

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



**Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias  
Biológicas**



**TOXICIDAD Y EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL  
INSECTICIDA ENDOSULFÁN EN PECES  
NEOTROPICALES**

**Carla Bacchetta**

**Directora de Tesis: MsC. María Julieta Parma  
Co-Directora de Tesis: Dra. Jimena Cazenave**

**Lugar de realización: Laboratorio de Ictiología  
Instituto Nacional de Limnología  
(CONICET-UNL)**

**2011**

A mi familia,  
y mis dos amores,  
Santiago y Olivia

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL), por el apoyo académico brindado durante todo el desarrollo de la presente Tesis.

Al Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL), por el apoyo institucional que fue fundamental para poder llevar a cabo todas las actividades planteadas.

A mis Directoras de Tesis, MsC. María Julieta Parma y Dra. Jimena Cazenave, por haber confiado en mí, por la paciencia, la amistad, las enseñanzas, y por infundirme su pasión por la Ciencia.

A mis compañeros de trabajo, que me ayudaron leyendo, opinando, corrigiendo, dando ánimo, y acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Especialmente agradezco a Mirta, Pablo, Elly, Fernanda, Analía, Andrea y Danilo, quienes además de apoyarme en las tareas diarias, me brindaron su incondicional amistad.

A Esteban, Ramón y Eduardo, por su incansable ayuda en las actividades de campaña.

A los organismos que me otorgaron becas y subsidiaron este trabajo: CONICET, UNL y FONCyT.

A Santiago, y a mis padres, hermano, y sobrinas que, de forma incondicional, me apoyaron y entendieron mis ausencias y mis malos momentos. A nuestro bebé, que desde hace unos meses me acompaña, y que me está enseñando la ciencia de ser mamá. A Clari, por su amistad y ayuda con las difíciles traducciones de inglés.

A todas mis amigas y amigos, por los momentos divertidos vividos durante estos cinco años, que hicieron más fácil sobrellevar el cansancio y las adversidades del trabajo diario.

Gracias a todos.

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas y símbolos</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	6
 <b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1 Introducción general</b> .....	8
<b>1.2 Endosulfán</b> .....	11
1.2.1 Estructura y propiedades químicas y físicas .....	11
1.2.2 Modos de uso y mecanismos de acción sobre los organismos blanco .....	13
1.2.3 Efectos sobre los organismos no-blanco .....	15
1.2.4 El Endosulfán en combinación con otros agroquímicos .....	16
<b>1.3 Los peces</b> .....	18
1.3.1 Los peces como bioindicadores en toxicología .....	18
1.3.2 Absorción, metabolismo y eliminación de sustancias tóxicas en peces .....	19
<b>1.4 Biomarcadores</b> .....	24
1.4.1 Índice hepato-somático.....	25
1.4.2 Hematología.....	26
1.4.3 Transaminasas y fosfatasa alcalina .....	27
1.4.4 Estrés oxidativo.....	28
1.4.5 Utilización de biomarcadores en peces expuestos a Endosulfán .....	33
<b>1.5 Objetivo general, hipótesis y objetivos específicos</b> .....	35
1.5.1 Objetivo general e hipótesis de trabajo.....	35
1.5.2 Objetivos específicos.....	35
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>2.1 Diseño experimental</b> .....	37
2.1.1 Caracterización de las especies utilizadas .....	37
2.1.2 Recolección y aclimatación de los peces .....	38
2.1.3 Condiciones experimentales.....	40
2.1.3.1 Condiciones generales .....	40
2.1.3.2 Ensayos de toxicidad aguda.....	41
2.1.3.3 Ensayos subletales.....	42
<b>2.2 Biomarcadores</b> .....	45
2.2.1 Índice hepato-somático.....	45
2.2.2 Biomarcadores hematológicos.....	45
2.2.3 Transaminasas y fosfatasa alcalina .....	47
2.2.4 Biomarcadores de estrés oxidativo.....	47
2.2.4.1 Enzimas antioxidantes.....	47
2.2.4.2 Peroxidación lipídica .....	48

<b>2.3 Análisis estadístico.....</b>	<b>48</b>
--------------------------------------	-----------

## RESULTADOS

<b>3.1 Toxicidad aguda del Endosulfán.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2 Efectos fisiológicos subletales del Endosulfán.....</b>	<b>51</b>
3.2.1 <i>Prochilodus lineatus</i> .....	51
3.2.2 <i>Cichlasoma dimerus</i> .....	54
<b>3.3 Efectos fisiológicos subletales del Endosulfán en <i>Piaractus mesopotamicus</i>, de modo individual y en combinación con <math>\lambda</math>-cialotrina .....</b>	<b>57</b>
3.3.1 Índice hepato-somático.....	57
3.3.2 Biomarcadores hematológicos.....	58
3.3.3 Transaminasas y fosfatasa alcalina .....	59
3.3.4 Biomarcadores de estrés oxidativo.....	60
3.3.4.1 Branquias .....	60
3.3.4.2 Intestino .....	61
3.3.4.3 Hígado.....	62
3.3.4.4 Riñón .....	63
3.3.4.5 Cerebro.....	64
3.3.4.6 Músculo.....	65

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

<b>4.1 Toxicidad aguda del Endosulfán.....</b>	<b>66</b>
<b>4.2 Efectos fisiológicos subletales del Endosulfán. Experimentos con <i>Prochilodus lineatus</i> y <i>Cichlasoma dimerus</i> .....</b>	<b>69</b>
4.2.1 Índice hepato-somático.....	69
4.2.2 Hematología.....	70
4.2.3 Transaminasas y fosfatasa alcalina .....	73
4.2.4 Estrés oxidativo.....	74
<b>4.3 Efectos fisiológicos subletales del Endosulfán en <i>Piaractus mesopotamicus</i>, de modo individual y en combinación con <math>\lambda</math>-cialotrina .....</b>	<b>76</b>
4.3.1 Índice hepato-somático.....	76
4.3.2 Hematología.....	77
4.3.3 Transaminasas y fosfatasa alcalina .....	78
4.3.4 Estrés oxidativo.....	79
4.3.4.1 Branquias .....	79
4.3.4.2 Intestino .....	80
4.3.4.3 Hígado.....	81
4.3.4.4 Riñón .....	82
4.3.4.5 Cerebro.....	83
4.3.4.6 Músculo.....	84
<b>4.4 Conclusiones.....</b>	<b>86</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>88</b>

**ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

**ALT:** alanino aminotransferasa

**AST:** aspartato aminotransferasa

**Ba:** basófilos

**CAT:** catalasa

**CDL:** conteo diferencial de leucocitos

**CGB:** conteo de glóbulos blancos

**CGR:** conteo de glóbulos rojos

**CHCM:** concentración de hemoglobina corpuscular media

**CL<sub>50</sub>:** concentración letal media

**ED:** Endosulfán

**ENS:** Endosulfán sulfato

**Eo:** eosinófilos

**FAL:** fosfatasa alcalina

**FC:** factor de condición

**GABA:** ácido gamma-aminobutírico

**GL:** glucosa

**GPx:** glutatión peroxidasa

**GR:** glutatión reductasa

**GSH:** glutatión

**GSSG:** GSH en su estado oxidado

**GST:** glutatión S-transferasa

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

**Hb:** contenido de hemoglobina

**HCM:** hemoglobina corpuscular media

**Ht:** hematocrito

**IHS:** índice hepato-somático

**K<sub>ow</sub>:** coeficiente de partición octanol-agua

**LE:** longitud estándar

**Li:** linfocitos

**LOOH:** peróxido lipídico

**LPO:** peroxidación lipídica

**LT:** longitud total

**Mo:** monocitos

**NADP<sup>+</sup>:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su estado oxidado

**NADPH<sup>+</sup>:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su estado reducido

**Ne:** neutrófilos

**O<sub>2</sub><sup>-·</sup>:** radical anión superóxido

**O<sub>2</sub>:** oxígeno

**·OH:** radical hidroxilo

**Pt:** peso total

**PT:** proteínas totales

**PUFAs:** ácidos grasos poliinsaturados

**R·:** radical lipídico

**ROH:** alcohol

**ROO·:** radical lipídico peroxilo

**ROOH:** hidroperóxidos

**ROS:** especies reactivas del oxígeno

**SDA:** sistema de defensa antioxidante

**SOD:** superóxido dismutasa

**TBA:** ácido tiobarbitúrico

**Tr:** trombocitos

**VCM:** volumen corpuscular medio



## RESUMEN

El Endosulfán (ED) es un insecticida organoclorado utilizado ampliamente para el control de plagas en cultivos de soja en Argentina. Comúnmente, durante las prácticas agrícolas este pesticida se utiliza en combinación con otros insecticidas, como los piretroides. El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue evaluar la toxicidad aguda de una formulación comercial del insecticida ED para tres especies ícticas neotropicales (*Prochilodus lineatus*, *Cichlasoma dimerus* y *Piaractus mesopotamicus*), y detectar cambios subletales en marcadores de estrés en peces expuestos a ED en forma individual, y en una mezcla con el insecticida piretroide  $\lambda$ -cialotrina.

El valor de las  $CL_{50-96h}$  del ED para *P. mesopotamicus*, *P. lineatus* y *C. dimerus* fue 3,6, 3,7, 17,7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Los resultados mostraron que concentraciones subletales de ED produjeron cambios en los biomarcadores hematológicos, enzimáticos y de estrés oxidativo en diferentes órganos de *P. lineatus* y *C. dimerus*. Las concentraciones más altas de ED alteraron el contenido de hemoglobina (Hb), y aumentaron significativamente el conteo de glóbulos blancos (CGB). El conteo diferencial de leucocitos (CDL) también resultó alterado, aunque los cambios observados fueron diferentes en ambas especies. En *P. lineatus* aumentaron el porcentaje de trombocitos (Tr) y monocitos (Mo), y disminuyeron los linfocitos (Li) y neutrófilos (Ne), mientras que en *C. dimerus* sólo se observó un aumento en la proporción de Ne. Con respecto a los biomarcadores de daño tisular, se observó una disminución en la actividad de las enzimas alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en hepatopáncreas de *C. dimerus* expuestos a 6,8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En la concentración más alta de ED, se observó un aumento significativo de los niveles de peroxidación lipídica (LPO) en hígado, intestino y cerebro de *P. lineatus*, y en branquias, hepatopáncreas y cerebro de *C. dimerus*.

