

Tesis Doctoral

Efectos del glifosato en peces dulceacuícolas. Biomarcadores de estrés ambiental

Menéndez Helman, Renata J.

2013-03-27

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Menéndez Helman, Renata J.. (2013-03-27). Efectos del glifosato en peces dulceacuícolas. Biomarcadores de estrés ambiental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Menéndez Helman, Renata J.. "Efectos del glifosato en peces dulceacuícolas. Biomarcadores de estrés ambiental". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-03-27.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Efectos del glifosato en peces dulceacuícolas. Biomarcadores de estrés ambiental.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas.

Renata J. Menéndez Helman

Directores de Tesis: Dr. Alfredo Salibián, Dra. María dos Santos Afonso
Consejero de Estudios: Dr. Enrique M. Rodríguez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Química de los Contaminantes en Aguas
Naturales y Suelos. INQUIMAE – CONICET. Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales - Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2013

Resumen

La expansión de la frontera agrícola ha involucrado un notable incremento en el uso de biocidas en la Argentina. En este trabajo nos propusimos evaluar los impactos del glifosato (N-fosfometilglicina, PMG) sobre dos especies no blanco: *Cnesterodon decemmaculatus* y *Odontesthes bonariensis*. Los resultados obtenidos indicarían que el PMG (en su forma ácida y grado analítico) no presenta un nivel significativo de toxicidad letal aguda ($CL_{50-96h} > 100 \text{ mg.L}^{-1}$) para *C. decemmaculatus*. Sin embargo, la toxicidad de un formulado de PMG resultó notablemente mayor ($CL_{50-96h} = 29 \text{ mg.L}^{-1}$). Al evaluar efectos subletales en esta especie, la exposición aguda a PMG provocó un aumento en la actividad de catalasa (defensas antioxidantes) e inhibición de la actividad de acetilcolinesterasa (biomarcador de neurotoxicidad). Por otra parte, la exposición crónica al formulado produjo una disminución significativa en la Carga Energética de Adenilatos (CEA) en hígado y músculo de *O. bonariensis*, manifestando efectos a nivel del metabolismo energético. Las branquias de estos animales, examinadas por MEB, mostraron alteraciones en su ultraestructura. Por último, se estudió el efecto de la exposición al formulado sobre la motilidad espermática y el desarrollo embrionario y larval de *O. bonariensis*, estableciéndose un aumento de la mortalidad de las larvas. Los resultados de este trabajo constituyen una contribución a los estudios sobre los efectos del glifosato en peces de agua dulce, así como a la evaluación y desarrollo de biomarcadores de estrés ambiental.

Palabras Claves: Glifosato, PMG, N-fosfometilglicina, Toxicidad, *Cnesterodon decemmaculatus*, *Odontesthes bonariensis*, Peces de agua dulce, Biomarcadores.

Glyphosate effects on freshwater fishes. Biomarkers of environmental stress.

Abstract

The agricultural frontier of Argentina is spreading out and this phenomenon has involved a significant increase in the use of biocides. In this work we propose to evaluate the impact of glyphosate herbicide on two non-target species: *Cnesterodon decemmaculatus* and *Odontesthes bonariensis*. Experimental results would indicate that glyphosate (PMG, analytical grade, acid form) does not present a significant level of acute lethal toxicity ($LC_{50-96h} > 100 \text{ mg.L}^{-1}$) on *C. decemmaculatus*. However, the toxicity of one of the glyphosate-based herbicide was found significantly higher ($LC_{50-96h} = 29 \text{ mg.L}^{-1}$). The sublethal effects on this species were evaluated. Acute exposure to PMG caused an increase in the activity of catalase (antioxidant defenses) and an inhibition of the activity of acetylcholinesterase (biomarker of neurotoxicity). On the other hand, chronic exposure to glyphosate-based herbicide resulted in a significant decrease in the Adenylate Energy Charge (AEC) in liver and muscle of *O. bonariensis*, showing effects on the energy metabolism. The gills of these animals, examined by SEM, showed changes in their ultrastructure. Finally, the effect of exposure to glyphosate-based herbicide on sperm motility, embryonic and larval development of *O. bonariensis* were studied and an increased mortality of the larvae was determined. The results presented on this PhD Thesis is a contribution to the knowledge of the effects of glyphosate on freshwater fishes, as well as the evaluation and development of biomarkers of environmental stress.

Keywords: Glyphosate, PMG, N-phosphonomethylglycine, Toxicity, *Cnesterodon decemmaculatus*, *Odontesthes bonariensis*, Freshwater fishes, Biomarkers.

A mi familia.

*A mis padres por los ideales,
y a mi abuelita, por ese ejemplo de persona pertinaz...*

*...a Pablo, por este recorrido juntos,
y por quererme así, como soy.*

Agradecimientos

Al CONICET por las becas otorgadas que me posibilitaron dedicarme al desarrollo de este trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires y la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

A mis directores, la Dra. María dos Santos Afonso y el Dr. Alfredo Salibián, por ese complemento necesario, desde diferentes disciplinas, del cual es fruto esta Tesis. Por todos los consejos, las críticas y enseñanzas que han aportado a mi formación.

Al Dr. Leandro Miranda por la colaboración que establecimos y por el ambiente de trabajo tan ameno que me supieron brindar en el Laboratorio de Ictiofisiología y Acuicultura del INTECH-Chascomús.

A todo el personal del INQUIMAE.

Muy especialmente a mis compañeros de todos estos años en el Laboratorio T5:

A Alcira por tantas risas, y llantos compartidos, y por poner siempre el hombro,

A José Luis por ser nuestro técnico 24h, el hombre del labo, y un gran amigo,

A Gisele por las mañanas, tardes y noches de trabajo, por ser mi primer pollita,

A Mariamar porque diferentes supimos entendernos, enseñar y aprender,

A Romina, Fanny, Vera, Martín porque todos ellos fueron parte de este recorrido.

A los integrantes del PRODEA, con quienes compartí tantas tardes de muestreos y quienes siempre estuvieron dispuestos a colaborar en el cuidado de mis madrecitas. A Natalia, Martín, Bettina, Laura, Carolina, Anabella, Adonis, Patricia y Lucrecia.

A todo el personal del INTECH y muy especialmente a Angie, Tomás, Pamela y Javier con quienes compartí largos días de trabajo.

A Vinko, y en su nombre a todos los CPAs que me han ayudado tantas veces en estos años.

A todos aquellos que me han facilitado solidariamente el uso de sus equipos. Al Laboratorio del Dr. Cánepa y el de la Dra. María del Carmen Ríos de Molina a quienes acudí tantas veces en búsqueda de esa centrífuga para eppendorf refrigerada. Al grupo de la Dra Winivesky por el uso compartido del Bioterio y el acceso a una Cámara climática en el ámbito de la FCEyN.

A Marisa por tenernos la vela en tantas tardes de escritura y análisis de datos con Alfredo, por estar ahí siempre con el mate a mano y mucho cariño.

A Fabiana Lo Nostro... por los buenos consejos.

A Pato Miranda por mis primeros pasos de incursión en la ciencia.

A Pablo, mi compañero, con quien recorrí estos últimos años, los abatares de esta Tesis, y de la vida; y con quien quiero seguir caminando...

A mi familia. Porque son con quienes siempre cuento, en las buenas y cuando vienen las malas. Mi mamá porque siempre somos y seremos sus pollitos mimados. Mi hermanito pequeño, que ya está grande, y busca su camino en la vida. Mis hermanos de lejos, porque... algún día vuelvan. A Ana, Hector, Mariel y Rolando, Nadia y Patricio, y la pequeña y soñadora Cloé, por todo el afecto.

A los compañeros de lucha de todos estos años. Porque nada me quita quien soy.

A Pablo, Sol, Bele, Lu, el Cuervo, Diana, Carlos, Quimey y todos aquellos que honestamente pelean por una sociedad más justa.

A mis compañeros de la vida Carlita Kagel mi gran amiga que se fue a incursionar otros mundos, a Mari ojos por un poquito de catarsis y por ser siempre un cable a tierra, a Sandrita light red, Malala y Toli.

A todos los que ponen su conocimiento para la investigación en ciencias ambientales, de cara a la defensa de nuestros recursos naturales, de una sociedad con un desarrollo planificado, independiente y en favor del pueblo.

A los compañeros del Taller de Aguas por todos estos años llevando las ideas a la práctica.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
<i>Resumen</i>	<i>1</i>
<i>Abstract</i>	<i>2</i>
Dedicatoria y Agradecimientos	<i>3</i>
<i>Glosario</i>	<i>11</i>
INTRODUCCIÓN GENERAL	12
Plaguicidas. Definición y clasificación.	
Plaguicidas organofosforados.	
Herbicidas. Glifosato.	
Clasificación de los Herbicidas.	
Glifosato. Características generales.	
Movilidad y Destino en el Ambiente.	
Aspectos toxicológicos del glifosato.	
Estudios en Ecotoxicología y Biomarcadores.	
Desarrollo de la Tesis.	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33

Capítulo 1 – Toxicidad letal aguda del glifosato en su forma ácida y de un formulado para *Cnesterodon decemmaculatus*.

- a) **Introducción.** Ensayos de Toxicidad. *Cnesterodon decemmaculatus* como organismo *test*. **35**
- b) **Materiales y Métodos.** **37**
 - i) Determinación de la toxicidad letal del glifosato (forma ácida).
 - ii) Determinación de la toxicidad letal de un formulado de glifosato.
 - iii) Determinación de la concentración de glifosato en los medios de ensayo.
 - iv) Reactivos.
 - v) Expresión de resultados y análisis estadísticos.
- c) **Resultados y Discusión.** **42**

Capítulo 2 – Biomarcadores de estrés ambiental I: Bioensayos de exposición de *Cnesterodon decemmaculatus* a glifosato en su forma ácida.

- a) **Introducción.** Biomarcadores de estrés oxidativo, neurotoxicidad y metabolismo energético **48**
- b) **Materiales y Métodos.** **55**
 - i) Esquema experimental del bioensayo.
 - ii) Determinación del Factor de Condición.
 - iii) Procesamiento de tejidos
 - (1) *Digestión de tejidos para la determinación de glucógeno.*

(2) *Preparación de homogenatos para la determinación del contenido de proteínas y la actividad de acetilcolinesterasa y catalasa*

- iv) Determinación de actividad de catalasa.
- v) Determinación de actividad de acetilcolinesterasa.
- vi) Determinación del contenido de glucógeno en el tercio medio.
- vii) Determinación de la concentración de proteínas tisulares.
- viii) Determinación de la concentración de glifosato en los medios de ensayo.
- ix) Reactivos.
- x) Expresión de resultados y análisis estadístico

c) **Resultados y Discusión.** **63**

Capítulo 3 – Biomarcadores de estrés ambiental II: Efectos de la exposición crónica a un formulado de glifosato sobre parámetros del metabolismo celular de *Odontesthes bonariensis*.

- a) **Introducción.** Metabolismo celular. Carga Energética de Adenilatos como biomarcador de estrés ambiental. *Odontesthes bonariensis* como organismo *test*. **77**
- b) **Materiales y Métodos.** **85**
 - i) Determinación de AMP, ADP, ATP, creatina y fosfocreatina.
 - ii) Esquema experimental para la exposición crónica de *Odontesthes bonariensis* a un formulado de glifosato.
 - iii) Procesamiento de tejidos para la determinación de AMP, ADP, ATP, creatina y fosfocreatina tisular.

iv) Cálculo del Índice Hepatosomático (IHS).	
v) Microscopía Electrónica de Barrido de branquias.	
vi) Determinación de la concentración de glifosato en los medios de ensayo.	
vii) Expresión de resultados y análisis estadístico	
c) Resultados y Discusión	94

Capítulo 4 – Efectos de un formulado de glifosato sobre parámetros reproductivos y desarrollo embrionario-larval de *Odontesthes bonariensis*.

a) Introducción. Impactos de contaminantes sobre aspectos reproductivos y en el desarrollo de los peces. Motilidad espermática y desarrollo embrionario-larval de <i>Odontesthes bonariensis</i> .	110
b) Materiales y Métodos.	115
i) Evaluación de la motilidad espermática. Efectos de la exposición a un formulado de glifosato.	
ii) Desarrollo embrionario-larval. Evaluación del efecto de la exposición a un formulado de glifosato.	
iii) Determinación de la concentración de glifosato en los medios de ensayo.	
iv) Expresión de resultados y análisis estadístico	
c) Resultados y Discusión.	124

Capítulo 5 – **Discusión General y Conclusiones** **138**

Referencias bibliográficas. **154**

Anexo I - Equipamiento utilizado.	169
Anexo II - Medios.	170

Glosario

A: Anterior.

AChE: acetilcolinesterasa.

ADP: adenosina difosfato.

AE: actividad específica.

AMD: agua moderadamente dura.

AMP: adenosina monofosfato.

ATP: adenosina trifosfato.

CASA: *Computer-Assisted Sperm Analysis* (Análisis de espermatozoides asistido por computadora).

CAT: catalasa.

CEA: Carga Energética de Adenilatos.

CL₅₀: Concentración letal 50.

Cr: creatina.

dpe: días post eclosión.

dpf: días post fecundación.

Gno: glucógeno.

K: Factor de Condición de Fulton.

L_T: largo total.

M: Medio.

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido.

N: Número de réplicas experimentales.

n: Número de organismos por tratamiento.

P: Posterior.

P_C: peso corporal

PCr: fosfocreatina.

PMG: N-(fosfonometil)glicina (glifosato).

Introducción General

*La información referida al impacto de los agroquímicos sobre la calidad de los cuerpos de agua es de valiosa importancia, especialmente en Argentina si se considera el creciente avance de la frontera agrícola con el consiguiente aumento -entre otras consecuencias- del uso de insecticidas y herbicidas como el glifosato. La descripción de biomarcadores de efecto en especies no blanco como los vertebrados acuáticos, se ha incrementado en los últimos tiempos pero aún es insuficiente, particularmente en el caso de especies nativas de nuestro país. En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo contribuirán a un mayor conocimiento sobre los impactos ambientales del actual modelo productivo agropecuario, particularmente en relación al efecto de este herbicida en **Cnesterodon decemmaculatus** (Teleostei, Cyprinodontiformes) y **Odontesthes bonariensis** (Teleostei, Atheriniformes); aportando también al desarrollo de nuevas herramientas para el monitoreo ecotoxicológico de los cuerpos de agua de las regiones agrícolas.*

En América Latina y el Caribe la degradación ambiental se ha incrementado en las últimas décadas. Las principales presiones sobre el ambiente y los recursos naturales son el crecimiento de la población, la desigualdad creciente de los ingresos de los trabajadores, la planificación limitada y la alta dependencia de la explotación de recursos naturales de muchas economías (PNUMA, 2002).

En nuestra región se profundiza un fuerte proceso de expansión de la frontera agrícola. El mismo ha estado dirigido por una serie de modificaciones temporarias en los precios internacionales de los productos agropecuarios y, a la vez, se ha basado en la utilización masiva de tecnologías como la siembra directa y la nutrición química y biológica, la aplicación intensiva de biocidas (herbicidas, insecticidas y fungicidas) y la utilización de semillas genéticamente modificadas (GM), todas ellas tendientes a disminuir costos y aumentar los rindes de la producción. En este proceso, determinado por el aumento de la producción agrícola y la superficie sembrada, el cultivo de soja ha cumplido un rol fundamental ya que representa en la actualidad cerca del 50% de la producción total del sector.

Sin duda la introducción de la soja GM al mercado argentino a partir de 1996 resultó un punto de inflexión. A partir de la Resolución 167 de la Secretaría de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación (SAGPyA), del 25/3/96: “El Estado autoriza la producción y comercialización de la semilla y de los productos y subproductos derivados de ésta provenientes de la soja tolerante al herbicida glifosato de la línea 40/3/2 que contiene el gen CP4 EPSPS”. De esta forma, la siembra directa (sin labranza previa del suelo) y la soja GM conformaron el paquete tecnológico que sustentó el avance del cultivo. Actualmente, para fines comerciales se cultiva únicamente la variedad de soja con resistencia al herbicida glifosato, conocida como RR (resistente al formulado Roundup Ready, uno de los más utilizados en la región) (Informe CONICET, 2009).

Sin embargo, este proceso de industrialización agropecuaria se ha desarrollado sin una real planificación, al margen de la inercia controlada por el mercado, y sin contemplar los impactos socioeconómicos y ambientales, ratificando el rol de los países latinoamericanos en la división internacional del trabajo como exportadores de materias primas.

En este sentido existe una creciente preocupación en relación a las consecuencias del fenómeno de “sojización” y la consecuente expansión de la frontera agrícola (Pengue, 2008; Carrasco *et al.*, 2012).

Respecto a los *impactos sociales* existen varios temas de relevancia para analizar:

a) La caída del empleo rural producto de la utilización intensiva de herbicidas que ha sustituido la eliminación manual o mecánica de malezas, sumado al reemplazo de la labranza convencional por el sistema de siembra directa (“labranza cero”) que ha prescindido del arado. b) Los procesos migratorios que han provocado una mayor concentración de la población en áreas urbanas y periurbanas. c) La fuerte concentración de la propiedad de las tierras, con la desaparición de un gran número de pequeños productores (el Censo Nacional Agropecuario de 2002 registró 297.425 explotaciones agropecuarias en el país, que ocupaban un total de 174 millones de hectáreas, estos datos muestran una reducción de 29.4% en el número de explotaciones en comparación con el Censo anterior del año 1988). d) El desplazamiento de otras actividades productivas tradicionales a causa de una economía basada en el monocultivo de soja para la exportación (por ejemplo, cultivos de trigo, maíz, girasol, batata y caña de azúcar en Tucumán, algodón en Chaco, los tambos en Santa Fé y Córdoba, los frutales en la región pampeana, los arrozales, la actividad ganadera, etc.). e) La concentración de la tierra y de la renta con los consiguientes conflictos por su tenencia con comunidades de pequeños campesinos y pueblos originarios.

En cuanto a los *impactos ambientales*, se ha generado una creciente presión sobre bosques nativos debido a los procesos de desmonte generalizados, con la consiguiente pérdida y fragmentación de ambientes naturales y su biodiversidad, alteraciones climáticas (temperaturas más extremas, sequías, disminución de las fuentes hídricas), desertificación y empobrecimiento del suelo debido a su uso intensivo y la falta de rotación de cultivos. Actualmente, el proceso de expansión sojera en nuestro país se expresa en varios frentes que afectan a la región chaqueña, la selva misionera, las áreas pedemontanas de las Yungas, al pastizal pampeano semiárido, e incluso a algunos sectores de la transición entre la estepa patagónica y los bosques andinos (Adámoli *et al.*, 2011).

Asociado a lo anterior, otro aspecto a destacar es el notable incremento en el uso de agroquímicos. Entre los años 2009 y 2010, en Argentina se sembraron 18 millones de hectáreas con soja, triplicando el área del período 1996-1997 (SAGPyA, 2012). Junto con dicho incremento, aumentó el uso de biocidas en general y de formulados a base de glifosato, pasando de 12 millones de litros en 1996 a 198 millones en 2007. Actualmente esta tendencia continúa en aumento (ver Figura I.1) (CASAFA, 2012).

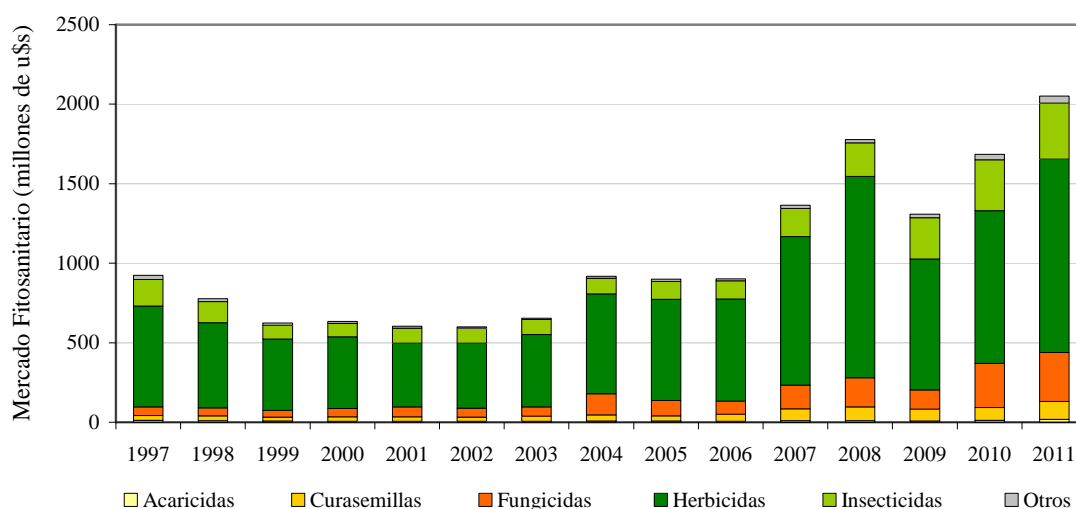


Figura I.1: Evolución del mercado fitosanitario argentino. Fuente: CASAFA, 2012.

Generalmente los plaguicidas se pulverizan como partículas muy finas suspendidas en medios acuosos, en algunos casos en presencia de surfactantes, o disueltos en medios orgánicos formando emulsiones acuosas, que presentan una gran superficie de contacto. Debido a los diferentes métodos de aplicación y a las condiciones ambientales (lluvias, vientos, etc.) una cantidad significativa del plaguicida aplicado alcanza el suelo. Cuando entran en contacto con el suelo pueden unirse a los constituyentes del mismo; también pueden ser transportados alcanzando arroyos, ríos y lagos; lixiviar hacia aguas subterráneas; o sufrir degradación química y/o biológica, algunos de los productos de degradación son volátiles y en ese caso escapan a la atmósfera.

Se ha establecido que aproximadamente un 0.1% de la cantidad de plaguicidas aplicada llega efectivamente a las especies blanco, mientras que el resto circula por el ambiente contaminando en una compleja dinámica que abarca diversos compartimentos ambientales (suelo, agua y biota) (Carvalho *et al.*, 1998).

PLAGUICIDAS. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

La Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) ha definido a los plaguicidas como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causen perjuicio o que interfieran de cualquier forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, maderas y sus productos o alimentos para animales, o que puedan administrarse a animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas sobre sus cuerpos” (FAO, 2002)

Los plaguicidas suelen clasificarse en base a diferentes criterios, entre ellos podemos destacar: funcional, toxicológico, modo de acción, persistencia, tipo de aplicación y familia química a la que pertenecen.

La clasificación funcional se basa en el organismo sobre el que actúan. Las clases más importantes en que se catalogan son: insecticidas, herbicidas, fungicidas, nematocidas, rodenticidas y reguladores fisiológicos. Conforme a su toxicidad aguda, los plaguicidas pueden ser extremadamente tóxicos, altamente tóxicos, moderadamente tóxicos y ligeramente tóxicos. Según su vida media, pueden ser permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes. En la actualidad, debido a la gran cantidad de plaguicidas existentes y de las familias químicas implicadas no resulta fácil una adecuada clasificación química. Siguiendo las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO por sus siglas en inglés), los plaguicidas se pueden clasificar en organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, derivados bupiridílicos, clorfenoxiacidos, cloronitrofenoles y organomercuriales, compuestos orgánicos del estaño, tiocarbamatos, ditiocarbamatos y otros como los insecticidas vegetales, bromuro de metilo, fosfatina, ácido cianhídrico (fumigantes), sulfato de talio, fluoroacetato sódico, warfarina (rodenticida), ácido bórico, arsenito sódico, criolita (insecticidas inorgánicos), disruptores del crecimiento de insectos, etc. (Reigart y Roberts, 1999).

PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Entre los compuestos nombrados anteriormente, los organofosforados (OF) constituyen el grupo de plaguicidas más utilizados en la agricultura mundial. Su estructura general es mostrada en la Figura I.2.

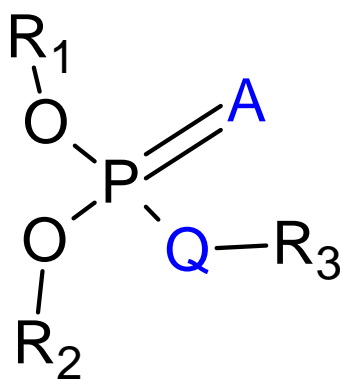


Figura I.2: Estructura general de plaguicidas organofosforados.

donde R1 y R2 son grupos metilo o etilo, A y Q átomos de oxígeno o azufre y R3 generalmente un grupo fenilo o piridinilo.

En total hay, al menos, 13 tipos de OF (Gupta, 2007), los cuales se detallan en la Tabla I.1.

Los OF son utilizados en la agricultura como plaguicidas y han desplazado en gran medida a los organoclorados. Esto se ha debido a la alta toxicidad, persistencia y capacidad de bioacumulación en la cadena trófica de estos últimos (Ecobichon, 2005). En general, los compuestos OF no se bioacumulan y se degradan fácilmente en el ambiente (Chambers, 1992; Racke, 1992); sin embargo, actualmente se acepta que son más peligrosos para el ambiente de lo que se predecía en un principio. Por esta razón, y considerando también la gran diversidad química de este grupo, su uso masivo, junto con la evidencia de que existen OF (como el fentión o el metilparatión) que pueden bioacumularse (Tsuda *et al.*, 1996; De la Vega *et al.*, 1997), se hace necesario su estudio exhaustivo.

Tabla I.1: Clasificación general de compuestos organofosforados.

Grupos de Organofosforados	Estructura	Ejemplos
Fosfatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-O-P-O-R} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Diclorvos Monocrotofos
Fosfonatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-O-P-R} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Triclorfón Glifosato
Fosfinatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-P-R} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Glufosinato
Fosforotioatos	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{R-O-P-O-R} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Paratión Fentión Clorpirifos
Fosfonotioatos	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{R-O-P-R} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Leptofos
Fosforotioatos (S sustituidos)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-S-P-O-R} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Demetón-S-metil ecotiofato
Fosfonotioatos (S sustituidos)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-S-P-R} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Agente nervioso VX
Fosforoditioatos	$\begin{array}{cc} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-S-P-S-R} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{R} \end{array} & \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{R-S-P-O-R} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{R} \end{array} \end{array}$	Azinfos metil dimetoato Malatión
Fosforotritioatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-S-P-S-R} \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Tribufos
Fosforamidatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-O-P-N}^{\text{R}} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \quad \text{R} \quad \text{R} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Fenamifos
Fosforamidotioatos	$\begin{array}{cc} \begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{R-O-P-N}^{\text{R}} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \quad \text{R} \quad \text{R} \\ \\ \text{R} \end{array} & \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-S-P-N}^{\text{R}} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \quad \text{R} \quad \text{R} \\ \\ \text{R} \end{array} \end{array}$	Metamidofos Isofenfos
Fosforofluoridatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-O-P-F} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{R} \end{array}$	DFP
Fosfonofluoridatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-O-P-F} \\ \\ \text{R} \end{array}$	Sarín Somán

HERBICIDAS. GLIFOSATO.

Clasificación de los Herbicidas.

Dentro de los plaguicidas, los herbicidas selectivos en particular permiten eliminar malezas al mismo tiempo que se seleccionan las especies de interés agrícola. En algunos casos estas especies han sido modificadas genéticamente para resistir a dichos biocidas.

Los herbicidas son utilizados básicamente de dos maneras; pueden ser aplicados al suelo antes de que la maleza germine ó directamente al follaje de la misma (preemergentes o postemergentes, respectivamente).

Según el modo de ingreso a la planta los herbicidas postemergentes se clasifican en: los de contacto y los sistémicos. Los herbicidas de contacto se caracterizan por matar aquella parte de la planta que entra en contacto con el producto químico. En estos casos, la fitotoxicidad puede ser muy dramática ya que las partes afectadas se dañan rápidamente luego de la aplicación del herbicida. Sin embargo, esta característica no resulta la más efectiva para el tratamiento de malezas perennes que tengan partes subterráneas capaces de regenerarse aún después del daño de las partes aéreas. Los herbicidas sistémicos, en contraste, son de acción más lenta pero traslocan por el sistema vascular de la planta (xilema, floema) hacia los meristemas tanto aéreos como subterráneos.

Cuando un herbicida resulta ser fitotóxico para las malezas y no para el cultivo, es denominado herbicida selectivo, mientras que cuando su acción es ejercida sobre todo tipo de plantas se lo denomina total ó de amplio espectro.

Por último, el Herbicide Resistance Action Committee (HRAC), clasificó a los herbicidas con letras, de acuerdo con su modo de acción (HRAC, 2013) (Figura I.3).

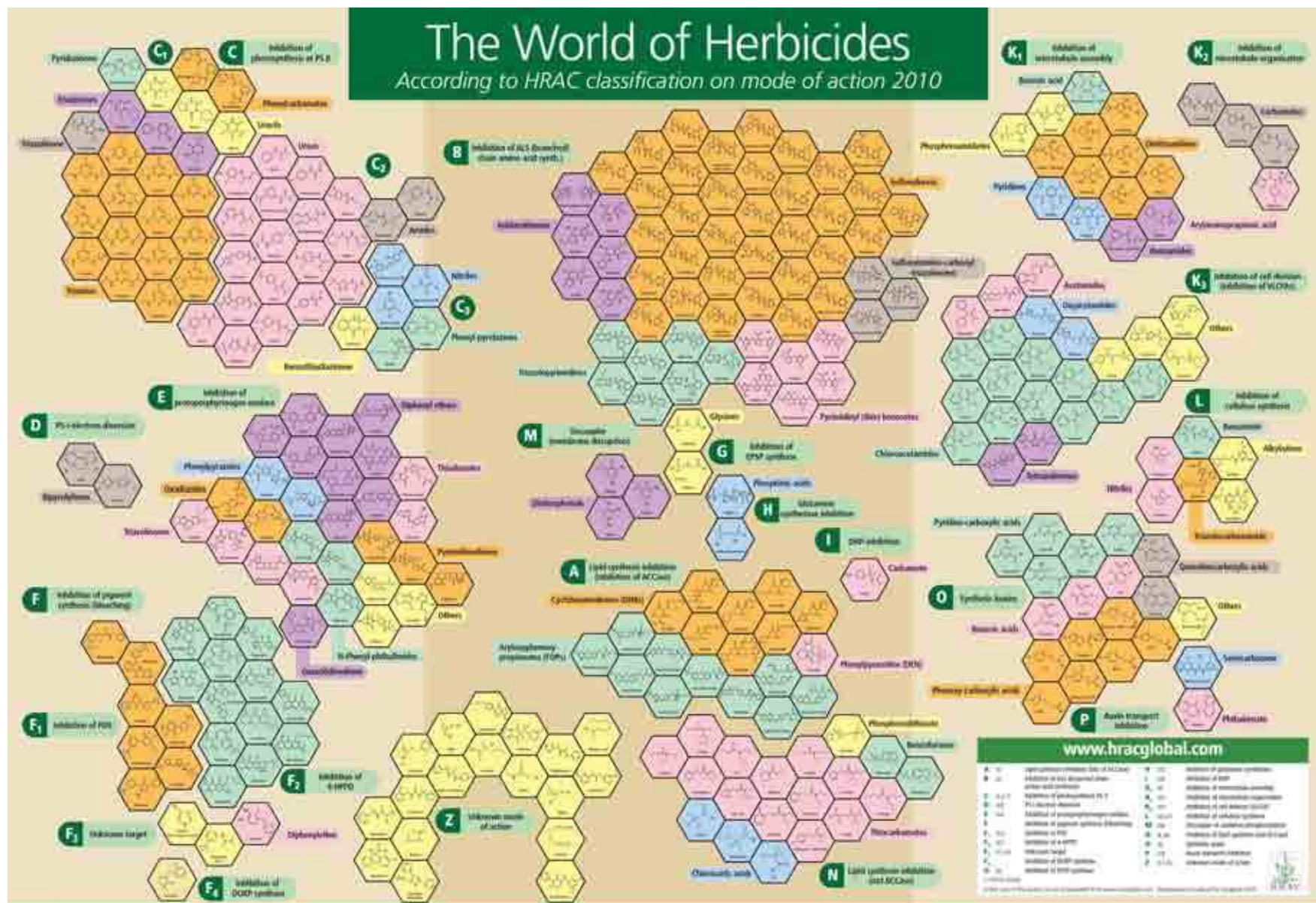


Figura I.3: Clasificación de los herbicidas según su modo de acción definida por el Herbicide Resistance Action Comité (HRAC).

Glifosato. Características generales.

El *glifosato* (N-fosfometilglicina; PMG, $C_3H_8NO_5P$, CAS 1071-83-6) (Figura I.4) es el herbicida más empleado en nuestro país.

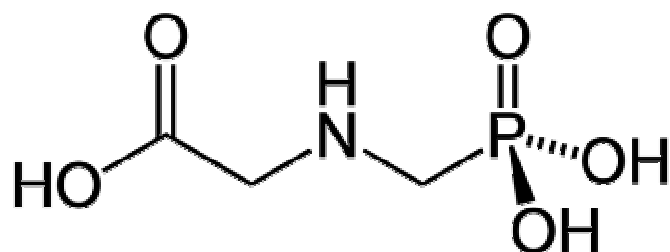


Figura I.4: Estructura molecular de N-(fosfometil)glicina, PMG

Es de tipo postemergente, sistémico, de amplio espectro (en pastos anuales y perennes, hierbas de hoja ancha y especies leñosas). También se lo clasifica en el grupo G según el HRAC (ver Figura I.5), ya que su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano) por inhibición enzimática de vías metabólicas propias de plantas superiores y microorganismos (no presentes en animales).

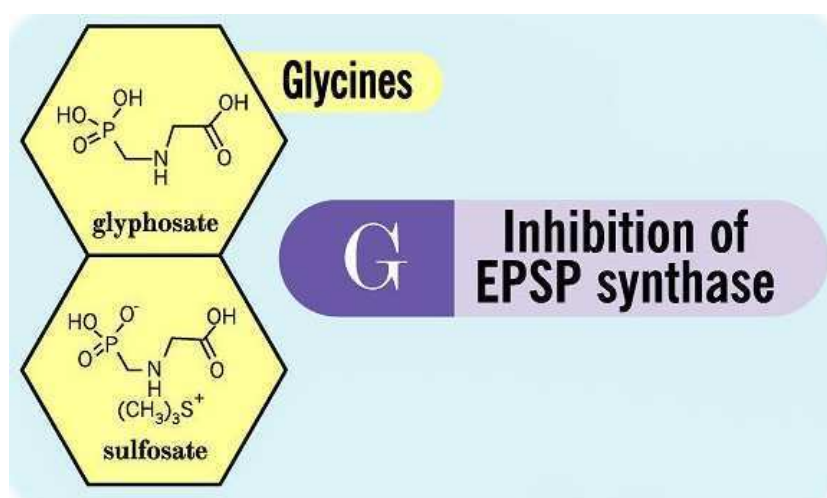


Figura I.5: Grupo G (*Glycines*), herbicidas inhibidores de la enzima EPSPS. Clasificación de herbicidas, según su modo de acción, del HRAC.

El crecimiento de la planta es inhibido rápidamente seguido de clorosis foliar general y necrosis, por medio de la inhibición de la 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS). Este proceso ocurre dentro de los 4 a 7 días posteriores a la aplicación para las especies más susceptibles y de los 10 a 20 para las menos susceptibles.

Se ha descubierto que ciertas isoenzimas de la EPSPS no se unen a glifosato y esto ha posibilitado el desarrollo, mediante ingeniería genética, de plantas transgénicas, tolerantes a glifosato, que pueden ser tratadas continuamente con el herbicida para el control de malezas. Existen semillas resistentes al glifosato de algodón (*Gossypium hirsutum*), canola (*Brassica napus*), maíz (*Zea mays*), soja (*Glycine max*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), entre otras (Franz, 1997).

Desde el punto de vista químico el glifosato es un herbicida organofosforado que pertenece al grupo de los fosfonatos. Se trata de un ácido orgánico débil que consiste en un grupo glicina y un grupo fosfonometilo. El nombre químico es N-(fosfonometil)glicina de acuerdo a nomenclatura IUPAC. En su forma ácida, el glifosato es un sólido blanco cristalino. Posee propiedades *zwiteriónicas* (ver Figura I.6) debido a que es un derivado de un aminoácido y presenta una alta solubilidad en agua (12 g/L a 25°C), lo cual es consecuencia de la formación de fuertes interacciones puente hidrógeno con los grupos OH, NH y el oxígeno del grupo fosfonato (Duke, 1988).

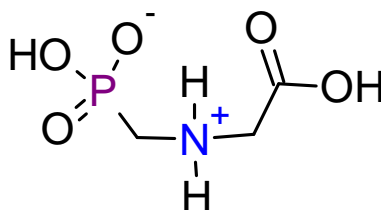


Figura I.6: Estructura del zwiterión de N-(fosfonometil)glicina, PMG.

Es un ácido tetraprótico relativamente fuerte que, en el rango de pH de los ambientes naturales, existe mayormente como monoanión o dianión. Sus valores de pKa son 0.78 (primer protón del grupo fosfonato), 2.29 (protón del grupo carboxilo), 5.96 (segundo protón del grupo fosfonato) y 10.98 (grupo amino) (Barja y dos Santos Afonso, 1998) (ver Figura I.7).

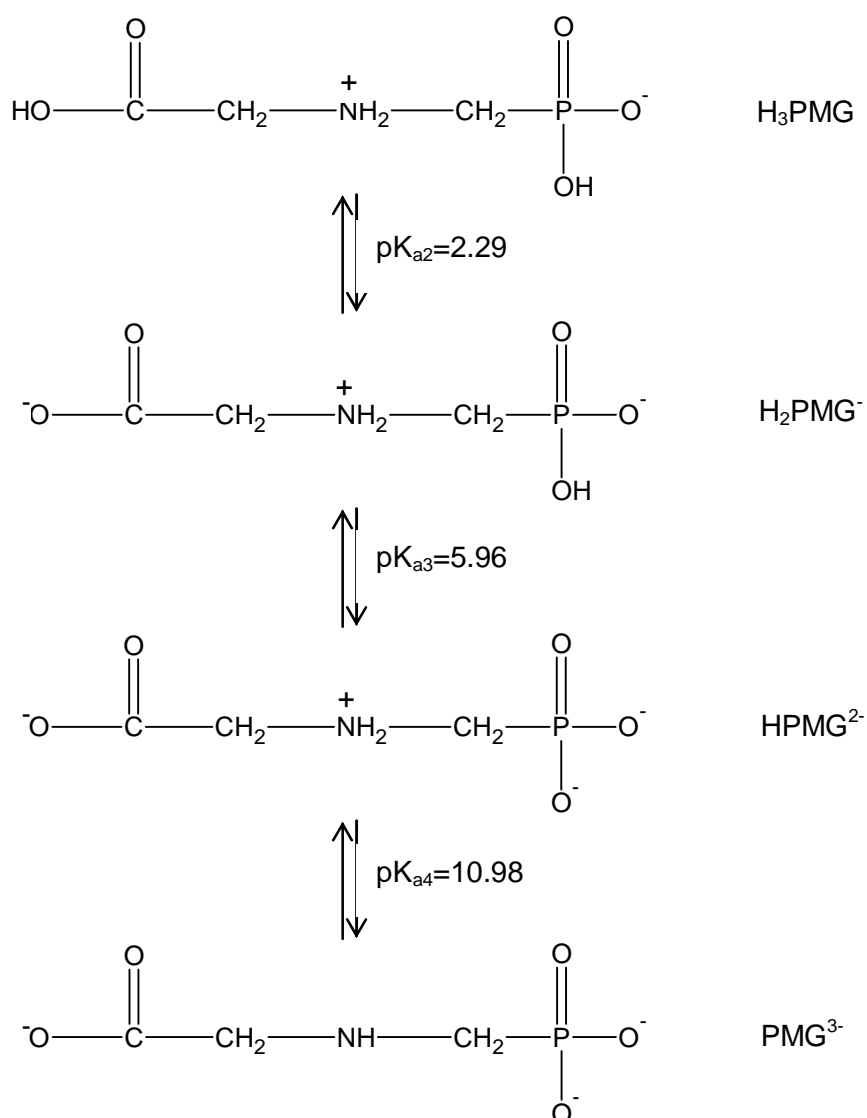


Figura I.7: Equilibrios ácido-base de N-(fosfonometil)glicina (PMG).

PMG es un ácido, pero se utiliza comúnmente en forma de sales solubles en agua, y en las formulaciones comerciales se encuentra junto con otras sustancias

químicas (coadyuvantes). La dosis de aplicación recomendada se encuentra en el intervalo de 0.84 a 4.20 Kg/ha (Duke, 1988).

Movilidad y Destino en el Ambiente.

Se ha afirmado que el glifosato presenta poca movilidad en los suelos, no tiene gran persistencia, ni capacidad de bioacumularse o biomagnificarse en la cadena trófica (WHO, 1994; Giesy *et al.*, 2000; Solomon y Thompson, 2003).

