

Comunicación breve

Evaluación de estrés oxidativo en juveniles de *Prochilodus lineatus* expuestos a cipermetrina

RECIBIDO: 25.07.2012

ACEPTADO: 18.09.2012

Davico, C.¹ • Poletta, GL.¹ • Loteste, A.^{1,2} • Scagnetti, JA.¹ •
Campana, M.² • Parma, MJ.² • Simoniello, MF.¹

¹ Cátedra de Toxicología y Bioquímica Legal, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo C.C 242 (3000) Santa Fe, Argentina.

² Instituto Nacional de Limnología, CONICET-UNL, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo C.C 242 (3000) Santa Fe, Argentina.

Autor para correspondencia: Dra. María Fernanda Simoniello.

E-mail: fersimoniello@yahoo.com.ar - Cátedra de Toxicología y Bioquímica Legal, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo C.C 242 (3000) Santa Fe, Argentina.

RESUMEN: Las aplicaciones de grandes cantidades de pesticidas en zonas agrícolas pueden encontrar su camino en los cursos de agua, lo que produce un impacto adverso en la biota acuática. En este estudio se utilizaron biomarcadores de daño oxidativo, peroxidación lipídica (TBARS) y defensas antioxidantes: Catalasa (CAT) y Glutation reducido (GSH), en tejido hepático de *Prochilodus lineatus* expuesto *in vivo* a cipermetrina (0,300, 0,150, 0,075 y 0,000 µg/l) por 96h. Los resultados no mostraron diferencias significativas en las concentraciones crecientes de cipermetrina ensayadas con respecto al grupo control al evaluar TBARS y GSH ($p > 0,05$ en ambos casos). Para CAT, se encontró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) a las concentraciones de 0,150 y 0,300 µg/l de cipermetrina. De los

marcadores de daño oxidativo utilizados, CAT demostró ser el más eficaz para monitorear *in vivo* los efectos de cipermetrina en *Prochilodus lineatus*, siendo este un organismo sensible.

PALABRAS CLAVE: *Prochilodus lineatus*, cipermetrina, Estrés oxidativo, tejido hepático.

SUMMARY: *Evaluation of oxidative stress in juvenile Prochilodus lineatus exposed to cypermethrin.*

The application of large amounts of pesticides in agricultural areas may find their way into waterways, resulting in an adverse impact on aquatic biota. In this study, we used biomarkers of oxidative damage, lipid peroxidation (TBARS) and antioxidant defenses: catalase (CAT) and glutathione (GSH) in liver tissue of *Prochilodus*

lineatus exposed *in vivo* to cypermethrin (0.300, 0.150, 0.075 and 0.000 $\mu\text{g/l}$) for 96h. Results showed no significant difference in TBARS and GSH in any group exposed to cypermethrin compared with the control group ($p > 0.05$ for all cases). CAT showed a significant decrease ($p < 0.05$) at concentrations of 0.150 and 0.300

$\mu\text{g/l}$ of cypermethrin. Considering the oxidative damage markers used, CAT demonstrated to be the most effective one to monitor *in vivo* effects of cypermethrin in *Prochilodus lineatus*, this being a sensitive organism.

KEYWORDS: *Prochilodus lineatus*, cypermethrin, oxidative stress, liver tissue.

Introducción

Las aplicaciones de grandes cantidades de pesticidas en zonas agrícolas contribuyen a la presencia de sustancias tóxicas en el medio ambiente. Estos productos químicos pueden encontrar su camino en los depósitos de agua, arroyos y ríos, lo que produce un impacto adverso en la biota acuática, incluidos los peces (1).

En Argentina, la agricultura se ha intensificado muy rápidamente. Esto conlleva la introducción creciente de productos fitosanitarios en los sistemas de cultivo. La implementación de nuevas técnicas agrícolas permitió realizar cultivos en zonas marginales, sin consideraciones de mediano plazo sobre el deterioro del suelo, el ambiente y la salud humana (2).

