) Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GTP) enzyme activities in different tissues of *Sarotherodon mossambicus* (Peters) exposed to a carbamate pesticide, carbaryl. *Pestic. Sci.* 55: 1217-1221.
- Ramírez Mora B., Martínez-Tabche L., Sánchez-Hidalgo E. , Castañeda Hernández G., Gutierrez Ruiz M. C., Flores Murrieta F. (2000) Relationship between toxicokinetics of carbaryl and effect on acetylcholinesterase activity in *Pomacea patula* snail. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46: 234-239.
- Rand G. M., Kleerekoper H., Matis J. (1975) Interaction in the odor flow perception and the effects of parathion in the locomotor orientation of the goldfish, *Carassius auratus* L. *J. Fish Biol.* 7: 497-504.

- Randi A. S., Sancovich H. A., Ferramola de Sancovich A. M., Loaiza A., Krawiec L., Kleiman de Pisarev D. L. (1998) Hexachlorobenzene-induced alteration of rat hepatic microsomal membrane function. *Toxicology* 125: 83-94.
- Rao K. S., Rao K. V. (1983) Regulation of phosphorylases and aldolases in tissues of the teleost (*Tilapia mossambica*) under methyl parathion impact. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 31(4): 474-478.
- Rattner B. A., Fairbrother A. (1991) Biological variability and the influence of stress on cholinesterase activity. En: *Cholinesterase-inhibiting insecticides. Vol 2. Chemicals in Agriculture.* Ed. Mineau P. Elsevier, New York, NY, USA. Cap 5 pp 89-105.
- Regoli F., Wiston G. W. (1999) Quantification of total oxidant scavenging capacity (TOSC) of antioxidants for peroxynitrite, peroxy radicals and hydroxyl radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156: 96-105.
- Richardson R. J. (1984) Neurotoxic esterase: normal and pathogenic roles. En: *Cellular and Molecular Neurotoxicology.* Ed. Narahashi T. Raven Press New York, USA. pp: 285-295.
- Richmonds C. R., Dutta H. M. (1989) Histopathological changes induced by malathion in the gills of bluegill *Lepomis macrochirus* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 43: 123-130.
- Richmonds C.R., Dutta H. M. (1992) Effects of pH on inhibition and spontaneous reactivation of acetylcholinesterase treated with esters of phosphorus acids and carbamic acids. *Biochem J.* 105: 171-179.
- Rodríguez-Fuentes G., Gold-Bouchot G. (2000) Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition *in vitro*. A case study in two Mexican lagoons. *Mar. Environ. Res.* 50: 357-360.

- Roméo M., Hoarau P., Garello G., Gnassia-Barelli M., Girard J. P. (2003) Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environ. Pollut.* 122 369-378.
- Rouser G., Fleischer S., Yamamoto A. (1970) Two dimensional chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorous analysis spots. *Lipids* 5: 494-496.
- Rubin R. A., O'Keefe E. J., Earp Shelton N. (1982) Alteration of epidermal growth factor dependent phosphorylation during rat liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 776-780.
- Rudneva-Titova I., Zherko N. V. (1994) Effects of polychlorinated biphenyls on the activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in muscle and liver of two black sea fish species. *Biochemistry (Moscow)* 59: 25-31.
- Saglio P., Trijasse S. (1998) Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35,484-491.
- Saglio P., Trijasse S., Azam D. (1996) Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 232-238.
- Sanchez J. C., Fossi M. C., Focardi S. (1997) Serum "B" esterases as a non destructive biomarkers for monitoring the exposure of reptiles to organophosphorus insecticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37: 45-52.
- Sanchez-Hernández J. C., Walker C. H. (2000) *In vitro* and *in vivo* cholinesterase inhibition in lacertides by phosphonate- and phosphorothioate-type organophosphates. *Pestic. Biochem. Physiol.* 67: 1-12.
- Sancho E., Ferrando M. D., Andreu E. (1997) Response and recovery of brain acetylcholinesterase activity in the European eel, *Anguilla anguilla*, exposed to fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38: 205-209.