Diversos estudios han demostrado que una vez aplicado el glifosato es fuertemente adsorbido por los componentes del suelo, tales como arcillas, óxidos de hierro y ácidos húmicos, siendo éste el principal proceso que regula su movilidad (Barja y dos Santos Afonso, 2005; Gimsing y dos Santos Afonso, 2005; Pessagno y dos Santos Afonso, 2006; Damonte *et al.*, 2007; Khoury *et al.*, 2010). También puede formar complejos con los metales disueltos (Barja *et al.*, 2001). Además, sufre una importante degradación química, fotoquímica (Trinelli *et al.*, 2012) y, principalmente, de tipo biológica, siendo su metabolito mayoritario el ácido aminometilfosfónico (AMPA) (Rueppel *et al.*, 1977). De acuerdo con estos datos, no sería previsible su presencia en altas concentraciones en las aguas subterráneas y/o superficiales. Sin embargo, se ha descrito que la adsorción varía en gran medida según el tipo de suelo, pudiendo liberarse desde un 15% hasta un 80% del herbicida adsorbido (Piccolo *et al.*, 1994; Pessagno *et al.*, 2005; 2008).

Una vez aplicado sobre el cultivo, por vía terrestre o aérea, el herbicida puede permanecer adsorbido a las partículas del suelo hasta ser degradado microbiológicamente o bien, moverse en el agroecosistema por influencia del viento, de lluvias o riego, factores que incrementan su infiltración y escorrentía superficial (Peruzzo *et al.*, 2008). De este modo puede alcanzar ambientes contiguos pudiendo afectar adversamente la flora y la fauna. En este sentido,

diversos autores han reportado niveles de glifosato y AMPA en sedimentos, suelos y aguas, especialmente en las superficiales en zonas aledañas a áreas de cultivo de la región pampeana (Peruzzo *et al.*, 2008; Demetrio, 2012), como así también plantas y granos de soja (Arregui *et al.*, 2004; Lorenzatti *et al.*, 2004).

La vida media del glifosato en el suelo es de 45-60 días y en relación a su persistencia se ha descripto que es superior a 170 días y algunos autores reportan que puede extenderse a más de 300 días (WHO, 1994; USEPA, 1999; Peruzzo *et al.*, 2008; CONICET, 2009).

Aspectos toxicológicos del glifosato.

Luego de su descubrimiento en el año 1974, el glifosato se introdujo en las prácticas agropecuarias para la siembra directa de semillas transgénicas resistentes al herbicida. Desde el comienzo se aseguró que resultaba un inhibidor altamente selectivo de la enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintetasa (la cual no se expresa en los animales) que interviene en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas (Mousdale y Coggins, 1984; Rubin *et al.*, 1984; Malik *et al.*, 1989), por lo que se suponía que su empleo revestía completa inocuidad para animales y humanos. Al mismo tiempo no se registraban evidencias de que el herbicida (tanto el principio activo como sus formulaciones comerciales) se bioacumule significativamente en tejidos o cultivos.

La Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (USEPA) clasifica a los herbicidas en cuatro categorías: I, II, III y IV (en orden decreciente de toxicidad). Estudios realizados para dicha Agencia no habían mostrado evidencia de actividad mutagénica, carcinogénica, teratogénica ó alérgica en un amplio rango de ensayos y pruebas, razón por la cual lo ubicó como levemente tóxico en la Clase III (irritante leve). De la misma manera, el glifosato ha sido clasificado en la

categoría de menor riesgo toxicológico, Clase IV “poco probable que presente peligro en condiciones de uso normal”, según el criterio de la OMS y la FAO, adoptado para la Argentina por resolución de la SAGPyA.

Sin embargo, estudios toxicológicos más recientes, conducidos por instituciones científicas independientes, parecen indicar que el glifosato ha sido erróneamente calificado como “toxicológicamente benigno”, tanto a nivel sanitario como ambiental.

Resulta relevante destacar que los formulados contienen –como se expresó previamente- además del ingrediente activo, otras sustancias cuya función es facilitar su manejo o aumentar su eficacia. Para facilitar su penetración en los tejidos de la planta, la mayoría de sus fórmulas comerciales incluye un surfactante. En general, estas sustancias son identificadas como “inertes” y no son especificadas en las etiquetas del producto. Sin embargo, en muchos casos suelen presentar mayor toxicidad que el principio activo del herbicida. El grado de toxicidad está relacionado en primer término con el tipo y concentración de coadyuvantes que posea el formulado, así como con los componentes fisicoquímicos del ambiente en el cual el herbicida es vertido. Roundup®, por ejemplo, hasta hace poco tiempo contenía el surfactante polioxietileno-amina (POEA), ácidos orgánicos de glifosato relacionados, isopropilamina y agua. Tsui y Chu (2003) informaron la toxicidad comparada de este formulado, su principio activo y el coadyuvante POEA para una serie de organismos (algas, bacterias, protozoos y crustáceos) determinando el siguiente orden de toxicidad: POEA > Roundup > Glifosato (ácido) > Glifosato (sal).

Existe un gran número de trabajos en los que se describen impactos del glifosato sobre la biota, principalmente de sus formulados (véase Camino y Aparicio, 2011). En anfibios se ha determinado que los mismos pueden producir numerosos efectos adversos (Mann *et al.*, 2009), entre los cuales pueden mencionarse retardo en el

desarrollo e inhibición del crecimiento de las larvas, malformaciones, aumento de mortalidad, disminución de biodiversidad (Lajmanovich *et al.*, 2003; Howe *et al.*, 2004; Relyea, 2005a; Brodeur, 2011) e incluso alteraciones en la selección de sitios de oviposición (Takahashi, 2007).

También se han reportado efectos del Roundup sobre comunidades de perifiton y fitoplancton, base de la cadena trófica (Pérez *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2010), sobre *Eisenia fetida*. (Casabé *et al.*, 2007) así como efectos teratogénicos y de disrupción endócrina en mamíferos de laboratorio (Dallegrave *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2010; 2012).

En relación a la información disponible referida específicamente a los efectos del glifosato sobre peces, que será más detallada en el desarrollo de la Tesis, puede destacarse que los trabajos evalúan en su mayoría efectos de formulados de glifosato, siendo más escasos los relacionados con el principio activo. En cuanto a efectos subletales en peces, existen antecedentes de evasión de concentraciones nocivas (Hildebrand *et al.*, 1982), cambios histopatológicos (Domitrovic, 1997; Szarek *et al.*, 2000; Jiraungkoorskul *et al.*, 2003), cambios metabólicos asociados a estrés oxidativo (Gluszczak *et al.*, 2007; Langiano y Martínez, 2008), genotoxicidad (Cavas y Könen, 2007), malformaciones (Kelly *et al.*, 2010), cambios hematológicos (Alvarez *et al.*, 2012) e incluso en los perfiles hormonales (Soso *et al.*, 2007), entre otros.

Es de destacar que también ha podido determinarse bioacumulación del glifosato en distintos organismos (Wang *et al.*, 1994; Casabé *et al.*, 2007; Contardo-Jara *et al.*, 2009). Considerando este hecho, su prolongada persistencia y su amplia utilización en la región, es que se hace necesario caracterizar el destino final y la toxicidad no prevista de estos plaguicidas sobre especies no destinatarias para evaluar con certeza el riesgo asociado a su uso (véase Carrasco *et al.*, 2012).

ESTUDIOS EN ECOTOXICOLOGÍA Y BIOMARCADORES

El ambiente acuático es el receptor final de los contaminantes naturales y xenobióticos; estos últimos son sustancias de síntesis cuya estructura química no se encuentra naturalmente en la biosfera y no pueden ser biodegradados.

Los efectos de los contaminantes sobre la biota acuática, en particular sobre los peces, son muy variados: cancerígenos, hepatotóxicos, neurotóxicos, citotóxicos, promotores de estrés oxidativo, disruptores endócrinos, entre otros. Estos se ponen de manifiesto a través de un conjunto de síntomas que globalmente se conoce con la expresión de *estrés*, que en el caso de los organismos acuáticos los aleja de sus niveles homeostáticos de normalidad.

Inherente a los estudios ecotoxicológicos en los medios acuáticos es el concepto de *estrés ambiental*. En términos simples puede definirse como una alteración cuantificable del estado estable normal de los sistemas biológicos, inducida por algún cambio externo o ambiental (natural o antrópico) (Boudou y Ribeyre, 1997; Walker *et al.*, 2006; Newman y Clements, 2008; Timbrell, 2009). Como resultado pueden observarse consecuencias adversas en diferentes niveles de organización de los ecosistemas, desde el subcelular, individual y poblacional y, por extensión, hasta el estructural y funcional.

La magnitud y el tipo de los disturbios ocasionados en los organismos expuestos a los estresores dependen de diversos factores, desde los ambientales propiamente dichos (concentraciones, perfil fisicoquímico del medio, temperatura, duración de la exposición, etc.) hasta los bióticos (especie, edad, sexo, estado nutricional, dieta, genética, estado fisiológico, estado reproductivo, etc.). Estas alteraciones se ponen de manifiesto a través de cambios en los denominados biomarcadores, más allá de sus límites homeostáticos normales.

El término *biomarcador* (WHO, 1993) incluye, en un sentido amplio, parámetros cuya alteración refleja la interacción entre un sistema biológico particular y un estresor ambiental de diverso carácter (químico, físico, biológico o la sinergia de varios de ellos) (Timbrell *et al.*, 1996; Lagadic *et al.*, 1997; Conti, 2008; Schlenk *et al.*, 2008a). Al mismo tiempo, es posible cuantificar el grado de estrés a partir de la magnitud de los cambios en variables o marcadores seleccionados.

Cabe señalar que los biomarcadores son de distinto tipo (de exposición, de efecto, de sensibilidad) y de variado carácter (moleculares, bioquímicos, morfológicos, conductuales, genéticos, etc.). Los *biomarcadores de exposición* indican que el contaminante presente en el medio penetró en el organismo. Determinan su biodisponibilidad, sin proporcionar información sobre las posibles consecuencias de esa exposición y no están relacionados con el modo de acción del tóxico o de la mezcla que lo contiene. Los *biomarcadores de efecto* son los que permiten determinar que el tóxico ha penetrado al organismo, se ha distribuido entre los tejidos y ha ejercido un efecto adverso, proporcionando información sobre el grado de alteración producido en el organismo asociado al mecanismo de acción del contaminante. Por último los de *sensibilidad o susceptibilidad* permiten identificar a los individuos de una población más sensibles a los efectos provocados por la exposición, estando relacionados a factores determinados genéticamente (Van der Oost *et al.*, 2003).

Para ser considerado como tal, un biomarcador debe tener sensibilidad, especificidad y precocidad en su respuesta (Porta, 1996).

Los esfuerzos de los ecotoxicólogos acuáticos se han orientado últimamente en dirección de la identificación de biomarcadores específicos y tempranos de exposición o de efecto en especies centinelas cuantificando sus modificaciones luego de estar en contacto con tóxicos particulares o con mezclas de ellos en una escala variable de complejidad química (Lagadic *et al.*, 1997; Viarengo *et al.*,

2007). De esa forma las alteraciones de dichos parámetros biomarcadores devienen en señales de alerta confiables del grado de deterioro de un ambiente determinado, siendo las respuestas registradas la resultante integrada de cambios múltiples que ocurren en el/los organismos *test*.

DESARROLLO DE LA TESIS

Este trabajo está orientado hacia los efectos de la exposición de dos teleósteos nativos a concentraciones subletales de glifosato. Con esta finalidad se han diseñado y utilizado protocolos experimentales para la determinación de los siguientes biomarcadores:

a- Morfológicos

- i. Factor de Condición.
- ii. IHS.
- iii. MEB de branquias.

b- Bioquímicos/ Fisiológicos

- i. Defensa antioxidante: Catalasa.
- ii. Sistema nervioso central.: Acetilcolinesterasa.
- iii. Contenidos tisulares de proteínas.
- iv. Balance energético: Glucógeno, Fosfocreatina y Adenilatos.
- v. Marcadores Reproductivos: Motilidad espermática y Desarrollo embrionario -larval.

En el Capítulo 1 se analiza la toxicidad letal (96 h) del glifosato forma ácida y de uno de sus formulados (*Glifosato II*) en *Cnesterodon decemmaculatus*. Al mismo tiempo se evalúa la estabilidad durante los tiempos y en las condiciones de los ensayos.

A partir de estos resultados se desarrollan, en el Capítulo 2, bioensayos de exposición aguda de *Cnesterodon decemmaculatus* a concentraciones subletales del principio activo, determinándose el efecto sobre una serie de biomarcadores. Particularmente se evalúan los impactos sobre el factor de condición, actividad de catalasa y acetilcolinesterasa, contenido de proteínas tisulares y glucógeno. Para ello se estudiaron también dichos parámetros en condiciones basales.

En el Capítulo 3 se describe el ensayo de exposición crónica de *Odontesthes bonariensis* a un formulado (*Glifosato II*), evaluándose los efectos sobre parámetros del metabolismo energético (niveles de adenilatos, creatina y fosfocreatina, Carga Energética de Adenilatos (CEA)) en hígado, músculo y cerebro. También se informa acerca de los efectos de la exposición al herbicida sobre alteraciones en la estructura de las branquias al MEB.

Por último, en el Capítulo 4 se evalúan los efectos del formulado sobre la motilidad espermática utilizando un sistema poco difundido en el área de la ecotoxicología: el Computer Assisted Sperm Analysis (CASA); paralelamente, se analiza el impacto del formulado sobre el desarrollo embrionario y larval de *Odontesthes bonariensis*.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis: Cuando los peces en cautiverio son expuestos a condiciones de estrés por exposición a medios con glifosato en concentraciones subletales, presentan alteraciones en la magnitud de algunos biomarcadores de estrés oxidativo, del sistema nervioso, y de su metabolismo energético. Como resultante integrada de algunos de estos procesos, se ven afectados parámetros reproductivos. En consecuencia, la exposición a estos herbicidas puede interferir en su desarrollo embrionario-larval.

Los Objetivos Generales de este trabajo son:

- a) Evaluar la toxicidad letal aguda del glifosato en *Cnesterodon decemmaculatus*, y sus efectos sobre biomarcadores de estrés oxidativo, neurotoxicidad y metabolismo energético;
- b) Analizar comparativamente en forma integral: los efectos del herbicida sobre parámetros del metabolismo energético, morfológicos, reproductivos y en el desarrollo embrionario-larval de *Odontesthes bonariensis*.

Para tales propósitos, se plantean los siguientes Objetivos Específicos:

- a) En *Cnesterodon decemmaculatus*:
 - Determinar el rango de concentraciones letales y subletales de glifosato (forma ácida) y de un formulado comercial (*Glifosato II*).

- Evaluar el efecto del glifosato (forma ácida) a concentraciones subletales sobre los biomarcadores Glucógeno, Catalasa, Acetilcolinesterasa, proteínas tisulares y Factor de Condición.

b) En *Odontesthes bonariensis*:

- Analizar los posibles cambios en el metabolismo energético del hígado, músculo y cerebro como consecuencia de la exposición crónica a un formulado de glifosato y evaluar, paralelamente, los impactos sobre la estructura de sus branquias (examen por MEB).
- Estudiar los efectos del formulado comercial sobre la motilidad espermática y el desarrollo embrionario-larval.

Capítulo 1

Toxicidad letal aguda del glifosato en su forma ácida y de un formulado para *Cnesterodon decemmaculatus*

a) **Introducción.**

Ensayos de Toxicidad. *Cnesterodon decemmaculatus* como organismo *test*.

Los ensayos biológicos de toxicidad son herramientas de diagnóstico ambiental adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre un organismo *test*, bajo condiciones específicas y controladas. La toxicidad aguda de un compuesto se define como el conjunto de los efectos adversos que ocurren dentro de un período definido después de la administración de una dosis única de una sustancia química o de múltiples dosis durante 24 horas o menos. En los estudios de toxicidad aguda el resultado se expresa como concentración letal 50 (CL₅₀-96h), esto es la concentración de una sustancia que es capaz de producir la muerte del 50% de la población en 96 h (vease Castillo Morales, 2004).

Una de las especies utilizadas para el biomonitoreo de ambientes acuáticos de nuestra región es *Cnesterodon decemmaculatus* (Gómez *et al.*, 1998; García *et al.*, 1999; Villar *et al.*, 2000). Este teleosteo, endémico de América Neotropical, presenta una amplia distribución entre los 18° y 38° S de latitud que involucra a

cinco países de la cuenca del Río de la Plata (Ringuelet *et al.*, 1967). Es ubicuo en cuerpos de agua dulce de la Provincia de Buenos Aires.

Posición taxonómica de *Cnesterodon decemmaculatus*:

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Sctinopterygii

Infraclase: Teleostei

Orden: Cypridontiformes

Familia: Poeciliidae

Género: *Cnesterodon*

Especie: *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842)

Nombre vulgar: madrecita de agua.

En la Figura 1.1 ilustra esquemáticamente el aspecto de ejemplares macho y hembra.

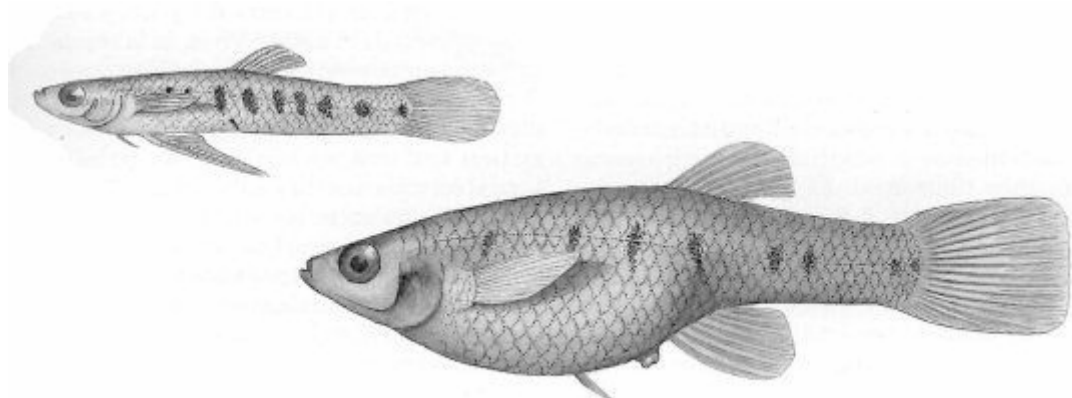


Figura 1.1: Ejemplar macho (izquierda) y hembra (derecha) de *Cnesterodon decemmaculatus*.
Fuente: Menni, R.C. 2004.

Esta especie presenta una exitosa estrategia reproductiva, caracterizada por fecundación interna y ovoviviparidad. Debido a su pequeño tamaño, rápido crecimiento, corta vida generacional y fácil reproducción en cautiverio (Mermoz y Salibián, 1992; Somma *et al.*, 2011) resulta apta para su utilización como especie *test* para ensayos de toxicidad (Molero y Pisano, 1986; de la Torre *et al.*, 2002; de la Torre *et al.*, 2007) y para biomonitoreo de ambientes de agua dulce (Ferrari *et al.*, 1998; Salibián, 2006).

b) Materiales y Métodos.

i) Determinación de la toxicidad letal del glifosato (forma ácida).

Con el objeto de determinar el rango de concentraciones letales y subletales de glifosato se llevaron a cabo ensayos semiestáticos, según Norma IRAM 29112 (2007).

Previamente, los peces fueron aclimatados a las condiciones del ensayo (medio, temperatura y fotoperíodo) durante 5 días. El medio utilizado fue Agua Moderadamente Dura (AMD, pH 7.4 – 7.8, ver Anexo II), según protocolo (USEPA, 1993). Se utilizaron recipientes de material plástico inerte (tereftalato de polietileno, PET) donde se colocaron 500 ml de AMD y cinco ejemplares de aproximadamente 2 cm de largo total (L_T) y 0.1 g de peso corporal (P_C) que fueron seleccionados del stock y distribuidos al azar en cada uno de los recipientes. Éstos se colocaron en cámara de incubación, bajo condiciones constantes de iluminación (12L:12O) y temperatura (23°C). Los recipientes se cubrieron para evitar cambios en el volumen del medio debido a la evaporación.

Luego de la aclimatación se prepararon cinco recipientes conteniendo 500 ml de AMD (control) y solución de glifosato (forma ácida) en AMD de siguientes

concentraciones: 1, 17.5, 35, 70 y 140 mg PMG.L⁻¹. El pH en cada uno de los recipientes fue ajustado a 7.6 – 7.8 con NaOH 4 M. Los peces se transfirieron de cada recipiente de aclimatación a los de ensayo y se mantuvieron en cámara en las mismas condiciones de iluminación y temperatura (Figura 1.2). Cada 24 horas se determinó el número de individuos muertos en cada recipiente, los cuales fueron retirados. En todos los casos se mantuvo constante la relación 1 individuo/100 ml de solución, ajustando el volumen luego de retirar los peces muertos. Se realizaron de 5 a 7 réplicas por concentración. El número de peces utilizados para estos ensayos de toxicidad fue 190.

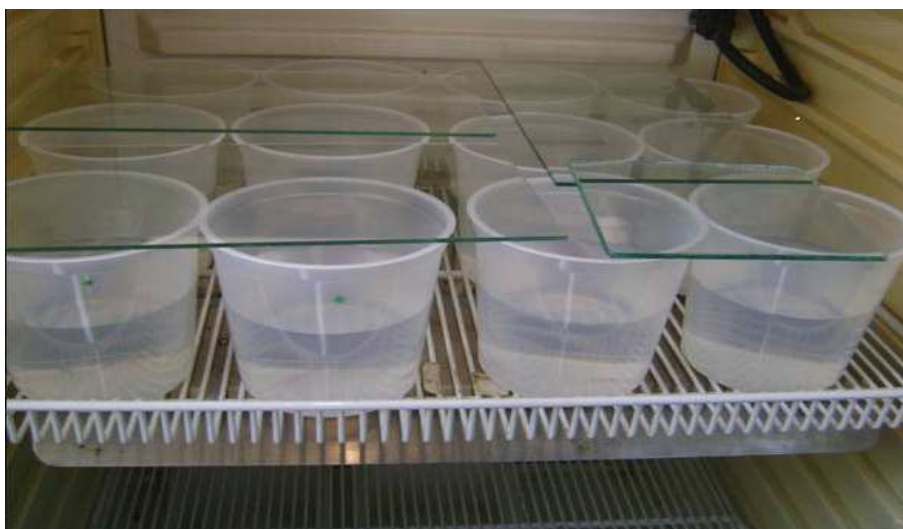


Figura 1.2: Disposición de los recipientes en cámara para el ensayo de toxicidad letal aguda en condiciones controladas de iluminación y temperatura.

Los medios se renovaron 48 h después de iniciado el ensayo, completándose luego las 96 horas de ensayo. Se tomaron alícuotas de los mismos a tiempo inicial y a las 48 h, previo a su recambio, que fueron congeladas para la posterior determinación de la concentración de glifosato por cromatografía iónica de aniones.

ii) Determinación de la toxicidad letal de un formulado de glifosato.

Se realizaron ensayos de toxicidad letal aguda con un formulado de glifosato (*Glifosato II*, Atanor). Se llevó a cabo un ensayo semiestático en iguales condiciones a las descritas anteriormente [sección 1.b.i.]. Las concentraciones ensayadas en este caso fueron 0 (control en AMD), 1, 17.5 y 35 equivalentes mg PMG.L⁻¹. Se realizaron de 2 a 4 réplicas por concentración ensayada. El número de animales utilizados fue 75.

iii) Determinación de la concentración de glifosato en los medios de ensayo.

La concentración analítica de PMG se determinó por cromatografía iónica de aniones (Zhu *et al.*, 1999). Se utilizó un equipo Dionex DRX-100, con columna AG4-AS4 (ver Figura 1.3), detector de conductividad, loop de inyección de 25 μ l.



Figura 1.3: Equipo de cromatografía iónica Dionex DRX-100, con columna AG4-AS4 utilizado para la determinación de PMG en los medios de ensayo.

La corrida cromatográfica se realizó con un eluyente mezcla de NaOH 4mM y Na₂CO₃ 9mM, y un flujo de 2 ml.min⁻¹. Se inyectaron estándares de PMG (Sigma) recién preparados, en un rango de 1-35 mg.L⁻¹. Luego se inyectaron las muestras, diluyéndolas en los casos necesarios. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Para la cuantificación se utilizó el software Clarity Lite. En la Figura 1.4 se muestra un típico *set* de cromatogramas correspondientes a diferentes concentraciones de estándares de PMG y a una muestra de medio de un ensayo de toxicidad.

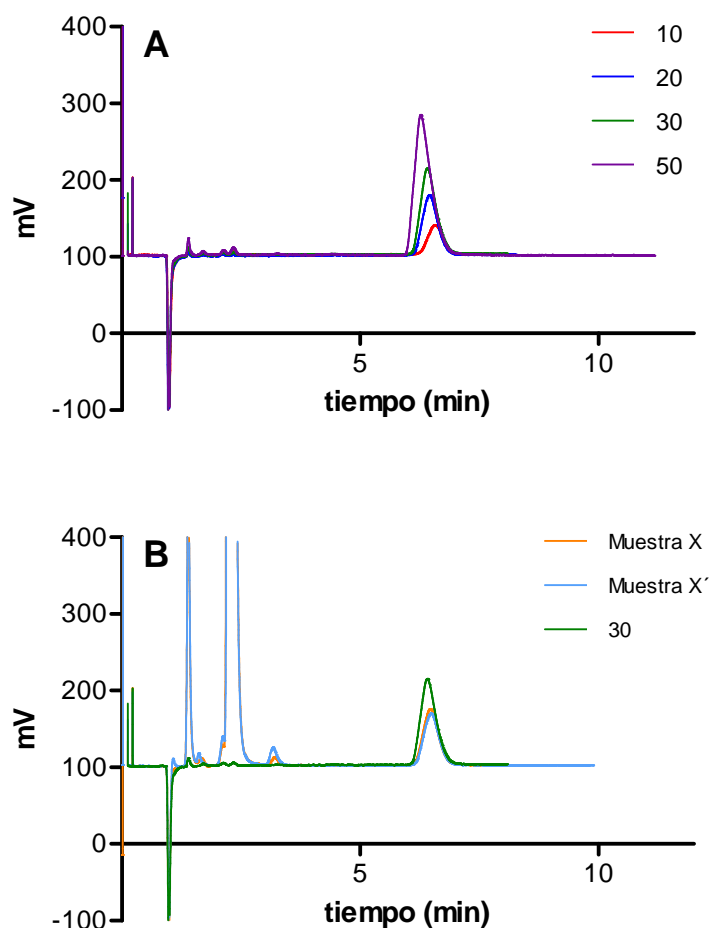


Figura 1.4: Cromatogramas para la determinación de PMG. A: Estándares de PMG en agua bidestilada (concentraciones 10, 20, 30 y 50 mg.L⁻¹). B: Muestra de medio de un ensayo de toxicidad medida por duplicado y un estándar de PMG (30 mg.L⁻¹).

donde:

Muertos_{xi} = Número de peces muertos acumulados al tiempo x de exposición (0, 24, 48 o 96 h) para la concentración i.

Total_i = Numero de peces utilizados para la concentración i.

Se evaluaron las diferencias respecto al grupo control mediante el test de comparaciones múltiples no paramétrico Dunn, con un intervalo de confianza del 95% (Zar, 1997).

Para la determinación de la CL₅₀-96h se transformaron los valores de mortalidad en unidades probit y se graficaron en función del logaritmo de la concentración del herbicida (en equivalentes mg PMG.L⁻¹). A partir de la función de la recta es posible despejar la concentración para un valor de 5 unidades probit (correspondiente al 50% de mortalidad, CL₅₀) (Díaz Báez *et al.*, 2004).

c) Resultados y Discusión.

Con el fin de determinar el rango de concentraciones letales y subletales se efectuaron ensayos de toxicidad aguda. Como puede observarse en la Figura 1.6, para el PMG en su forma ácida, el porcentaje de mortalidad no resultó apreciable, aún en la mayor concentración ensayada, superando tan sólo en un 10% la del grupo control (diferencias no significativas).

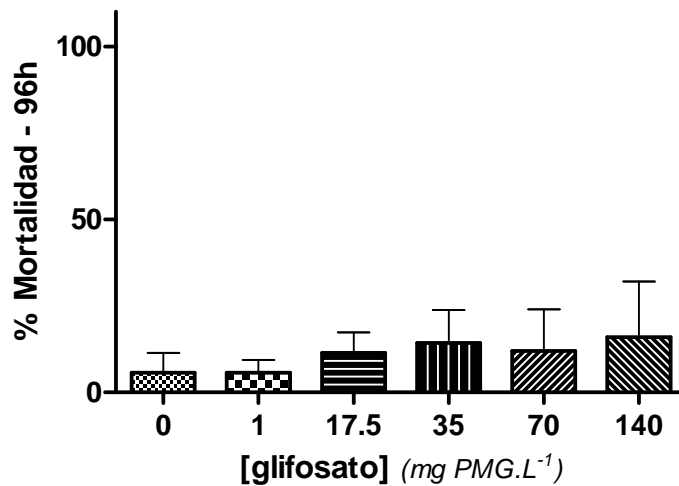


Figura 1.6: Mortalidad de ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos por 96 h a glifosato (forma ácida). Datos como % Mortalidad promedio \pm ESM, n = 25-35.

Existen numerosos estudios sobre los efectos tóxicos de los formulados comerciales a base de glifosato en animales acuáticos (Giesy et al. 2000), pero son pocos los referidos a la toxicidad aguda de soluciones de glifosato (principio activo). Los resultados mostrados en este Capítulo indican que *C. decemmaculatus* expuesto a 140 mg.L⁻¹ de PMG (forma ácida) durante 96 h presenta una supervivencia superior al 80%, por lo que se deduce que la CL₅₀-96h debe hallarse por encima de la máxima concentración ensayada. Estos resultados son consistentes con los de un trabajo reciente de Carriquiriborde (2011) que informó una CL₅₀-96 h para juveniles de *C. decemmaculatus* > 225 mg.L⁻¹. El mismo parámetro ha sido reportado también para otros teleósteos: *Oncorhynchus mykiss*, especie de mayor sensibilidad, 140 mg.L⁻¹ (Folmar et al., 1979); *Odontesthes bonariensis*, 163 mg.L⁻¹ (Carriquiriborde, 2011); *Poecilia reticulata*, > 400 mg.L⁻¹ (Alvarez et al., 2012) y *Cyprinus carpio*, especie de elevada tolerancia, 620 mg.L⁻¹ (Neskovic et al., 1996). Estos resultados sugieren que PMG como principio activo no presenta un nivel significativo de toxicidad letal aguda para peces de agua dulce (CL₅₀-96h > 100 mg.L⁻¹).

En este trabajo analizamos además, mediante el mismo diseño experimental, la toxicidad aguda del formulado *Glifosato II* (Atanor) en *C. decemmaculatus*. En la Figura 1.7 se observa el porcentaje de mortalidad a las 24 h y 96 h de exposición.

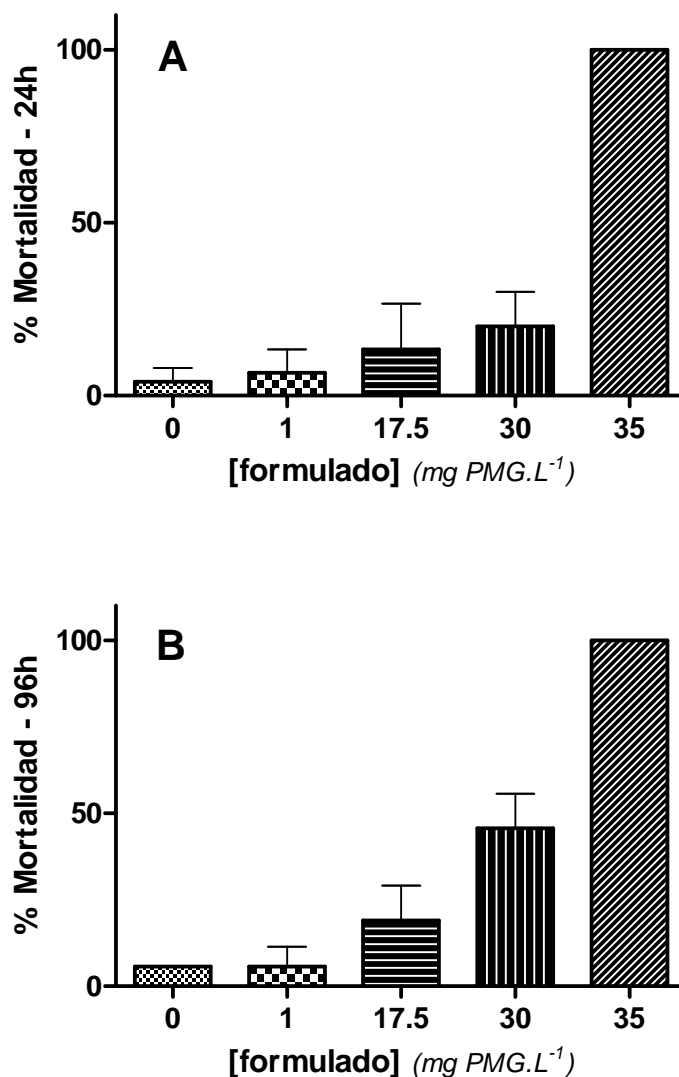


Figura 1.7: Mortalidad de *C. decemmaculatus* expuestos al formulado *Glifosato II* (Atanor). A: % Mortalidad acumulada a las 24 h. B: % Mortalidad acumulada a las 96 h. Datos como promedio \pm ESM, n = 10-25.

Para la concentración de formulado de 35 mg.L⁻¹ (equivalentes PMG) se observa la mortalidad del 100% de los ejemplares de *C. decemmaculatus* resultando significativamente diferente al grupo control ($p < 0.05$). En cambio, como se

mostró previamente (Figura 1.6), la concentración equivalente del principio activo tan sólo provocó un 9% de mortalidad por encima del control a las 96 h de exposición.

Es de destacar que para la concentración de formulado, correspondiente a 35 mg.L⁻¹, el 100% de mortalidad ocurrió durante las primeras 24 h de exposición (panel A, Figura 1.7), observación que se repitió en todos los ensayos realizados. Estos resultados indican una notoria mayor toxicidad del formulado respecto al principio activo.

En base a los resultados de mortalidad correspondientes a las 96 h de exposición se realizó una estimación de la CL₅₀-96h para el formulado utilizando un análisis Probit. En la Figura 1.8 se grafica unidades probit en función del logaritmo de la concentración de equivalentes PMG del formulado.

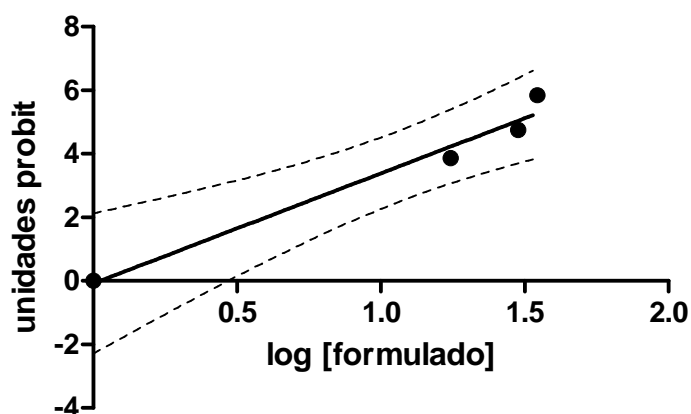


Figura 1.8: Estimación de CL₅₀-96h del formulado *Glifosato II* (Atanor) para *C. decemmaculatus*. Se grafican las unidades probit correspondientes al ensayo de toxicidad aguda (96h) en función del logaritmo de la concentración del herbicida. La recta corresponde al ajuste a una función lineal ($R^2 = 0.972$) y en líneas punteadas el intervalo de confianza del 95%.

La CL₅₀-96h estimada resultó 29 mg.L⁻¹ (equivalentes PMG).

Diversos autores han observado que las formulaciones que contienen PMG como principio activo junto con coadyuvantes como POEA (polioxietileno amina), un tensioactivo no iónico, presentan un aumento significativo de la toxicidad letal para diversos organismos acuáticos (algas, zooplancton, anfibios y peces) (Pérez *et al.* 2011).

En relación a los peces, se determinó la CL_{50-96h} de formulados de glifosato para varias especies: *Rhambdia quelen*, 7.3 mg.L⁻¹ Roundup (Kreutz *et al.*, 2008); *Oncorhynchus mykiss*, 8.2-27 mg.L⁻¹ Roundup (Giesy *et al.*, 2000); *Cyprinus carpio*, 10 mg.L⁻¹ Roundup (Giesy *et al.*, 2000); *Prochilodus lineatus*, 13.7 mg.L⁻¹ Roundup (Langiano y Martinez, 2008); *Gambusia yucatana*, 17.8 mg.L⁻¹ Roundup (Osten *et al.*, 2005); *Leporinus obtusidens*, >100 mg.L⁻¹ Roundup (Gluszczak *et al.*, 2006). Aunque se desconoce la naturaleza química de los coadyuvantes del formulado *Glifosato II* (Atanor) utilizado en el presente trabajo, los resultados que se exponen son consistentes con los de la bibliografía confirmando la mayor toxicidad aguda del formulado para los peces, con respecto al principio activo. En este caso la CL_{50-96h} para *C. decemmaculatus* expuesto al formulado se estimó en 29 mg.L⁻¹, mientras que para el principio activo fue >140 mg.L⁻¹.

Al mismo tiempo *C. decemmaculatus* se ubicó, tanto para el principio activo como para el formulado del herbicida, entre las especies con CL_{50-96h} más elevadas, es decir, las de mayor tolerancia. Este hecho resulta coherente con la amplia distribución que presenta la especie en los agroecosistemas de la Pampa Ondulada en los que se han reportado concentraciones del herbicida entre 0.1 y 0.7 mg.L⁻¹ (Peruzzo *et al.*, 2008).

En los distintos ensayos se tomaron alícuotas de los medios al inicio y a las 48 h con el objetivo de establecer la concentración analítica de PMG durante los mismos (Tablas 1.1 y 1.2).

Tabla 1.1: Concentración analítica de PMG en los medios de ensayos de toxicidad con PMG (forma ácida) correspondientes a t_0 y t_{48h} . Media \pm ESM (N = 3).

Concentración Nominal	Concentración Analítica ($mg\ PMG.L^{-1}$)	
	t_0	t_{48h}
1.0	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.2
17.5	17 ± 1	17 ± 1
35.0	33 ± 1	34 ± 2
70.0	67 ± 1	71 ± 2
140.0	130 ± 9	133 ± 7

Tabla 1.2: Concentración analítica de PMG en los medios de ensayos de toxicidad con formulado *Glifosato II* (Atanor) correspondientes a t_0 y t_{48h} . Media \pm ESM (N = 2).

Concentración Nominal	Concentración Analítica ($mg\ PMG.L^{-1}$)	
	t_0	t_{48h}
1.0	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
17.5	15 ± 1	16 ± 1
35.0	32 ± 2	32 ± 1

Como se observa en las Tablas precedentes las concentraciones analíticas resultaron muy cercanas a las nominales. Tanto para los medios con PMG (forma ácida) como con su formulado no se observaron diferencias significativas en las concentraciones luego de las 48 h de exposición, respecto al tiempo inicial; verificándose la estabilidad del herbicida (forma ácida o formulado) en el medio AMD de ensayo a las condiciones experimentales durante el lapso de 48 h. De esta forma pudo descartarse que existan procesos de hidrólisis o bioacumulación en los peces de una magnitud capaz de reducir la concentración del compuesto en dichas condiciones y en el período de tiempo evaluado.

Capítulo 2

Biomarcadores de estrés ambiental I:

Bioensayos de exposición de *Cnesterodon decemmaculatus* a glifosato en su forma ácida.

a) **Introducción.**

Biomarcadores de estrés oxidativo, neurotoxicidad y metabolismo energético.

Los organismos están expuestos a un gran número de xenobióticos¹ que, una vez absorbidos por el organismo, pueden acumularse en él y afectar su equilibrio funcional. Si la concentración de un xenobiótico en los compartimentos del organismo es excesiva, inevitablemente involucrará un riesgo para las funciones de las biomoléculas que actúen en su entorno, pudiendo alterar finalmente la normal homeostasis del organismo.

Al igual que la absorción y la distribución, ocurren fenómenos de biotransformación que también se llevan a cabo utilizando mecanismos celulares, con la misma maquinaria bioquímica con la que se metabolizan los compuestos endógenos (a veces de estructura química similar al tóxico ambiental). El objetivo de la biotransformación es la metabolización del xenobiótico, en casi todos los

¹ Xenobiótico deriva del griego *xeno* ('extraño') y *bio* ('vida'). Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente en un sistema biológico debido a que son compuestos de síntesis introducidos deliberada o accidentalmente al medio ambiente.

casos catalizada enzimáticamente, para su conversión en una sustancia o complejo molecular menos tóxico o más fácilmente excretable.