Por otro lado, *P. mesopotamicus* expuestos a una combinación de ED (1,1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y  $\lambda$ -cialotrina (0,7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) mostraron un aumento significativo del índice hepato-somático

(IHS), que no se observó en los expuestos a los pesticidas de modo individual. Por otro lado, el ED produjo cambios significativos en los peces expuestos, en algunas variables hematológicas de la serie roja (disminución del CGR y Hb) y el CDL, debido a una disminución del porcentaje de Ne en los peces expuestos. El piretroide  $\lambda$ -cialotrina también produjo cambios, que consistieron en un aumento de la glucosa (GL) y disminución de las proteínas totales (PT). La mezcla de ambos pesticidas produjo un aumento del CGB, así como también una marcada alteración de los componentes leucocitarios, representada principalmente por una disminución en el porcentaje de Li. Los cambios en las transaminasas consistieron en un incremento de su actividad en el riñón de los peces expuestos a ED y  $\lambda$ -cialotrina de modo individual, y una disminución en el hígado de los expuestos a la mezcla de ambos pesticidas. La respuesta antioxidante y el daño oxidativo en *P. mesopotamicus*, variaron según el tratamiento y órgano analizado. En general, los peces expuestos a ED y  $\lambda$ -cialotrina de modo individual mostraron alteraciones en la actividad de las enzimas antioxidantes en todos los órganos, sin registrarse cambios en los niveles de LPO. Por otro lado, la mezcla de ambos pesticidas produjo, una inducción enzimática en todos los órganos, acompañada por un aumento significativo en los niveles de LPO en hígado, riñón y cerebro de *P. mesopotamicus*.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral mostraron que la exposición a concentraciones subletales de ED de modo individual y en mezcla con otro insecticida, produjo cambios hematológicos sobre todo relacionados al sistema inmune, alteración en enzimas metabólicas y antioxidantes, e inducción de daño oxidativo en órganos vitales de las especies ícticas neotropicales *P. lineatus*, *C. dimerus* y *P. mesopotamicus*.

### ABSTRACT

The organochlorine Endosulfan (ED) is one of the compounds used most extensively for pest-control in Argentinean crops. During agricultural practices, this pesticide is commonly used in combination with other insecticides such as pyrethroids. This Doctoral Thesis was aimed at evaluating acute toxicity of a ED commercial formulation for three neotropical fish species (*Prochilodus lineatus*, *Cichlasoma dimerus*, and *Piaractus mesopotamicus*); and detecting sublethal changes of stress markers in fish exposed to ED alone, and combined with the pyrethroid  $\lambda$ -cyalothrin.

The ED LC<sub>50</sub>-96h values for *P. lineatus*, *C. dimerus* and *P. mesopotamicus* were 3.6, 3.7, 17.7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. Results showed that ED sublethal concentrations yielded changes in hematological, enzymatic and oxidative stress biomarkers in different tissues of *P. lineatus* and *C. dimerus*. The highest ED concentrations altered hemoglobin content (Hb), and increased significantly the white blood cells count (WBC). Differential leukocytes count (DLC) was also affected, though changes differed in both species. In *P. lineatus*, while the thrombocytes (Tr) and monocytes (Mo) proportion increased; the lymphocytes (Li) and neutrophils (Ne) decreased. However, in *C. dimerus* an increase was only observed in the Ne proportion. As regards tissue damage biomarkers, a decrease was recorded in the alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) enzyme activity in the *C. dimerus* hepatopancreas exposed to 6.8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . At the highest ED concentration, a significant increase of lipid peroxidation levels (LPO) in *P. lineatus* liver, intestine and brain; and in *C. dimerus* gills, hepatopancreas and brain was observed.

On the other hand, *P. mesopotamicus* exposed to a combination of ED (1.1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and  $\lambda$ -cyalothrin (0.7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) showed a higher liver-somatic index (LSI), which was not observed in those exposed to individual pesticide treatments. Besides, ED affected significantly some hematological variables of the red blood cells (RBC and Hb reduction); and of the DLC, due to a decrease in the Ne proportion of exposed fish. The  $\lambda$ -cyalothrin

pyrethroid also produced changes, which consisted of a glucose (GL) increase and a total protein (TP) decrease. The mixture of pesticides yielded higher WBC, and an outstanding alteration of leucocytes compounds, which was reflected mainly by a decrease in Li proportion. Changes in transaminases involved an activity rise in kidney of fish exposed to individual ED and  $\lambda$ -cyalothrin treatments, and a reduction in the liver of those exposed to the mixture of both pesticides.

The antioxidant response and oxidative damage in *P. mesopotamicus*, varied according to the treatment and tissue analyzed. In general, fish exposed to individual ED and  $\lambda$ -cyalothrin treatments showed alterations in the activity of antioxidant enzymes in all tissues, but changes in LPO levels were not registered. Moreover, the mixture of both pesticides, produced an enzyme induction in all organs, accompanied by a significant increase in the liver, kidney and brain LPO levels of *P. mesopotamicus*.

The results obtained in the present Doctoral Thesis showed that exposure to sublethal ED concentrations, used individually and in combination with another insecticide, produced hematological changes which are primarily related to the immune system, alteration in metabolic and antioxidants enzymes, and induction of oxidative damage in vital organs of the neotropical fish species *P. lineatus*, *C. dimerus* and *P. mesopotamicus*.



## 1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

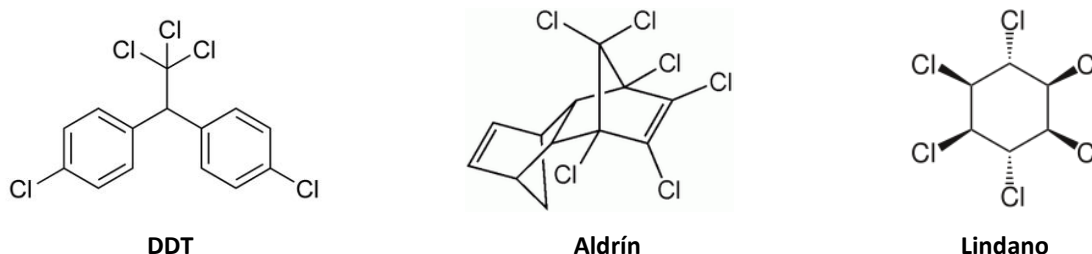
Organismos, poblaciones y ecosistemas están naturalmente influenciados por un gran número de factores bióticos y abióticos, como las fluctuaciones del clima y recursos alimentarios, relación predador-presa, competición inter-específica, y ocurrencia de parásitos y enfermedades, entre otros. La habilidad de reaccionar ante estos estresores naturales es una característica importante de los sistemas vivos. El estrés es la locomotora de la evolución, y los organismos están obligados a ajustarse a las condiciones ambientales cambiantes. En los últimos tiempos, estos cambios han alcanzado una nueva dimensión en términos de calidad y cantidad. A través de la actividad humana, el ambiente ha sido invadido por sustancias totalmente nuevas sintetizadas por el hombre, o sustancias potencialmente peligrosas liberadas en cantidades impensadas (ej. metales pesados). Estos nuevos estresores (denominados factores antropogénicos) comúnmente tienen múltiples efectos sobre los organismos, lo que provoca que la capacidad de los sistemas vivos de ajustarse a estos cambios se vea excedida (Markert y col., 2003).

En este contexto, los sistemas acuáticos son altamente vulnerables debido a que son receptores de gran cantidad de sustancias químicas provenientes de los sistemas terrestres circundantes, deposición aérea, y descargas directas accidentales e intencionales (Ferrari, 2006). El uso de tratamientos de protección contra plagas en cultivos representa uno de los problemas que afectan la integridad de los ecosistemas acuáticos. Las sustancias utilizadas para este fin, comúnmente denominadas *pesticidas*, alcanzan los cuerpos de agua como consecuencia de las actividades agrícolas, a través de fumigaciones aéreas incontroladas, deposición o arrastre por la lluvia desde la atmósfera y escorrentía superficial del suelo, y filtraciones hacia las aguas subterráneas (Elezović y col., 1994). Bajo la denominación de *pesticidas*, se engloban los productos químicos

empleados para combatir parásitos de cultivos, ganado, animales domésticos, del hombre y su ambiente en general (Nimmo, 1985).

Dentro de los pesticidas, existen varios grupos de insecticidas con una gran diversidad de estructuras, propiedades, usos y mecanismos de acción. Pueden ser clasificados en cuatro grandes grupos: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides (Walker y col., 2001).

Los *insecticidas organoclorados* son compuestos sintéticos que tienen cierta cantidad de moléculas de cloro. Su estructura química no se parece a ningún compuesto orgánico natural, por lo que, en general, estos pesticidas se degradan muy lentamente en el ambiente. La mayoría son no polares y tienen un alto peso molecular. Consecuentemente, son altamente lipofílicos, bioacumulables y capaces de biomagnificarse en las cadenas tróficas (Newman y Unger, 2003). Su mecanismo de acción es neurotóxico, a través de la inhibición del neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA). Estos insecticidas pueden ser clasificados en tres grandes grupos: dicloro difenil tricloroetano (DDT) y compuestos relacionados, ciclodienos (ej. endosulfán, aldrín, dieldrin) y hexaclorociclohexanos (ej. lindano) (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Estructura química de los diferentes grupos de insecticidas organoclorados.

Los *insecticidas organofosforados* son ésteres orgánicos del ácido fosfórico. La mayoría son líquidos de carácter lipofílico, algo volátiles. Son, en general, menos estables que los insecticidas organoclorados y rápidamente degradados por agentes químicos o bioquímicos. Tienen una vida media relativamente baja en el ambiente y su riesgo ambiental está principalmente, pero no exclusivamente, asociado a eventos de toxicidad aguda (cortos tiempos de exposición). La mayoría son polares y solubles en agua. Estos insecticidas son neurotóxicos, por su habilidad de inhibir la enzima acetilcolinesterasa

(Walker y col., 2001). Algunos ejemplos de este tipo de compuestos son el diazinon, monocrotofos, paratión, metil paratión y malatión.