Los piretroides sintéticos son los principales insecticidas de amplio espectro orgánico actualmente utilizados (3). Estos compuestos halogenados y lipofílicos son generalmente reconocidos como neurotóxicos potentes y se caracterizan por tener altas propiedades insecticidas y baja toxicidad para los mamíferos. Debido a sus evidentes ventajas, el uso de insecticidas piretroides se ha generalizado. No obstante, varios estudios han informado que estos compuestos son extremadamente tóxicos para los peces y otros organismos (4,5,6). Además de su toxicidad aguda, muchos

piretroides pueden tener efectos potencialmente nocivos a niveles subletales (7,8).

En un relevamiento realizado en cultivos extensivos en Argentina, el piretroide cipermetrina resultó ser uno de los principios activos más utilizados (9). Estos compuestos químicos se disipan por deriva y escorrentía y, al contaminar los ambientes naturales circundantes, afectan a las especies silvestres (10).

Una de las alternativas para evaluar los efectos de los agroquímicos es la medición de las respuestas biológicas en los organismos, conocidas como biomarcadores (11).

La exposición de los organismos a xenobióticos puede producir una tasa de generación de Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) excesiva, superando su capacidad antioxidante y produciendo como consecuencia Estrés Oxidativo (EO) (12,13). Los plaguicidas son un ejemplo de agentes que actúan como prooxidantes en múltiples órganos, modifican las respuestas de defensas antioxidantes, producen acumulación de EROs, daño a proteínas, al ADN y también pueden generar Peroxidación Lipídica (POL), resultando en daño a membranas y alteración de su funcionalidad (14,15).

Entre los biomarcadores de EO se encuentran los de daño oxidativo y los de defensa antioxidante. La POL está consi-

derada entre los mejores indicadores de daño en sistemas biológicos inducidos por EROs (16). Por su parte, los mecanismos de defensa antioxidante, pueden ser enzimáticos o no enzimáticos, ya que por un lado tienden a impedir la formación de radicales libres y por otro, a neutralizarlos una vez formados. Dentro de los sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos, se encuentra la Catalasa (CAT), enzima especializada en neutralizar el peróxido de hidrógeno (17). En los sistemas de defensas antioxidantes no enzimáticas se encuentra el sistema Glutathion, que es un tripéptido natural cuyas propiedades lipofílicas y reductoras le otorgan importancia en las vías metabólicas así como en el sistema antioxidante de la mayoría de las células. En los hepatocitos se encuentra principalmente en forma reducida.

Los peces son considerados sistemas de especial interés para investigaciones *in vivo* en la evaluación de contaminantes acuáticos (18), particularmente por su capacidad para metabolizar xenobióticos y acumular contaminantes, que los hace sensibles incluso a bajas concentraciones de genotóxicos (19,5).

Para el presente estudio se utilizó la especie *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) debido a que es la más abundante y el principal recurso de pesca comercial en el río Paraná Medio (20). Es un pez neotropical ampliamente distribuido, que representa gran parte de la ictiofauna de nuestros sistemas acuáticos. Además, su característica ecológica detritívora le permite ser una especie adecuada para el monitoreo ambiental, ya que está en contacto con los xenobióticos en el agua y los sedimentos (21,22). Esta especie ha demostrado ser sensible a la exposición a xenobióticos, produciéndose alteraciones

hematológicas y estrés oxidativo en diferentes tejidos por exposición controlada (23) o ambiental (24).

De este modo, con la aplicación de los biomarcadores de daño oxidativo (TBARS) y defensa antioxidante: CAT y Glutathion reducido (GSH), se pretende evaluar la acción *in vivo* de uno de los pesticidas más utilizados en la región, cipermetrina, sobre una especie representativa de la fauna íctica autóctona, *P. lineatus*.

Materiales y métodos

Se utilizaron ejemplares juveniles de *P. lineatus*, provenientes de un ambiente considerado prístino, una laguna de desborde vinculada al río Colastiné, próxima a la ciudad de Santa Fe (31° 39' 36" S y 60° 35' 26" O). Las capturas se llevaron a cabo durante el otoño, siguiendo metodologías para minimizar el estrés. Se emplearon redes de arrastre a la costa y de calado, y se transportaron los ejemplares vivos en recipientes de poliuretano convenientemente oxigenados a los efectos de asegurar su bienestar hasta la llegada al laboratorio. Allí se aclimataron entre 24 y 48 horas en recipientes de 180 litros con oxigenación permanente y a 25°C. Los ensayos fueron de tipo semiestáticos con una duración de 96 horas, donde se renovó el 50% de las soluciones cada 24 horas, con el fin de mantener una concentración relativamente constante del tóxico y, por otra parte, eliminar productos de desecho propios del metabolismo de los peces. Se utilizaron entre 45 y 60 ejemplares juveniles, de talla y peso homogéneos (peso: $41,7 \pm 21,7$ g y longitud: $113,31 \pm 19,49$ mm), que fueron colocados en recipientes de poliuretano de 26 litros de capacidad, a razón de 3 ejemplares por cada recipiente. La temperatura se mantuvo a 25°C, fotope-