En estos procesos de biotransformación se generan con frecuencia especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), también denominadas intermediarios oxígenoreactivos, radicales libres u óxido radicales que son el producto de la reducción de oxígeno molecular (O_2) a radicales superóxido (O_2^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH^{\cdot}). Este último intermediario es un potente oxidante capaz de reaccionar con macromoléculas celulares provocando diversos efectos tales como inactivación enzimática, peroxidación de lípidos de membrana (mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico), daño del ADN y por último muerte celular (Helmut, 1991; Mitchelmore *et al.*, 1998; Van der Oost *et al.*, 2003). Todos estos efectos son conocidos genéricamente como estrés oxidativo (Lushchak, 2011)

Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor en sus células; su estabilidad es preservada por la actividad de enzimas particulares que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Esas alteraciones del equilibrio redox celular pueden causar efectos tóxicos nocivos de diferente tipo e intensidad. El estrés oxidativo es una de las respuestas celulares a los estresores, causado por un desequilibrio entre la producción de aquellas moléculas de alto potencial oxidante derivadas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico particular de detoxificar rápidamente los productos intermedios generados o reparar el daño resultante (Repetto Jiménez y Repetto Kuhn, 2009; Di Giulio y Meyer, 2008).

El sistema de defensa antioxidante que tiende a inhibir la formación de oxiradicales, incluye enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GRED) (Van der Oost *et al.*, 2003). Otra defensa, no enzimáticas, incluyen

vitaminas liposolubles (N-tocoferol y β -caroteno), así como a moléculas de bajo peso molecular (ácido ascórbico, catecolaminas, glutatión) (Helmut, 1991; Winston y Di Giulio, 1991; Van der Oost *et al.*, 2003). En la Figura 2.1 se describe esquemáticamente el sistema mencionado.

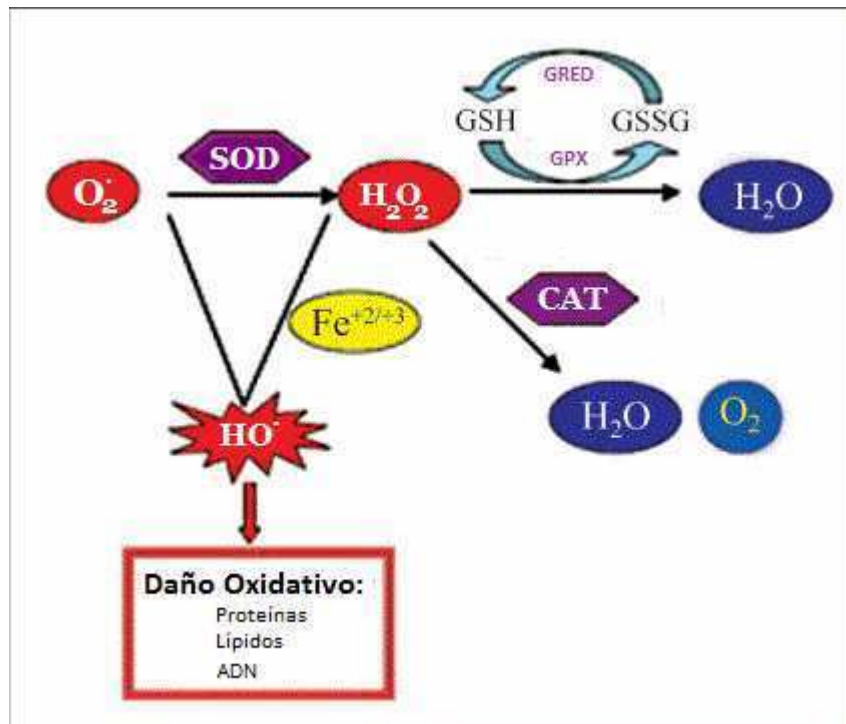


Figura 2.1: Estrés oxidativo y defensas antioxidantes. Se esquematizan las especies reactivas de oxígeno (O_2^{\bullet} , H_2O_2 y OH^{\bullet}), sus posibles efectos sobre macromoléculas y las defensas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GRED) y glutatión (GSH)

El efecto oxidativo de un estresor puede ser evaluado a través del monitoreo de los cambios en la magnitud de algunos biomarcadores críticos. Estos pueden ser aquellos que denotan los efectos de estrés oxidativo sobre las macromoléculas o sobre la respuesta antioxidante, como las enzimas del sistema antioxidante cuya síntesis o actividad pueden verse modificadas como consecuencia de desbalances del estado redox intracelular. La CAT es una de las enzimas principales en los

mecanismos antioxidantes de eliminación de las ROS, la cual metaboliza por degradación al peróxido de hidrógeno.



El aumento de su actividad es reconocido como uno de los índices confiables de los procesos de estrés oxidativo. La localización subcelular de la CAT en vertebrados es principalmente en los peroxisomas (Lackner, 1998; Hermes-Lima, 2004; Schlenk *et al.*, 2008b).

El hígado es uno de los principales órganos de detoxificación. La CAT también puede utilizar el peróxido de hidrógeno para reacciones de oxidación (por ejemplo la oxidación de sustancias tóxicas como los fenoles, etanol, formaldehído, entre otros), mecanismo de detoxificación realizado por dicho órgano y en los riñones.

Al mismo tiempo, ante situaciones de estrés ambiental se produce una alteración en los requerimientos y provisión de moléculas energéticas; y como respuesta puede verse modificado el equilibrio de síntesis y degradación de glucógeno (Gno) en el hígado. En el mismo sentido, así como el glucógeno, el contenido de proteínas tisulares puede verse afectado, en ciertos escenarios pueden degradarse a aminoácidos como fuentes energéticas de “emergencia”. El contenido de glucógeno y las proteínas tisulares pueden brindar la información complementaria del escenario de los impactos de un estresor, en particular sobre el metabolismo energético (Figura 2.2).

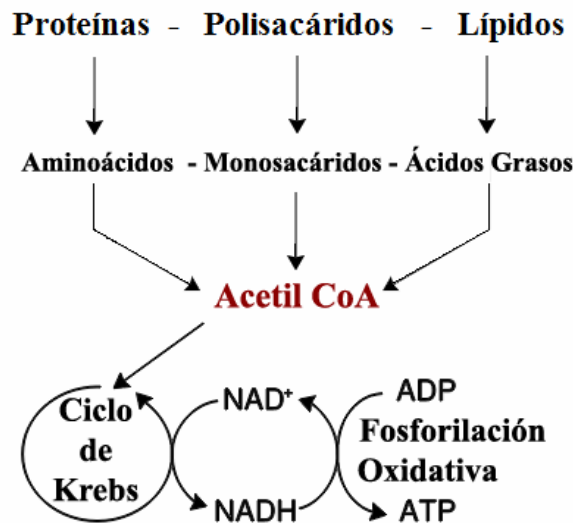


Figura 2.2: Metabolismo de las reservas de polisacáridos, grasas y proteínas para la adquisición de energía.

La acetilcolinesterasa (AChE), pertenece a la familia de las esterasas, y es la responsable de la hidrólisis de la acetilcolina, un neurotransmisor presente en las sinapsis del sistema nervioso tanto en vertebrados como en invertebrados (ver Figura 2.3). Se la adopta como biomarcadora de alteraciones ocurridas en las uniones sinápticas en el SNC, neuromusculares colinérgicas y simpáticas, pudiendo afectar la locomoción y el equilibrio de los animales (Behra *et al.*, 2002). La actividad de la AChE depende tanto de su cantidad como de su modulación tejido específica, por fosforilación de la serina en su sitio activo; la enzima fosforilada es muy estable. Cabe mencionar que no se conocen inhibidores endógenos de esta enzima.

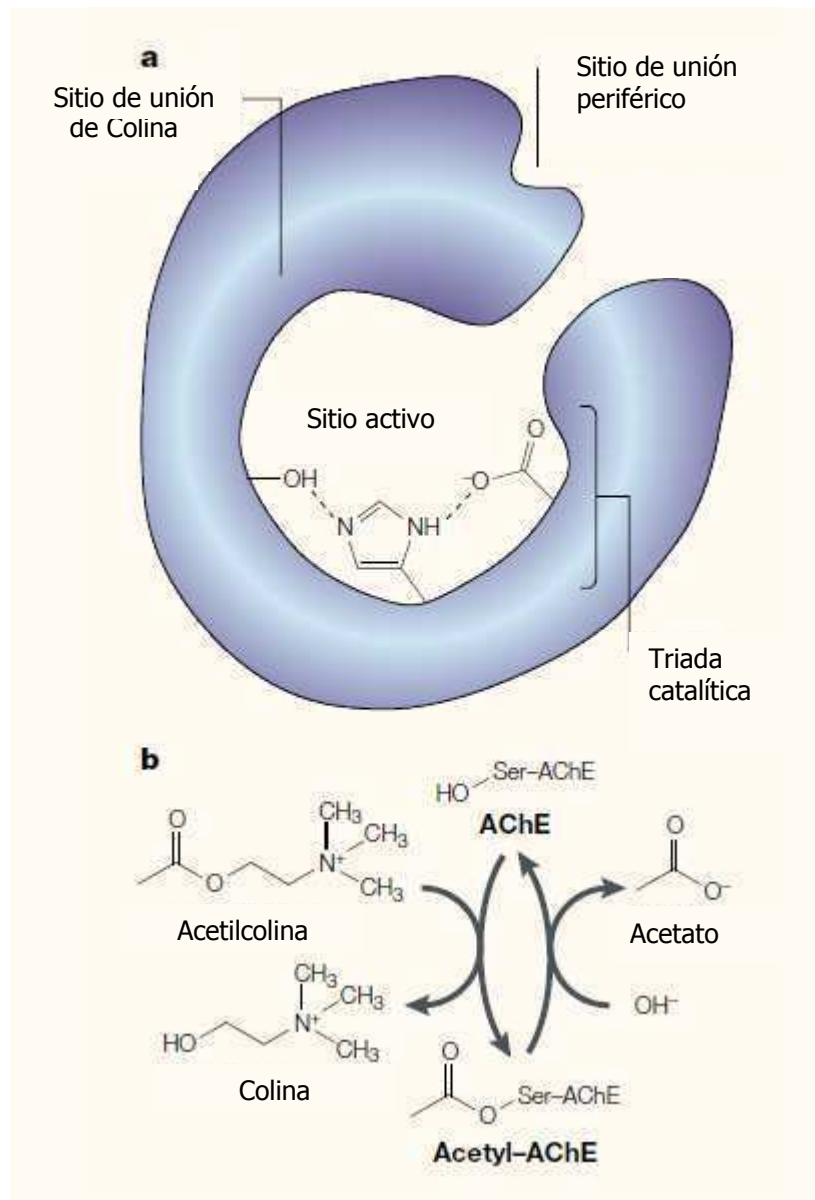


Figura 2.3: a. Estructura de la acetilcolinesterasa (AChE) determinada por cristalografía de rayos X. b. Reacción mediada por AChE. AChE promueve la hidrólisis de acetilcolina a través de la formación de un intermediario (Acetyl-AChE) con liberación de colina y posterior hidrólisis del intermediario liberando acetato. Fuente: Soreq y Seidman, 2001.

Dado que la AChE cumple un papel extremadamente importante para muchas funciones fisiológicas de los peces, su determinación es útil en estudios ecotoxicológicos (Bradbury *et al.*, 2008).

Esta enzima se utiliza como un sensible biosensor en estudios de exposición a pesticidas organofosforados (particularmente los que contienen el grupo fosfato

en su estructura, ver Tabla I.1) y carbamatos que son inhibidores directos de su actividad por unirse en forma covalente a los sitios activos de la misma (Thompson, 1999; Soreq y Seidman, 2001; van Dyk y Pletschke, 2011) (Figura 2.4). Su inhibición provoca una acumulación de acetilcolina en la hendidura sináptica, con la consiguiente sobre-estimulación de la membrana post-sináptica, un proceso que puede conducir a la muerte.

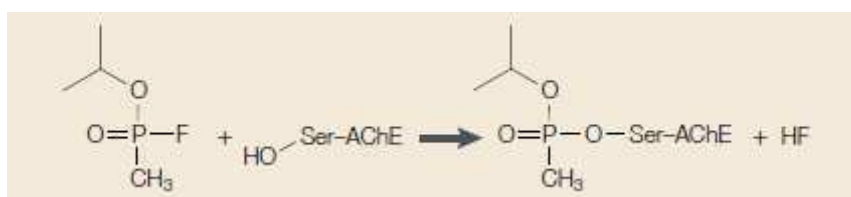


Figura 2.4: Inhibición de AChE por un compuesto organofosforado. El grupo fosforado del sitio activo del inhibidor reacciona con AChE para producir un éster de fosfato estable, análogo al intermediario de catálisis, pero incapaz de realizar su función fisiológica, resultando además bloqueada la regeneración de la enzima. Fuente: Soreq y Seidman, 2001

Recientemente, Kumar *et al.* (2009) informaron que dos piretroides en concentraciones subletales también inhiben la actividad de la AChE cerebral, branquial y muscular de *Channa punctatus*.

Por otro lado, Behra *et al.* (2002) han demostrado una función no clásica de la enzima: esta es requerida para el desarrollo neuronal y muscular en embriones de pez cebra (*zebrafish, Danio rerio*); lo que sugiere que la exposición de los peces a los tóxicos que afectan la funcionalidad de la AChE durante las primeras etapas de desarrollo podría generar, con el tiempo, alteraciones a nivel de la estructura de la población.

Además de los bioquímicos, se dispone de otros biomarcadores de carácter morfológico indicativos del grado de estrés ambiental de los peces, especialmente en exposiciones subcrónicas. Este es el caso del Factor de Condición (K)

expresado originalmente por Fulton (1902) que relaciona el peso con el largo del animal; este parámetro morfométrico es un buen indicador del estado nutricional de los organismos. El mismo varía según la especie, morfotipo, sexo, edad, estado de madurez reproductiva, época del año y ambiente acuático, aspectos adicionales que deben ser tenidos en cuenta al momento de su utilización como biomarcador en bioensayos de toxicidad.

b) Materiales y Métodos.

i) Esquema experimental del bioensayo.

El bioensayo semiestático de exposición aguda se efectuó según lo descrito en el Capítulo 1 [sección 1.b.i.].

Al finalizar la exposición, los ejemplares de *C. decemmaculatus* fueron anestesiados por inmersión en agua con hielo. Inmediatamente se determinaron sus pesos corporales (P) con balanza analítica y sus longitudes (L_T) con calibre. Se seccionó la médula con tijera de punta fina y se mantuvo sobre placa enfriada.

Considerando la talla reducida de los animales, los biomarcadores fueron determinados en homogenatos totales de tres fracciones corporales: *tercio anterior* (A) que corresponde a la cabeza, *tercio medio* (M) representa tejido muscular y las vísceras, y *tercio posterior* (P) contiene principalmente tejido muscular. El tercio A fue considerado desde la boca del individuo hasta el opérculo; el medio desde el opérculo hasta la línea transversal inmediatamente posterior a la aleta anal; el tercio posterior fue considerado desde ese punto hasta el extremo de la aleta caudal (Figura 2.5). Esta modalidad ya fue utilizada por otros autores en estudios con individuos de tamaño reducido (Li, 2008; Varó *et al.*, 2008; Di Marzio y Tortorelli, 1994). Luego de la disección los tercios también fueron pesados.

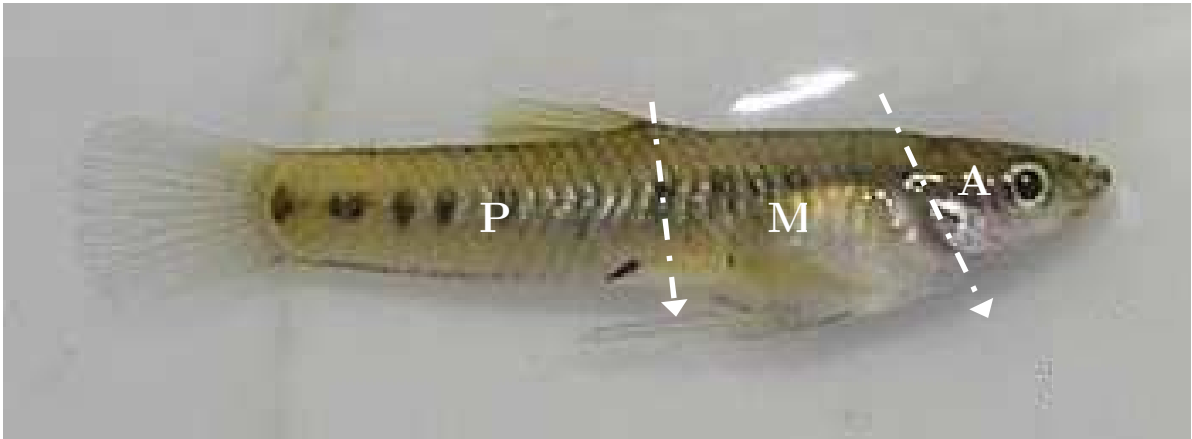


Figura 2.5: Secciones de *C. decemmaculatus* definidos como tercios anterior (A), medio (M) y posterior (P). Las flechas indican los sitios en los que se realizaron los cortes.

ii) Determinación del Factor de Condición.

Con los valores de L_T y P_c de los peces fue calculado el Factor de Condición K , según:

$$K = \frac{P_c}{L_T^3} * 100 \quad [2.2]$$

donde P_c , es el peso corporal del pez (g), y L_T su longitud (cm).

iii) Procesamiento de tejidos.

(1) *Digestión de tejidos para la determinación de glucógeno.*

Los tercios fueron procesados según Seifter *et. al* (1949). La digestión de los tejidos correspondientes a cada tercio se realizó en tubos eppendorf con 200 μ l de KOH 30%, colocados en un termostato con agua circulante a 90°C, durante 20 minutos. Los tubos se transfirieron a hielo para detener la digestión. Luego se agregó etanol 96% (800 μ l) para la precipitación de glucógeno. Se reservó en heladera hasta el momento de su análisis.

(2) *Preparación de homogenatos para la determinación del contenido de proteínas y la actividad de acetilcolinesterasa y catalasa*

La homogeneización de los tejidos se realizó con equipo Decalab, rotor vidrio - teflón, a 3500-4000 rpm. La cantidad promedio de golpes por homogenato fue de 20. Los tercios anteriores se homogeneizaron en buffer fosfato 0.1 M, pH 8; y los medios y posteriores en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4 (detalle en Anexo II). El volumen de buffer utilizado fue calculado aplicando un factor (F) al peso del tejido, el cual fue determinado para cada tercio en función de optimizar la técnica, según:

$$V_{buffer} = m_{tejido} * F \quad [2.3]$$

Los homogenatos se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 10000 g durante 15 minutos a 4 °C en microcentrífuga (HERMLE Z 216 MK). Se separó el sobrenadante y el pellet fue descartado.

Todos los homogenatos fueron almacenados a -20 °C hasta el momento de su utilización (1-5 días). Sobre los mismos se realizaron las determinaciones de las actividades de catalasa y AChE, y el contenido de proteínas tisulares.

iv) Determinación de actividad de catalasa. (EC 1.11.1.6)

La actividad de catalasa se determinó utilizando la técnica de Baudhuin *et al.* (1964).

El fundamento de este método se basa en la determinación de la velocidad de degradación del H₂O₂ (peróxido de hidrógeno), especie oxidante que se reduce a agua y oxígeno, mediante la reacción (Ec. 2.1) catalizada por la catalasa.

La velocidad de degradación del sustrato se determinó utilizando un espectrofotómetro UV/Vis PharmaSpec 1700 (Shimadzu) (ver detalle del equipo en Anexo I). Las muestras se colocaron en celdas de plástico de 1.5 ml, de 1 cm de paso óptico, siguiendo el siguiente protocolo: a 1500 μl de buffer fosfato 0.05 M, pH 7.2 (detalle en Anexo II) se adicionó un volumen de homogenato (dependiendo del tercio) y 9 μl de H_2O_2 3M (preparado en el momento). El volumen de homogenato utilizado fue de 10 μl (tercios anterior y posterior), y de 5 μl en el caso del tercio medio. Las determinaciones se realizaron por duplicado. El blanco en cada medición correspondió al buffer fosfato 0.05 M (pH 7.2) con el volumen de homogenato respectivo sin adición de H_2O_2 .

Las lecturas de absorbancia se realizaron durante 1 minuto, con intervalos de 10 segundos, a $\lambda = 240$ nm. Posteriormente se graficaron los valores de absorbancia registrados en función del tiempo (min). A partir de las ecuaciones de las rectas se calculó el promedio de sus pendientes para cada tercio de cada animal.

La actividad enzimática (A) se calculó según la ecuación:

$$A = \frac{m * f_{dil} * 1000}{l * \epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}} \quad [2.4]$$

donde m es la pendiente promedio de la recta, f_{dil} el factor de dilución ($V_{\text{TOTAL}}/V_{\text{homogenato}}$), 1000 el factor de conversión de M a mM, l el paso óptico de la celda (cm) y ϵ el coeficiente de extinción molar del $\text{H}_2\text{O}_2 = 40 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. A queda expresada como $mM.\text{min}^{-1} = m\text{moles}.\text{min}^{-1}.L^{-1} = \mu\text{moles}.\text{min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$.

La actividad específica (AE) de la enzima se calculó según:

$$AE = \frac{A}{PT} \quad [2.5]$$

donde PT es el contenido de proteínas totales ($\text{mg proteínas}.\text{ml}^{-1}$). La AE queda expresada como $\mu\text{moles}.\text{min}^{-1}.\text{(mg proteína)}^{-1}$.

v) Determinación de actividad de acetilcolinesterasa. (EC 3.1.1.7)

Para esta determinación se utilizó el método colorimétrico de Ellman *et al.* (1961).

El fundamento de esta técnica se basa en que las colinesterasas hidrolizan ésteres de colina, con una actividad máxima a pH 7.7. Se utiliza como sustrato ioduro de acetiltiocolina que es hidrolizado por la enzima a tiocolina y, en presencia de 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), produce el ditiobisnitrobenzoato, que en medio alcalino genera compuestos resonantes de color amarillo. La velocidad de aparición de la coloración es proporcional a la actividad de la enzima.

El buffer fosfato 0.1 M, pH 8 (detalle en Anexo II) se termostató en un baño a 25°C. La solución de DTNB fue preparada previamente y descongelada al momento de su utilización; durante la determinación fue mantenida en frío con hielo. La solución de ioduro de acetiltiocolina fue preparada inmediatamente antes del comienzo de las determinaciones, protegida con papel aluminio de la fotooxidación y mantenida en frío con hielo durante la determinación.

Las muestras se colocaron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico según el siguiente protocolo: a 3 ml de buffer fosfato 0.1 M (pH 8) se adicionó un determinado volumen de homogenato (dependiendo del tercio), 100 µl de solución DTNB y 20 µl de sustrato (ioduro de acetiltiocolina 0.075 M). El volumen de homogenato utilizado fue de 20 µl para los tercios posteriores y de 10 µl para los tercios anteriores y medios.

El blanco utilizado fue buffer fosfato 0.1 M (pH 8) con el volumen de homogenato respectivo y DTNB, sin adición de sustrato.

Las lecturas de absorbancia se realizaron durante 2 minutos, con intervalos de 8 segundos, a $\lambda = 412$ nm. Cada muestra fue medida por triplicado. Se graficaron

los valores de absorbancia registrados en función del tiempo (min). A partir de las ecuaciones de las rectas se calculó el promedio de sus pendientes.

La actividad enzimática (A), en cada tercio y para cada tratamiento, se calculó según la ecuación:

$$A = \frac{m * f_{dil} * 1000}{l * \epsilon_{acetiltiocolina}} \quad [2.6]$$

donde m es la pendiente promedio de la recta, f_{dil} es el factor de dilución ($V_{TOTAL}/V_{homogenato}$), 1000 es el factor de conversión de mM a μ M, l es el paso óptico de la celda (cm) y ϵ es el coeficiente de extinción del ioduro de acetiltiocolina ($13.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A partir de esta ecuación, A queda expresada como $M \cdot \text{min}^{-1} = \text{nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

La actividad específica (AE) de acetilcolinesterasa se calculó según:

$$AE = \frac{A}{PT} \quad [2.7]$$

donde PT es el contenido de proteínas totales ($\text{mg proteínas} \cdot \text{ml}^{-1}$). La AE queda expresada como $\text{nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$.

vi) Determinación del contenido de glucógeno en el tercio medio.

El glucógeno se cuantificó por espectrofotometría, según método de Seifter *et al.* (1949), utilizando antrona como reactivo.

Las muestras digeridas y conservadas en heladera fueron centrifugadas durante 20 minutos a 850 g en microcentrífuga refrigerada (5°C). El pellet fue resuspendido en 1 ml de H_2O destilada. Se tomaron 250 μ l de cada suspensión y de soluciones estándares de glucosa (en ambos casos por triplicado), y se agregaron 1.75 ml de antrona 0.2% en H_2SO_4 95%. Estas soluciones se llevaron a 90°C (en baño

termostatizado) durante 10 minutos. Inmediatamente después se enfrió colocando los tubos en hielo para detener la reacción y se procedió a la lectura de absorbancia a $\lambda = 620$ nm. La curva patrón se realizó con las siguientes concentraciones de glucosa: 0, 5, 10 y 20 μg en 250 μl de H_2O bidestilada. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

vii) Determinación de la concentración de proteínas tisulares.

Las proteínas tisulares se cuantificaron por el método de Lowry *et al.* (1951). Esta técnica se basa en la detección de la coloración azul que resulta de la reacción del complejo proteína-cobre con el reactivo de Folin-Ciocalteu. La coloración presenta un máximo de absorbancia a 650 nm.

A partir de una solución stock de albúmina bovina ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) se confeccionó una curva patrón con las siguientes concentraciones: 0, 10, 20 y 30 μg de albúmina en 200 μl en H_2O bidestilada. En paralelo se prepararon tubos con los siguientes volúmenes de homogenato: 8 μl (tercio anterior), 3 μl (tercio medio) y 5 μl (tercio posterior), completándose el volumen a 200 μl con H_2O bidestilada. Estos volúmenes fueron determinados en ensayos preliminares para que sus valores de absorbancia se encontrasen dentro del intervalo de valores de la curva patrón. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Se realizó la lectura de absorbancia a $\lambda = 650$ nm, en celda plástica de 1 cm de paso óptico.

La concentración de proteínas se determinó extrapolando en la curva patrón la absorbancia obtenida y relativizando el valor al volumen de homogenato utilizado.

viii) Determinación de la concentración de glifosato en los medios de ensayo.

La determinación de PMG se realizó por cromatografía iónica siguiendo el mismo protocolo descrito en el Capítulo 1 [sección 1.b.iii.].

ix) Reactivos.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Para los bioensayos se utilizó N-(fosfonometil)glicina (PMG), Sigma (P-5671, CAS 1071-83-6).

En la determinación de proteínas totales se utilizó albúmina bovina BSA Sigma (A7906, CAS 9048-46-8) y reactivo de Folin-Ciocalteu Anedra. En la cuantificación de glucógeno se utilizó antrona Sigma (A1631, CAS 90-44-8) y dextrosa anhidra (glucosa) Anedra. La determinación de actividad enzimática de catalasa se realizó con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) Merck; la de acetilcolinesterasa con ioduro de acetiltiocolina ($C_7H_{16}NOSI$) Sigma (A5751, CAS 1866-15-5) y DTNB (ácido 5-5'-dinitrobis-(2-nitrobenzoico)) Sigma (D8130, CAS 69-78-3) como sustratos.

x) Expresión de resultados y análisis estadístico

En todos los casos se calculó la media y el ESM de los valores obtenidos para el grupo control y para los grupos correspondientes a cada concentración de glifosato. Estos parámetros se obtuvieron a partir del *análisis estadístico de columnas* utilizando el software GraphPad Prism versión 5.01.

En el caso de actividades de catalasa y acetilcolinesterasa se expresaron como actividad específica. Los resultados fueron graficados como porcentaje promedio respecto al grupo control. Para la AChE se analizó además la actividad de AChE total en el tercio anterior.

El glucógeno y las proteínas totales se expresaron como *mg/g*.

Para el análisis de estacionalidad se efectuaron las comparaciones mediante el test Bonferroni de comparaciones múltiples, las regresiones con el test de Pearson.

Por otra parte, las comparaciones entre los tratamientos y el grupo control se realizaron mediante el test de comparaciones múltiples Dunnet, con un intervalo de confianza del 95% en todos los casos (Zar, 1997), utilizando el programa antes mencionado.

c) Resultados y Discusión.

Aunque el PMG como principio activo no presenta un nivel significativo de toxicidad letal para *Cnesterodon decemmaculatus* es importante analizar la existencia de efectos subletales, aún más considerando que distintos trabajos reportan este tipo de efectos de sus formulados, como se ha descrito en la introducción de este Capítulo.

Factor de Condición.

El Factor de Condición no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 2.1). El valor promedio de este parámetro para todos los peces utilizados en este análisis fue de 0.72 ± 0.01 (media \pm ESM, N =111). El K asume que el peso de un individuo en relación a su talla (largo) puede ser adoptado como

indicador de su estado sanitario-nutricional. Los valores de P_c y L_T indican, en nuestro caso, una homogeneidad de la talla de las madrecitas utilizadas en los diferentes ensayos. También es oportuno destacar que el K es un biomarcador que, contrariamente a otros, no es destructivo (Fossi, 1994), que también brinda valiosa información ecotoxicológica referente a la salud de los animales.

Tabla 2.1: Peso (P_c), largo total (L_T) y Factor de Condición (K) de *C. decemmaculatus* expuesto a diferentes soluciones de PMG en ensayo agudo (96 h). Los valores están expresados como media \pm ESM, n = número de peces.

[PMG] mg.L ⁻¹	P_c (g)	L_T (cm)	K	n
0	0.076 \pm 0.005	2.17 \pm 0.06	0.72 \pm 0.02	28
1.0	0.076 \pm 0.006	2.19 \pm 0.05	0.69 \pm 0.02	29
17.5	0.077 \pm 0.007	2.16 \pm 0.07	0.74 \pm 0.02	28
35.0	0.072 \pm 0.005	2.11 \pm 0.06	0.74 \pm 0.02	26

Defensas antioxidantes: Catalasa.

En relación a la evaluación de un biomarcador de las defensas antioxidantes pudo determinarse sólo en el tercio M la actividad de la CAT que resultó $36 \pm 9 \mu\text{moles.min}^{-1} \cdot (\text{mg proteína})^{-1}$ (media \pm ESM) para los ejemplares control. En A y P la actividad de CAT resultó no detectable (ND).

La exposición a PMG produjo un incremento de CAT en M, en un rango del 47-70%, siendo el aumento significativo para la concentración de 35 mg PMG.L⁻¹ (Figura 2.6).

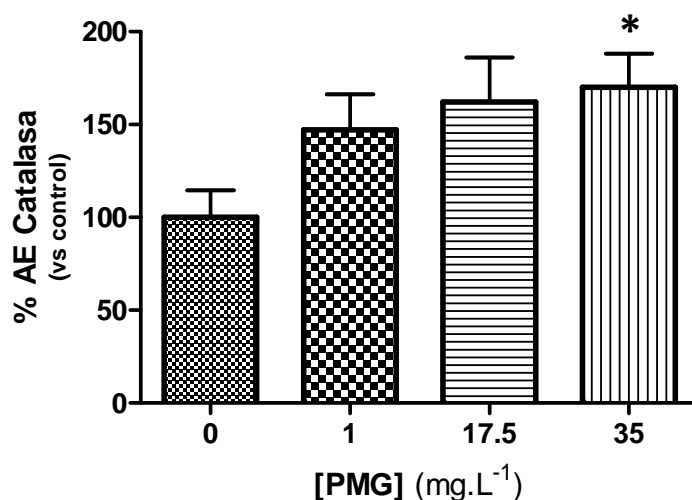


Figura 2.6: Actividad específica de Catalasa en el tercio corporal medio de *C. decemmaculatus* expuestos por 96 h a diferentes soluciones de PMG (forma ácida) en ensayo agudo (96 h). Los valores se expresan como media \pm ESM ($n = 9-10$) en porcentaje respecto al grupo control. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; * $p < 0.05$.

Existen antecedentes en relación a los efectos de estrés oxidativo y respuestas antioxidantes en peces expuestos en forma aguda a formulados de PMG (Tabla 2.2). Entre estos antecedentes, algunos describen efectos sobre CAT, una de las enzimas del sistema de defensa antioxidante. Lushchak *et al.* (2009) determinaron un aumento de CAT en hígado y riñón de *Carassius auratus* por exposición a Roundup (2.5-20 mg.L⁻¹). En *Prochilodus lineatus* Roundup (10 mg.L⁻¹) también provocó el aumento de la CAT hepática (Langiano y Martínez, 2008). Para otro formulado de glifosato (Roundup Transorb) juveniles de *P. lineatus* mostraron una reducción de CAT en el hígado a tiempos cortos (6 h) en paralelo a la aparición de peroxidación de lípidos (Modesto y Martínez, 2010a). En *Goodea atripinnis* un formulado de glifosato ampliamente utilizado en México provocó la reducción de la CAT en branquias y el aumento de la enzima en hígado (Ortiz-Ordoñez *et al.*, 2011). Mientras que en *Astyanax sp* la exposición a Roundup (1 y 2 mg.L⁻¹) no produjo cambios significativos en la CAT del hígado (Rossi *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos por exposición aguda de *C. decemmaculatus* al principio activo PMG son consistentes con la respuesta de la CAT hepática observada por varios autores para exposiciones agudas a formulados. Es de destacar que, a pesar de observarse una tendencia de incremento de la actividad de CAT desde la menor concentración (1 mg.L⁻¹), las diferencias observadas sólo resultaron significativas para la mayor concentración ensayada (35 mg.L⁻¹). Es posible que una parte de los efectos observados para formulados se deban al principio activo, y que los coadyuvantes tengan también un rol relevante como agentes promotores de estrés oxidativo y respuestas antioxidantes. Sin embargo debe notarse que no existen antecedentes previos en relación a una respuesta antioxidante en peces por la exposición aguda al PMG (forma ácida).

Al mismo tiempo, el análisis global de la bibliografía citada sugiere que la respuesta de las defensas antioxidantes es muy variable, resulta fuertemente dependiente de la especie, el tiempo de exposición y el tejido.

Biomarcador de neurotoxicidad: AChE

Los cambios en la actividad de la AChE, que proporciona información sobre los efectos de un estresor sobre el sistema nervioso, puede ayudar a explicar algunas alteraciones del comportamiento de los peces, tales como pérdida del equilibrio y variaciones en el patrón de locomoción (Tierney *et al.*, 2007).

Realizando determinaciones preliminares en peces no tratados detectamos que la actividad específica de esta enzima mostraba gran variabilidad. En este sentido al realizar varias determinaciones en diferentes meses del año pudimos corroborar que la variabilidad que presentaba AChE era aproximadamente cíclica, mostrando un patrón estacional (Ver Figura 2.7).

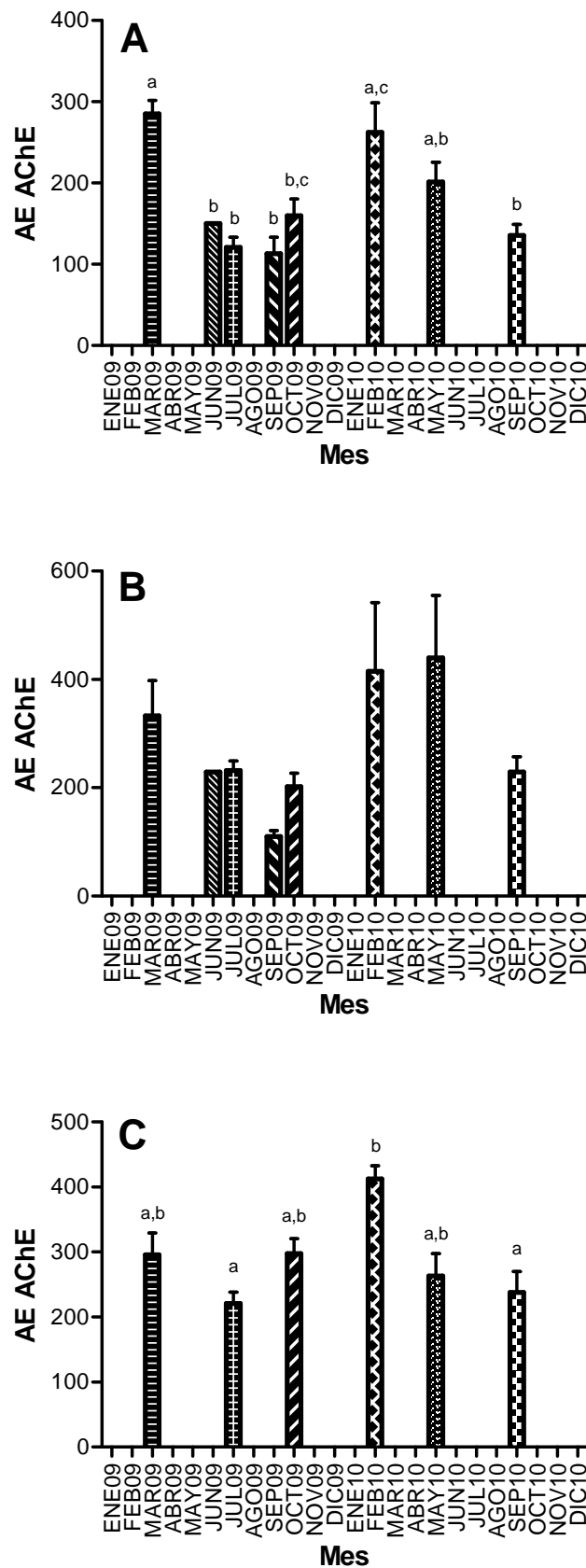


Figura 2.7: Variaciones estacionales en la actividad específica de AChE en *C. decemmaculatus* en condiciones control. Se grafican los valores promedio \pm ESM ($n = 4-10$). A: Tercio Anterior; B: Tercio Medio; C: Tercio Posterior. En cada panel se indica con letras iguales (a, b, c) las barras que no presentan diferencias significativas.

Las actividades de AChE correspondientes a las tres secciones del cuerpo (A, M y P) mostraron el mismo perfil. La mayor actividad fue observada en los meses de verano, mientras que la misma disminuye en los meses de invierno hasta un 60%, 75% y 46% en los tercios A, M y P respectivamente. Como se observa en los paneles A y C (Figura 2.7), para los tercios A y P estas diferencias resultan significativas entre ambas estaciones extremas, hallándose valores intermedios en los meses de primavera y otoño. Para el tercio M, aunque se aprecia un perfil similar, la variabilidad de la AChE en cada grupo de mediciones determinó que las diferencias no resultaran significativas en ningún caso (ver barras de error estándar en Figura 2.7, panel B).

En relación al patrón estacional que hemos observado, referente a variaciones naturales de la actividad de AChE en peces, existen algunos antecedentes. Chuiko *et al.* (1997) determinaron la existencia de fluctuaciones estacionales en la actividad de AChE en *Rutilus rutilus*. Estos hallazgos ponen en evidencia la importancia de considerar y definir en los programas de monitoreo los momentos de realización de los ensayos para llegar a conclusiones válidas, discriminando las variaciones atribuibles a contaminantes de las naturales.

Para indagar sobre el origen o las repercusiones de estas variaciones se realizó un estudio de correlaciones entre la actividad de AChE y los parámetros morfométricos para evaluar si, por ejemplo, un cambio en el nivel nutricional (expresado a través de K) podría tener relación con los cambios observados.

Tanto en los tercios M y P la actividad de AChE mostró mayor correlación con el K ($R^2 = 0.667$ y 0.686 respectivamente, $p < 0.05$), sugiriendo que el nivel nutricional se relacionaría con la actividad de esta enzima. En cambio, en el caso del tercio A dicha actividad presentó una marcada correlación con el P_c y L_T de los peces ($R^2 = 0.811$ y 0.817 respectivamente, $p < 0.005$), mientras no resultó relevante su relación con K ($R^2 = 0.194$, ns), hecho que indicaría que la actividad

de la AChE cerebral estaría íntimamente ligada a la talla (largo), y por tanto la edad de los peces, no así de su estado nutricional.

Resulta relevante conocer el comportamiento de las enzimas para su posterior uso como biomarcadores. A partir de los resultados obtenidos pudimos conocer algunos de los parámetros que modulan la actividad de AChE y considerarlos al momento de utilizarla como biomarcador de neurotoxicidad (verificar homogeneidad entre grupos en cuanto a peso y talla, evitar repeticiones de bioensayos en diferentes estaciones del año, etc.).

En los bioensayos la actividad en A, M y P de los peces control (N = 14) resultó 257 ± 19 ; 452 ± 85 y 343 ± 27 $nmoles.min^{-1}.(mg\ proteína)^{-1}$ (media \pm ESM), respectivamente. La Figura 2.8 muestra las actividades específicas de AChE para cada tercio (A, M, P) de los animales expuestos a diferentes concentraciones de PMG, expresadas como porcentajes relativos a los controles.

