



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Exposición de *Cnesterodon decemmaculatus* a clorpirifós y glifosato. Efectos sobre la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) y variaciones estacionales en la relación dosis-respuesta

Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires en Ciencias Ambientales.

Lic. Daissy Lisbeth Bernal Rey

Directora de Tesis: Dra. Renata Menéndez Helman

Co-directora: Dra. María dos Santos Afonso

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, Febrero de 2018

Exposición de *Cnesterodon decemmaculatus* a clorpirifós y glifosato. Efectos sobre la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) y variaciones estacionales en la relación dosis-respuesta

Resumen

En Argentina, con la expansión de la frontera agrícola aumentó la aplicación de plaguicidas. En particular, el herbicida glifosato [N- (fosfonometil) glicina; PMG] y el insecticida clorpirifós [O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil)-fosforotioato, CPF] son ampliamente utilizados en la región. Por ello se hace necesario caracterizar la toxicidad sobre especies no-blanco. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la exposición de estos plaguicidas sobre la actividad de acetilcolinesterasa (AChE, biomarcador de neurotoxicidad) en la sección anterior de un teleósteo nativo, *Cnesterodon decemmaculatus*, y se analizaron los posibles cambios en la relación dosis-respuesta en distintas condiciones ambientales. Se realizaron bioensayos semi-estáticos de toxicidad aguda bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo determinándose en invierno una inhibición estadísticamente significativa de la actividad de AChE del 46 y 66 % para 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y del 25 y 31 % para 1 y 10 $\text{mg PMG} \times \text{L}^{-1}$. Posteriormente se determinó un patrón de inhibición para CPF ($\text{CI}_{50} = 254 \mu\text{M}$) y para su metabolito activo (clorpirifós-oxón) ($\text{CI}_{50} = 10,2 \text{ nM}$) mediante ensayos *in vitro*, confirmando que éste último presenta un mecanismo de inhibición directo sobre la enzima. En cambio, para PMG no se observó un efecto inhibitorio *in vitro* en un amplio rango de concentraciones. Finalmente se confirmó la existencia de ritmos circanuales en los niveles basales de la actividad de AChE y se evaluó la existencia de variaciones estacionales en la relación dosis-respuesta. Para ello se llevaron adelante ensayos de exposición a CPF y PMG durante las cuatro estaciones del año, observándose una mayor susceptibilidad de los animales a la exposición a ambos contaminantes durante la estación de otoño. Los resultados presentados indican que la actividad de AChE resulta un biomarcador sensible para la exposición a CPF y PMG, incluso a concentraciones bajas ambientalmente relevantes. Al mismo tiempo, indican que para su utilización como biomarcador es necesario considerar las variaciones naturales y cómo la susceptibilidad de la respuesta a los contaminantes puede verse afectada en distintas condiciones ambientales.

Palabras claves: clorpirifós, glifosato, Acetilcolinesterasa, *Cnesterodon decemmaculatus*.

Effects of chlorpyrifos and glyphosate exposure on acetylcholinesterase activity (AChE) in *Cnesterodon decemmaculatus*. Seasonal variations in the dose-response relationship

Abstract

The application of pesticides has been increased in Argentina, associated with the expansion of the agricultural frontier. In particular, the herbicide glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine; PMG] and the insecticide chlorpyrifos [O, O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl)-phosphorothioate, CPF] are widely used in the region. Therefore, it is necessary to characterize the toxicity on non-target species. In the present work, the effect of the exposure of these pesticides on the activity of acetylcholinesterase (AChE, biomarker of neurotoxicity) in the anterior section of *Cnesterodon decemmaculatus*, a native teleost, was evaluated. Also, the possible changes in the dose-response ratio in different environmental conditions were analyzed. Semi-static bioassays of acute toxicity were carried out under controlled conditions of temperature and photoperiod. Statistically significant inhibition of AChE activity of 46 and 66 % for 1 and 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ and 25 and 31 % for 1 and 10 $\text{mg PMG} \times \text{L}^{-1}$, were determined in winter season. Subsequently, an inhibition pattern was determined by *in vitro* tests obtaining $\text{IC}_{50} = 254 \mu\text{M}$ and $\text{IC}_{50} = 10.2 \text{ nM}$ for CPF and its active metabolite (chlorpyrifos-oxón) respectively, confirming that it presents a mechanism of direct inhibition on the enzyme. In contrast, for PMG, no *in vitro* inhibitory effect was observed in a wide range of concentrations. Finally, the existence of circannual rhythms in the basal levels of AChE activity was confirmed and the existence of seasonal variations in the dose-response ratio was evaluated. Furthermore, tests of exposure to CPF and PMG were carried out during the four seasons of the year. Thus, the circannual rhythms in the basal levels of AChE activity were determined. Moreover, the existence of seasonal variations in the dose-response ratio was established by observing a greater susceptibility of the animals to the exposure to both pesticides during the autumn season. The results presented denote that AChE activity is a sensitive biomarker for exposure to CPF and PMG, even at low concentrations that are environmentally relevant. At the same time, to use AChE as a biomarker it is necessary to consider the natural variations and how the susceptibility of the response to pollutants may be affected in different environmental conditions.

Keywords: chlorpyrifos, glyphosate, acetylcholinesterase, *Cnesterodon decemmaculatus*.

Agradecimientos

A mis directoras de quienes aprendo un montón todos los días, a Renata Menéndez Helman, porque antes que ser mi directora fue una amiga, me orientó, me escuchó, me aconsejó y siempre me apoyó sobre todo en los momentos más difíciles de mi permanencia en este país. A Mari por toda su generosidad, por apoyarme, compartir sus conocimientos y darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. “Gracias a ellas hoy tengo la oportunidad de continuar con mis estudios con una beca doctoral, un sueño que en mi país es casi un imposible”.

A mi familia, mis padres Pedro Bernal García y Carmen Rey Mora, por su apoyo incondicional e inculcarme el valor de la responsabilidad. A mis hermanos Wilman, Norma, Yehison, Andrea y Jenny por confiar en mí y ser un ejemplo a seguir, les agradezco sus palabras de aliento y motivación en los momentos de dificultad, especialmente a mi hermanita gemela “Jenny”, quien desde el vientre de mi madre siempre me ha acompañado.

A las chinitas del laboratorio, Ceci y Anita quienes siempre me han dado consejos, comparten sus conocimientos, me han dado ánimos cuando los he necesitado y dialogan conmigo en compañía del mate.

A mis amigos, Diana Patricia Cruz Pinzón, Luz Beltrán Aguilera, Miguel Falcón y Pablo Cameroto, por compartir conmigo los momentos de alegría y ser mi pañuelo de lágrimas cuando los he necesitado. Mil gracias por todas las tardes de cafecito con arepa.

A mi compañero de vida Julián Gigena, por todo su amor incondicional, sus enseñanzas, por ser uno de mis pilares, pero especialmente por hacer de este país mi hogar. A su familia: Doña Julia, Don Luis y Gabi por abrirme las puertas de su casa y acogerme como una hija y hermana más.

... Gracias a todos ellos, porque hoy más que nunca puedo estar segura que vale la pena estar tan lejos de casa y de muchos seres queridos.

Tabla de Contenido

Resumen	2
Abstract	3
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. Plaguicidas.....	16
1.1.1. Definición y Clasificación	16
1.1.2. Dinámica de los plaguicidas en el ambiente.....	17
1.1.3. Plaguicidas organofosforados.....	19
1.1.3.1. Insecticidas organofosforados	20
1.1.3.1.1. Clorpirifós. Características generales	21
1.1.3.1.2. Clorpirifós: Movilidad y destino en el ambiente.....	26
1.1.3.2. Herbicidas organofosforados.....	26
1.1.3.2.1. Glifosato. Características generales.....	27
1.1.3.2.2. Glifosato. Movilidad y destino en el ambiente.....	31
1.2. Estudios ecotoxicológicos.	32
1.2.1. Acetilcolinesterasa.....	32
1.2.2. Efectos de los organofosforados sobre la enzima AChE	35
1.2.3. AChE como biomarcador de neurotoxicidad.....	36
1.3. <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> como especie <i>test</i>.....	39
1.4. Hipótesis	41
1.5. OBJETIVO GENERAL.....	42
1.5.1. Objetivos específicos:	42
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.1. Organismo <i>test</i>: <i>Cnesterodon decemmaculatus</i>.....	44

2.2.	Ensayos <i>in vivo</i>	45
2.2.1.	Preparación de homogenatos	48
2.2.2.	Determinación de la actividad de AChE.	49
2.2.3.	Determinación de la concentración de proteínas.	51
2.2.4.	Determinación de la concentración de plaguicidas en los medios de ensayo.	52
2.3.	Ensayos <i>in vitro</i>	53
2.3.1.	Ensayos <i>in vitro</i> - CPF y CPF-oxón	53
2.3.2.	Ensayos <i>in vitro</i> - PMG	57
2.4.	Expresión de resultados y análisis estadístico	59
2.5.	Reactivos	60
2.5.1.	Plaguicidas	60
2.5.1.1.	Clorpirifós	60
2.5.1.2.	Clorpirifós-oxón.....	61
2.5.1.3.	Glifosato	61
2.6.	Medios	62
2.6.1.	Agua moderadamente dura (AMD)	62

CAPÍTULO 3. RESULTADOS **64**

3.1.	Efectos de la exposición a glifosato y clorpirifós sobre la actividad de acetilcolinesterasa en <i>Cnesterodon decemmaculatus</i>.....	64
3.1.1.	Efecto de la exposición a clorpirifós sobre la actividad de AChE.	64
3.1.2.	Efecto de la exposición a glifosato sobre la actividad de AChE.	66
3.2.	Ensayos <i>in vitro</i>.	67
3.2.1.	Ensayos <i>in vitro</i>: Exposición a clorpirifós (CPF).	68
3.2.2.	Ensayos <i>in vitro</i>: Exposición a clorpirifós-oxón (CPF-oxón).	69
3.2.3.	Ensayos <i>in vitro</i>: Exposición a glifosato (PMG).	70

3.3. Ritmos circanuales. Respuesta de la actividad de AChE durante las diferentes estaciones del año.	71
3.3.1. Variaciones estacionales en los niveles basales de AChE.....	72
3.3.2. Variación estacional en la respuesta de la actividad de AChE en ejemplares expuestos a plaguicidas.	76
3.3.2.1. Variación estacional en la respuesta de la actividad de AChE en ejemplares expuestos a CPF.....	77
3.3.2.2. Variación estacional en la respuesta de la actividad de AChE en ejemplares expuestos a PMG.....	88
 CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN	98
4.1. Efectos de la exposición a clorpirifós y a glifosato sobre la actividad de acetilcolinesterasa en <i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	98
4.1.1. Efecto de la exposición a clorpirifós sobre la actividad de AChE.	98
4.1.2. Efecto de la exposición a glifosato sobre la actividad de AChE.	100
4.2. Ensayos <i>in vitro</i>	101
4.3. Ritmos circanuales. Respuesta de la actividad de AChE durante las diferentes estaciones del año.....	103
4.3.1. Variaciones estacionales en los niveles basales de AChE.....	103
4.3.2. Variación estacional en la respuesta de la actividad de AChE en ejemplares expuestos a plaguicidas.....	106
 CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES	113
5.1. Efectos de la exposición <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> a clorpirifós sobre la actividad de acetilcolinesterasa en <i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	113
5.2. Efectos de la exposición <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> a glifosato sobre la actividad de acetilcolinesterasa en <i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	114

5.3. Ritmos circanuales. Respuesta de la actividad de AChE durante las diferentes estaciones del año..... 114

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Principales características fisicoquímicas de clorpirifós..	22
Tabla 1.2. Principales características fisicoquímicas de clorpirifós oxón.	25
Tabla 1.3. Principales características fisicoquímicas de glifosato.....	28
Tabla 2.1. Características generales del clorpirifós.	60
Tabla 2.2. Características generales de clorpirifós-oxón.	61
Tabla 2.3. Características generales del glifosato.....	61
Tabla 2.4. Reactivos utilizados en la preparación de agua moderadamente dura (AMD).	62
Tabla 3.1. Valor de los parámetros morfométricos y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de exposición a CPF realizado en la estación de invierno del 2015.....	64
Tabla 3.2. Valor de los parámetros morfométricos y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de exposición a PMG realizado en la estación de invierno del 2015.....	66
Tabla 3.3. Actividad de AChE estimada a partir de las funciones propuestas por Menéndez Helman <i>et al.</i> , 2015; y valor de la actividad de AChE determinado experimentalmente.	74
Tabla 3.4. Valor de los parámetros morfométricos, contenido de proteínas totales y actividad específica de AChE de individuos control de <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> en las diferentes estaciones del año.....	75
Tabla 3.5. Variaciones entre sexos: actividad de AChE, factor de condición y contenido de proteínas en las distintas estaciones	76
Tabla 3.6. Valor de los parámetros morfométricos y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de exposición a CPF realizado en la estación de otoño del 2015.....	77
Tabla 3.7. Valor de los parámetros morfométricos y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de exposición a CPF realizado en la estación de primavera del 2015....	79
Tabla 3.8. Valor de los parámetros morfométricos y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de exposición a CPF realizado en la estación de verano del 2016.....	81
Tabla 3.9. Valor de los parámetros morfométricos y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de exposición a CPF realizado en la estación de otoño del 2016.....	83
Tabla 3.10. Concentración analítica de CPF en los bioensayos, determinada en alícuotas recolectadas a tiempo inicial, transcurridas 48 h (pre y post recambio) y a tiempo final.....	86
Tabla 3.11. Valor de los parámetros morfométricos y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de exposición a PMG de la estación de otoño del 2015	88
Tabla 3.12. Valor de los parámetros morfométricos y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de exposición a PMG de la estación de primavera del 2015	90
Tabla 3.13. Valor de los parámetros morfométricos y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de exposición a PMG de la estación de verano del 2016.....	91
Tabla 3.14. Valor de los parámetros morfométricos y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de exposición a PMG de la estación de otoño del 2016	93
Tabla 3.15. Concentración analítica de PMG en los bioensayos, determinada en alícuotas recolectadas a tiempo inicial, transcurridas 48 h (pre y post recambio) y a tiempo final.....	96

Índice de Figuras

Figura 1.1. Movimiento de los plaguicidas en el ambiente	18
Figura 1.2. Estructura general de los plaguicidas organofosforados.....	19
Figura 1.3. Estructura química del clorpirifós	21
Figura 1.4. Grupo 1 (inhibidores de AChE) del mapa de clasificación de los insecticidas según modo de acción elaborado por el IRAC y detalle del grupo 1B (OPs).	23
Figura 1.5. Vías metabólicas del clorpirifós.	24
Figura 1.6. Estructura química del clorpirifós oxón	25
Figura 1.7. Estructura química del glifosato	28
Figura 1.8. Detalle del subgrupo G de la clasificación de herbicidas según el modo de acción realizada por el HRAC.....	29
Figura 1.9. Vía metabólica del shikimato y mecanismo de acción del glifosato en plantas.....	30
Figura 1.10. Estructura y mecanismo de la enzima acetilcolinesterasa.	34
Figura 1.11. Reacción de la acetilcolinesterasa con un compuesto organofosforado	35
Figura 1.12. Ejemplar macho y hembra de <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> . Tomado de Menni (2004).	40
Figura 2.1. Recipientes de exposición y cámara de incubación.....	45
Figura 2.2. Diseño experimental utilizado en los bioensayos <i>in vivo</i> para clorpirifós y glifosato.....	47
Figura 2.4. Determinación de la actividad de AChE. Descripción de la reacción en la que se basa el método Ellman <i>et al.</i> (1961).....	50
Figura 2.5. Diseño experimental del ensayo <i>in vitro</i> para clorpirifós (CPF).....	55
Figura 2.6. Diseño experimental del ensayo <i>in vitro</i> para clorpirifós-oxón (CPF-oxón).	56
Figura 2.7. Diseño experimental del ensayo <i>in vitro</i> para glifosato (PMG).	58
Figura 3.1. Actividad específica de AChE en ejemplares de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a CPF o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de invierno del 2015	65
Figura 3.2. Actividad específica de AChE en ejemplares de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a PMG o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de invierno del 2015	67
Figura 3.3. Efecto de la exposición a CPF <i>in vitro</i> sobre la actividad de AChE de la sección anterior de <i>C. decemmaculatus</i>	68
Figura 3.4. Efectos de la exposición a clorpirifós-oxón (CPF-oxón) <i>in vitro</i> sobre la actividad de AChE de la sección anterior de <i>C. decemmaculatus</i>	69
Figura 3.5. Efectos de la exposición a PMG <i>in vitro</i> sobre la actividad de AChE de la sección anterior de <i>C. decemmaculatus</i>	71
Figura 3.6. Actividad específica promedio de AChE en homogenatos de ejemplares en <i>C. decemmaculatus</i> durante diferentes estaciones del año	72
Figura 3.7. Actividad de AChE en ejemplares en <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a CPF o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de otoño del 2015.	78
Figura 3.8. Actividad de AChE en ejemplares en <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a CPF o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de primavera del 2015	80
Figura 3.9. Actividad de AChE en ejemplares en <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a CPF o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de verano del 2016.....	82

Figura 3.10. Actividad de AChE en ejemplares en <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a CPF o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de otoño del 2016	84
Figura 3.11. Comparación estacional de la actividad específica de AChE (% vs control) en ejemplares de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos concentraciones de CPF por 96 h	85
Figura 3.12. Efecto de la exposición a CPF-oxón in vitro sobre la actividad de acetilcolinesterasa en homogenatos de <i>C. decemmaculatus</i> de la estación de verano y otoño de 2016.....	87
Figura 3.13. Actividad de AChE en ejemplares de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a PMG o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de otoño del 2015.	89
Figura 3.14. Actividad de AChE en ejemplares de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a PMG o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de primavera del 2015	90
Figura 3.15. Actividad de AChE en ejemplares de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a PMG o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de verano del 2016	92
Figura 3.16. Actividad de AChE en ejemplares de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a PMG o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de otoño del 2016.	94
Figura 3.17. Comparación estacional de la actividad específica de AChE (% vs control) en ejemplares de <i>C. decemmaculatus</i> expuestos a PMG por 96 h.....	95

Glosario

A: actividad enzimática

AChE: acetilcolinesterasa

ACh: acetilcolina

AE: actividad específica

AMD: agua moderadamente dura

BSA: albúmina bovina

CAT: catalasa

CPF: O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil)-fosforotioato (clorpirifós)

CL₅₀: concentración letal 50

CPF-oxón: O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil)-fosfato (clorpirifós oxón)

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

GPx: glutatión peroxidasa

GM: genéticamente modificados/as

K: Factor de Condición de Fulton

L_T: largo total

n: número de organismos por tratamiento

OPs: organofosforados

p: peso

P_c: peso corporal

PMG: N-(fosfonometil)glicina (glifosato)

ROS: especies reactivas de oxígeno

SNC: sistema nervioso central

SOD: superóxido dismutasa

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas en los países de América Latina y el Caribe, se ha dado un proceso de expansión de la frontera agrícola. En Argentina particularmente, el área destinada a la siembra de soja (principal cultivo de la región) aumentó, desde fines de la década de 1990 hasta el período 2012/2013, de aproximadamente 9 millones a más de 20 millones de hectáreas (MAGyP, 2014).

Ese cambio se implementó en el país mediante la aplicación de un paquete tecnológico en la actividad agropecuaria basado en la siembra directa y la utilización de semillas genéticamente modificadas (GM). Este proceso se inicia en 1996 con la introducción de las semillas de soja GM conjuntamente con el uso de controles químicos, convirtiendo a los plaguicidas en la herramienta más utilizada por los productores para controlar y/o eliminar plagas y enfermedades en cultivos agrícolas. Es así que, la aplicación de plaguicidas (herbicidas, insecticidas, fungicidas, acaricidas, entre otros) prácticamente se triplicó pasando de 127.500 toneladas en 1999 a más de 314.000 toneladas en 2012 (CASAFE, 2014).

En la actualidad los plaguicidas organofosforados (OPs) son uno de los más utilizados en el país y han reemplazado en gran parte a los organoclorados. Aunque los compuestos organofosforados son degradados más rápidamente, son generalmente más tóxicos, en términos de toxicidad aguda, que los clorados (Bull y Hathaway, 1986). En este contexto, el glifosato es el herbicida organofosforado más utilizado en la actividad agrícola del país. Particularmente el uso de formulados a base de glifosato aumentó de 70 mil toneladas a más de 180 mil toneladas entre 1999 y 2013 (CASAFE, 2014). Por su parte, el clorpirifós es el insecticida más empleado en los cultivos de soja (Aparicio *et al.*, 2015).

Los plaguicidas pueden llegar a los cuerpos de agua por aplicaciones directas o por procesos de escorrentía y lixiviación. Una vez en los ecosistemas acuáticos, pueden

reducir la calidad ambiental e influir en el funcionamiento esencial del ecosistema. Aunque, el clorpirifós se considera de baja persistencia en el ambiente (OMS, 2009) se han reportado en arroyos de la región pampeana concentraciones de hasta de $10,8 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ (Marino y Ronco, 2005). En el caso del glifosato se han determinado concentraciones entre $0,1$ y $0,7 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ en cuerpos de agua asociados a agroecosistemas de la región pampeana (Peruzzo *et al.*, 2008). Incluso se ha informado una concentración de $10,9 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ en un tributario del arroyo Pescado de la Provincia de Buenos Aires (Ronco, 2011).

Diferentes autores han descripto la bioacumulación de plaguicidas OPs en diferentes especies de peces y su transferencia a lo largo de la cadena trófica (Varo *et al.*, 2002; Venkateswara Rao *et al.*, 2005). Es así que resulta relevante evaluar el riesgo del uso de estos compuestos caracterizando el destino y la toxicidad en especies para los cuales no están destinados (especies no-blanco).

El uso de biomarcadores se ha empleado como una herramienta de información para la evaluación de factores de riesgo asociados a la exposición a agentes ambientales. Uno de los biomarcadores de neurotoxicidad más utilizado para determinar la exposición a algunos plaguicidas OPs y carbamatos es la actividad de la enzima acetilcolinesterasa. Los OPs del subgrupo fosfato se unen a la enzima inhibiéndola en forma irreversible (Thompson, 1999) y los del subgrupo fosforotioato (menos tóxico) también pueden inhibirla, aunque requieren de la biotransformación (desulfuración oxidativa) (Assis *et al.*, 2012).

La acetilcolinesterasa (AChE) pertenece a la familia de las esterasas, cuyo papel fisiológico es hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina, permitiendo así la finalización del impulso nervioso en la hendidura sináptica (Jebali *et al.*, 2013). Esta enzima se encuentra presente en diferentes tejidos de vertebrados e invertebrados. Sin embargo, se ha determinado que la AChE cerebral es la más sensible a la inhibición por plaguicidas organofosforados en diferentes especies de peces (Carr *et al.*, 1997). Al mismo tiempo, se ha descripto que

tanto la longitud del pez como la variabilidad estacional (Chuiko *et al.*, 1997; Beauvais *et al.*, 2002; Menéndez-Helman *et al.*, 2013; 2015) pueden afectar los niveles basales de la actividad de la enzima. En ese sentido resulta necesario tener en cuenta estos factores al utilizar la AChE como biomarcador de neurotoxicidad, evaluando las variaciones intrínsecas y si los factores que las determinan afectan la susceptibilidad de la respuesta a los contaminantes ambientales.

Cnesterodon decemmaculatus (Jenyns, 1842) (Teleostei; Cyprinodontiformes), conocido como “madrecita”, tiene una amplia distribución que involucra a cinco países de la cuenca del Río de la Plata. Esta especie es utilizada en estudios de monitoreo en la región y como organismos *test* en ensayos de toxicidad, debido a su amplia distribución, pequeño tamaño, rápido crecimiento, corta vida generacional y fácil reproducción en cautiverio (García *et al.*, 1998). A la vez presenta una gran tolerancia a variaciones fisicoquímicas, siendo resistente a ambientes degradados (Teixeira de Mello, 2007).

Es así, como en este trabajo se pretende evaluar el efecto de dos plaguicidas (clorpirifós y glifosato) sobre la actividad de AChE en *Cnesterodon decemmaculatus*; analizar si el mecanismo de acción sobre la enzima es directo y la existencia de cambios estacionales en la relación dosis-respuesta.

1.1. Plaguicidas.

1.1.1. Definición y Clasificación

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), define a los plaguicidas como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias con ingredientes químicos o biológicos destinados a repeler, destruir o controlar cualquier plaga o a regular el crecimiento de las plantas” (FAO, 2014). Se ha reportado que, de los plaguicidas aplicados, sólo el 1 % llega a las plagas objetivo (Gavrilescu, 2005).

Los plaguicidas se pueden clasificar según las características principales. Según su funcionalidad: insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, avicidas, rodenticidas, molusquicidas, etc. Según su persistencia en el ambiente: persistente, poco persistente o no persistente. Según su toxicidad aguda: extremadamente tóxicos, altamente tóxicos, moderadamente tóxicos y ligeramente tóxicos. Según el grupo químico del principio activo: organofosforados, carbamatos, organoclorados, piretroides, triazinas, derivados bipiridílicos, clorofenoxiácidos, cloronitrofenoles y organomercuriales, entre otros. A los fines particulares de esta tesis, nos referiremos en detalle a los insecticidas y herbicidas organofosforados.

1.1.2. Dinámica de los plaguicidas en el ambiente

Los plaguicidas se desplazan de una forma muy compleja en el ambiente, pueden ser transportados desde el sitio en el que son liberados hacia el suelo, aire y cuerpos de agua, por medio de una variedad de procesos físicos, químicos y biológicos (Arias-Estévez *et al.*, 2008). La persistencia o residualidad (concentración del plaguicida en el suelo a través del tiempo) depende de las características fisicoquímicas de la molécula (acidez o alcalinidad de la molécula, solubilidad en agua, presión de vapor), de la reacción del plaguicida con las sustancias que componen el suelo (minerales presentes y contenido de materia orgánica), de las propiedades fisicoquímicas de la fase mineral (pH, capacidad de intercambio catiónico, área superficial) y de los factores ambientales (temperatura y humedad) (Díaz Trujillo, 2007). Todas estas interacciones dan paso a procesos de disipación como: volatilización, descomposición fotoquímica o química, escurrimiento superficial, degradación química, descomposición microbiana, lixiviación y adsorción (Figura 1.1).

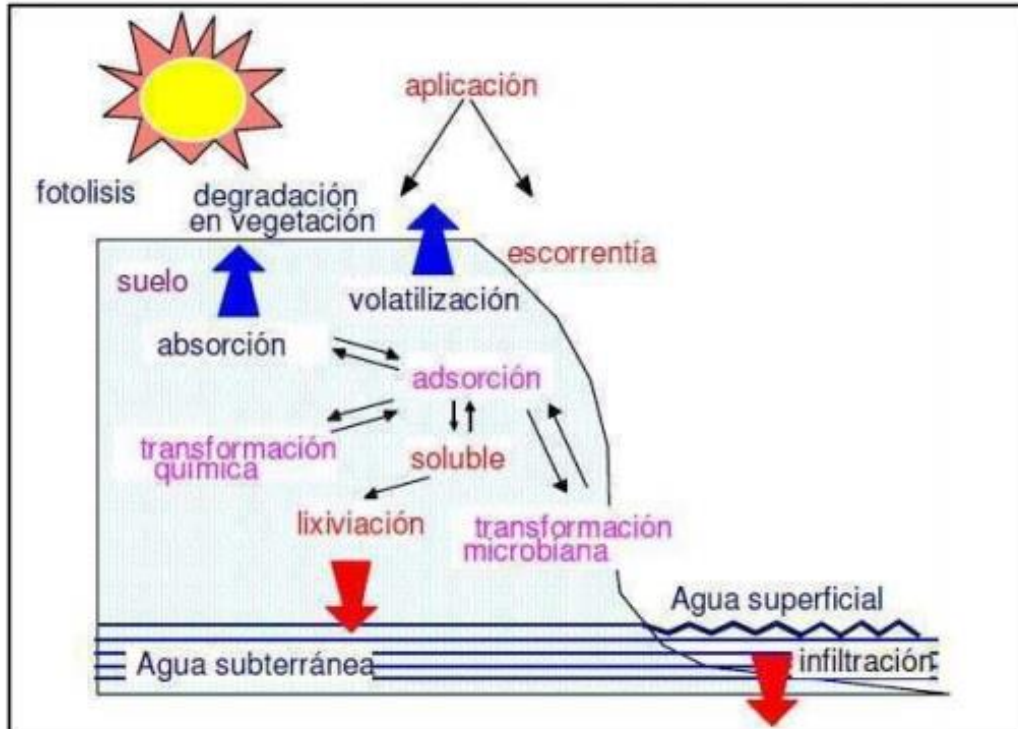


Figura 1.1. Movimiento de los plaguicidas en el ambiente. Tomado de Sotomayor (2011).

Las propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas en el medio acuático (su solubilidad en agua, el potencial para formar complejos con metales, entre otros) son los que determinan el destino del compuesto (Gimsing y dos Santos Afonso, 2005) y el tiempo en que el plaguicida va a circular por el ambiente.

Una vez que los plaguicidas están presentes en los ecosistemas acuáticos, pueden alterar la calidad ambiental e influir en el funcionamiento del ecosistema, reduciendo la diversidad de especies y las estructuras comunitarias, modificando las cadenas tróficas, cambiando los patrones de flujo de energía, ciclo de nutrientes, estabilidad y resiliencia de los ecosistemas (Pérez *et al.*, 2011).

1.1.3. Plaguicidas organofosforados

Los compuestos OPs forman un gran grupo de compuestos químicos utilizados para proteger los cultivos, el ganado, la salud y como armas químicas durante la guerra, cuyo uso se ha incrementado en las últimas décadas con la prohibición del uso de los organoclorados. Los procesos de degradación natural de los OPs son más eficientes por lo que tienen una menor persistencia que los organoclorados. Sin embargo, en numerosas ocasiones dichos procesos ocurren en el interior de organismos de la biota al producirse la biotransformación de estas sustancias en metabolitos, que a veces son de mayor toxicidad que los compuestos parentales (Vittozzi *et al.*, 2001).

Estos plaguicidas organofosforados son ésteres orgánicos del ácido fosfórico, están formados por un átomo central de fósforo unido por un doble enlace a un átomo de oxígeno o azufre, dos grupos (R1 y R2) conteniendo grupos o-etilos u o-metilos, y un grupo sustituyente (X) que es específico de cada compuesto (Figura 1.2.).

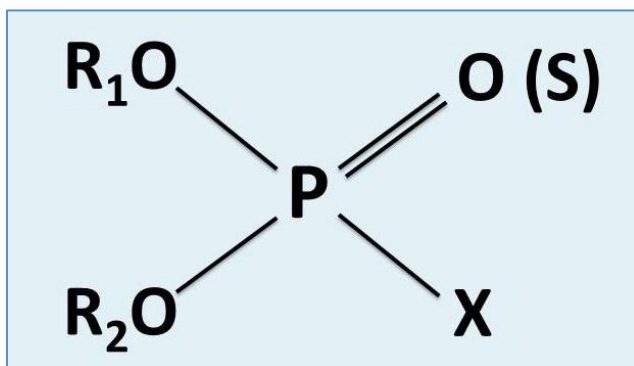


Figura 1.2. Estructura general de los plaguicidas organofosforados. Tomado y modificado de Kazemi *et al.*, 2012.

Los OPs son un grupo de compuestos sintéticos y biogénicos, la mayoría de estos plaguicidas son resistentes a la hidrólisis química, descomposición térmica y fotólisis (Kazemi *et al.*, 2012). Su clasificación determinada por su estructura química, y particularmente por el grupo funcional (que son los sitios de reactividad o funcionalidad

del compuesto), las agrupa en al menos 13 Tipos, incluyendo: fosfatos, fosfonatos, fosfinatos, fosforotioatos, fosfonotioatos, fosforoditioatos, fosforotritioatos, fosforamidotioatos, entre otros (Elersek y Filipic, 2011).