riodo de 12:12 hs. y concentración de oxígeno entre 5,7 y 6,8 mg/l, respetando así el grado de bienestar de los peces (24).

Un lote compuesto por 10 ejemplares fue mantenido durante 24 hs. bajo estas mismas condiciones con el fin de determinar los valores basales de los biomarcadores seleccionados en tejido hepático de esta especie.

El ensayo de exposición a cipermetrina se llevó a cabo durante 96 hs. Se realizaron cuatro tratamientos con cinco ejemplares cada uno: un grupo control no expuesto (0,00 $\mu\text{g/l}$), y 3 grupos expuestos a una formulación comercial de cipermetrina (SHERPA®) como principio activo: 0,075; 0,150 y 0,300 $\mu\text{g/l}$. A su vez, cada tratamiento se realizó por triplicado, de manera que se expusieron 15 especímenes a cada concentración.

Una vez finalizada la exposición, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los hígados de cada ejemplar, los cuales fueron lavados en solución fisiológica y conservados a -80°C .

Preparación de los homogenatos de tejido hepático.

Con los hígados conservados a -80°C se procedió a realizar los homogenatos según Sabatini *et al* (25). Brevemente, se tomaron 30 mg de tejido hepático por cada ejemplar y se mezclaron con un buffer de KCl e inhibidores de proteasas (PMSF y benzamida). Luego se centrifugaron a 900 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante se utilizó para las determinaciones de estrés oxidativo. Se empleó un kit comercial (Wiener lab®) para determinar la concentración de proteínas en cada homogenato.

Actividad de Catalasa en tejido hepático.

Para determinar la actividad de CAT, se utilizó el método de Aebi (26) que mide la disminución de H_2O_2 a 240 nm (a 25°C) durante 60 segundos, para luego calcular la actividad de CAT por diferencia de absorbancia en 60 segundos de reacción. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, los resultados fueron expresados como U/mg proteína.

Determinación de tioles totales en tejido hepático.

La determinación de tioles totales representan en gran medida la cantidad de GSH contenido en los hepatocitos. El GSH fue determinado por una modificación de la técnica de Ellman (27), utilizando DTNB (dithio-bis-nitrobenzoate) en buffer fosfato, pH 8,0. El contenido de tioles totales se registró espectrofotométricamente a 412 nm. La concentración de GSH fue calculada de una curva estándar y se expresó como μmol Glutation /mg proteína.

Peroxidación lipídica mediante TBARS en tejido hepático.

Para la determinación de POL se utilizó la técnica de TBARS (28). Como reactivo se utilizó ácido Tricloroacético y ácido Tiobarbitúrico en presencia de BHT (Butil hidroxitolueno) que luego de mezclarse con el homogenato se calentó por 45 minutos a 95°C para luego medir la absorbancia a 535nm. Los resultados de la concentración de TBARS en tejido hepático fueron expresados como $\mu\text{mol/g}$ proteína.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico SPSS 14.0 para Windows. Los datos fueron evaluados en normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y en homogeneidad de varianza mediante el test de Levene. Se utilizó el test de Kruskal Wallis seguido de Mann-Whitney para comparar los valores de CAT, GSH y TBARS entre los grupos expuestos, y el control negativo, y entre este último y los basales.

Resultados

No hubo mortalidad ni se observaron cambios comportamentales evidentes en los peces expuestos a las distintas concentraciones subletales de cipermetrina. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre las réplicas de los tratamientos ($p > 0,05$) para ninguno de los parámetros evaluados. Todos los resultados son informados como la media \pm EE de cada grupo experimental.