Las secciones A y M mostraron una tendencia de disminución de la actividad de AChE por exposición a PMG. En el tercio M, se observó una disminución de la AChE en un rango del 24 – 37%. Sin embargo los valores de actividad específica mostraron una mayor variabilidad en este tercio, lo que podría explicar que las diferencias observadas no resultaron significativas en todos los casos. En el tercio A, esta actividad disminuyó por la exposición a PMG en un rango del 20 – 30% respecto a los controles, diferencias que resultaron significativas para todas las concentraciones ensayadas. En cambio, el herbicida no afectó la actividad AChE en el tercio P, lo que podría indicar una sensibilidad diferente en relación a la exposición a glifosato, dependiendo de la localización de la enzima.

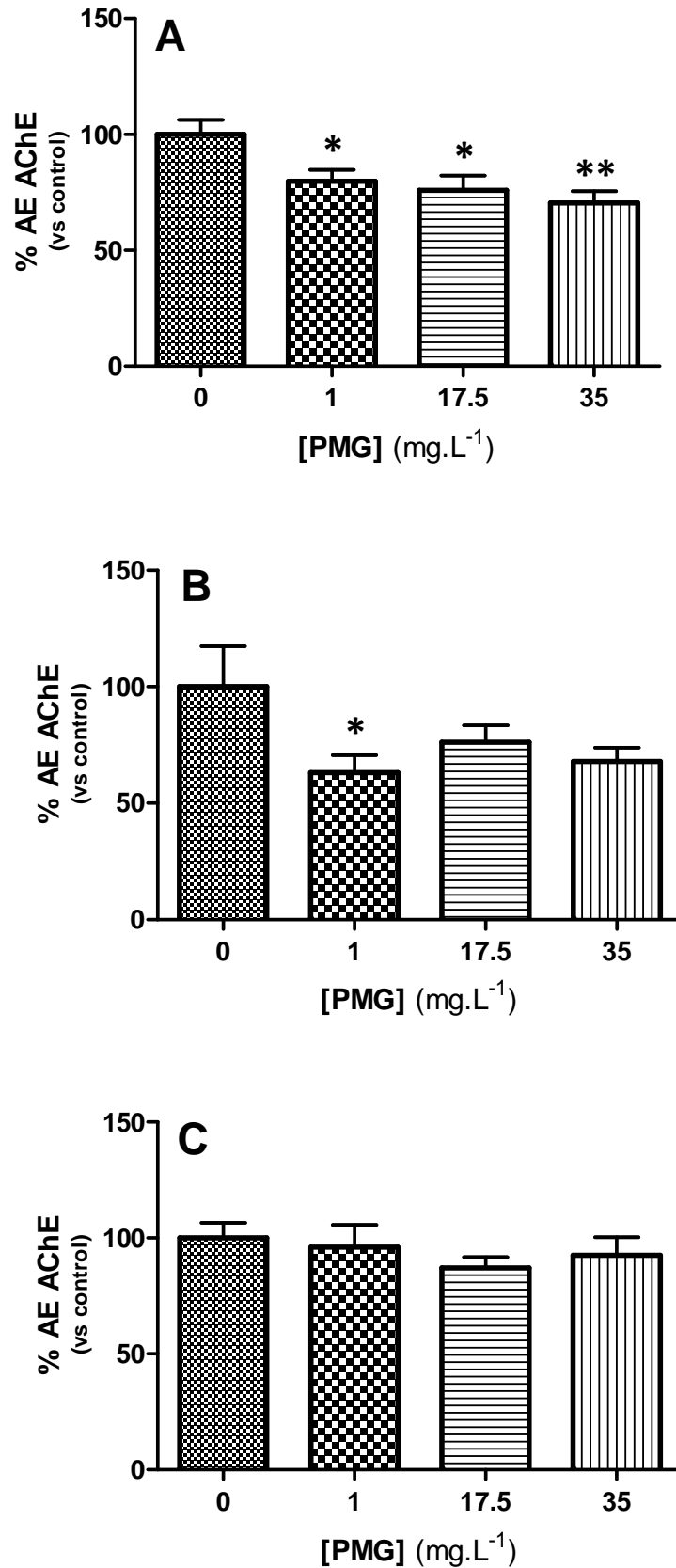


Figura 2.8: Actividad específica de AChE en las tercios anterior, medio y posterior de *C. decemmaculatus* expuesto a diferentes soluciones de PMG (forma ácida) por 96 h. Los valores se expresan como media \pm ESM ($n = 14-15$) en porcentaje respecto al grupo control. A: Tercio Anterior; B: Tercio Medio; C: Tercio Posterior. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control respectivo; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Considerando que la AChE del tercio A corresponde fundamentalmente a la enzima de origen cerebral calculamos, en este caso, la actividad total en el tercio, ya que dicho valor representaría la actividad total de la enzima cerebral (Figura 2.9). Esta metodología fue previamente utilizada por otros autores (Osten *et al.*, 2005; Varó *et al.*, 2008).

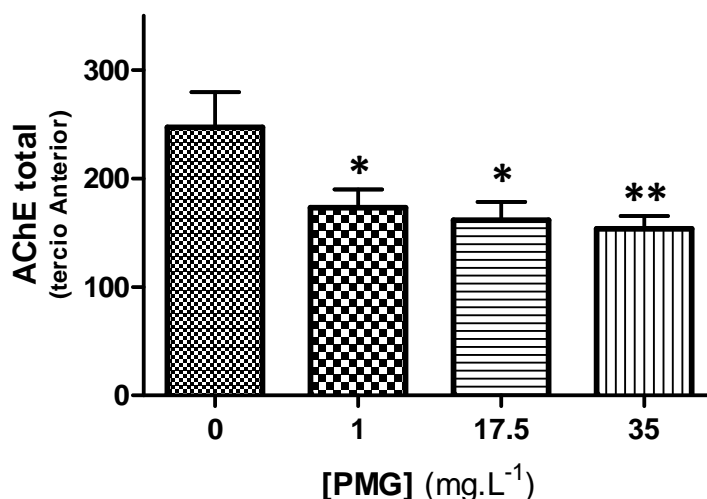


Figura 2.9: Actividad Total de AChE en el tercio anterior de *C. decemmaculatus* expuesto a diferentes soluciones de PMG (forma ácida) por 96 h. Los valores se expresan como media \pm ESM (n =14-15). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; * p < 0.05, ** p < 0.01.

Al expresar la actividad como Actividad Total en el tercio, los valores absolutos presentaron muy baja dispersión, lo que parecería sugerir que nuestra consideración fue válida. Al mismo tiempo, el efecto del PMG resultó aún más notorio, mostrando una inhibición del 30-38%.

Este efecto del glifosato sobre la actividad de AChE es comparable con lo descrito para otras especies de peces en exposiciones agudas a formulados de glifosato. En *Leporinus obtusidens* expuestos por 96 h a concentraciones de Roundup, en un rango de 3-20 mg.L⁻¹, la actividad de AChE disminuyó significativamente en el cerebro, mientras que no se encontraron cambios en el

músculo (Gluszczak *et al.*, 2006). En un ensayo de exposición crónica (90 días) de *Leporinus obtusidens* a Roundup, la concentración de 5 mg.L⁻¹ del formulado produjo inhibición de AChE cerebral, mientras no afectó la enzima de origen muscular (Salbego *et al.*, 2010); esta respuesta diferencial podría interpretarse como una consecuencia de la distinta afinidad de la enzima en cada tejido. En *Rhamdia quelen*, determinaron un resultado similar luego de la exposición a 0.2 y 0.4 mg.L⁻¹ de Roundup (Gluszczak *et al.*, 2007). Rossi *et al.* (2011) tampoco determinaron variaciones en músculo de *Astyanax sp* expuesto a 1 y 2 mg.L⁻¹ de Roundup. En *Prochilodus lineatus*, la actividad de AChE en el cerebro se redujo significativamente por exposición aguda a 1 y 5 mg.L⁻¹ del formulado RoundupTransorb, mientras que en el músculo también establecieron una disminución significativa, aunque sólo para la concentración más alta del formulado (Modesto y Martínez, 2010a). En esta especie, se determinó la inhibición en ambos tejidos para 10 mg.L⁻¹ del formulado Roundup (Modesto y Martínez, 2010b), mientras que en *Cyprinus carpio* el mismo patrón fue determinado para exposiciones agudas a Roundup entre 0.5-20 mg.L⁻¹ (Cattaneo *et al.*, 2011).

Los resultados del presente trabajo son complementarios a los mencionados, y al mismo tiempo significan el primer antecedente del efecto inhibitorio de PMG, como principio activo, sobre la actividad de AChE en peces.

Reservas energéticas: Glucógeno.

Los niveles de glucógeno fueron determinados en el tercio M de los ejemplares, ya que es en este tercio en donde se encuentra el hígado, órgano que concentra la reserva principal de este polisacárido. El nivel de Gno en los controles fue $1.8 \pm$

0.2 mg/g. En la Figura 2.10 se grafican los valores del grupo control y los expuestos a PMG, no hallándose diferencias significativas.

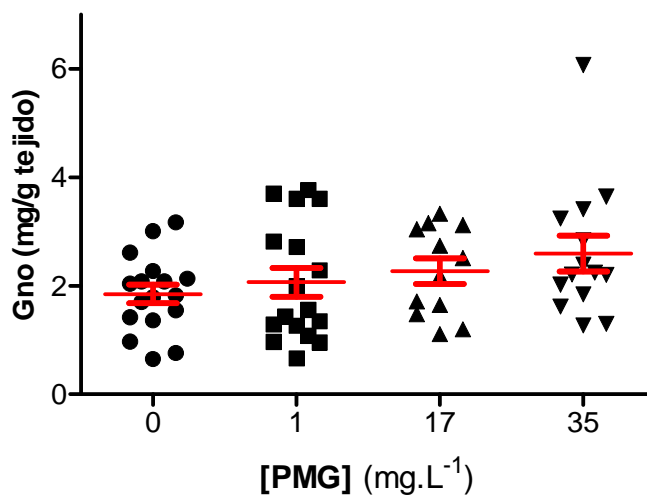


Figura 2.10: Niveles de Glucógeno en el tercio medio de *C. decemmaculatus* en condiciones control o expuestos a diferentes soluciones de PMG (forma ácida) por 96 h. Se grafican junto a los valores, el promedio y la barra de ESM de cada grupo experimental, n = 12-17.

Existen antecedentes de depleción del contenido de glucógeno hepático en peces expuestos por 96 h a formulados de glifosato, como también de daños histopatológicos de este órgano en exposiciones agudas y crónicas (Jiraungkoorskul *et al.*, 2003; Ortiz-Ordoñez *et al.*, 2011; Shiogiri *et al.*, 2012).

Según los resultados obtenidos, el principio activo no produjo este efecto sobre el contenido de glucógeno del hígado, al menos para *C. decemmaculatus* en las concentraciones ensayadas.

Proteínas tisulares.

Por último, el contenido de proteínas tisulares se presenta en la Tabla 2.3. Para los tercios A, M y P de organismos control resultó 43 ± 2 ; 101 ± 6 y 70 ± 4 mg/g, respectivamente.

Tabla 2.3: Contenido de proteínas tisulares en los tercios (Anterior, Medio y Posterior) de *C. decemmaculatus* expuesto 96 h a soluciones de PMG (1, 17.5, 35) o mantenidos en condiciones control.

Proteínas tisulares totales (mg/g tejido)												
	Anterior				Medio				Posterior			
	0	1	17	35	0	1	17	35	0	1	17	35
PROM	43	39	37*	41	101	93	100	88	65	58	64	64
N	24	25	22	22	24	25	22	23	23	25	22	23
ESM	2	1	1	1	6	5	4	6	2	3	2	3

Para la sección A pudo determinarse, una ligera disminución significativa del contenido de proteínas tisulares para la exposición a 17.5 mg.L⁻¹, respecto al control. En las secciones M y P no se detectaron diferencias significativas.

En relación al glifosato, Gluszczak *et al.* (2006; 2007) han observado efectos de uno de sus formulados sobre los niveles de proteínas, aunque los mismos aparecen como contradictorios. En *Leporinus obtusidens* determinaron una disminución (29–38%) en los niveles de proteínas hepáticas y aumento en el tejido muscular (9-53%) por exposiciones agudas a Roundup entre 3-20 mg.L⁻¹. En *Rhamdia quelen*, en cambio, 0.2 y 0.4 mg.L⁻¹ produjeron incrementos en el hígado y disminución en músculo.

En este sentido, debe considerarse que el tercio M de *C. decemmaculatus* contiene tanto al hígado como tejido muscular por lo que efectos diferentes en estos tejido podrían verse solapados en este análisis. Por lo tanto, es posible que para la evaluación de este biomarcador sea conveniente un análisis en forma tejido específica. Aún así es de destacar el efecto inhibitorio leve, significativo para 17.5 mg PMG.L⁻¹ en el tercio A.

Concentración analítica de PMG.

Al igual que en el Capítulo 1, se determinaron las concentraciones analíticas de PMG en los medios de ensayo en el tiempo inicial y después de 48 h (Tabla 2.4).

Tabla 2.4: Concentración analítica de PMG en los medios de ensayo correspondientes al tiempo inicial (t_0) y luego de las 48 h de iniciado el ensayo (t_{48h}).

Concentración Nominal	Concentración Analítica ($mg\ PMG.L^{-1}$)	
	t_0	$t_{48\ h}$
1.0	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.2
17.5	16 ± 1	17 ± 2
35.0	33 ± 2	34 ± 3

Las concentraciones de herbicida no se modificaron significativamente. Esto implica que no hubo cambios relevantes debido a, por ejemplo, procesos de degradación abiótica durante el desarrollo del ensayo, pudiendo ratificarse la estabilidad determinada previamente.

Por lo tanto, los efectos observados sobre los biomarcadores estudiados en este Capítulo (respuesta antioxidante, neurotoxicidad, metabolismo energético y factor de condición de los peces) pueden ser atribuidos a una exposición aguda al PMG, cuya concentración se mantiene estable durante los tiempos del ensayo, descartando a la vez la posibilidad de cambios atribuibles a procesos de bioconcentración como los reportados para otros pesticidas organofosforados (Tsuda *et al.*, 1997).

Capítulo 3

Biomarcadores de estrés ambiental II:

Efectos de la exposición crónica a un formulado de glifosato sobre parámetros del metabolismo celular de *Odontesthes bonariensis*.

a) **Introducción.**

Metabolismo celular. Carga Energética de Adenilatos como biomarcador de estrés ambiental. *Odontesthes bonariensis* como organismo *test*.

En el área de la Ecotoxicología, muchos científicos han orientado sus investigaciones a la identificación de biomarcadores específicos y tempranos. Obviamente la adecuada selección de biomarcadores, considerando su selectividad, sensibilidad y la precocidad de sus cambios, determinará su potencia y utilidad para la detección de condiciones ambientales responsables del estrés en los diferentes niveles de organización y de los efectos de dicha alteración (LeBlanc y Bain, 1997). En el marco amplio de los biomarcadores, los *fisiológicos* pueden ser clasificados en dos diferentes categorías: los regulados y los regulatorios. Estos últimos varían según los requerimientos del organismo de forma de mantener su homeostasis. Sin embargo, pueden verse modificados ante variaciones en el desarrollo celular normal. Por ello, los efectos tóxicos de la polución ambiental

sobre parámetros fisiológicos, probablemente puedan manifestarse en los parámetros fisiológicos regulatorios antes que en los regulados (Salibián, 2011).

Las fluctuaciones ambientales son importantes desencadenantes de eventos asociados a la regulación fisiológica y a modificaciones en el comportamiento, en particular, de los organismos acuáticos (Hochachka y Somero, 2002). Las variaciones cíclicas en la temperatura, la disponibilidad de alimentos, el pH o el O₂ disuelto del medio -entre otros factores- pueden inducir cambios a distintos niveles, desde el celular (Segner y Braunbeck, 1998) hasta el poblacional (Newman y Clements, 2008), y están asociados a síntomas de estrés. En estos escenarios los organismos acuáticos aumentan su gasto de energía para disparar mecanismos fisiológicos de compensación (homeostasis), suelen liberar catecolaminas, glucocorticoides y/o corticotrofinas, y alteran el metabolismo energético en sus tejidos (Mazeaud y Mazeaud, 1981; Boonstra, 2013).

Carga Energética de Adenilatos.

La carga energética de adenilatos (CEA) ha sido definida por Atkinson (1968) como:

$$CEA = \frac{[ATP] + 0.5 * [ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]} \quad [3. 1]$$

La CEA es reflejo del equilibrio energético de las células, una medida de la cantidad de energía disponible a partir del *pool* de adenilatos: adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) y adenosina monofosfato (AMP), siendo, teóricamente el principal factor que regula el flujo de energía para los procesos catabólicos y anabólicos en las células. Este parámetro ha sido propuesto como indicador del control de la regulación de los caminos metabólicos y del estado energético del organismo (Le Gal *et al.*, 1997).

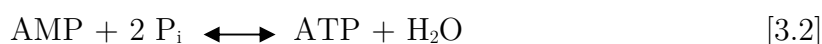
Teóricamente la CEA varía entre los valores de 0 (si todos los adenilatos se almacenan como moléculas de AMP, sin energía) y 1 (si todas las moléculas están como ATP, máxima energía). Sin embargo, en condiciones óptimas, cuando hay un equilibrio entre la degradación y síntesis de ATP, la CEA tiene un valor aproximado de 0.80 (Atkinson, 1968). Se considera que los valores entre 0.50 y 0.75 corresponden a organismos estresados o en un estado fisiológico sub-óptimo que se manifiesta con diferentes signos (crecimiento limitado, potencial reproductivo reducido, etc.), mientras que los valores inferiores a 0.50 reflejan un estado de estrés grave, caracterizado por células en condiciones de muerte celular, ya que no pueden sobrevivir ni recuperarse incluso con un retorno a las condiciones óptimas (Le Gal *et al.*, 1997).

El uso de la CEA ha sido sugerido como una herramienta para la evaluación de las respuestas de los organismos acuáticos ante el estrés ambiental. Sin embargo, su estudio como biomarcador en estudios de toxicidad y biomonitoreo en peces no ha sido explorado con el cuidado que corresponde.

Existen antecedentes del uso de CEA como biomarcador, mayoritariamente en invertebrados. En estos organismos se ha descrito una disminución significativa en la CEA frente a variaciones en las condiciones fisicoquímicas del medio, como pH y temperatura (Moal *et al.*, 1991; Wang *et al.* 2002). También por exposiciones a cadmio (den Besten *et al.*, 1991; Thebault *et al.*, 1996; Sokolova *et al.*, 2005). En relación a los peces la bibliografía es relativamente escasa. Se dispone de algunos trabajos en los que se estudió la variación de la CEA asociada a estrés térmico, hipoxia, exposiciones a cobre y carbofuran (Hohreiter *et al.*, 1991; De Boeck *et al.*, 1995; Renshaw *et al.*, 2002; Viant *et al.*, 2003; Werner *et al.*, 2006; Ishibashi *et al.*, 2008).

Metabolismo energético en las células

El ATP representa la "moneda energética" de las células en todos los organismos. Sin embargo, en los tejidos con altos o fluctuantes requerimientos energéticos no existe un sistema sencillo de regulación. Una concentración elevada de ATP como reserva energética inmediata, dejaría a la célula, luego de una hidrólisis masiva, con altos niveles de ADP, P_i y H^+ , acidificando el citosol. En este sentido resulta fundamental una homeostasis energética capaz de mantener estables los niveles de ATP intracelular. Existen dos sistemas enzimáticos importantes a partir de los cuales las reservas de ATP pueden ser regeneradas en forma inmediata. Uno de ellos es el de la adenilato quinasa (AK, por sus siglas en inglés). El sistema de reservas energéticas de adenilatos puede resumirse en la siguiente reacción:

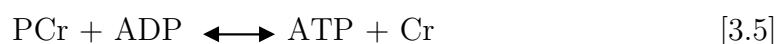


Dicha reacción sintetiza la suma de dos procesos (Ec. 3.3 y 3.4).



La Ec. 3.3 describe la reacción catalizada por la AK y la 3.4 la regeneración de ATP por transporte de electrones, fosforilación; o (en el caso de la reacción inversa) la utilización de ATP en el metabolismo.

Por otro lado, los fosfágenos son compuestos de alta energía y, a la vez, metabólicamente inertes por lo que no interfieren con el metabolismo primario. Uno de ellos es la fosfocreatina (PCr) que junto con la creatina quinasa (CK, por sus siglas en inglés) surgieron en los albores de la evolución eucariota (Bertin *et al.*, 2007) y constituyen el segundo sistema de biosíntesis de ATP. La CK cataliza la reacción reversible:



a partir de la cual puede regenerarse ATP utilizando las reservas de PCr o bien capturar la energía disponible y almacenarla como PCr, en órdenes 10 veces superiores a las reservas de ATP. De esta forma el sistema CK puede estabilizar la [ATP] celular en aproximadamente 3-6 mM dependiendo del tejido, a expensas de mantener elevados los niveles de PCr (Wallimann *et al.*, 2011). Como puede verse en la Figura 3.1 en el interior de la célula los equilibrios PCr/Cr y ATP/ADP se encuentran regulados por una CK citosólica acoplada a las enzimas glicolíticas, aceptando ATP mientras la isoforma mitocondrial de CK se encuentra acoplada al transportador de nucleótidos de adenina el cual también acepta ATP desde la matriz (generado por fosforilación oxidativa). La contribución de ambos compartimentos para la generación de PCr depende de cada tipo celular. Otra fracción citosólica de CK específicamente asociada a sitios de utilización de ATP regenera el ATP utilizado por las ATPasas a expensas de las reservas de PCr.

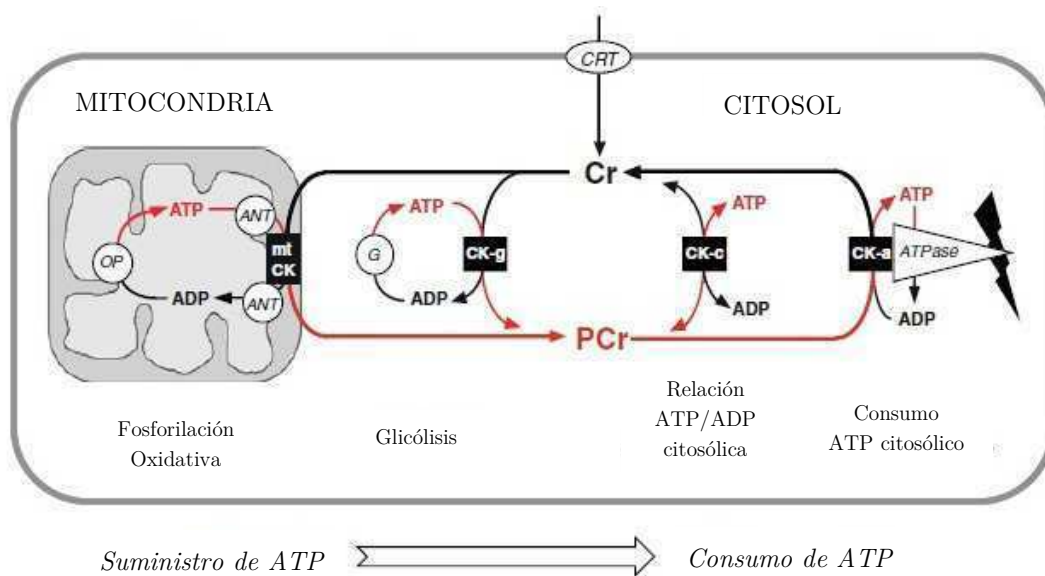


Figura 3.1: Regulación energética en las células por el sistema CK/PCr. CKc: CK citosólica. CKa: CK citosólica asociada a sitios de utilización de ATP. mtCK: CK mitocondrial ANT: Transportador de nucleótidos de adenina. OP: Fosforilación oxidativa. G: Glicólisis.

Ambos sistemas mantienen la homeostasis energética en las células y un análisis del estado energético de un determinado tejido requiere el estudio integral de los niveles de adenilatos, PCr y Cr.

Odontesthes bonariensis como organismo test

Para realizar un análisis a nivel del metabolismo energético en los diferentes tejidos de peces expuestos a glifosato, utilizamos como modelo experimental una especie de mayor talla que las *madrecitas*: *Odontesthes bonariensis*.

El pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, Cuvier y Valenciennes, 1835) es una especie de la familia Atherinidae, se considera originario de lagunas de la provincia de Buenos Aires, Argentina, y probablemente del sur del Brasil (Dyer, 2006; Grosman, 2001). Aunque inicialmente fue considerado como una especie de agua dulce, se sabe que es eurihalina (Tsuzuki *et al.*, 2000; Gómez y Ferriz, 2001). En las lagunas del tipo mesohalinas de la pampasia es una de las especies más abundantes, junto a *Cnesterodon decemmaculatus* y *Jenynsia multidentata*.

En la Figura 3.2 puede observarse un ejemplar de *O. bonariensis*.



Figura 3.2: Ejemplar de *Odontesthes bonariensis*.

Posición taxonómica de Odontesthes bonariensis:

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Sctinopterygii

Infraclase: Teleostei

Orden: Atheriniformes

Familia: Atherinopsidae

Género: *Odontesthes*

Especie: *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835)

Nombre vulgar: pejerrey

A comienzos del siglo pasado comenzaron las primeras experiencias de acuicultura en América latina. En la actualidad este teleósteo presenta relevancia socioeconómica por su pesca comercial y deportiva, y adicionalmente es una especie que resulta promisorio para la acuicultura (Somoza *et al.*, 2008; López y García, 2001).

En varios estudios de toxicidad letal utilizando a *Odontesthes bonariensis* como organismo *test* se reportan valores relativamente bajos de CL₅₀-96h para varios metales pesados y contaminantes orgánicos confirmando la sensibilidad de esta especie a factores ambientales (Carriquiriborde y Ronco, 2006). Recientemente, Pacheco Marino (2011) informó acerca de los impactos tóxicos de agentes químicos utilizados en acuicultura para el control de infecciones en huevos y larvas de *O. bonariensis* durante su desarrollo temprano.

Biomarcadores morfométricos y morfológicos

Al mismo tiempo que el análisis a nivel del metabolismo energético, nos propusimos estudiar otros parámetros que reflejan alteraciones a otros niveles de organización. Los biomarcadores morfométricos y morfológicos pueden ser la resultante integrada de los efectos a nivel celular y tisular. Entre ellos puede destacarse el Factor de Condición (ver capítulo 2). Otros son los índices organosomáticos que proveen una información más específica ya que relacionan la masa de un órgano particular con la masa corporal del individuo, pudiendo mostrar una correspondencia más directa del efecto de la exposición a un tóxico en dicho órgano (que puede ser el sitio de bioacumulación, biotransformación, etc.). El Índice Hepatosomático (IHS) es un parámetro de referencia en los estudios ecotoxicológicos, dado el rol central del hígado en el almacenamiento de reservas energéticas y en la biotransformación de xenobióticos y, considerando su relación con el metabolismo energético abordado en este Capítulo, entendimos que merece atención.

En relación a los parámetros morfológicos, debe señalarse que su alteración puede manifestarse en lesiones internas, externas o patologías cuyos efectos pueden ser fácilmente cuantificables. Tal es el caso, por ejemplo del análisis histológico de tejidos que es un biomarcador útil para evaluar el riesgo potencial en organismos acuáticos expuestos a tóxicos (Schlenk et al., 2008a). Los órganos considerados blancos primarios de los mismos son los que revisten mayor interés en los estudios ecotoxicológicos. Entre las técnicas que recientemente están siendo muy utilizadas, cabe mencionar la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) que demuestra ser útil para observar alteraciones en la estructura de los tejidos blanco (Ferrari *et al.*, 2009).

b) Materiales y Métodos.

i) Determinación de AMP, ADP, ATP, creatina y fosfocreatina.

Los adenilatos (AMP, ADP y ATP), creatina y fosfocreatina fueron determinados por HPLC con columna C18 fase reversa (columna Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 250mm, 5 micrones de tamaño de partícula, Agilent). Se utilizó un equipo Jasco compuesto de tres módulos: Intelligent HPLC Pump Model PU-2089, Intelligent UV detector Model UV-2070/75, e Interface box LC-NetII/ADC (ver Figura 3.3), conectado a una PC con el software ChromPass.



Figura 3.3: Equipo HPLC Jasco con columna C18 fase reversa, utilizado en la determinación de fosfocreatina, creatina, AMP, ADP y ATP en tejidos de *O. bonariensis*.

Las cuantificaciones se efectuaron con las siguientes condiciones: fase móvil conteniendo 35mM NaH_2PO_4 , 6mM tetrabutilamonio, gradiente de la fase

móvil/acetónitrilo 95:5 a 75:25 (ver Figura 3.4). Detección: 210 nm durante 0-10 minutos de corrida y 254 nm a partir de los 10 minutos (Ally y Park, 1992; Werner *et al.*, 2006).

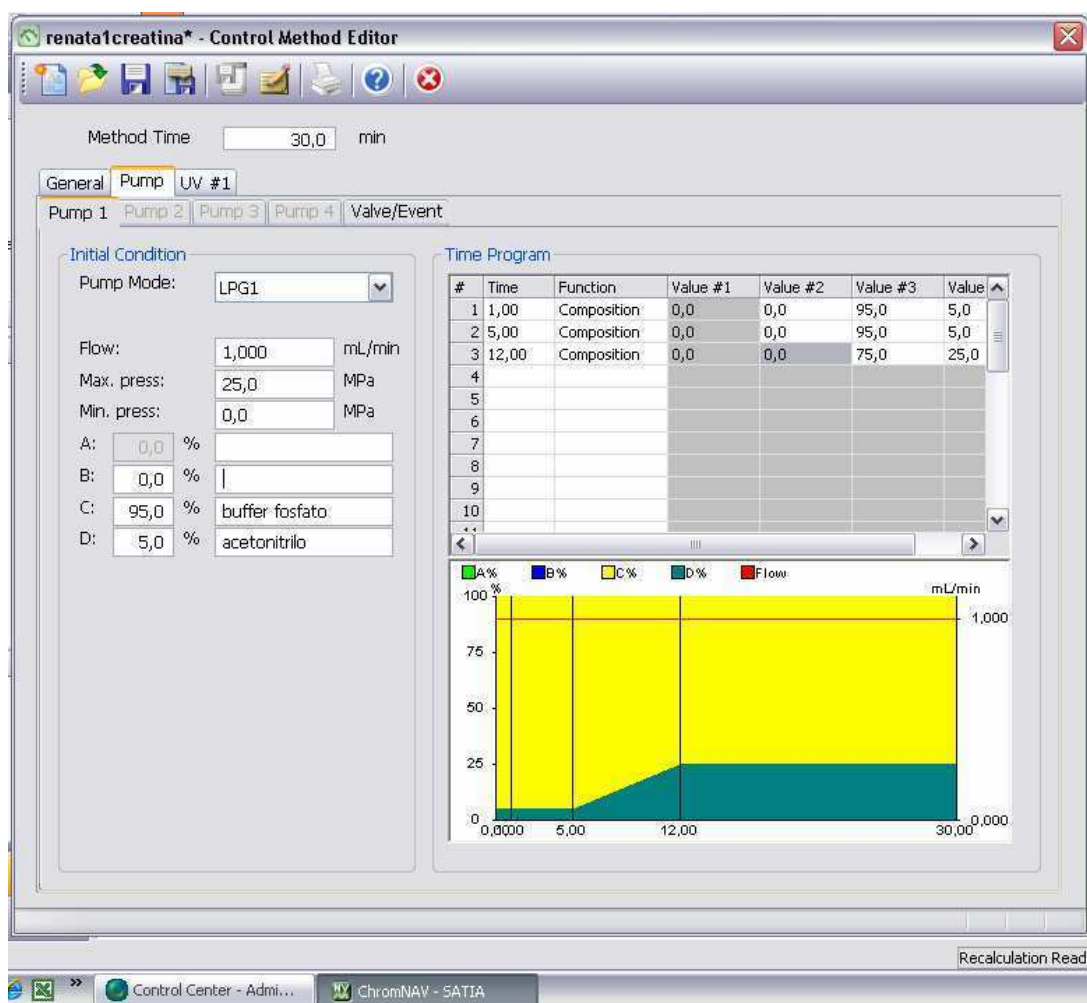


Figura 3.4: Panel que detalla el método utilizado en la corrida por HPLC. Puede observarse en el mismo el flujo y el gradiente de los eluyentes utilizados para la separación de fosfocreatina, creatina, AMP, ADP y ATP.

En las Figuras 3.5 y 3.6 se muestran ejemplos típicos del *set* de cromatogramas correspondientes a diferentes concentraciones de estándares y a muestras de músculo, hígado y cerebro de *O. bonariensis*.

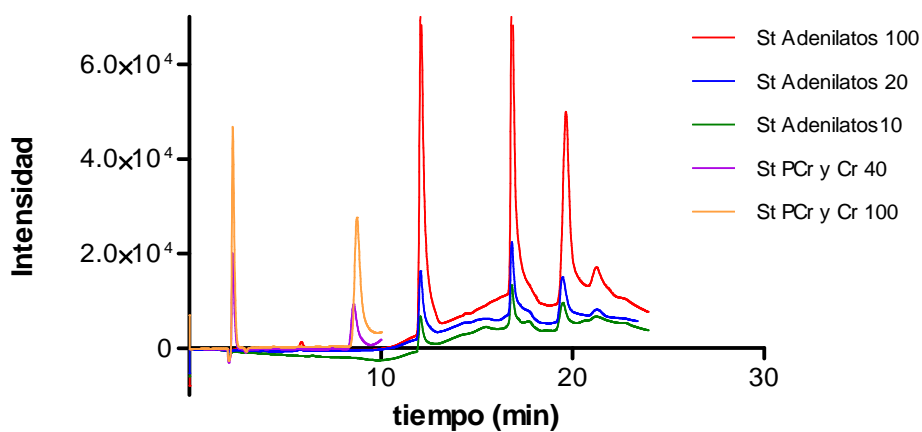


Figura 3.5: Cromatogramas de HPLC correspondientes a multipatrones de AMP, ADP y ATP (10, 20 y 100 μM); y de Cr y PCr (40 y 100 μM).

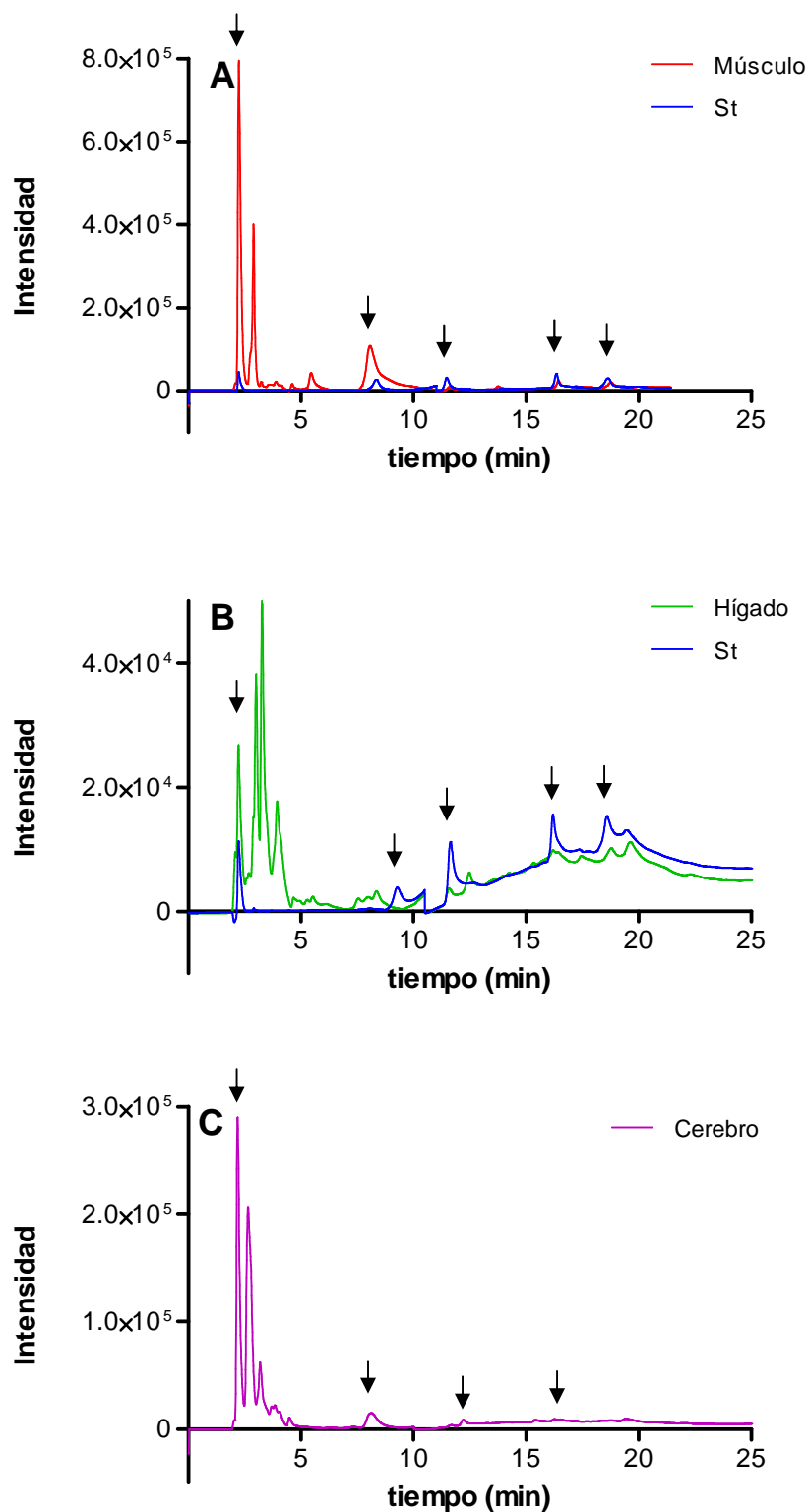


Figura 3.6: Cromatogramas de HPLC correspondientes a muestras de tejidos de *O. bonariensis* y estándares (St). Se señalan los picos de Cr, PCr, AMP, ADP y ATP (en orden creciente de tiempo de retención). A: Músculo. B: Hígado. C: Cerebro.

- ii) Esquema experimental para la exposición crónica de *Odontesthes bonariensis* a un formulado de glifosato.

Se seleccionaron ejemplares del stock de animales criados en forma intensiva en el INTECH Chascomús. Se dispusieron tres tanques de 45x55x60 cm (ancho x alto x profundidad, capacidad: 150 L) en el exterior, con dos aireadores por tanque. Se colocaron pequeños toldos individuales de media sombra para evitar la acumulación de materia orgánica y putrefacción del agua por caída de hojas. En cada uno de los tanques se colocó un volumen de 120 L de agua salobre de napa (15 g.L⁻¹ de salinidad) y 6 ejemplares (4 machos y 2 hembras) de *Odontesthes bonariensis* de 2 años de edad. Luego de 48 h se dio comienzo a la exposición. Para ello se trasvasaron, los peces de cada tanque a otro más pequeño con aireación mientras se incorporaba el volumen del formulado correspondiente (previamente diluido en agua) y se homogeneizó el contenido resultante del tanque antes de volver a colocar los animales. Se realizó el mismo procedimiento con los peces del tanque control en el cual sólo se incorporaron 100 ml de agua, sin herbicida. Los ejemplares se sometieron durante 15 días a dos concentraciones del formulado comercial *Glifosato II*, Atanor, 1 y 10 mg.L⁻¹ equivalentes PMG. El tercer tanque se mantuvo como control.

Diariamente se alimentaron los peces con alimento comercial (6 pellets de 4 mm por tanque). A lo largo del ensayo se monitoreó la temperatura de los tanques y se tomaron muestras del agua al inicio y a tiempo final para determinar la concentración del herbicida.

En la Figura 3.7 se ilustran con algunas imágenes los dispositivos utilizados durante los ensayos.



Figura 3.7: Ensayo de exposición crónica de *O. bonariensis* a un formulado de glifosato. A: Disposición de tanques de 150 L, al momento de inicio de la exposición. B: Grupo de peces retirados de un tanque para adicionar el herbicida. C: Alimento utilizado. D: Laboratorio donde se realiza la disección al finalizar el ensayo.

Al finalizar la exposición, los peces fueron anestesiados en un recipiente conteniendo benzocaína ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Se determinó su longitud (L_T) y peso (P_c) y se procedió a su disección. Para la evaluación de parámetros metabólicos se obtuvieron muestras de hígado, músculo y cerebro que fueron almacenadas hasta su procesamiento a -70°C . También se extrajeron cuidadosamente las branquias que fueron lavadas sucesivas veces con buffer fosfato 0.1 M (pH : 7.2) e inmediatamente fueron fijadas, como se detalla posteriormente, para su observación al MEB.

- iii) Procesamiento de tejidos para la determinación de AMP, ADP, ATP, creatina y fosfocreatina tisular.