1.1.3.1. Insecticidas organofosforados

Los insecticidas son productos utilizados para controlar insectos y tienen importancia en la agricultura para el control de plagas o para eliminar todos aquellos que afectan la salud humana y animal (CASAFE 2010). A la vez, éstos pueden ser tóxicos para insectos benéficos, como para otras especies no blanco (peces, anfibios, entre otros), debido a su alta toxicidad (Mohammad *et al.*, 2008).

Los insecticidas organofosforados son ampliamente usados en todo el mundo (Upadhyay *et al.*, 2011). Son fundamentalmente ésteres del ácido fosfórico, muchos de ellos son sistémicos, es decir, son absorbidos por las plantas y transportados a todos los tejidos a través del sistema vascular, actuando tanto en los insectos como también sobre las personas que ingieren el alimento. Pueden causar toxicidad aguda y subaguda.

El principal efecto bioquímico asociado a la toxicidad de estos insecticidas es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, esta enzima es imprescindible en la transmisión de los impulsos nerviosos que van desde las fibras nerviosas hasta las células musculares y glandulares, hacia otras células nerviosas en los ganglios autónomos y hacia el sistema nervioso central (SNC). Al inhibirse esta enzima se acumula la acetilcolina en las uniones colinérgicas neuroefectoras (efectos muscarínicos), en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos (efectos nicotínicos) y también a nivel central (USEPA, 2015).

1.1.3.1.1. Clorpirifós. Características generales

El clorpirifós O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil)-fosforotioato, CPF) es el insecticida más empleado en la actividad agrícola del país en los cultivos de soja (Aparicio *et al.*, 2015). De las aproximadamente 36.400 toneladas de insecticidas utilizados anualmente en el país 9.100 toneladas corresponden a CPF (CASAFE, 2010). Este es un insecticida organofosforado no sistémico, de amplio espectro, ligeramente volátil, de baja solubilidad en agua, cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la acetilcolinesterasa. Es moderadamente persistente en el suelo, se han reportado para su vida media valores entre 2 semanas y 1 año dependiendo del tipo de suelo, clima y otras condiciones (De Gerónimo *et al.*, 2014). Marino y Ronco (2005) han determinado concentraciones de CPF en arroyos de la región pampeana, reportando hasta $10,8 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$.

La estructura química del CPF es presentada en la Figura 1.3 y sus principales características fisicoquímicas se describen en la Tabla 1.1.

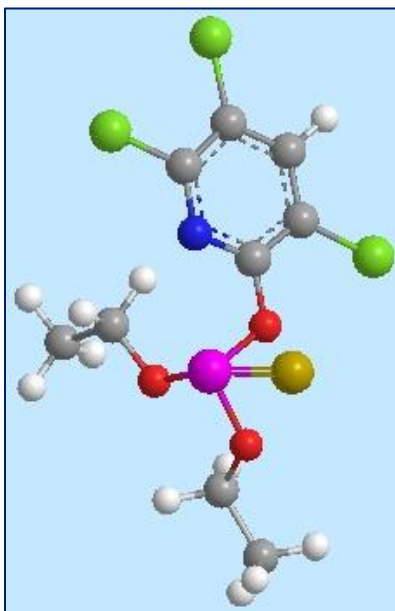


Figura 1.3. Estructura química del clorpirifós. Las esferas representan: ● átomos de oxígeno, ● átomos de cloro, ● átomos de carbono, ● átomos de hidrógeno, ● átomo de nitrógeno, ● átomo de fósforo y ● átomo de azufre.

Clorpirifós: características fisicoquímicas	
Nombre genérico	Clorpirifós
Nombre IUPAC	O, O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato
Fórmula molecular	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$
Masa molecular	$350,6 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$
Punto de fusión	$41 - 42^\circ\text{C}$
Presión de vapor	$2,7 \text{ mPa} (25^\circ\text{C})$
Solubilidad	En agua $1,4 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ a 25°C
Densidad	$1,4 \text{ g} \times \text{mL}^{-1}$
Grupo	Fosforotioato

Tabla 1.1. Principales características fisicoquímicas del Clorpirifós. Datos tomados de la USEPA (2017).

Algunas de las marcas comerciales de los formulados que contienen CPF como principio activo son Lorsban, Dursban, entre otros. Desde el punto de vista toxicológico, está clasificado como un plaguicida moderadamente peligroso (clase II), según la Organización Mundial de la Salud (OMS). El Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) realizó un mapa de clasificación por modo de acción de los insecticidas colocando al CPF en el grupo 1 que corresponde a los inhibidores de la acetilcolinesterasa (<http://www.irac-online.org/>) (Figura 1.4).

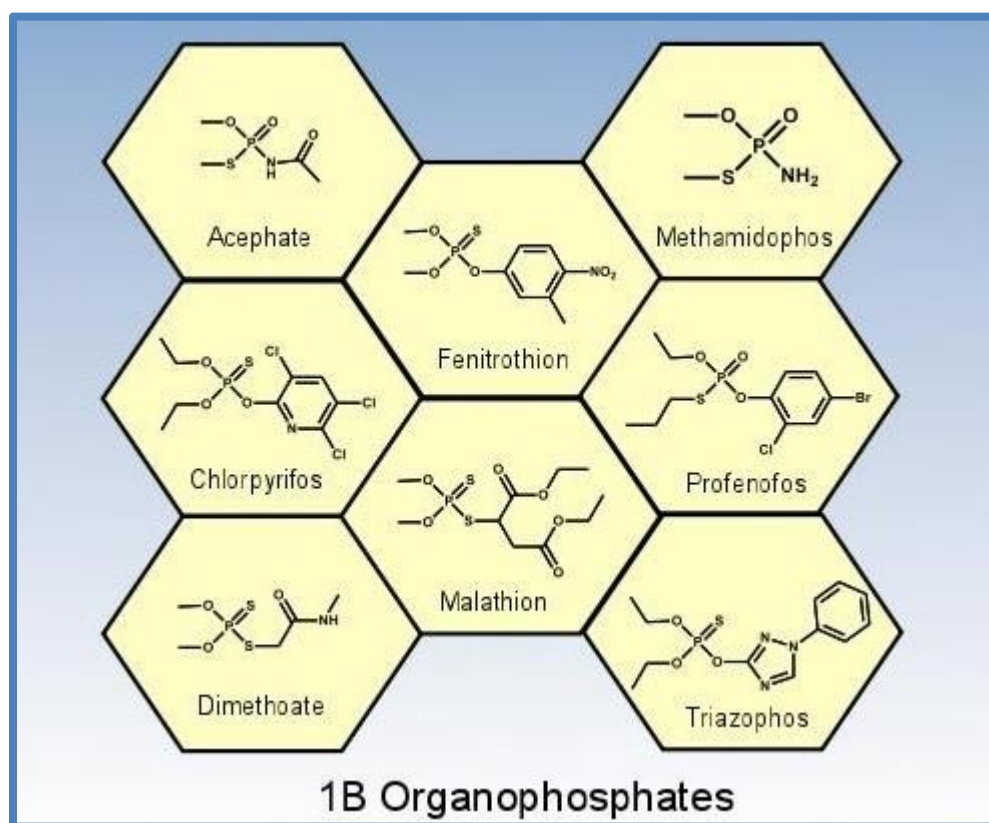
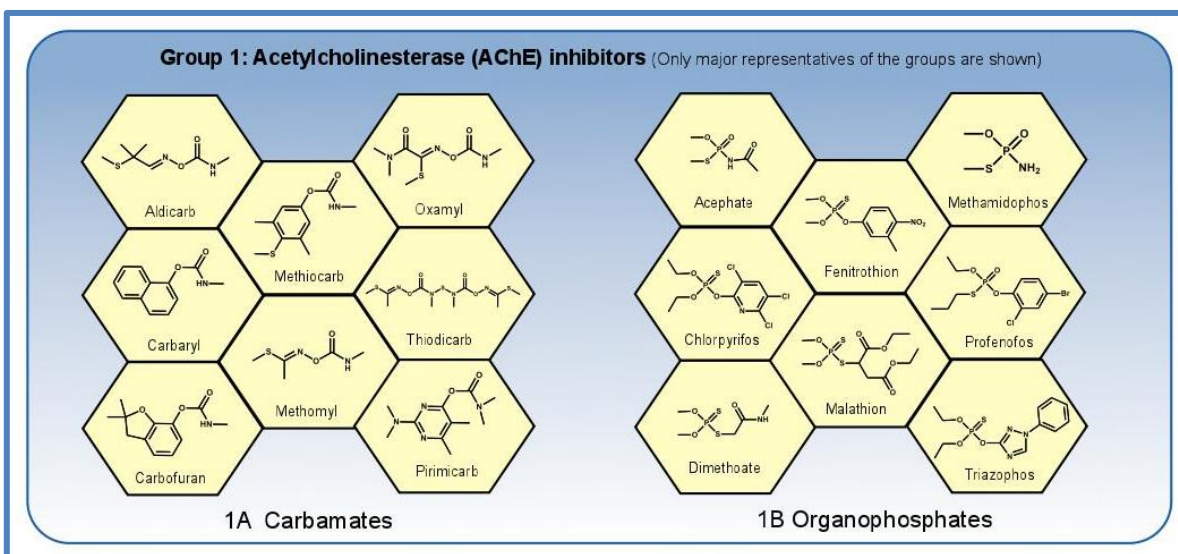


Figura 1.4. Grupo 1 (inhibidores de AChE) del mapa de clasificación de los insecticidas según modo de acción elaborado por el IRAC (panel superior). Detalle del grupo 1B (OPs) ampliado (panel inferior).

El mecanismo de acción del CPF como se mencionó anteriormente, se basa en la inhibición de la acetilcolinesterasa (Nobonita y Suchismita, 2013). Este insecticida es biotransformado mediante distintas reacciones metabólicas dentro de los organismos (Figura 1.5). El clorpirifós es bioactivado en el sistema mitocondrial citocromo P450 (CYP) y transformado a clorpirifós oxón (CPF-oxón), cuya toxicidad es mayor que la del CPF, a partir de una desulfuración oxidativa (Cox, 1994). Esta bioactivación se desarrolla tanto en los vertebrados como en los invertebrados, siendo el CPF-oxón posteriormente desactivado por hidrólisis, catalizada enzimáticamente, originando dietilfosfato y 3,5,6-tricloropiridinol (Picco, 2010).

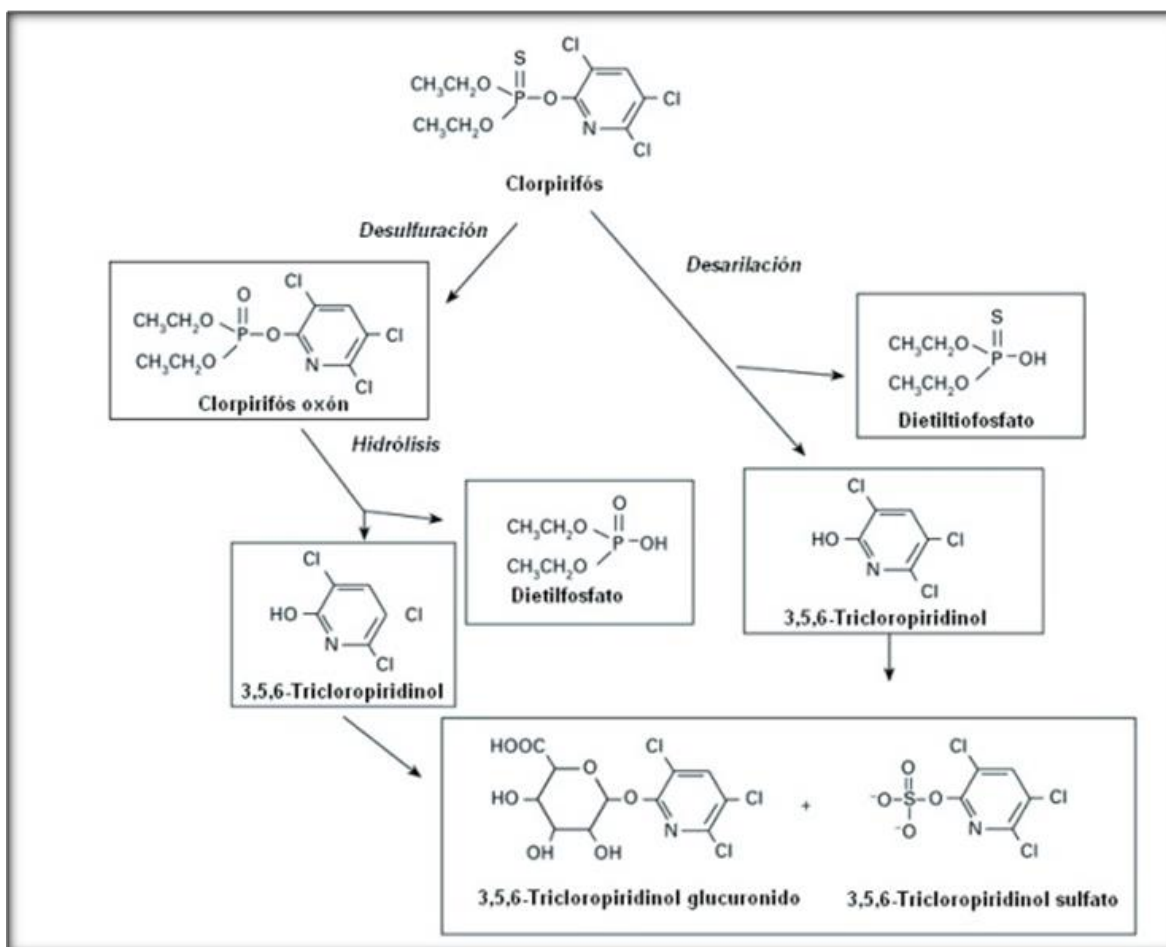


Figura 1.5. Vías metabólicas del clorpirifós. Tomado de Picco (2010).

La estructura química del CPF-oxón es presentada en la Figura 1.6 y sus principales características fisicoquímicas en la Tabla 1.2.

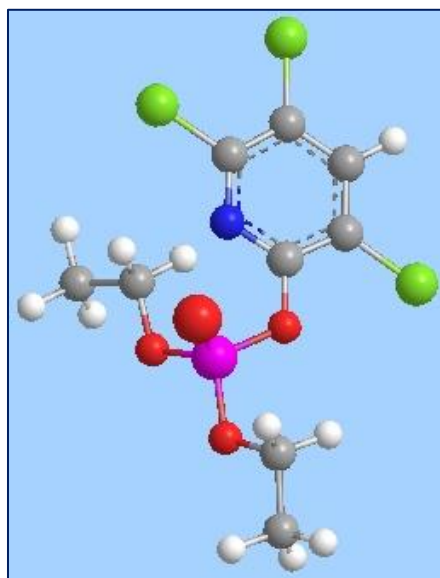


Figura 1.6. Estructura química del clorpirifós oxón. Las esferas representan: ● átomos de oxígeno, ● átomos de cloro, ● átomos de carbono, ● átomos de hidrógeno, ● átomo de nitrógeno y ● átomo de fósforo.

Clorpirifós oxón: características fisicoquímicas	
Nombre genérico	Clorpirifós oxón
Nombre IUPAC	O, O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosfato
Fórmula molecular	$C_9H_{11}Cl_3NO_4P$
Masa molecular	$334,5 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$
Punto de fusión	$34 - 37^\circ\text{C}$
Solubilidad	Cloroformo (ligeramente), metanol (ligeramente)
Densidad	$1,5 \text{ g} \times \text{mL}^{-1}$
Grupo	Fosfato

Tabla 1.2. Principales características fisicoquímicas de clorpirifós oxón. Datos tomados de Chem Service y Chemical Name.

1.1.3.1.2. Clorpirifós: Movilidad y destino en el ambiente

El CPF es un compuesto bastante hidrofóbico, lo cual se confirma con el intervalo de valores del coeficiente octanol/agua: $\log K_{ow} = 4,7- 5,3$. Esta propiedad indica que este plaguicida presenta una fuerte tendencia a separarse de la fase acuosa e incorporarse a las fases orgánicas de su entorno, es decir, se une fácilmente a la materia orgánica (MO). La adsorción en la MO constituye el principal mecanismo no degradativo para la remoción de éste plaguicida de los cuerpos de agua (Díaz, 2007). En suelos con ausencia de MO, la volatilidad de este plaguicida es un mecanismo importante de remoción (Franz *et al.*, 1997). Otros factores que intervienen en la degradación son la actividad microbiana (Albendín García, 2009) y la fotodegradación (Franz *et al.*, 1997).

1.1.3.2. Herbicidas organofosforados

Los herbicidas son sustancias químicas, generalmente sintéticas, que se emplean para controlar el crecimiento de malezas (plantas indeseadas) por motivos comerciales (Dixit y Varshney, 2008).

Según la FAO (1996), existen diferentes formas de clasificación de los herbicidas según su comportamiento en la planta: de contacto (se aplica al follaje y afecta solo la parte tratada), sistémico (se aplica al follaje y afecta otras partes de la planta), residuales (se aplican al suelo y tienen que persistir por algún tiempo para ser efectivos). Según su especificidad: selectivo (afecta las hierbas no deseadas sin afectar las demás), no selectivo (afecta un gran grupo de hierbas sin ningún tipo de selección). Según su modo de aplicación: pre-emergente o post-emergente (se aplica antes o después de que brote la maleza) o post-dirigida (se aplica después de que emerjan la maleza y el cultivo, pero en forma dirigida evitando el contacto del herbicida con el cultivo). Según sus propiedades químicas: orgánicos e inorgánicos. Según el grupo funcional químico de acuerdo con lo detallado anteriormente (sección 1.1.3).

1.1.3.2.1. Glifosato. Características generales

El glifosato (N- fosfometilglicina, PMG), es el herbicida organofosforado más utilizados en el país. Con el transcurso de los años se incrementó su uso: en el período 1997-98 se utilizaron 28 millones de litros, en 1998-99 se usaron 56 millones de litros alcanzando 100 millones de litros durante el periodo 2003-04 (Lapegna, 2013). Durante el año 2013, la comercialización de herbicidas en Argentina representó el 65 % del mercado total de productos fitosanitarios, donde el PMG fue el principio activo más vendido (Aparicio *et al.*, 2015). Este es un herbicida post-emergente, sistémico, no selectivo para el control de malezas anuales y perennes. Carece prácticamente de actividad pre-emergente debido a que es rápida y fuertemente adsorbido a la mayoría de los suelos (Franz *et al.*, 1997). Su mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la síntesis de aminoácidos aromáticos. Posee una gran capacidad para formar complejos uniéndose fuertemente a las partículas del suelo; su vida media es de 45-60 días y su persistencia se extiende más de 170 días (WHO, 1994; Solomon y Thompson, 2003).

En Argentina, se han reportado concentraciones entre 0,1 y 0,7 mg × L⁻¹ de este herbicida en cuerpos de agua de la región pampeana (Peruzzo *et al.*, 2008), e incluso Ronco (2011) ha informado una concentración de 10,9 mg × L⁻¹ en un tributario de un arroyo de la Provincia de Buenos Aires.

Este herbicida es particularmente efectivo porque la mayoría de las plantas lo metabolizan muy lentamente o no lo degradan (Prata *et al.*, 2003). Los efectos bioquímicos del plaguicida pueden ser observados unas horas después de la aplicación, pero los efectos fitotóxicos como necrosis, clorosis foliar y la muerte de la planta, pueden tardar días o semanas (Franz *et al.*, 1997).

La estructura química del glifosato es presentada en la Figura 1.7 y sus principales características fisicoquímicas en la Tabla 1.3.

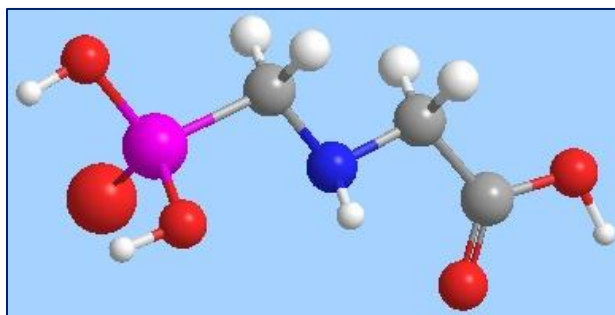


Figura 1.7. Estructura química del glifosato. Las esferas representan: ● átomos de oxígeno, ○ átomos de hidrógeno, ● átomos de carbono, ● átomo de fósforo y ● átomo de nitrógeno.

Glifosato: características fisicoquímicas	
Nombre genérico	Glifosato
Nombre IUPAC	(N-(fosfometil)glicina)
Fórmula molecular	$C_3H_8NO_5P$
Masa molecular	$169,1 \text{ g} \times \text{mL}^{-1}$
Punto de fusión	$189,5^\circ\text{C}$
Presión de vapor	Despreciable a temperatura ambiente
Solubilidad	En agua $10,5 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ en agua a pH 1,9 y 20°C . Prácticamente insoluble en disolventes orgánicos.
Apariencia y olor	Sólido cristalino blanco, inodoro
Densidad	$1,7 \text{ g} \times \text{mL}^{-1}$
Grupo	Fosfonato

Tabla 1.3. Principales características fisicoquímicas de glifosato. Tomado de la EPA (2017).

Al ser el glifosato sistémico, una vez absorbido por el follaje se traslada por el floema a los tallos y raíces. El mecanismo de acción sobre el organismo blanco es la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato (EPSPS) presente en la vía shikimato, que es esencial para la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) en plantas, algas y hongos. El The World of Herbicides detalla la clasificación de los herbicidas por su modo de acción realizada en el año 2010 por el HRAC (Herbicide Resistance Action

Committee, <http://hracglobal.com/>). Según la misma el glifosato se ubica entre los herbicidas que afectan el metabolismo celular y en particular en el subgrupo G que son los inhibidores de la EPSPS (Figura 1.8).

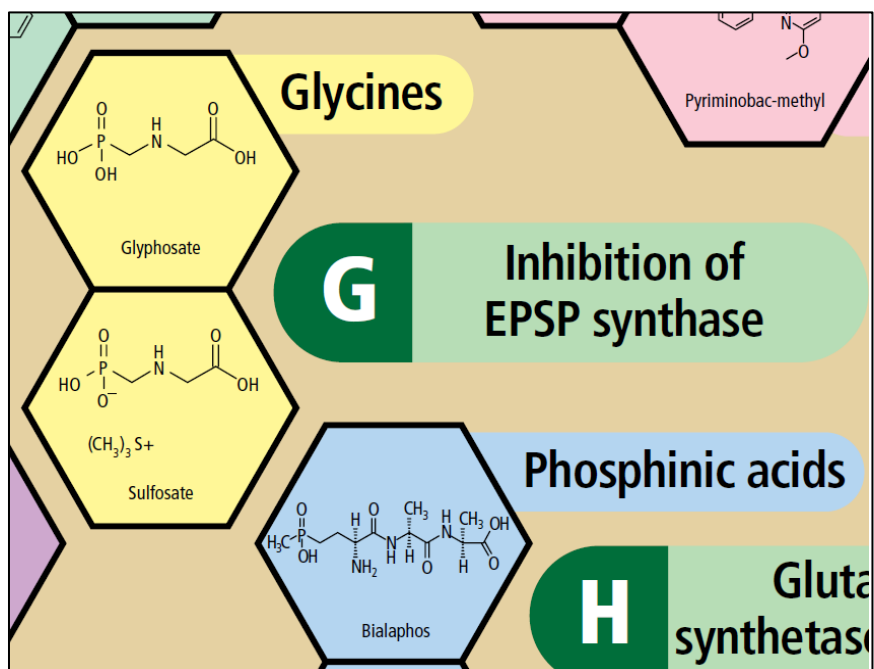


Figura 1.8. Detalle del subgrupo G de la clasificación de herbicidas según el modo de acción realizada por el HRAC.

La EPSPS se encuentra localizada en el cloroplasto, de la vía metabólica del shikimato. La enzima EPSPS cataliza la transferencia fosfoenol piruvato (PEP) al shikimato-3-fosfato (S3P) formando 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato y fosfato inorgánico. El glifosato actual como un inhibidor competitivo del PEP y se une más fuertemente al complejo EPSPS--S3P de lo que lo hace el PEP (sustrato natural) impidiendo el normal desarrollo de la vía shikimato. En la Figura 1.9 se describe la vía metabólica del shikimato y el mecanismo de acción del glifosato en plantas.

VÍA METABÓLICA DEL SHIKIMATO Y MECANISMO DE ACCIÓN DEL GLIFOSATO EN PLANTAS

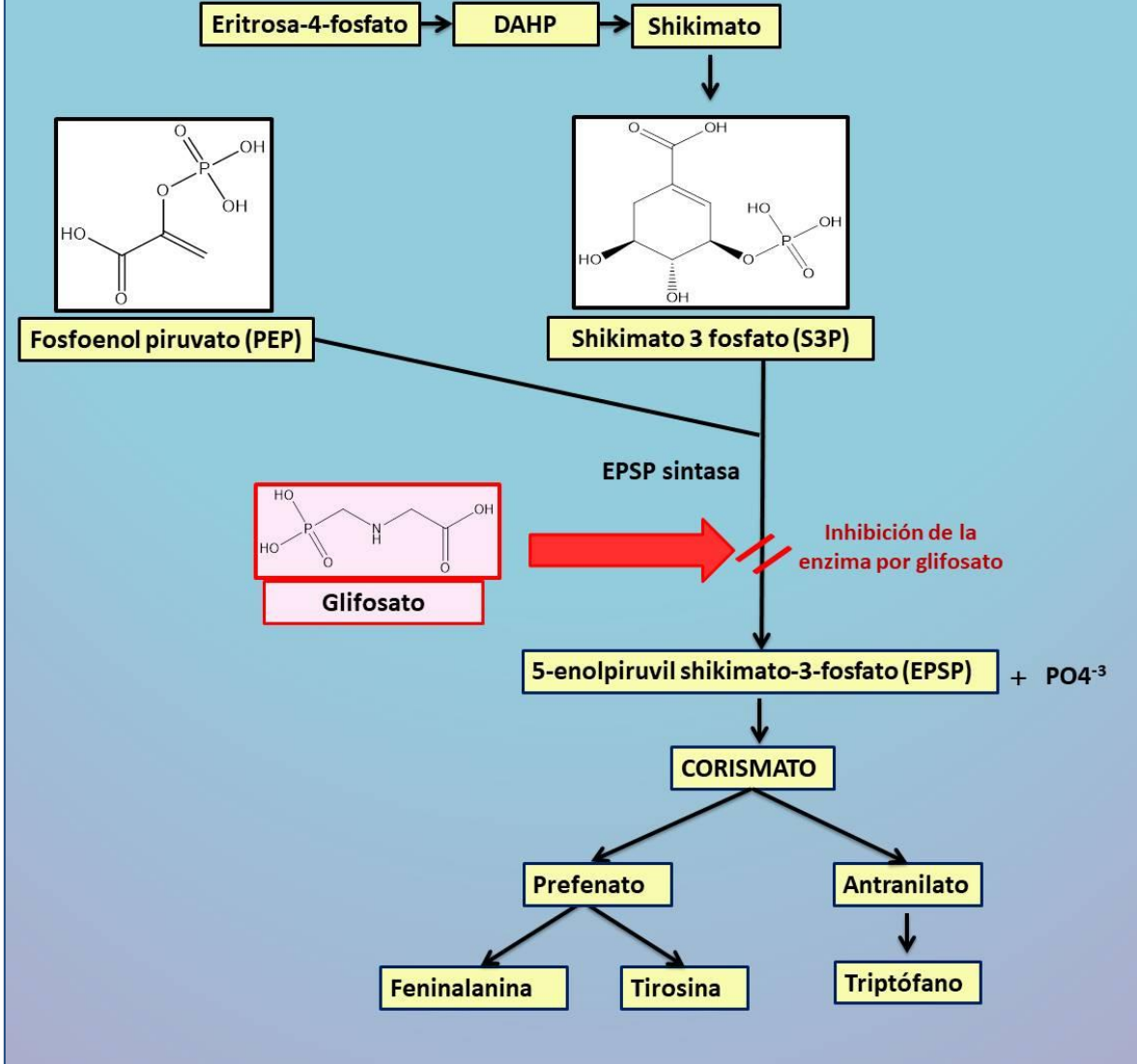


Figura 1.9. Vía metabólica del shikimato y mecanismo de acción del glifosato en plantas. El glifosato actúa como un inhibidor competitivo ocupando el sitio del PEP en el complejo enzimático.

Estas reacciones metabólicas se encuentran en las plantas y en los microorganismos, pero no en los animales.

Cabe mencionar que el glifosato no puede penetrar *per se* en las malezas blanco, razón por la cual se utiliza junto a coadyuvantes que disminuyen la tensión superficial de la cutícula de las plantas y aumentan la permeabilidad (Franz *et al.*, 1997). Es por esta razón que se utilizan formulados que contienen como principio activo al glifosato, generalmente en forma de sal de isopropilamina, junto con uno o varios coadyuvantes y agua. Los nombres comerciales de los formulados que contienen glifosato como principio activo son Roundup, Roundup Biactive y Rodeo, entre otros. Aunque durante muchos años la Organización Mundial de la Salud (OMS) ubicó al glifosato en la categoría de menor riesgo toxicológico, durante el 2016 lo ha recategorizado en la Clase IIA como probablemente cancerígeno, basado en evidencias de carcinogenicidad en humanos y animales de experimentación (WHO, 2016). Cabe señalar que los formulados pueden presentar mayor toxicidad sobre organismos no blanco que el ácido libre debido a la presencia de los coadyuvantes (Tsui y Chu, 2003; Pérez *et al.*, 2011).

1.1.3.2.2. Glifosato. Movilidad y destino en el ambiente

El glifosato es altamente polar, soluble en agua e insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos, siendo el ácido aminometilfosfónico (AMPA) el principal metabolito. La cantidad del herbicida que llega al suelo depende de los diferentes métodos de aplicación del glifosato y de las condiciones ambientales como la lluvia y el viento. Una vez que este herbicida llega al suelo puede ser adsorbido rápidamente por óxidos de hierro y aluminio dependiendo del pH (Calderón *et al.*, 2005), o ser degradado por diferentes mecanismos como por las bacterias mineralizantes, las *Pseudomonas spp* (Gimsing *et al.*, 2004).

La capacidad de complejación del glifosato con metales se debe a la presencia, en la molécula, de tres grupos funcionales: carboxilato, amino y fosfonato, siendo éste último el que coordina a los metales con mayor afinidad. Este herbicida compite con los nutrientes por los sitios de intercambio en las partículas de los suelos, donde los cationes forman con

el glifosato complejos insolubles que disminuyen la disponibilidad para las plantas (Civeira, 2012).

El glifosato tiene una baja movilidad en el suelo a pesar de su alta solubilidad (Calderon *et al.*, 2005). Es aquí donde la biodegradación del glifosato tiene dos caminos: el oxidativo a partir de la ruptura del enlace C-N para producir (AMPA) y la ruptura del enlace C-P para formar sarcosina (Zhao *et al.*, 2009). Todos los procesos de adsorción, fotodegradación y biodegradación de fosfonatos se modifican por la presencia de metales debido a la formación de complejos de todo tipo solubles e insolubles (Barja *et al.*, 2001).

Se ha descrito que la vida media del glifosato en agua puede variar de pocos días a 91 días (Tomlin, 2006). Puede eliminarse del agua debido a la adsorción a las partículas en suspensión, inactivándose al formar complejos insolubles con hierro, aluminio, calcio y magnesio (Barja *et al.*, 2001), y/o por adsorción sobre la superficie de minerales componentes de los sedimentos (Barja y dos Santos Afonso, 2005).

1.2. Estudios ecotoxicológicos.

1.2.1. Acetilcolinesterasa

En los organismos, la transmisión de señales de una neurona a otra se genera a partir de sustancias químicas conocidas como neurotransmisores. Uno de ellos es la acetilcolina (ACh), que se genera a partir de la molécula acetyl coenzima-A y colina mediante una reacción catalizada por la enzima colina-acetiltransferasa.

Una vez generada la ACh es almacenada y transportada en las vesículas presinápticas hacia las hendiduras sinápticas donde es liberada para unirse a los receptores postsinápticos transmitiendo los impulsos nerviosos. Éstos son detenidos al ser

hidrolizado el neurotransmisor ACh por la enzima AChE, permitiendo que el organismo vuelva a su estado basal.