Los *insecticidas carbamatos* son derivados del ácido carbámico, y han sido desarrollados más recientemente que los organoclorados y organofosforados. Son frecuentemente sólidos, muy solubles en agua, rápidamente degradados por agentes químicos y poco persistentes. Al igual que los organofosforados, son inhibidores de la acetilcolinesterasa y su riesgo ambiental está asociado a exposiciones agudas. Algunos ejemplos de estos insecticidas son aldicarb, carbofuran y carbaril (Walker y col., 2001).

Por último, los *insecticidas piretroides* son compuestos sintéticos análogos a las piretrinas producidas naturalmente por las plantas de *Chrysanthemum* spp., con propiedades insecticidas muy conocidas. Son ésteres formados por un ácido orgánico y una base orgánica. Como están basados en productos naturales, se degradan rápidamente en el ambiente y son fácilmente metabolizados por los mamíferos. Si bien los piretroides son más estables que sus predecesores naturales, se consideran que tienen una vida media relativamente corta. Tienen una baja solubilidad en agua y son neurotóxicos (Newman y Unger, 2003; Bradbury y col., 2008). Algunos ejemplos de insecticidas piretroides sintéticos son las piretrinas, permetrinas, fenvalerato, y cialotrinas.

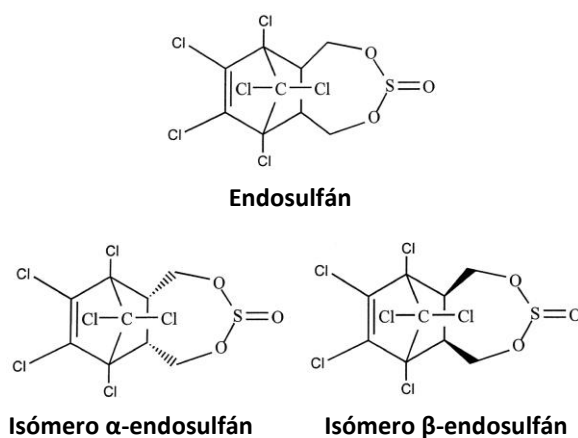


## 1.2 ENDOSULFÁN

### 1.2.1 Estructura y propiedades químicas y físicas

El *Endosulfán* (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepina-3-óxido) (ED) es un insecticida organoclorado del grupo de los ciclodienos. Es sintetizado por la reacción de Diels-Alder de hexaclorociclopentadieno con *cis*-buteno-1,4-diol y reacción subsiguiente con tionil cloruro.

Los ingredientes activos de la formulación comercial de grado técnico están compuestos por una mezcla de isómeros  $\alpha$  y  $\beta$ -endosulfán en una proporción de 02:01-07:03 (Wan y col., 2005) (Figura 1.2). El Endosulfán sulfato (ENS) es el principal producto de la degradación de ambos isómeros, es igualmente tóxico y es por sí mismo más persistente en el medio ambiente que sus compuestos de origen.



**Figura 1.2** Estructura química del Endosulfán y sus isómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ -endosulfán.

El ED puede descomponerse por fotólisis, hidrólisis y biodegradación. En la superficie de las plantas se degrada rápidamente en metabolitos, mientras que en el suelo es bastante inmóvil y altamente persistente. Los principales productos que se encuentran en el suelo son el endosulfán diol, ENS y endosulfán lactona. La vida media del ED en el suelo varía entre 120 días a varios meses (Rao y Murthy, 1980; Awasthi y col., 2000; Jayashree y Vasudevan, 2007). En el agua, tiene una vida media de 3 a 7 días (Leonard y col., 1999; ATDSR, 2000). Una vez en la columna de agua, el ED tiende a acumularse en los sedimentos, convirtiéndose en una fuente de redistribución en las aguas superficiales. Es moderadamente persistente en sistemas acuáticos y peces (Naqvi y Vaishnavi, 1993). Los productos de la descomposición en el agua son el endosulfán diol y el ENS (Figura 1.3).

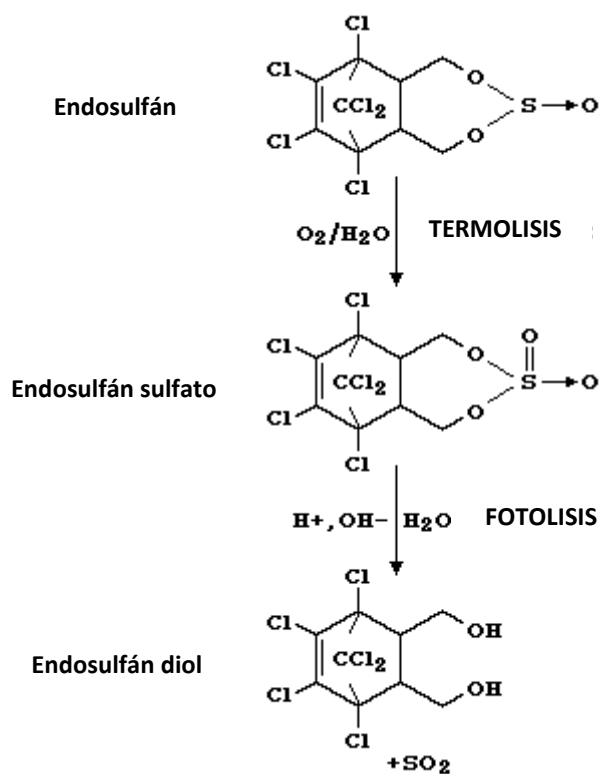


Figura 1.3 Degradación química del Endosulfán en el ambiente (IPCS, 1984).

Se ha comprobado que el ED puede escurrirse hacia las aguas subterráneas luego de las fumigaciones. Ha sido detectado en aguas subterráneas en estratos profundos del terreno, en concentraciones que van desde 0,008 a 0,053  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , hasta 20 días después de la última fumigación (Quijano, 2000). Entra al aire por volatilización desde la superficie de las plantas y desde la superficie del agua, y desde la atmósfera, puede ser transportado a grandes distancias (Weber y col., 2010). El  $\beta$ -endosulfán es más estable en el aire.

### 1.2.2 *Modos de uso y mecanismos de acción sobre los organismos blanco*

El ED es formulado como un líquido emulsionable (9-35% de principio activo), o como un polvo hidratable (1-50% de principio activo). Puede ser aplicado a los cultivos por pulverización, fumigación o inmersión. Es un insecticida y acaricida de amplio espectro que controla a los organismos blanco (principalmente insectos chupadores y masticadores de los órdenes Lepidóptera, Coleóptera, Heteróptera, Homóptera y Díptera) por contacto e ingestión del material vegetal, en cultivos de cereales, oleaginosas, hortalizas, frutales y ornamentales (Kalender y col., 2004). Además de su uso agrícola, el ED se utiliza como conservante de la madera y para controlar las plagas en casas y jardines (EFSA, 2005). Por último, históricamente se usó en países africanos para el control de la mosca *tse-tse*, vector biológico del parásito que causa la tripanosomiasis en el hombre.

El mecanismo neurotóxico del ED en insectos consiste en la inhibición del transporte mediado por el cloro en el receptor GABA. Normalmente, el canal GABA para el cloro se abre luego de la unión con el neurotransmisor GABA, causando un incremento del flujo de cloro, hipo-polarización neuronal, y depresión de la excitabilidad. El bloqueo del receptor GABA elimina la modulación normal del cloro en la actividad neuronal, causando síntomas como la hiperexcitabilidad (Bradbury y col., 2008).

El ED ha sido clasificado por la *United States Environmental Protection Agency* (US EPA, 2002) como altamente tóxico para peces marinos y de agua dulce. Sin embargo, su utilización en Argentina ha sido amplia y continua en las últimas décadas. Esto ha llevado a un aumento de las concentraciones ambientales a niveles superiores a los establecidos por la US EPA (2002) para la protección de la vida acuática (0,22  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Por ejemplo, se han encontrado concentraciones de ED de 0,2 a 13,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en humedales cercanos a campos de arroz, y concentraciones de 0,1 a 0,7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en ríos de montaña (Baudino y col., 2003; Silva y col., 2005). Además, Jergentz y col. (2005) reportaron valores de 318  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  en

partículas en suspensión del arroyo Horqueta (provincia de Buenos Aires), situado en la zona de producción sojera más importante de la Argentina.

Desde principios de la década de 1970 y sobre todo a mediados de la década de 1980 diversos países comenzaron a restringir primero y prohibir después el uso del ED. En julio de 2007, la Unión Europea tomó la decisión de proponer al ED para integrar la lista de Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) del Convenio de Estocolmo para su eliminación global. Hasta el año 2009, son 60 los países que han prohibido el ED, entre los que se incluyen todos los países que forman la Unión Europea y sólo Colombia y Belice como representantes de América del Sur y Central, entre otros. Su uso se ha restringido en 23 países, entre los cuales se encuentran Estados Unidos, Australia, Honduras, Panamá y Venezuela (Bejarano Gonzales y col., 2008, 2009). A pesar de que su utilización ha sido prohibida en la mayoría de los países de la Unión Europea y América del Norte, se sigue utilizando en regiones tropicales y subtropicales (EFSA, 2005).

En un contexto nacional donde legisladores intentan normalizar el uso de agrotóxicos, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) resolvió, mediante la aprobación de la Resolución N° 511/11 (en vigencia a partir de agosto de 2011), el establecimiento de los plazos de prohibición total del uso del ED y sus productos formulados. El objetivo del proyecto es acompañar la normativa internacional, por lo cual la Resolución se basó en las normativas vigentes en la Unión Europea, la US EPA, el Convenio de Estocolmo y el Convenio de Róterdam.