- Sancho E., Ferrando M. D., Lleó C., Andreu-Moliner E. (1998) Pesticide toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41: 245-250.
- Sanders B. M. (1993) Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23: 49-75.
- Sandvik M., Beyer J., Goksoyr A., Hylland K., Egaas E., Skaare U. (1997) Interaction of benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium on biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.). *Biomarkers* 2: 153-160.
- Sarafian T. A., Bredesen D. E. (1994) Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? *Free Rad. Res.* 21: 1-8.
- Scaps P., Demuyneck S., Descamps M., Dhainaut A. (1997) Effect of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and choline acyltransferase activities of the polychaete *Nereis diversicolor*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33: 203-208.
- Schuh R. A., Lein P. J., Beckles R. A., Jett D. A. (2002) Non cholinergic mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element binding protein in cultured neurons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182: 176-185.
- Schultz I. R., Peters E. L., Newman M. C. (1996) Toxicokinetics and disposition of inorganic mercury and cadmium in channel catfish after intravascular administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140: 39-50.

- Serrano R., Hernández F., López F. J., Peña J. B. (1997a) Bioconcentration and depuration of chlorpyrifos in the marine mollusk *Mytilus edulis*.
- Serrano R., López F. J., Hernández F., Peña J. B. (1997b) Bioconcentration of chlorpyrifos, chlorfenvinphos, and methidathion in *Mytilus galloprovincialis*. Bull. Contam. Toxicol. 59: 968-975.
- Shapira M., Seidman S., Livni N., Soreq H. (1998) *In vivo* and *in vitro* to multiple anticholinesterases in *Xenopus laevis* tadpoles. Toxicol. Lett. 102-103: 205-209.
- Shi D., Deng Y. R., Liu S. L., Zhang Y. D., Wei L. (2003) Redox stress regulates cell proliferation and apoptosis of human hepatoma through Akt protein phosphorylation. FEBS Lett. 542: 60-64.
- Siem W. K., Curtis L. R., Glenn S. W. (1984) Growth and survival of developing steelhead trout (*Salmo gairdneri*) continuously or intermittently exposed to copper. J. Fish. Aquat. Sci. 41: 433-438.
- Singh R. K., Sharma B. (1998) Carbofuran-induced biochemical changes in *Clarias batrachus*. Pestic. Sci. 53: 285-290.
- Smith G. J., Litwack G. (1980) Roles of ligandin and the glutathione S-transferases in binding steroid metabolites, carcinogens and other compounds. Rev. Biochem. Toxicol. 2: 1-47.
- Sprague J. B. (1988) Fish test that give useful information. En: *Toxic Contaminants and Ecosystem Health: A great Lake Focus*. Evans M. S. (Ed) Adv. Environ. Technol. 21: 247-256.
- Steadman B. L., Farag A. M., Bergman H. L. (1991) Exposure related patterns of biochemical indicators in rainbow trout exposed to No 2 fuel oil. Environ. Toxicol. Chem. 10: 365-374.

- Stephan C. E., Mount D. I. (1973) Use of toxicity tests with fish in water pollution control. Biological methods for the assessment of water quality, ASMT STP 528: 164-177.
- Stephan E. (1975) Methods for acute test with fish, macroinvertebrates and amphibians. Ecological Research Series. EPA-660/3-75-009.
- Stephensen E., Sturve J., Förling L. (2002) Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 133 C: 435-442.
- Strmac M., Braunbeck T. (2000) Isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to discriminate between differently contaminated small river systems. *Toxicol. in Vitro* 14: 361-377.
- Sturm A., Wogram J., Hansen P-D., Liess M. (1999) Potential use of cholinesterase in monitoring low levels of organophosphates in small streams: Natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 194-200.
- Tedengren M., Olsson B., Bradley B., Zhou L. (1999) Heavy metal uptake, physiological response and survival of the blue mussel (*Mytilus edulis*) from marine and brackish waters in relation to the induction of heat-shock protein 70. *Hydrobiologia* 393: 261-269.
- Tessier D. M., Matsumura F. (2001) Increased ErbB-2 tyrosine kinase activity, MAPK phosphorylation, and cell proliferation in the prostate cancer cell line LNCaP following treatment by selected pesticides. *Toxicol. Sci.* 60: 38-43.
- Thomas G., De Pablo F., Schlessinger J., Moscat J. (2000) The ins and outs of protein phosphorylation. Workshop report: Control of signaling by protein phosphorylation. *EMBO reports* 1: 11-15.