La AChE (Figura 1.10a) está presente en el sistema nervioso y los músculos tanto en organismos vertebrados como invertebrados (Wiesner *et al.*, 2007). Pertenece a la familia de enzimas colinesterasas, y al grupo de las serina-hidrolasas, ya que la serina del centro activo de la enzima es la que reacciona con el neurotransmisor ACh y lo hidroliza liberando colina y formando un intermediario acetil-AChE (Figura 1.10b). Este intermediario luego libera acetato y AChE, quedando la enzima disponible para hidrolizar otro neurotransmisor ACh y volver a iniciar el ciclo. El acetato pasa a la sangre y la colina es recuperada por las neuronas para la síntesis de nuevas moléculas neurotransmisoras (Figura 1.10b). La función normal de la acetilcolina depende de la hidrólisis de la acetilcolinesterasa.

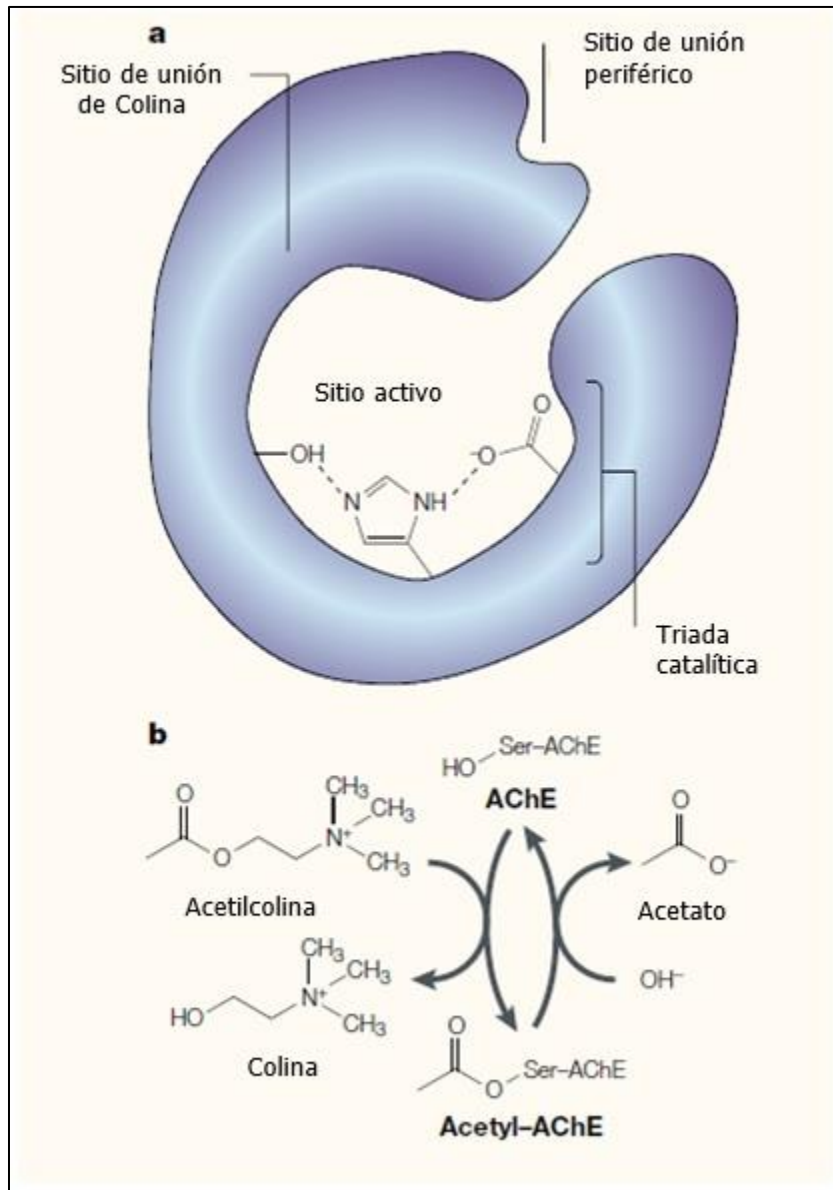


Figura 1.10. a. Estructura de la enzima acetilcolinesterasa, identificada por cristalografía de rayos X. **b.** La enzima acetilcolinesterasa hidroliza a la acetilcolina formando un intermediario acetil-AChE, liberando colina y posterior hidrólisis del intermediario acetil-AChE, liberando colina y posterior hidrólisis del intermediario liberando acetato. Tomado y modificado de Soreq y Seidman (2001).

La neurotransmisión mediada por ACh es fundamental en el funcionamiento del sistema nervioso de los organismos. Su bloqueo gradual genera consecuencias en las funciones cognitivas, autónomas y neuromusculares, y el bloqueo abrupto puede ser letal (Wright *et al.*, 1993).

La actividad de esta enzima es muy importante en los peces para el desarrollo de muchas funciones fisiológicas, como la capacidad locomotora, evasión de depredadores, localización de presas, orientación, el patrón de distribución espacial y la alimentación (Bradbury *et al.*, 2008). Otras investigaciones en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) han informado que esta enzima está involucrada en el desarrollo normal del sistema nervioso (Tripathi y Srivastava, 2008).

1.2.2. Efectos de los organofosforados sobre la enzima AChE

El mecanismo de acción de algunos plaguicidas OPs y los carbamatos se basa en la inhibición de la AChE. Un grupo fosfato o carboxilato de estos compuestos reacciona químicamente con el sitio activo de la enzima, específicamente con el grupo OH de la serina de la enzima, formando un éster de fosfato o carboxilato. De esta forma la enzima queda inhabilitada para realizar la hidrólisis del neurotransmisor, provocando una acumulación de ACh en los ganglios autónomos, uniones colinérgicas neuroefectoras y en el sistema nervioso central (Soreq y Seidman, 2001) (Figura 1.11).

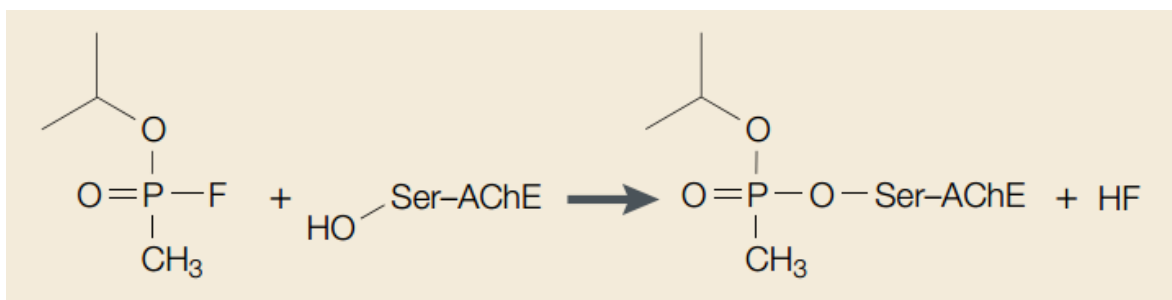


Figura 1.11. Reacción de la acetilcolinesterasa con un compuesto organofosforado. Tomado de Soreq y Seidman (2001). El grupo fosfato del inhibidor del sitio activo reacciona con la AChE y produce un éster de fosfato o carboxilato estable, análogo a la acetil-AChE, el intermediario de la catálisis. De esta manera la enzima no está disponible para su función fisiológica. En esta Figura se toma como ejemplo el compuesto Sarín que fue utilizado como arma química.

La acumulación de ACh produce la interrupción de la transmisión normal de los impulsos nerviosos, provocando una sobreestimulación y posterior desensibilización de los receptores nicotínicos y muscarínicos (Fernández *et al.*, 2010). Altas concentraciones de ACh en el sistema nervioso central causa alteraciones motoras, sensoriales, de comportamiento y posteriormente depresión de la función motora respiratoria, pudiendo ocasionar la muerte (Nobonita y Suchismita, 2013).

No todos los compuestos OPs tienen un efecto directo sobre la actividad de AChE. El subgrupo fosforotioato al que pertenece CPF tiene baja capacidad de inhibir directamente a la enzima, es metabólicamente activado por el citocromo P450, y se forman potentes inhibidores denominados oxones (sección 1.1.3.1.1). El subgrupo fosfato, al que pertenece el CPF-oxón, es un inhibidor directo e irreversible de la enzima. El CPF-oxón puede llegar a ser un potente inhibidor hasta 3000 veces más que el CPF (Cox, 1994).

1.2.3. AChE como biomarcador de neurotoxicidad

Debido a la sensibilidad de la enzima AChE a los compuestos OPs, en las últimas dos décadas han aumentado el número de trabajos toxicológicos tanto ambientales como de medicina ocupacional en los que se utiliza la actividad de esta enzima como un biomarcador de neurotoxicidad (Lionetto *et al.*, 2013). Cuando se mide la inhibición de la actividad de AChE, no sólo se puede saber si el organismo ha sido expuesto o no a estos contaminantes, sino también si la dosis de exposición ha sido suficiente para alcanzar el sitio diana y producir efectos fisiológicos (Fulton y Key, 2001).

Una de las ventajas de estudiar la presencia y efectos de estos compuestos a partir de la inhibición de la actividad de AChE es que, como se mencionó anteriormente, algunos de estos plaguicidas se degradan muy rápidamente en el ambiente en términos de días e incluso horas, pudiendo encontrarse en niveles por debajo de los detectables en muestras

ambientales. En cambio, la inhibición de la actividad AChE puede persistir durante muchos más días e incluso semanas (Fulton y Key 2001).

Cabe señalar que no sólo se ha estudiado la inhibición de la actividad AChE por plaguicidas OPs y carbamatos sino también por otros contaminantes como metales pesados y piretroides (Järup, 2003; Singh y Yadav, 2010; Richetti *et al.*, 2011).

Uno de los grupos en los que más se han desarrollado estudios ecotoxicológicos ha sido el de los peces, ya que son organismos sensibles a la presencia de tóxicos en el sistema acuático. En el cerebro de estos organismos se ha determinado mayor sensibilidad de AChE a la inhibición por plaguicidas, con respecto a otros tejidos (Pathiratne *et al.*, 1998; Varó *et al.*, 2003). A la vez, se sabe que la sensibilidad a la inhibición es específica en cada especie (Perkins y Schlenk, 2000).

Se ha sugerido que una inhibición de la actividad de AChE por encima del 20 % resulta un indicativo de exposición a agentes anticolinesterásicos (Ludke *et al.*, 1975). Algunos autores señalan que la pérdida de más del 70 – 80 % de la actividad de AChE en el cerebro lleva a la muerte de los peces (Chovanec *et al.*, 2003), aunque otros autores han reportado una tolerancia mayor al 90 – 95 % de inhibición para ciertas especies (Sturm *et al.*, 2000; Fulton y Key, 2001; Ferrari *et al.*, 2004).

La inhibición de la actividad de AChE por exposición a CPF, se genera a concentraciones muy bajas de este insecticida produciendo efectos neurológicos, oxidativos, histopatológicos y endócrinos, evidenciados con espasmos musculares, hiperactividad, parálisis, pérdida de equilibrio, aumento en el movimiento opercular, natación errática, el letargo y finalmente la muerte (Deb y Das, 2013).

En algunos estudios, con los peces guppy se demostró que una vez inhibida la actividad de AChE por exposición a concentraciones menores de $1 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ de CPF, esta enzima no se

recupera fácilmente, ya que después de mantener los animales en agua no contaminada durante dos semanas no se observó recuperación (Cox, 1994). Sin embargo, en otros trabajos se observó recuperación de la enzima después de la exposición (Yang *et al.*, 2011). Además, se encontró una correlación positiva entre el patrón de recuperación de la actividad de AChE y el comportamiento locomotor, por lo que se propuso este parámetro comportamental como una herramienta ecotoxicológica para evaluar la inhibición de la actividad de AChE (Sharbidre *et al.*, 2011).

En diferentes trabajos se ha determinado la mayor sensibilidad de la enzima AChE al CPF-oxón respecto al CPF. Por ejemplo en algunas Investigaciones desarrolladas con embriones de *Danio rerio* en bioensayos de exposición aguda a concentraciones subletales de CPF, no se evidenció la inhibición de la actividad de AChE (Yang *et al.*, 2011), a diferencia de la exposición de embriones de esta misma especie a CPF-oxón, donde sí se observó inhibición de la actividad enzimática (Jacobson *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011).

En relación al glifosato, diferentes autores han reportado la inhibición de la actividad de AChE en la sección anterior de los peces, por la exposición a formulados de glifosato. En la especie *Leporinus obtusidens* se determinó la inhibición de la enzima, trastornos regresivos, y alteraciones metabólicas y hematológicas (Gluszczak *et al.*, 2006). En la especie *Prochilodus lineatus* la exposición a este contaminante produjo también la inhibición de la actividad de AChE, en conjunto con efectos de estrés oxidativo (Modesto y Martinez, 2010a).

Por otra parte, cabe señalar que la actividad enzimática de AChE en los peces, puede variar naturalmente dependiendo de la especie, el ciclo reproductivo, el sexo, la edad y los parámetros morfométricos (Chuiko *et al.*, 1997). Se ha informado de biomarcadores fisiológicos que pueden fluctuar temporalmente de acuerdo a los cambios en el desarrollo de los organismos (Wenderlaar Bonga, 1997). Es por ello que, en pruebas de toxicidad, así como en protocolos de biomonitoreo, donde se estudian los efectos sobre biomarcadores

fisiológicos como la actividad de AChE, es necesario conocer y tener en cuenta los factores que pueden afectar sus niveles basales (Schlenk *et al.*, 2008, Menéndez-Helman *et al.*, 2015).

Asimismo, se ha evidenciado que la actividad basal (sin el efecto de algún contaminante) de AChE del cerebro de los peces no sólo se ve influenciada por parámetros intrínsecos, morfométricos o fisiológicos, sino también por la estacionalidad. Algunas investigaciones han reportado fluctuaciones de la actividad enzimática entre las diferentes estaciones. Se observó mayor actividad durante la estación de verano y menor actividad en invierno en la especie *Rutilus rutilus* (Chuiko *et al.*, 1997); y esta misma fluctuación se observó en la especie *Cnesterodon decemmaculatus* (Menéndez-Helman *et al.*, 2013; 2015); en la especie *Anguilla anguilla*, se reportó mayor actividad de esta enzima en verano y menor actividad durante el otoño (Guimaraes *et al.*, 2009). Como posibles causas de esta variación estacional se propone la temperatura del ambiente, el período reproductivo y el fotoperíodo, descartándose el sexo de los peces (Chuiko *et al.*, 1997).

1.3. *Cnesterodon decemmaculatus* como especie test

Cnesterodon decemmaculatus (Jenyns, 1842), conocido con el nombre de “madrecita de agua”, es una especie de poecílido nativa de Sudamérica, encontrándose en Argentina, sur de Brasil, y Uruguay. Tiene una amplia distribución en ríos, arroyos y sistemas lénticos, especie bentopelágica, de agua dulce a salobre, pH 7,5 – 8,2, tolerante a variaciones de temperatura y salinidad (Somma *et al.*, 2011).

Las madrecitas (Figura 1.12), son peces de tamaño pequeño, ovovivíparo, con una evidente diferenciación sexual, los machos presentan una aleta anal modificada en órgano intromitente (“gonopodio”), cuerpo comprimido, boca oblicua, dorso recto o aplastado, ojos grandes, pedúnculo caudal alto y comprimido lateralmente (Somma *et al.*, 2011).

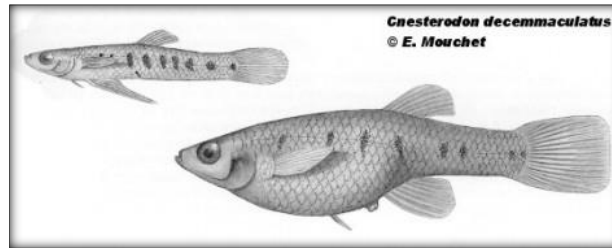


Figura 1.12. Ejemplar macho (izquierda) y hembra (derecha) de *Cnesterodon decemmaculatus*. Tomado de Menni (2004).

Clasificación Taxonómica

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclase: Osteichthyes

Orden: Cyprinodontiformes

Clase: Actinopterygii

Familia: Poeciliidae

Genero: *Cnesterodon*

Especie: *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842)

Nombre vulgar: Madrecita de agua

Estos peces, además de ser de tamaño pequeño, tienen un crecimiento rápido y período corto de reproducción, son fáciles de mantener en laboratorio, razón por la cual son considerados buenos modelos experimentales en biología y toxicología (Molero y Pisanó, 1987). Además, han sido utilizados en biomonitoreos en ambientes de agua dulce (Salibián, 2006).

Se han desarrollado diferentes trabajos en los que se ha reportado la inhibición de AChE en *C. decemmaculatus*, después de la exposición a diferentes contaminantes, como metales pesados y plaguicidas (de la Torre *et al.*, 2002; Menéndez-Helman *et al.*, 2012; 2013). Menéndez-Helman *et al.* (2012) reportaron la inhibición de la enzima por

exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de PMG. Respecto al CPF, no se encontraron estudios previos en los que se evalúe el efecto de este plaguicida como principio activo sobre la actividad de AChE en *C. decemmaculatus*.

Por otra parte, se ha reportado en esta especie la existencia de variaciones cíclicas anuales en la actividad enzimática de AChE, sin la exposición a ningún contaminante, observándose una mayor actividad de la enzima durante las estaciones de verano disminuyendo significativamente por debajo del 40 % en invierno (Menéndez-Helman *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que la actividad de AChE puede variar naturalmente, se hace relevante evaluar los posibles cambios en la relación dosis-respuesta durante las diferentes estaciones del año.

1.4. Hipótesis

Los plaguicidas organofosforados clorpirifós y glifosato, utilizados ampliamente en Argentina, causan efectos adversos sobre especies no-blanco como los peces de agua dulce.

La actividad de AChE en la especie *Cnesterodon decemmaculatus* es inhibida por la exposición a estos plaguicidas. En el caso del clorpirifós, éste es biotransformado y su metabolito presenta un mecanismo directo de inhibición, mientras que el glifosato involucra otras vías de inhibición.

La actividad basal de la enzima AChE en la especie *Cnesterodon decemmaculatus* presenta variaciones estacionales. Los procesos que determinan estos cambios influyen en la relación dosis-respuesta, tanto para la exposición a CPF como a PMG.

1.5. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la exposición a dos plaguicidas (clorpirifós y glifosato) sobre la actividad de AChE en el pez de agua dulce *Cnesterodon decemmaculatus* y evaluar la existencia de variaciones estacionales en la relación dosis-respuesta.

1.5.1. Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de exposiciones subletales al insecticida clorpirifós en la actividad de AChE de *Cnesterodon decemmaculatus*.
2. Estudiar el efecto de exposiciones subletales al herbicida glifosato en la actividad de AChE de *Cnesterodon decemmaculatus*.
3. En el caso de observarse inhibición en la actividad de AChE analizar si el mecanismo de inhibición es directo.
4. Finalmente, evaluar la existencia de posibles cambios en la relación dosis-respuesta durante diferentes estaciones del año.

Materiales & Métodos

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El efecto de la exposición a concentraciones subletales de clorpirifós (CPF) y glifosato (PMG) sobre la actividad de AChE se evaluó en el pez *Cnesterodon decemmaculatus*. Para ello se llevaron a cabo bioensayos de exposición durante 96 h, según Norma IRAM 29112 (2008), utilizándose concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y de 1 y 10 $\text{mg PMG} \times \text{L}^{-1}$. Posteriormente se prepararon homogenatos de la sección anterior de los peces en los que se determinó el contenido de proteínas y la actividad de la acetilcolinesterasa.

Los grupos control de los bioensayos se utilizaron para la caracterización de la actividad basal de AChE. Al mismo tiempo se analizó el impacto de la exposición aguda a los plaguicidas estudiados sobre la actividad de este biomarcador.

Para estudiar el mecanismo por el cual puede afectarse la actividad de AChE por la exposición a ambos plaguicidas, se realizaron ensayos *in vitro*.

Finalmente, se realizaron bioensayos en diferentes estaciones del año (otoño, invierno, verano y primavera) para evaluar la influencia estacional en los niveles basales de AChE y en la relación dosis-respuesta.

2.1. Organismo test: *Cnesterodon decemmaculatus*

Los ejemplares de *C. decemmaculatus*, fueron obtenidos de un acuario que recolectaba ejemplares de arroyos de la Prov. de Buenos Aires, y con quien se coordinaba previamente a los bioensayos la fecha en que serían capturados. Una vez obtenidos, los mismos eran aclimatados por un período de 15 días en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEyN-UBA), en acuarios de vidrio con agua de red declorada, aireación constante, en condiciones de temperatura y luz controladas

($23,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo 12L:12O) y se alimentaban con comida comercial Tetra Fin® en pellet finamente molidos.

2.2. Ensayos *in vivo*.

Se realizaron bioensayos semiestáticos agudos con el objetivo de evaluar la actividad de AChE de la especie *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a concentraciones subletales de los plaguicidas. Para ello, se siguió el protocolo para la determinación de la toxicidad de sustancias en peces de agua dulce propuesto por el Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM, 2008).

Se seleccionaron peces del stock de 2,5 cm de largo aproximadamente y se distribuyeron entre los diferentes recipientes de material plástico inerte de polipropileno. Se colocaron 5 ejemplares por recipiente en 500 mL de agua moderadamente dura (AMD), manteniendo una relación de 1 g por litro. El AMD fue preparado según protocolo USEPA (1993) (sección 2.6.1). Los animales fueron aclimatados en AMD durante 48 h en cámara de incubación bajo condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) y fotoperíodo 12L:12O (Figura 2.1) y se mantuvieron sin alimentación durante 24 horas previas al bioensayo.



Figura 2.1. Recipientes de exposición y cámara de incubación.

Transcurridas las 48 h de aclimatación, los peces fueron expuestos durante 96 h a dos concentraciones subletales tanto para CPF como para PMG, o mantenidos en condiciones control.

En los bioensayos de clorpirifós los peces fueron expuestos a concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$. Las soluciones se prepararon por dilución de la solución madre (1000 mg CPF $\times \text{L}^{-1}$ en etanol) con AMD y fueron distribuidos en los recipientes (control con AMD y las dos soluciones de CPF, con sus respectivos duplicados). La concentración final de etanol en los bioensayos fue de 1×10^{-4} - 5×10^{-4} %. Además del control en AMD, en uno de los bioensayos de CPF se realizó un control extra para evaluar si la concentración de etanol utilizada influía *per se* en la actividad de AChE.

Las concentraciones en los bioensayos de exposición a PMG (forma ácida, 95 % pureza) a las que se expusieron los peces fueron: 1 y 10 mg PMG $\times \text{L}^{-1}$. Se preparó una solución madre de 200 mg PMG $\times \text{L}^{-1}$ en agua Milli-Q que fue sonicada para garantizar su total disolución y las concentraciones utilizadas en el ensayo se prepararon por dilución de la misma en AMD. Las soluciones fueron luego transferidas a los recipientes (control con AMD y las dos soluciones de PMG, con sus respectivos duplicados).

En todos los medios de ensayo se verificó el pH. En el caso del PMG que por su característica ácida modifica el pH, éste debió ajustarse con NaOH 4 M para alcanzar los mismos valores que el control. Los peces fueron distribuidos entre los tratamientos, y sus duplicados, de forma aleatoria quedando en cada recipiente 5 animales ($n = 5$) como se aclaró anteriormente.

En relación a las concentraciones utilizadas en el trabajo, las mismas se encuentran por debajo de las máximas concentraciones reportadas para cuerpos de agua de la región: $10,8 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ para CPF y $10,9 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ para PMG (Marino y Ronco 2005; Ronco, 2011). A la vez, cabe señalar que se encuentran muy por debajo de los valores de CL_{50} que han sido

previamente reportados para *C. decemmaculatus*: $105,3 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ (Paracampo *et al.*, 2015) y $75 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$; y $> 225 \text{ mg PMG} \times \text{L}^{-1}$ (Carriquiriborde *et al.*, 2010).

En la Figura 2.2 se especifica el diseño experimental utilizado en los bioensayos de CPF y de PMG.

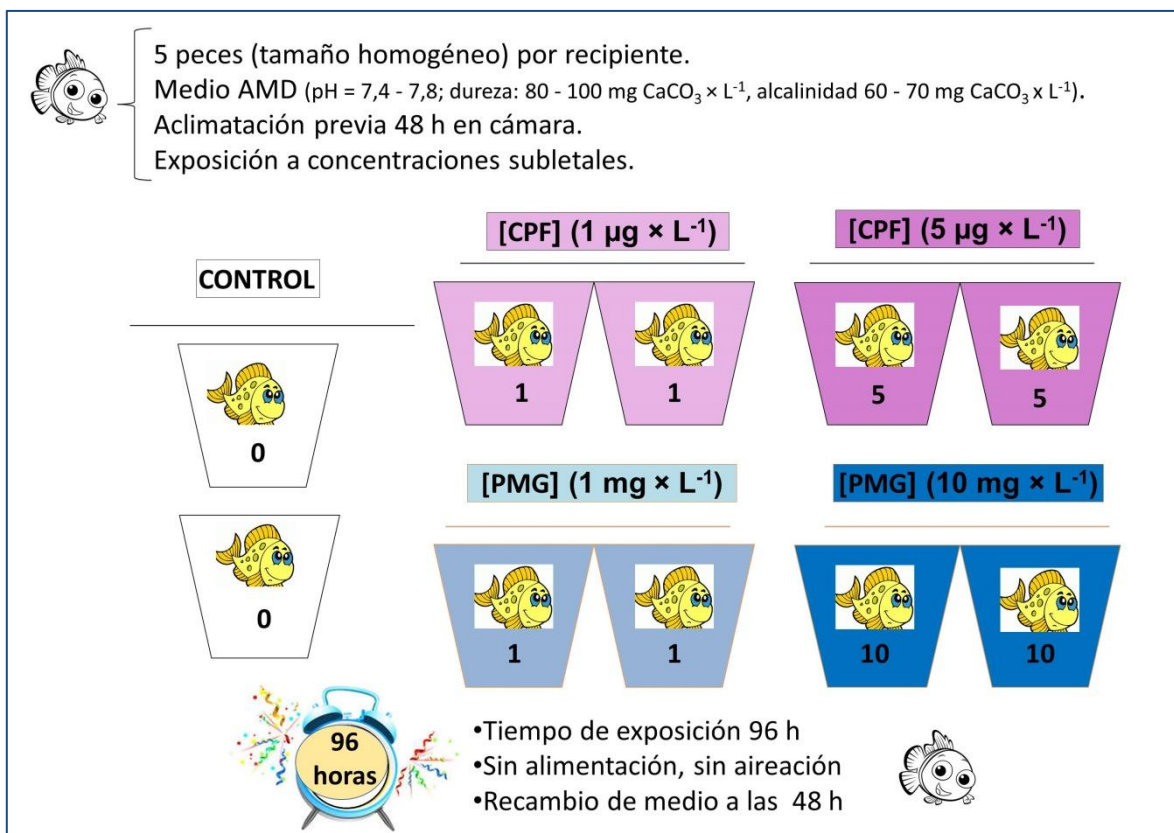


Figura 2.2. Diseño experimental utilizado en los bioensayos *in vivo* para clorpirifós y glifosato.

Los recipientes fueron parcialmente cubiertos y las soluciones del ensayo se renovaron completamente después de 48 h de iniciada la exposición. Se tomó una alícuota de la solución de cada tratamiento al inicio, luego de las 48 h previo recambio, post recambio y a tiempo final; las cuales fueron congeladas para la determinación de la concentración de los plaguicidas en los medios de ensayo. Cada 24 horas a partir del inicio del bioensayo (24, 48, 72 y 96 h), se revisaron todos los recipientes, se determinó la mortalidad, tanto para los tratamientos de CPF, de PMG como para los controles, y posteriormente se retiraron los peces muertos.

2.2.1. Preparación de homogenatos.

Se prepararon homogenatos para la determinación del contenido de proteínas y la actividad de la acetilcolinesterasa.

Transcurridas las 96 h de exposición, al finalizar el bioensayo, los peces fueron anestesiados por inmersión en agua-hielo por 2-3 minutos. Luego de alcanzar inmovilidad se colocaron sobre una plancha de parafina refrigerada, se seccionó la médula con tijera de punta fina para evitar el sufrimiento. Posteriormente fueron sexados, se midió la longitud total (L_T) con un calibre digital ($\pm 0,1$ cm) y se pesó (P_c) en una balanza analítica ($\pm 0,01$ mg). Los animales se sacrificaron mediante un corte a la altura del opérculo de dorsal a ventral, quedando definida la sección anterior, correspondiente a la cabeza desde el opérculo hasta la boca, incluyendo branquias, opérculo y cabeza completa. Figura 2.3.



Figura 2.3. Sección anterior de *C. decemmaculatus*. La flecha indica el corte que se realizó.

Las secciones anteriores se colocaron en una caja de Petri con Parafilm para determinar su peso, para la preparación de los homogenatos y la posterior determinación enzimática. La homogeneización se realizó con un equipo Decalab, rotor vidrio-teflón, a 3500-4000 rpm en solución buffer de K_2HPO_4 0,1 M, pH = 8, la cantidad promedio de golpes por homogenato fue de 20. El volumen del buffer fue calculado aplicando un factor ($F = 25$) al peso del tejido:

$$V_{\text{buffer}} = P_{\text{tejido}} \times F \quad [2.1]$$

Posteriormente, los homogenatos se centrifugaron a 10000 g, 4°C, durante 15 minutos, en microcentrífuga (HERMLE Z 216 MK), el pellet fue descartado y se conservó los sobrenadantes en tubos eppendorf de 1,5 mL, en freezer a una temperatura de -20°C, hasta el momento de las determinaciones enzimáticas (1 - 5 días).

Con el peso y la longitud de los peces se calculó el factor de condición, expresado como K, utilizado para comparar la "condición" o "estado nutricional" de un pez o población, basándose en que los peces de mayor peso, a una determinada longitud, presentan una mejor condición (Froese, 2006).

El factor de condición (K), expresado por Fulton, fue calculado como:

$$K = \frac{P_C \times 100}{L_T^3} \quad [2.2]$$

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

2.2.2. Determinación de la actividad de AChE.

Las colinesterasas hidrolizan ésteres de colina, con una actividad máxima a pH = 7,7. La determinación de la actividad de AChE se realizó a partir del método de Ellman *et al.* (1961). Este método se basa en la determinación de la velocidad de aparición de tiocolina como producto de la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina, catalizada por la enzima AChE. La tiocolina en presencia del cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), produce el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, compuesto de color amarillo que puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 412 nm. La velocidad de aparición de la coloración es proporcional a la actividad de la enzima. En la Figura 2.4 se describe la reacción involucrada en la medición.