De esta forma, la Argentina está recorriendo un camino hacia la eliminación definitiva del insecticida ED. Se establece un plazo de 5 años a partir de la entrada en vigencia de la Resolución, para la prohibición total de uso, importación, elaboración, formulación, comercialización para el principio activo ED y sus productos formulados. El cronograma para la eliminación progresiva, es el siguiente (1) en el primer año, la reducción (50%) de la importación del producto formulado; (2) en el segundo año, la reducción (75%) de la importación de principio activo y producto formulado; (3) en el tercer año, prohibición total de la importación del principio activo; (4) En el cuarto año, prohibición total de la formulación nacional y la importación de productos formulados; por último, (5) en el quinto año, prohibición total del uso, importación, elaboración (síntesis), formulación y comercialización del ED (principios activos y productos formulados) en la República Argentina (Boletín Oficial 32207 SENASA, 5 de agosto de 2011).

### 1.2.3 Efectos sobre los organismos no-blanco

Los pesticidas son tóxicos por naturaleza, son *biocidas* diseñados para matar, reducir o repeler insectos, hierbas, roedores, hongos y otros organismos que pueden ser una amenaza para la economía y la salud pública. Sin embargo, su modo de acción sobre los organismos blanco es a través de la inactivación o alteración de enzimas que pueden ser idénticas o muy similares a los sistemas o enzimas en humanos y organismos no-blancos, por lo que representan un riesgo real para la salud humana y el ambiente.

Ciertas bacterias que habitan el suelo son capaces de metabolizar y detoxificar grandes cantidades de ED, sin sufrir efectos adversos sobre su estructura celular (Shivaramaiah y Kennedy, 2006). Sin embargo, no ocurre lo mismo con las bacterias acuáticas. De Lorenzo y col. (1999) estudiaron los efectos del ED sobre una cadena trófica microbiana estuarina, y registraron una disminución de la abundancia total de bacterias, principalmente debido a la disminución de la comunidad bacteriana fototrófica.

Los crustáceos son particularmente sensibles al ED. Se conoce que este insecticida es altamente tóxico para muchas especies de langostas y camarones, con concentraciones letales medias ( $CL_{50}$ ) cercanas a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Bhavan y col., 1997; Wirth y col., 2001; Montagna y Collins, 2007). La toxicidad subletal del ED también fue estudiada en micro y macrocrustáceos, registrándose cambios en el metabolismo energético y consumo de oxígeno, alteraciones en enzimas antioxidantes, cambios histopatológicos y disrupción endocrina (Bhavan y Geraldine, 2000; Montagna y Collins, 2008; Dorts y col., 2009; Palma y col., 2009; Suryavanshi y col., 2009).

Otro grupo de organismos acuático-terrestres que pueden ser afectados por la presencia de ED en cuerpos de agua son los anfibios, destacándose los trabajos que reportan efectos teratogénicos en embriones, cambios histopatológicos y efectos genotóxicos (Lajmanovich y col., 2005; Bernabò y col., 2008; Kang y col., 2008).

Los estudios realizados sobre la toxicidad del ED en diferentes especies de peces han demostrado que los valores de la concentración letal media a las 96 horas ( $CL_{50-96h}$ ) pueden variar entre  $0,4$  y  $12,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Vittozzi y De Angelis, 1991; Jonsson y Toledo, 1993; Capkin y col., 2006; Magesh y Kumaraguru, 2006; Pandey y col., 2006; Ballesteros y col., 2007; Hii y col., 2007; Téllez-Bañuelos y col., 2009). Por otro lado, se conoce que la exposición a concentraciones subletales de ED en agua y a través de la dieta, puede inducir una amplia gama de efectos en peces, como neurotoxicidad y genotoxicidad (Dutta y Arends, 2003; Sharma y col., 2007; Ballesteros y col., 2009a), hepatotoxicidad (Mishra y

Shukla, 1994; Glover y col., 2007; Krøvel y col., 2010), y cambios metabólicos e histopatológicos (Nowak, 1996; Mishra y Shukla, 1994; Willey y Krone, 2001; Tripathi y Verma, 2004). Alteraciones en los sistemas inmunológico y endocrino, y cambios en el comportamiento también se han reportado en peces expuestos a ED (Carlson y col., 1998; Bisson y Hontela, 2002; Coimbra y col., 2005; Harford y col., 2005; Ballesteros y col., 2009a; Stanley y col., 2009; Thangavel y col., 2010). En estudios realizados con huevos expuestos, se registró un retraso en la eclosión de larvas y una disminución en el número y crecimiento de los alevinos (Gormley y Teather, 2003).

#### **1.2.4 El Endosulfán en combinación con otros agroquímicos**

El ED se utiliza, generalmente, en combinación con otros tipos de pesticidas, con el fin de aumentar al máximo el rendimiento del tratamiento contra plagas en cultivos. Puede ser combinado con otros insecticidas, como los piretroides, y con herbicidas y fungicidas. Así, los escenarios reales de exposición involucran la mezcla de pesticidas, de los cuales algunos persisten en el ambiente, algunos son aplicados repetidamente y otros como combinaciones para incrementar la eficacia y reducir costos económicos.

Se conoce que la mezcla de sustancias químicas tiene ventajas sobre los químicos utilizados de forma individual. Esto ha llevado, desde el siglo XX, a la evolución de la ciencia de la farmacología y, más recientemente, al desarrollo de mezclas de químicos para el uso en agricultura y control de plagas (Marking, 1985). Las ventajas reportadas de la utilización de mezclas químicas incluyen el (1) incremento de la efectividad contra organismos blancos, (2) en algunos casos, el incremento de la seguridad para organismos no-blanco, (3) la aplicación de menores cantidades de material sin una reducción en la efectividad, y (4) la reducción de costos económicos. Sin embargo, a pesar de dichas ventajas, muchas mezclas químicas representan un riesgo mayor para los organismos no-blanco y para el ambiente.

Una *mezcla* es una combinación de dos o más componentes/compuestos químicos, a la cual un organismo puede estar expuesto, de forma simultánea o secuencial (McCarty y Bogert, 2006). La mezcla de pesticidas podría causar efectos en los organismos incluso si las sustancias individuales se encuentran en una concentración igual o menor a la concentración en la cual no se observan efectos (NOEC) (Silva y col., 2002; Faust y col., 2003; Chèvre y col., 2008; Evrard y col., 2010). A su vez, pueden producir respuestas

diferentes y/o interactuar entre sí produciendo efectos tóxicos aditivos, sinérgicos o antagónicos (Barata y col., 2006). La toxicidad de este tipo de mezclas es un tema complejo, siendo escasa la información existente sobre su efecto en peces (Tsuda y col., 1995a, b; Oruç y col., 2004; Thangavel y col., 2005; Wang y col., 2009; Evrard y col., 2010; Biales y col., 2011; Tilton y col., 2011), y aún menor el número de estudios que involucran al ED en mezclas con otros compuestos tóxicos (Verma y col., 1980; Arnold y col., 1995).

## 1.3 LOS PECES

### 1.3.1 *Los peces como bioindicadores en toxicología*

Los peces son organismos sensibles al impacto de una mezcla compleja de químicos en un sistema acuático específico, integrando la carga ambiental a través del tiempo y el espacio. Los contaminantes generalmente causan un amplio espectro de efectos y respuestas en los organismos, desde el nivel sub-celular y bioquímico hasta el comportamiento, crecimiento y reproducción. Durante la exposición a niveles tóxicos bajos y limitados, los peces responden a nivel sub-celular, pero comúnmente pueden compensar el efecto tóxico, y su salud no se ve seriamente afectada. La exposición prolongada y/o severa, sin embargo, puede inducir una secuencia de cambios estructurales y funcionales que deterioran las funciones vitales. El estrés permanente, aunque moderado, interfiere con los procesos metabólicos y hormonales, llevando a un incremento en el metabolismo, inmunosupresión, disturbios en la osmoregulación, daños tisulares y fracaso de la reproducción (Chovanec y col., 2003). Esto finalmente trae como consecuencia la disminución de las poblaciones de peces, así como también cambios en la estructura comunitaria, por ejemplo a través de la baja en la abundancia de ciertas especies y la diversidad de la comunidad. Estos cambios poseen una alta relevancia ecológica e involucran importantes alteraciones en el ecosistema acuático.

El estudio de los mecanismos de toxicidad en peces involucra dos aspectos, su utilización como organismos blanco y como modelos. Claramente, los peces son blanco de los contaminantes ambientales, por lo que son sujetos a investigaciones para conocer los mecanismos involucrados en la adaptación fisiológica y evolutiva a la exposición a



sustancias químicas. Los peces también son ampliamente utilizados como modelos animales en investigación toxicológica, con el objetivo de realizar extrapolaciones para responder preguntas relacionadas a los efectos potenciales de la exposición química sobre la salud humana (Hahn y Hestermann, 2008). Varias características de los peces los convierten en valorables modelos en toxicología (Ballatori y Villalobos, 2002). Por ser vertebrados, los peces tienen una relación evolutiva estrecha con los humanos, compartiendo genes y mecanismos bioquímicos, que se han vuelto más evidentes como resultado de los análisis genómicos actuales.

### ***1.3.2 Absorción, metabolismo y eliminación de sustancias tóxicas en peces***

Los peces están íntimamente ligados a su hábitat. Respiran, osmoregulan, y obtienen su carácter térmico en relación al agua circundante. Además, el agua les sirve como un conducto para muchos procesos vitales. Las adaptaciones estructurales y fisiológicas que permiten a los peces prosperar en un ambiente acuático también se relacionan fuertemente con las interacciones con los xenobióticos. Los peces entran en contacto con los contaminantes a través del contacto directo con el agua o sedimento, y por ingestión de otros organismos ya contaminados.

La mayoría de las sustancias tóxicas existen en diferentes formas (especies químicas) como resultado de reacciones químicas, bioquímicas y biológicas. Su toxicidad no sólo depende de la concentración en el ambiente, sino también de cómo el pez puede absorber estas especies químicas, y cómo efectúa su distribución a todo el organismo. La biodisponibilidad se define como la facilidad relativa con la cual una sustancia química es transferida desde el ambiente a un sitio específico en un organismo de interés (Spacie y Hamelink, 1985).