Figura 1. Actividad de la enzima Catalasa (CAT) en peces expuestos a diferentes concentraciones de cipermetrina (0,000; 0,075; 0,150 y 0,300 $\mu\text{g/l}$) y grupo basal. Los valores se expresan como valores medios \pm EE. *Estadísticamente significativo respecto al control negativo ($p < 0,05$ Test de Mann-Whitney).

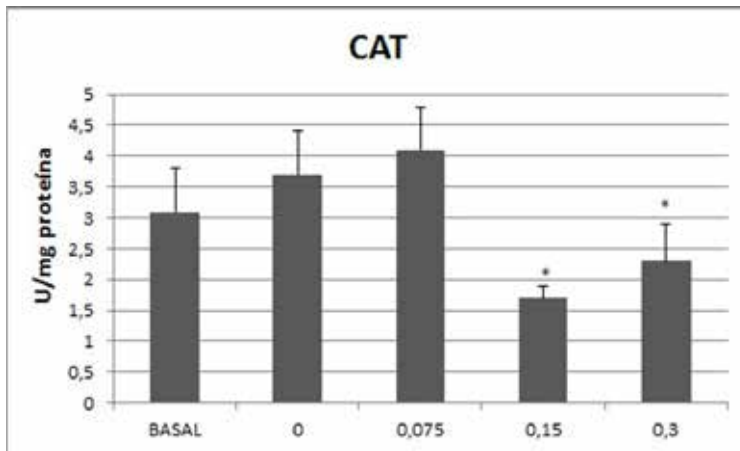


Figura 2. Concentración de GSH en peces expuestos a diferentes concentraciones de cipermetrina (0,000; 0,075; 0,150 y 0,300 $\mu\text{g/l}$) y grupo basal. Los valores se expresan como valores medios \pm EE. *Estadísticamente significativo respecto del control negativo ($p < 0,05$ Test de Mann-Whitney).

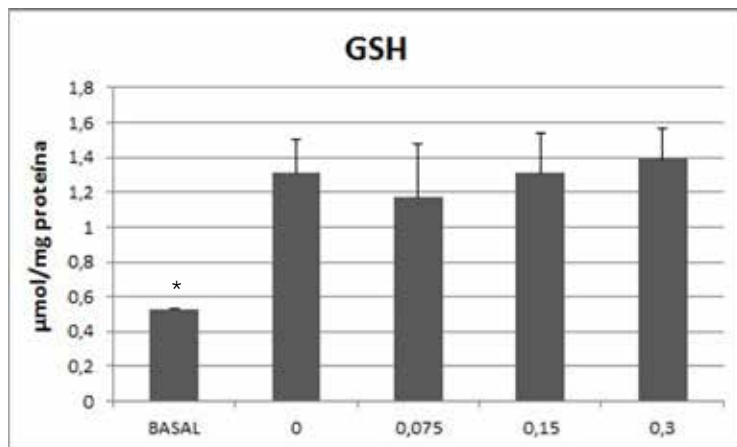
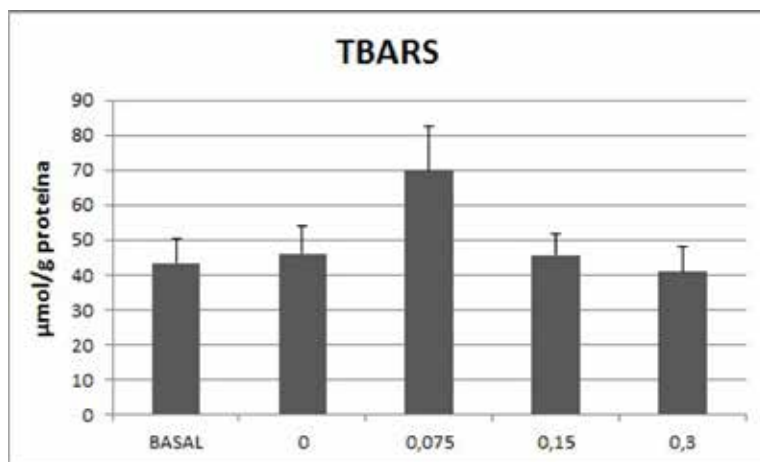


Figura 3. Concentración de TBARS en peces expuestos a diferentes concentraciones de cipermetrina (0,000; 0,075; 0,150 y 0,300 $\mu\text{g/l}$) y grupo basal. Los valores se expresan como valores medios \pm EE.