- Thomas J. G., Ayling A., Baneyx F. (1997) Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. Coli*. *Appl. Biochem. Biotech.* 66: 197-238.
- Tort L., Kargacin B., Torres P., Giralt M., Hidalgo J. (1996) The effect of cadmium exposure and stress plasma cortisol, metallothionein levels and oxidative status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Liver. Comp. Biochem. Physiol.* 114 C (1): 29-34.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Tsuda T., Kojima M., Harada H., Nakajima A., Aoki S. (1996) Accumulation and excretion of fenthion, fenthion sulfoxide and fenthion sulfone by killifish (*Oryzias latipes*) *Comp. Biochem. Physiol.* 113 C: 45-49.
- United State Environmental Protection Agency (EPA) (1984). *Analysis of Pesticides Residues in Human and Environmental Samples: The Sampling and analysis of water for pesticides. Section 10, 1-25.*
- United State Environmental Protection Agency. *Prevention, Pesticides and Toxic Substances (1996) Fish acute Toxicity Test, Freshwater and Marine. EPA 712-C-96-118, Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1075.*
- United State Environmental Protection Agency. *Water Quality Criteria (1972) EPA R3-73-033.*
- Valters K., Olsson A., Vitinsh M., Bergman A (1999) Contamination sources in Latvia: levels of organochlorines in Perch (*Perca fluviatilis*) from rivers Daugava and Lielupe. *Ambio.* 28: 335-340.

- Van den Beukel I., Van Kleef R. G. D. M., Ootgiesen M. (1996) Direct functional effects of parathion and paraoxon on neuronal nicotinic and muscarinic M3 acetylcholine receptors. *ATLA* 24: 191-199.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen P. E. (2003) Fish Bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57-149.
- Van der Oost R., Goksøyr A., Celander M., Heida H., Vermeulen N. P. E. (1996) Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquat. Toxicol.* 36: 189-222.
- Van Gestel C. A. M., Van Brummelen T. C. (1996) Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5: 217-225.
- Varo I., Navarro J. C., Amat F., Guilhermino L. (2002) Characterization of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia partenogénica*. *Chemosphere* 48: 563-569.
- Ventura E. C., Gaelzer L. R., Zanette J., Marques M. R. F., Bainy A. C. D. (2002) Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. *Mar. Environ. Res.* 54: 775-779.
- Venturino A. (1995) Interacción de plaguicidas organofosforados y poliaminas sobre el desarrollo embrionario. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

- Venturino A., Gauna L., Bergoc R. M., Pechén de D'Angelo A. M. (2001) Toxicokinetics of Malathion in larval stages of the toad *Bufo arenarum* (Hensel): Effect of exogenous spermidine. *Pest. Biochem. Physiol.* 70: 142-150.
- Venturino A., Gauna L., Loewy M., Rovedatti G., Pechén de D'Angelo A.M (1999) Toxicocinética de distribución y bioeliminación del paratión en un microcosmos nativo. XI Congreso Argentino de Toxicología y XIX Jornadas Argentinas Interdisciplinarias de Toxicología. La Plata, Argentina.
- Vilanova E., Sogorb M.A. (1999) The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 29: 21-57.
- Vinton A. J. A., Yaron B., Nye P. H. (1983) Vertical transport of pesticides into soil when adsorbed on suspended particles. *J. Agri. Food Chem.* 31: 662.
- Walker C. H., Hopkins. P., Civil R. M., Peakall D. B. (1996) Biomarkers. *Principles of Ecotoxicology*, Walker C. H., Hopkins. P., Civil R. M., Peakall D. B. (Eds.) Taylor y Francis, Londres. 175-194.
- Wallace K. B. (1992) Species-selective toxicity of organophosphorus insecticides: a pharmacodynamic phenomenon. En *Organophosphates. Chemistry, Fate and Effects*. Ed. Chambers J. E., Levi P.E. Academic Press Inc., San Diego, California, USA. Cap 4 pp 79-105.
- Ward T. R., Mundi W. R. (1996) Organophosphorus compounds preferentially affect second messenger systems coupled to M2/M4 receptors in rat frontal cortex. *Brain Res. Bull.* 39 (1): 49-55.
- Web D., Gagnon M. M. (2002) MFO inducion potential of fish species native to the Swan-Canning Estuary, Western Australia. *Environ. Toxicol.* 17 (1): 87-92.