Los xenobióticos son absorbidos por los peces a través de las branquias, piel y tracto gastrointestinal. El camino que un químico toma cuando es absorbido por una de estas superficies puede ser en general descripto como: (1) transporte a través del epitelio a la sangre, (2) incorporación a la sangre, incluyendo unión a proteínas del plasma, (3) transporte a través de la circulación sistémica o disolución libre, y (4) transporte desde la sangre a los diferentes tejidos (Kleinow y col., 2008).

Las branquias de los peces tienen una variedad de funciones fisiológicas, incluyendo intercambio gaseoso, osmoregulación, excreción de nitrógeno, y control del

balance ácido-base (Wendelaar Bonga y Lock, 2008). A causa de esto, las branquias poseen las siguientes características que son importantes para el intercambio de tóxicos entre el pez y el ambiente: (a) procesan grandes volúmenes de agua y son irrigadas por un alto flujo sanguíneo; (b) tienen una gran superficie-área y una pequeña distancia de difusión entre el agua y la sangre; (c) tienen un flujo contra-corriente entre la sangre y el agua que aumenta la eficiencia de intercambio; (d) poseen sistemas bioquímicos que regulan dicho intercambio; y (e) el mucus y condiciones de pH de las branquias puede afectar la especiación química de una sustancia en la superficie de la branquia y en el agua adyacente (Wright y col., 1991). La ruta de absorción de los diferentes tipos de compuestos tóxicos depende en gran parte de su coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ). Para compuestos orgánicos moderadamente hidrofóbicos ( $3 < K_{ow} < 6$ ), la fracción de esta sustancia que puede ser removida desde el agua hacia el interior de las branquias es alta, similar a la del oxígeno (McKim y col., 1985). Ya que el ED tiene un  $K_{ow} = 4,5$ , ésta puede ser una de las rutas de absorción principal en los peces.

Otras rutas de absorción menos importantes son el intestino y la piel. El tracto gastrointestinal de los peces tiene funciones de digestión, absorción de nutrientes, excreción, y como barrera que los separa del ambiente externo. Eventos físicos, químicos y bioquímicos dentro del lumen intestinal, que también involucran a los eritrocitos y el sistema vascular, determinan la forma química e integridad del compuesto y su biodisponibilidad para la absorción hacia el epitelio intestinal. Por otro lado, la piel de los peces es una barrera física que separa los ambientes interno y externo. Así, mantiene la integridad iónica y osmótica del ambiente interno, provee protección de la abrasión y enfermedades, y participa en el intercambio de gases respiratorios. La absorción de compuestos tóxicos desde el agua a través de la piel de los peces es mucho menos importante que a través de las branquias, ya que posee menor superficie-área, una barrera de difusión más gruesa y menos permeable, y un menor transporte de agua y flujo sanguíneo (Erickson y col., 2008).

Una variedad de procesos actúan para distribuir dentro del pez los tóxicos absorbidos. Una parte de los compuestos pueden distribuirse a un sitio de acción (órgano, tejido, fluido) donde los efectos tóxicos son expresados. Algunos sitios sirven como áreas de almacenaje para el químico durante cortos o largos períodos de tiempo, mientras otros compuestos son móviles y transitan dentro y fuera del animal (Kleinow y col., 2008). Los tejidos con el mayor flujo sanguíneo en peces son el riñón, músculo rojo, ciegos pilóricos, intestino, bazo e hígado.

Luego de la entrada de un químico ambiental a un organismo, las reacciones químicas dentro del cuerpo alteran la estructura de la sustancia. Este proceso de conversión metabólica se conoce como *biotransformación*, y ocurre principalmente en tejidos y órganos como el intestino, riñón, e hígado (Landis y Yu, 1999). Puede llevar a facilitar la excreción, o a aumentar la detoxificación, redistribución, o activación del compuesto tóxico (Newman y Unger, 2003).

El proceso de biotransformación de compuestos orgánicos consta de dos fases, y es catalizado principalmente por reacciones enzimáticas que alteran la estructura química de compuestos lipofílicos no polares y los convierten en metabolitos polares y solubles en agua, llevando a la detoxificación y más fácil eliminación del compuesto tóxico. Desafortunadamente, esta alteración frecuentemente crea sustancias intermediarias reactivas (*bioactivación*), que pueden ser biológicamente más peligrosas que el compuesto original. La *fase I* del proceso agrega o expone átomos polares al compuesto xeno- o endobiótico, a través de reacciones de *oxidación*, *reducción* e *hidrólisis*, y es catalizada principalmente por el sistema enzimático monooxigenasas del citocromo P450. Cuando la polaridad del compuesto ha sido aumentada a través de reacciones de la fase I, la *fase II* generalmente tiende a aumentar aún más la polaridad a través de reacciones de *conjugación* de los productos de la fase I con una molécula polar endógena, llevadas a cabo principalmente por la enzima *glutación S-transferasa* (GST) (Schlenk y col., 2008b). Alternativamente, las reacciones de la fase II pueden proteger contra la bioactivación enmascarando grupos funcionales (ej. aminas) expuestos a sustancias reactivas. En conclusión, la biotransformación del compuesto original puede modificar su toxicidad, aumentándola a través de la bioactivación de derivados más reactivos, o reduciéndola a través de la inactivación o aumento de polaridad para facilitar su excreción (Figura 1.4).

La *eliminación* a través de las branquias puede ser rápida para xenobióticos hidrofílicos, y más lenta para los lipofílicos. Las moléculas grandes y no polares asociadas con metabolitos pueden ser eliminadas desde el hígado, a través de la bilis, y excretadas por las heces (Barron y col., 1990). Durante el pasaje por hígado, el contaminante entra a los sinusoides hepáticos, donde puede ser absorbido por las células del parénquima y sufrir procesos de biotransformación. El compuesto y sus metabolitos retornan a los sinusoides o se incorporan a la bilis. Aquellos incorporados a la bilis pueden, al pasar por el intestino, ser reabsorbidos repitiendo el pasaje por el hígado. Esta circulación entero-hepática puede incrementar la persistencia de algunos compuestos en el cuerpo e incrementar el daño en el hígado. Por último, la eliminación renal tiende a ser importante

para compuestos de bajo peso molecular. Involucra tres procesos: filtración glomerular, secreción tubular activa, y reabsorción pasiva (Newman y Unger, 2003).

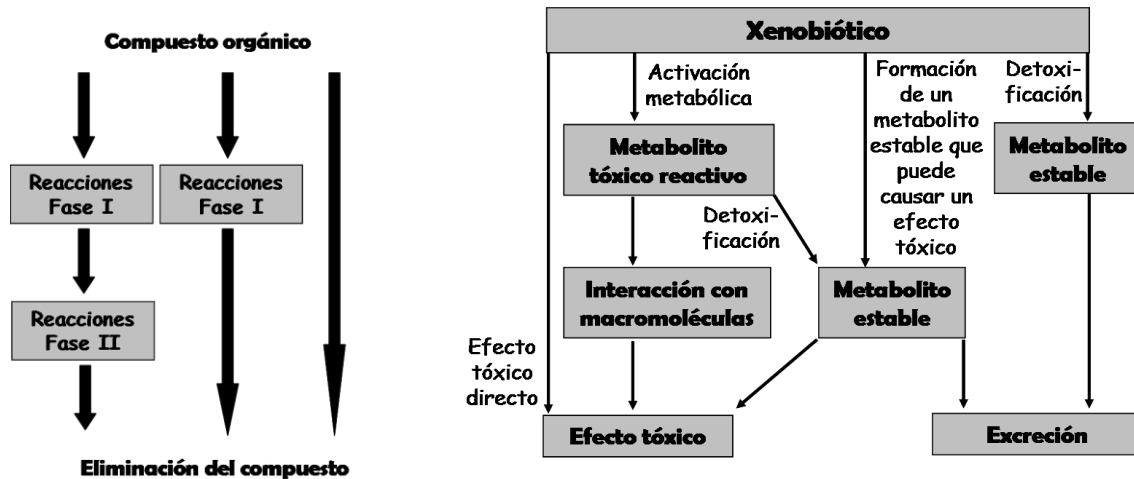


Figura 1.4 Mecanismos de biotransformación y detoxificación en peces (van der Oost y col., 2003).

El hígado en los peces es el mayor sitio para homeostasis de aminoácidos, regulación de glucosa, procesamiento de lípidos, metabolismo hormonal, y producción de numerosos constituyentes del plasma (Hinton y col., 2001). También juega un rol importante en la excreción de xenobióticos. Ésta depende de la absorción del químico por los hepatocitos, la formación de secreción biliar, y el transporte de estos compuestos hacia la bilis. En este proceso, la biotransformación hepática e intestinal juega un rol importante debido a la producción de metabolitos aniónicos polares que pueden ser manipulados por los mecanismos de transporte hepático. Los procesos de biotransformación pueden incrementar substancialmente la eliminación biliar de los xenobióticos incrementando su solubilidad y creando compuestos conjugados que son sustratos de sistemas de transporte activo. Una vez secretado dentro del intestino, los conjugados biliares pueden ser sometidos a hidrólisis, liberando el metabolito por reabsorción y recirculación entero-hepática (Schultz y col., 2001). Este proceso modula la cantidad de metabolito eliminado por las heces.

Los riñones en los peces tienen dos funciones principales: balance iónico y del agua, y excreción de solutos endógenos y exógenos. El primer paso para la formación de orina es la ultrafiltración del plasma a través de la red de capilares de los glomérulos. En el

lumen del túbulo, los solutos pueden ser reabsorbidos por el plasma o agregados al filtrado por secreción de químicos libres desde el plasma a través del epitelio renal. Dos atributos importantes de los solutos orgánicos que determinan la efectividad de su excreción renal son: el tamaño molecular y la unión a proteínas (Miller, 1987). Los compuestos lipofílicos, que generalmente están unidos a proteínas, tienden a permanecer en el plasma y a fluir a través de los glomérulos, y pueden ser reabsorbidos en los túbulos.