Al comparar los valores basales con los del control negativo, se observó un incremento significativo de GSH en estos últimos ($p < 0,01$; Fig. 2), pero no hubo diferencias significativas en la actividad de CAT

ni en TBARS ($p > 0,05$ en ambos casos; Figs. 1 y 3).

Respecto al ensayo de exposición se observó una actividad significativamente menor de CAT en los grupos expuestos a

0,150 y 0,300 $\mu\text{g/l}$ de cipermetrina en comparación con el control negativo ($p < 0,05$; Fig. 1), pero no hubo diferencias en los demás parámetros de estado oxidativo analizados bajo estas condiciones experimentales ($p > 0,05$; Figs. 2 y 3).

Discusión

Los piretroides pertenecen a una clase de insecticidas lipofílicos que se degradan fácilmente en ambientes naturales, pero pueden llegar a ser tóxicos para los peces debido a la escasa capacidad que tienen para metabolizar estos compuestos (29). Varios estudios han evaluado la acción de estos plaguicidas sobre la biota acuática. Ansari *et al.* (30) estudiaron el efecto genotóxico y daño oxidativo de la cipermetrina en el pez de agua dulce *Channa punctata*, Jin *et al.* (6) estudiaron los efectos de la exposición a cipermetrina en la inducción de estrés oxidativo hepático y daño en el ADN en adultos del pez cebra, *Danio rerio*, en todos ellos se observaron cambios significativos en los marcadores seleccionados para evaluar la acción de cipermetrina. La exposición subletal de *Labeo rohita* a cipermetrina ha producido cambios apreciables en los parámetros bioquímicos, enzimáticos y hematológicos (31). Otro estudio en la misma especie, afirma que a dosis subletales de cipermetrina para 24 h y 96hs. de exposición causa alteraciones en proteína total, aminoácidos, piruvato, lactato, actividad de enzima proteasa, acetilcolinesterasa, y citocromo oxidasa, de modo que afecta negativamente los patrones de comportamiento, respiración y producción de ATP (32). A su vez, la exposición subletal de alevines de *Catla catla* a cipermetrina altera los parámetros hematológicos y bioquímicos (33).

En el presente estudio se observó un valor significativamente menor de GSH en el grupo basal respecto al control negativo, lo cual podrían indicar un estado de estrés en los animales producido por el cautiverio y por las condiciones del ensayo de exposición. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones crecientes de cipermetrina ensayadas con respecto al grupo control al evaluar POL, lo cual podría deberse a que el tiempo de exposición de 96 hs no fue suficiente para producir este tipo de daño, ya que en trabajos realizados con exposición subcrónica a cipermetrina en branquias de *P. lineatus* encontraron que las actividades de glutatión-S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD) y CAT, así como la POL aumentaron después de la exposición subcrónica de 14 días (34).

En cuanto a la enzima CAT, aunque no se encontraron diferencias significativas para las concentraciones más bajas, para las concentraciones de 0,150 y 0,300 $\mu\text{g/l}$ de cipermetrina se observó una disminución significativa, que puede explicarse por una respuesta adaptativa al estrés producido por la exposición. Un estudio realizado en la especie *Oncorhynchus mykiss* expuesta a Carbaril produjo un incremento significativo de CAT en el hígado después de 24 hs de exposición. Esa inducción se mantuvo con la menor concentración ensayada durante las 48 hs pero la actividad se redujo por debajo de los valores del control a las 96 hs de exposición (35). Por su parte, Jin *et al.*, (36) informaron un aumento de la actividad CAT en el hígado del pez cebra, después de 14 días de exposición a atrazina en una concentración de 1000 mg/l, por lo tanto esta enzima muestra diferentes patrones de cambios en función del agente al que se

expone la fauna íctica, de la concentración del mismo, así como de la especie utilizada como indicador.