Las muestras de músculo e hígado fueron procesadas según Werner *et al.* (2006):

Se pulverizaron en mortero bajo nitrógeno líquido, realizando una extracción con HClO_4 0.4 M (en una relación de 10 ml por gramo de tejido). El sistema fue mantenido en baño con hielo. Luego de 20 minutos se centrifugó 10 min a $9000 g$ y 4°C . El sobrenadante fue inmediatamente neutralizado con K_2CO_3 4 M ($67 \mu\text{l}$ por mililitro de sobrenadante) e incubado en hielo durante 30 min . Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones (en ultracentrífuga Sigma), reservándose el sobrenadante en frío para inyectar en el equipo de HPLC dentro de las 3 hs subsiguientes. Para el hígado se realizó el mismo protocolo pero debido a la baja densidad de este tejido la primera centrifugación se realizó durante 15 min a $15000 g$ y 4°C .

El procesamiento de las muestras de cerebro se realizó según lo descrito por De Boeck *et al.* (1995). La extracción se realizó por homogeneización en HClO_4 0.4 M (1.2 ml por cada cerebro) con equipo Decalab, rotor vidrio-teflón, a $3500\text{-}4000 \text{ rpm}$, realizando 10 golpes por homogenato. Este homogenato fue tratado igual

que el extracto proveniente de la pulverización en mortero de las muestras de músculos: incubación en frío; centrifugación; neutralización; incubación en frío; centrifugación e inyección del sobrenadante en el equipo de HPLC. Ambas centrifugaciones se realizaron a 14000 *g* en una microcentrífuga refrigerada para tubos eppendorf a 4°C durante 10 min.

En cada día de medición se seleccionaron muestras correspondientes a ejemplares de las tres diferentes condiciones experimentales para evitar cualquier sesgo durante el procesamiento o la corrida por HPLC. En cada corrida se inyectaron paralelamente los estándares de creatina, fosfocreatina, AMP, ADP y ATP en el rango 10-50 μM (preparados en agua miliQ).

iv) Cálculo del Índice Hepatosomático (IHS)

En todos los ejemplares se determinó el IHS, calculado como:

$$IHS = \frac{P_{HIG}}{P_C} * 100 \quad [3.6]$$

donde P_{HIG} es el peso (húmedo) del hígado (g) y P_C el peso corporal (g) del pez.

v) Microscopía Electrónica de Barrido de branquias.

Después de la disección, las branquias fueron lavadas con buffer fosfato y fijadas durante 3 h en solución 2.5% glutaraldehído (en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.2). Luego se colocaron nuevamente en buffer fosfato y se realizaron 4 lavados durante las siguientes 48 h. Posteriormente se realizó una deshidratación con alcoholes de graduación creciente, para lo cual se realizaron tres recambios, de 30 min cada uno, por etanol: 10%, 30% y 50%. Finalmente se colocaron en etanol 70% (en el que se conservaron hasta su análisis, renovando periódicamente el etanol 70%).

Las branquias se trasvasaron de etanol 70% a tubos con etanol absoluto, días antes de su análisis, que requiere el secado de las muestras por la técnica de Punto Crítico y el posterior metalizado de las mismas (Sarmiento *et al.*, 2009).

El método de Secado por Punto Crítico se basa en el desplazamiento del etanol por CO₂ líquido en condiciones de alta presión, para luego permitir que este pase a estado gaseoso sin formar interfase líquido/gas (condiciones de presión y temperatura por encima del punto crítico del CO₂). De esta forma se deja a la muestra seca sin que los tejidos colapsen o deformen su estructura original.

Las muestras se fijaron sobre tacos y se metalizaron con oro-paladio en un metalizador Termo VG Scientific SC 7620, para su posterior observación al MEB. Se utilizó un equipo Philips modelo XL30 TMP New Look (ver Figura 3.8) controlado por computadora mediante un software con interfase gráfica. Todas las muestras fueron observadas en condiciones de alto vacío.

El análisis por MEB fue realizado en el equipo del Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN) “Bernardino Rivadavia”.



Figura 3.8: Metalizador Termo VG Scientific SC 7620 (izquierda) y Microscopio Electrónico de Barrido marca Philips modelo XL30 TMP New Look (derecha) utilizados para la observación de branquias de *O. bonariensis*.

vi) Determinación de la concentración de glifosato en los medios de ensayo.

La determinación de PMG por cromatografía iónica se realizó siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 1 [sección 1.b.iii.].

vii) Expresión de resultados y análisis estadístico

Las concentraciones de Adenilatos, PCr y Cr se indican en $\mu\text{moles/g}$ de los tejidos. A partir de los mismos se calcularon el valor de CEA y las relaciones $[\text{PCr}]/[\text{Cr}]$, $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ y $[\text{ATP}]/[\text{PCr}]$. Todas las concentraciones, como los parámetros energéticos y el IHS se expresaron como promedio \pm ESM para cada grupo experimental.

Se realizaron comparaciones entre los grupos control y expuestos utilizando el test de comparaciones múltiples Dunnet, intervalo de confianza 95% (Zar, 1997).

c) Resultados y Discusión

El efecto de la exposición de un formulado de glifosato sobre el metabolismo energético en diferentes tejidos se estudió utilizando como modelo a *Odontesthes bonariensis*. Los peces fueron sometidos a un bioensayo de exposición crónica a *Glifosato II* (Atanor). Los parámetros fisicoquímicos durante el ensayo en los tanques fueron (promedio \pm ESM): O_2 disuelto = $6.2 \pm 0.3 \text{ mg.L}^{-1}$ y $T = 19 \pm 1^\circ\text{C}$ (determinada a las 14 h). No se detectaron diferencias apreciables en estos parámetros entre los tres tanques (control y expuestos a 1 y 10 mg PMG.L^{-1} de formulado).

En la Tabla 3.1 se muestran las concentraciones de adenilatos, PCr y Cr en cerebro. En este tejido los niveles de ATP resultaron no detectables (ND) en

todos los casos, hecho que puede explicar que se obtuvo un valor promedio de CEA bajo (0.37 para los controles) (ver Tabla 3.4). No se observaron variaciones significativas en ninguno de estos parámetros en los dos grupos expuestos al formulado respecto del control.

La concentración total de Adenilatos en los peces control fue 0.040 ± 0.004 , 0.12 ± 0.02 , 0.6 ± 0.1 $\mu\text{moles/gr}$ para cerebro, hígado y músculo respectivamente. Tanto el hígado como el músculo mostraron una mayor concentración de adenilatos que en el cerebro.

En el hígado se obtuvo un aumento significativo del 99% en la [AMP] en los ejemplares expuestos a 10 mg PMG.L^{-1} respecto al control. Consistentemente, el valor de CEA (0.49 para los controles) resultó notablemente menor en los animales expuestos a esta concentración del plaguicida (disminución del 24%), diferencia que resultó significativa respecto al grupo control (ver Tabla 3.2 y 3.5).

El músculo es el tejido que mostró mayores concentraciones de las moléculas más energéticas (ATP y PCr). La [ATP] en este tejido resultó cuatro veces mayor ($0.18 \mu\text{moles/gr}$) a la determinada en hígado, mientras que en cerebro fue ND. Al mismo tiempo se determinó una [PCr] de $8 \mu\text{moles/gr}$; el mismo parámetro fue ND en hígado y 29 veces superior a la del cerebro. Estos resultados confirman la información que registra la bibliografía (van den Thillart y van Raaij, 1995). Por último, la CEA de los controles (0.56) también fue la más elevada en relación a los otros tejidos analizados. Estos resultados son consistentes con los mayores y fluctuantes requerimientos energéticos del tejido muscular. La CEA, al igual que en el hígado, disminuyó significativamente en el grupo expuesto a la mayor concentración del formulado (ver Tablas 3.3 y 3.6).

Tabla 3.1: Efecto de la exposición crónica a un formulado de glifosato sobre las concentración de ATP, ADP, AMP, PCr y Cr en cerebro de *O. bonariensis*. Datos en $\mu\text{moles/g}$ (n = 5-6); ND = no detectable.

Concentración de formulado (PMG mg.L ⁻¹)	ATP	ADP	AMP	PCr	Cr
0 (control)	ND	0.029 ± 0.001	0.011 ± 0.003	0.21 ± 0.04	6 ± 2
1	ND	0.036 ± 0.006	0.018 ± 0.003	0.47 ± 0.13	10 ± 2
10	ND	0.039 ± 0.010	0.014 ± 0.005	0.43 ± 0.16	8 ± 2

Tabla 3.2: Efecto de la exposición crónica a un formulado de glifosato sobre las concentración de ATP, ADP, AMP, PCr y Cr en hígado de *O. bonariensis*. Datos en $\mu\text{moles/g}$ (n = 5-6). * p<0.05 respecto del grupo control; ND = no detectable.

Concentración de formulado (PMG mg.L ⁻¹)	ATP	ADP	AMP	PCr	Cr
0 (control)	0.043 ± 0.009	0.036 ± 0.009	0.043 ± 0.006	ND	0.92 ± 0.03
1	0.043 ± 0.004	0.049 ± 0.014	0.046 ± 0.004	ND	1.25 ± 0.26
10	0.040 ± 0.006	0.037 ± 0.004	0.085 ± 0.013*	ND	1.01 ± 0.08

Tabla 3.3: Efecto de la exposición crónica a un formulado de glifosato sobre las concentración de ATP, ADP, AMP, PCr y Cr en músculo de *O. bonariensis*. Datos en $\mu\text{moles/g}$ (n = 5-6).

Concentración de formulado (PMG mg.L ⁻¹)	ATP	ADP	AMP	PCr	Cr
0 (control)	0.18 ± 0.05	0.33 ± 0.06	0.09 ± 0.01	8.27 ± 1.9	26 ± 2
1	0.16 ± 0.04	0.36 ± 0.05	0.13 ± 0.02	9.95 ± 0.6	29 ± 1
10	0.12 ± 0.02	0.22 ± 0.06	0.14 ± 0.02	6.88 ± 1.4	21 ± 4

Tabla 3.4: Efecto de la exposición crónica a un formulado de glifosato sobre parámetros energéticos (CEA y PCr/Cr) determinados en cerebro de *O. bonariensis*.

Concentración de formulado (PMG mg.L ⁻¹)	CEA	PCr/Cr
0 (control)	0.37 ± 0.02	0.054 ± 0.007
1	0.33 ± 0.03	0.061 ± 0.015
10	0.38 ± 0.03	0.065 ± 0.015

Tabla 3.5: Efecto de la exposición crónica a un formulado de glifosato sobre parámetros energéticos (CEA y ATP/ADP) determinados en hígado de *O. bonariensis*. * p<0.05 respecto del grupo control.

Concentración de formulado (PMG mg.L ⁻¹)	CEA	ATP/ADP
0 (control)	0.49 ± 0.05	1.5 ± 0.3
1	0.48 ± 0.02	1.3 ± 0.3
10	0.37 ± 0.02*	1.2 ± 0.3

Tabla 3.6: Efecto de la exposición crónica a un formulado de glifosato sobre parámetros energéticos (CEA, PCr/Cr, ATP/ADP y ATP/PCr) determinados en músculo de *O. bonariensis*. * p<0.05 respecto del grupo control.

Concentración de formulado (PMG mg.L ⁻¹)	CEA	PCr/Cr	ATP/ADP	ATP/PCr
0 (control)	0.56 ± 0.03	0.32 ± 0.07	0.62 ± 0.20	0.030 ± 0.012
1	0.51 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.45 ± 0.09	0.016 ± 0.003
10	0.48 ± 0.01*	0.31 ± 0.03	0.62 ± 0.10	0.020 ± 0.004

En relación a los niveles energéticos basales determinados en los organismos control, debe señalarse que los mismos son relativamente bajos (principalmente, como era de esperar, en cerebro), y, según lo descrito por Atkinson (1968), corresponden a condiciones en las que los organismos están estresados o en un estado fisiológico sub-óptimo o, incluso, en un estado de estrés grave (en el caso de los resultados obtenidos para el cerebro).

Un valor de CEA menor al óptimo en los animales control podría deberse a que las condiciones de ensayo (ensayo estático, tanques de 150 L) no representan condiciones óptimas para los organismos. Debe considerarse incluso la manipulación, tanto de los animales durante el ensayo como posteriormente de los tejidos, como un factor estresante que pueden afectar la estabilidad de estas moléculas (Vogel, 1993; Pottinger y Calder, 1995). Sin embargo no pueden descartarse otros factores. La bibliografía registra una gran heterogeneidad en los valores de CEA que sugiere que la correspondencia directa entre en los valores de CEA y el estado fisiológico de los organismos requiere un análisis experimental más exhaustivo.

En varios trabajos se han descrito variaciones estacionales en los niveles de CEA en bivalvos (Giesy y Dickson, 1981; Picado *et al.*, 1988; Giesy y Graney, 1989; Moal *et al.*, 1991); crustáceos (Dickson y Giesy, 1982) y otros invertebrados; estas han sido asociadas con el ciclo reproductivo de moluscos y crustáceos. Posteriormente Dehn (1992) determinó en peces la existencia de un patrón estacional en los niveles de adenilatos y fosfocreatina en músculo e hígado de ejemplares de *Lepomis microlophus*. Particularmente en músculo observó un mínimo en los niveles de ATP, PCr y CEA (0.49) durante los meses de invierno y estableció una correlación positiva entre estos parámetros y la temperatura. En

hígado, aunque no se determinaron estas correlaciones con la temperatura, sí pudo establecer un mínimo en los niveles de ATP, PCr y CEA (0.17) en primavera (cuando la temperatura del medio se hallaba en el rango de 23-28°C).

Considerando que nuestro ensayo fue realizado durante la primavera (finales de Noviembre) el factor estacional podría explicar en parte los niveles basales de CEA más bajos de lo esperado.

En cuanto a los niveles de fosfocreatina, proveedora de los grupos fosfato para la síntesis de ATP en la reacción catalizada por la CK, su concentración en músculo esquelético es aproximadamente 10 veces superior a la de ATP; en otros tejidos (músculo liso, cerebro, riñón) es 3-6 veces menor (Nelson y Cox, 2000). Como puede apreciarse en la Tabla 3.1 los valores determinados en el pejerrey indican que la [PCr] resultó 46 veces mayor a la de ATP, lo que sugiere para la PCr un papel crítico en la regulación energética de *O. bonariensis*.

En relación al uso de CEA como biomarcador cabe señalar en primer lugar que existe un número reducido de trabajos en los que se evalúa este parámetro, especialmente en peces. Hohreiter *et al.* (1991) estudiaron los cambios en la CEA de branquias, músculo, hígado y estómago de *Leponis macrochirus* por exposición durante 10 días al insecticida carbofurano, Otros trabajos señalan variaciones en los niveles de ATP en músculo y cerebro en condiciones de hipoxia (Vetter y Hodson, 1982; Renshaw *et al.*, 2002) y cambios en los niveles de adenilatos en respuesta a estrés térmico (Werner *et al.*, 2006). Waiwood *et al.* (1992) reportaron en juveniles de *Salmo salar* cambios en la concentración de adenilatos asociados al pH ambiental.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la exposición a un formulado de glifosato sobre el metabolismo energético en el cerebro, hígado y músculo de *O.*

bonariensis. En el cerebro no se determinó ninguna variación significativa. Por otro lado, tanto en músculo como en hígado se observó una tendencia de disminución de los niveles de ATP y aumento de AMP con la exposición. Sin embargo, estas tendencias sólo resultan significativas en el caso del aumento de AMP en el hígado (ver Tabla 3.2). Para la CEA se determinó una disminución significativa en ambos tejidos. De todos los parámetros energéticos determinados, es de destacar que la CEA resultó el biomarcador de exposición más sensible.

Con respecto a los parámetros morfométricos no se determinaron cambios significativos en el Factor de Condición (K) en los peces expuestos al formulado. Los valores de K (promedios \pm ESM) fueron 0.78 ± 0.05 ; 0.83 ± 0.05 y 0.83 ± 0.04 para los grupos control y expuestos a 1 y 10 mg.L⁻¹ respectivamente.

Por su parte, para el IHS se observó una tendencia de disminución (24-27%) en los peces expuestos al formulado respecto al grupo control (Tabla 3.7).

Tabla 3.7: Índice Hepatosomático (IHS) para *O. bonariensis* en condiciones control o expuesto por 15 días a formulado de PMG (1 y 10 mg.L⁻¹ equivalentes PMG). Datos promedio \pm ESM, n = 5-6

[Formulado]	IHS
0	3.3 \pm 0.8
1	2.5 \pm 0.4
10	2.4 \pm 0.1

Al mismo tiempo es interesante señalar que al evaluar el IHS por sexo se observa que esta disminución se hace más notoria en las hembras: 4.8 ± 1.3 ; 3.6 ± 0.7 y 2.6 ± 0.2 ; mientras que el efecto no se apreció en los machos: 2.3 ± 0.2 ; 2.0 ± 0.2 ; 2.3 ± 0.2 (control, 1 y 10 mg.L⁻¹, respectivamente en ambos casos). Aunque

dichos cambios no fueron estadísticamente significativos, brindaron un indicio de la existencia de efectos negativos del formulado a nivel hepático luego de 15 días de exposición, consistente con la disminución de la CEA determinada en este tejido.

Por otro lado, se examinaron al MEB las branquias de los peces control y expuestos al herbicida. Dichos órganos, cumplen un rol vital para los peces ya que son el sitio de intercambio gaseoso, pero su epitelio también cumple funciones de excreción y osmorregulación (Evans, 1987; Evans *et al.*, 2005). El conocimiento de su morfología y su fisiología resulta de gran importancia ya que estos órganos, junto con los riñones, el hígado y la piel, son considerados como órganos primarios u órganos blanco, útiles para evaluar el efecto de la polución (Wendelaar Bonga, 1997; Bernet *et al.*, 1999). En el caso de las branquias, su extensa superficie (considerando filamentos y laminillas secundarias) en constante exposición al medio circundante y, por lo tanto, a los contaminantes presentes, las convierten en un biomarcador morfológico temprano (Maina, 1998).

En la Figura 3.9 puede observarse las micrografías de branquias correspondientes a ejemplares de *O. bonariensis* en condiciones control. En la imagen superior (A - 30X) se aprecia la morfología general de la branquia con el arco branquial en la base, los filamentos branquiales y las laminillas secundarias. En B se observa con mayor aumento (125X) un filamento con sus laminillas; y en C (1000X) el detalle de una laminilla secundaria. La descripción resulta acorde con la caracterización realizada por Vigliano *et al.* (2006) de la ultraestructura de superficie de las branquias de juveniles de *O. bonariensis* (por MEB y Microscopía Electrónica de

Transmisión) y con la de Díaz *et al.* (2009) para el mismo órgano de *Odontesthes argentinensis* de la Laguna Mar Chiquita. Estos autores describieron que las mismas están formadas por dos sets de cuatro holobranquias, y cada una de ellas esta comprendida de un arco branquial y dos filas de filamentos branquiales y sus laminillas secundarias.

Cabe señalar que al comparar nuestras imágenes de las branquias, se puede apreciar la similitud de su estructura básica con las de otras especies (Low *et al.*, 1988; Torres *et al.*, 2010; Khoshnood *et al.*, 2011).

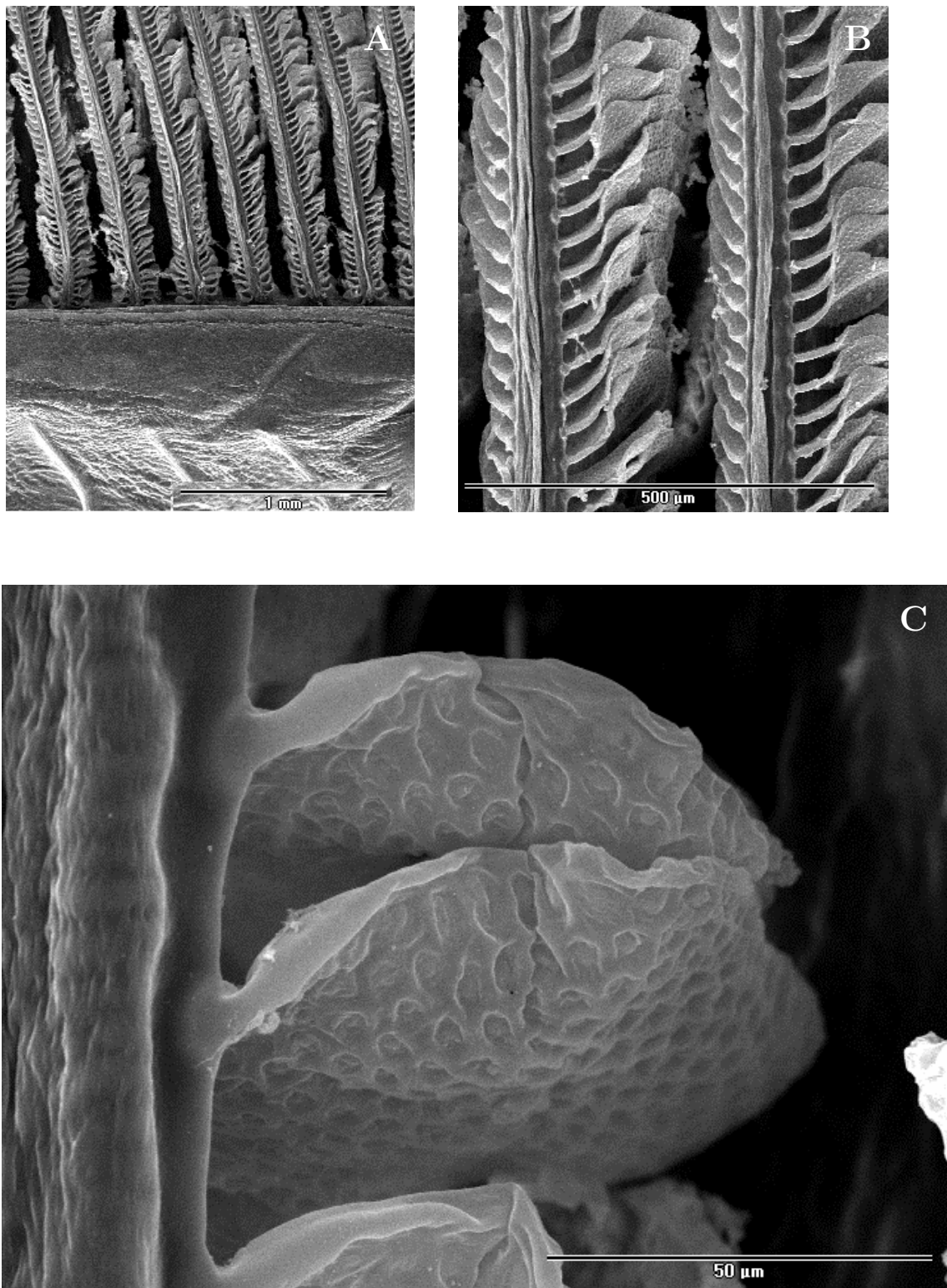


Figura 3.9: Filamentos y laminillas secundarias de branquias de *O. bonariensis* correspondientes a ejemplares control en ensayo de exposición crónica (15 días). A: Vista panorámica (30x); B: Filamento y laminillas (125x); C: Laminilla secundaria (1000x).

En las Figuras 3.10 y 3.11 se muestran las micrografías correspondientes a branquias de los ejemplares que fueron expuestos durante 15 días a 1 y 10 mg PMG.L⁻¹ del formulado de glifosato, respectivamente. En ambos casos se evidencian alteraciones de la estructura branquial, ya en la observación de los filamentos branquiales al menor aumento (30X); las mismas se manifiestan principalmente en la región media de los filamentos. Para el grupo expuesto a mayor concentración del formulado resulta más notorio este efecto en la estructura. Al examinar a mayores aumentos (1000X) las muestras correspondientes al grupo expuesto a 1 mg.L⁻¹, se observan laminillas secundarias intactas y otras parcial o completamente desorganizadas; en el grupo expuesto a la mayor concentración la mayoría de las laminillas secundarias presentan algún grado de desorganización.

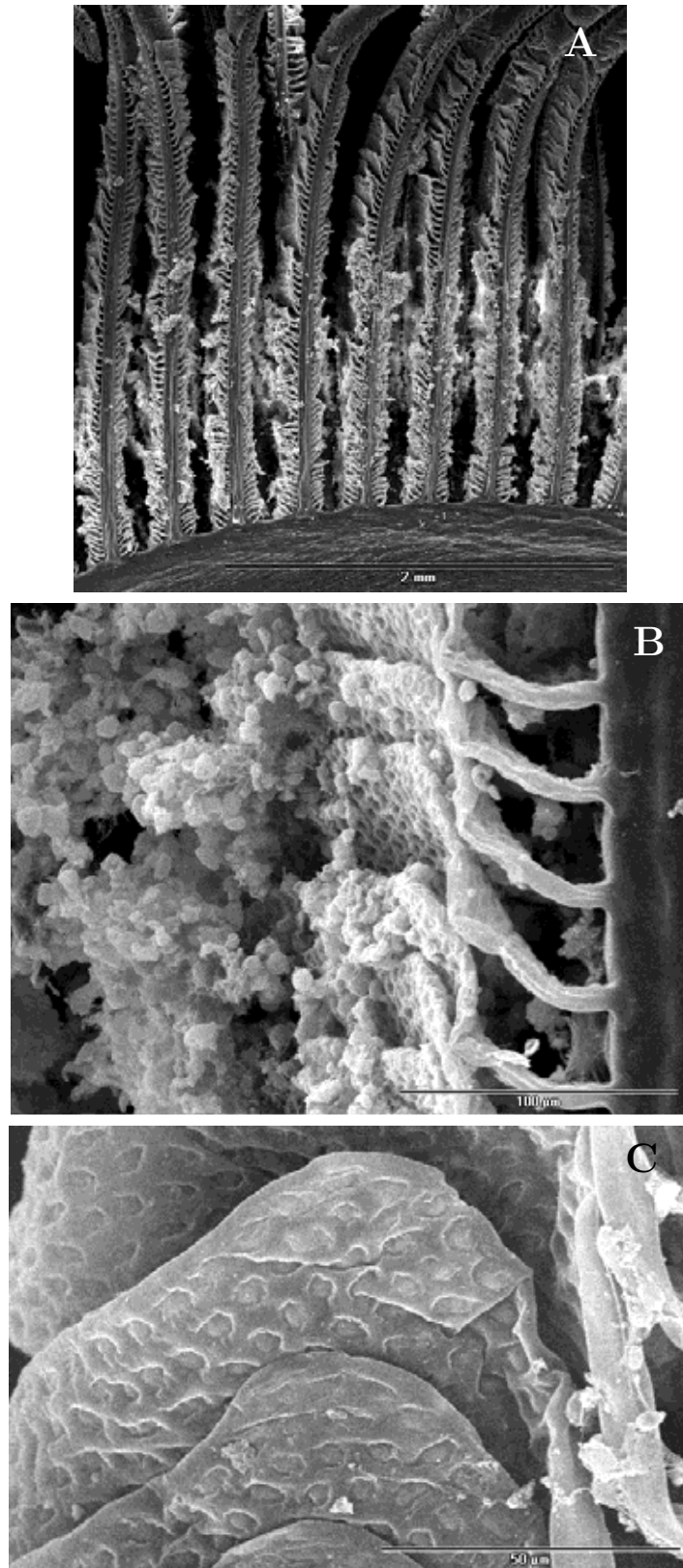


Figura 3.10: Filamentos y laminillas secundarias de branquias de *O. bonariensis*, correspondientes a ejemplares expuestos a una concentración de formulado de 1 mg.L⁻¹ (equivalentes PMG) en bioensayo de exposición crónica (15 días). A: Vista panorámica (30x); B y C: Laminillas secundarias (1000x).

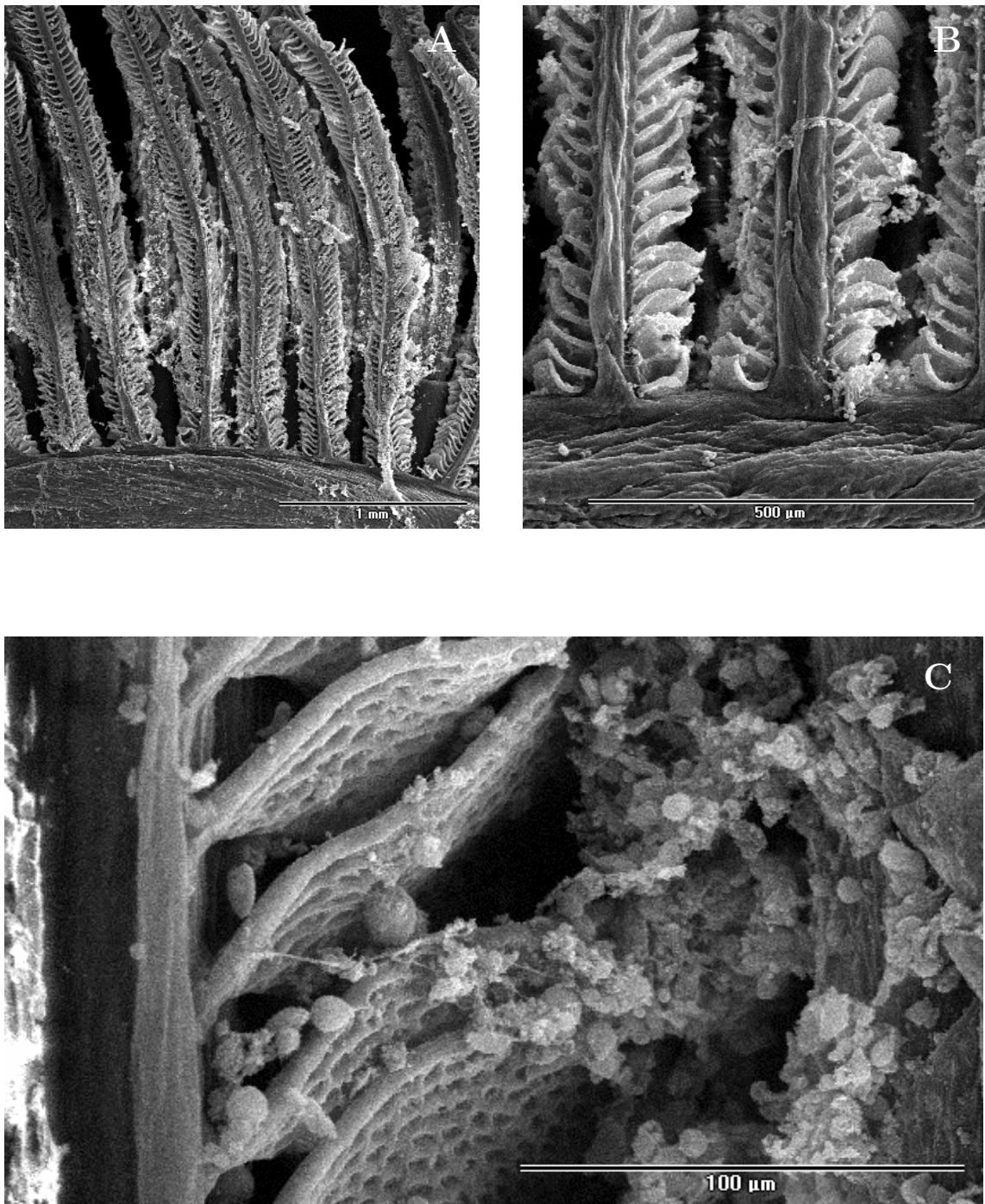


Figura 3.11: Filamentos y laminillas secundarias de branquias de *O. bonariensis*, correspondientes a ejemplares expuestos a una concentración de formulado de 10 mg.L⁻¹ (equivalentes PMG) en bioensayo de exposición crónica (15 días). A: Vista panorámica (30x); B: Filamento y laminillas (125x); C: Laminilla secundaria (1000x).

El análisis de la ultraestructura de las branquias de peces es utilizado ampliamente como biomarcador en estudios de exposición a metales (Giari *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2008; Ferrari *et al.*, 2009) y a otros contaminantes como pesticidas (Johal *et al.*, 2007). Los daños de los filamentos que forman parte de su estructura debido a la exposición a metales, sólidos suspendidos y otras sustancias tóxicas, interfieren con la alimentación, crecimiento y desarrollo del individuo; por lo que puede anticiparse que alteraciones en su funcionalidad pueden tener relevancia ecológica.

En este sentido, estos resultados en relación a los efectos del formulado *Glifosato II* sobre la ultraestructura de las branquias de *O. bonariensis* son los primeros aportes para completar la comprensión de los efectos de este herbicida en relación a un aspecto crítico del funcionalismo del balance gaseoso e hidromineral de los peces, y reafirman la potencialidad del análisis morfológico de las branquias como biomarcador, utilizando la técnica de MEB, en estudios ecotoxicológicos de ambientes acuáticos.

En relación a los efectos del glifosato también se dispone de antecedentes de alteraciones histopatológicas en las branquias de peces por exposición crónica a varios de sus formulados (Domitrovic, 1997; Jiraungkoorskul *et al.*, 2003; Olurin *et al.*, 2006; Albinati *et al.*, 2009; Ortiz-Ordóñez *et al.*, 2011; Hued *et al.*, 2012).

Por último, en relación a la concentración del herbicida en el ensayo, en este caso -a diferencia de los ensayos anteriores- el sistema no fue estable. A los 15 días (t_f) la concentración de PMG resultó no detectable (ND) en el tanque de baja concentración (1 mg.L^{-1} , equivalentes PMG). En el mismo sentido en el tanque con 10 mg.L^{-1} iniciales se observa que la concentración remanente a t_f no supera el

30%. Esta disminución puede deberse a procesos de bioacumulación como también de adsorción a componentes del medio, ya que en este ensayo el material particulado o material en suspensión se ve incrementado por la provisión diaria de alimento.

Capítulo 4

Efectos de un formulado de glifosato sobre parámetros reproductivos y desarrollo embrionario-larval de *Odontesthes bonariensis*.

a) **Introducción.**

Impactos de contaminantes sobre aspectos reproductivos y en el desarrollo de los peces. Motilidad espermática y desarrollo embrionario-larval de *Odontesthes bonariensis*.

Es sabido que determinados compuestos químicos pueden producir impactos negativos sobre las funciones reproductivas y el desarrollo de los peces. Algunos de ellos actúan como desorganizadores endocrinos, e interfieren con el normal equilibrio hormonal que es crucial en la regulación de los órganos reproductivos. Existen estudios que reportan anomalías en el sistema reproductivo de peces machos expuestos a diferentes contaminantes (17 α -etinilestradiol, alquilfenoles, compuestos presentes en efluentes de aguas residuales, entre otros), que incluyen efectos en la producción de espermatozoides, en el desarrollo de la espermatogénesis, atrofia en las células germinales y disminución de la motilidad espermática (Jobling *et al.*, 1996; 2002; Schultz *et al.*, 2003).

Por su parte, algunos metales pesados, como el cadmio, pueden sustituir isomórficamente a otros iones divalentes esenciales y producir un amplio espectro de efectos nocivos sobre tejidos reproductivos, afectar negativamente la gametogénesis e incluso provocar distintas anomalías en el desarrollo embrionario y larval (Thompson y Bannigan, 2008).

En relación al glifosato, Xie *et al.* (2005) estudiaron el potencial estrogénico de cuatro plaguicidas, e informaron que la exposición a glifosato por 7 días no produjo un aumento en los niveles de vitelogenina en juveniles de *Oncorhynchus mykiss*. Se ha reportado que exposiciones crónicas a sus formulados causan un aumento en los niveles de cortisol (respuesta típica post-stress de los peces), un descenso en los niveles de estradiol en hembras de *Rhamdia quelen* y una reducción en el número de alevines viables provenientes de hembras expuestas (Soso *et al.*, 2007). Sin embargo, son escasos los trabajos que hayan analizado los efectos de este herbicida sobre aspectos de la función reproductiva y del desarrollo en peces.

Nuestro trabajo se orientó al estudio de algunos aspectos parciales de la fisiología reproductiva y el desarrollo del pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Este teleósteo presenta fecundación externa y desarrollo indirecto, por lo que es de vital relevancia la calidad de los espermatozoides para alcanzar el oocito y completar el proceso de fecundación. En este sentido debe considerarse que para el pejerrey mantenido en cautiverio se ha descrito una marcada asincronía entre los períodos de desove, con una relativa baja fecundidad (30-40%) (Strüssmann, 1989; Miranda *et al.*, 2006). En el caso de los ejemplares machos, se obtienen bajos volúmenes de esperma (100-200 μ l) para ejemplares de 3-4 años (Strüssmann *et al.*, 1994), una concentración en el rango $3.5-6.5 \cdot 10^9$ espermatozoides/ml (Miranda

et al., 2005) y patrones estacionales en la estructura del epitelio testicular (García Romeu, 1964; Gacía Romeu y Cordero Funes, 1964).

Diferentes factores afectan la motilidad espermática en *O. bonariensis*. Los espermatozoides son inmóviles en el fluido seminal. Sin embargo, adquieren motilidad al diluirse en el agua dulce (4 mOsm.kg⁻¹), mientras que soluciones hiperosmóticas causan una reducción del porcentaje de espermatozoides móviles, por lo que la presión osmótica aparece como un factor determinante de la inducción de la motilidad, así como también la presencia de cationes, especialmente K⁺ (Strüssmann *et al.*, 1994).

Strüssmann *et al.* (1994) desarrollaron un índice numérico, entre 0 y 5, para evaluar y expresar en forma cualitativa la motilidad de los espermatozoides de una muestra de espermatozoides de *O. bonariensis*. El índice toma un valor de 5 cuando la mayoría de los espermatozoides presenta un movimiento rápido, resultando imposible seguir el curso de cualquiera de ellos; y un valor de 0 cuando ningún espermatozoide es móvil. Se ha descrito que las muestras con un índice de motilidad 3-5 son las que poseen capacidad fecundante (Gárriz *et al.*, 2010). En el mismo sentido, varios estudios han reportado que tanto el porcentaje de espermatozoides móviles como su velocidad correlacionan con el éxito reproductivo, por lo que la reducción de estos parámetros podría afectar la fecundidad (Lahnsteiner *et al.*, 1998; Kime *et al.*, 2001; Rurangwa *et al.*, 2004).

Considerando lo antedicho, la motilidad espermática podría proveer un bioindicador sensible y temprano de la polución acuática. En este sentido, existen antecedentes de impactos negativos en la motilidad de espermatozoides por exposición, aún a muy bajas concentraciones, de algunos metales como zinc, cadmio, cobre, plomo y algunos derivados del mercurio (Kime *et al.*, 1996; Cosson

et al., 1999; Lahnsteiner *et al.*, 2004) e incluso a algunos compuestos orgánicos (TBT, nonilfenol, etinilestradiol, DDT, entre otros) (Rurangwa *et al.*, 2002; Hara *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 2009; Marchand *et al.*, 2010).

Recientemente se han desarrollado metodologías para realizar un análisis cuantitativo de la motilidad espermática. Los sistemas CASA (por sus siglas en inglés *Computer Assisted Sperm Analysis*) resultan promisorias herramientas para la evaluación más precisa de la calidad de la muestra de espermatozoides en estudios ecotoxicológicos.

El pejerrey presenta un período reproductivo intenso en primavera en el que están involucradas casi la totalidad de las hembras (más del 90%, muchas de ellas incluso desovan en más de una ocasión durante ese período); otro período de menor intensidad ocurre en otoño donde desova sólo una parte de las hembras (Calvo y Morriconi, 1972). Varios trabajos han descrito las características fisiomorfológicas del desarrollo embrionario y larval del pejerrey (Ringuelet, 1943; Minoprio, 1944; Muñiz Saavedra y Piacentino, 1991; Chalde *et al.*, 2011).

Los huevos de los peces teleósteos son telolecíticos, presentan abundante vitelo y, por lo tanto su segmentación a lo largo del desarrollo es parcial (meroblástica). Están caracterizados por un desarrollo indirecto, reconociéndose tres etapas principales: embrión, larva y juvenil.

El huevo del pejerrey presenta un tamaño de 1.5-2 mm de diámetro, y es transparente, hecho que lo convierte en un excelente material de estudio del desarrollo temprano. Todo su desarrollo embrionario es observable mediante lupa, reconociéndose más de diez estadios diferentes. La larva recién eclosionada presenta unos 6.2-7.6 mm de largo total (Muñiz Saavedra y Piacentino, 1991; Chalde *et al.*, 2011). Chalde *et al.* (2011) determinaron 20 estadios embrionarios

en *O. bonariensis*, desde las primeras divisiones de los blastómeros, la formación de la blástula, la gastrulación (observándose el avance gradual de la epibolia), hasta la etapa de neurulación y organogénesis.

Se ha demostrado que el desarrollo, la determinación sexual, como también varios aspectos de la fisiología gonadal de *O. bonariensis* presenta una fuerte dependencia de la temperatura (Strüssmann, 2010; Chalde *et al.*, 2011). El tiempo de desarrollo, hasta la eclosión, varía de 12 a 18 días según se lo incuba a 21°C o a 15°C (Minoprio, 1944).