Los procesos de eliminación de xenobióticos y sus metabolitos a través de la piel son poco conocidos. Sin embargo, los factores anatómicos y fisiológicos que promueven la absorción de xenobióticos a través de este órgano, también podrían facilitar su eliminación (Kleinow y col., 2008).

#### 1.4 BIOMARCADORES

La necesidad de detectar y evaluar los efectos de bajas concentraciones de contaminantes ha llevado al desarrollo de un amplio rango de indicadores de exposición y efecto en organismos expuestos a sustancias potencialmente tóxicas (Livingstone y col., 2000; Lionetto y col., 2003). Estos indicadores son llamados *biomarcadores* y tienen la capacidad de anticipar los cambios que podrían ocurrir a mayores niveles de organización biológica, como por ejemplo población, comunidad o ecosistema (Adams, 1990). De esta forma, los biomarcadores pueden usarse de una forma predictiva, permitiendo la iniciación de estrategias de biorremediación antes de que ocurran daños ambientales con consecuencias ecológicas irreversibles. En un contexto ambiental, los biomarcadores prometen ser indicadores sensibles que demuestran que un tóxico ha ingresado en un organismo, se ha distribuido en los tejidos, y ha provocado un efecto tóxico en órganos blanco. Muchas definiciones han sido dadas para el término biomarcador, el cual generalmente es utilizado en un sentido amplio para incluir toda medida que refleja una interacción entre un sistema biológico y un peligro potencial, que puede ser químico, físico o biológico (WHO, 1993). Según el *Committee on Biological Markers of the International Research Council* (1987) los biomarcadores son medidas en fluidos corporales, células y tejidos que indican modificaciones bioquímicas o celulares debido a la presencia y magnitud de un tóxico o de un huésped. De un modo más específico, un biomarcador puede ser definido como un cambio en una respuesta biológica (desde respuestas moleculares, fisiológicas, hasta del comportamiento) que pueden estar relacionadas a la exposición o efectos tóxicos de químicos ambientales (Peakall, 1994).

Una situación de estrés causada por la exposición a una sustancia tóxica desencadena una cascada de respuestas biológicas, cada una de las cuales sirve como

biomarcador. Por encima de un cierto umbral (en concentración o tiempo de exposición) los biomarcadores se desvían de su rango normal, llevando a la manifestación de múltiples efectos a mayores niveles de organización biológica. De este modo, los biomarcadores son considerados respuestas intermediarias entre las fuentes de contaminación y la ocurrencia de efectos a niveles más altos de organización biológica (van der Oost y col., 2003). Cuando estas respuestas son activadas, el potencial de supervivencia de los organismos puede disminuir, ya que reduce su capacidad de llevar a cabo respuestas compensatorias a nuevos cambios ambientales (Depledge y Fossi, 1994). La razón más convincente de usar biomarcadores es que éstos pueden brindar información sobre los efectos biológicos de los contaminantes, y no sólo una mera cuantificación de sus niveles ambientales, pueden ser rápidamente detectados, y se manifiestan a bajas concentraciones de la sustancia tóxica (Schlenk y col., 2008a).

#### 1.4.1 *Índice hepato-somático*

Los índices de condición fisiológica han sido utilizados por muchos años en acuicultura como un método simple para monitorear cambios en la salud general de los peces. Estos índices relacionan las dimensiones físicas de un animal o uno de sus órganos internos, con su peso total. El índice morfométrico más común es el *factor de condición* (FC), expresado como peso (g)/longitud (cm); sin embargo, los índices órgano-somáticos pueden proveer información más específica, muchas veces relacionada a la función del órgano en cuestión. Estos índices que relacionan la masa de un determinado órgano a la masa corporal pueden relacionar directamente los efectos sobre el órgano blanco con la exposición al contaminante. El *índice hepato-somático* (IHS) relaciona el peso del hígado con el peso total de pez, y puede ser un biomarcador apropiado para identificar sustancias hepato-tóxicas y enfermedades hepáticas (Schlenk y col., 2008a). Por ejemplo, Slooff y col. (1983) resumen un número de estudios que soportan la hipótesis de que hay una relación causal entre el tamaño del hígado y la exposición a compuestos químicos. De modo similar, van der Oost y col. (2003) enumera una serie de estudios que reportaron un incremento o disminución significativos del IHS en peces expuestos a compuestos organoclorados, así como también en estudios de campo. Si bien no es específico, el IHS es un biomarcador de bajo costo, fácilmente cuantificable, y puede también proveer información sobre el estado de las reservas energéticas de los peces.

### 1.4.2 Hematología

La sangre es el componente más accesible de los sistemas de fluidos del cuerpo de los vertebrados, y ha sido frecuentemente utilizado para evaluar el estatus fisiológico de los organismos (Schlenk y col., 2008a) y estudiar los efectos toxicológicos en sus tejidos. Varias modalidades de transporte de xenobióticos contribuyen a su distribución a través de la circulación sanguínea. Aunque muchos compuestos son transportados por la sangre como formas libres disueltas, otros pueden ser transportados en asociación con proteínas, lipoproteínas, o componentes celulares (a través de uniones covalentes o no-covalentes) (Kleinow y col., 2008). Para medir la respuesta de los organismos a los factores estresantes del medio ambiente, los cambios en la composición sanguínea son ampliamente utilizados. Éstos se evalúan a través de la medición de biomarcadores como el hematocrito, contenido de hemoglobina, conteo de glóbulos rojos y blancos, y bioquímica del plasma (Niimi, 1990; Leatherland y col., 1998; Handy y Depledge, 1999). Si bien estos biomarcadores no son específicos, resultan herramientas útiles para indicar diferentes disturbios ambientales, como la presencia de metales pesados, pesticidas, disminución del oxígeno disuelto, etc. (Saxena y Seth, 2002; Cazenave y col., 2005; Oliveira Ribeiro y col., 2006; Parma y col., 2007).

Los biomarcadores relacionados al sistema inmune son sumamente sensibles para evaluar los efectos tóxicos de estresores químicos y físicos de importancia ambiental. Esta sensibilidad reside en las complejas interacciones que deben ocurrir para llevar a cabo la movilización de este sistema. El sistema inmune comprende una red de células capaces de una rápida proliferación y diferenciación, está regulado por una variedad de factores, e integrado con otros órganos y funciones. La disrupción de alguno de los procesos involucrados desequilibra el balance necesario para la inmunoregulación y produce una cascada de efectos secundarios indeseados, incluyendo el compromiso de la resistencia del organismo a enfermedades y patógenos ambientales (Carlson y Zelikoff, 2008). La exposición a sustancias químicas puede, entonces, interferir en etapas críticas de la respuesta inmune en peces, destruyendo, sensibilizando, o alterando la función celular (ej. a través del bloqueo de la actividad fagocítica, inducción o inhibición de la proliferación celular, interferencia en la formación de células precursoras).

Como en los mamíferos, se considera que los biomarcadores relacionados al sistema inmune en peces tienen un considerable potencial para la aplicación en biomonitoreo de sitios contaminados (Wester y col., 1994) y estudios de laboratorio

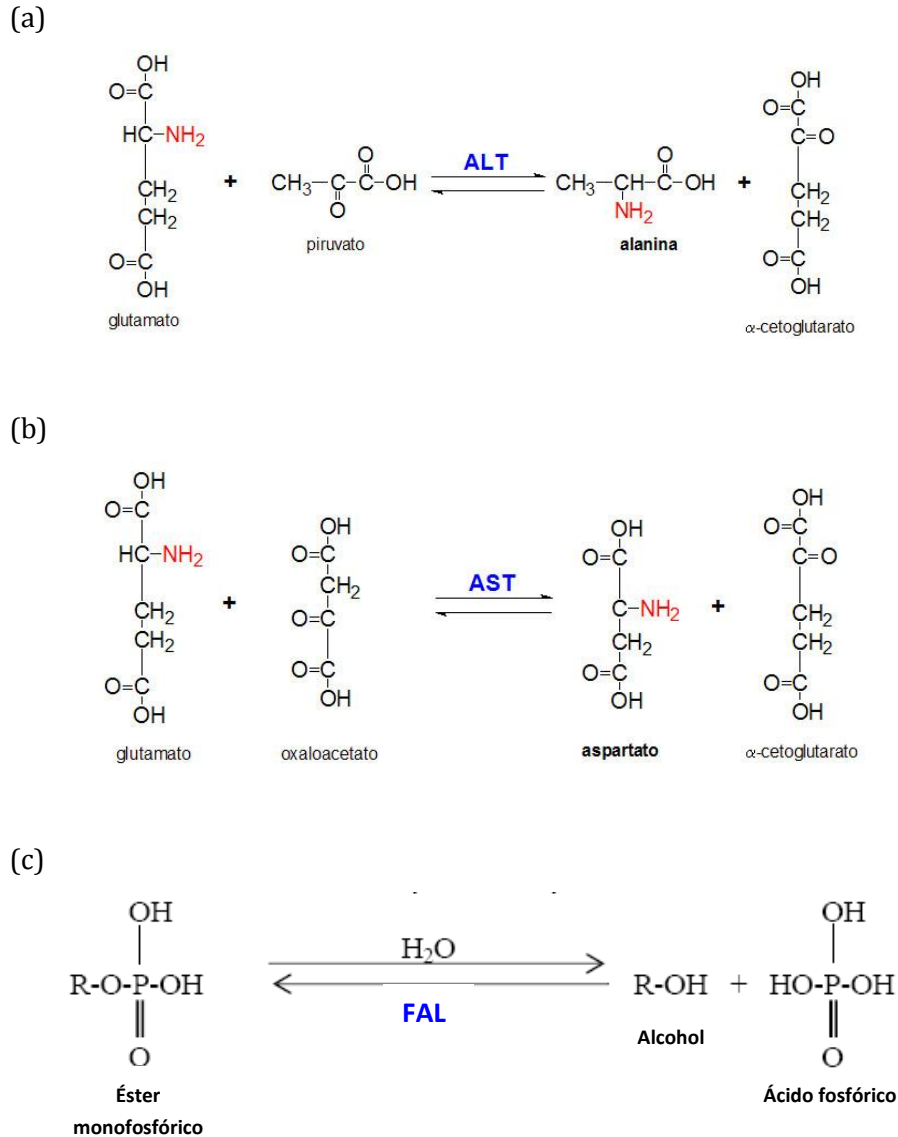


(Dunier y col., 1994; Lemaire-Gony y col., 1995; Sanchez-Dardon y col., 1999; Aaltonen y col., 2000a, b). Dentro de los parámetros inmunológicos que pueden ser utilizados como biomarcadores en peces, se incluyen el conteo de glóbulos blancos y el conteo diferencial de leucocitos (van der Oost y col., 2003).