Se cree que el daño oxidativo es un mecanismo importante del efecto nocivo de los plaguicidas (37,38), pudiendo impactar sobre proteínas, lípidos e incluso el ADN. Respecto a éste último, en una primera etapa de la evaluación del efecto de la cipermetrina en *P. lineatus*, se aplicó el ensayo cometa, que permite realizar una cuantificación del daño al ADN (5). Esos resultados demostraron diferencias significativas en el daño observado en el ADN en los animales expuestos a las concentraciones de 0,150 y 0,300 $\mu\text{g/l}$ de cipermetrina, resultados que podrían estar relacionados con la disminución en la capacidad antioxidante (CAT) determinada en el presente trabajo para las mismas concentraciones.

Conclusiones

Como conclusiones de este estudio es posible puntualizar:

-Se logró estandarizar técnicas de evaluación de respuesta antioxidante y peroxidación lipídica en tejido hepático para una de las especies de peces nativos más comunes de la región neotropical, *P. lineatus*.

-En vista de los resultados obtenidos en este trabajo se ha arribado a la conclusión de que los marcadores de respuesta antioxidante junto con los marcadores de daño al ADN previamente estudiados, son un medio eficaz de prueba a corto plazo para monitorear *in vivo* los efectos de un agente tóxico en especies acuáticas.

Por último, *P. lineatus* es un organismo sensible para la evaluación de sustancias potencialmente dañinas en el medio acuático.

Referencias bibliográficas

1. John, P.J. y Prakash, A. 2003. Bioaccumulation of pesticides on some organs of freshwater catfish *Mystus vitatus*, Bull. Environmental Contaminant Toxicology. **70**: 1013-1016.
2. Carballo, M.A.; Simoniello, M.F. y Kleinsorge, E.C. 2011. Agrochemicals: horticulture. Use conditions determine genotoxic effects and oxidative damage in rural populations in Santa Fe, Argentina. Chapter. 17: 357-384 in: Pesticides the Impacts of Pesticides Exposure, ISBN 978-953-307-460-3 published by INTECH. Editorial Collegiums. Vienna, Austria. p 446.
3. Eisler, R. 1992. Fenvalerate hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. Contaminant Hazards Reviews, Report 24, US Department of the interior, Fish and Wildlife Service. 20240.
4. Boccardo, L.; Fernandes, M.N.; Penteado, C. H. S. y Jucáchagas, R. 2004. Effects of deltamethrin pyrethroid on the respiratory metabolism of the neotropical spirostreptid millipedes *Gymnostreptus olivaceus* and *Plusioporus setiger*. Revista Brasileira de Toxicologia. **17**: 2: 25-28
5. Simoniello, M.F.; Gigena, F.; Poletta, G.; Loteste, A.; Kleinsorge, E.C.; Campana, M.; Scagnetti, J.A. y Parma y M.J. 2009. Alkaline Comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. **83**:155-158.
6. Jin, Y.; Zheng, S.; Pu, Y.; Shu, L.; Sun L.; Liu, W. y Fu, Z. 2011. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere. **82**: 398-404
7. Parma, M.J.; Loteste, A.; Campana, M y Bacchetta, C. 2007. Changes of hematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of