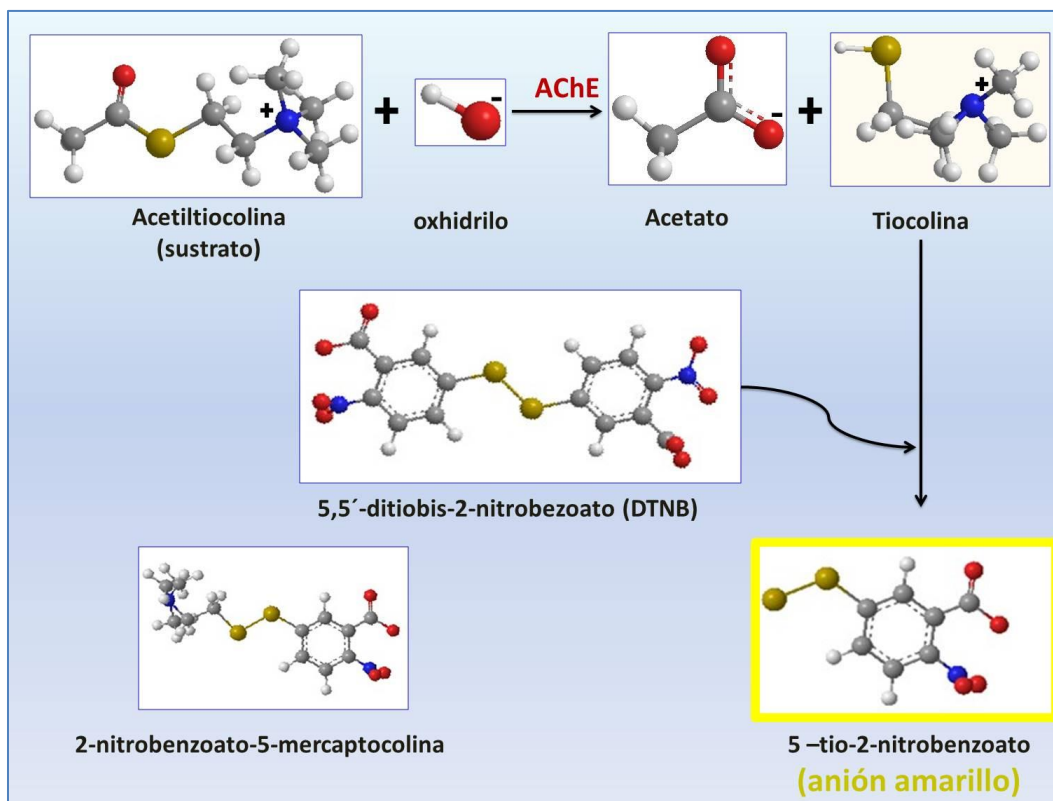


Figura 2.3. Determinación de la actividad de AChE. Descripción de la reacción en la que se basa el método Ellman *et al.* (1961).

El buffer fosfato (pH = 8) 0,1 M se termostató en un baño a temperatura ambiente (20 - 25°C). El sustrato acetiltiocolina fue preparado en el mismo momento de las determinaciones (ioduro de acetiltiocolina 0,075 M), y fue protegido de la foto-oxidación con papel aluminio. La solución de DTNB fue preparada previamente y descongelada en el momento de utilizarse. Los homogenatos, el DTNB y el sustrato acetiltiocolina se mantuvieron en frío con hielo durante las determinaciones.

Las muestras se midieron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, siguiendo el siguiente protocolo: 3 mL de buffer fosfato 0,1 M (pH = 8), 10 µL de homogenato, 100 µL de solución de DTNB y 20 µL de sustrato acetiltiocolina. El estudio cinético se realizó utilizando como blanco: 3 mL de buffer fosfato (pH = 8) 0,1 M, 10 µL de homogenato, 100

μL de solución de DTNB, sin sustrato acetiltiocolina. Se homogenizó la mezcla por inversión.

Las lecturas de absorbancia se realizaron a 412 nm durante 2 minutos a intervalos de 8 segundos. Cada muestra se midió por triplicado. Se graficaron los valores de absorbancia versus tiempo (min) obteniéndose una función lineal y a partir de las ecuaciones de las rectas se calculó el promedio de las pendientes. La actividad enzimática (A) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$A = \frac{m \times f_{dil} \times 1000}{l \times \varepsilon} \quad [2.3]$$

donde m es la pendiente promedio de la recta, f_{dil} es el factor de dilución de ($V_{TOTAL}/V_{homogenato}$), 1000 es el factor de conversión de mM a μM , l es el paso óptico de la celda (cm) y ε es el coeficiente de extinción molar del yoduro de acetiltiocolina ($13,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

A partir de esta ecuación, A queda expresada en $M \times \text{min}^{-1} = \text{nmoles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$.

2.2.3. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas tisulares fue cuantificada mediante la técnica de Lowry *et al.* (1951). Es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. Se basa en la detección del color azul que se genera al reaccionar el complejo proteína-cobre con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Esta coloración presenta una absorbancia máxima a 650 nm.

Para la determinación de la concentración de proteínas en la muestra se construyó una curva patrón a partir de una solución stock de albúmina bovina ($1 \text{ mg BSA} \times \text{mL}^{-1}$) con las

siguientes concentraciones: 0, 10, 20 y 30 μg de albumina en 200 μL en agua Milli-Q. Al mismo tiempo se prepararon tubos con 8 μL de homogenato de sección anterior, llevados a un volumen de 200 μL con agua Milli-Q.

Cada determinación se realizó por triplicado. El volumen de 8 μL de homogenato se determinó en ensayos previos de forma de garantizar que los valores de absorbancia se encontraran dentro del intervalo de los valores de la curva patrón.

La lectura de absorbancia se realizó a $\lambda = 650 \text{ nm}$, en celda de plástico de 1 cm de paso óptico. Para determinar la concentración de proteínas por volumen de homogenato, se interpoló la absorbancia obtenida en la curva patrón de BSA expresándose el resultado como $\text{mg de proteínas} \times (\text{mL homogenato})^{-1}$ (sección 2.4).

2.2.4. Determinación de la concentración de plaguicidas 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 una columna AG4-AS4, detector de conductividad, y un loop de inyección de 25 μL . La corrida cromatográfica se realizó con un eluyente mezcla de NaOH 4 mM y Na_2CO_3 9 mM, y un flujo de $0,9 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$. Se inyectaron estándares de PMG (Sigma) recién preparados, en un rango de 0,5; 1; 5; 10 y 20 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$. Luego se inyectaron las alícuotas de las soluciones utilizadas en los bioensayos. Para la cuantificación se utilizó el software Clarity Lite.

Las concentraciones usadas en los bioensayos de CPF corresponden a las reportadas ambientalmente. Por esta razón, al encontrarse en el orden de los $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ (ppb), las concentraciones analíticas se determinaron en un equipo cromatógrafo líquido de masas /masas con cuadrupolo y tiempo de vuelo (LC-MS-MS QTOF). Equipo Agilent con un detector Agilent QTOF 6530 equipado con ionizador dual ESI.

La separación cromatográfica fue realizada en una columna Eclipse Plus C-18 (tamaño de partícula 1,8 μm , diámetro 2,1x100 mm) a 60°C. El volumen de inyección fue de 1 μL . La fase móvil: formiato de amonio 5mM y ácido fórmico 0,1 % en agua (solvente A), y formiato de amonio 5mM y ácido fórmico 0,1 % en metanol (solvente B); con gradiente lineal programado y velocidad de flujo de 0,4 mL/min. Las condiciones de la ionización: gas N_2 ; temperatura 300°C; flujo 13 L/min; nebulizer 60 psig. Los parámetros del scan se programaron de la siguiente manera: VCap, 3500 V; fragmentor, 120V; Skimmer, 65V; OctopoleRFPeak 750V. El espectro de las muestras es adquirido en modo Auto ms/ms. El rango de adquisición m/z fue 40-600 u, con una velocidad de barrido de 1,00 espectro/seg. Las masas de referencia fueron usadas como target y qualifier. Los resultados se analizaron utilizando Software: MassHunter y librerías de compuestos químicos acopladas al sistema de manejo de información Pesticidas PCL. En paralelo a las muestras se inyectaron también estándares de CPF con los que se realizó la curva patrón para la cuantificación.

2.3. Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo con los plaguicidas organofosforados: clorpirifós, su metabolito clorpirifós-oxón (CPF-oxón) y glifosato. Para este estudio se utilizaron alícuotas de homogenatos de la sección anterior de organismos no expuestos (sección 2.2.1).

2.3.1. Ensayos *in vitro* - CPF y CPF-oxón

En ensayos preliminares, se analizaron diferentes concentraciones de CPF y tiempos de co-incubación (30 min a 3 h). El intervalo de concentraciones se determinó considerando informes previos de efectos *in vitro* de CPF sobre la actividad de AChE en peces (Kavitha y Venkateswara Rao, 2008; Venkateswara Rao y Kavitha, 2010).

A partir de dichas pruebas, se seleccionó el tiempo de co-incubación más largo (para obtener los porcentajes más altos de inhibición) que no afectase la actividad de la enzima en la condición control (aquel para el que la disminución de la actividad fuese menor a un

10 %). Se llevaron a cabo co-incubaciones de AChE con diferentes concentraciones de CPF (concentraciones finales: 0, 25, 50, 100 y 200 mg CPF \times L⁻¹).

Para este propósito, se añadieron diferentes volúmenes de una solución madre de CPF (1000 mg de CPF \times L⁻¹ en 10 % etanol, buffer fosfato 0,1 M) a alícuotas de 60 μ L de homogenatos de sección anterior de animales no expuestos (n = 4). Se alcanzó un volumen final de 75 μ L añadiendo: 60 μ L de homogenato, diferentes cantidades de buffer fosfato y de la solución madre de CPF para obtener las concentraciones previamente especificadas. Se realizaron dos controles diferentes, el primero añadiendo a 60 μ L de homogenato 15 μ L de buffer fosfato y el segundo añadiendo buffer fosfato y etanol, de forma de obtener en el volumen final la concentración más alta utilizada (2 % etanol). La actividad de AChE se determinó como se indicó previamente (sección 2.2.2) después de 3 h de co-incubación. En la Figura 2.5 se describe el diseño experimental del ensayo *in vitro* de CPF.

Se realizó un procedimiento similar para las co-incubaciones de CPF-oxón. La solución madre fue de 800 nM en 0,05 % de etanol. En este caso, las concentraciones finales de CPF-oxón fueron de 0, 10, 50, 100 y 200 nM y el tiempo de co-incubación fue de 15 min de acuerdo con el procedimiento descrito por otros autores (Boone y Chambers, 1997, Carr *et al.* 1997). En la Figura 2.6 se describe el diseño experimental del ensayo *in vitro* de CPF-oxón.

Diseño experimental. Ensayo *in vitro* Clorpirifós (CPF)

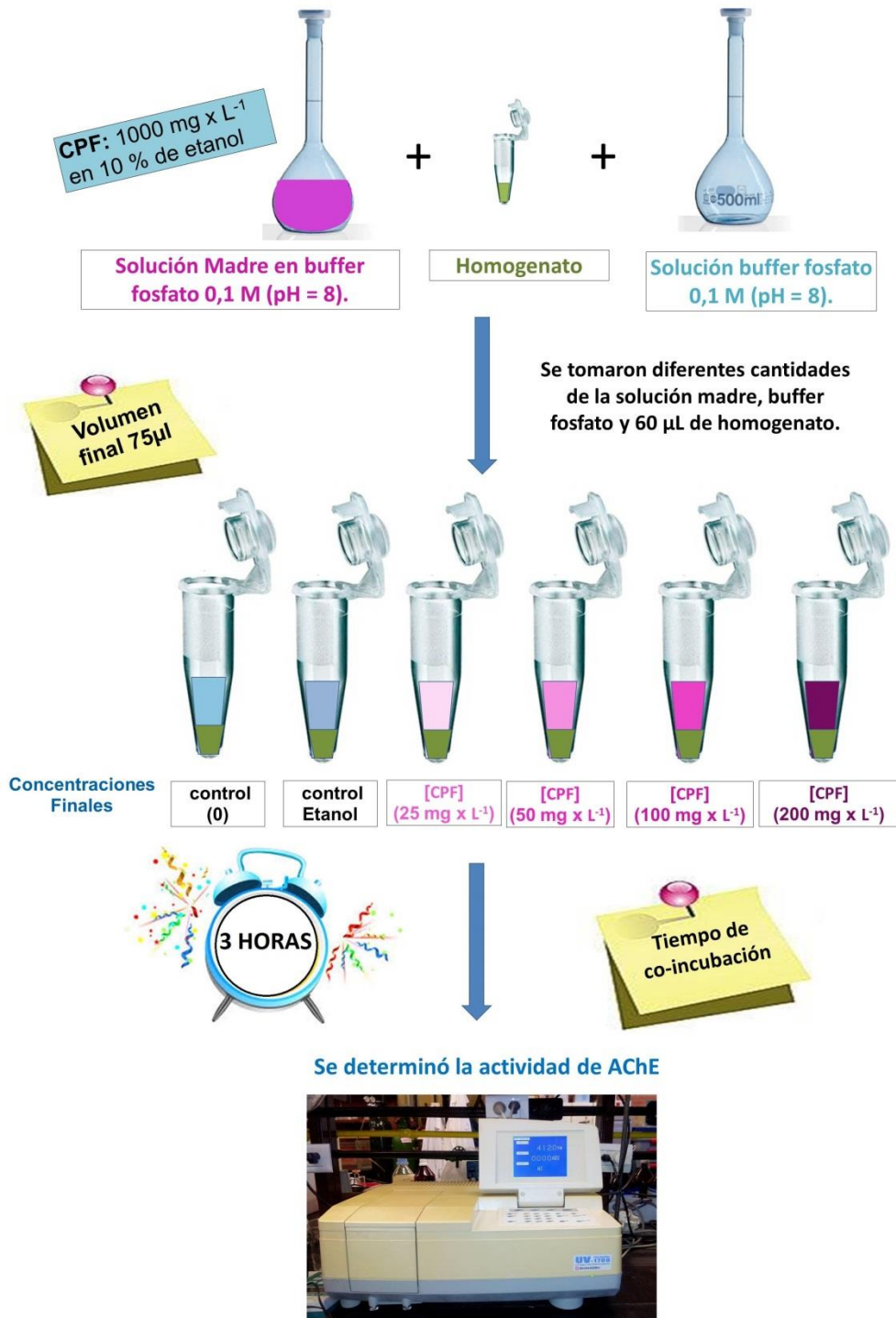


Figura 2.4. Diseño experimental del ensayo *in vitro* para clorpirifós (CPF).

Diseño experimental. Ensayo *in vitro* Clorpirifós-oxón (CPF-oxón)

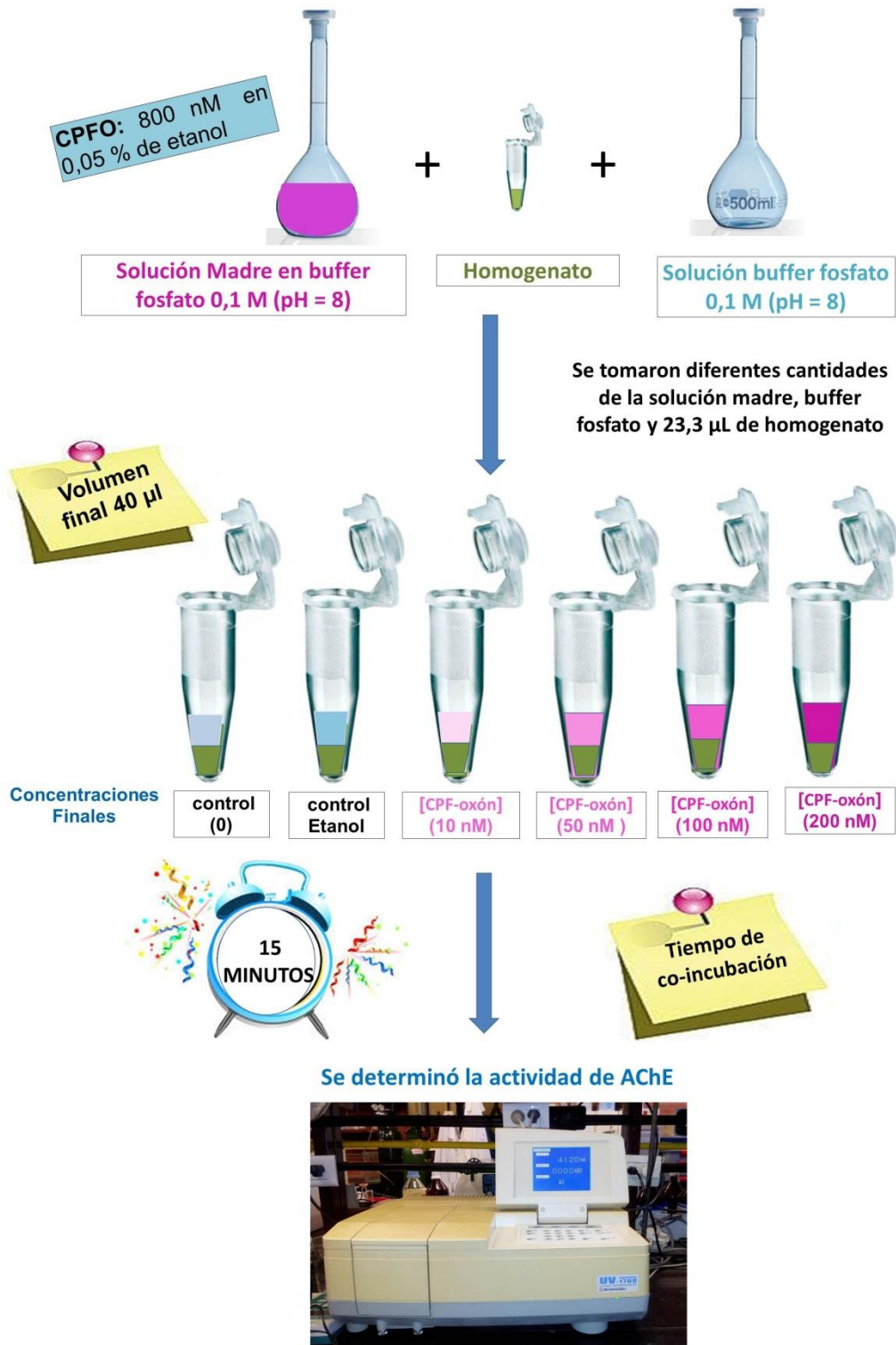


Figura 2.5. Diseño experimental del ensayo *in vitro* para clorpirifós-oxón (CPF-oxón).

2.3.2. Ensayos *in vitro* - PMG

Se llevaron a cabo co-incubaciones de AChE de homogenatos de animales no expuestos (n = 4), en tubos eppendorf de 1,5 mL, durante 3 h con diferentes concentraciones de PMG (concentraciones finales: 0; 2,5; 5; 7,5; 10 y 20 mM PMG \times L⁻¹). Para ello, se añadieron diferentes cantidades de solución madre de PMG (50 mM en buffer fosfato 0,1 M ajustado a pH = 8 con NaOH 4 M), y alícuotas de 45 μ L de homogenato de la sección anterior de los animales. En todos los casos se alcanzó un volumen final de 75 μ L por adición de buffer fosfato, transcurridas las 3 h de co-incubación se determinó la actividad enzimática AChE (sección 2.2.1.2). En la Figura 2.7 se describe el diseño experimental del ensayo *in vitro* de PMG.

Diseño experimental. Ensayo *in vitro* glifosato

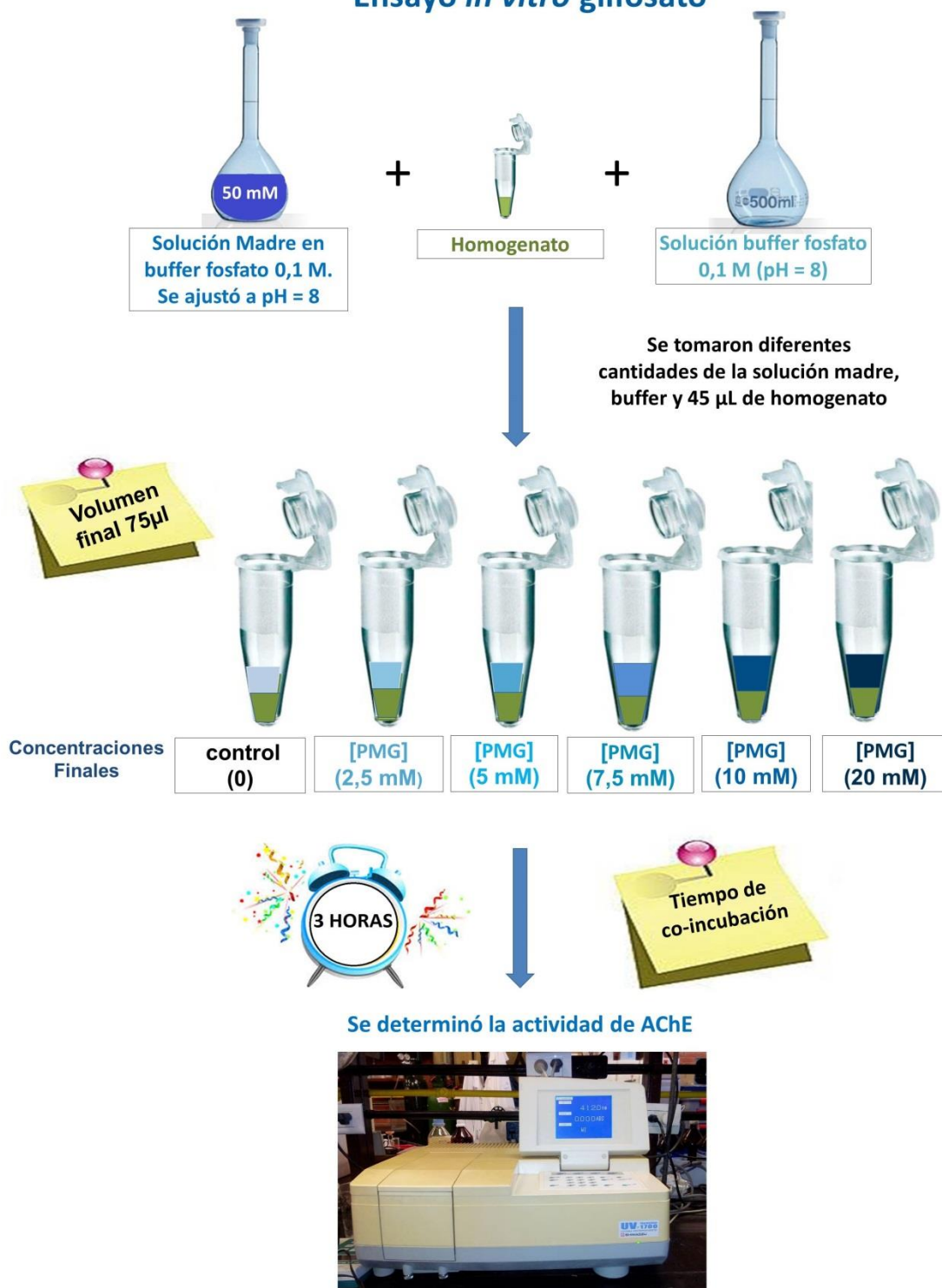


Figura 2.6. Diseño experimental del ensayo *in vitro* para glifosato (PMG).

2.4. Expresión de resultados y análisis estadístico.

La actividad de AChE se expresó y se graficó como actividad específica (AE), la cual se determinó a partir de la ecuación:

$$AE = \frac{A}{PT} \quad [2.4]$$

donde PT es el contenido de proteínas totales ($\text{mg proteínas} \times \text{mL}^{-1}$). La AE queda expresada como $(U) = \text{nmoles} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg Proteínas})^{-1}$.

Tanto en los ensayos *in vivo* como *in vitro* se calculó la media y el error estándar de la media (ESM) para la actividad de AChE, el contenido de proteínas totales y los parámetros morfométricos, tanto del grupo control como de los grupos correspondientes a cada concentración de plaguicida (CPF, CPF-oxón o PMG).

Para los ensayos *in vitro* se calculó la concentración correspondiente al 50 % de inhibición (CI_{50}) a partir de la curva dosis-respuesta aplicando la ecuación "log(inhibitor) vs. normalized response - variable slope" (GraphPad Prism).

Por otra parte, para el análisis de las variaciones estacionales de la actividad de AChE, los resultados fueron graficados como porcentaje promedio respecto al grupo control.

Para el análisis estadístico, de la actividad de AChE y de los demás parámetros estudiados, se verificó la hipótesis de normalidad de varianzas mediante el test de Shapiro-Wilk y para comparar la homogeneidad de las varianzas se utilizó el test Bartlett's. El nivel de significancia para aceptar las hipótesis mediante estos test fue de $p < 0,05$. Posteriormente para las comparaciones entre los tratamientos y entre las distintas estaciones se utilizó el test Kruskal-Wallis y el post test Dunns para el análisis de los datos no paramétricos. Para los datos paramétricos se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) y al encontrar diferencias significativas se aplicó el post test Bonferroni.

El análisis estadístico de los diferentes datos de la actividad de AChE y de los parámetros morfométricos se realizó utilizando el programa estadístico GraphPad prism versión. 5.03.

2.5. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica y las soluciones fueron preparadas con agua Milli-Q.

El ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), (SHBD6835V, CAS 69-78-3), la Albumina Sérica Bovina (BSA), (A7906, CAS 9048-46-8), el ioduro de acetiltiocolina (C₇H₁₆NOSI) (A5751-56, CAS 1866-15-5) utilizados son marca Sigma.

El reactivo Folin- Ciocalteau (17874-16) es marca Anedra.

2.5.1. Plaguicidas

2.5.1.1. Clorpirifós

El clorpirifós (CPF) utilizado fue obtenido en Chem Service. En la Tabla 2.1 se especifican algunas de sus características relevantes.



Nombre	O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil)-fosforotioato
CAS	2921-88-2
Pureza	99,5 %
Almacenaje	2 – 8 °C

Tabla 2.1. Características generales del clorpirifós.

2.5.1.2. Clorpirifós-oxón

El clorpirifós-oxón (CPF-oxón) fue obtenido en Chem Service, en la Tabla 2.2 se especifican algunas de sus características relevantes.



Nombre	O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil)-fosfato
CAS	5598-15-2
Pureza	98,8 %
Almacenaje	0 – 6°C

Tabla 2.2. Características generales de clorpirifós-oxón.

2.5.1.3. Glifosato

El glifosato utilizado fue obtenido en Sigma. En la Tabla 2.3 se especifican algunas de sus características relevantes.



Nombre	N-(fosfonometil)glicina
CAS	1071-83-6
Pureza	95 %
Almacenaje	A temperatura ambiente

Tabla 2.3. Características generales del glifosato.

2.6. Medios

2.6.1. Agua moderadamente dura (AMD)

El agua moderadamente dura (AMD) utilizada en los bioensayos fue preparada según USEPA (1993). Se utilizaron sales de calidad analítica que fueron disueltas en agua Milli-Q, según se describe en la Tabla 2.4.

REACTIVO	mg × L ⁻¹
Bicarbonato de sodio NaHCO ₃	96,0
Sulfato de calcio hidratado CaSO ₄ ·2H ₂ O	60,0
Sulfato de magnesio hidratado MgSO ₄ ·7H ₂ O	60,0
Cloruro de potasio KCl	40,0

Tabla 2.4. Reactivos utilizados en la preparación de agua moderadamente dura (AMD).

Una vez preparada el AMD, ésta se dejó en contacto con la atmosfera 24 h para alcanzar el equilibrio del pH.

Características del AMD: dureza: 80-100 mg CaCO₃ × L⁻¹, alcalinidad: 60-70 mg CaCO₃ × L⁻¹, pH = 7,4 - 7,8.

Resultados

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1. Efectos de la exposición a glifosato y clorpirifós sobre la actividad de acetilcolinesterasa en *Cnesterodon decemmaculatus*.

El efecto de los plaguicidas organofosforados objeto de este estudio, glifosato y clorpirifós, sobre la actividad de AChE se analizó a partir de la realización de ensayos de exposición *in vivo*. En los mismos se expusieron ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* durante 96 h a concentraciones subletales de los plaguicidas: 1 y 10 mg PMG \times L⁻¹, y 1 y 5 μ g CPF \times L⁻¹.

3.1.1. Efecto de la exposición a clorpirifós sobre la actividad de AChE.

Los valores medios de los diferentes parámetros morfométricos de los peces utilizados en el bioensayo de exposición a CPF en invierno, determinados luego de la exposición, se detallan en la Tabla 3.1. No se observaron diferencias significativas en la mortalidad entre el grupo control (10 %) y los grupos expuestos (10 - 20 %).

[CPF] (μ g \times L ⁻¹)	L _T (cm)	P _C (g)	K	Proteínas Totales (mg \times (g de tejido húmedo) ⁻¹)
0	2,50 \pm 0,04	0,095 \pm 0,004	0,61 \pm 0,02	48 \pm 2
1	2,53 \pm 0,04	0,088 \pm 0,004	0,54 \pm 0,02	54 \pm 3
5	2,52 \pm 0,03	0,079 \pm 0,004*	0,49 \pm 0,02 **	46 \pm 4

Tabla 3.1. Valor de los parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_C) y Factor de condición (K) y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo realizado en la estación de **invierno** del 2015, determinados luego de la exposición. Los valores se expresan como media \pm ESM (n = 8 - 9) de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* del grupo control y los grupos expuestos (1 y 5 μ g CPF \times L⁻¹). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grupo control; *p<0,05 y **p<0,01.

En cuanto a las tallas no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, verificándose la homogeneidad de los ejemplares utilizados. Tampoco se identificaron diferencias significativas en las proteínas totales. Se evidenció una disminución del peso y del factor de condición a medida que aumenta la concentración de CPF, resultando las diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento de mayor concentración ($5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$).

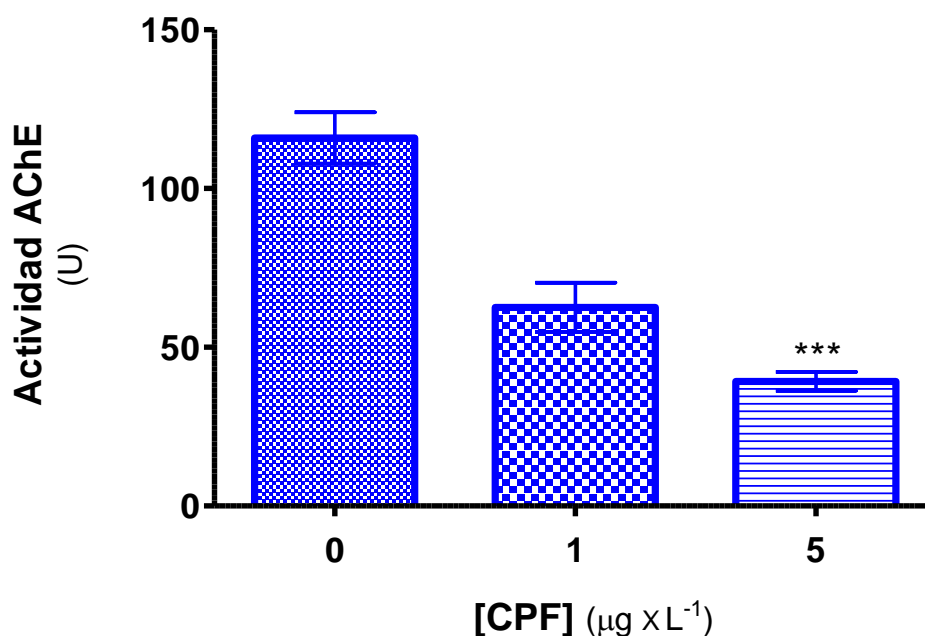


Figura 3.1. Actividad específica de AChE de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a diferentes concentraciones de CPF o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de **invierno** del 2015. Los valores se expresan como media \pm ESM ($n = 8 - 9$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; *** $p < 0,001$.

La actividad específica promedio de AChE en la estación de invierno del grupo control fue de 116 U ($\text{U} = \mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg Proteínas})^{-1}$). En la Figura 3.1 se grafica la actividad de AChE observándose una inhibición de la actividad que muestra un perfil concentración dependiente: mayor inhibición de la actividad de AChE a medida que aumenta la concentración de CPF. La misma resultó una inhibición estadísticamente significativa del 66 % ($p < 0,001$) en los organismos expuestos a $5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$.

3.1.2. Efecto de la exposición a glifosato sobre la actividad de AChE.

Los valores de los diferentes parámetros morfométricos de los peces utilizados en el bioensayo realizado en la estación de invierno, determinados luego de la exposición, se presentan en la Tabla 3.2. Las tallas promedio se encuentran en el rango de 2,50 - 2,52 cm, verificándose la homogeneidad de los animales utilizados. No se observaron diferencias significativas en la mortalidad entre el grupo control y los grupos expuestos, no superando en ningún caso el 10 %.