### 1.4.3 *Transaminasas y fosfatasa alcalina*

Las enzimas *aspartato aminotransferasa* (AST), y *alanino aminotransferasa* (ALT) (comúnmente denominadas transaminasas) están relacionadas al metabolismo de aminoácidos (Figura 1.5).

Las transaminasas constituyen un grupo de enzimas que catalizan la interconversión de aminoácidos por transferencia de grupos amino. La ALT cataliza la transferencia de grupos amino desde alanina al  $\alpha$ -ketoglutarato para formar glutamato y piruvato, mientras que la AST cataliza la transferencia de grupos amino desde aspartato al  $\alpha$ -ketoglutarato para formar glutamato y oxaloacetato. Dado que las transaminaciones son libremente reversibles, las transaminasas pueden catalizar reacciones de catabolismo o biosíntesis de aminoácidos (Rodwell, 1997). Por otro lado, la enzima *fosfatasa alcalina* (FAL) es una enzima que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosforilo, a un pH alcalino, lo que libera ácido fosfórico al medio (Lehninger, 1985). Estas enzimas son indicadores sensibles de daño celular, y su alteración permite la identificación de daño tisular en órganos como el hígado y el riñón (Karan y col., 1998; Peri y col., 2003; Begum, 2004; Borges y col., 2007; Ramaiah y col., 2007). Por lo tanto, han sido utilizadas como indicadores de daño hepático y renal para evaluar la toxicidad de diversos compuestos tóxicos en laboratorio (Hori y col., 2006; Sancho y col., 2009) y a campo (de la Torre y col., 2007).



**Figura 1.5** Reacciones catalizadas por las enzimas (a) alalino aminotransferasa (ALT), (b) aspartato aminotransferasa (AST), y (c) fosfatasa alcalina (FAL) (King, 2011).

#### 1.4.4 Estrés oxidativo

La causa más importante de la toxicidad del oxígeno ( $\text{O}_2$ ) es su propensión a la transferencia de electrones que genera intermediarios reactivos, denominados *especies reactivas del oxígeno* (*reactive oxygen species*, ROS). Por otro lado, esta habilidad del  $\text{O}_2$  de aceptar electrones es el fundamento de su utilidad en organismos aeróbicos; por ejemplo,

una de sus funciones clave es servir como el aceptor terminal de electrones en el transporte electrónico mitocondrial, que lleva a la producción del adenosin trifosfato (ATP) de alta energía (Di Giulio y Meyer, 2008). En este proceso, el  $O_2$  se reduce a agua ( $H_2O$ ). Durante esta cadena de reacciones se producen los siguientes ROS: radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) (radicales libres) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Un *radical libre* es cualquier especie capaz de existencia independiente que contiene uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 2007). La existencia de electrones desapareados tiende a hacerlos más reactivos, aunque el rango de reactividad entre los radicales libres es extenso; por ejemplo,  $O_2^{\cdot-}$  es poco reactivo, mientras que  $\cdot OH$  es extremadamente reactivo y está entre los ROS más deletéreos encontrados en las células, ya que reacciona indiscriminadamente con constituyentes celulares como las membranas lipídicas, proteínas, y ADN.

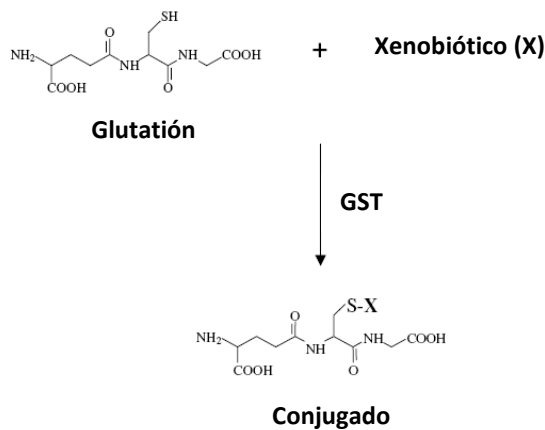
Aunque el  $H_2O_2$  no es un radical libre, es un importante ROS. Es un agente reductor y oxidante débil. Su naturaleza neutra (no cargada) le permite penetrar las membranas celulares; sin embargo su significado en el proceso de estrés oxidativo se relaciona a su capacidad de servir como precursor de  $\cdot OH$ , a través de la reacción de Harber-Weiss con el  $O_2^{\cdot-}$ , que puede ser catalizada por metales de transición como el hierro (reacción de Fenton) (Halliwell y Gutteridge, 2007). Existen otros ROS que pueden jugar roles importantes en el proceso de estrés oxidativo, como el ozono, radicales alcoxi y peroxilo, y especies reactivas de nitrógeno.

En este contexto, los ROS parecen ser malos, pero es importante resaltar que también pueden jugar roles positivos. Un ejemplo es la producción de ROS por los neutrófilos y macrófagos en muchos vertebrados para ser utilizados en la actividad fagocítica.

En organismos saludables, la producción de ROS está relativamente balanceada por la actuación del *sistema de defensa antioxidante* (SDA). Sin embargo, este balance no es perfecto, lo cual deriva en la continua ocurrencia de daño mediado por ROS. Un antioxidante es cualquier sustancia que retrasa, previene o remueve daños oxidativos en moléculas blanco (Halliwell y Gutteridge, 2007). En otras palabras, el SDA tiende a controlar los niveles de ROS, y no a eliminarlos totalmente. Esto es a causa de que el mantenimiento de un exceso de sustancias antioxidantes tiene un costo energético alto, y puede ser más “económico” reparar o reemplazar las biomoléculas dañadas.

Como se citó en la sección de reacciones de biotransformación, las GST son una familia de enzimas de la fase II que proveen protección celular contra los efectos tóxicos

de una variedad de químicos endógenos y exógenos. Estas enzimas están bien distribuidas y forman aproximadamente del 2 al 4% del total de las proteínas citosólicas en el hígado. La reacción más importante catalizada por todas las isoformas de esta enzima es la conjugación del *glutati6n* (GSH) (un tripéptido formado por cisteína, glutamato y glicina) con un centro electrofílico (átomos de carbono, nitr6geno o azufre) (Figura 1.6). Luego de la formaci6n del GSH conjugado, el metabolito puede sufrir dos reacciones separadas de desdoblamiento de aminoácidos seguidas por una N-acetilaci6n para formar derivados del ácido mercaptúrico (Schlenk y col., 2008b).

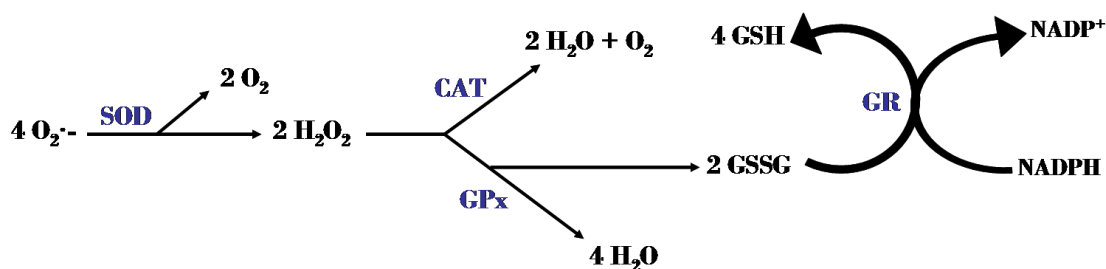


**Figura 1.6** Reacci6n de conjugaci6n de un xenobi6tico, catalizada por la enzima glutati6n S-transferasa (GST) (Townsend y Tew, 2003).

La especificidad de sustratos de esta enzima es muy amplia, incluyendo los pesticidas. El mayor rol en el metabolismo de sustancias end6genas es la detoxificaci6n de productos del estr6s oxidativo derivados de la oxidaci6n de l6pidos, ácidos nucleicos y prote6nas. As6, adem6s de su funci6n de protecci6n contra qu6micos electrof6licos, ciertas isoenzimas de la GST pueden catalizar la reducci6n de per6xidos celulares a sus correspondientes alcoholes, as6 como conjugar aldeh6dos insaturados genot6xicos end6genos formados durante la peroxidaci6n de l6pidos de membranas. En consecuencia, la GST es tambi6n un componente del SDA. As6, un rol cr6tico de la GST es la defensa contra el daño oxidativo y los productos oxidativos de ADN y l6pidos (van der Oost y col., 2003). La toxicidad de muchos compuestos ex6genos puede estar modulada por la inducci6n de la GST. Efectos inductores de la GST en h6gado han sido observados en diversas especies de peces. Por ejemplo, un aumento significativo de la GST fue observada en peces expuestos a dioxinas, pesticidas o hidrocarburos poliaromáticos (Arnold y col., 1995, Huuskonen y col., 1996; Machala y col., 1998; Egeas y col., 1999), y en algunas especies en

ambientes contaminados (Jedamski-Grymlas y col., 1995; Viganò y col., 1995; Beyer y col., 1996; van der Oost y col., 1996, 1998; Pesonen y col., 1999).

Sin embargo, las enzimas clave para la detoxificación de ROS son la *superóxido dismutasa* (SOD), *glutación peroxidasa* (GPx) y *catalasa* (CAT), en conjunción con enzimas que proveen equivalentes reductores, como la *glutación reductasa* (GR) (Figura 1.7). El GSH juega también un rol central en el proceso de detoxificación: no sólo actúan como un antioxidante sino también como sustrato de la GPx y cofactor de la GST (Hermes-Lima, 2004). El consumo de GSH debido al secuestro directo de ROS durante la actividad antioxidante o como un co-factor de la actividad de la GPx puede generar un flujo intracelular de equivalentes reductores con profundas consecuencias en una variedad de procesos metabólicos. La coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su estado reducido (NADPH) debe ser oxidada (a NADP<sup>+</sup>) para mantener los niveles de GSH a través de la actividad de la GR. Entonces, la GPx remueve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la conversión de GSH en su estado reducido al oxidado (GSSG), y la GR mantiene los niveles de GSH reducido a través de la oxidación de NADPH.