En relación a los *test* para evaluar efectos de contaminantes en peces, resulta relevante considerar las características químicas y la frecuencia de liberación al medio de los mismos, factores que determinan el grado de exposición que tendrán los organismos. Pueden plantearse entonces tres escenarios: 1) una sustancia química persistente y/o constantemente liberada al medio, por lo que puede resultar apropiado un test de ciclo de vida completo (*full life-cycle test*); 2) el compuesto es liberado no se bioacumula y es aplicado estacionalmente por lo que puede desarrollarse un test de ciclo de vida parcial (desarrollo, reproducción); y 3) en el caso de mezclas complejas, efluentes en los que se desconoce su composición, los test agudos pueden ser una herramienta poco costosa para realizar un primer acercamiento y a partir de sus resultados realizar el diseño de experimentos más complejos.

En este sentido, considerando las características de los protocolos de uso/aplicación del glifosato y sus características fisicoquímicas, resulta coherente su evaluación utilizando test de ciclo de vida parcial.

El uso de embriones de peces para estudios ecotoxicológicos representa un modelo promisorio, ya que permite la realización de ensayos a pequeña escala cuyos

resultados pueden aportar a la comprensión del mecanismo del tóxico en una etapa sensible como el desarrollo embrionario (Fraysee *et al.*, 2006; Pacheco Marino y Salibián, 2010). Al mismo tiempo, los estudios de toxicidad letal con larvas pueden ser una herramienta complementaria para tener una visión integral de los efectos del tóxico sobre el desarrollo.

b) Materiales y Métodos.

- i) Evaluación de la motilidad espermática. Efectos de la exposición a un formulado de glifosato.

Se seleccionaron ejemplares machos criados en el INTECH Chascomús. Una vez anestesiados en solución de benzocaína (100 mg.L^{-1}) se obtuvieron las muestras de esperma presionando suavemente la región abdominal. Las mismas fueron colectadas con puntas de micropipetas acopladas a una jeringa, teniendo especial cuidado en descartar muestras contaminadas con heces u orina.

La motilidad se determinó en forma cualitativa, según los índices de Strüssman *et al.* (1994); para ello se diluyó $1\mu\text{l}$ de muestra de esperma con agua corriente declorada sobre portaobjetos (activación de la motilidad), realizándose la observación en microscopio a 100X. Cada muestra fue categorizada en un rango de 0-5, de acuerdo a dicha escala:

0. Todos los espermatozoides se encuentran inmóviles.
1. La mayoría está inmóvil; algunos presentan vibraciones laterales.
2. La mayoría se encuentran vibrando o inmóvil; mientras algunos exhiben movimiento progresivo.

3. La muestra presenta tres clases de espermatozoides en proporciones similares:
 - a) los que se mueven rápidamente; b) lentamente o vibran y c) inmóviles.
4. La mayoría de los espermatozoides se mueve rápidamente, mientras que sólo algunos lo hacen lentamente.
5. La mayoría presenta movimiento rápido, siendo imposible seguir el curso de cualquiera de ellos.

Paralelamente se realizó el mismo procedimiento de activación de las muestras utilizando soluciones de PMG y su formulado preparadas con agua corriente declorada. Las concentraciones ensayadas fueron: 1, 10, 50 mg.L⁻¹ (equivalentes de PMG), por triplicado. En cada caso se categorizó la muestra según la motilidad (0-5). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

La motilidad también fue evaluada cuantitativamente utilizando un sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) (Figura 4.1); con el que varios autores han reportado resultados de motilidad espermática en peces (Toth *et al.*, 1995; Fauvel *et al.*, 2010; Murack *et al.*, 2011). Para ello se utilizó una cámara Basler A602fc-2, acoplada a un microscopio Olympus CX41 y a una PC con los programas ImagenJ y VirtualDub (ambos de código abierto, open source) (Wilson-Leedy e Ingermann, 2007). La cámara puede captar 100 imágenes por segundo (100 fps, *frames per second*), las que luego son analizadas para determinar distintos parámetros de motilidad.



Figura 4.1: Equipo de Análisis de espermatozoides asistido por computadora (CASA).

La activación se realizó colocando 1 μl de muestra de esperma en un tubo eppendorf y adicionando 1.9 ml de agua corriente declorada. En el mismo instante de agregado se dio comienzo a la filmación, se tomaron 10 μl del medio con los espermatozoides y rápidamente se colocaron sobre una cámara de Neubauer, ya dispuesta en el microscopio. Luego de colocarse cubreobjetos (previamente tratado con polivinil alcohol, PVA, al 1% en etanol) se ajustó el foco a 100X, y se filmó hasta los 35-40 seg.

En este caso también se realizaron las activaciones con agua declorada (control) o con diferentes concentraciones de formulado (0.5, 1, 10 y 50 mg.L^{-1} , equivalentes PMG). Cada determinación (para cada muestra y tratamiento) fue realizada por duplicado o triplicado en los casos en que el volumen de muestra no era limitante. Se tomaron alícuotas para la posterior determinación de la concentración de PMG y se midió la osmolaridad de las mismas con Osmómetro Vapro.

De cada uno de las filmaciones obtenidas se seleccionaron para el análisis tres secuencias de 100 imágenes (de un segundo cada una) utilizando el Programa VirtualDub. En todos los casos las secuencias correspondieron al tiempo 10-11 seg, 20-21 seg y 30-31 seg de la filmación (equivalente al tiempo post activación). Estas secuencias de un segundo fueron analizados con el Programa ImageJ, luego de *setear* una serie de parámetros específicos para los espermatozoides de *O. bonariensis*.

El Programa permite evaluar los siguientes parámetros de motilidad:

%MOT (Percent motility): *Porcentaje de espermatozoides móviles.*

VAP (velocity average path): *Velocidad promedio.*

VCL (velocity curvilinear): *Velocidad curvilínea.*

VSL (velocity straight line): *Velocidad en línea recta.*

STR (straightness) (%): *Medida de la velocidad curvilínea lateral que surge de la relación VAP/VCL.*

Al mismo tiempo puede extraerse una imagen del recorrido de los espermatozoides durante el segundo analizado (ver Figura 4.2).

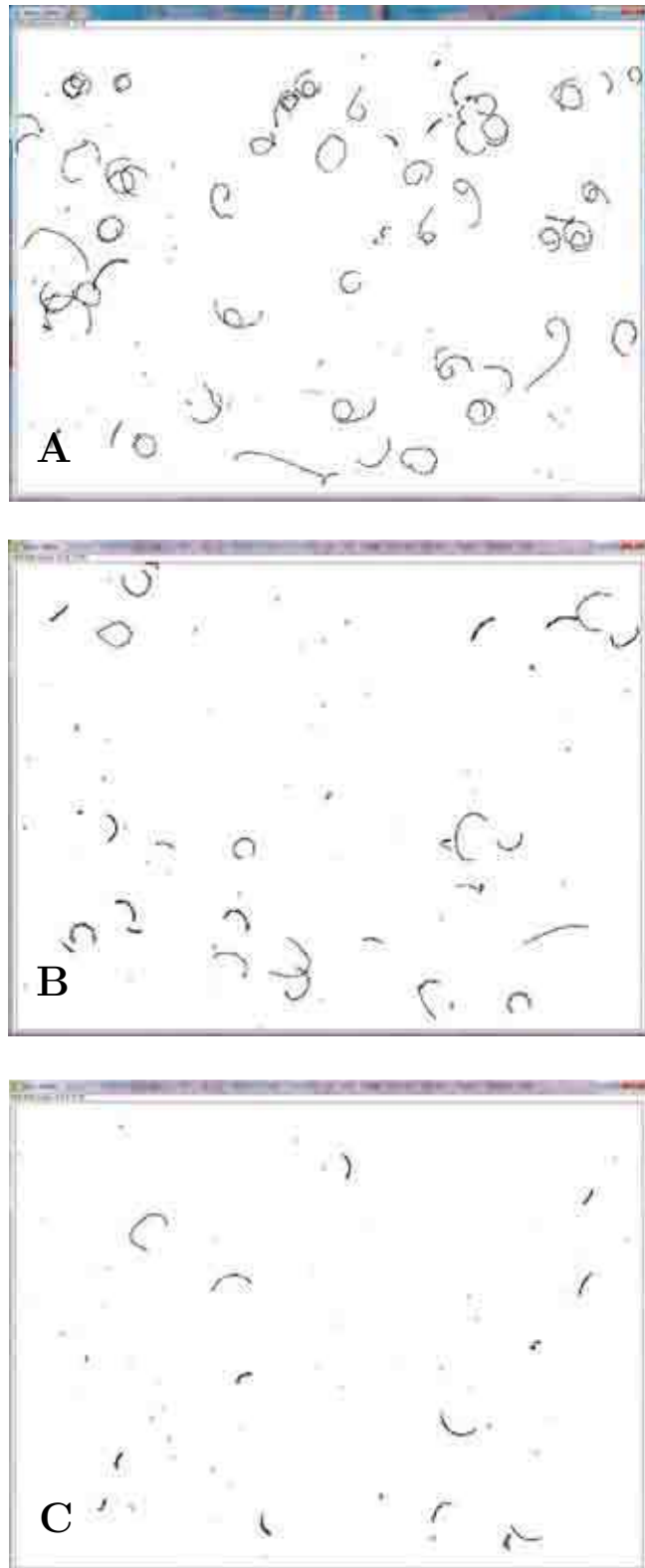


Figura 4.2: Recorridos de los espermatozoides de *O. bonariensis* (controles) registrados por el sistema CASA y analizados por el programa ImageJ. Todas las imágenes representan el recorrido durante un segundo en diferentes tiempos post activación. A: Espermatozoides luego de 10 seg de activación. B: 20 seg postactivación. C: 30 seg postactivación.

- ii) Desarrollo embrionario-larval. Evaluación del efecto de la exposición a un formulado de glifosato.

Los ensayos se realizaron durante la época reproductiva utilizando embriones fecundados obtenidos diariamente de los tanques en los que se crían los pejerreyes en el INTECH. El esquema experimental se realizó simulando un evento de contaminación puntual. Bajo lupa se seleccionaron embriones en los primeros estadios de desarrollo. Los mismos fueron colocados en placas multicubetas (10 embriones por cubeta) en cámara con fotoperíodo y temperatura constantes (12L:12O y 19.5°C). Los embriones fueron expuestos a soluciones del formulado comercial de glifosato (*Glifosato II*) preparadas con agua de salinidad 4-5 g.L⁻¹. Se ensayaron soluciones conteniendo 1, 5, 10 y 50 mg.L⁻¹ equivalentes PMG, por triplicado. Cada 24 h se observaron los embriones presentes en cada unidad experimental, descartando los muertos y registrándose el estadio de cada embrión o los eventos de eclosión.

El criterio de muerte fue el de ausencia de latidos cardíacos. El estadio embrionario fue determinado bajo lupa estereoscópica, según la escala descripta de Chalde *et al.* (2011) (ver Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Desarrollo Embrionario de *O. bonariensis* incubado a 19°C. Estadios según las horas post fecundación (HPF) y características. Fuente: Chalde *et al.*, 2011.

Estadios	Tiempo (post fecundación)/ Característica
<i>Cigoto</i>	
Huevo fecundado	0 h/ Citoplasma libre de vitelo ubicado sobre el polo animal.
Blastodisco	1.5 h/ Primer blastómero sobre el polo animal formando el blastodisco.
<i>Segmentación</i>	
2 células	2 h/ Primera segmentación del blastodisco.
4 células	3 h/ Blastómeros dispuestos en 2X2.
8 células	4 h/ Blastómeros dispuestos en 2X4.
16 células	5 h/ 4 Blastómeros centrales y 12 periféricos.
32 células	6.5 h/ Simetría difícil de observar, no hay división meridional aparente.
64 - 128 células	7.5 h/ Planos de segmentación irregulares. Primera división ecuatorial.
Blástula	8.5 h/ El blastodermo toma forma de domo, con varias capas celulares.
<i>Gastrulación</i>	
25% epibolia	1 d 2 h/ El blastodermo migra al polo vegetativo. Se observa anillo germinal y escudo embrionario.
40% epibolia	1 d 5 h/ Ingresión de células desde el anillo germinal.
90% epibolia	1 d 14 h/ El blastodermo cubre casi el total del vitelo. Se distingue el eje del embrión.
<i>Somitogénesis</i>	
Primordios ópticos	1 d 23 h/ Se distinguen primordios de las vesículas ópticas y vesícula de Kupffer. Inicia somitogénesis.
Primordios óticos	2 d 4 h/ Se distingue los primordios de las vesículas óticas.
Lentes oculares	2 d 15 h/ Se distingue la formación de lentes ópticos. Aumento del número de somitos.
Gota de aceite	3 d 23 h/ Las gotas de aceite se fusionan completamente
Venas vitelinas	4 d 1 h/ Aparición de venas vitelinas y vesículas cerebrales definidas.
Corazón	5 d 11.5 h/ Se forma el corazón y se observa circulación de sangre roja. Hay movimiento muscular.
Pigmentos oculares	6 d 3 h/ Se pigmentan los ojos y se distinguen los bulbos olfatorios, telencéfalo y bulbos ópticos
Aletas pectorales	7 d 2 h/ Aparece la vesícula biliar, primordios de aletas pectorales y melanóforos en el cuerpo.
Vejiga natatoria	9 d 3.5 h/ Aparecen melanóforos cefálicos y la vejiga natatoria.
<i>Eclosión</i>	11 d 5.5 h/ Comienzo de la eclosión

Las soluciones para la renovación diaria de los medios fueron preparadas al inicio del ensayo y mantenidas en la misma cámara en que se dispusieron los embriones.

Al momento de la eclosión las larvas fueron transferidas a otros recipientes con 50 ml de medio fresco con la concentración de formulado, en condiciones de ensayo de punto de no retorno (sin alimentación), reportado en el test de desarrollo temprano (USEPA, 1996). Diariamente se determinó para cada condición experimental el número de individuos muertos, que fueron descartados. En el caso de las larvas, el criterio de muerte fue la ausencia de movimiento y pérdida de reacción ante estímulo. En la Figura 4.3 se ilustran las condiciones del ensayo.



Figura 4.3: Disposición de los huevos y larvas de *O. bonariensis* en cámara durante el ensayo de desarrollo en condiciones control o expuestos a distintas concentraciones de formulado de glifosato. A: Placa multipocillos con huevos, erlenmeyers con larvas eclosionadas y tubos con los medios de recambio. B: Detalle de placa multipocillos. C: Detalle de placa a mayor aumento, donde se distinguen huevos y larvas eclosionadas.

iii) Determinación de la concentración de glifosato en los medios de ensayo.

Tanto en las pruebas de motilidad espermática como a lo largo de los ensayos de desarrollo embrionario y larval se tomaron alícuotas de los medios en los que se llevó a cabo la determinación de PMG siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 1 [sección 1.b.iii.].

iv) Expresión de resultados y análisis estadístico

Para los ensayos de análisis cualitativos de motilidad se determinaron los valores de índice de motilidad promedio \pm ESM para los controles y cada grupo expuesto al formulado. En el caso de los parámetros de motilidad determinados por CASA también se calcularon los valores como promedio \pm ESM.

En el desarrollo embrionario-larval se estimó la edad de los embriones al inicio del ensayo (días post fecundación) y se calculó: % mortalidad diaria acumulada, % supervivencia y % eclosión para cada grupo. Se realizaron los promedios entre réplicas para cada ensayo, y luego entre ensayos. Para las larvas se calculó el % de mortalidad diaria acumulada. Los valores informados resultan el promedio \pm ESM.

Las diferencias estadísticas de motilidad entre el control y los grupos expuestos se analizaron mediante el test de comparaciones múltiples no paramétrico de Dunn. Para el desarrollo embrionario-larval las curvas se compararon por medio de un análisis de dos factores utilizando el test Bonferroni (Zar, 1997).

c) Resultados y Discusión.

Motilidad espermática de *O. bonariensis*.

El análisis cualitativo de los efectos del glifosato sobre la motilidad espermática de *O. bonariensis* no mostró diferencias significativas entre la motilidad en muestras activadas en condiciones control y las realizadas en soluciones con diferentes concentraciones del formulado de glifosato. El índice de motilidad promedio (analizando tres muestras diferentes y cada condición por duplicado) resultó 4.8 ± 0.2 , tanto para el grupo control como para las exposiciones con formulado (1, 5, 10 y 20 equivalentes mg PMG.L⁻¹).

Para un análisis más preciso se procedió a evaluar la motilidad con el sistema CASA.

Considerando el rol de la osmolaridad en la activación de la motilidad se determinó este parámetro en todas las soluciones ensayadas. En la Tabla 4.2 se detallan los valores junto con las concentraciones analíticas de PMG determinadas en cada medio.

Tabla 4.2: Concentración analítica de PMG y osmolaridad de los medios para ensayo de motilidad. Valores promedio \pm ESM (N = 2).

Concentración Nominal	Concentración Analítica	Osmolaridad
<i>(mg PMG.L⁻¹)</i>		<i>(mmol.kg⁻¹)</i>
0	ND	257 ± 1
0.5	0.3 ± 0.1	251 ± 6
1.0	0.8 ± 0.2	255 ± 2
5.0	4.4 ± 0.5	253 ± 1
10.0	8.7 ± 0.2	252 ± 2
50.0	45 ± 5	253 ± 6

Como se aprecia, las concentraciones de PMG resultaron similares a las nominales; además, el agregado de formulado, en las concentraciones utilizadas, no produjo cambios significativos en la osmolaridad de las mismas.

En la Tabla 4.3 se detallan los valores de los parámetros de motilidad obtenidos a partir del programa ImagenJ para muestras activadas en condiciones control o con cuatro concentraciones del formulado de glifosato.

Para los controles, del análisis correspondiente a los primeros instantes de activación (10 seg) se determinó una motilidad promedio del 42% de los espermatozoides; la velocidad curvilínea (VCL) fue de 135; la promedio (VAP) 93 y en línea recta (VSL) 59 ($\mu\text{m}/\text{seg}$). Todos estos parámetros disminuyeron con el transcurso del tiempo (como puede verse al observar el análisis correspondiente a los 20 seg y 30 seg). El STR, en cambio, aumentó a lo largo del tiempo lo que es consistente con la disminución general de la motilidad observada, cuando pasan a prevalecer las vibraciones laterales.

Tabla 4.3: Evolución temporal (10, 20, 30 seg) de los parámetros de motilidad de los espermatozoides de *O. bonariensis* activados en condiciones control y en soluciones de distintas concentraciones de glifosato formulado. %MOT: Porcentaje de espermatozoides móviles; VCL: Velocidad Curvilínea ($\mu\text{m}/\text{seg}$); VAP: Velocidad promedio ($\mu\text{m}/\text{seg}$); VSL: Velocidad en línea recta ($\mu\text{m}/\text{seg}$); STR: Medida de velocidad lateral. Valores promedio \pm ESM (N = 3-4).

Concentración formulado (mg PMG.L ⁻¹)	% MOT			VCL		
	T ₁₀	t ₂₀	t ₃₀	t ₁₀	t ₂₀	t ₃₀
0	42 \pm 8	29 \pm 9	14 \pm 6	135 \pm 7	96 \pm 6	83 \pm 4
0.5	46 \pm 11	37 \pm 6	10 \pm 3	132 \pm 7	93 \pm 10	97 \pm 9
1	46 \pm 11	37 \pm 13	20 \pm 10	145 \pm 5	96 \pm 5	81 \pm 2
10	46 \pm 11	41 \pm 13	23 \pm 9	143 \pm 10	97 \pm 5	81 \pm 2
50	48 \pm 16	36 \pm 14	25 \pm 13	135 \pm 12	100 \pm 13	82 \pm 13

Concentración formulado (mg PMG.L ⁻¹)	VAP			VSL			STR		
	t ₁₀	t ₂₀	t ₃₀	t ₁₀	t ₂₀	t ₃₀	t ₁₀	t ₂₀	t ₃₀
0	93 \pm 9	49 \pm 5	37 \pm 3	59 \pm 11	36 \pm 4	29 \pm 1	0.62 \pm 0.07	0.74 \pm 0.08	0.80 \pm 0.06
0.5	91 \pm 13	49 \pm 11	40 \pm 5	62 \pm 18	38 \pm 12	34 \pm 8	0.67 \pm 0.10	0.76 \pm 0.07	0.83 \pm 0.10
1	99 \pm 7	53 \pm 5	35 \pm 3	65 \pm 10	36 \pm 5	28 \pm 1	0.65 \pm 0.07	0.70 \pm 0.10	0.80 \pm 0.06
10	98 \pm 8	59 \pm 3	36 \pm 1	56 \pm 8	37 \pm 5	28 \pm 1	0.57 \pm 0.05	0.64 \pm 0.08	0.78 \pm 0.06
50	94 \pm 13	58 \pm 11	37 \pm 5	53 \pm 9	41 \pm 8	32 \pm 4	0.57 \pm 0.08	0.71 \pm 0.08	0.86 \pm 0.05

Al evaluar los efectos de la exposición al formulado durante la activación, para ninguno de los parámetros analizados pudo determinarse diferencias significativas con el grupo control, en todo el rango de concentraciones ensayadas.

Desarrollo embrionario y larval de *O. bonariensis*.

Como se detalló previamente, el estudio de las fases iniciales del desarrollo de *Odontesthes bonariensis* se realizó mediante un ensayo semiestático, a temperatura y fotoperíodo constantes (19.5°C y 12L:12O). En condiciones control los embriones mostraron una supervivencia del $68 \pm 2\%$. La mortalidad resultó 0% en el transcurso de los primeros 9 días post fecundación (dpf). Al llegar a los 10.5 dpf se observó la primer diferencia significativa en la curva de eclosión respecto al tiempo inicial ($p < 0.01$), y entre los 10-12.5 dpf se determinó la eclosión del 68% de los huevos. Este valor fue el máximo de eclosión acumulada, resultando a tiempo final (día 13.5) una mortalidad acumulada del $32 \pm 2\%$ (ver Figura 4.4).

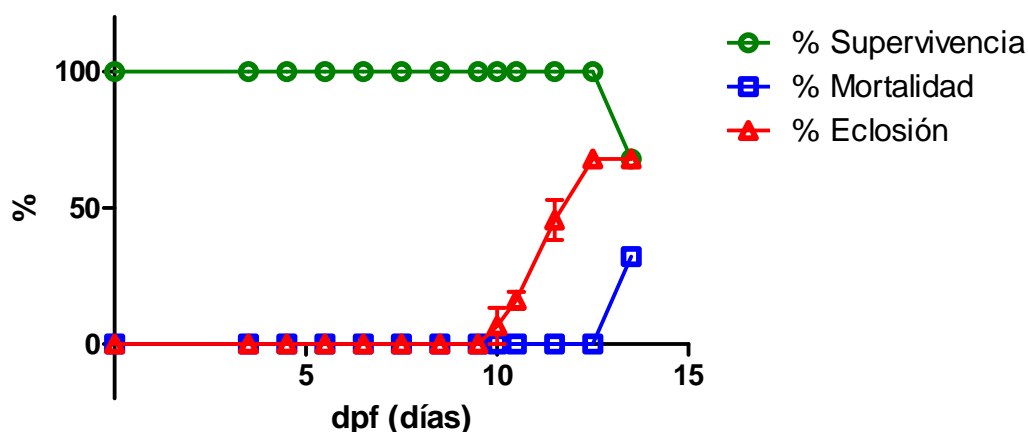


Figura 4.4: Desarrollo embrionario de *O. bonariensis* a lo largo del tiempo en condiciones control. Los huevos fueron mantenidos en multipocillos (10 por huevos por pocillo) a temperatura y fotoperíodo constantes. Se grafica el porcentaje de supervivencia, mortalidad y eclosión acumulada promedio por pocillo ($N = 3$). dpf = días post fecundación.

En la figura 4.5 se detallan los estadios mayoritarios observados a lo largo del tiempo. Al inicio la blástula, luego entre el día 1-2 pudo apreciarse el proceso de epibolia con la aparición del eje embrionario y el esbozo de notocorda. Luego, el desarrollo de la somitogénesis. Entre los 2-3 días se observaron los primordios ópticos y a partir del día 5 los mismos comenzaron a tornarse pigmentados y pudo apreciarse claramente el corazón latiendo y las venas vitelinas. A partir del día 7 no se observaron grandes cambios hasta el momento de eclosión, los ojos completan su pigmentación, la cola sobrepasa la cabeza y el embrión muestra los primeros movimientos.

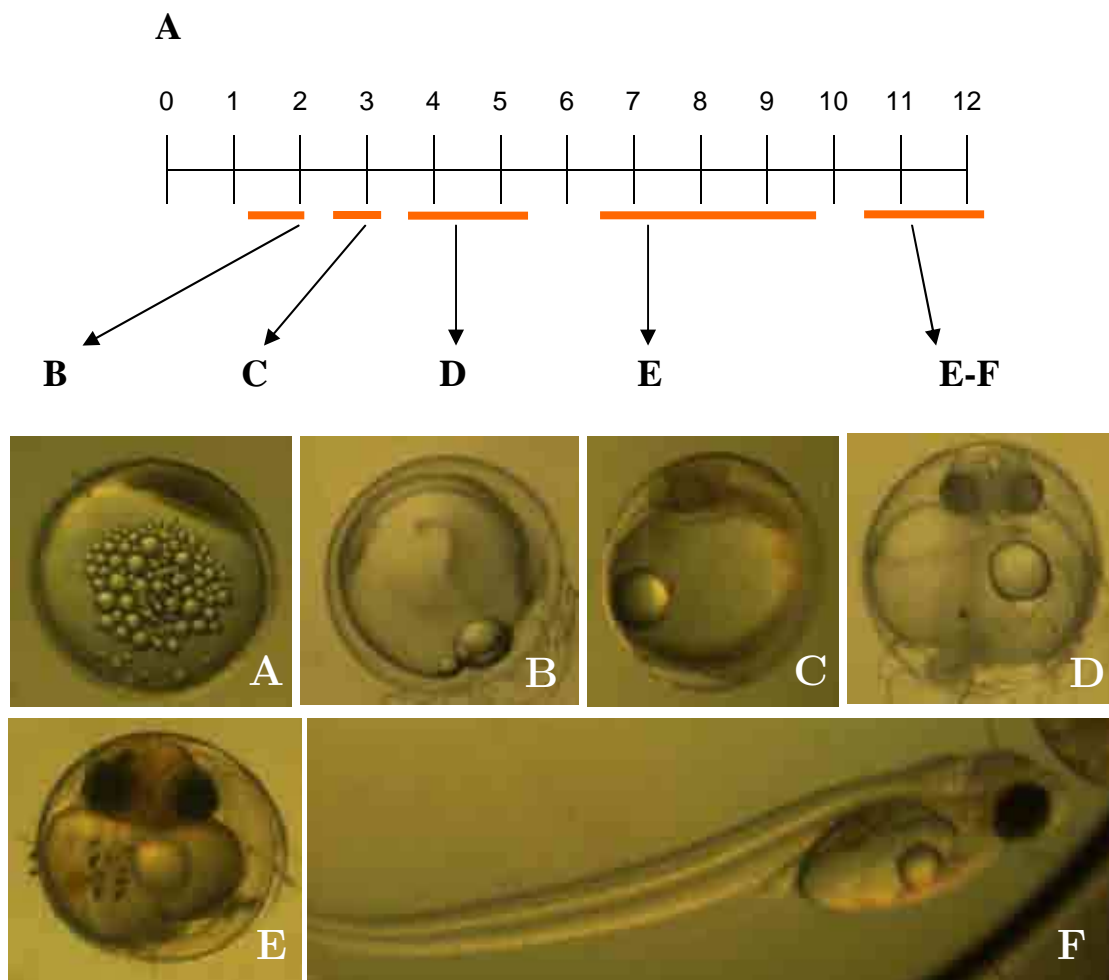


Figura 4.5: Estadios más representativos a lo largo del desarrollo embrionario. Se detallan algunos de los estadios observados en relación a la línea temporal (días post fecundación).

Para estudiar los efectos del formulado comercial, los embriones de los primeros estadios se expusieron a cinco medios (equivalentes a 0, 1, 5, 10, 50 mg PMG.L⁻¹) en las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo. Como se aprecia en las Figuras 4.6 y 4.7 no existieron diferencias en el desarrollo de los embriones expuestos al formulado de glifosato con respecto al control (supervivencia-mortalidad, tiempo de desarrollo y porcentaje acumulado de eclosión).

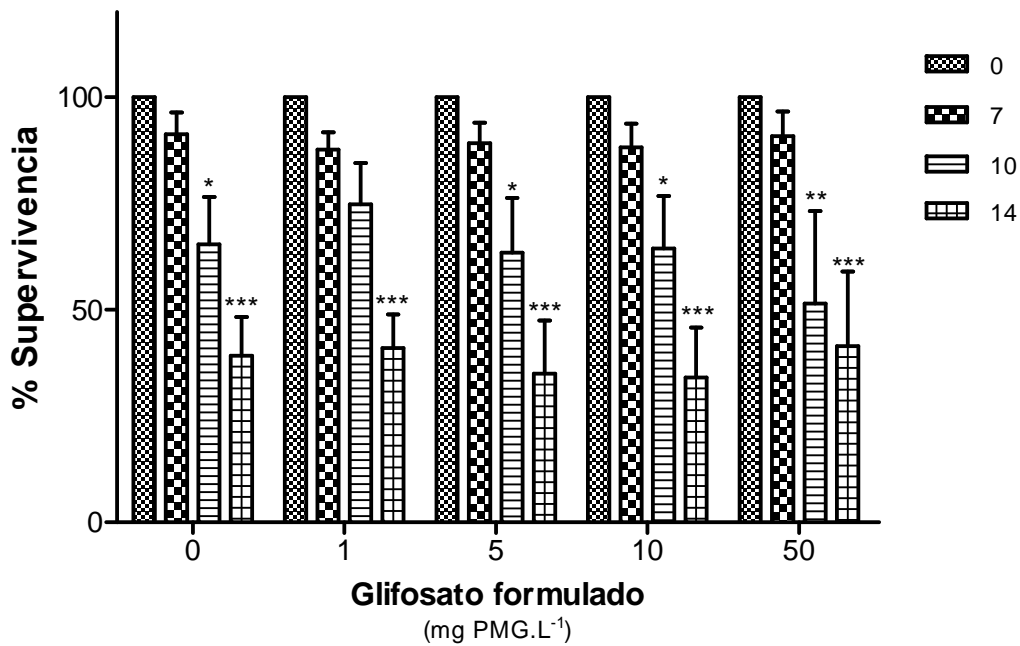


Figura 4.6: Porcentaje de Supervivencia acumulada en el desarrollo embrionario de *O. bonariensis* (controles y expuestos a distintas concentraciones de formulado de glifosato). Se grafica el porcentaje de supervivencia promedio por pocillo en función del tiempo (0, 7, 10 y 14 días post fecundación), barras de ESM, N = 8. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al t₀ de cada grupo (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

El ANOVA de dos factores constató estas conclusiones. En el caso de la supervivencia la comparación entre diferentes tratamientos (concentraciones de formulado y control) para cada uno de los tiempos, determinó la ausencia de diferencias significativas. En el análisis entre los diferentes tiempos estudiados, respecto del inicial, se determinaron diferencias significativas a partir de los 10

dpf en el caso de los tratamientos 0, 5, 10 y 50 mg PMG.L⁻¹; mientras que para los 14 dpf las diferencias respecto a t₀ resultaron significativas para todos los grupos (p<0.001).

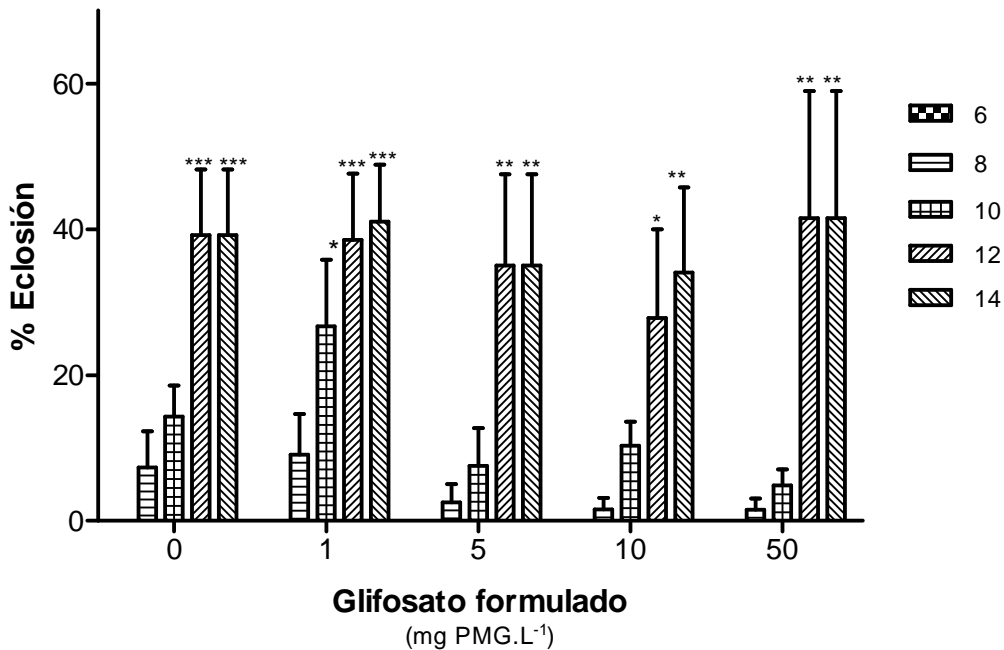


Figura 4.7: Porcentaje de Eclosión en el desarrollo embrionario de *O. bonariensis* (controles o expuestos a distintas concentraciones de formulado de glifosato). Se grafica el porcentaje de eclosión promedio por pocillo en función del tiempo (0, 6, 8, 10, 12 y 14 días post fecundación) con sus barras de ESM, N = 8. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al t₀ de cada grupo (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

Con respecto al porcentaje de eclosión los resultados fueron semejantes. En el análisis entre los diferentes tiempos estudiados, respecto del inicial, el ANOVA de dos factores evidenció a partir de los 10 dpf, en el caso de la concentración de 1 mg PMG.L⁻¹, diferencias significativas respecto al tiempo inicial (p<0.05), las cuales no se registran a tiempos menores en ningún caso. Posteriormente, para los 12 dpf las diferencias resultaron significativas para todos los grupos. Por otra parte, al igual que en el caso de la supervivencia, para la eclosión se determinó la

ausencia de diferencias significativas en la comparación entre diferentes tratamientos (concentraciones de formulado y control) para cada uno de los tiempos. La eclosión acumulada (%) al tiempo final fue de 39 ± 9 ; 41 ± 8 ; 35 ± 13 ; 34 ± 12 ; 42 ± 17 para 0, 1, 5, 10 y 50 mg PMG.L⁻¹ (formulado) respectivamente.

En relación a los estadios embrionarios no pudo distinguirse ningún cambio en los estadios preponderantes en cada observación, descartándose que el herbicida afecte la velocidad, por aceleración o retardo, del desarrollo.

Las concentraciones del herbicida en las soluciones de ensayo a tiempo inicial (Tabla 4.4) no variaron respecto de las nominales.

Tabla 4.4: Concentración analítica de PMG en los medios del ensayo de exposición de embriones a un formulado de glifosato correspondiente a t_0 . Valores promedio \pm ESM (N = 3). ND = No Detectable.

Concentración Nominal	Concentración Analítica
<i>(mg PMG.L⁻¹)</i>	
0	ND
1	0.947 ± 0.002
5	4.68 ± 0.04
10	9.3 ± 0.1
50	47 ± 2

Como se observa en la Figura 4.8, a pesar de tratarse de un ensayo de exposición crónica, las concentraciones de PMG en el formulado no variaron a lo largo del tiempo. Las bajas pendientes de las regresiones determinadas explicarían variaciones menores al 10% de las respectivas concentraciones. Inclusive, del

análisis de regresión surge que ninguna de las pendientes es significativamente distinta de cero.

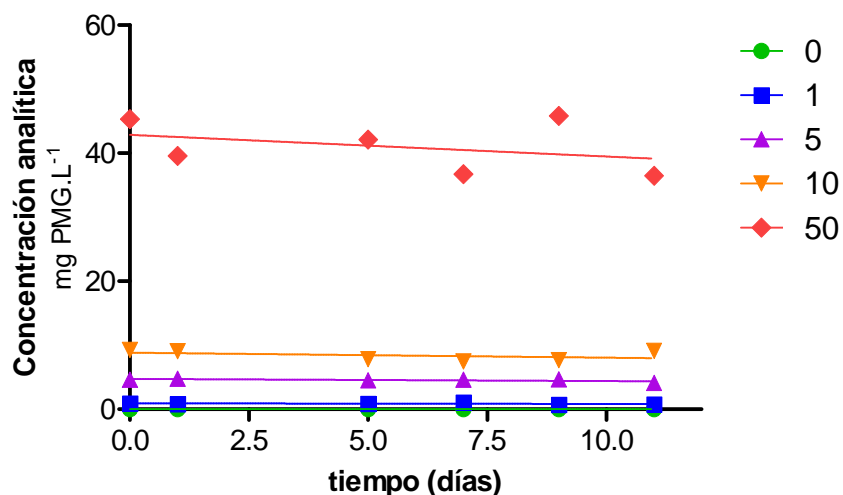


Figura 4.8: Concentración analítica de PMG a lo largo del tiempo en los medios de ensayo de exposición de embriones al formulado de glifosato. Se grafica la regresión lineal para cada concentración.

En relación al desarrollo de las larvas se evaluó la mortalidad a lo largo del tiempo en condiciones de ensayo de Punto de No Retorno (sin alimentación).

En el primer ensayo, realizado en condiciones *control*, se observó aproximadamente la mortalidad del 50% de las larvas para los 7 días de edad promedio (días post eclosión, dpe), completándose el 100% de mortalidad a los 10 dpe (Figura 4.9).

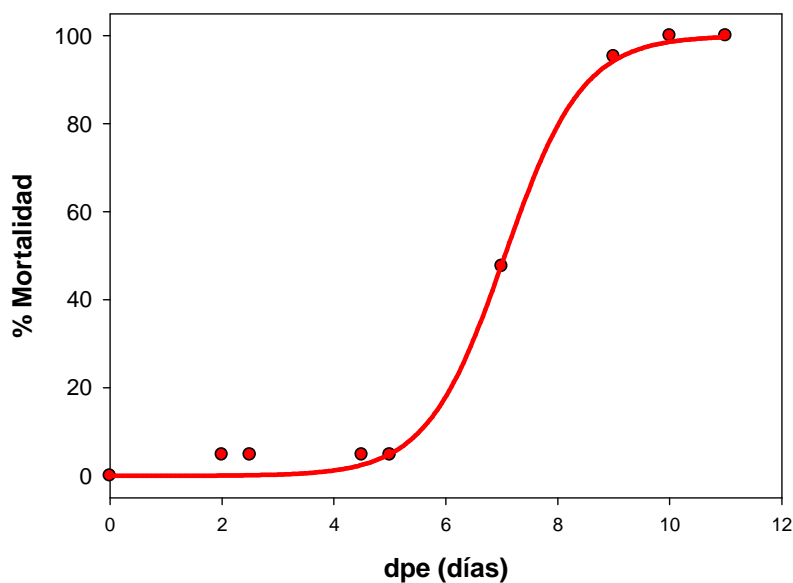


Figura 4.9: Mortalidad de larvas de *O. bonariensis* en condiciones control a lo largo del tiempo. Se grafica el porcentaje de mortalidad acumulada a lo largo del tiempo (dpe, días post eclosión), n = 21.

Sin embargo, al evaluar los efectos de la exposición al formulado de glifosato sobre la mortalidad, pudo observarse una notable disminución en el tiempo de supervivencia máxima, que varió entre 10 días (grupo control) y unas pocas horas (exposición a 50 mg PMG.L⁻¹) (Tabla 4.5).

En la Figura 4.10 se grafican a modo ilustrativo las curvas para el control y los grupos expuestos. El ANOVA de dos factores evidenció que estas diferencias resultan significativas sólo para la mayor concentración, que se diferencia estadísticamente del control entre los 0.25 y 4 dpe ($p < 0.01$ en todos los casos). Sin embargo, en la gráfica como a tiempos iniciales las curvas para las mayores concentraciones de formulado (10 y 50 mg PMG.L⁻¹) presentan mayor mortalidad que el control. Aunque esta tendencia no resultó significativa para 10 mg PMG.L⁻¹ esto podría atribuirse a la dispersión de los datos obtenida al promediar varios ensayos.

Tabla 4.5: Mortalidad de larvas de *O. bonariensis* en condiciones control y expuestas a diferentes concentraciones de formulado de glifosato a lo largo del tiempo. Cada valor representa el porcentaje de mortalidad acumulada promedio \pm ESM, de tres ensayos para rangos temporales. dpe = días post eclosión.