[PMG] (mg × L ⁻¹)	L _T (cm)	P _C (g)	K	Proteínas Totales (mg × (g de tejido húmedo) ⁻¹)
0	2,50 ± 0,04	0,095 ± 0,004	0,61 ± 0,02	48 ± 2
1	2,51 ± 0,04	0,079 ± 0,003**	0,50 ± 0,02**	45 ± 4
10	2,52 ± 0,06	0,078 ± 0,002**	0,49 ± 0,02**	38 ± 2*

Tabla 3.2. Valor de los parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_C) y Factor de condición (K) y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo realizado en la estación de **invierno** del 2015, determinados luego de la exposición. Los valores se expresan como media ± ESM (n = 9 - 10) de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* del grupo control y de los grupos expuestos (1 y 10 mg PMG × L⁻¹). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grupo control; *p<0,05 y **p<0,01.

En el peso corporal y el factor de condición se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos de 1 y 10 mg × L⁻¹ con respecto al grupo control (p < 0,001). En relación a las proteínas totales se observaron diferencias significativas con el grupo control (p < 0,05) para el tratamiento de mayor concentración.

En la Figura 3.2 se grafica la actividad de AChE, observándose una inhibición estadísticamente significativa y concentración dependiente: del 25 % (p < 0,05) en los organismos expuestos a 1 mg PMG × L⁻¹ y del 31 % (p < 0,01) para la exposición a 10 mg PMG × L⁻¹.

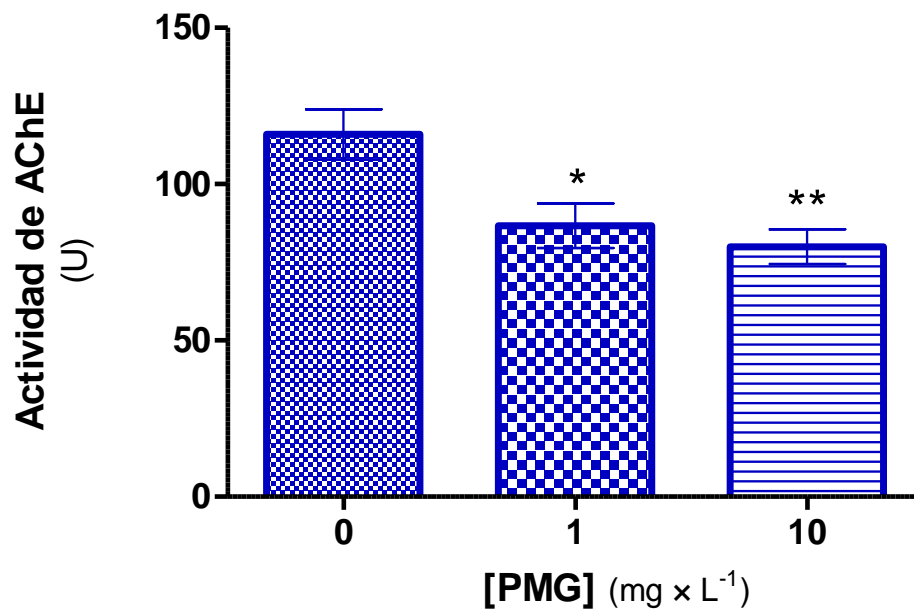


Figura 3.2. Actividad específica de AChE de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a diferentes concentraciones de PMG o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de **invierno** del 2015. Los valores se expresan como media \pm ESM (n = 9 - 10). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; *p<0,05 y **p<0,01.

3.2. Ensayos *in vitro*.

Para evaluar si el PMG y el CPF presentan un mecanismo de inhibición directa, se llevaron adelante ensayos de exposición *in vitro*. Para ello se realizaron co-incubaciones de homogenatos provenientes de animales no expuestos con soluciones de diferentes concentraciones de CPF o PMG. También se realizaron co-incubaciones con clorpirifós oxón (CPF-oxón) para evaluar la sensibilidad de la enzima a este compuesto que es el metabolito activo del CPF.

3.2.1. Ensayos *in vitro*: Exposición a clorpirifós (CPF).

Al realizar los ensayos de exposición a distintas concentraciones de CPF *in vitro*, se observó un perfil de inhibición de la actividad de AChE (Figura 3.3).

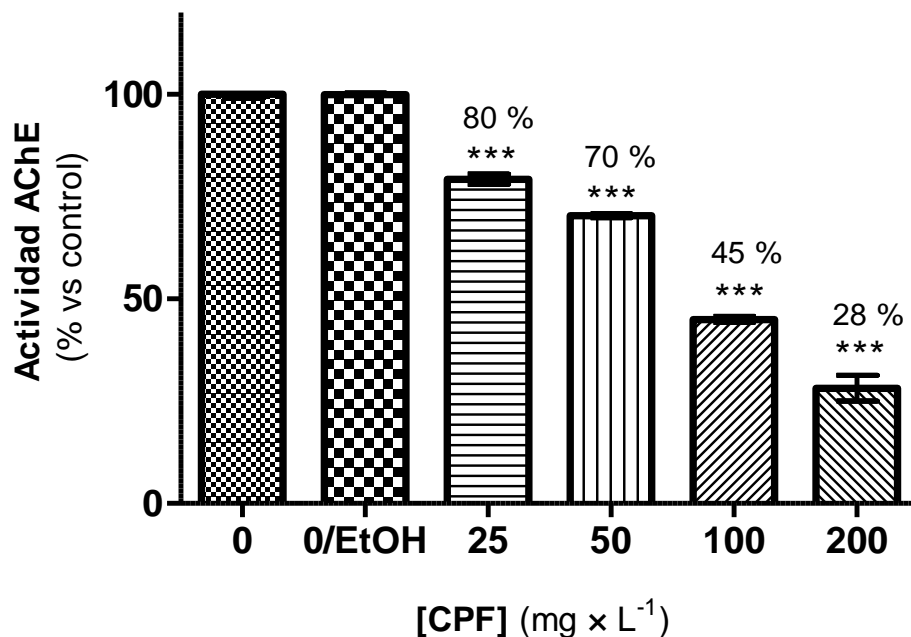


Figura 3.3. Efecto de la exposición a CPF *in vitro* sobre la actividad de AChE de la sección anterior de *C. decemmaculatus*. Promedio de la actividad de la enzima en homogenatos expuestos a diferentes concentraciones de CPF durante 3 h. Los valores expresan la media \pm ESM ($n = 4$) como porcentaje respecto al grupo control. Los asteriscos indican diferencias significativas vs grupo control (** $p < 0,001$).

Después de 3 h de co-incubación se observó una inhibición estadísticamente significativa ($p < 0,001$) para todas las concentraciones ensayadas. Los resultados muestran una mayor inhibición de la actividad de AChE a medida que aumenta la concentración de CPF. El valor de la CI_{50} de CPF para la exposición *in vitro* en estas condiciones fue de $89,3 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9561$), correspondiente a $254 \text{ } \mu\text{M}$. Se verificó la ausencia de efecto del disolvente para la concentración de etanol más alta ensayada ($5 \times 10^{-4} \%$).

Cabe señalar que en los ensayos preliminares utilizando co-incubaciones de 1 h se obtuvo un perfil y porcentajes de actividad similares. A modo de ejemplo la exposición a 100 y 200 mg x L⁻¹ produjeron una inhibición del 51 y 70 %, respectivamente para ese tiempo.

3.2.2. Ensayos *in vitro*: Exposición a clorpirifós-oxón (CPF-oxón).

El efecto de la exposición a CPF-oxón *in vitro* sobre la actividad de AChE se grafica en la Figura 3.4, observándose una inhibición estadísticamente significativa para todas las concentraciones utilizadas con respecto al grupo control ($p < 0,001$). Al mismo tiempo, la respuesta inhibitoria también resultó dependiente de la concentración con una mayor inhibición de la actividad de AChE a medida que aumenta la concentración de CPF-oxón. A partir de estos resultados se estimó una Cl_{50} para la exposición *in vitro* a CPF-oxón de 10,2 nM ($R^2 = 0,9170$).

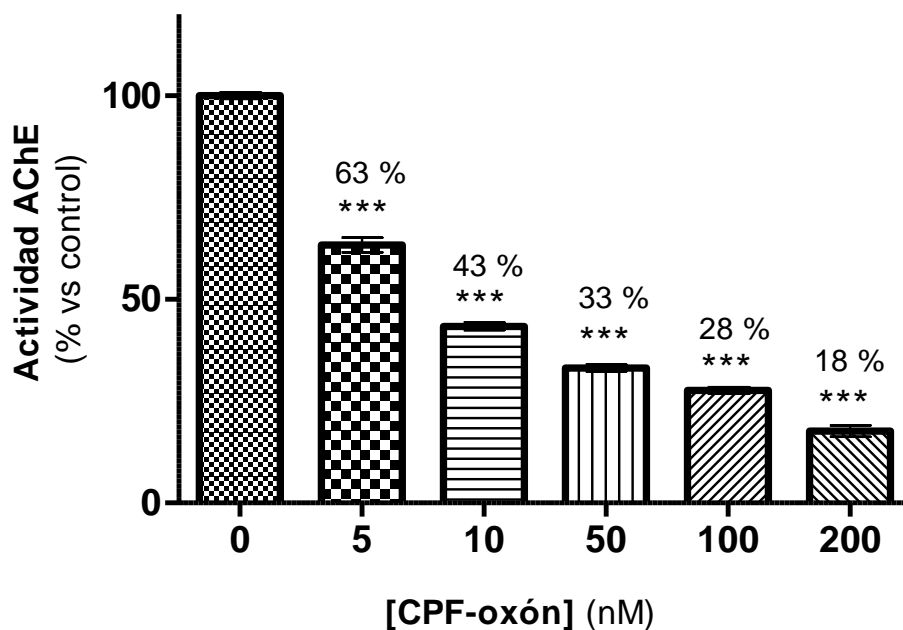


Figura 3.4. Efectos de la exposición a clorpirifós-oxón (CPF-oxón) *in vitro* sobre la actividad de AChE de la sección anterior de *C. decemmaculatus*. Promedio de la actividad de la enzima en homogenatos expuestos a diferentes concentraciones de CPF-oxón durante 15 minutos. Los valores expresan la media \pm ESM ($n = 4$) como porcentaje respecto al grupo control. Los asteriscos indican diferencias significativas vs grupo control (** $p < 0,001$).

En el caso de las co-incubaciones con soluciones de CPF-oxón cabe remarcar que para observar el efecto inhibitorio se utilizaron concentraciones en el orden de 5 a 200 nM, mientras que para CPF las concentraciones ($25 - 200 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$) equivalen a $71 - 570 \text{ } \mu\text{M}$. Como puede observarse, las concentraciones de CPF-oxón que, luego de 15 minutos de exposición, produjeron un efecto inhibitorio sobre la actividad de AChE fueron más de mil veces más bajas que las utilizadas para los ensayos *in vitro* con CPF. Esto resulta consistente con la mayor toxicidad del metabolito.

3.2.3. Ensayos *in vitro*: Exposición a glifosato (PMG).

Al realizar los ensayos de exposición a distintas concentraciones de PMG *in vitro* no se observaron efectos sobre la actividad de AChE para ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 3.5). Es de destacar que se utilizaron concentraciones de hasta 20 mM (equivalente a $3382 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$), las que se encuentran más de 300 veces por encima de las concentraciones utilizadas en los ensayos *in vivo*.

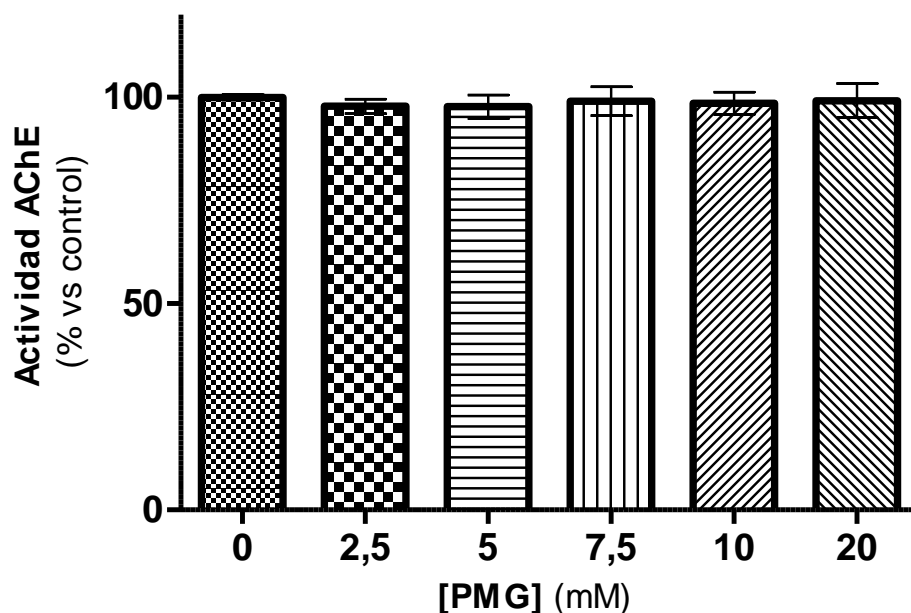


Figura 3.5. Efectos de la exposición a PMG *in vitro* sobre la actividad de AChE de la sección anterior de *C. decemmaculatus*. Promedio de la actividad de la enzima en homogenatos expuestos a diferentes concentraciones de PMG durante 3 h. Los valores expresan la media \pm ESM ($n = 4$) como porcentaje respecto al grupo control.

3.3. Ritmos circunales. Respuesta de la actividad de AChE durante las diferentes estaciones del año.

Para analizar el efecto de CPF y PMG sobre la actividad de AChE en *C. decemmaculatus*, además de estudiar su inhibición a diferentes concentraciones de los plaguicidas, se evaluaron los posibles cambios estacionales. Para ello, se realizaron los bioensayos semi-estáticos agudos a concentraciones subletales (1 y $5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ y 1 y $10 \text{ mg PMG} \times \text{L}^{-1}$) en las cuatro estaciones del año.

A partir de estos resultados se analizaron las variaciones en los niveles basales de la actividad de AChE (actividad de los grupos control en las diferentes estaciones) y, posteriormente, la existencia de variaciones estacionales en la relación dosis-respuesta.

3.3.1. Variaciones estacionales en los niveles basales de AChE.

Los valores de la actividad de AChE de los grupos control se representaron gráficamente a lo largo del tiempo, estableciéndose una variación estacional cíclica. Los resultados obtenidos confirmaron la existencia de un patrón de forma de onda con período anual descrito previamente por Menéndez-Helman *et al.* (2015) (Figura 3.6).

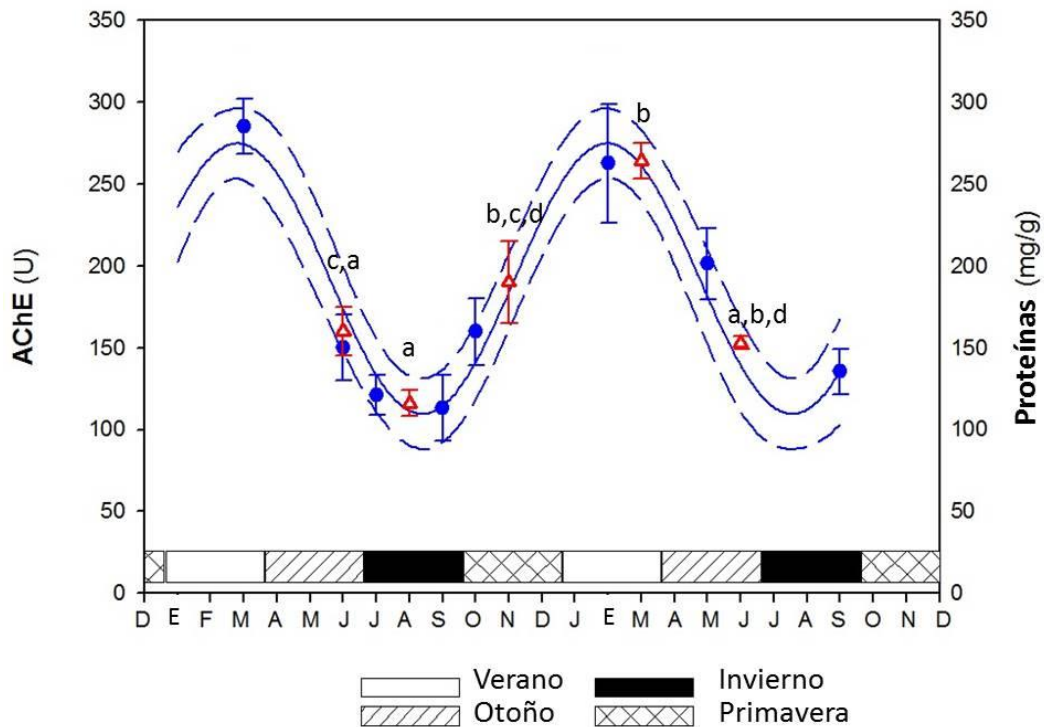


Figura 3.6. Tomada y modificada de Menéndez-Helman *et al.* (2015). Actividad específica promedio de AChE en homogenatos de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* durante diferentes estaciones del año (círculos rellenos corresponden a los datos de la publicación). Los valores se expresan como media \pm ESM ($n = 7 - 10$) para cada grupo de peces. La curva se ajustó utilizando una función sinusoidal (línea continua), con un intervalo de confianza del 95 % (líneas discontinuas). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes estaciones. Se superponen los datos correspondientes al promedio de actividad de AChE de los animales control de cada ensayo del presente trabajo (triángulos sin relleno).

En el presente trabajo, al igual que lo reportado previamente, la mayor actividad de AChE se observó en verano (264 ± 11 U), mientras los valores intermedios se registraron en otoño y primavera, y los niveles más bajos en invierno (116 ± 8 U). Los valores de la actividad de AChE en verano resultaron más del doble que los valores obtenidos en invierno.

Utilizando las funciones descritas por Menéndez-Helman *et al.* (2015) se estimó la actividad de AChE en forma teórica para compararla con los valores obtenidos experimentalmente (Tabla 3.3).

Considerando sólo la estacionalidad (el mes del año en que se inició el bioensayo) se estimó la actividad de AChE aplicando la función sinusoidal [3.1]. Por otra parte, se realizó la estimación considerando tanto la longitud de los peces utilizados como la estación en la que se realizó el bioensayo, aplicando la función cuadrática de análisis de regresión múltiple [3.2].

$$f(x) = 192,2 + 82,6 \text{ sen } (2\pi x/11,2) + 6,3 \quad [3.1]$$

donde x es el tiempo expresado en meses (correspondientes a el hemisferio sur).

$$f(x,y) = 1360,97 - 739,29x + 127,05x^2 - 111,70y + 3,38y^2 + 15,92xy \quad [3.2]$$

donde (x) es la longitud, (y) es la estación (verano=1, otoño y primavera=2, invierno=3).

	Mes en el que se realizó el bioensayo (x)	Actividad de AChE estimada según [3.1]	Estación (y)	Talla (x)	Actividad de AChE estimada según [3.2]	Valor promedio AChE experimental
Estimación AChE	Agosto (8)	111	Invierno (3)	2,50 cm	121	116
	Noviembre (11)	184	Primavera (2)	2,45 cm	180	190
	Marzo (3)	274	Verano (1)	2,44 cm	244	264
	Junio (6)	172	Otoño (2)	2,56 cm	173	153

Tabla 3.3. Actividad de AChE estimada considerando el momento de realización de cada bioensayo y el valor de talla promedio de los animales utilizados, a partir de las funciones propuestas por Menéndez Helman *et al.*, 2015; y valor de la actividad de AChE determinado experimentalmente.

Como puede observarse los valores experimentales resultaron muy semejantes a los estimados en base a las funciones (Tabla 3.3).

A la vez, se analizaron estacionalmente los niveles basales de AChE en conjunto con el contenido de proteínas tisulares y los parámetros morfométricos. Para ello se evaluaron los valores de estos parámetros determinados en los ejemplares control de los diferentes bioensayos. Los mismos se detallan en la Tabla 3.4.

La longitud corporal promedio se encontró en el rango de 2,44 - 2,56 cm, mientras que el peso promedio osciló entre 0,078 - 0,097 g. La actividad de AChE en la sección anterior varió entre 116 y 264 U y las proteínas totales entre 46 y 86 mg × (g de tejido húmedo)⁻¹.

Estación	L _T (cm)	P _C (g)	Factor de condición K	Proteínas Totales (mg × (g de tejido húmedo) ⁻¹)	AChE (U)
Otoño	2,56 ± 0,09 a	0,097 ± 0,014 a	0,56 ± 0,02 a	46 ± 6 a	153 ± 4 a,b
Invierno	2,50 ± 0,04 a	0,095 ± 0,004 a	0,61 ± 0,02 a	48 ± 2 a	116 ± 8 a
Primavera	2,45 ± 0,02 a	0,078 ± 0,003 a	0,54 ± 0,02 a	86 ± 7 b	190 ± 25 b
Verano	2,44 ± 0,03 a	0,091 ± 0,006 a	0,63 ± 0,03 a	61 ± 2 a,b	264 ± 11 b

Tabla 3.4. Valor de los parámetros morfométricos estudiados (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_C) y Factor de condición (K); contenido de proteínas totales y actividad específica de AChE de individuos control de *Cnesterodon decemmaculatus* en las diferentes estaciones del año. Los valores se expresan como media ± ESM. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para cada parámetro entre las diferentes estaciones.

No se observaron diferencias significativas entre los parámetros morfométricos (L_T, P_C y K), los ejemplares utilizados resultaron ser homogéneos entre los diferentes bioensayos. La mortalidad de los ejemplares del grupo control se encontró en el rango de 0-20 % para todos los bioensayos, determinándose mortalidades superiores al 10 % sólo en otoño.

En cuanto a los parámetros que nos enfocamos en analizar en este estudio, el contenido de proteínas totales de los animales en primavera presentó diferencias significativas con respecto a los niveles determinados en invierno ($p < 0,001$) y en otoño ($p < 0,01$). En la actividad específica de AChE se obtuvieron diferencias significativas entre la estación de invierno y verano ($p < 0,001$), y entre la estación de invierno y primavera ($p < 0,05$), a pesar de que los organismos no estuvieron expuestos a ningún agente inhibidor. Estos resultados confirman que la estación influye en la actividad de AChE cuyos niveles presentan ritmos circanuales.

En relación a las variaciones entre sexos se analizaron los parámetros actividad de AChE, factor de condición y contenido de proteínas en las distintas estaciones para hembras y machos (Tabla 3.5). Al evaluar la actividad específica de AChE no se observaron diferencias estadísticamente significativas durante las estaciones de otoño, invierno o verano.

Tampoco se observaron diferencias entre sexos en el factor de condición ni el contenido de proteínas en estas estaciones. En cambio, en la estación de primavera se observó una actividad de AChE estadísticamente mayor en las hembras, al mismo tiempo que presentan un menor contenido de proteínas.

Estación	Hembras				Machos			
	n	AChE	Factor de condición (K)	Proteínas	n	AChE	Factor de condición (K)	Proteínas
Otoño	4	154±3a	0,57±0,03a	42±7a	3	150±9a	0,53±0,05a	51±12a
Invierno	7	123±8a	0,60±0,02a	49±3a	2	90±13a	0,62±0,05a	46±2a
Primavera	4	260±40a	0,51±0,03a	63±3a	6	143±15b	0,55±0,02a	101±7b
Verano	5	277±18a	0,58±0,05a	60±3a	4	248±8a	0,68±0,03a	62±3a

Tabla 3.5. Valor del Factor de condición (K); contenido de proteínas totales y actividad específica de AChE de individuos control de *Cnesterodon decemmaculatus* para machos y hembras en las diferentes estaciones del año. Los valores se expresan como media ± ESM. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para cada parámetro entre sexos.

3.3.2. Variación estacional en la respuesta de la actividad de AChE en ejemplares expuestos a plaguicidas.

Considerando la existencia de variaciones estacionales en los niveles basales de AChE se evaluó la existencia de cambios en la relación dosis-respuesta a lo largo del año. A continuación, se describen los resultados de los bioensayos llevados adelante en las cuatro estaciones del año (otoño, invierno, primavera, verano) en los que se expusieron los ejemplares de *C. decemmaculatus* a las concentraciones de CPF y PMG previamente descriptas.

3.3.2.1. Variación estacional en la respuesta de la actividad de AChE en ejemplares expuestos a CPF.

En el bioensayo de exposición a CPF realizado durante la estación de **otoño** del 2015 el valor promedio de la actividad específica de AChE fue de 153 U en el grupo control. La talla promedio de los organismos utilizados se encontró en el rango de 2,56 - 2,62 cm. En la Tabla 3.6 se describen los parámetros morfométricos y el contenido de proteínas totales de los organismos utilizados en este bioensayo.

[CPF] ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	L_T (cm)	P_C (g)	K	Proteínas Totales ($\text{mg} \times (\text{g de tejido húmedo})^{-1}$)
0	2,56 ± 0,09	0,097 ± 0,014	0,56 ± 0,02	46 ± 6
1	2,62 ± 0,04	0,123 ± 0,006	0,68 ± 0,02*	48 ± 6
5	2,57 ± 0,04	0,101 ± 0,009	0,58 ± 0,03	56 ± 4

Tabla 3.6. Valor de los parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_C) y Factor de condición (K) y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo realizado en la estación de **otoño** del 2015, determinados luego de la exposición a CPF. Los valores se expresan como media \pm ESM ($n = 7 - 9$) de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* del grupo control y los grupos expuestos (1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; * $p < 0,05$.

Sólo se observaron diferencias significativas en el factor de condición en el tratamiento de 1 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ ($p < 0,05$) que, llamativamente en este caso, aumenta con respecto al grupo control. No se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos en la talla, peso, ni en las proteínas totales.

Se realizó un control extra conteniendo etanol en AMD a una concentración equivalente a la presente en la solución de CPF más concentrada: EtOH 5×10^{-4} % (v/v); para comprobar que esta concentración de etanol no generaba *per se* un efecto sobre la actividad de AChE (Figura 3.7). No se observaron diferencias significativas entre el grupo control con estas

concentraciones de etanol en AMD y el grupo control conteniendo sólo AMD. En cuanto a la inhibición de la actividad de AChE, se obtuvo una inhibición estadísticamente significativa en los dos tratamientos, del 55 % ($p < 0,001$) para la concentración de $1 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ y del 79 % ($p < 0,001$) para la concentración de $5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ (Figura 3.7).

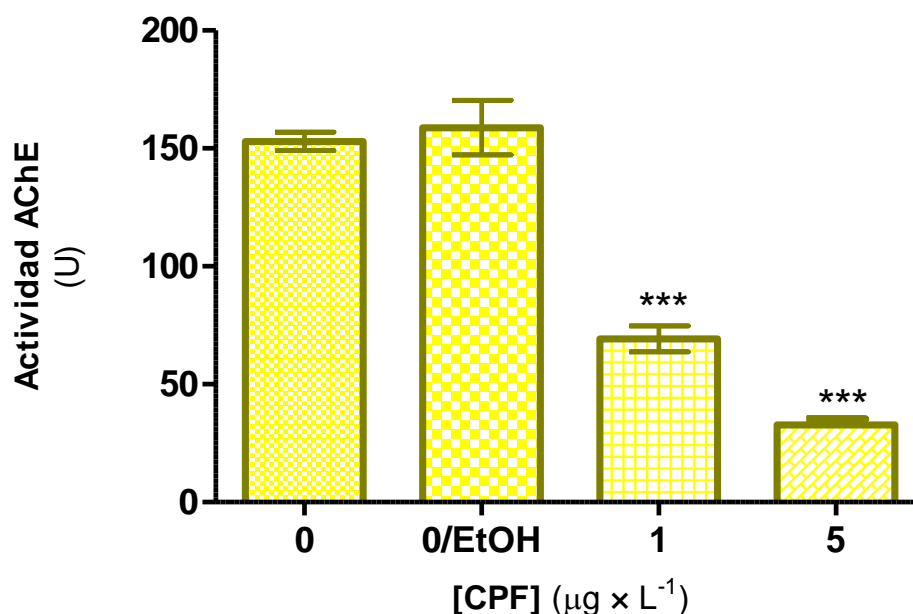


Figura 3.7. Actividad específica de AChE de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a diferentes concentraciones de CPF o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de **otoño** del 2015. Los valores se expresan como media \pm ESM ($n = 7 - 9$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; *** $p < 0,001$.

Los resultados obtenidos en el bioensayo de exposición a CPF durante la estación de **invierno** del 2015, fueron anteriormente descriptos (sección 3.1.1).

En la estación de **primavera** del 2015 la talla promedio de los peces utilizados se encontró entre 2,43 y 2,45 cm, verificándose su homogeneidad. Los valores de los parámetros morfométricos de talla, peso y factor de condición no presentaron diferencias significativas. En cambio, para el contenido de proteínas totales se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el tratamiento de concentración de $5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ respecto al grupo control. En la Tabla 3.7 se detallan los resultados obtenidos.

[CPF] ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	L_T (cm)	P_C (g)	K	Proteínas Totales ($\text{mg} \times (\text{g de tejido húmedo})^{-1}$)
0	2,45 ± 0,02	0,078 ± 0,003	0,54 ± 0,02	86 ± 7
1	2,45 ± 0,03	0,073 ± 0,003	0,50 ± 0,01	76 ± 5
5	2,43 ± 0,05	0,069 ± 0,004	0,49 ± 0,03	63 ± 5*

Tabla 3.7. Valor de los parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_C) y Factor de condición (K) y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo realizado en la estación de **primavera** del 2015, determinados luego de la exposición a CPF. Los valores se expresan como media ± ESM (n = 9 - 10) de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* del grupo control y los grupos expuestos (1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; *p<0,05.

La actividad de AChE en el bioensayo de exposición a CPF realizado durante la primavera se grafica en la Figura 3.8. El valor promedio para el grupo control fue de 190 U. Puede observarse una tendencia de disminución de la actividad con el aumento de la concentración de CPF: del 47 % para la exposición a 1 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ y una inhibición estadísticamente significativa del 74 % ($p < 0,001$) para 5 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$.

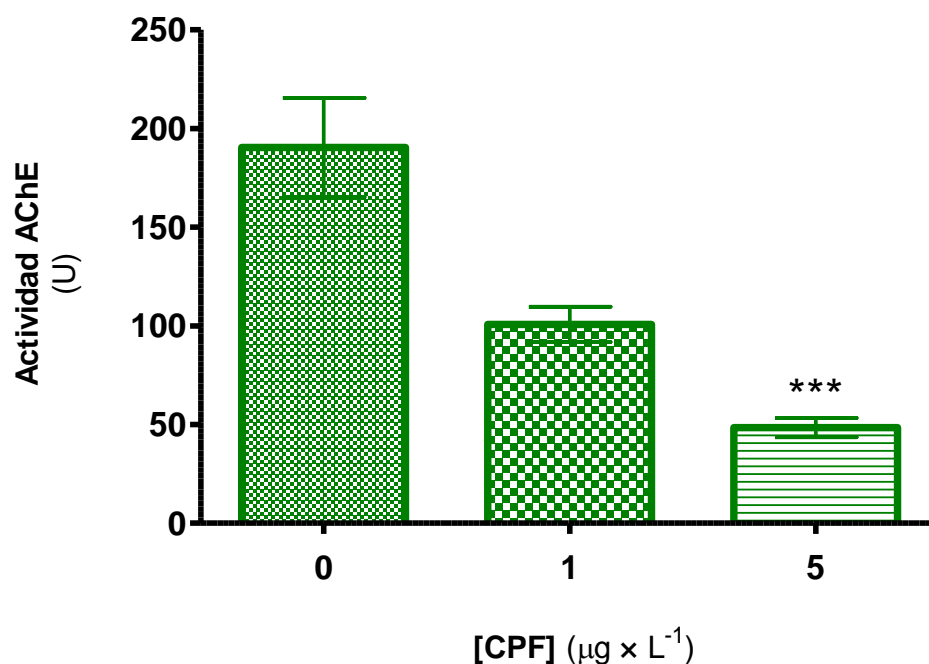


Figura 3.8. Actividad específica de AChE de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a diferentes concentraciones de CPF o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de **primavera** del 2015. Los valores se expresan como media \pm ESM (n = 9 - 10). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; ***p<0,001.