- Weiss C. M. (1958) The determination of cholinesterase in the brain tissues of three species of fresh water fish and its inactivation *in vivo*. *Ecology* 30: 194-199.
- Weiss C. M. (1961) Physiological effect of organic phosphorous insecticides in several species of fish. *Trans. Am. Fish Soc.* 90:143-152.
- Welch W. J. (1993) How cells respond to stress. *Scient. Am.* 268: 56-64.
- Werner I., Nagel R. (1997) Stress proteins Hsp60 and Hsp70 in three species of amphipods exposed to cadmium, diazinon, dieldrin and fluoranthene. *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (11): 2393-2403.
- Wheelock C. E., Wolfe M. F., Olsen H., Tjeerdema R. S., Sowby M. L. (1999) Hsp-60 induced tolerance in the rotifer *Brachionus plicatilis* exposed to multiple environmental contaminants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 281-287.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS) (1993) Biomarkers and risk assessment: concepts and principles: Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.
- Wiegand C., Krause E., Steinberg Ch., Plugmacher S. (2001) Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49: 199-205.
- Wilson B. W., Hooper M. J., Hansen M. E., Nieberg P.S. (1992) Reactivation of organophosphorus inhibited AChE with oximes. En *Organophosphates. Chemistry, Fate and Effects*. Ed. Chambers J.E., Levi PE. Academic Press Inc., San Diego, California, USA. Cap 5 pp.107-136.
- Winston G. W., Di Giulio R. T. (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19: 137-161.

- Wogram J., Sturm A., Segner H., Liess M. (2001) Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1528-1531.
- Yarsan E., Tanyuksel M., Celik S., Aydin A. (1999) Effects of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63: 575-581.
- Yu B. P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74 (1): 139-163.
- Yu Z., Magee W. E., Spotila J. R. (1994) Monoclonal antibody ELISA test indicates that large amount of quantitative hsp-70 is present in salamanders, turtle and fish. *J. Therm. Biol.* 19: 41-53.
- Zinkl J. G., Lockhard W. L., Kenny S. A., Ward F. J. (1991) The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. En: *Cholinesterase Inhibiting Insecticides. Their Impact on Wildlife and the Environment. Vol 2. Chemicals in Agriculture.* Ed Mineau P. Elsevier, New York, NY, USA, Cap. 10 pp 233-254.

## VIII. PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

### 1. PUBLICACIONES

Ferrari Ana, Bubach Débora, Guevara S. Ribeiro, Arribére María A., Venturino Andrés, Pechen de D'Angelo Ana M. (2002) **Distribución de paratión y mercurio y biomarcadores de efecto en la exposición de *Cyprinus carpio* a concentraciones subletales**. Acta Toxicológica Argentina, volumen 10, número 1, 5-10.

Ferrari Ana, Anguiano Liliana, Soleño Jimena, Venturino Andrés, Pechen de D'Angelo Ana M. (2003) **Diferente sensibilidad de especies acuáticas a plaguicidas metil azinfos, paratión y carbaril**. En: *Toxicología y Química Ambiental. Contribuciones para un desarrollo sustentable*. Proceedings: IV Reunión "Society of Environmental Toxicology and Chemistry" Latinoamericana, Buenos Aires 2001. Publicación SETAC LA. Ed Herkovits J. pp.178-181.

Ferrari Ana, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M. (2004) **Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*)**. Ecotoxicology and Environmental Safety 57 (3): 420-425.

Ferrari Ana, Anguiano Olga L., Soleño Jimena, Venturino Andrés, Pechen de D'Angelo Ana M. **Comparative study of susceptibility and cholinesterase activities in aquatic species exposed to azinphos methyl and carbaryl**. (Enviado para su publicación).

Ferrari Ana, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M. **Effects of carbaryl and azinphos methyl on antioxidant system of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss***. (En preparación).

## 2. CONGRESOS INTERNACIONALES

- **Ferrari Ana**, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M. **La Actilcolinesterasa como biomarcador de la exposición a carbarilo en peces.** Presentación en póster XI Latin American Congress of Toxicology. Asociación Latinoamericana de Toxicología (ALATOX) 2000. Campiñas, Brasil, 25 al 28 de octubre del 2000. Revista Brasileira de Toxicología, volumen 13, N1 suplemento 2000. Resumen, 85 pág 55. San Pablo, Brasil.

- Anguiano Olga L., **Ferrari Ana**, Soleño Jimena, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M. **Bases bioquímicas de la diferente susceptibilidad de especies acuáticas a plaguicidas organofosforados y carbamatos.** Presentación en póster. XXIII Reunión Anual Sociedad de Biología Molecular de Chile, XIV Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile, XXXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, en asociación con la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Viña del Mar, Chile, 30 de octubre al 4 de noviembre del 2000. Acta de resúmenes de la reunión Iberoamericana de Bioquímica, Biología Molecular y Celular. Resumen 44, pág 99.

- **Ferrari Ana**, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M. **Time course of inhibition and recovery following acute and subacute organophosphate and carbamate exposure in the goldfish.** Presentación en póster: 27<sup>th</sup> meeting of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS) and Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB). Lisboa, Portugal, del 30 de junio al 5 de julio del 2001. The FEBS Journal. Volumen 268, suplemento 1. Resumen, PW 10-019, pág. 239. Blackwell Science, Oxford, UK.