% Mortalidad larval				
dpe (días)	Concentración de formulado (mg PMG.L ⁻¹)			
	0	1	10	50
0.0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
0.25	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	69 \pm 31
0.50	8	5	20	100
1.0			43 \pm 17	100 \pm 0
2.0	25	16	56 \pm 24	100 \pm 0
4.0	36 \pm 31	50 \pm 17	69 \pm 11	100 \pm 0
6.0	72 \pm 22	75 \pm 21	85 \pm 8	100 \pm 0
8.0	85 \pm 15	98 \pm 2	97 \pm 3	100 \pm 0
9.5	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
10.0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0
n	37	33	29	28

n = número de larvas utilizadas por tratamiento

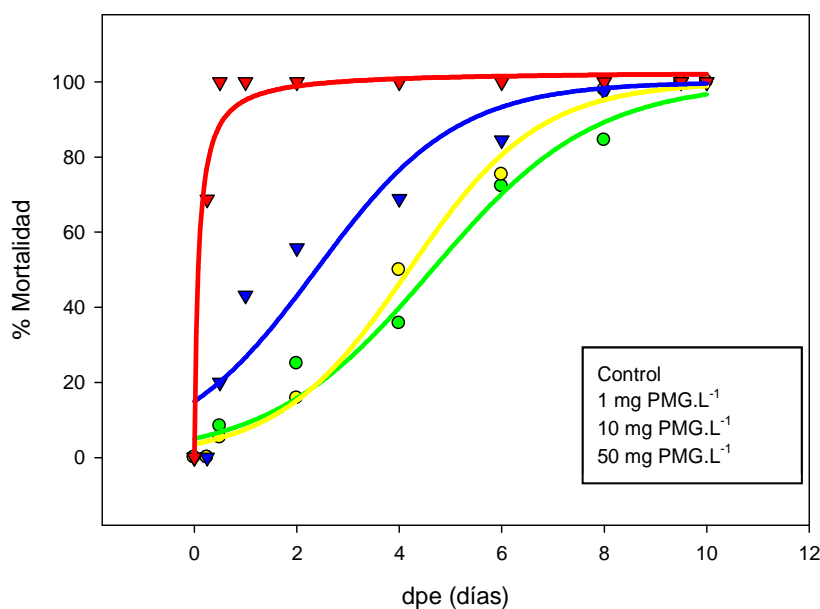


Figura 4.10: Mortalidad de las larvas en condiciones control (0) y expuestas a distintas concentraciones de formulado de glifosato. Se grafica el porcentaje de mortalidad acumulada promedio \pm ESM, de tres ensayos a lo largo del tiempo y las curvas sigmoideas que mejor ajustan a dichos valores para 0, 1 y 10 mg PMG.L⁻¹, y logarítmica en el caso de 50 mg PMG.L⁻¹.

Las concentraciones analíticas del herbicida en las soluciones ensayadas al inicio de la exposición de las larvas se muestran en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6: Concentración analítica de PMG en los medios del ensayo de exposición de larvas a formulado de glifosato correspondiente a t_0 . Valores promedio \pm ESM (N = 2). ND = No Detectable.

Concentración Nominal	Concentración Analítica
<i>(mg PMG.L⁻¹)</i>	
0	ND
1	0.87 \pm 0.03
5	4.66 \pm 0.02
10	9.7 \pm 0.1
50	53 \pm 2

Los resultados de este Capítulo permiten afirmar que la exposición al formulado comercial de glifosato utilizado en los ensayos no produjo efectos significativos observables sobre la motilidad espermática. Tampoco durante el desarrollo embrionario en relación a la mortalidad, % eclosión y tiempo de desarrollo.

Sin embargo, al evaluar la mortalidad de las larvas, en condiciones de punto de no retorno, se observó una mayor mortalidad, con la consiguiente disminución del tiempo de vida que llega a ser de unas pocas horas en el caso de la larvas expuestas a la mayor concentración de formulado utilizada.

Estos resultados ponen en evidencia que, en las condiciones del ensayo, el desarrollo larval de *Odontesthes bonariensis* se ve afectado significativamente por la exposición al producto comercial *Glifosato II*, y estarían indicando una mayor susceptibilidad durante la etapa final del desarrollo temprano.

En relación a los efectos del glifosato sobre el desarrollo embrionario-larval existen antecedentes en distintas especies. En huevos de erizos de mar se ha determinado que el glifosato deteriora los puntos de control del ciclo celular asociados a la reparación del ADN (Marc *et al.*, 2002) y el glifosato y su principal metabolito (AMPA) alteran la transcripción en los embriones (Marc *et al.*, 2005) afectando el desarrollo embrionario (Le Bouffant *et al.*, 2007). Por otro lado, los estudios en relación al efecto de estresores ambientales sobre el desarrollo y la supervivencia de anfibios están en aumento, dada la preocupación por el fenómeno de decrecimiento de sus poblaciones, la prevalencia de malformaciones, e incluso su incremento en las listas de especies amenazadas o en peligro (Houlahan *et al.*, 2000). Varios autores han reportado un aumento de la mortalidad de larvas por exposición a sus formulados, como la existencia de efectos subletales (Chen *et al.*, 2004; Edginton *et al.*, 2004; Howe *et al.*, 2004; Wojtaszek *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2009; Lajmanovich *et al.*, 2013), con un valor de CL₅₀-96h promedio para las 13 especies reportadas en estos trabajos de $2.3 \pm 0.3 \text{ mg.L}^{-1}$ (equivalentes PMG). En un estudio realizado en mesocosmos, Relyea (2005b) estableció la muerte del 96-100% de las larvas de tres especies de anfibios, luego de tres semanas del agregado de Roundup por aspersión. Asimismo, Edginton *et al.* (2004) determinaron la CL₅₀-96h de un formulado de glifosato (Vision) para embriones y larvas de cuatro especies de anuros; y pudieron establecer en todos los casos un aumento de la sensibilidad (entre 1.5 y 8.9 veces mayor) de las larvas en relación a los embriones, tendencia consistente con los resultados obtenidos en el presente trabajo para *O. bonariensis*.

Sin embargo, debe señalarse que los efectos de plaguicidas sobre el desarrollo temprano no han sido suficientemente estudiados en el caso de los peces. Puede citarse el trabajo de Stehr *et al.* (2009) en el que evalúan los efectos de seis

herbicidas (picloram, clopiralida, imazapic, glifosato, imazapir y triclopir) sobre el desarrollo de *Danio rerio* (*zebrafish*). Luego de la exposición a glifosato (en un rango de concentraciones de 0.003 a 10 mg.L⁻¹) durante 5 días desde la etapa embrionaria, no observaron diferencias con el grupo control al evaluar el porcentaje de larvas con anatomía normal y su talla. En este sentido, los resultados presentados en este trabajo son un aporte a los antecedentes acerca de los efectos del glifosato sobre las etapas tempranas del desarrollo de los peces.

Capítulo 5

Discusión General y Conclusiones

Uno de los objetivos planteado en este trabajo fue abordar aspectos ecotoxicológicos asociados a la expansión de la frontera agrícola, que se ha desarrollado de la mano del paquete tecnológico que involucra la siembra directa, la introducción de cultivos genéticamente modificados y el uso masivo de productos fitosanitarios (fertilizantes y plaguicidas). En particular se estudió el herbicida más utilizado en la actualidad en la Argentina: el glifosato (PMG) y algunos de sus impactos en dos especies no destinatarias de la ictiofauna dulceacuícola local.

A pesar de que en Argentina los estudios de monitoreo de plaguicidas en el medio ambiente son aún insuficientes e incompletos, varios trabajos han reportado niveles de PMG y sus metabolitos en diversos cuerpos de agua próximos a las áreas de producción agrícola. Se han evidenciado concentraciones entre 0.10 y 0.70 mg.L⁻¹ en cuerpos de agua pampeanos (Peruzzo *et al.*, 2008). Más recientemente, en un estudio realizado en un afluente del arroyo del Pescado (Provincia de Buenos Aires) el mismo grupo ha reportado concentraciones que oscilaron entre 1.8 y 10.9 mg.L⁻¹ del herbicida (Ronco, 2011).

En este período fue realizado un relevamiento en Pampa del Indio (Chaco) junto a comunidades de pueblos originarios y campesinos pobres que exigen condiciones de vida dignas, lo que incluye el acceso al agua para consumo y riego. El primer muestreo arrojó como resultado la presencia de concentraciones de glifosato en agua de aljibes de los parajes en un rango de 0.5–1.1 mg.L⁻¹ (resultados no publicados). Estos valores se encuentran en el orden de concentraciones previamente descriptas, y a la vez resultan elevadas en relación a las publicadas por grupos de otros países en los que usualmente fueron reportados valores del orden de los µg.L⁻¹ (ppb) en aguas superficiales (Hernández, 2011).

Este escenario pone cada vez más en evidencia que, a pesar de haberse asignado al glifosato la categoría de plaguicida poco persistente en el ambiente, su utilización en forma masiva está provocando la detección cada vez más frecuente, y en concentraciones más elevadas, de PMG en los cuerpos de agua. Es de destacar que no sólo se ha incrementado en la región la superficie afectada a cultivos transgénicos, sino que en muchos casos se realizan más aplicaciones que las recomendadas por ciclo de cultivo e incluso se ha producido un aumento en la dosis de aplicación (Giesy *et al.*, 2000), situación que, junto con las características del tipo de suelo y su mineralogía, podrían explicar las concentraciones crecientes del herbicida que se registran actualmente.

En relación a lo antedicho, se consideró relevante el estudio de los efectos de dicho herbicida en peces, como las dos especies de la ictiofauna nativa que fueron objeto de este trabajo. Debe tenerse en cuenta que la información ecotoxicológica referida a los efectos adversos de los pesticidas para las especies acuáticas es demandada por el Organismo regulatorio de nuestro país, como uno de los requisitos que los laboratorios deben cumplir para el registro y autorización de los productos fitosanitarios. Sin embargo, en la actualidad el mismo es satisfecho con la presentación de informes referidos a bioensayos de toxicidad llevados a cabo

con especies inexistentes en nuestra fauna como organismos *test*, esto es, organismos propios de ecosistemas muy diferentes de aquéllos en los que serán utilizados. En este caso hemos trabajado con dos especies representantes de la ictiofauna neotropical. Una de ellas, vivípara (*Cnesterodon decemmaculatus*) es abundante en los cuerpos de agua próximos a los agroecosistemas donde se practican diversos cultivos intensivos, con masivas aplicaciones de pesticidas; la otra (*Odontesthes bonariensis*), es un teleósteo de gran valor comercial y de amplia distribución en los ecosistemas pampeanos (Grosman, 2001; Somoza *et al.*, 2008), igualmente en riesgo si continúa la tendencia expansiva de la frontera agrícola. De esta forma se espera contribuir con información científica, adicional a la preexistente, sobre los riesgos potenciales asociados a la aplicación masiva de este herbicida.

Existen antecedentes de estudios de toxicidad letal del glifosato y, principalmente, de sus formulados en peces de agua dulce. En el presente trabajo analizamos la toxicidad del glifosato (forma ácida) sobre la “madrecita”: *Cnesterodon decemmaculatus*. Los resultados obtenidos denotan una baja toxicidad letal del principio activo para el rango de concentraciones ensayadas (0–140 mg PMG.L⁻¹) (Figura 1.6). Consistente con la bibliografía (Folmar *et al.*, 1979; Neskovic *et al.*, 1996; Carriquiriborde, 2011; Alvarez *et al.*, 2012), estos resultados sugieren que PMG no presentaría un nivel significativo de toxicidad letal aguda para peces de agua dulce (CL_{50-96 h} > 100 mg.L⁻¹). Sin embargo, el formulado (*Glifosato II Atanor*) provocó la muerte de la totalidad de los peces en unas pocas horas para la concentración de 35 mg.L⁻¹ y pudo determinarse una CL_{50-96h} de 29 mg.L⁻¹ (equivalentes PMG)(Figuras 1.7 y 1.8). Al igual que lo observado por otros autores (Tsui y Chu, 2003; Pérez *et al.*, 2011), los resultados alcanzados indican

un notable aumento de la toxicidad letal del formulado en relación con el principio activo.

Al mismo tiempo, ante un estresor ambiental los organismos pueden mostrar efectos subletales, y estos pueden ser buenos indicadores tempranos de la presencia del tóxico, respuestas que pueden expresarse a diferentes niveles de organización, desde el celular hasta el poblacional o ecosistémico. Los marcadores biológicos o biomarcadores son los cambios medibles -ya sean estos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos- que se asocian a la exposición al tóxico. En las últimas décadas el estudio de biomarcadores despierta un interés creciente en los estudios ecotoxicológicos debido a las ventajas que estos presentan sobre los test convencionales de toxicidad que utilizan la letalidad como punto final; al respecto, corresponde mencionar que, además, dichos ensayos están siendo objeto de intensos debates críticos en los ámbitos de la Ecotoxicología. Los biomarcadores pueden ser considerados como una medida de los cambios iniciales causados por la interacción de los contaminantes con el organismo. Esta genera una cascada de eventos que se inician en el nivel subcelular (metabolismo, síntesis proteica, etc.), llegando a mostrar efectos adversos a niveles superiores de organización biológica. En el presente trabajo se analizó una batería de biomarcadores “clásicos” y el estudio de otros biomarcadores más recientes o menos utilizados, evaluando los cambios que podrían operarse sobre los mismos en peces dulceacuícolas por exposición al PMG y a uno de sus formulados.

Los biomarcadores bioquímicos dan cuenta del ingreso del tóxico al organismo y su interacción con las rutas metabólicas y la normal homeostasis.

El *estrés oxidativo* resulta del desequilibrio entre los sistemas pro-oxidantes y los antioxidantes, a favor de los primeros. Debe tenerse en cuenta que las ROS son también especies intermediarias de los procesos fisiológicos normales, por lo tanto

la relación entre reactividad y toxicidad no es directa, sino que inicialmente debe plantearse la potencialidad de los efectos. Existen una serie de mecanismos capaces de neutralizar la superproducción de ROS, y reparar y compensar las lesiones iniciales que fueron causadas. Cuando el sistema de defensa no es suficiente, es superado y se manifiesta la toxicidad, pasándose a un estado de perturbación o estrés. En el marco de las defensas antioxidantes enzimáticas pueden nombrarse como principales la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), capaces de metabolizar las ROS. En este trabajo se analizó la respuesta de **CAT** en *C. decemmaculatus* por exposición aguda a PMG (forma ácida). Los resultados revelaron que dicho biomarcador resultó sensible: se observó una tendencia de aumento de su actividad en los peces expuestos a glifosato (en todo el rango de concentraciones ensayadas). La diferencia resultó significativa para la exposición a 35 mg.L⁻¹ (p<0.05) (Figura 2.6). Al mismo tiempo es menester señalar que los antecedentes bibliográficos indican una gran variabilidad en la respuesta de CAT, y demás enzimas antioxidantes, ante los estresores. La misma también ha sido descrita en referencia a ensayos de exposición de peces a formulados de glifosato (ver Tabla 2.2). Estas variaciones resultan dependientes fundamentalmente del tiempo transcurrido desde el inicio de la exposición, ya que el sistema antioxidante involucra vías de interacción complejas. Por ejemplo, un exceso de peróxido de hidrógeno puede generar la reducción de la actividad de SOD, mientras que el anión superóxido puede ser responsable de una disminución en la actividad de CAT (Bagnyukova *et al.*, 2006). Es por esto que a tiempos cortos puede observarse la disminución de la actividad de algunas de las enzimas antioxidantes, debido a la inactivación generada por el exceso de ROS que aún no ha sido degradado; mientras a tiempos mayores, mediante regulación positiva, puede determinarse el aumento de la actividad de dichas enzimas. En este sentido, para

una comprensión integral de la respuesta antioxidante, resulta relevante considerar los tiempos de exposición, crónica o aguda, e incluso considerar determinaciones a tiempos más cortos si se tiene en cuenta que se han observado comportamientos diferentes, incluso entre las 6 h y las 24 h de exposición (Modesto y Martínez, 2010a). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, constituyen una “foto instantánea” de la respuesta de *C. decemmaculatus* a las 96 h de exposición, el aumento de la actividad de CAT indica un potencial oxidativo, siendo la primer evidencia objetiva en este sentido para el principio activo (PMG). Los mismos resultan, a la vez, complementarios a los antecedentes en relación a los formulados a base de glifosato.

La inhibición de la actividad de las colinesterasas, particularmente la acetilcolinesterasa (**AChE**), es ampliamente utilizada como *biomarcador de neurotoxicidad* aplicada a la identificación de efectos de insecticidas organofosforados y carbamatos. Sin embargo, la utilización de dichos biomarcadores como herramientas bioquímicas para evaluar respuestas de los organismos a los contaminantes en el marco de proyectos de biomonitoreo requiere de la validación en el sistema bajo estudio. Es preciso el conocimiento de la relación tóxico-respuesta biológica, como así también aspectos que determinen la variabilidad natural del biomarcador. En este sentido, se ha podido determinar la variabilidad estacional de la actividad de AChE en *C. decemmaculatus* (Figura 2.7). Al mismo tiempo, sus niveles mostraron una relación con el Factor de Condición (K) o la talla (L_T) de los peces, según el origen de la enzima.

En relación a la respuesta ante la exposición aguda de *C. decemmaculatus* a PMG (forma ácida) pudo determinarse la disminución significativa de la actividad de AChE cerebral aún a la concentración de 1 mg.L^{-1} (Figura 2.9). También en el tercio medio (M) de los peces expuestos a 1 mg.L^{-1} se determinó una variación

significativa (Figura 2.8), Sin embargo, en el tercio posterior (P), correspondiente principalmente al tejido muscular, no se estableció efecto de la exposición, lo que indicaría que la respuesta de la enzima resulta tejido específica. Resulta oportuno recordar que en cerebro y músculo de algunas especies de peces se ha descrito la coexistencia de varias colinesterasas (acetil y butiril), que exhiben diferente sensibilidad, a veces de alta variabilidad, por exposición a organofosforados, y de disímil actividad (Sturm *et al.*, 2000; Moralev y Rozengart, 2004). Estos antecedentes podrían explicar algunos de nuestros resultados. Complementando lo antedicho, Durieux *et al.*, (2010) destacaron recientemente la gran variabilidad espacio-temporal de la actividad acetilcolinesterásica cerebral en *Morone saxatilis*, y Beauvais *et al* (2002) informaron que el mismo parámetro es sensiblemente afectado por factores tales como sexo, temperatura ambiente o talla.

Estos resultados son el primer reporte de efecto inhibitorio del glifosato (PMG) sobre la AChE, y se complementan con los antecedentes existentes para formulados en los que se ha determinado efecto inhibitorio sobre la AChE cerebral y respuestas variables en músculo (Gluszczak *et al.*, 2006; 2007; Modesto y Martínez, 2010a; 2010b; Salbego *et al.*, 2010; Rossi *et al.*; 2011; Cattaneo *et al.*, 2011).

En relación al *estado bioenergético* de los organismos pueden definirse diferentes biomarcadores. Las reservas de glucógeno y el contenido de proteínas totales son parámetros que reflejan específicamente el estado de las reservas energéticas, como también los niveles de las moléculas que representan las fuentes inmediatas de energía a nivel subcelular, ATP y PCr. La importancia relativa de las diferentes formas de energía movilizable en un organismo que ha sido sometido a estrés dependen por un lado de la intensidad y duración de la exposición, como también de parámetros ajenos al estresor: estacionalidad, especie, estado de

desarrollo del organismo, entre otros. Al mismo tiempo, desde el punto de vista morfométrico tanto el Factor de Condición (K) como el IHS son indicativos del estado nutricional de los organismos.

El **glucógeno** y los lípidos representan las principales reservas de energía de los animales. Las mismas son movilizadas ante una situación de estrés y, por lo tanto, el contenido de glucógeno resulta un biomarcador ampliamente utilizado en estudios ecotoxicológicos. A diferencia de lo observado por otros autores en exposiciones a formulados de glifosato (Jiraungkoorskul *et al.*, 2003; Ortiz-Ordoñez *et al.*, 2011; Shiogiri *et al.*, 2012), en el presente trabajo no pudo determinarse un efecto sobre dichas reservas energéticas en *C. decemmaculatus* frente a la exposición aguda a PMG (Figura 2.10).

En casos de estrés severo, las proteínas pueden ser utilizadas como fuente de energía. Sin embargo, el uso del **contenido de proteínas tisulares** como biomarcador no ha sido debidamente analizado en la literatura. Algunos trabajos han descrito que concentraciones subletales de ciertos pesticidas inducen cambios en su contenido. En *Clarias batrachus* expuestos al pesticida carbofuran (Singh y Sharma, 1998) y en *Heteropneustes fossilis* expuestos al insecticida clorpirifos (Tripathi y Shasmal, 2011), se determinó una disminución en el contenido de proteínas tisulares. También se han reportado variaciones ante exposiciones a formulados de glifosato (Gluszczak *et al.* 2006; 2007). Los ensayos realizados en el presente trabajo mostraron una disminución leve, aunque significativa, del contenido de proteínas tisulares en el tercio A (Tabla 2.3). Aunque la magnitud del cambio resultó moderada, el mismo debe ser considerado aún más teniendo en cuenta que dicha disminución fue determinada en el tercio A en el que la actividad de AChE mostró la existencia de un efecto neurotóxico del PMG. El hecho de que el organismo utilice las proteínas como fuente de energía resulta indicativo de escenarios donde la perturbación ambiental supera un estrés leve. Al

mismo tiempo, estos resultados suman elementos a diferentes autores que proponen los cambios en el contenido de proteínas tisulares como un biomarcador, afirmando que, aunque su variación puede resultar una respuesta inespecífica, constituye un buen indicador del estado fisiológico integral del organismo (Pottinger *et al.*, 2002).

Como se ha mencionado, el **Factor de Condición** de Fulton (K) y el **IHS** están asociados al *nivel nutricional* del organismo. En el caso de los ensayos de exposición aguda de *C. decemmaculatus* a PMG no se hallaron diferencias en el K entre los grupos expuestos y el control (Tabla 2.1). Tampoco para *O. bonariensis* sometidos a una exposición crónica al formulado de glifosato. Por otro lado, en estos animales pudo observarse una tendencia de disminución del IHS, aunque la misma no resultó estadísticamente significativa (Tabla 3.7) no puede descartarse la existencia de daño en un órgano como el hígado, central en los mecanismos de detoxificación.

Cabe señalar que existe una marcada tendencia al aumento de las investigaciones en relación a los biomarcadores de toxicidad que pueden ser utilizados para la detección de un agente específico al cual ha sido expuesto el organismo. De Coen *et al.* (2000) muestran como ejemplo de dicha tendencia la comparación en el número de publicaciones en el área de toxicología ambiental referidas al citocromo P450 (biomarcador de exposición a hidrocarburos poliaromáticos) en relación a las que involucran el análisis del metabolismo energético (biomarcador de efecto). Los autores muestran que las primeras se han incrementaron 55 veces en un período de 20 años, mientras las segundas sólo 4 veces. Sin embargo, los parámetros bioenergéticos, en general, pueden ofrecer una ventaja al proveer información

referida a procesos claves en el organismo, con implicancias que, al menos sobre bases teóricas, podrían extrapolarse a niveles superiores de organización biológica.

En este sentido debe señalarse que existen una serie de parámetros que han sido propuestos como biomarcadores y no han sido estudiados con profundidad como la **Carga Energética de Adenilatos** (CEA), expresión del balance energético en las células. El mismo ha sido postulado como un parámetro regulatorio y podría reflejar en forma temprana el efecto subletal de un estresor a nivel subcelular (Le Gal *et al.*, 1997).

El *balance energético subcelular* es regulado por diversos fosfatos, dadores/receptores de grupos fosforilo a moléculas “ricas en energía”, mayormente generadas en las reacciones catabólicas que son catalizadas por enzimas específicas (Nelson y Cox, 2000; Walliman, 2011). Entre esas moléculas, cabe destacar a los nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP) y la fosfocreatina (o creatina fosfato, PCr). Es interesante señalar que la energía libre de hidrólisis de esos fosfatos (Kcal/mol) tienen valores comparables entre sí; por ejemplo: -7.3 para el ATP (\rightarrow ADP + Pi) y -10.3 en la hidrólisis de la fosfocreatina.

La fosfocreatina es la proveedora de los grupos fosfato para la síntesis de ATP por fosforilación del ADP, en una reacción catalizada por la creatina quinasa (extramitocondrial) ($\text{ADP} + \text{PCr} \rightarrow \text{ATP} + \text{Cr}$). Como puede apreciarse en la Tabla 3.1 las concentraciones de PCr determinadas en el músculo del pejerrey resultaron muy superiores a las de ATP, lo que sugiere para la PCr un papel crítico en la regulación energética del pez particularmente como proveedora de grupos fosforilo para contribuir a la rápida síntesis de ATP, a mayor velocidad que la provista por las reacciones catabólicas.

Los resultados alcanzados en este trabajo indican cambios significativos limitados a los valores de CEA en músculo e hígado de los peces expuestos por 15 días a

medios con 10 mg.L⁻¹ del herbicida (Tablas 3.5 y 3.6). Estos cambios no fueron observados en el cerebro de los mismos animales (Tablas 3.4).

Cabe recordar que dicha concentración de glifosato fue subletal en todos los casos; aún así, los resultados indican en forma fehaciente una alteración precoz en ciertos aspectos de los parámetros del balance energético de los peces en condiciones experimentales. Esta observación debe subrayarse ya que advierte que la toxicidad del herbicida no puede ser calificada únicamente sobre la base de los parámetros de toxicidad como la CL₅₀-96h, NOEC, LOEC, etc.

Por otra parte, tampoco puede dejar de considerarse la posibilidad de que los valores de concentración determinados sean ligeramente diferentes de las condiciones estrictamente *in vivo*, debido a pérdidas en las fases iniciales del procesamiento de los tejidos, ni desestimarse la limitación asociada a dos factores relevantes: a) la compartimentalización intracelular y b) la heterogeneidad de los tejidos estudiados. Aún así, debe destacarse que los resultados alcanzados denotan la sensibilidad de la CEA, por lo que se presenta como un parámetro promisorio para la utilización en ensayos de toxicidad.

La **morfología de las branquias** también ha demostrado ser un indicador sensible de los efectos de la exposición de los peces a medios contaminados. Cabe recordar que estos órganos constituyen el sitio más relevante que vincula el medio externo con el interno. Por presentar grandes superficies de exposición, las branquias constituyen un blanco primario de los tóxicos que podrían estar presentes en su entorno. Luego de la exposición crónica al formulado de glifosato las branquias de *O. bonariensis* mostraron alteraciones de su estructura al ser examinadas al MEB (Figuras 3.9, 3.10 y 3.11). Sin embargo, el análisis comparativo con lo informado por otros autores sugiere que los cambios morfológicos registrados pueden ser inespecíficos y sólo podrían ser considerados

en el marco de un análisis integrado, junto a las respuestas de otros biomarcadores simultáneamente evaluados. Esa posible inespecificidad indicaría que dichos cambios representan, primariamente, respuestas fisiológicas al estrés ambiental en muchos casos de carácter defensivo y/o compensatorio.

Lo antedicho encuentra apoyo adicional en estudios de numerosos autores referidos a las alteraciones observadas en el mismo órgano luego de la exposición de los peces a soluciones de diferentes tóxicos (herbicidas, insecticidas, metales pesados, etc.), en concentraciones subletales. En ningún caso pudieron ser reconocidas como efectos específicos sobre dicho órgano, unívocos, asignables a cada tóxico en particular o a algún componente específico de las mezclas estudiadas. Así, se registró un extenso repertorio de cambios estructurales, todos comunes para diferentes especies y variadas condiciones de exposición, sin que se hayan podido reconocer sitios diana subcelulares específicos que puedan ser identificados por desencadenar cambios selectivos luego de la exposición a un medio conteniendo un tóxico particular (Evans, 1987; Evans *et al.*, 2005; Mallatt, 1985; Wendelaar Bonga, 1997). De allí que nos inclinamos a considerar que estos efectos morfológicos en las branquias son, en realidad, alteraciones subletales de carácter *morfo-funcional*, y que para su correcta interpretación requieren un abordaje integrado de las respuestas de los biomarcadores morfológicos y bioquímicos.

En el campo de los estudios ecotoxicológicos, existen evidencias crecientes de que niveles subletales de contaminantes pueden afectar negativamente la fecundidad de poblaciones de peces, pudiendo producir a largo plazo una disminución y, eventualmente, la extinción de importantes recursos naturales (Kime, 1995). Estos efectos sobre la *reproducción* pueden ser ejercidos sobre los reproductores o directamente sobre las gametas cuando estas se ponen en contacto con los

contaminantes en el medio acuático, o incluso luego de la fecundación en las etapas tempranas del desarrollo. Los estudios a nivel de toxicidad reproductiva y en el desarrollo se vienen impulsando en la última década como herramientas para el estudio sistémico de los efectos de un contaminante, pudiendo reflejar la integración de fenómenos subcelulares y tisulares (IUPAC, 2003).

En relación a la **motilidad espermática** de *O. bonariensis* la exposición al formulado de glifosato no produjo cambios al ser analizada tanto en forma cualitativa como a través del sistema CASA (Tabla 4.3). Cabe señalar que para evaluar en forma cabal los efectos del herbicida sería oportuno un análisis que incluya la capacidad fecundante como punto final. No obstante, destacamos que, hasta donde llega nuestra información, los resultados presentados constituyen el primer informe que se da a conocer en nuestro medio en relación a la evaluación de los efectos de un formulado de glifosato sobre la motilidad espermática mediante la tecnología CASA.

Finalmente, se realizaron ensayos originales para evaluar los efectos sobre el **desarrollo embrionario-larval**. Los embriones no vieron afectado su desarrollo en presencia del formulado (1-50 mg.L⁻¹), supervivencia-mortalidad, eclosión o duración temporal (Figuras 4.6 y 4.7). Sin embargo, las larvas presentaron un notorio aumento en su mortalidad (Figura 4.10). Es interesante que la diferencia de sensibilidad establecida resulta coincidente con la determinada para algunas especies de anfibios (Edginton *et al.*, 2004). Estos resultados contribuyen a los escasos antecedentes en relación a los efectos de contaminantes en el desarrollo de los peces.

Como síntesis final podemos concluir que:

- Los resultados obtenidos denotan una baja toxicidad letal aguda de PMG (forma ácida) en *Cnesterodon decemmaculatus* para el rango de concentraciones ensayadas (0 – 140 mg PMG.L⁻¹). Sin embargo, el formulado (*Glifosato II*) provocó la muerte de la totalidad de los ejemplares en unas pocas horas para la concentración de 35 mg.L⁻¹ (equivalentes PMG), pudiéndose determinar una CL₅₀-96h de 29 mg.L⁻¹, lo que indicaría un notable aumento de la toxicidad letal del formulado en relación con el principio activo. Este resultado es consistente con lo descrito para otras especies.
- En relación a los efectos de la exposición aguda de *C. decemmaculatus* a concentraciones subletales sobre biomarcadores: a) Se produjo un incremento de la actividad de CAT denotando una respuesta de las defensas antioxidantes. b) La AChE disminuyó significativamente en el tercio A, aún para la menor concentración ensayada (1 mg.L⁻¹), tendencia que también fue determinada en el tercio M. c) En el tercio A pudo determinarse una disminución leve en el contenido de proteínas tisulares. d) No se determinaron diferencias significativas en el factor de condición K ni en los niveles de glucógeno.
- La actividad de AChE en organismos control de *C. decemmaculatus* mostró una variación estacional, característica que debe ser considerada para su uso como herramienta en estudios de biomonitoreo.
- Los resultados alcanzados en bioensayos con *Odontesthes bonariensis*, indican cambios significativos en los valores de CEA en músculo e hígado de los peces expuestos por 15 días a medios con 10 mg.L⁻¹ del formulado

de PMG, lo que indicaría en forma fehaciente una alteración precoz en ciertos aspectos del balance energético subcelular.

- La morfología de las branquias también ha demostrado ser un indicador morfológico sensible. Luego de la exposición crónica de *O. bonariensis* a 1 y 10 mg.L⁻¹ del formulado las branquias examinadas al MEB evidencian alteraciones de su ultraestructura.
- En relación a las concentraciones del herbicida, las mismas se mantuvieron constantes durante la mayoría de los bioensayos (ensayos agudos de *C. decemmaculatus* y de desarrollo embrionario de *O. bonariensis*), por lo que pudo descartarse para estos casos la existencia de procesos de degradación biótica y abiótica de una magnitud relevante. En cambio, en el ensayo crónico con *O. bonariensis* expuesto al formulado de PMG, las concentraciones no exhibieron el mismo comportamiento, no descartándose la posible contribución de los procesos mencionados al decaimiento de la concentración.
- El formulado de PMG no produjo efectos significativos sobre la motilidad espermática en *O. bonariensis*.
- Al estudiar el desarrollo embrionario de *O. bonariensis* no se observaron diferencias en el porcentaje de supervivencia-mortalidad, ni de eclosión. Tampoco se determinaron cambios en el progreso temporal (aceleración o retraso en el desarrollo). En cambio, las larvas resultaron ser notablemente más sensibles, ya que la exposición al formulado produjo un incremento significativo de su mortalidad.
- Finalmente, a lo largo de este estudio pudieron valorarse en forma integral una serie de biomarcadores “clásicos” y revalorarse otros desarrollados más recientemente, o cuyo uso no se encuentra tan difundido.

Los resultados de este trabajo resultan una contribución a los estudios realizados por diversos grupos de investigación locales y del ámbito internacional en relación a los efectos del glifosato sobre peces de agua dulce. Se ha evaluado los impactos del glifosato a diferentes niveles de organización, desde parámetros subcelulares regulatorios, hasta efectos en el desarrollo. Pretenden ser también un aporte al desarrollo y adopción de bioensayos de toxicidad y de nuevas herramientas para el monitoreo ecotoxicológico de los cuerpos de agua adyacentes a las regiones agrícolas.

Referencias Bibliográficas

- Adámoli J., Ginzburg R. & Torrela S. -colaboracion de Narbaiza C.- (2011). Informe "Escenarios productivos y ambientales del Chaco Argentino: 1977-2010" FCEyN - UBA y Fundación Producir Conservando. http://www.producirconservando.org.ar/documentos/escenarios_productivos_ambientales_chaco.pdf
- Albinati A.C.L., Moreira E.L.T., Albinati R.C.B., Carvalho J.V., De Lira A.D., Santos G.B. & Vidal L.V.O. (2009). Histological biomarkers - chronic toxicity for roundup in piauçu (*Leporinus macrocephalus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 61, 621-627.
- Ally A. & Park G. (1992). Rapid determination of creatine, phosphocreatine, purine bases and nucleotides (ATP, ADP, AMP, GTP, GDP) in heart biopsies by gradient ion-pair reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography - Biomedical Applications*, 575, 19-27.
- Alvarez M., Gimenez I.T., Saitua H., Enriz R.D. & Giannini F.A. (2012). Toxicidad en peces de herbicidas formulados con glifosato. *Acta Toxicol Argent*, 20, 5-13.
- Arregui M.C., Lenardón A., Sanchez D., Maitre M.I., Scotta R. & Enrique S. (2004). Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. *Pest Management Science*, 60, 163-166.
- Atkinson D.E. (1968). The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, 7, 4030-4034.
- Bagnyukova T.V., Chahrak O.I. & Lushchak V.I. (2006). Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, 78, 325-331.
- Baudhuin P., Beaufay H., Rahman-Li Y., Sellinger O.Z., Wattiaux R., Jacques P. & De Duve C. (1964). Tissue fractionation studies. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*, 92, 179-184.
- Barja B.C. & Dos Santos Afonso M. (1998). An ATR-FTIR study of glyphosate and its Fe(III) complex in aqueous solution. *Environmental Science and Technology*, 32, 3331-3335.
- Barja B.C. & Dos Santos Afonso M. (2005). Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: A comparative study. *Environmental Science and Technology*, 39, 585-592.
- Barja B.C., Herszage J. & Dos Santos Afonso M. (2001). Iron(III)-phosphonate complexes. *Polyhedron*, 20, 1821-1830.
- Beauvais S.L., Cole K.J., Atchison G.J. & Coffey M. (2002). Factors affecting brain cholinesterase activity in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Water, Air, and Soil Pollution*, 135, 249-264.
- Behra M., Cousin X., Bertrand C., Vonesch J.L., Biellmann D., Chatonnet A. & Strähle U. (2002). Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience*, 5, 111-118.
- Bernal M.H., Solomon K.R. & Carrasquilla G. (2009). Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos) and cosmo-flux to larval colombian frogs 1. laboratory acute toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 72A, 961-965.
- Bernet D., Schmidt H., Meier W., Burkhardt-Holm P. & Wahli T. (1999). Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22, 25-34.
- Bertin M., Pomponi S.M., Kokuhuta C., Iwasaki N., Suzuki T. & Ellington W.R. (2007). Origin of the genes for the isoforms of creatine kinase. *Gene*, 392, 273-282.
- Boonstra R. (2013). Reality as the leading cause of stress: rethinking the impact of chronic stress in nature. *Functional Ecology*, 27, 11-23.

- Boudou A. & Ribeyre F. (1997). Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environ Health Perspect*, 105 (Suppl 1), 21-35.
- Bradbury S.P., Carlson, R.W., Henry, T.R., Padilla, S. & Cowden, J. (2008). Toxic responses of the fish nervous system. En: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Eds), *The Toxicology of Fishes*, CRC Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. Pp. 417-455.
- Brodeur J.C. (2011). La soja y sus agroquímicos: evaluando impactos en anfibios. En: Camino M, Aparicio V (Editoras), *Aspectos ambientales del uso del glifosato*. Ediciones INTA. Pp. 69-76.
- Camino M. & Aparicio V. (Editoras) (2010). Aspectos ambientales del uso del glifosato. Ediciones INTA-Balcarce.
- Calvo J. & Morriconi, E. (1972). Fenómenos reproductivos en el pejerrey (*Basilichthys bonariensis*). III. Estudio de la fecundidad, época y número de desoves. *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, 93, pp. 75-84.
- Carrasco A.E., Sánchez N.E. & Tamagno L.E. (2012). Modelo agrícola e impacto socioambiental en la Argentina: monocultivo y agronegocios. Serie monográfica Sociedad y Ambiente, N° 1. Ed. Asociación de Universidades Grupo Montevideo-UNLP (ISSN 2314-1743)
- Carriquiriborde P. & Ronco A. (2006). Ecotoxicological studies on the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, Pisces Atherinopsidae). *Biocell*, 30, 97-109.
- Carriquiriborde P. (2011). Toxicidad de glifosato en peces autóctonos: Estudios de laboratorio y campo. En: Camino M, Aparicio V (Editoras), *Aspectos ambientales del uso del glifosato*. Ediciones INTA. Pp. 57-68.
- Carvalho F., Zhong N., Tavares & Klaine S. (1998). Rastreo de plaguicidas en los trópicos. Boletín del OEIA 40.
- Casabé N., Piola L., Fuchs J., Oneto M.L., Pamparato L., Basack S., Giménez R., Massaro R., Papa J.C. & Kesten E. (2007). Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal of Soils and Sediments*, 7, 232-239.
- CASAFE. (2012). Informe de Mercado Argentino de Fitosanitarios, año 2011. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. <http://www.casafe.org/pdf/Informemercadofitosanitarios2011.pdf>
- Castillo Morales G. (Editora) (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México-IMTA/Canadá-IDRC. Pp. 1-189.
- Cattaneo R., Clasen B., Loro V.L., De Menezes C.C., Pretto A., Baldisserotto B., Santi A. & De Avila L.A. (2011). Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87, 597-602.
- Çavaş T. & Könen S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22, 263-268.
- Chalde T., Fernández D.A., Cussac V.E. & Somoza G.M. (2011). The effect of rearing temperature in larval development of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* - Morphological indicators of development. *Neotropical Ichthyology*, 9, 747-756.
- Chambers W.H. (1992). Organophosphorus Compounds: An Overview. Organophosphates, Chemistry, Fate, and Effects. J. E. Chambers, Levi, P.E. San Diego, Academic Press: 3-17.
- Chen C.Y., Hathaway K.M. & Folt C.L. (2004). Multiple stress effects of Vision® herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 823-831.