En la estación de **verano** del 2016, la actividad específica promedio de AChE del grupo control fue de 264 U. La talla promedio de los peces utilizados se encontró entre 2,43 y 2,47 cm. No se observaron diferencias significativas al comparar la talla y el peso de los ejemplares utilizados entre el grupo control y los diferentes tratamientos. Las diferencias significativas se encontraron tanto para el factor de condición como para las proteínas totales en el tratamiento de mayor concentración (Tabla 3.8).

[CPF] ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	L_T (cm)	P_c (g)	K	Proteínas Totales ($\text{mg} \times (\text{g de tejido húmedo})^{-1}$)
0	2,44 ± 0,03	0,091 ± 0,006	0,63 ± 0,03	61 ± 2
1	2,43 ± 0,06	0,082 ± 0,009	0,55 ± 0,04	53 ± 4
5	2,47 ± 0,05	0,074 ± 0,006	0,49 ± 0,04*	42 ± 2***

Tabla 3.8. Valor de los parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_c) y Factor de condición (K) y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo realizado en la estación de **verano** del 2016, determinados luego de la exposición a CPF. Los valores se expresan como media ± ESM (n = 9 - 10) de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* del grupo control y los grupos expuestos (1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; *p<0,05 y ***p<0,001.

En la Figura 3.9 se grafica la actividad de AChE para esta estación, observándose la inhibición de la actividad de AChE. La inhibición resulta estadísticamente significativa y concentración dependiente: del 48 % (p < 0,001) para la concentración de 1 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ y del 68 % (p < 0,001) para 5 $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$.

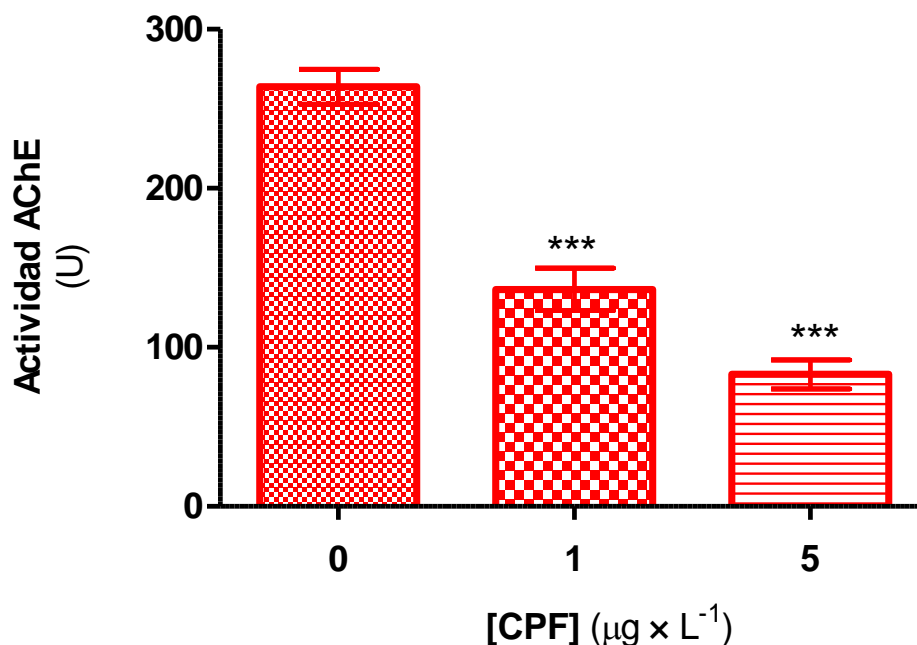


Figura 3.9. Actividad específica de AChE de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a diferentes soluciones de CPF o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de **verano** del 2016. Los valores se expresan como media \pm ESM (n = 9 - 10). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; ***p<0,001.

Considerando que en la estación de otoño se observó una mayor inhibición de la actividad de AChE con respecto a las demás estaciones, se realizó un nuevo bioensayo en dicha estación. Entonces, se compararon los resultados obtenidos entre los bioensayos realizados en otoño de los años 2015 y 2016.

En la Tabla 3.9 se detalla los parámetros morfométricos y el contenido de proteínas de los organismos utilizados en el segundo ensayo realizado en la estación de **otoño**. Se observó una talla homogénea en el rango de 2,73 - 2,77 cm, sin diferencias significativas entre el grupo control y los demás tratamientos. El valor promedio de actividad específica de AChE del grupo control fue de 160 U.

[CPF] ($\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$)	L_T (cm)	P_C (g)	K	Proteínas Totales ($\text{mg} \times (\text{g de tejido húmedo})^{-1}$)
0	2,74 ± 0,08	0,136 ± 0,021	0,63 ± 0,05	58 ± 3
1	2,77 ± 0,06	0,128 ± 0,010	0,60 ± 0,05	41 ± 4**
5	2,73 ± 0,06	0,114 ± 0,009	0,56 ± 0,06	54 ± 4

Tabla 3.9. Valor de los parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_C) y Factor de condición (K) y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo realizado en la estación de **otoño** del 2016, determinados luego de la exposición a CPF. Los valores se expresan como media ± ESM (n = 8) de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* del grupo control y los grupos expuestos (1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; **p<0,01.

No se observaron diferencias significativas en el peso ni en el factor de condición, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) en las proteínas totales en el tratamiento de concentración de $1 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$.

En la Figura 3.10 se grafica la actividad de AChE para esta estación. En el tratamiento de $1 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ la actividad de AChE presentó una inhibición significativa de un 56 % ($p < 0,05$) con respecto a la media de los controles. Por su parte, la mayor inhibición de la enzima de un 85 % ($p < 0,001$) se produjo para la exposición a $5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$.

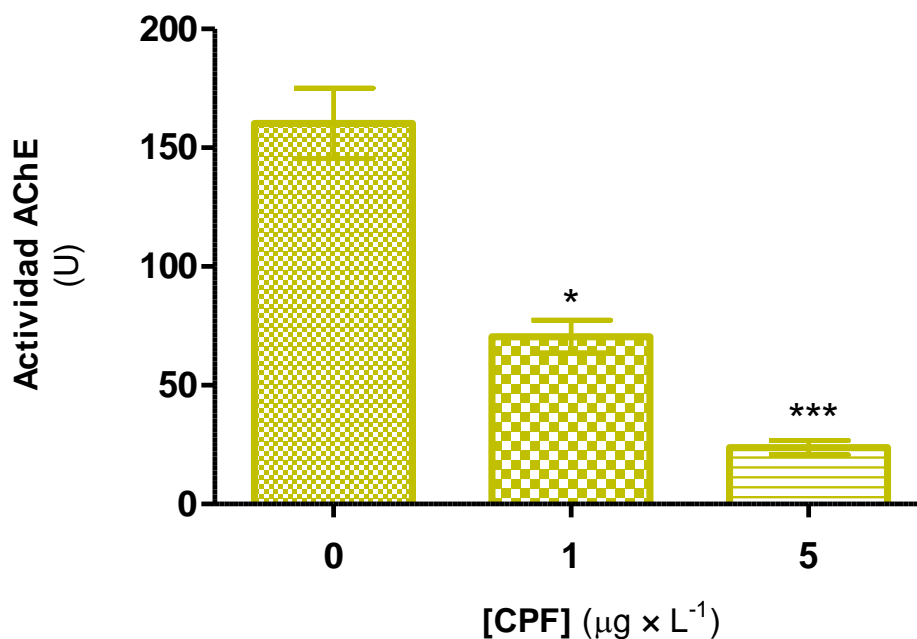


Figura 3.10. Actividad específica de AChE de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a diferentes concentraciones de CPF o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de **otoño** del 2016. Los valores se expresan como media \pm ESM (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$.

En la Figura 3.11 se representa la actividad de AChE como porcentaje respecto al respectivo control para todas las estaciones. En la estación de otoño (tanto 2015 como 2016) es en la que se determinó mayor inhibición. No se observaron diferencias significativas entre ambos bioensayos de otoño.

Para la exposición a $1 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estaciones (Figura 3.11 **A**). En cambio, se observaron diferencias estadísticamente significativas para la exposición a $5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ (Figura 3.11 **B**) entre: invierno 2015 y otoño 2015 ($p < 0,05$), invierno 2015 y otoño 2016 ($p < 0,001$), y entre verano y otoño 2016 ($p < 0,001$).

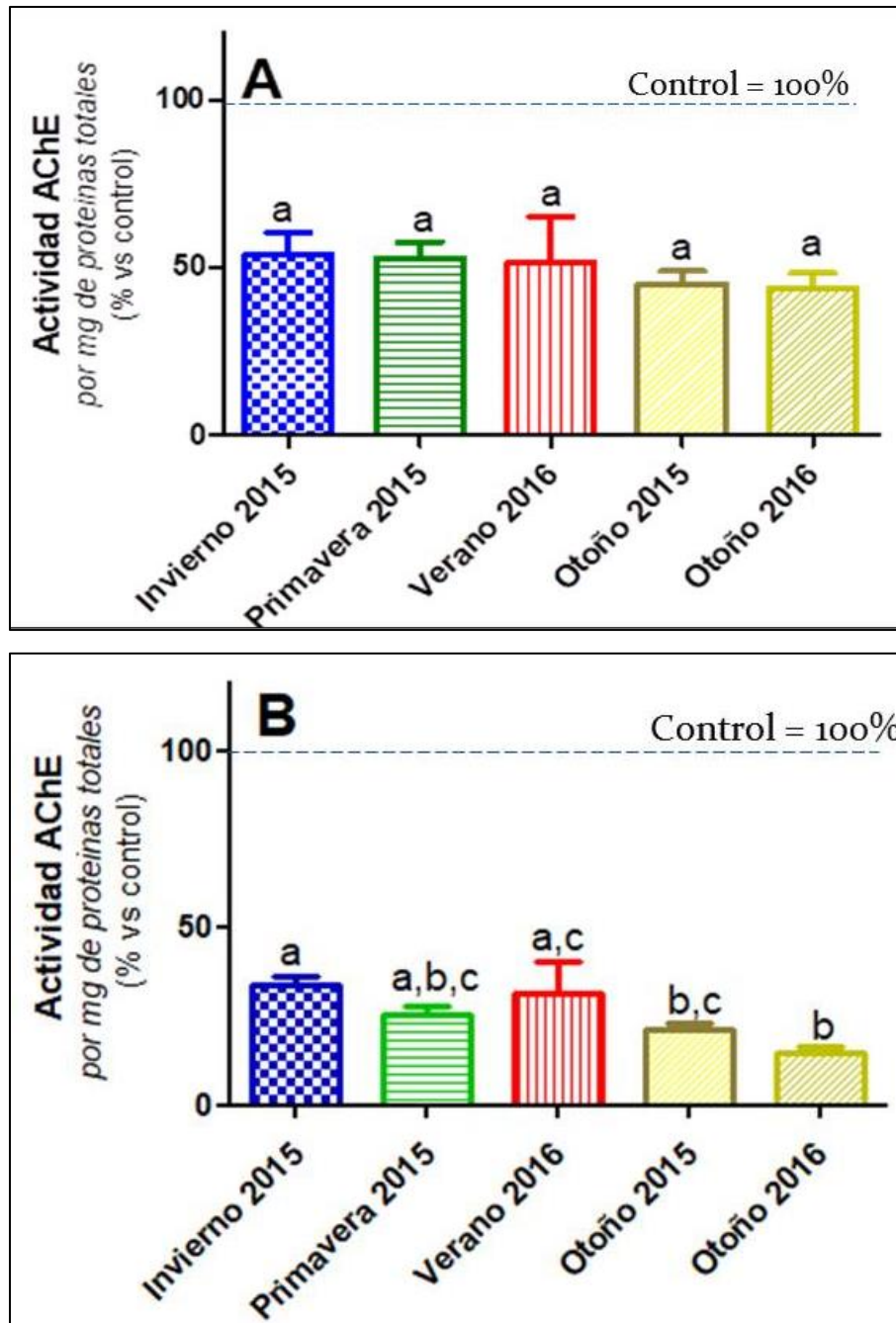


Figura 3.11. Comparación estacional de la Actividad específica de AChE (% vs control) de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a diferentes concentraciones de CPF por 96 h. Los valores expresan la media \pm ESM ($n = 7 - 10$) como porcentaje respecto al grupo control respectivo. **A:** concentración de $1 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$; **B:** concentración de $5 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las estaciones.

Es de destacar que en los bioensayos de exposición a CPF el grupo expuesto a la mayor concentración ($5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$) presentó valores de mortalidad en el mismo rango que el grupo control (0 - 20 %). La mortalidad promedio entre los bioensayos resultó $12 \pm 4 \%$; $14 \pm 5 \%$ y $12 \pm 4 \%$ para el control y los grupos expuestos a 1 y $5 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$, respectivamente.

En relación a las concentraciones analíticas de CPF de los distintos bioensayos, las mismas se detallan en la Tabla 3.10. Las concentraciones analíticas resultaron similares a las nominales. Por otra parte, luego de las 48 h, previo al recambio, y luego del recambio hasta el final de la exposición, no se observa una disminución relevante de la concentración para ninguno de los tratamientos.

Concentraciones de clorpirifós en los medios de ensayo					
Estación	Nominal [CPF] $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$	Inicio de la exposición [CPF] $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$	48 h (previo recambio) [CPF] $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$	48 h (post recambio) [CPF] $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$	96 h [CPF] $\mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$
Otoño 2015	1	$1,11 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,01$	$1,09 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,01$
	5	$4,98 \pm 0,01$	$4,87 \pm 0,01$	$4,94 \pm 0,01$	$4,80 \pm 0,01$
Invierno 2015	1	$0,99 \pm 0,01$	$0,94 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,01$	$1,03 \pm 0,01$
	5	$5,01 \pm 0,02$	$4,72 \pm 0,01$	$4,92 \pm 0,01$	$4,74 \pm 0,01$
Primavera 2015	1	$1,08 \pm 0,01$	$1,04 \pm 0,01$	$1,02 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0,02$
	5	$4,93 \pm 0,01$	$4,61 \pm 0,01$	$4,91 \pm 0,01$	$4,71 \pm 0,01$
Verano 2016	1	$1,08 \pm 0,01$	$1,07 \pm 0,01$	$1,11 \pm 0,01$	$1,03 \pm 0,01$
	5	$4,92 \pm 0,01$	$4,88 \pm 0,02$	$4,99 \pm 0,01$	$4,80 \pm 0,01$
Otoño 2016	1	$1,06 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,01$	$1,06 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,01$
	5	$4,90 \pm 0,01$	$4,84 \pm 0,01$	$4,87 \pm 0,02$	$4,67 \pm 0,01$

Tabla 3.10. Concentración analítica de CPF determinada en alícuotas de los medios de los bioensayos recolectadas a tiempo inicial, transcurridas 48 h (pre y post recambio) y a tiempo final. Las concentraciones fueron determinadas por cromatografía líquida de masas /masas con cuadrupolo y tiempo de vuelo (LC-MS-MS QTOF). Los valores se expresan como media \pm ESM.

Distintos factores podrían explicar las diferencias observadas en los bioensayos entre estaciones (una mayor inhibición de la actividad de AChE en otoño).

Finalmente, para evaluar si las diferencias observadas *in vivo* para CPF entre estaciones se deben a una diferencia de sensibilidad de la enzima *per se* al contaminante a lo largo del año, se analizó la sensibilidad estacional de la enzima al CPF-oxón (su metabolito activo). Para ello, se compararon los resultados obtenidos de un ensayo *in vitro* con CPF-oxón utilizando homogenatos provenientes de animales control de un bioensayo de otoño, con los obtenidos al utilizar homogenatos provenientes de animales control de un bioensayo de verano (Figura 3.12).

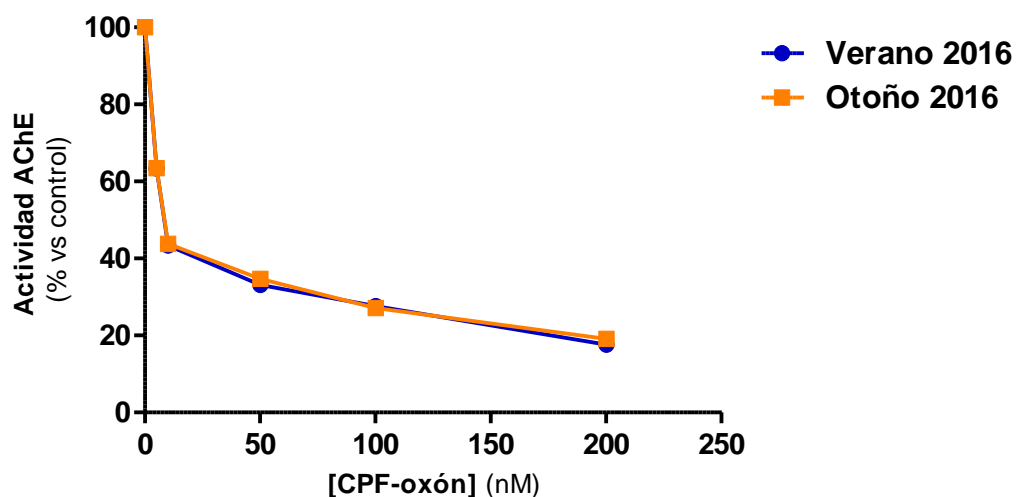


Figura 3.12. Efecto de la exposición a CPF-oxón *in vitro* sobre la actividad de acetilcolinesterasa de la sección anterior en ejemplares de *C. decemmaculatus* en la estación de **verano** y **otoño** de 2016. Promedio de la actividad de la enzima en homogenatos expuestos a diferentes concentraciones de CPF-oxón durante 15 minutos. Los valores expresan la media \pm ESM ($n = 4$) como porcentaje respecto al grupo control.

No se observaron diferencias significativas en el perfil de inhibición obtenido entre ambas estaciones. Más aún, las curvas obtenidas resultaron prácticamente indistinguibles. Estos resultados sugieren que en estas condiciones la AChE presente en los homogenatos obtenidos en una u otra estación no presenta una diferencia de sensibilidad al CPF-oxón que pueda ser la causa de lo observado en los ensayos *in vivo*.

3.3.2.2. Variación estacional en la respuesta de la actividad de AChE en ejemplares expuestos a PMG

La talla promedio de los peces utilizados en el bioensayo de exposición a PMG en **otoño** de 2015 se encontró en el rango 2,56 - 2,62 cm. En la Tabla 3.11 se detallan los parámetros morfométricos y el contenido de proteínas de los organismos utilizados en este bioensayo. No se obtuvo ninguna diferencia significativa para ninguno de los parámetros.

[PMG] (mg × L ⁻¹)	L _T (cm)	P _c (g)	K	Proteínas Totales (mg × (g de tejido húmedo) ⁻¹)
0	2,56 ± 0,09	0,097 ± 0,014	0,56 ± 0,02	46 ± 6
1	2,62 ± 0,07	0,128 ± 0,011	0,71 ± 0,05	50 ± 2
10	2,57 ± 0,07	0,121 ± 0,022	0,66 ± 0,06	49 ± 4

Tabla 3.11. Valor de los parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_c) y Factor de condición (K) y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de la estación de **otoño** del 2015, determinados luego de la exposición. Los valores se expresan como media ± ESM (n = 7 - 9) de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* del grupo control y los grupos expuestos (1 y 10 mg PMG × L⁻¹).

La actividad de AChE correspondiente al bioensayo realizado en esta estación se observa en la Figura 3.13. Se evidenció una inhibición estadísticamente significativa del 40 % (p < 0,05) para la concentración de 1 mg × L⁻¹ y del 61 % (p < 0,001) para la concentración de 10 mg × L⁻¹.

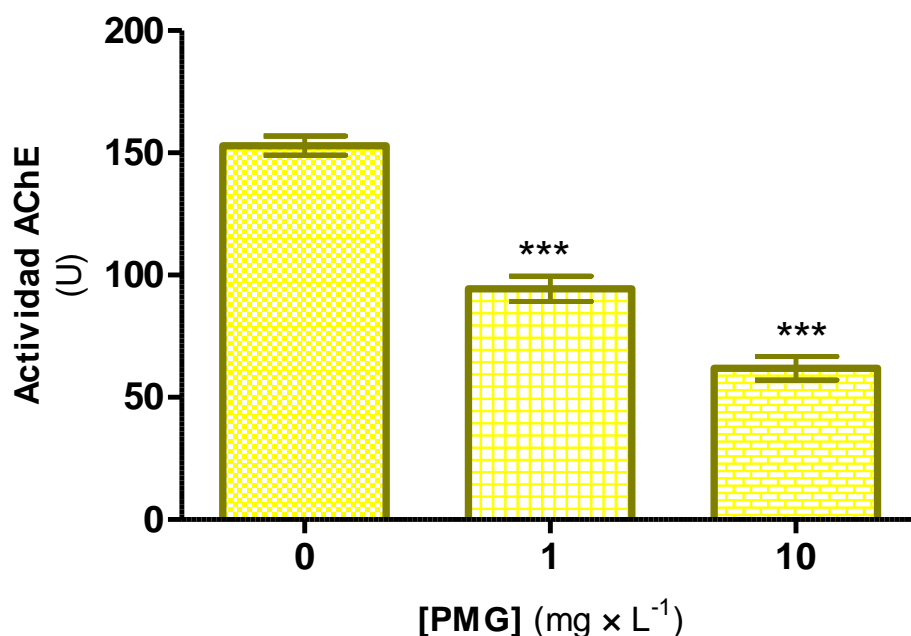


Figura 3.13. Actividad de AChE de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a diferentes concentraciones de PMG o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de **otoño** del 2015. Los valores se expresan como media ± ESM (n = 7 - 9). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; ***p<0,001.

Los valores obtenidos en el bioensayo de PMG realizado durante la estación de **invierno**, fueron anteriormente descritos (Sección 3.1.2).

En **primavera** del 2015, al igual que en las otras estaciones, se utilizaron peces de talla homogénea (rango 2,41 - 2,45 cm) (Tabla 3.12 donde se describen los parámetros morfométricos). En esta estación no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros morfométricos, ni en el contenido de proteínas totales.

[PMG] (mg × L ⁻¹)	L _T (cm)	P _C (g)	K	Proteínas Totales (mg × (g de tejido húmedo) ⁻¹)
0	2,45 ± 0,02	0,078 ± 0,003	0,54 ± 0,02	86 ± 7
1	2,40 ± 0,05	0,067 ± 0,007	0,48 ± 0,02	82 ± 5
10	2,41 ± 0,05	0,065 ± 0,004	0,47 ± 0,02	91 ± 5

Tabla 3.12. Valor de los parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_C) y Factor de condición (K) y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de la estación de **primavera** del 2015, determinados luego de la exposición. Los valores se expresan como media ± ESM (n = 8 - 10) de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* del grupo control y los grupos expuestos (1 y 10 mg PMG × L⁻¹).

En la Figura 3.14 se grafica la actividad de AChE observándose una inhibición de la actividad que muestra un perfil concentración dependiente. La misma resultó estadísticamente significativa en un 39 % (p < 0,05) para 10 mg PMG × L⁻¹.

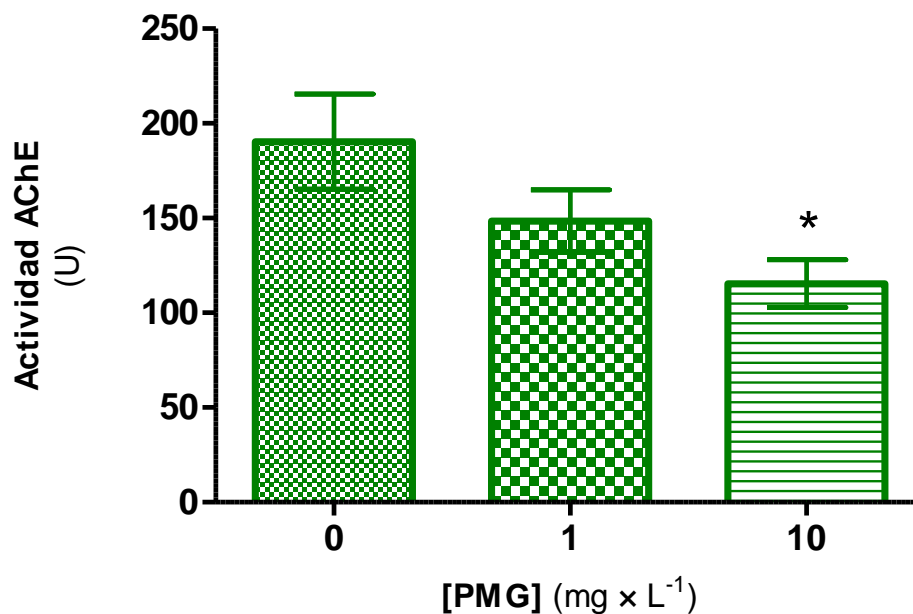


Figura 3.14. Actividad específica de AChE de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a diferentes concentraciones de PMG o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de **primavera** del 2015. Los valores se expresan como media ± ESM (n = 8 - 10). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; *p<0,05.

En el bioensayo realizado en **verano** del 2016 la talla promedio de los peces que se utilizaron se encontró en el rango de 2,44 - 2,49 cm, como se observa en la Tabla 3.13.

[PMG] (mg × L ⁻¹)	L _T (cm)	P _C (g)	K	Proteínas Totales (mg × (g de tejido húmedo) ⁻¹)
0	2,44 ± 0,03	0,091 ± 0,006	0,63 ± 0,03	61 ± 2
1	2,49 ± 0,02	0,084 ± 0,004	0,54 ± 0,03	65 ± 3
10	2,45 ± 0,03	0,069 ± 0,003**	0,47 ± 0,02**	61 ± 2

Tabla 3.13. Valor de los parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_C) y Factor de condición (K) y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de la estación de **verano** del 2016, determinados luego de la exposición. Los valores se expresan como media ± ESM (n = 9) de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* del grupo control y los grupos expuestos (1 y 10 mg PMG × L⁻¹). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; **p<0,01.

Al comparar los parámetros morfométricos de los diferentes tratamientos con el control no se observaron diferencias significativas en la talla, como tampoco en el contenido de proteínas totales. Se evidenció una disminución en el peso de los ejemplares de los grupos expuestos con respecto al grupo control, sin embargo las diferencias sólo resultaron estadísticamente significativas (p < 0,01) para el grupo expuesto a 10 mg × L⁻¹ de PMG. Lo mismo se observa para el factor de condición, para el cual se obtuvo una disminución significativa (p < 0,01) en el tratamiento de mayor concentración.

En la Figura 3.15 se grafica la actividad de AChE, evidenciándose una inhibición significativa del 22 % (p < 0,01) para la concentración de 1 mg × L⁻¹ y del 28 % de inhibición (p < 0,001) para el tratamiento de 10 mg × L⁻¹.

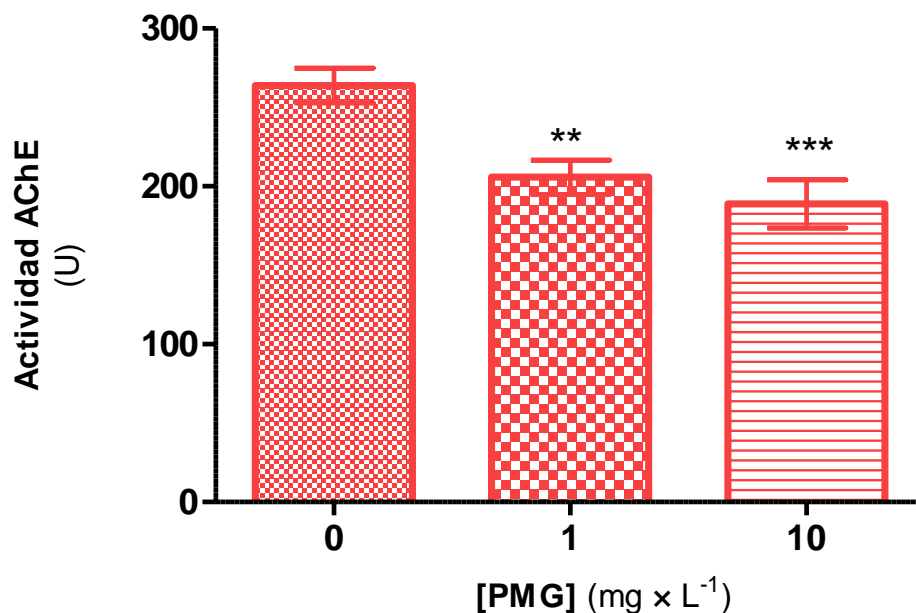


Figura 3.15. Actividad de AChE de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a diferentes concentraciones de PMG o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de **verano** del 2016. Los valores se expresan como media \pm ESM (n = 9). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; **p<0,01 y ***p<0,001.

Al igual que para la exposición a CPF, el PMG presentó un mayor efecto inhibitorio en otoño, por lo que se realizó un nuevo bioensayo en dicha estación para verificar los resultados obtenidos.

En el segundo bioensayo realizado durante la estación de **otoño** la talla de los peces utilizados se encontró en el rango 2,74 - 2,78 cm, confirmando la homogeneidad entre los mismos. Todos los parámetros morfométricos y el contenido de proteínas de los organismos utilizados en este bioensayo se encuentran en la Tabla 3.14.

[PMG] (mg × L⁻¹)	L_T (cm)	P_C (g)	K	Proteínas Totales (mg × (g de tejido húmedo)⁻¹)
0	2,74 ± 0,08	0,136 ± 0,021	0,63 ± 0,05	58 ± 3
1	2,76 ± 0,01	0,135 ± 0,015	0,63 ± 0,07	55 ± 4
10	2,78 ± 0,02	0,120 ± 0,015	0,55 ± 0,06	51 ± 3

Tabla 3.14. Valor de los parámetros morfométricos (Longitud total (L_T), Peso corporal (P_C) y Factor de condición (K) y contenido de proteínas totales de los peces utilizados en el bioensayo de la estación de otoño del 2016. determinados luego de la exposición. Los valores se expresan como media ± ESM (n = 7 - 8) de los ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* del grupo control y los grupos expuestos (1 y 10 mg PMG × L⁻¹).

Aunque se observó una leve tendencia de disminución del peso, el factor de condición y el contenido de proteínas totales para la mayor concentración de PMG, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para estos parámetros.

Con respecto a la respuesta en la actividad de AChE, se determinó una inhibición significativa del 43 % (p < 0,05) para la concentración de 1 mg × L⁻¹ y una inhibición del 61% (p < 0,001) para la concentración de 10 mg × L⁻¹ (Figura 3.16).

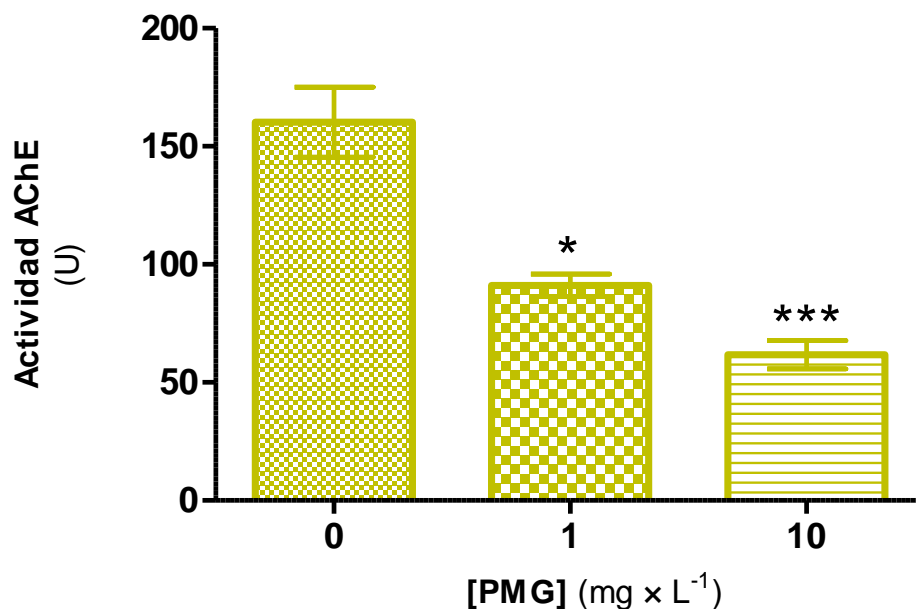


Figura 3.16. Actividad específica de AChE de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a diferentes concentraciones de PMG o mantenidos en medio control durante 96 h en la estación de **otoño** del 2016. Los valores se expresan como media \pm ESM (n = 7 - 8). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control; *p<0,05 y ***p<0,001.