- **Ferrari Ana**, Anguiano Olga L. Soleño Jimena, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M. **Diferente sensibilidad de especies acuáticas a plaguicidas metil azinfos, paratión y carbaril**. Presentación en póster. IV Reunión "Society of Environmental Toxicology and Chemistry" Latinoamericana (SETAC LA) Buenos Aires, 22 al 25 de octubre del 2001. Resumen, TA 33.

- **Ferrari Ana**, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M. **Evaluación del sistema antioxidante en juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestos a metilazinfos**. Presentación en póster. VII Congreso Brasileiro de Ecotoxicología, V Congreso Anual de la SETAC Latino-Americana. Vitoria, Espirito Santo, Brasil, 6 al 9 de octubre del 2002. Resumen, 214.

- **Ferrari Ana**, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M. **Efectos del insecticida carbarilo sobre biomarcadores en juveniles de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)**. Presentación en póster. VI Congreso Anual de la SETAC Latino-Americana. Buenos Aires, Argentina, 20 al 23 de octubre del 2003. Resumen pág 103.

### **3. CONGRESOS NACIONALES**

- Gauna Lidia, Rovedatti Gabriela, Loewy Miriam, **Ferrari Ana**, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M (Expositor). **Distribución y metabolismo del biocida Paratión y aparición de biomarcadores de toxicidad en un microsistema acuático**. Comunicación oral. XXXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas y Biología Molecular (SAIB). Villa Giardino, Córdoba, del 11 al 14 de noviembre de 1997. Resumen C 168.

- **Ferrari Ana**, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M. **Análisis toxicocinético y de bioindicadores en la toxicidad subaguda de insecticidas organofosforados en peces.** Comunicación libre: Presentación en póster. XXXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas y Biología Molecular (SAIB); Mendoza, 25 al 27 de noviembre de 1998. Resumen, M 164.

- **Ferrari Ana**, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M. **Inhibición y Recuperación de Colinesterasa en Peces Expuestos a Organofosforados.** Comunicación libre: Presentación en póster. XX Congreso Argentino de Toxicología, XIX Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología, La Plata, Provincia de Buenos Aires, del 27 al 29 de septiembre de 1999. Asociación Toxicológica Argentina (ATA). Resumen, pág. 120.

- **Ferrari Ana**, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M. **Estudio comparativo de la recuperación de acetilcolinesterasa cerebral de peces inhibida por los insecticidas organofosforados metil azinfos y paratió.** Presentación en póster. XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas y Biología Molecular (SAIB). Ciudad de Mendoza, Mendoza, del 9 al 12 de noviembre de 1999. Resumen, M334.

- **Ferrari Ana**, Venturino Andrés, Pechén de D'Angelo Ana M. **Pesticide effects on protein phosphorylation patterns in fish.** Presentación en póster. XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas y Biología Molecular (SAIB). Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 5 al 9 de noviembre del 2002. Resumen. Biocell, vol. 26 suplemento III, 2002. Resumen P249, pág 110.

#### **4. JORNADAS DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA**

- Pechén de D'Angelo A. M, Venturino A, Montagna C. M., Rosembaum E., Magnarelli G., Caballero A., Gauna L., Anguiano L., Loewy M., Rovedatti G., Carbajal G., Kirs V., Ferrari A. y Alvarez R. **Plaguicidas Toxicología Ambiental.** Presentación en poster. Jornadas de Divulgación Científica y Técnica, Universidad Nacional del Comahue, Neuquen, 25 al 26 de abril del 2000. Resumen pág 125.

- Pechén de D'Angelo A. M, Venturino, Rosembaum E., Loewy M., Rovedatti G., Carbajal G., Ferrari A. **Mecanismos Comunes De Toxicidad Y Dinámica Ambiental En El Impacto De Plaguicidas Sobre Vida Acuática.** Presentación en poster. Jornadas de Divulgación Científica y Técnica, Universidad Nacional del Comahue.

Bariloche 23 y 24 de mayo del 2001. Resumen

#### **5. PREMIOS OBTENIDOS**

**Premio ATA 99** al mejor trabajo científico en el área de Ecotoxicología, Toxicología Ambiental y Evaluación de riesgo: **Inhibición y Recuperación de Colinesterasa en Peces Expuestos a Organofosforados.** Ferrari A., Venturino A., Pechén de D'Angelo A. M. XX Congreso Argentino de Toxicología, XIX Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología. La Plata 29 de septiembre de 1999.