- Chuiko G.M., Zhelmin Y. & PoD'Gornaya V.A. (1997). Seasonal fluctuations in brain acetylcholinesterase activity and soluble protein content in roach (*Rutilus rutilus* L.): A freshwater fish from Northwest Russia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117C, 251-257.
- CONICET. Comisión Nacional de Investigación sobre Agroquímicos. Consejo Científico Interdisciplinario creado en el ámbito del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. (2009). "Informe - evaluación de la información científica vinculada al glifosato en su incidencia sobre la salud humana y el ambiente". Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Contardo-Jara V., Klingelmann E. & Wiegand C. (2009). Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*, 157, 57-63.
- Conti M.E. (2008) – Biomarkers for environmental monitoring. En: Conti M.E. (Editor), *Biological monitoring: Theory and applications*. Wit Press. Pp. 25-46.
- Cosson J., Billard R., Cibert C., Dreanno C. & Suquet M. (1999). Ionic factors regulating the motility of fish sperm. En: Gagnon C. (Ed). *The Male Gamete: From basic knowledge to clinical applications*. Cache River Press, Paris, France. Pp 161-186.
- Dallegre E., DiGiorgio Mantese F., Soares Coelho R., Drawans Pereira J. Dalsenter P.R. & Langeloh A. (2003). The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. *Toxicology Letters*, 142, 45-52.
- Damonte M., Torres Sánchez R.M. & dos Santos Afonso M. (2007). Some aspects of the glyphosate adsorption on montmorillonite and its calcined form. *Applied Clay Science*, 36, 86-94.
- De Boeck G., Nilsson G.E., Elofsson U., Vlaeminck A. & Blust R. (1995). Brain monoamine levels and energy status in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to sublethal levels of copper. *Aquatic Toxicology*, 33, 265-277.
- De Coen W.M., Janssen C.R. & Giesy J.P. (2000). Biomarker applications in ecotoxicology: Bridging the gap between toxicology and ecology. En: Persoone *et al.* (Eds) *New microbiotests for routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Pp. 13-24.
- Dehn, P.F. (1992). Seasonal changes in adenylate energy metabolism in the muscle and liver of the redear sunfish, *Lepomis microlophus*. *Aquatic Living Resources*, 5, 197-204.
- de la Torre F.R., Ferrari L. & Salibián A. (2002). Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology & Pharmacology*, 131, 271-280.
- de la Torre F.R., Salibián A. & Ferrari L. (2007). Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere*, 68, 1582-1590.
- De La Vega Salazar M.Y., Martínez Tabche L. & Macías García C. (1997). Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ryamirez dam in Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38, 53-62.
- Demetrio P.M. (2012). Estudio de efectos biológicos de plaguicidas utilizados en cultivos de soja RR y evaluación de impactos adversos en ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región pampeana. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
- Den Besten P.J., Bosma P.T., Herwig H.J., Zandee D.I. & Voogt P.A. (1991). Effects of cadmium on metal composition and adenylate energy charge in the sea star *Asterias rubens* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, 112-117.
- Díaz A.O., González Castro M., García A.M. Díaz de Astarloa J.M. & Figueroa D.E. (2009). Gross morphology and surface ultrastructure of the gills of *Odontesthes argentinensis* (Actinopterygii, Atherinopsidae) from a Southwestern Atlantic coastal lagoon. *Tissue Cell*, 41, 193-198.

- Díaz Báez M.C., Bulus Rossini G.D. & Pica Granados Y. (2004). Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. En: Castillo Morales G (Editora), *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. México-IMTA/Canadá-IDRC. Pp. 99-124.
- Dickson G.W. & Giesy J.P. (1982). Seasonal variation of phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge in dorsal tail muscle of the crayfish, *Procambarus acutus acutus* (Decapoda: Astacidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 72A, 295-299.
- Di Giulio, R.T. & Meyer, J.N. (2008). Reactive oxygen species and oxidative stress. En: Di Giulio, R.T., Hinton, D.E. (Editors), *The Toxicology of Fishes*, CRC Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. Pp. 273-324.
- Di Marzio W.D. & Tortorelli M.C. (1994). Effects of paraquat on survival and total cholinesterase activity in fry of *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 52, 274-278.
- Domitrovic H.A. (1997). Toxicidad y respuesta histopatológica en *Aequidens portalegrensis* (Pisces, Cichlidae) expuestos a Glifosato en ensayos de toxicidad aguda y en ensayos subletales. Univ Nac Nordeste, *Actas Reunión Comunicaciones Científicas Tecnológicas*. Tomo II: 4-29/4-32.
- Duke, S.O. (1988). Glyphosate. En: Kartney P.C. & Kaufman D.D. (Eds.), *Herbicides: Chemistry, degradation and mode of action*. Marcel Dekker, New York. Pp. 1-70
- Durieux E.D.H., Farver T.B., Fitzgerald P.S., Eder K.J. & Ostrach D.J. (2011). Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 21-29.
- Dyer H.B.S. (2006). Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). *Biocell*, 30, 69-88.
- Ecobichon D.J. (2005). Efectos tóxicos de los pesticidas. En: Klaassen CD, Watkins JB, (Editores). Madrid: McGraw-Hill. p. 339-53.
- Edginton A.N., Sheridan P.M., Stephenson G.R., Thompson D.G. & Boermans H.J. (2004). Comparative effects of pH and Vision® herbicide on two life stages of four anuran amphibian species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 815-822.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr V. & Featherstone R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-90, IN1-IN2, 91-95.
- Evans D.H. (1987). The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 71, 47-58.
- Evans D.H., Piermarini P.M. & Choe K.P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, 85, 97-177.
- FAO (2002). Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides. Roma. Estudio FAO: Producción y protección vegetal N° 173.
- Ferrari L., Eissa B.L., Ossana N.A. & Salibián A. (2009) Effects of sublethal waterborne cadmium on gills in three teleostean species: scanning electron microscope study. *International Journal of Environmental and Health*, 3, 410-426
- Ferrari L., García M.E., de la Torre F.R. & Demichelis S.O. (1998). Evaluación ecotoxicológica del agua de un río urbano mediante bioensayos con especies nativas. *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"*, Nueva Serie N° 148, 1-16.
- Folmar L.C., Sanders H.O. & Julin A.M. (1979). Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 8, 269-278.

- Fossi M.C. (1994). Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102, 49-54.
- Franz J.E., Mao M.K. & Sikorski, J.A. (1997). Glyphosate: A Unique Global Herbicide. Washington, DC, American Chemical Society.
- Fraysee B, Mons R & Garric J (2006). Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 253-267.
- Fulton, T.W. (1904) The rate of growth of fishes. *Fisheries Board of Scotland, Annual Report*, 22, Pp. 141-241.
- García M.E., Cappelletti C.A. & Salibián A. (1999). Sublethal maternal pre-exposure of fish to cadmium. Effect on the survival of the newly hatched alevins. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 107, 152-158.
- García-Romeu F. (1964). Estudios histológicos e histoquímicos sobre el testículo del pejerrey *Basilichthis bonariensis* (C.V.). *Agro Año* 6, N° 10: 40-43.
- García-Romeu F. & Cordero-Funes J.R. (1964). Variación estacional de la altura del epitelio de los conductos eferentes del testículo del pejerrey *Basilichthis bonariensis* (Cuv. Val.). *Agro Año* 6, N° 10: 45-48.
- Gárriz Á., Chalde T. & Miranda L.A. (2010). Almacenamiento a corto plazo de esperma del pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Libro de Resúmenes VI Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos*, Santa Rosa - La Pampa.
- Giari L., Manera M., Simoni E. & Dezfúli B.S. (2007). Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere*, 67, 1171-1181.
- Giesy J.P. & Dickson G.W. (1981). The effect of season and location on phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge in two species of freshwater clams. *Oecologia*, 49, 1-7.
- Giesy J.P., Dobson S. & Solomon K.R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167, 35-120.
- Giesy J.P. & Graney R.L. (1989). Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. *Hydrobiologia*, 188/189: 21-60
- Gimsing A.L. & dos Santos Afonso M. (2005). Glyphosate. En: van Briesen J.M. & Nowack B. (Eds), *Biogeochemistry of Chelating Agents*, ACS Symposium Series Volume 910 Pp 263.
- Gluszczak L., dos Santos Miron D., Crestani M., Braga da Fonseca M., Araújo Pedron F.d., Duarte M.F. & Vieira V.L.P. (2006). Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 237-241.
- Gluszczak L., Miron D.d.S., Moraes B.S., Simões R.R., Schetinger M.R.C., Morsch V.M. & Loro V.L. (2007). Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146C, 519-524.
- Gómez S., Villar C. & Bonetto C. (1998). Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná River and Río de La Plata Estuary. *Environmental Pollution*, 99, 159-165.
- Gómez S.E. & Ferriz R.A. (2001). Algunos Aspectos de la ecofisiología del pejerrey. En: Grosman F. (Ed), *Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey*. Pp. 46-53.
- Grosman F. (Editor). (2001) *Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey*. Editorial Astyanax. Azul, Bs. As., Argentina.
- Guilherme S., Gaivão I., Santos M.A. & Pacheco M. (2010). European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup® - A glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis*, 25, 523-530.

- Gupta R.C. (2007). Organophosphates and carbamates. En: Gupta RC (Ed), *Veterinary toxicology: Basic and clinical principles*. New York: Academic Press. p. 477-88.
- Hara Y., Strüssmann C.A. & Hashimoto S. (2007). Assessment of short-term exposure to nonylphenol in Japanese medaka using sperm velocity and frequency of motile sperm. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53, 406-410.
- Hashimoto S., Watanabe E., Ikeda M., Terao Y., Strüssmann C.A., Inoue M. & Hara A. (2009). Effects of ethinylestradiol on Medaka (*Oryzias latipes*) as measured by sperm motility and fertilization success. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56, 253-259.
- Helmut S. (1991). Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants. Academic Press. U.S.A. 280-300 p.
- Hermes-Lima M. (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. En: Storey HB (Ed), *Functional metabolism: regulation and adaptation*, Pp 319-368.
- Hernández F. (2011). Análisis de Residuos de Plaguicidas Polares, con especial énfasis en el herbicida Glifosato: Problemática Analítica. En: Camino M, Aparicio V (Editoras), *Aspectos ambientales del uso del glifosato*. Ediciones INTA. Pp. 85-94.
- Hildebrand L.D., Sullivan D.S. & Sullivan T.P. (1982). Experimental studies of rainbow trout populations exposed to field applications of Roundup® herbicide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 11, 93-98.
- Hochachka P.W. & Somero G.M. (2002). *Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution*. Oxford University Press, New York.
- Hohreiter D.W., Reinert R.E. & Bush P.B. (1991). Effects of the insecticides carbofuran and fenvalerate on adenylate parameters in bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, 325-331.
- Houlahan J.E., Fidler C.S., Schmidt B.R., Meyer A.H. & Kuzmin S.L. (2000). Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature*, 404, 752-755.
- Howe C.M., Berrill M., Pauli B.D., Helbing C.C., Werry K. & Veldhoen N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1928-1938.
- HRAC. Herbicide Resistance Action Committee. (2013). <http://www.hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideSiteofAction.aspx>
- Hued A.C., Oberhofer S. & Bistoni M.A. (2012). Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, cyprinodontiformes). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 107-117.
- Hutchinson T.H., Yokota H., Hagino S. & Ozato K. (2003). Development of fish tests for endocrine disruptors. *Pure and Applied Chemistry*, 75, 2343-2353.
- IRAM. Norma 29112. (2007). Calidad ambiental - Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático. 24 pp.
- Ishibashi Y., Ekawa H., Hirata H. & Kumai H. (2002). Stress response and energy metabolism in various tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to hypoxic conditions. *Fisheries Science*, 68, 1374-1383.
- Jiraungkoorskul W., Upatham E.S., Kruatrachue M., Sahaphong S., Vichasri-Grams S. & Pokethitiyook P. (2003). Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*, 18, 260-267.
- Jobling S., Coey S., Whitmore J.G., Kime D.E., Van Look K.J.W., McAllister B.G., Beresford N., Henshaw A.C., Brighty G., Tyler C.R. & Sumpter J.P. (2002). Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biology of Reproduction*, 67, 515-524.

- Jobling S., Sheahan D., Osborne J.A., Matthiessen P. & Sumpter J.P. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 194-202.
- Johal M.S., Sharma M.L. & Ravneet (2007). Impact of low dose of organophosphate, monocrotophos on the epithelial cells of gills of *Cyprinus carpio communis* Linn. - SEM study. *Journal of Environmental Biology*, 28, 663-667.
- Kelly D.W., Poulin R., Tompkins D.M. & Townsend C.R. (2010). Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *Journal of Applied Ecology*, 47, 498-504.
- Khoury G.A., Gehris T.C., Tribe L., Torres Sánchez R.M. & dos Santos Afonso M. (2010). Glyphosate adsorption on montmorillonite: An experimental and theoretical study of surface complexes. *Applied Clay Science*, 50, 167-175.
- Kime D.E. (1995). The effects of pollution on reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 5, 52-96.
- Kime D.E., Ebrahimi M., Nysten K., Roelants I., Rurangwa E., Moore H.D.M. & Ollevier F. (1996). Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquatic Toxicology*, 36, 223-237.
- Kime D.E., Van Look K.J.W., McAllister B.G., Huyskens G., Rurangwa E. & Ollevier F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130C, 425-433.
- Khoshnood Z., Khodabandeh S., Moghaddam M.S. & Khorjestan S.M. (2011). Histopathological and pathomorphological effects of mercuric chloride on the gills of persian sturgeon, *Acipenser persicus*, fry. *International Journal of Natural Resources and Marine Sciences*, 1 (1), 23-32.
- Kreutz L.C., Barcellos L.J.G., Silva T.O., Anziliero D., Martins D., Lorensen M., Marteninghe A. & Da Silva L.B. (2008). Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Ciencia Rural*, 38, 1050-1055.
- Kumar A., Rai D.K., Sharma B. & Pandey R.S. (2009). λ -cyhalothrin and cypermethrin induced in vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 96-99.
- Lackner R. (1998) "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. En: Braunbeck T, Hinton DE y Streit B (Eds), *Fish Ecotoxicology*, Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, Pp 203-224
- Lagadic L., Caquet Th. & Amiard J.C. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. En: Lagadic et al. *Biomarqueurs en Écotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris. Pp 1-9.
- Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T. & Patzner R.A. (1998). Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*, 163, 163-181.
- Lahnsteiner F., Mansour N. & Berger B. (2004). The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 65, 1283-1297.
- Lajmanovich R.C., Junges C.M., Attademo A.M., Peltzer P.M., Cabagna-Zenklusen M.C. & Basso A. (2013). Individual and Mixture Toxicity of Commercial Formulations Containing Glyphosate, Metsulfuron-Methyl, Bispyribac-Sodium, and Picloram on *Rhinella arenarum* Tadpoles. *Water, Air and Soil Pollution*, 224, 1-13.
- Lajmanovich R.C., Sandoval M.T. & Peltzer P.M. (2003). Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 612-618.
- Langiano V.d.C. & Martinez C.B.R. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 147C, 222-231.

- LeBlanc G.A. & Bain L.J. (1997). Chronic toxicity of environmental contaminants: Sentinels and biomarkers. *Environmental Health Perspectives*, 105, 65-80.
- Le Bouffant R., Cormier P., Cueff A., Bellé R. & Mulner-Lorillon O. (2007). Sea urchin embryo as a model for analysis of the signaling pathways linking DNA damage checkpoint, DNA repair and apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1723-1734.
- Le Gal, Y., Lagadic, L., Le Bras, S. & Caquet, Th. (1997). Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. En: Lagadic L., Caquet Th., Amiard J.-C. & Ramade F. (Eds.), *Biomarqueurs en Ecotoxicologie: Aspects Fondamentaux*, Masson Editeur, Paris. Pp. 241-285.
- Li M.H. (2008). Effects of nonylphenol on cholinesterase and carboxylesterase activities in male guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 781-786.
- López H.L. & García M.L. (2001). Aspectos históricos e importancia regional del pejerrey bonaerense. En: Grosman F. (Editor), *Fundamentos biológicos, económicos y sociales para una correcta gestión del recurso pejerrey*. Pp. 15-22.
- Lorenzatti E., Maitre M.I., Argelia L., Lajmanovich R., Peltzer P. & Anglada M. (2004). Pesticide residues in immature soybeans of Argentina croplands. *Fresenius Environmental Bulletin*, 13, 675-678.
- Low W.P., Lane D.J.W. & Ip Y.K. (1988). A comparative study of terrestrial adaptations of the gills in three mudskippers - *Periophthalmus chrysospilos*, *Boleophthalmus boddarti*, and *Periophthalmodon schlosseri*. *Biological Bulletin*, 175, 434-438.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Fan A.L. & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lushchak O.V., Kubrak O.I., Storey J.M., Storey K.B. & Lushchak V.I. (2009). Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, 76, 932-937.
- Lushchak V.I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101, 13-30.
- Maina J.N. (1998). *The gas exchangers. Structure, function, and evolution on the respiratory processes*. Springer-Verlag, Berlin.
- Malik J., Barry G. & Kishore G. (1989). The herbicide glyphosate. *BioFactors*, 2, 17-25.
- Mallatt J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 630-648.
- Mann R.M., Hyne R.V., Choung C.B. & Wilson S.P. (2009). Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, 157, 2903-2927.
- Marchand M.J., Pieterse G.M. & Barnhoorn I.E.J. (2010). Sperm motility and testicular histology as reproductive indicators of fish health of two feral fish species from a currently DDT sprayed area, South Africa. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 707-714.
- Marc J., Le Breton M., Cormier P., Morales J., Bellé R. & Mulner-Lorillon O. (2005). A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203, 1-8.
- Marc J., Mulner-Lorillon O., Boulben S., Hureau D., Durand G. & Bellé R. (2002). Pesticide roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chemical Research in Toxicology*, 15, 326-331.
- Mazeud M.M. & Mazeud F. (1981). Adrenergic responses to stress in fish. En: Pickering A. (Ed.). *Stress and Fish*. Academic Press, New York. Pp. 49-75.
- Menni R.C. (2004). Peces y ambientes en la Argentina continental. Monografías del Museo Argentino de Ciencias Naturales. Número 5.

- Mermoz M.L.A. & Salibián A. (1992). Dinámica de una población de alevinos de *Cnesterodon sp.* criada en cautiverio: resultados preliminares. *V Jornada Científica Ecología, Depto Cs Básicas-UNLuján*. Serie Resúmenes 2 (2).
- Minoprio, J.L. (1944). Consideraciones sobre el desarrollo embrionario del pejerrey. *Acta Zoologica Lilloana*, 2, pp. 9-25.
- Miranda L.A., Berasain G.E., Velasco C.A.M., Shirojo Y. & Somoza G.M. (2006). Natural spawning and intensive culture of pejerrey *Odontesthes bonariensis* juveniles. *Biocell*, 30, 157-162.
- Miranda L.A., Cassará M.C. & Somoza G.M. (2005). Increase in milt production by hormonal treatment in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes 1835). *Aquaculture Research*, 36, 1473-1479.
- Mitchelmore C.L., Birmelin C., Chipman J.K. & Livingstone D.R. (1998). Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussels (*Mytilus edulis*) digestive gland cells. *Aquatic Toxicology*, 41, 193-212.
- Moal J., Le Coz J.R., Samain J.F. & Daniel J.Y. (1991). Adenylate energy charge: A possible trophic index for management of oyster intensive aquaculture. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C, 201-205.
- Modesto K.A. & Martínez C.B.R. (2010a). Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81, 781-787.
- Modesto K.A. & Martínez C.B.R. (2010b). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78, 294-299.
- Molero A.M. & Pisanó A. (1986). Different susceptibility to lindane toxicity between male and female of *Cnesterodon decemmaculatus*. *Comunicaciones Biológicas*, 4, 377-386.
- Moore L.J., Fuentes L., Rodgers J.H., Bowerman W.W., Yarrow G.K., Chao W.Y. & Bridges Jr W.C. (2012). Relative toxicity of the components of the original formulation of Roundup® to five North American anurans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 128-133.
- Moralev S.N. & Rozengart E.V. (2004). Comparative sensitivity of cholinesterases of different origin to some irreversible inhibitors. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 40, 1-17.
- Mousdale D.M. & Coggins J.R. (1984). Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from seedlings of *Pisum sativum L.* *Planta*, 160, 78-83.
- Muñiz Saavedra J. & Piacentino G. (1991). Estudio del desarrollo ontogenético de *Odontesthes bonariensis* (Cuvier y Valenciennes, 1835). *Medio Ambiente*, 11, Pp. 61-68.
- Murack, P.J., Parrish, J. & Barry, T.P. (2011). Effects of progesterone on sperm motility in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 104, 121-125.
- Nelson D.L. & Cox M.M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York.
- Nešković N.K., Poleksić V., Elezović I., Karan V. & Budimir M. (1996). Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56, 295-302.
- Newman M.C. & Clements W.H. (2008). *Ecotoxicology. A comprehensive treatment*. CRC Press-Taylor & Francis Group. Boca Raton FL.
- Olurin K.B., Olojo E.A.A., Mbaka G.O. & Akindele A.T. (2006). Histopathological responses of the gill and liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to the herbicide, glyphosate. *African Journal of Biotechnology*, 5, 2480-2487.
- Ortiz-Ordoñez E., Uría-Galicia E., Ruiz-Picos R.A., Sánchez Duran A.G., Hernández Trejo Y., Sedeño-Díaz J.E. & López-López E. (2011). Effect of Yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 443-452.

- Osten J.R. v-, Ortíz-Arana A., Guilhermino L. & Soares A.M.V.M. (2005). In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere*, 58, 627-636.
- Pacheco-Marino S.G., Cabello M.N. & Salibián A. (2011). Effect of three fungicides on in vitro growth of *Fusarium solani* and *Fusarium semitectum*, parasitic on *Odontesthes bonariensis* eggs. *International Journal of Environment and Health*, 5, 293-303.
- Pacheco-Marino S.G. & Salibián A. (2010). Acute toxicity of three antifungal chemicals on silverside *Odontesthes bonariensis*, Valenciennes (1835) eggs. *International Journal of Environment and Health*, 4 (4), 333-341.
- Pandey S., Parvez S., Ansari R.A., Ali M., Kaur M., Hayat F., Ahmad F. & Raisuddin S. (2008). Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chemico-Biological Interactions*, 174, 183-192.
- Pengue W.A. (compilador) (2008). *La apropiación y el saqueo de la naturaleza. Conflictos ecológicos distributivos en la Argentina del Bicentenario*, Lugar Editorial, Buenos Aires.
- Pérez G.L., Torremorell A., Mugni H., Rodríguez P., Solange Vera M., Do Nascimento M., Allende L., Bustingorry J., Escaray R., Ferraro M., Izaguirre I., Pizarro H., Bonetto C., Morris D.P. & Zagarese H. (2007). Effects of the herbicide roundup on freshwater microbial communities: A mesocosm study. *Ecological Applications*, 17, 2310-2322.
- Pérez G.L., Vera M.S. & Miranda L. (2011). Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. En: Kortekamp A (Ed), *Herbicides and Environment*. InTech. Pp 343-368.
- Peruzzo P.J., Porta A.A. & Ronco A.E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156, 61-66.
- Pessagno R.C., dos Santos Afonso M. & Torres Sanchez R.M. (2005). N-phosphonomethylglycine interactions with soils. *Journal of the Argentine Chemical Society*, 93, 97-108.
- Pessagno R.C. & dos Santos Afonso M. (2006). Estudio comparativo del impacto ambiental de tres herbicidas de uso común en cultivos de soja y trigo. En: Gallardo Lancho J.F.(Ed.) *Medioambiente en Iberoamérica. Visión desde la Física y la Química en los albores del siglo XXI*, Tomo III, 345-352.
- Pessagno R.C., Torres Sánchez R.M. & dos Santos Afonso M. (2008). Glyphosate behavior at soil and mineral-water interfaces. *Environmental Pollution*, 153, 53-59.
- Picado A.M., Sylvestre C., Penada M.C. & Le Gal Y. (1988). Evaluation de la charge énergétique adénylique du bivalve *Cardium sp.* Dans l'estuaire du Sado (Portugal) *Oceanis*, 14, pp. 479-486
- Piccolo A., Celano G., Arienzo M. & Mirabella A. (1994). Adsorption and desorption of glyphosate in some European soils. *Journal of Environmental Science and Health*, 29B, 1105-1115.
- PNUMA (2002). *Perspectivas del medio ambiente mundial. GEO-3*. Ed. Mundiprensa. ISBN: 84-8476-062-6.
- Porta A. (1996). Contaminación ambiental: Uso de indicadores bioquímicos en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 30, 67-79.
- Pottinger T.G. & Calder G.M. (1995). Physiological stress in fish during toxicological procedures: A potentially confounding factor. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10, 135-146.
- Pottinger T.G., Carrick T.R. & Yeomans W.E. (2002). The three-spined stickleback as an environmental sentinel: Effects of stressors on whole-body physiological indices. *Journal of Fish Biology*, 61, 207-229.
- Racke K.D. (1992). Degradation of organophosphorus insecticides in environmental matrices. En: Chambers JE, Levi PE (Eds.), *Academic Press*. Pp. 47-78.

- Reigart J.R. & Roberts J.R. (Eds.) (1999). *Recognition and Management of Pesticide Poisonings*. Washington, US EPA.
- Relyea R.A. (2005a). The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications*, 15, 618-627.
- Relyea R.A. (2005b). The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, 15, 1118-1124.
- Renshaw G.M.C., Kerrisk C.B. & Nilsson G.E. (2002). The role of adenosine in the anoxic survival of the epaulette shark, *Hemiscyllium ocellatum*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131B, 133-141.
- Repetto Jiménez M. & Repetto Kuhn G. (2009). *Toxicología Fundamental*. Ediciones Díaz de Santos, Madrid.
- Ringuelet R. (1943). *Piscicultura del pejerrey o aterinicultura*. Colección Agro. Editorial Suelo Argentino, Buenos Aires.
- Ringuelet R.A., Aramburu R.H. & Alonso de Aramburu A. (1967). *Los peces argentinos de agua dulce*. Ediciones CIC Provincia de Buenos Aires.
- Romano M.A., Wisniewski P., Viau P., Romano R.M., Campos D.A., Bernardi M.M., Santos L.D., De Souza P.B., Nunes M.T. & De Oliveira C.A. (2012). Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Archives of Toxicology*, 86, 663-673.
- Romano R.M., Romano M.A., Bernardi M.M., Furtado P.V. & Oliveira C.A. (2010). Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Archives of Toxicology*, 84, 309-317.
- Ronco A.E. (2011). Impacto de Plaguicidas en ambientes acuáticos pampeanos: Integración de estudios químico ecotoxicológicos en experimentos de campo y laboratorio, con especial énfasis en el glifosato. En: Camino M, Aparicio V (Editoras), *Aspectos ambientales del uso del glifosato*. Ediciones INTA. Pp. 85-94.
- Rossi S.C., Dreyer Da Silva M., Piancini L.D.S., Oliveira Ribeiro C.A., Cestari M.M. & Silva De Assis H.C. (2011). Sublethal effects of waterborne herbicides in tropical freshwater fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87, 603-607.
- Rubin J.L., Gainess C.G. & Jensen R.A. (1984). Glyphosate inhibition of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from suspension-cultured cells of *Nicotina glauca*. *Plant Physiology*, 75, 839-845.
- Rueppel M.L., Brightwell B.B., Schaefer J. & Marvel J.T. (1977). Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 517-528.
- Rurangwa E., Biegñiewska A., Slominska E., Skorkowski E.F. & Ollevier F. (2002). Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: A biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131C, 335-344.
- Rurangwa E., Kime D.E., Ollevier F. & Nash J.P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234, 1-28.
- SAGPyA, (2012). Secretaría de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación. República Argentina. En línea <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>
- Salbeo J., Pretto A., Gioda C.R., De Menezes C.C., Lazzari R., Radünz Neto J., Baldisserotto B. & Loro V.L. (2010). Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 740-745.
- Salibián A. (2006). Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista River of Argentina. En: Ware GW (Editor), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 185, 35-65.

- Salibián A (2011). Bioquímica Ambiental y Ecotoxicología modelo siglo XXI: nuevos caminos y desafíos. *Anales Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica* (Argentina), 37-40.
- Sarmiento P.L., Ossana N.A. & Salibián A. (2009) Branquias de larvas premetamórficas de *Lithobates catesbeianus* (Amphibia, Anura): Técnica de procesamiento para el análisis ultraestructural en el microscopio electrónico de barrido. *Acta Microscopica*, 18C, 649-650
- Schlenk D., Handy R., Steinert S., Depledge M.H. & Benson W. (2008a). Biomarkers. En: Di Giulio R.T., Hinton D.E. (Eds), *The toxicology of fishes*. CRC Press – Taylor & Francis Group. Boca Raton. FL. Pp. 683-731.
- Schlenk D., Celander M., Gallagher E.P., George S., James M., Kullman S.W., van den Hurk P. & Willet K. (2008b) Biotransformation in fishes. En: *The Toxicology of Fishes*. Di Giulio RT, Hinton DE (Eds). Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, Pp. 153-234
- Schultz I.R., Skillman A., Nicolas J.M., Cyr D.G. & Nagler J.J. (2003). Short-term exposure to 17 α -ethynylestradiol decreases the fertility of sexually maturing male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 1272-1280.
- Segner H. & Braunbeck T. (1998). Cellular response profile to chemical stress. En: Schüürmann G., Markert B. (Eds.), *Ecotoxicology. Ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects*. John Wiley & Sons, New York. Pp. 521 - 569.
- Seifter S., Dayton S., Novic B. & Muntwyler E. (1949). The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Archives Biochemistry*, 25, 191-200.
- Shiogiri N.S., Paulino M.G., Carraschi S.P., Baraldi F.G., da Cruz C. & Fernandes M.N. (2012). Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34, 388-396.
- Singh R.K. & Sharma B. (1998). Carbofuran-induced biochemical changes in *Clarias batrachus*. *Pesticide Science*, 53, 285-290.
- Sokolova I.M., Sokolov E.P. & Ponnappa K.M. (2005). Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *Aquatic Toxicology*, 73, 242-255.
- Solomon K.R. & Thompson D.G. (2003). Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 6B, 289-324.
- Somma L.A., Mastrangelo M. & Ferrari L. (2011). *Manual de producción de *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) en Laboratorio*. Editorial Utopías, Buenos Aires.
- Somoza G.M., Miranda L.A., Berasain G.E., Colautti D., Remes Lenicov M. & Strüssmann C.A. (2008). Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. *Aquaculture Research*, 39, 784-793.
- Soreq H. & Seidman S. (2001). Acetylcholinesterase - New roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 294-302.
- Soso A.B., Barcellos L.J.G., Ranzani-Paiva M.J., Kreutz L.C., Quevedo R.M., Anziliero D., Lima M., Silva L.B.d., Ritter F., Bedin A.C. & Finco J.A. (2007). Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23, 308-313.
- Stehr C.M., Linbo T.L., Baldwin D.H., Scholz N.L. & Incardona J.P. (2009). Evaluating the effects of forestry herbicides on fish development using rapid phenotypic screens. *North American Journal of Fisheries Management*, 29, 975-984.
- Strüssmann C.A. (1989). Basic studies on seed reproduction of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Doctoral Thesis. Tokyo University of Fisheries.

- Strüssmann C.A., Conover D.O., Somoza G.M. & Miranda L.A. (2010). Implications of climate change for the reproductive capacity and survival of New World silversides (family Atherinopsidae). *Journal of Fish Biology*, 77, 1818-1834.
- Strüssmann C.A., Renard P., Ling H. & Takashima F. (1994). Motility of pejerrey *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fisheries Science*, 60, pp. 9-13.
- Sturm A., Wogram J., Segner H. & Liess M. (2000). Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Application in biomonitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 1607-1615.
- Szarek J., Siwicki A., Andrzejewska A., Terech-Majewska E. & Banaszkiwicz T. (2000). Effects of the herbicide Roundup(TM) on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Environmental Research*, 50, 263-266.
- Takahashi M. (2007). Oviposition site selection: Pesticide avoidance by gray treefrogs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 1476-1480.
- Thébault M.T., Biegñiewska A., Raffin J.P. & Skorkowski E.F. (1996). Short term cadmium intoxication of the shrimp *Palaemon serratus*: Effect on adenylate metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113C, 345-348.
- Thompson H.M. (1999). Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*, 8, 369-384.
- Thompson J. & Bannigan J. (2008). Cadmium: Toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive Toxicology*, 25, 304-315.
- Tierney K., Casselman M., Takeda S., Farrell T. & Kennedy C. (2007). The relationship between cholinesterase inhibition and two types of swimming performance in chlorpyrifos-exposed coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 998-1004.
- Timbrell J.A., Draper R. & Waterfield C.J. (1996). Biomarkers in toxicology: New uses for some old molecules? *Biomarkers*, 1, 1-11.
- Timbrell J.A. (2009). *Principles of Biochemical Toxicology*, Informa Healthcare, New York.
- Torres G.A., Gonzalez S & Peña E (2010). Descripción anatómica, histológica y ultraestructural de la branquia e hígado de tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Morphology*, 28, 703-712.
- Toth G.P., Christ, S.A., McCarthy, H.W., Torsella, J.A. & Smith, M.K. (1995). Computer-assisted motion analysis of sperm from the common carp. *Journal of Fish Biology* 47: 986-1003.
- Trinelli M.A., Cantera G. & dos Santos Afonso M. (2012). Estudios de fotodegradación de glifosato en medio acuoso En: dos Santos Afonso, M y Torres Sanchez, R M (Eds.), *Ciencia y Tecnología Ambiental Un enfoque integrador*. Editorial AAPC. Buenos Aires.
- Tripathi G. & Shasmal J. (2011). Concentration related responses of chlorpyrifos in antioxidant, anaerobic and protein synthesizing machinery of the freshwater fish, *Heteropneustes fossilis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99, 215-220.
- 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*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113C, 45-49.
- Tsuda T., Kojima M., Harada H., Nakajima A. & Aoki S. (1997). Relationships of bioconcentration factors of organophosphate pesticides among species of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 116C, 213-218.
- Tsui M.T.K. & Chu L.M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52, 1189-1197.

- Tsuzuki M.Y., Aikawa H., Strüssmann C.A. & Takashima F. (2000). Comparative survival and growth of embryos, larvae, and juveniles of pejerrey *Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri* at different salinities. *Journal of Applied Ichthyology*, 16, 126-130.
- USEPA. Environmental Protection Agency. (1993). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.
- USEPA. Environmental Protection Agency. (1996). Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1400. Fish Early-Life Stage Toxicity Test. <http://www.epa.gov/>
- USEPA. Environmental Protection Agency. (1999) Technical Fact Sheets on: Glyphosate. Primary Drinking Water regulations.
- Van den Thillart, G. & van Raaij, M (1995). Endogenous fuels; non-invasive *versus* invasive approaches. En: Hochachka P.P. & Mommsen T.P. (Eds), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (Metabolic Biochemistry) - Volume 4. Elsevier, Amsterdam. Pp. 33-63.
- Van der Oost R., Beyer J. & Vermeulen N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149.
- Van Dyk J.S. & Pletschke B. (2011). Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere*, 82, 291-307.
- Varó I., Amat F. & Navarro J.C. (2008). Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species. *Aquatic Toxicology*, 88, 53-61.
- Vera M.S., Lagomarsino L., Sylvester M., Pérez G.L., Rodríguez P., Mugni H., Sinistro R., Ferraro M., Bonetto C., Zagarese H. & Pizarro H. (2010). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19, 710-721.
- Vetter R.D. & Hodson R.E. (1982). Use of adenylate concentrations and adenylate energy charge as indicators of hypoxic stress in estuarine fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39, 535-541.
- Viant M.R., Werner I., Rosenblum E.S., Gantner A.S., Tjeerdema R.S. & Johnson M.L. (2003). Correlation between heat-shock protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature. *Fish Physiology and Biochemistry*, 29, 159-171.
- Viarengo A., Lowe D., Bolognesi C., Fabbri E. & Koehler A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146C, 281-300.
- Vigliano F.A., Aleman N., Quiroga M.I. & Nieto J.M. (2006). Ultrastructural characterization of gills in juveniles of the Argentinian silverside, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes, 1835) (Teleostei: Atheriniformes). *Journal of Veterinary Medicine*, 35C, 76-83.
- Villar C.A., Gómez S.E. & Bentos C.A. (2000). Lethal concentration of Cu in the neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Cyprinodontiformes). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65, 465-469.
- Vogel W.H. (1993). The Effect of Stress on Toxicological Investigations. *Human & Experimental Toxicology*, 12, 265-271.
- Waiwood B.A., Haya K. & van Eeckhaute (1992). Energy metabolism of hatchery-reared juvenile salmon (*Salmo salar*) exposed to low pH. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101C, 49-56.
- Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M. & Peakall D.B. (2006). *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis. Boca Raton, FL.

- Wallimann T., Tokarska-Schlattner M. & Schlattner U. (2011). The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino acids*, 40, 1271-1296.
- Wang W.N., Wang A.L., Chen L., Liu Y. & Sun R.Y. (2002). Effects of pH on survival, phosphorus concentration, adenylate energy charge and Na⁺-K⁺ ATPase activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles. *Aquatic Toxicology*, 60, 75-83.
- Wang Y.S., Jaw C.G. & Chen Y.L. (1994). Accumulation of 2,4-D and glyphosate in fish and water hyacinth. *Water, Air, and Soil Pollution*, 74, 397-403.
- Wendelaar Bonga S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77, 591 - 625.
- Werner I., Viant M.R., Rosenblum E.S., Gantner A.S., Tjeerdema R.S. & Johnson M.L. (2006). Cellular responses to temperature stress in steelhead trout (*Onchorynchus mykiss*) parr with different rearing histories. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32, 261-273.
- WHO. (1993). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155. Geneva.
- WHO. (1994). Glyphosate. Environmental Health Criteria 159. Geneva.
- Wilson-Leedy J.G. & Ingermann R.L. (2007). Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, 67, 661-672.
- Winston G.W. & Di Giulio R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19, 137-161.
- Wojtaszek B.F., Staznik B., Chartrand D.T., Stephenson G.R. & Thompson D.G. (2004). Effects of Vision® herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 832-842.
- Xie L., Thripleton K., Irwin M.A., Siemering G.S., Mekebri A., Crane D., Berry K. & Schlenk D. (2005). Evaluation of estrogenic activities of aquatic herbicides and surfactants using an rainbow trout vitellogenin assay. *Toxicological Sciences*, 87, 391-398.
- Zar JH (1996). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.
- Zhu Y., Zhang F., Tong C. & Liu W. (1999). Determination of glyphosate by ion chromatography. *Journal of Chromatography*, 850A, 297-301.

Anexo I - Equipamiento utilizado.

Balanza analítica: Mettler Toledo AL204 (± 0.05 mg).

Baño termostático: Baño termostático LAUDA ecoline 011.

Calibre Digital: Schwyz Caldig 150-001 (± 0.01 mm)

Cámara de Incubación: Bio-Control Modelo AX-Z.

Cromatografía Iónica: Equipo Dionex DRX-100, con columna AG4-AS4, conectado a una PC con el programa Clarity Lite.

Espectrofotómetro: Equipo UV/Vis Pharmasec 1700 (Shimadzu) conectado a una PC mediante el programa UV-Probe.

Homogeneizador: Equipo Decalab, rotor vidrio – teflón.

HPLC: Equipo Jasco compuesto de tres módulos: Intelligent HPLC Pump Model PU-2089, Intelligent UV detector Model UV-2070/75, e Interface box LC-NetII/ADC), conectado a una PC con el software ChromPass. Columna C18 fase reversa (columna Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 250mm, 5 micrones de tamaño de partícula, Agilent).

Lupa: Marca Carl Zeiss, modelo Stemi 2000-C. Estereoscópica con zoom.

Microcentrífuga refrigerada (tubos eppendorf): HERMLE Z 216 MK.

Osmómetro: Equipo Vapro 5520 (*Vapor Pressure Osmometer*), Wescor.

pHmetro: Metrohm 744.

Sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*): Cámara Basler A602fc-2, acoplada a un microscopio Olympus CX41 y a una PC con los programas ImagenJ y VirtualDub.

Ultracentrífuga refrigerada: Sigma Modelo 3-18K con rotor 12158.

Anexo II - Medios.

- Agua Moderadamente Dura – AMD (USEPA, 1993)

<i>Reactivos</i>	<i>mg.L⁻¹</i>
NaHCO ₃	96.0
CaSO ₄ .2H ₂ O	60.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	60.0
KCl	4.0

pH: 7.4 – 7.8. Dureza: 80 – 100 mg CaCO₃.L⁻¹. Alcalinidad: 60 – 70 mg CaCO₃.L⁻¹.

- Buffer Fosfato 0.1 M para la preparación de homogenatos:

<i>Reactivos</i>	<i>g.L⁻¹</i>
NaH ₂ PO ₄	13.8
KCl	11.2
EDTA	0.372
DTT (ditiotriol)	0.154
Glicerol	10%

El NaH₂PO₄ y el KCl deben ser previamente disueltos en 500 ml de agua bidestilada. Por otro lado debe disolverse el EDTA y el DTT en 115 ml de glicerol 87%. Finalmente se mezclan ambas soluciones, se ajusta a pH = 7.4 y se lleva a 1 L.

- Buffer Fosfato 0.1 M para la determinación de AChE:

Solución Stock KH_2PO_4 0.2 M	
<i>Reactivos</i>	<i>g.L⁻¹</i>
KH_2PO_4	27.2

Solución Stock K_2HPO_4 0.2 M	
<i>Reactivos</i>	<i>g.L⁻¹</i>
K_2HPO_4	34.8

Se mezclan 26.3 ml de la primer solución stock y 473.5 ml de la segunda y se lleva a 1 L. Finalmente se ajusta a $\text{pH} = 8$.

- Buffer Fosfato 0.05 M para la determinación de Catalasa:

<i>Reactivos</i>	<i>g.L⁻¹</i>
NaH_2PO_4	6.0

El buffer debe llevarse a $\text{pH} = 7.2$ con NaOH.