Al comparar entre los resultados de todas las estaciones se observa que los animales mostraron una mayor susceptibilidad a la exposición a PMG durante la estación de otoño. El análisis estadístico determinó que no hubo diferencias significativas entre los resultados obtenidos en los bioensayos realizados dos años sucesivos durante la estación de otoño. Se observa una mayor inhibición en los grupos expuestos en otoño a 1 mg \times L⁻¹ con respecto a las demás estaciones, aunque las diferencias no resultan estadísticamente significativas (Figura 3.17 A). Por otro lado, se evidenció que para la mayor concentración ensayada el porcentaje de actividad del bioensayo de otoño presenta algunas diferencias entre estaciones que resultan estadísticamente significativas (Figura 3.17 B). Se obtuvieron diferencias significativas entre: otoño 2015 e invierno 2015 (p < 0,01), otoño 2016 e invierno 2015 (p < 0,01), otoño 2015 y verano 2016 (p < 0,01) y entre otoño 2016 y verano 2016 (p < 0,01).

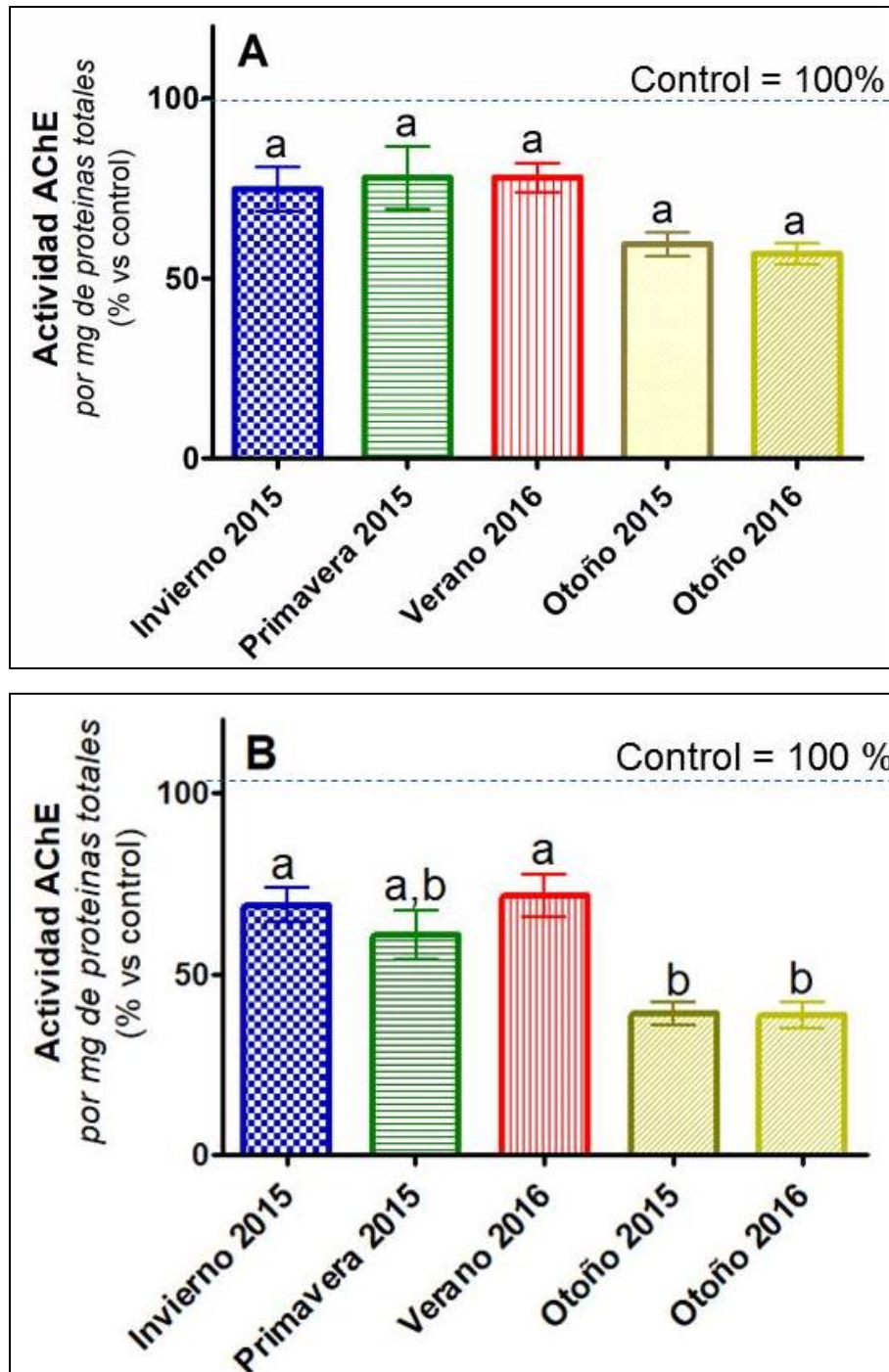


Figura 3.17. Comparación estacional de la actividad específica de AChE (% vs control) de la sección anterior de ejemplares de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos a diferentes concentraciones de PMG por 96 h. Los valores expresan la media \pm ESM ($n = 7 - 10$) como porcentaje respecto al grupo control respectivo. **A:** concentración de $1 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$; **B:** concentración de $10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$. Las letras indican diferencias significativas entre las estaciones.

Es de destacar que en los bioensayos de exposición a PMG el grupo expuesto a la mayor concentración ($10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$) presentó valores de mortalidad en el mismo rango que el grupo control (0 - 20 %). La mortalidad promedio entre los bioensayos resultó de $12 \pm 4 \%$; $10 \pm 3 \%$ y $14 \pm 4 \%$ para el control y los grupos expuestos a 1 y $10 \text{ mg PMG} \times \text{L}^{-1}$, respectivamente.

En relación a las concentraciones analíticas de PMG de los distintos bioensayos, las mismas se detallan en la Tabla 3.15. Como puede observarse las concentraciones analíticas resultaron similares a las nominales. Por otra parte, luego de 48 h, desde tiempo inicial hasta el recambio y desde el recambio hasta tiempo final, se observa una disminución de la concentración, entre el 10 y 30 % para $1 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ y entre el 3 y 19 % para $10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$.

Concentraciones de glifosato en los medios de ensayo					
Estación	Nominal [PMG] $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$	Inicio de la exposición [PMG] $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$	48 h (previo recambio) [PMG] $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$	48 h (post recambio) [PMG] $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$	96 h [PMG] $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$
Otoño 2015	1	1,1	0,8	0,9	0,7
	10	9,7	8,0	9,8	8,2
Invierno 2015	1	1	0,7	1	0,7
	10	10,1	9,0	10,2	9,9
Primave ra 2015	1	1,0	0,9	0,9	0,8
	10	10,0	9,0	10,2	9,2
Verano 2016	1	1,0	0,8	1,1	0,9
	10	9,9	8,0	9,8	8,2
Otoño 2016	1	0,9	0,8	0,9	0,7
	10	9,8	8,1	9,9	9,1

Tabla 3.15. Concentración analítica de PMG determinada en alícuotas de los medios de los bioensayos recolectadas a tiempo inicial, transcurridas 48 h (pre y post recambio) y a tiempo final. Las concentraciones fueron determinadas por cromatografía iónica de aniones, el método de medición tiene un error del 2 %.

DISCUSIÓN

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

4.1. Efectos de la exposición a clorpirifós y a glifosato sobre la actividad de acetilcolinesterasa en *Cnesterodon decemmaculatus*.

Durante las últimas décadas, el esfuerzo de muchos ecotoxicólogos se ha centrado en la búsqueda de respuestas biológicas como biomarcadores de exposición, efecto, susceptibilidad, que puedan resultar en señales tempranas de la contaminación ambiental. En este marco, la actividad de AChE es reconocida como biomarcador de neurotoxicidad en peces (Sturm *et al.*, 2000; de la Torre *et al.*, 2002; Schlenk *et al.*, 2008). La inhibición de la enzima AChE ha sido sugerida por diferentes autores como un buen biomarcador de efecto ante la exposición a algunos grupos de compuestos organofosforados y a carbamatos (Fulton y Key, 2001).

En relación a los plaguicidas evaluados en el trabajo cabe señalar que se ensayaron concentraciones subletales. Como se verifica a partir de los valores de CL_{50} que han sido reportados para *C. decemmaculatus*: $105,3 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ (Paracampo *et al.*, 2015) y $75 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$; y $> 225 \text{ mg PMG} \times \text{L}^{-1}$ (Carriquiriborde *et al.*, 2010).

4.1.1. Efecto de la exposición a clorpirifós sobre la actividad de AChE.

Dada su estructura química el clorpirifós es un reconocido inhibidor de la AChE. Aún más, su modo de acción como insecticida se basa en esta característica, por lo que resulta esperable que produzca efectos de neurotoxicidad en especies de animales no blanco.

Como se describió previamente, la exposición aguda (96h) de *C. decemmaculatus* a CPF en el bioensayo realizado durante el invierno produjo una inhibición del 46 % y 66 % para 1 y 5 $\mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$, respectivamente, siendo las diferencias con el grupo control estadísticamente significativas para el tratamiento de mayor concentración (Figura 3.1). Estos resultados son coincidentes con estudios anteriores en otras especies de peces

expuestos a CPF durante 96h, en los que se reportó un alto porcentaje de inhibición de la actividad de AChE. En *Gambusia affinis* se observó una inhibición del 82 % de la actividad de AChE y alteraciones en el comportamiento locomotor después de una exposición aguda a $297 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ (Kavitha y Venkateswara Rao, 2008). En ejemplares de trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, expuestos a $6,75 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ la inhibición de la enzima fue de un 75 % (Topal *et al.*, 2016). En la especie *Poecilia reticulata* se reportó hasta un 66 % de inhibición de la enzima por exposición a un formulado comercial de CPF a una concentración de $176 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ (Sharbidre *et al.*, 2011). En otros trabajos realizados con la especie *Gambusia affinis*, se reportó que además de la inhibición de la actividad de la AChE en el cerebro, la exposición a $60 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$ durante 20 días produjo alteraciones del comportamiento locomotor, y bioacumulación de este insecticida (Venkateswara Rao *et al.*, 2005).

A diferencia de los resultados obtenidos en todos estos trabajos, Bonifacio *et al.* (2016) informaron el incremento significativo de la actividad cerebral de AChE en ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos durante 6 semanas a 0,2 y $1,0 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ de Clorfox (un formulado comercial de clorpirifós). Además, estos autores reportaron la disminución del factor de condición de Fulton (al igual que lo observado en el presente trabajo para algunas estaciones) y la activación de los mecanismos antioxidantes. Como posible explicación de lo observado sugieren que en exposiciones crónicas el cerebro de estos individuos puede responder de una manera compensatoria mediante el aumento de la síntesis de AChE, contrarrestando la inhibición causada por el CPF.

Son pocos los antecedentes sobre la inhibición de la actividad de AChE por exposición aguda o crónica de *Cnesterodon decemmaculatus* a CPF como formulado, mientras no hay reportes previos para el principio activo. Cabe destacar que las concentraciones bajas de este insecticida utilizadas en los bioensayos del presente trabajo son ambientalmente relevantes ya que, como se mencionó en capítulos anteriores, se han reportado

concentraciones de CPF cercanas a $10 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ en cuerpos de agua en áreas agrícolas de la región pampeana (Marino y Ronco, 2005).

4.1.2. Efecto de la exposición a glifosato sobre la actividad de AChE.

La AChE ha sido ampliamente utilizada como biomarcador de exposiciones a organofosforados (de los grupos fosforotioatos y fosfatos) y carbamatos ya que los mismos producen una inhibición directa. El glifosato, dada su clasificación química, no era considerado como un inhibidor de la acetilcolinesterasa. Sin embargo, en los últimos años algunos estudios han informado la inhibición de esta enzima después de la exposición *in vivo* a formulados a base de glifosato (Rendón-von Osten *et al.*, 2005; Gluszczak *et al.*, 2006, 2007; Modesto y Martinez, 2010a; 2010b; Salbego *et al.*, 2010; Gholami-Seyedkolei *et al.*, 2013; Braz-Mota *et al.*, 2015), como también a su principio activo (Menéndez-Helman *et al.*, 2012).

Los resultados del presente trabajo demostraron que luego de la exposición aguda (96h) a PMG los ejemplares de *C. decemmaculatus* presentan una inhibición de la actividad de AChE estadísticamente significativa y concentración dependiente. La inhibición fue del 25 y 31 % para 1 y $10 \text{mg} \times \text{L}^{-1}$, respectivamente, en el bioensayo realizado durante el invierno (Figura 3.2). Estos resultados concuerdan con los de otros autores que han informado la inhibición de esta enzima en diferentes especies de peces neotropicales luego de una exposición aguda a herbicidas a base de glifosato: en *Gambusia yucatana* expuesto a un rango 9,4 a $150,0 \text{mg} \times \text{L}^{-1}$ de un formulado a base de glifosato (Rendón-von Osten *et al.*, 2005), en *Leporinus obtusidens* expuesto a un rango de 3 a $20 \text{mg} \times \text{L}^{-1}$ de Roundup (Gluszczak *et al.*, 2006), y a $5 \text{mg} \times \text{L}^{-1}$ de Roundup (Salbego *et al.*, 2010); en *Rhamdia quelen* expuesto a 0,2 y $0,4 \text{mg} \times \text{L}^{-1}$ de Roundup (Gluszczak *et al.*, 2007), en *Prochilodus lineatus* expuesto a 1 y $5 \text{mg} \times \text{L}^{-1}$ de Roundup Transorb (Modesto y Martinez, 2010a); en *Prochilodus lineatus* expuesto a $10 \text{mg} \times \text{L}^{-1}$ de Roundup (Modesto y Martinez, 2010b); y

en *Colossoma macropomum* expuesto a $10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ y $15 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ de Roundup (Braz-Mota *et al.*, 2015).

Son muy pocos los trabajos sobre toxicidad aguda del glifosato como principio activo en peces. Para *Cnesterodon decemmaculatus* se reportó la inhibición de la actividad de AChE en las secciones del cuerpo anterior y medio por la exposición a glifosato como principio activo a concentraciones de 1; 17,5 y 35 $\text{mg PMG} \times \text{L}^{-1}$ (Menéndez-Helman *et al.*, 2012). Los resultados del presente trabajo son consistentes y complementarios con los obtenidos previamente.

4.2. Ensayos *in vitro*.

La actividad de AChE en homogenatos de animales no expuestos mostró un patrón de inhibición después de ser co-incubados durante 3 horas con soluciones de CPF. El efecto inhibitorio se observó a altas concentraciones de CPF (más de mil veces mayores a las utilizadas en los bioensayos *in vivo*). La inhibición de la AChE resultó concentración dependiente, desde un 20 % hasta un 72 % para el rango de concentraciones de 25-200 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$, obteniéndose diferencias significativas para todos los tratamientos en comparación al grupo control (Figura 3.3). La Cl_{50} determinada por exposición a CPF *in vitro* durante 3 horas, para *Cnesterodon decemmaculatus*, fue de $89,3 \text{ mg CPF} \times \text{L}^{-1}$ (255 μM). En trabajos realizados con homogenatos conteniendo AChE de otras especies de peces se han reportado un amplio rango de valores de Cl_{50} . Se estimó el valor de $\text{Cl}_{50} = 218 \mu\text{M}$ para *Gambusia affinis* (Bernal-Rey *et al.*, 2017), se reportó una $\text{Cl}_{50} = 810 \mu\text{M}$ para la especie *Cyprinus carpio* durante 2 minutos de exposición (Dembélé *et al.*, 2000). El valor de $\text{Cl}_{50} = 7,6 \mu\text{M}$ para la especie *Colossoma macropomum* durante 1 h de exposición (Assis *et al.*, 2010). Los valores de $\text{Cl}_{50} = 7,87 \mu\text{M}$ para la especie *Arapaima gigas*, $\text{Cl}_{50} = 30,24 \mu\text{M}$ para la especie *Rachycentron canadum*, y $\text{Cl}_{50} = 26,78 \mu\text{M}$ para la especie *Oreochromis niloticus*, durante 1 h de exposición (Assis *et al.*, 2012).

Basándonos en las comparaciones de los valores de Cl_{50} publicados, la enzima de la AChE de la sección anterior de *Cnesterodon decemmaculatus* se encontró entre las que presentan menor sensibilidad al clorpirifós.

A la vez, debe señalarse que, considerando el tiempo de incubación, no puede descartarse que parte del efecto inhibitorio observado *in vitro* se produzca debido a una biotransformación de una proporción de las moléculas CPF a CPF-oxón.

Cabe destacar que la inhibición de la acetilcolinesterasa por CPF se da principalmente a través de su metabolito activo, CPF-oxón, mediante un proceso de desulfuración oxidativa, siendo un potente inhibidor irreversible de la enzima AChE. Por esta razón se evaluó la inhibición de AChE por CPF-oxón, la misma varió de 37 a 82 % para un rango de concentraciones de 5-200 nM (Figura 3.4). Las diferencias fueron estadísticamente significativas para todos los tratamientos en comparación con el control. En este caso, las concentraciones de CPF-oxón utilizadas se encuentran en el intervalo nanomolar (al igual que las ensayadas *in vivo*). La Cl_{50} para la exposición *in vitro* a CPF-oxón en estas condiciones fue de 10,2 nM.

Otros autores hallaron la Cl_{50} de CPF-oxón para la AChE de otras especies de peces luego de coincubaciones durante 15 minutos: para *Gambusia affinis* se reportó una $Cl_{50} = 50 \pm 2$ nM (Boone y Chambers, 1997), 64 ± 2 nM (Carr *et al.*, 1997) y 54,2 nM (Bernal-Rey *et al.*, 2017); para *Oncorhynchus tshawytscha* una $Cl_{50} = 24 \pm 1$ nM (Scholz *et al.*, 2006), para *Micropterus salmoides* una $Cl_{50} = 24 \pm 2$ nM, para *Lepomis macrochirus* una $Cl_{50} = 28 \pm 2$ nM y, para *Notemigonus crysoleucas* una $Cl_{50} = 52 \pm 1$ nM (Carr *et al.*, 1997).

Al comparar las Cl_{50} reportadas para otras especies con la obtenido para *Cnesterodon decemmaculatus*, se observa una mayor sensibilidad al CPF-oxón de la AChE de esta especie con respecto a *Gambusia affinis*, *Micropterus salmoides*, *Lepomis macrochirus*, y *Notemigonus crysoleucas*.

Finalmente, cabe destacar que los resultados obtenidos en la co-incubaciones *in vitro* confirman que el CPF presenta un mecanismo de inhibición mediado por su metabolito CPF-oxón, siendo este último quien inhibe de forma directa a la enzima AChE.

En cuanto a los ensayos de exposición a distintas concentraciones de PMG *in vitro* no se observaron efectos sobre la actividad de AChE para ninguna de las concentraciones ensayadas (Figura 3.5). Estos resultados sugieren que las vías por las cuales la exposición *in vivo* a PMG produce la inhibición de la actividad de AChE serían indirectas. Resultados similares fueron encontrados en moluscos de la especie *Phyllocaulis soleiformis* (da Silva *et al.*, 2003). Contrariamente, un trabajo reciente de otros autores ha reportado la inhibición del 50 % de la actividad de AChE en *Jenynsia multidentata* y *Danio rerio* por exposición *in vitro* a 0,62 y 6,67 mM PMG, respectivamente (Sandrini *et al.*, 2013). Sin embargo, no podría descartarse que el efecto descrito por estos autores esté causado por un cambio de pH que afecte *per se* a la enzima, ya que el glifosato tiene un comportamiento ácido/base que podría modificar el pH a altas concentraciones como las utilizadas. En el presente trabajo hemos realizado procedimientos para regular el pH de tal forma que se pueda distinguir un efecto de la molécula más allá de su característica ácida. En el caso de los trabajos de otros autores que reportan una inhibición en co-incubaciones *in vitro*, no puede confirmarse que se hayan tomado este tipo de recaudos teniendo en cuenta la descripción metodológica.

4.3. Ritmos circanuales. Respuesta de la actividad de AChE durante las diferentes estaciones del año.

4.3.1. Variaciones estacionales en los niveles basales de AChE.

La utilización biomarcadores como herramientas bioquímicas para evaluar respuestas de los organismos frente a la exposición a contaminantes ambientales requiere de la

validación en el sistema bajo estudio. Es preciso el conocimiento de la relación dosis-respuesta biológica, como así también aspectos que determinen la variabilidad natural del biomarcador (Schlenk *et al.*, 2008).

Los valores de la actividad de la AChE basal, obtenidos para ejemplares de *C. decemmaculatus* no expuestos a contaminantes, en las diferentes estaciones confirman la existencia de variaciones estacionales: 153 ± 4 U en otoño, 116 ± 8 U en invierno, 190 ± 25 U en primavera y 261 ± 11 U en verano (Tabla 3.4). La mayor actividad de AChE se observó en verano, mientras los valores intermedios en otoño y primavera, y los niveles más bajos en invierno. Los valores de la actividad de AChE en verano resultaron más del doble que los valores obtenidos en invierno.

Al mismo tiempo, estas variaciones resultan coincidentes con las obtenidas por Menéndez-Helman *et al.* (2015) para la misma especie, lo que puede observarse al superponer los resultados obtenidos con la gráfica sinusoidal descrita por los autores (Figura 3.6). Esto también queda en evidencia al comparar los resultados obtenidos con aquellos estimados por dicha función, confirmando la existencia de ritmos circanales para la actividad de AChE. Otros autores también han descrito resultados semejantes para *C. decemmaculatus*: 296 ± 7 U durante verano y 227 ± 12 U durante primavera en un estanque artificial (de la Torre *et al.*, 2005).

Los resultados también fueron muy similares a los estimados por la función cuadrática de análisis de regresión múltiple propuesta por Menéndez-Helman *et al.* (2015) que considera tanto la estación como la longitud de los peces utilizados. En estudios previos, diferentes autores han señalado una relación inversa entre la actividad de la enzima y la longitud de los peces (Beauvais *et al.*, 2002; Flammarion *et al.*, 2002; Chandrasekara y Parthiratne, 2007). En el presente trabajo se utilizaron animales de talla homogénea y no se observaron diferencias significativas para la longitud ni el peso de los peces entre estaciones, por lo que no pudo analizarse la influencia de dichos parámetros sobre la

actividad de AChE. Al mismo tiempo, la variación observada, aún cuando la talla es homogénea, reafirma la hipótesis de que la longitud de los peces no sería el único factor que afecta la actividad de AChE. Los resultados concuerdan con lo postulado previamente por Menéndez-Helman *et al.* (2015) que afirman que tanto la longitud como la estación son parámetros relevantes para determinar los ritmos de la actividad de AChE en la sección anterior de los peces. Es de destacarse que los ritmos fueron observados aún cuando los animales fueron mantenidos con una misma temperatura y fotoperíodo durante más de 20 días (aclimatación durante 15 días y 6 días en cámara). Esto evidencia que estas variaciones son tan marcadas que no se pierden con estas condiciones de aclimatación. A la vez, no puede descartarse que los niveles basales de animales en condiciones silvestres (realizando las determinaciones de la actividad de la enzima inmediatamente luego de ser capturados, sin aclimatación) puedan presentar mayores diferencias entre las estaciones.

En relación con el patrón estacional determinado para la actividad de AChE en *C. decemmaculatus*, algunas investigaciones han reportado variaciones estacionales en otras especies. Monteiro *et al.* (2007) determinaron fluctuaciones estacionales de la actividad cerebral de AChE en *Pomatoschistus microps* mostrando los valores más altos de actividad enzimática en verano y los más bajos en primavera. En el mismo sentido, Guimaraes *et al.* (2009) informaron en la especie *Anguilla anguilla* mayor actividad de AChE en verano y menor en otoño.

Los resultados obtenidos aportan al conocimiento de los distintos parámetros que pueden afectar los niveles basales de la actividad de AChE: talla y estacionalidad (Beauvais *et al.*, 2002; Flammarion *et al.*, 2002; Chandrasekara y Parthiratne, 2007; Menéndez-Helman *et al.*, 2015). A la vez, estos hallazgos ponen en evidencia la importancia de considerar y definir en los programas de monitoreo los momentos de realización de las campañas de muestreo para llegar a conclusiones válidas, discriminando las variaciones atribuibles a la exposición a contaminantes, de las naturales.

4.3.2. Variación estacional en la respuesta de la actividad de AChE en ejemplares expuestos a plaguicidas.

La existencia de variaciones estacionales en los niveles basales de la actividad de AChE plantea un nuevo interrogante: ¿es homogénea la relación dosis-respuesta durante el año?.

Tanto en la exposición a CPF como a PMG, se observó una mayor susceptibilidad de los animales durante la estación de otoño, obteniendo diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la actividad de AChE para las concentraciones más altas de CPF con respecto a invierno y verano (Figuras 3.11); y en el caso de las exposiciones a PMG con respecto a invierno y primavera (Figura 3.16). Otros autores han reportado diferentes niveles de inhibición de la actividad de AChE después de la exposición a un plaguicida organofosforado, según el tamaño de los ejemplares. Se observó menor inhibición de la enzima al aumentar el tamaño corporal en: *Oreochromis niloticus* expuesta a CPF (Chandrasekara y Parthiratne, 2007); en larvas de esta misma especie expuesta a clorpirifós-metil (Gül, 2005) y en *Tilapia mossambica* expuesta a dichlorvos (Rath y Misra, 1981). Teniendo en cuenta que en el presente trabajo se eligieron ejemplares de tallas homogéneas en todos los bioensayos, este parámetro no sería la causa de las diferencias de inhibición observadas en los bioensayos realizados durante las diferentes estaciones.

Distintos factores podrían explicar las diferencias observadas entre estaciones (una mayor inhibición de AChE en otoño). En el caso de un contaminante que no presenta un mecanismo de inhibición directo, como el PMG según sugieren los resultados *in vitro*, las causas de las diferencias observadas deben buscarse en los mecanismos indirectos involucrados en la inhibición. Existen diferentes procesos que influyen en la distribución del compuesto en todo el organismo y su vida media como: la absorción, la biotransformación y la excreción; los mismos podrían afectar los niveles del contaminante

que alcanzan el cerebro. En el caso de un contaminante que, él o alguno de sus metabolitos (como el CPF-oxón), ejerce una inhibición directa sobre la enzima; además de diferencias en el metabolismo del contaminante durante las estaciones, podría la enzima *per se* presentar una diferencia de sensibilidad al contaminante a lo largo del año (por ejemplo, a causa de cambios en la expresión de distintas isoformas de la enzima). Existen antecedentes de variaciones en la sensibilidad de la enzima a un contaminante entre especies por la presencia de diferentes isoformas (Assis *et al.*, 2012), como también en diferentes tejidos de una misma especie (Bonne y Chambers, 1997; Pathiratne *et al.*, 1998).

En este marco se evaluó la posibilidad de que las diferencias observadas para CPF *in vivo* entre estaciones se deban a una diferencia de sensibilidad de la enzima al contaminante a lo largo del año. Para ello se analizó la sensibilidad estacional de la enzima al CPF-oxón (su metabolito activo) comparando los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* utilizando homogenatos provenientes de animales control de un bioensayo de otoño u homogenatos provenientes de animales control de un bioensayo de verano. Las curvas obtenidas resultaron prácticamente indistinguibles (Figura 3.17), sugiriendo que en estas condiciones la enzima presente en los homogenatos obtenidos en diferentes estaciones no presenta una diferencia de sensibilidad al CPF-oxón que pueda ser la causa de lo observado en los ensayos *in vivo*. En este contexto, debería evaluarse si la diferencia observada *in vivo* se debe a variaciones en el metabolismo del contaminante durante las diferentes estaciones que afectan los niveles de CPF o CPF-oxón que se ponen en contacto con la enzima en el cerebro.

Algunos autores han afirmado que en los ensayos *in vivo* de diferentes especies puede observarse mayor heterogeneidad en los resultados de la inhibición de AChE cerebral que en ensayos *in vitro*, después de la exposición a un mismo compuesto organofosforado (Assis *et al.*, 2012). En los bioensayos *in vitro* se han reportado variaciones entre especies debido a la presencia de diferentes isoformas/polimorfismos de la enzima que presentan

diferente sensibilidad frente a los contaminantes. En cambio, en los ensayos *in vivo* podrían observarse mayores variaciones ya que el efecto del contaminante va a estar modulado por una serie de mecanismos metabólicos como los de detoxificación y bioactivación (Assis *et al.*, 2012). Las diferencias observadas en los niveles de toxicidad aguda durante las estaciones podrían deberse a cambios estacionales en alguno de estos procesos.

El CPF al ser liposoluble, es ampliamente distribuido por todo el organismo. Como se describió anteriormente, una vez que ingresa el contaminante al organismo, una vía metabólica del CPF es la bioactivación principalmente en el hígado por medio del sistema P450 mediante el cual, por una reacción de desulfuración oxidativa que es mediada por las enzimas mono-oxigenasas, se transforma en metabolito activo. El metabolito oxón es un potente inhibidor irreversible de la enzima AChE. Es necesario tener en cuenta que sólo los organofosforados fosfatos y oxones (que poseen un doble enlace entre el fósforo y oxígeno) son inhibidores directos de la AChE (Costa, 2006). El CPF, por medio de una segunda vía metabólica también puede ser inactivado directamente por una reacción de desarilación, transformándose en dietiltiofosfato y 3,5,6-tricloropiridinol (Smith *et al.*, 1967).

Según varios estudios, la toxicidad aguda de los plaguicidas fosforotioatos, como el CPF, está fuertemente influenciada por las diferencias en la actividad de las mono-oxigenasas de los sistemas P450 que bioactivan estos compuestos (Keizer *et al.*, 1993., Boone y Chambers, 1997; Assis *et al.*, 2010) y que se encuentran presentes en el hígado, los riñones, los pulmones y el cerebro. El citocromo P450 es una familia de hemoproteínas presentes en numerosas especies, que intervienen en el metabolismo oxidativo de los xenobióticos como los plaguicidas organofosforados. Se han identificado más de 2000 isoformas diferentes. Presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja tanto en la gran variedad de procesos que puede catalizar, como en el elevado número de sustratos que es capaz de metabolizar (Donato *et al.*, 2004).

Pero no solo se han reconocido a las enzimas mono-oxigenasas en los procesos de distribución y vida media de los contaminantes en los peces, sino también las enzimas carboxilesterasas que intervienen en los procesos de detoxificación quienes junto a las enzimas dependientes del citocromo P450 pueden potencialmente influenciar la inhibición de AChE *in vivo* por exposición a organofosfatos (Pathiratne y George, 1998). Otra vía importante para la detoxificación y la excreción de compuestos xenobióticos en mamíferos y peces es la glucuronidación (Schlenk *et al.*, 2008).

En otras investigaciones se ha planteado la posibilidad de un rol diferencial de la AChE en distintos tejidos. Carr *et al.* (1997) determinaron en una misma especie diferente sensibilidad de la AChE en diferentes tejidos, postulando que el músculo esquelético puede funcionar como un protector de la AChE cerebral. Los autores sugieren que una vez que el contaminante ingresa al organismo, el músculo esquelético proporciona sitios alternativos de fosforilación reduciendo así la cantidad disponible de CPF-oxón que podrían inhibir la AChE cerebral. Esta hipótesis se complementa con la consideración de que el hígado presenta una mayor actividad de mono-oxigenasas que el cerebro (Assis *et al.*, 2012).

Otro factor que puede influir en la interacción de compuestos OP con los tejidos, es su característica lipofílica. El CPF es altamente lipofílico por lo que se absorbe rápidamente y se acumula en el hígado, los riñones y las glándulas salivales (Assis *et al.*, 2012). Variaciones estacionales en los niveles de grasas corporales en el organismo podrían determinar cambios en los niveles de CPF que quedan disponibles para la biotransformación a CPF-oxón (que es menos liposoluble).