- cypermethrin. *Journal of Environmental Biology*. **28**: 147-149.
- 8.** Dogan, D.; Can, C.; Kocyigit, A.; Dikilitas, M.; Taskin, A. y Bilinc, H. 2011. Dimethoate-induced oxidative stress and DNA damage in *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*. **84**: 39–46.
- 9.** CASAFE, 2008. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes Argentina. La importancia del control de plagas en la agricultura: insecticidas, fungicidas, herbicidas. Cap 8: 374. Disponible en: <http://www.casafe.org/pdf/CAP%2008.pdf> [Consulta abril 2012]
- 10.** Peruzzo, P.J.; Porta, A.A. y Ronco, A.E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*. **156**: 61-66.
- 11.** Zapata-Pérez, O. 2002. CYP1A en tilapia *Oreochromis niloticus*. Caracterización y regulación por xenobióticos. Tesis de Doctorado. Departamento de Farmacología y Toxicología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional: 118.
- 12.** Valavanidis, A.; Vlahogianni, T.; Dassenakis, M. y Scoullou, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **64**: 178–189.
- 13.** Oruc, E.O. y Usta, D. 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **23**: 48-55.
- 14.** Franco, R.; Sánchez-Olea, R.; Reyes-Reyes, E. y Panayiotidis, M.I. 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation Research*. **674**: 3-22.
- 15.** Limón-Pacheco, J. y Gonsebatt, M.E. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*. **674**: 137-147.
- 16.** Ballesteros, M.L.; Wunderlin, D.A. y Bistoni, M.A. 2009. Oxidative stress responses indifferent organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **72**: 199–205.
- 17.** Rodríguez Perón, J.M.; Menéndez López, J.R. y Trujillo López, Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*. **30**, 1: 36-44.
- 18.** Schirmer, K. 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology*. **224**, 3: 163-183.
- 19.** Koppe Grisolia, C. y Torres Cordeiro, C.M. 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genetics and Molecular Biology*. **23**, 1: 235-239.
- 20.** Rossi, L.; Cordiviola, E. y Parma, M.J. 2007. Fishes. In Iriondo, M.H.; Paggi, J.C.; Parma, M.J. (Eds.) *The middle Paraná River. Limnology of a subtropical wetland*. Berlin: Springer Verlag: 305–321.
- 21.** Carvalho, C.S. y Fernandes, M.N. 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **151**: 437–442.
- 22.** Cazenave, J.; Bacchetta, C.; Parma, M.J.; Scarabotti, P. y Wunderlin, D. 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution*. **157**: 3025-3033.
- 23.** Bacchetta, C.; Cazenave, J. y Parma M.J. 2011. Responses of Biochemical Markers in the Fish *Prochilodus lineatus* Exposed to a Com-

- mercial Formulation of Endosulfan. *Water Air Soil Pollut.* **216**:39–49
- 24.** Weatherley, A.H. y Gill, H.S. 1987. The biology of fish growth. Academic Press, London (UK): 443.
- 25.** Sabatini, S.E.; Rocchetta, I.; Nahabedian, D.E.; Luquet, C.M.; Eppis, M.R.; Bianchi L. y Ríos de Molina M.C. 2011. Oxidative stress and histological alterations produced by dietary copper in the fresh water bivalve *Diplodon chilensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology and Pharmacology.* **154**, 4: 391-398.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**: 121–126.
- 26.** Ellman, C.L. 1959. Tissue sulphhydryl group. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **82**: 70-77.
- 27.** Beuge, J.A y Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology.* **52**: 302-310.
- 28.** Demoute, J.P. 1989. A brief review of environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pesticide Science.* **27**: 375-385
- 29.** Ansari, A.; Rahman, S.; Kaur, M.; Anjum, S. y Raisuddin, S. 2011. In vivo cytogenetic oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **74**: 150-156.
- 30.** Das, B.K. y Mukherjee, S.C. 2003. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* **134**: 109–121
- 31.** Tiwari, S.; Tiwari, R.; Singh, A. 2012. Impact of Cypermethrin on Fingerlings of Common Edible Carp (*Labeo rohita*). *The ScientificWorld Journal.* DOI 10.1100/2012/291395
- 32.** Vani, T.; Saharan, N.; Roy, S.D.; Ranjan, R.; Pal, A.K.; Siddaiah G.M.; Kumar, R. 2012. Alteration in haematological and biochemical parameters of *Catla catla* exposed to sub-lethal concentration of cypermethrin. *Fish Physiol Biochem* DOI 10.1007/s10695-012-9650-0
- 33.** Paulino, M.G.; Souza, N.E.S. y Fernandes, M.N. 2012. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **80**: 6–13.
- 34.** Ferrari, A.; Venturino, A. y Pechén, A. 2007. Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **88**: 134–142
- 35.** Jin, Y.X.; Zhang, X.X.; Shu, L.J.; Chen, L.F.; Sun, L.W.; Qian, H.F.; Liu, W.P.; Fu, Z.W.. 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* **78**: 846–852.
- 36.** Banerjee, B.D.; Seth, V.; Bhattacharya, A.; Pasha, S.T. y Chakraborty A.K. (1999). Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters.* **107**: 33-47.
- 37.** Halliwell, B. (2002). Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine.* **32**, 10: 968–974.