Por otra parte, la exposición a plaguicidas puede causar un aumento en la producción de especies altamente reactivas de oxígeno – ROS, como el oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$), el radical superóxido (O_2^\bullet), el ozono (O_3), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical

hidroxilo (HO^\bullet) que causan daño a lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Montserrat *et al.*, 2007). Cuando hay un desequilibrio en el balance entre la generación de radicales libres y su eliminación por los antioxidantes, se produce una situación de estrés oxidativo. Distintos trabajos han señalado el estrés oxidativo como una vía inespecífica presente en distintos escenarios de toxicidad en peces expuestos a diferentes plaguicidas (Parvez *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2006; Kavitha *et al.*, 2007), como también alteraciones en los niveles de las defensas antioxidantes enzimáticas (catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y no enzimáticas (vitaminas C, E y glutatión) y de la glutatión-S-transferasa (enzima cuyo rol fisiológico es la detoxificación de productos de estrés oxidativo que surgieron por la oxidación de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y excreción de xenobióticos) (Bonifacio *et al.*, 2017).

Particularmente, en relación a la exposición a glifosato (principalmente sus formulados), distintos trabajos han demostrado que la exposición altera la actividad de estas enzimas en los tejidos de los peces. En la exposición aguda de la especie *Prochilodus lineatus* a formulados de glifosato se observó efectos sobre las actividades de SOD, GST y GPx y el contenido de glutatión; como también peroxidación lipídica (Modesto y Martinez, 2010a; 2010b). En la especie *Carassius auratus*, expuestos por 96 h a concentraciones de 2,5 - 20 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$ de Roundup, las actividades de SOD se redujeron en un 51 – 68 % en cerebro y en algunos tratamientos se observó supresión selectiva de los tioles de baja masa molecular en un 26 – 29 % (Lushchak *et al.*, 2009). Estas vías podrían ser parte de los mecanismos indirectos involucrados en la inhibición de AChE luego de la exposición a PMG, y la existencia de variaciones estacionales en estas vías podría explicar los cambios observados entre estaciones para la relación dosis-respuesta.

Por otra parte, estudios recientes mostraron que el metabolismo de CPF produjo un aumento en las ROS generando estrés oxidativo y variaciones en las actividades enzimáticas de CAT y GST en diferentes tejidos de *Cnesterodon decemmaculatus*, y de CAT

en *Cheirodon interruptus*, después de 48 h de exposición de 0,84 nl x L⁻¹ y 8,4 nl x L⁻¹ del formulado comercial Clorfox (Bonifacio *et al.*, 2017).

Una variación estacional en cualquiera de estos procesos metabólicos (bioactivación, interacción con los diferentes tejidos, procesos de estrés oxidativo, vías de detoxificación, etc.) podría explicar una diferencia estacional en el metabolismo de estos plaguicidas, y por lo tanto influir en la inhibición de la actividad de AChE.

Es de destacar que no se han encontrado antecedentes de estudios que planteen la potencial variación estacional en la relación dosis-respuesta; siendo este punto la principal contribución del presente trabajo. Los mecanismos que determinan estas variaciones son un punto a dilucidar en futuras investigaciones.

Conclusiones

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Esta investigación se desarrolló con el objetivo de analizar el efecto de la exposición de dos plaguicidas (clorpirifós y glifosato) sobre la actividad de AChE en una especie no blanco, *Cnesterodon decemmaculatus*, y la existencia de variaciones estacionales en la relación dosis-respuesta.

A partir de los resultados obtenidos podemos arribar a las siguientes conclusiones:

5.1. Efectos de la exposición *in vivo* e *in vitro* a clorpirifós sobre la actividad de acetilcolinesterasa en *Cnesterodon decemmaculatus*.

El clorpirifós es un potente inhibidor de la actividad de la enzima AChE en el cerebro de *C. decemmaculatus*, tanto *in vivo* como *in vitro*.

A partir de los resultados obtenidos en los bioensayos *in vivo* en este trabajo se puede afirmar que la actividad de AChE en la sección anterior de *Cnesterodon decemmaculatus* es un biomarcador sensible a la exposición a clorpirifós, con un perfil concentración-dependiente, incluso a concentraciones bajas que resultan ambientalmente relevantes ($\leq 10 \mu\text{g CPF} \times \text{L}^{-1}$).

Por su parte, las co-incubaciones *in vitro* confirman que la inhibición de AChE por clorpirifós se genera principalmente a través de su metabolito activo CPF-oxón. El valor de CI_{50} fue de $89 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ para CPF y de $3,4 \mu\text{g} \times \text{L}^{-1}$ para CPF-oxón.

Estos resultados son los primeros datos reportados sobre la inhibición de la actividad de AChE por exposición de *Cnesterodon decemmaculatus* a CPF como principio activo.

5.2. Efectos de la exposición *in vivo* e *in vitro* a glifosato sobre la actividad de acetilcolinesterasa en *Cnesterodon decemmaculatus*.

Los resultados obtenidos para la actividad de AChE en la especie estudiada después de la exposición *in vivo* a PMG, muestran una inhibición concentración-dependiente. El efecto fue observado a concentraciones que resultan ambientalmente relevantes (≤ 10 mg PMG x L⁻¹). Consecuentemente, puede afirmarse que la actividad de AChE en *Cnesterodon decemmaculatus* también resulta un biomarcador sensible para la exposición a PMG.

La exposición *in vitro* a concentraciones de 2,5; 5; 7,5; 10 y 20 nM de glifosato no produjo inhibición de la actividad de AChE. Estos resultados sugieren que la inhibición observada *in vivo* no involucraría un mecanismo directo, lo que hace necesario desarrollar otros estudios que permitan identificar los mecanismos indirectos que determinan la inhibición.

5.3. Ritmos circunuales. Respuesta de la actividad de AChE durante las diferentes estaciones del año.

Cnesterodon decemmaculatus presenta una variación estacional en la actividad basal de AChE de la sección anterior. La mayor actividad se presenta en verano, mientras los valores intermedios en otoño y primavera, y los niveles más bajos en invierno. Los valores de la actividad de AChE en verano son más del doble que los valores obtenidos en invierno. Esta variación circunual rítmica observada, es relevante y debe ser tomada en cuenta en estudios donde se utilice la AChE como biomarcador de toxicidad.

Por otra parte, pudo determinarse la existencia de una variación estacional en la relación dosis-respuesta tanto para glifosato como para clorpirifós: una mayor inhibición de AChE en otoño. La misma pudo confirmarse en un segundo bioensayo realizado al año subsiguiente.

En el caso del PMG las posibles causas de estas diferencias estacionales deben buscarse en el metabolismo del contaminante asociado a los mecanismos indirectos involucrados en la inhibición de la enzima. En el caso del CPF el origen de las diferencias también podría deberse a variaciones en la expresión de isoformas/polimorfismos de la enzima que presenten distinta sensibilidad al contaminante. Esta última hipótesis quedaría descartada a partir de los resultados observados en los ensayos *in vitro* utilizando homogenatos de ejemplares de diferentes estaciones. En los mismos el perfil de inhibición fue indistinguible. Por lo tanto, también para CPF las causas deben buscarse en la existencia de diferencias estacionales involucradas en el metabolismo de CPF que puedan influir en los niveles de CPF-oxón que alcanzan el cerebro, y por lo tanto puedan afectar la inhibición de la actividad de AChE. Entre estos procesos podrían enumerarse los siguientes: 1. El metabolismo del contaminante (detoxificación y bioactivación del CPF por medio del sistema P450) que influyen en los procesos de desulfuración oxidativa y los niveles de transformación del metabolito activo CPF-oxón, 2. Distribución del contaminante teniendo en cuenta la propiedad liposoluble del CPF, 3. Desarilación del CPF que determina los niveles de CPF que se inactivan al ser transformados en dietiltiofosfato y 3,5,6-tricloropiridinol, 4. Actividad de las enzimas carboxilesterasas que intervienen en los procesos de detoxificación y enzimas de activación tales como citocromo P450. 5. Procesos de estrés oxidativo.

Los resultados de esta investigación resultan una contribución a la evaluación de los efectos subletales del insecticida clorpirifós y el herbicida glifosato (dos plaguicidas ampliamente utilizados en la región) en una especie nativa, Cnesterodon decemmaculatus. Teniendo en cuenta, que es uno de los primeros estudios en considerar la variación estacional en la relación dosis-respuesta de estos plaguicidas, los resultados presentados pueden ser un aporte al desarrollo y perfeccionamiento de bioensayos de toxicidad y, a la vez, 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.

BIBLIOGRAFÍA

- Albendín García, G. (2009). *Caracterización de las colinesterasas presentes en cerebro y músculo de dorada (sparus aurata) y estudio de su inhibición por insecticidas organofosforados*. Tesis de doctoral. Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias del mar y ambientales.
- Aparicio, V., De Gerónimo, E., Hernández Guijarro, K., Pérez, D., Portocarrero, R., & Vidal, C. (2015). *Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente*. INTA Ediciones, Argentina, pp. 1-74.
- Arias-Estevez, M., Lopez-Periago, E., Martinez-Carballo, E., Simal-Gandara, J., Mejuto, J.C., Garcia-Rio, L. (2008). *The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources*. Agriculture, Ecosystems and Environment, 123, pp. 247–260.
- Assis, C.R.D.; Castro, P.F.; Amaral, I.P.G.; Maciel Carvalho, E.V.M.; Carvalho Jr, L.B., Bezerra, R.S. (2010). *Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (Colossoma macropomum) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides*. Environ Toxicol Chem, 29, pp.2243–2248.
- Assis, C. R. D., Linhares, A. G., Oliveira, V. M., França, R. C. P., Carvalho, E. V. M. M., Bezerra, R. S., & de Carvalho, L. B. (2012). *Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish*. Science of the Total Environment, 441, pp. 141-150.
- Barja, B. C., Herszage, J., & dos Santos Afonso, M. (2001). *Iron (III)-phosphonate complexes*. Polyhedron, 20(15), pp. 1821-1830.
- Barja, B. C., & dos Santos Afonso, M. (2005). *Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study*. Environmental science & technology, 39(2), pp. 585-592.
- Beauvais, S. L., Cole, K. J., Atchison, G. J., Coffey, M. (2002). *Factors affecting brain acetylcholinesterase activity in bluegill (Lepomis macrochirus)*. Water Air Soil Poll., 135, pp. 249-264.
- Bernal-Rey, D. L., Afonso, M. D. S., & Menendez-Helman, R. J. (2017). *Effects of chlorpyrifos on acetylcholinesterase activity in two freshwater fish species (Cnesterodon decemmaculatus and Gambusia affinis)*. International Journal of Environment and Health, 8(4), pp. 316-330.
- Bonifacio, A. F., Cazenave, J., Bacchetta, C., Ballesteros, M. L., de los Ángeles Bistoni, M., Amé, M. V., Bertrand, L. and Hued, A. C. (2016). *Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in Cnesterodon decemmaculatus exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures*. Ecological Indicators, 67, pp. 88-97.

- Bonifacio, A. F., Ballesteros, M. L., Bonansea, R. I., Filippi, I., Amé, M. V., & Hued, A. C. (2017). *Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect two neotropical fish species, Cheirodon interruptus and Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere*. In Press. Accepted Manuscript.
- Boone, J.S. & Chambers, J.E. (1997). *Biochemical factors contributing to toxicity differences among chlorpyrifos, parathion and methyl parathion in mosquitofish (Gambusia affinis)*. *Aquatic Toxicology*, 39(3), pp. 333–343.
- Bradbury, S. P., Carlson, R. W., Henry, T. R., Padilla, S., & Cowden, J. (2008). *Toxic responses of the fish nervous system*. *The Toxicology of Fishes*. CRC Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 417-455.
- Braz-Mota, S., Sadauskas-Henrique, H., Duarte, R. M., Val, A. L., & Almeida-Val, V. M. (2015). *Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish Colossoma macropomum*. *Chemosphere*, 135, PP. 53-60.
- Bull, D., & Hathaway, D. (1986). *Pragas e venenos: agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo*. Ed. Vozes. Petrópolis.
- Calderón, M. J., Quintana, M. A., Lopez-Piñeiro, A., Hermosín, M. C., & Cornejo, J. (2005). *Estudio preliminar sobre el comportamiento del herbicida glifosato en dos suelos de extremadura*. *Estudios de la zona no saturada del suelo* 3(2), pp 112-122. Sevilla.
- Carr, R. L., Ho, L. L., Chambers, J. E. (1997). *Selective toxicity of chlorpyrifos to several species of fish during an environmental exposure: biochemical mechanisms*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(11), pp. 2369-2374.
- Carrquiriborde, P. (2010). *Toxicidad de glifosato en peces autóctonos: Estudios de laboratorio y campo*. Taller de aspectos ambientales del uso de glifosato. INTA-EEBalarce, Argentina, pp. 57-68.
- CASAFE (2010). Insecticidas y acaricidas. <https://kardauni08.files.wordpress.com/2010/09/insecticidas.pdf>
- CASAFE (2014). Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. *Estudio de mercado de fitosanitarios 2013*. Abril del 2014.
- Chandrasekara, L. W. H. U., & Pathiratne, A. (2007). *Body size-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile tilapia (Oreochromis niloticus) by chlorpyrifos and carbosulfan*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 67(1), pp. 109-119.
- Chovanec, A., Hofer, R., & Schiemer, F. (2003). *Fish as bioindicators*. *Trace metals and other contaminants in the environment*, 6, pp. 639-676.

- Chuiko, G.M., Zhelnin, 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*. Comp. Biochem. Physiol. 117C, pp. 251–257.
- Civeira, G. (2012). Recopilación sobre los efectos del Glifosato en agroecosistemas. Instituto de Suelos. INTA Castelar.
- Costa, Lucio G. (2006). *Current issues in organophosphate toxicology*. Clinica chimica acta, 366(1), pp. 1-13.
- Cox, C. (1994). *Chlorpyrifos, Part I: Toxicology*. J. Pesticide Reform 14, pp. 15-20.
- da Silva, R. S., de Paula Cognato, G., Vuaden, F. C., Rezende, M. F. S., Thiesen, F. V., da Graça Fauth, M., ... & Dias, R. D. (2003). *Different sensitivity of Ca²⁺-ATPase and cholinesterase to pure and commercial pesticides in nervous ganglia of Phyllocaulis soleiformis (Mollusca)*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 135(2), pp. 215-220.
- De Gerónimo, E., Aparicio, V. C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S. & Costa, J. L. (2014). *presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina*. Chemosphere, 107, pp. 423-431.
- Deb, N., & Das, S. (2013). *Chlorpyrifos toxicity in fish: A review*. Current World Environment, 8(1), pp. 77-84.
- de la Torre, F. R., Ferrari, L., & Salibian, A. (2002). *Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 131(3), pp. 271-280.
- de la Torre, F.R., Ferrari, L. and Salibián, A. (2005). *Biomarkers of a native fish species (Cnesterodon decemmaculatus) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina*, Chemosphere, 59(4), pp. 577–583.
- Dembélé, K.; Haubruge, E.; Gaspar, C. 2000. *Concentration Effects of Selected Insecticides on Brain Acetylcholinesterase in the Common Carp (Cyprinus carpio L.)*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 45, pp. 49-54.
- Díaz Trujillo, M. V. (2007). *Estudios del sistema suelo-surfactante-plaguicida en los procesos de adsorción y desorción de atrazina, MBT y clorpirifós*. Tesis de maestría. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias. Facultad de ciencias químicas y farmaceuticas.
- Dixit, A., & Varshney, J.G. (2008). *Assessment of post emergence herbicides in direct seeded rice*. Indian J. Weed Sci., 40, pp. 144-147.
- Donato, M. T. (2004). *¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona?*. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.

- Elersek, T., & Filipic, M. (2011). *Organophosphorus pesticides – Mechanisms of their toxicity*. In Pesticides – the impacts of pesticides exposure; Stoytcheva, M., Ed.; INTECH Publishers: Croatia.
- 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(2), pp.88–90, IN1-IN2, pp.91–95.
- FAO (1996). Manejo de malezas para países en desarrollo. (Estudio FAO producción y protección vegetal -120). <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s0e.htm>
- FAO (2014). <http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP>
- Fernández, D. G., Mancipe, L. C., & Fernández, D. C. (2010). Intoxicación por organofosforados. *Revista Med*, 18(1), pp. 84-92.
- Ferrari, A., Venturino, A., Pechen de D'Angelo, A.M., (2004). *Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (Carassius auratus)*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 57(3), pp. 420-425.
- Flammarion, P., Noury, P., & Garric, J. (2002). *The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (Leuciscus cephalus): the fish length should not be ignored*. *Environmental Pollution*, 120(2), pp. 325-330.
- Franz, J. E., Mao, M. K., & Sikorski, J. A. (1997). *Glyphosate: a unique global herbicide*. American Chemical Society.
- Froese, R. (2006). *Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations*. *Journal of applied ichthyology*, 22(4), PP. 241-253.
- Fulton, M. H., & Key, P. B. (2001). *Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), pp. 37-45.
- García, M. E., Demichelis, S. O., de la Torre, E. R., & Ferrari, L. (1998). *Freshwater toxicity to Cnesterodon sp.: bioassays with water from the Reconquista River*. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 26(3), 1216-1218.
- Gavrilescu, M. (2005). *Fate of pesticides in the environment and its bioremediation*. *Engineering in Life Sciences*, 5(6), pp. 497-526.
- Gimsing, A. L., Borggaard, O. K., Jacobsen, O. S., Aamand, J., & Sørensen, J. (2004). *Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralisation in Danish surface soils*. *Applied Soil Ecology*, 27(3), pp. 233-242.

- Gimsing A. L., & dos Santos Afonso M. (2005). *Glyphosate*. En: Nowack B., VanBriesen J. M. (Eds.) Biogeochemistry of Chelating Agents. ACS Symposium Series 910, American Chemical Society, Washington, DC, USA, pp. 263-277.
- Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Crestani, M., da Fonseca, M. B., de Araújo Pedron, F., 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(2), pp. 237-241.
- Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., 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 Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(4), pp. 519-524.
- Guimaraes, L., Gravato, C., Santos, J., Monteiro, L. S., & Guilhermino, L. (2009). *Yellow eel (Anguilla anguilla) development in NW Portuguese estuaries with different contamination levels*. *Ecotoxicology*, 18(4), pp. 385-402.
- Gholami-Seyedkolaei, S. J., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., & Kosari, A. A. (2013). *Effect of a glyphosate-based herbicide in Cyprinus carpio: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 98, pp. 135-141.
- Gül, A. (2005). *Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.) larvae*. *Chemosphere*, 59(2), pp. 163-166.
- IRAM (2008). *Calidad ambiental, Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce, Método semiestático*. Norma IRAM 29112, pp.24.
- Jacobson, S. M., Birkholz, D. A., McNamara, M. L., Bharate, S. B., & George, K. M. (2010). *Subacute developmental exposure of zebrafish to the organophosphate pesticide metabolite, chlorpyrifos-oxon, results in defects in Rohon-Beard sensory neuron development*. *Aquatic toxicology*, 100(1), pp. 101-111.
- Järup, L. (2003). *Hazards of heavy metal contamination*. *British medical bulletin*, 68(1), pp. 167-182.
- Jebali, J., Ben Khedher, S., Sabbagh, M., Kamel, N., Banni, M. & Boussetta, H. (2013). *Cholinesterase activity as biomarker of neurotoxicity: utility in the assessment of aquatic environment contamination*. *Revista de Gestão Costeira Integrada. Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 13(4), pp. 525-537.
- Kavitha, P., & Venkateswara Rao, J. (2007). *Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, Gambusia affinis after lethal*

- effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos*. Pestic. Biochem. Physiol. 87 (2), 182–188.
- Kavitha, P., & Venkateswara Rao, J. (2008). *Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, Gambusia affinis*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 26(2), pp.192-198.
- Kazemi, M., Tahmasbi, A. M., Valizadeh, R., Naserian, A. A., & Soni, A. (2012). *Organophosphate pesticides: a general review*. Agricultural science research journals, 2. Vol. 2.
- Keizer, J., D'Agostino, G., Gramenzi, F., Vittozzi, L., & Nagel, R. (1993). *Comparative diazinon toxicity in guppy and zebra fish: different role of oxidative metabolism*. Environmental toxicology and chemistry, 12(7), PP. 1243-1250.
- Lapegna, P. (2013). *The expansion of transgenic soybeans and the killing of indigenous peasants in argentina*. Societies Without Borders, 8(2), pp. 291-308.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M. E., & Schettino, T. (2013). *Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives*. BioMed research international. Vol. 3.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. Journal of biological chemistry, 193(1), pp. 265-275.
- Ludke, J. L., Hill, E. F., Dieter, M. P., (1975). *Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 3(1), pp.1-21.
- 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, pp. 932–937.
- MAGyP (2014). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina. Sistema Integrado de Información Agropecuaria. <http://www.siiia.gov.ar/apps/siia/estimaciones/estima2.php>
- Marino, D. & Ronco, A. (2005). *Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the pampa ondulada, Argentina*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 75(4), pp. 820-826.
- Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., dos Santos Afonso, M., & Salibián, A. (2012). *Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in Cnesterodon decemmaculatus*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 88(1), pp. 6-9.
- Menéndez-Helman R.J. (2013). *Efectos del glifosato en peces dulceacuícolas. Biomarcadores de estrés ambiental*. Tesis Doctoral. Facultad de ciencias exactas y naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

- Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., dos Santos Afonso, M. & Salibián, A. (2015). *Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus**. *Ecotoxicology and environmental safety*, 111, pp. 236-241.
- Menni, R. C. (2004). *Peces y ambientes en la Argentina continental*. Monografías del Museo Argentino de Ciencias Naturales.
- Modesto, K. A., & Martinez, C. B. (2010a). *Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity*. *Chemosphere*, 81(6), pp. 781-787.
- Modesto, K. A., & Martinez, C. B. (2010b). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78(3), pp. 294-299.
- Mohammad, F., Al-Badrany, Y., & Al-Jobory, M. (2008). *Acute toxicity and cholinesterase inhibition in chicks dosed orally with organophosphate insecticides*. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 59(3), pp. 145-151.
- Molero, A. M., & Pisanó, A. (1987). *Estadíos de desarrollo de *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae)*. *Rev. Bras. Biol*, 47, 115-125.
- Monserrat, J. M., Martínez, P. E., Geracitano, L. A., Amado, L. L., Martins, C. M. G., Pinho, G. L. L., ... & Bianchini, A. (2007). *Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1), pp. 221-234.
- Monteiro, M., Quintaneiro, C., Nogueira, A. J. A., Morgado, F., Soares, A. M. V. M., & Guilhermino, L. (2007). *Impact of chemical exposure on the fish *Pomatoschistus microps* Krøyer (1838) in estuaries of the Portuguese Northwest coast*. *Chemosphere*, 66(3), pp. 514-522.
- Monteiro, D. A., De Almeida, J. A., Rantin, F. T., & Kalinin, A. L. (2006). *Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion)*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(2), pp. 141-149.
- Nobonita, D., & Suchismita, D. (2013). *chlorpyrifos toxicity in fish: a review*. *Current World Environ.*, 8 (1), pp. 77-84
- OMS-FAO (2009). *Organización Mundial de la Salud. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Higiene de los alimentos*. Cuarta Edición. Roma.
- Paracampo, A., Solis, M., Bonetto, C., & Mugni, H. (2015). *Acute toxicity of chlorpyrifos to the non-target organism *Cnesterodon decemmaculatus**. *International journal of environmental health research*, 25(1), pp. 96-103.

- Parvez, S., & Raisuddin, S. (2005). *Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish Channa punctata (Bloch)*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20(1), pp. 112-117.
- Pathiratne, A., & George, S. G. (1998). *Toxicity of malathion to Nile tilapia, Oreochromis niloticus and modulation by other environmental contaminants*. *Aquatic Toxicology*, 43(4), 261-271
- Prata, F., Cardinali, V. C. D. B., Lavorenti, A., Tornisielo, V. L., & Regitano, J. B. (2003). *Glyphosate sorption and desorption in soils with distinct phosphorus levels*. *Scientia Agricola*, 60(1), PP. 175-180.
- Pérez, G. L., Vera, M. S., Miranda, L. A. (2011). *Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems*. In: Kortekamp, A. Ed. *Herbicides and the Environment*. INTECH Open, Rijeka, Croatia, pp. 343–368.
- Perkins Jr, E. J., & Schlenk, D. (2000). *In vivo acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: role of biotransformation in acute toxicity*. *Toxicological Sciences*, 53(2), pp. 308-315.
- 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(1), pp. 61.
- Picco, E., Rodríguez, C., & Boggio, J. (2010). *Clorpirifós: aspectos cinéticos a considerar en su uso clínico como antiparasitario en veterinaria*. *Panorama Actual del Medicamento*, 34(339), pp. 1037-1051.
- Rath, S., & Misra, B. N. (1981). *Toxicological effects of dichlorvos (DDVP) on brain and liver acetylcholinesterase (AChE) activity of Tilapia mossambica, Peters*. *Toxicology*, 19(3), pp. 239-245.
- Rendón-von Osten, J., Ortiz-Arana, A., Guilhermino, L., & Soares, A. M. V. M. (2005). *In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (Gambusia yucatanana) exposed to pesticides*. *Chemosphere*, 58(5), pp. 627-636.
- Richetti, S. K., Blank, M., Capiotti, K. M., Piato, A. L., Bogo, M. R., Vianna, M. R., & Bonan, C. D. (2011). *Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish*. *Behavioural Brain Research*, 217(1), pp. 10-15.
- Ronco, A. (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.*, INTA, Buenos Aires. pp. 85-94.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C. R., de Menezes, C. C., Lazzari, R., Neto, J. R., ... & 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(3), pp. 740-745.
- Salibián, A. (2006). *Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista River of Argentina*. In *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer New York. pp. 35-65.
- Sandrini, J. Z., Rola, R. C., Lopes, F. M., Buffon, H. F., Freitas, M. M., Martins, C. D. M. G., & da Rosa, C. E. (2013). *Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel Perna perna and the fish Danio rerio and Jenynsia multidentata: In vitro studies*. Aquatic Toxicology, 130, pp. 171-173
- Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E. P., George, S., James, M., Kullman, S. W., Peter van den Hurk., & Willett, K. (2008). *Biotransformation in fishes*. The toxicology of fishes, pp. 153-234.
- Scholz, N. L., Truelove, N. K., Labenia, J. S., Baldwin, D. H., & Collier, T. K. (2006). *Dose-additive inhibition of chinook salmon acetylcholinesterase activity by mixtures of organophosphate and carbamate insecticides*. Environmental Toxicology and Chemistry, 25(5), pp. 1200-1207.
- Sharbidre, A. A., Metkari, V., & Patode, P. (2011). *Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, Poecilia reticulata*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 101(2), pp. 132-141.
- Singh, S. K., & Yadav, R. P. (2010). *Toxicological and biochemical alterations of cypermethrin (Synthetic Pyrethroids) against freshwater Teleost fish Colisa fasciatus at different season*. World J. Zool, 5(1), pp. 25-32.
- Smith, G. N., Watson, B. S., & Fischer, F. S. (1967). *Investigations of Dursban insecticide. Metabolism of O, O-diethyl O-3, 5, 6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol in plants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 15(5), pp. 870-877.
- Solomon, K. & Thompson, D. (2003). *Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate*. Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews, 6(3), pp. 289-324.
- Somma, L. A., Mastrángelo, M., & Ferrari, L. (2011). *Manual de producción de Cnesterodon decemmaculatus en laboratorio*. Utopias, Ushuaia, pp. 35.
- Soreq, H., & Seidman, S. (2001). *Acetylcholinesterase—new roles for an old actor*. Nature Reviews Neuroscience, 2(4), pp. 294-302.
- Sotomayor, Verónica (2011). *Efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la expresión génica de embriones de Rhinella arenarum. Mecanismos de acción y vías de señalización*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

- Sturm, A., Wogram, J., Segner, H., Liess, M., (2000). *Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from threespined stickleback (Gasterosteus aculeatus): Application in biomonitoring.* Environmental Toxicology and Chemistry, 19(6), pp.1607-1615.
- Teixeira de Mello, F. (2007). *Efecto del uso del suelo sobre la calidad del agua y las comunidades de peces en sistemas lóticos de la cuenca baja del río Santa Lucía (Uruguay).* Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- Thompson, H. M. (1999). *Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates.* Ecotoxicology, 8(5), pp. 369-384.
- Tomlin, C. D. S. (2006). *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 14th ed.; British Crop Protection Council: Hampshire, UK. pp 545- 548.
- Topal, A., Şişecioglu, M., Atamanalp, M., Işık, A., & Yılmaz, B. (2016). *The in vitro and in vivo effects of chlorpyrifos on acetylcholinesterase activity of rainbow trout brain.* Journal of applied animal research, 44(1), pp. 243-247.
- Tripathi, A., & Srivastava, U. C. (2008). *Acetylcholinesterase: a versatile enzyme of nervous system.* Annals of neurosciences, 15(4).
- 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.
- Upadhyay, S., Sharma, M. K., Rao, V. K., Bhattacharya, B. K., Sharda, D., Vijayaraghavan R. (2011). *Organophosphorous compounds-toxicity and detection approach.* Ed, M. Stoytcheva. Chapter from the book *Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis.* InTech, Rijeka pp. 315.
- USEPA (1993). *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, U.S. EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington DC.
- USEPA (2015). Insecticidas organofosforados. <file:///D:/TESIS/Documento%20de%20la%20tesis/Documentos%20de%20Bibliografía/EPA%202015.pdf>
- USEPA (2017). <https://espanol.epa.gov/espanol/plaguicidas>
- Varó, I., Serrano, R., Pitarch, E., Amat, F., Lopez, F. J., Navarro, J.C., (2002). *Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain: study of protein HSP70 as biomarker of sublethal stress in fish.* Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 4(2), pp. 229-235.

- Varó, I., Navarro, J. C., Amat, F., & Guilhermino, L. (2003). *Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (Dicentrarchus labrax)*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 75(3), 61-72.
- Venkateswara-Rao, J., Begum, G., Pallela, R., Usman, P. y Rao, R. N. (2005). *Changes in behavior and brain acetylcholinesterase activity in mosquito fish, Gambusia affinis in response to the sub-lethal exposure to chlorpyrifos*. *International journal of environmental research and public health*, 2(3), pp. 478-483.
- Venkateswara Rao, J., & Kavitha, P. (2010). *In vitro effects of chlorpyrifos on the acetylcholinesterase activity of euryhaline fish, Oreochromis mossambicus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(3-4), pp. 303-306.
- Vittozzi, L., Fabrizi, L., Di Consiglio, E., Testai, E. (2001). *Mechanistic aspects of organophosphorothionate toxicity in fish and humans*. *Environ. Int.*, 26, pp. 1-5.
- Wendelaar Bonga, S. E., 1997. *The stress response in fish*. *Physiology Review*, pp. 77: 591-625.
- Wiesner, J., Kříž, Z., Kuča, K., Jun, D., & Koča, J. (2007). *Acetylcholinesterases—the structural similarities and differences*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 22(4), pp. 417-424.
- Wright, C. I., Geula, C., & Mesulam, M. (1993). *Neuroglial cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability*. *Annals of neurology*, 34(3), pp. 373-384.
- WHO (1994). *Glyphosate. Environmental Health Criteria*, 159. Geneva. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/40044/1/9241571594-eng.pdf>
- WHO (2016). <http://www.who.int/foodsafety/faq/en/#>
- Yang, D., Lauridsen, H., Buels, K., Chi, L. H., La Du, J., Bruun, D. A., Olson J. R., Tanguay R. L., & Lein, P. J. (2011). *Chlorpyrifos-oxon disrupts zebrafish axonal growth and motor behavior*. *Toxicological sciences*, 121(1), pp. 146-159.
- Zhao, B., Zhang, J., Gong, J., Zhang, H., & Zhang, C. (2009). *Glyphosate mobility in soils by phosphate application: Laboratory column experiments*. *Geoderma*, 149(3), pp. 290-297.
- Zhu, Y., Zhang, F., Tong, C., & Liu, W. (1999). *Determination of glyphosate by ion chromatography*. *Journal of chromatography A*, 850(1-2), pp. 297-301.