**Figura 1.7** Componentes enzimáticos y reacciones principales del sistema de defensa antioxidante en peces (Landis y Yu, 1999).

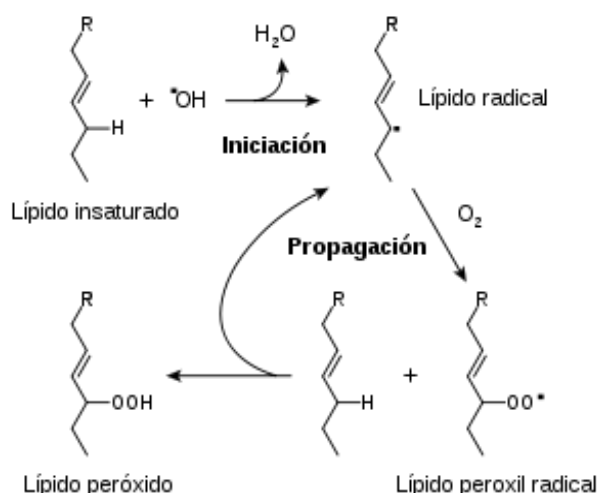
Por otro lado, la CAT también cataliza la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que es metabolizado a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. En los animales, la CAT está presente en todos los órganos, pero está especialmente concentrada en el hígado. Por el contrario, el cerebro, corazón y músculo esquelético tiene bajos niveles de esta enzima. Su localización intracelular es en los peroxisomas (Halliwell y Gutteridge, 2007).

La disminución o inactivación de sustancias o enzimas antioxidantes, y el incremento en la producción intracelular de ROS son las causas principales de la ocurrencia de estrés oxidativo. Los pesticidas pueden inducir estrés oxidativo a través de varios mecanismos: (a) pueden ser capaces de entrar en ciclos redox, aceptando o donando electrones a constituyentes celulares, (b) pueden secuestrar sustancias como el

GSH, agotar sus reservas y provocar una disminución del potencial antioxidante, (c) pueden inactivar enzimas antioxidantes, y, finalmente, (d) pueden interferir con procesos relacionados a la obtención de energía, lo cual compromete el funcionamiento del SDA (Lushchak, 2011).

Esta situación puede hacer que un organismo sufra daño oxidativo en términos de proteínas, ADN, o lípidos (Monserrat y col., 2007). Por ejemplo, los radicales libres pueden formar uniones covalentes o actuar con grupos sulfidrilos de una variedad de biomoléculas (como enzimas y receptores de membrana) y cambiar su estructura y funcionalidad, así como también producir rupturas en uno o ambos lados de las moléculas de ADN, oxidar bases o formar aductos (Newman y Unger, 2003).

Uno de los blancos de los ROS más estudiados son los ácidos grasos poliinsaturados (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs), que son ácidos grasos que contienen dos o más uniones dobles carbono-carbono. De particular interés son aquellos PUFAs asociados a las membranas celulares, incluyendo organelas como las mitocondrias, lisosomas y retículo endoplasmático. En los PUFAs, los átomos de hidrógeno asociados a carbonos saturados (hidrógenos alifáticos) adyacentes a carbonos participantes de uniones dobles, son susceptibles de ser sustraídos por ROS (como los  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ). Esta sustracción de hidrógenos alifáticos representa la *iniciación* de la *peroxidación lipídica* (*lipid peroxidation*, LPO); así, la susceptibilidad de los PUFAs a sufrir LPO se incrementa con el incremento del número de uniones dobles insaturadas. La iniciación resulta en un radical lipídico ( $\text{R}\cdot$ ), que da origen a un dieno conjugado; bajo condiciones aeróbicas típicas, éste reacciona con  $\text{O}_2$ , llevando a la formación de un radical lipídico peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ). Este radical puede reaccionar con otro PUFA, sustrayendo el hidrógeno, y convirtiéndose en un peróxido lipídico ( $\text{LOOH}$ ), que genera otro  $\text{R}\cdot$  capaz de reaccionar con el  $\text{O}_2$  para llevar a la formación de un nuevo  $\text{ROO}\cdot$ ; este proceso puede ser repetido varias veces, constituyendo una cadena de reacción de radicales libres, denominada *propagación* de la LPO (Figura 1.8). La cadena de LPO puede ser finalizada por la reacción de dos radicales lipídicos para formar un producto no radical. Además, la LPO puede ser retrasada o lentificada por la acción de la sustancia antioxidante  $\alpha$ -tocoferol. La donación de hidrógenos a los  $\text{ROO}\cdot$  por el  $\alpha$ -tocoferol (formando radicales de baja reactividad) resulta en la formación de hidroperóxidos ( $\text{ROOH}$ ) que formarán nuevos radicales. Esto es reparado por la acción de las GPx que reducen los  $\text{ROOH}$  a su correspondiente alcohol ( $\text{ROH}$ ), previniendo efectivamente nuevos procesos de LPO (Di Giulio y Meyer, 2008).



**Figura 1.8** Etapas del proceso de peroxidación lipídica (Marnett, 1999).

El efecto general más importante de la LPO es una disminución de la fluidez y permeabilidad de la membrana celular, lo cual facilita el intercambio de fosfolípidos entre las dos mitades de la bicapa lipídica, e incrementa la fuga de ciertas sustancias que no podrían cruzar la membrana sin ayuda de canales transportadores especializados (ej. Ca<sup>2+</sup>). También tiene efectos directos sobre las proteínas constituyentes de las membranas, dañándolas, inactivando enzimas y canales iónicos, y disminuyendo su movilidad lateral y rotacional (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Varios estudios han identificado a los niveles de LPO, así como también la actividad de la GR, GST y GPx como los indicadores más sensibles de estrés oxidativo (van der Oost y col., 2003). El malondialdehído, un producto de degradación de la LPO, indica el daño oxidativo en lípidos (Kohen y Nyska, 2002) y puede ser utilizado como un marcador biológico adecuado en peces (Oakes y col., 2004; Crestani y col., 2007; Zhang y col., 2008).

#### 1.4.5 Utilización de biomarcadores en peces expuestos a Endosulfán

Los biomarcadores se han utilizado ampliamente en estudios de toxicidad de pesticidas en peces (Joseph y Raj, 2011). En la Tabla 1.1 se citan algunos antecedentes de utilización de los biomarcadores descritos en las secciones anteriores, en estudios de laboratorio con diferentes especies ícticas expuestas a ED.

Biomarcadores	Especies	Referencias bibliográficas
<i>Índice hepato-somático</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Arnold y col. (1995)
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Coimbra y col. (2007)
	<i>Salmo salar</i>	Berntssen y col. (2008)
	<i>Cyprinus carpio</i>	Salvo y col. (2008)
	<i>Salmo salar</i>	Berntssen y col. (2010)
<i>Hematología</i>	<i>Channa punctatus</i>	Sastry y Siddiqui (1983)
	<i>Cyprinus carpio</i>	Chandrasekar y Jayabalan (1993)
	<i>Cyprinus carpio</i> var <i>specularis</i>	Shafiq-ur-Rehman (2006)
	<i>Salmo salar</i>	Petri y col. (2006)
	<i>Monopterus albus</i>	Hii y col. (2007)
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Girón-Pérez y col. (2008)
	<i>Salmo salar</i>	Berntssen y col. (2010)
	<i>Cichlasoma dimerus</i>	Da Cuña y col. (2011)
	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Kumar y col. (2011)
<i>Danio rerio</i>	Velasco-Santamaría y col. (2011)	
<i>Transaminasas y fosfatasa alcalina</i>	<i>Puntius conchoniis</i>	Gill y col. (1990)
	<i>Channa punctatus</i>	Sarma y col. (2009)
<i>Estrés oxidativo</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Arnold y col. (1995)
	<i>Channa punctatus</i>	Pandey y col. (2001)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Dorval y Hontela (2003)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Dorval y col. (2003)
	<i>Channa punctata</i>	Atif y col. (2005)
	<i>Cyprinus carpio</i> var <i>specularis</i>	Shafiq-ur-Rehman (2006)
	<i>Salmo salar</i>	Glover y col. (2007)
	<i>Jenynsia multidentata</i>	Ballesteros y col. (2009b)
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tellez-Bañuelos y col. (2009)
	<i>Salmo salar</i>	Berntssen y col. (2010)
	<i>Clarias gariepinus</i>	Ezemonye y Ikpesu (2011)
	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Kumar y col. (2011)
<i>Danio rerio</i>	Velasco-Santamaría y col. (2011)	

**Tabla 1.1** Antecedentes de la medición de biomarcadores en peces expuestos a Endosulfán.



## 1.5 OBJETIVO GENERAL, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### 1.5.1 *Objetivo general e hipótesis de trabajo*

Objetivo general: Evaluar la toxicidad aguda del insecticida ED para tres especies ícticas neotropicales, y detectar cambios subletales en marcadores de estrés en peces expuestos a una formulación comercial de ED, individualmente y en mezcla con otro pesticida. A través del cumplimiento de dicho objetivo, se pretendió ampliar la base de datos de toxicidad del ED en vertebrados acuáticos, y evaluar la utilidad de los biomarcadores como sistemas de alerta temprano, bajo condiciones experimentales.

Hipótesis: La exposición a una formulación comercial de ED y a su mezcla con un insecticida piretroide, desencadena una cascada de respuestas fisiológicas en peces, que provocan un desequilibrio en la homeostasis y la ocurrencia de efectos perjudiciales.

### 1.5.2 *Objetivos específicos*

- Evaluar la toxicidad aguda de una formulación comercial de ED para tres especies ícticas nativas (*Prochilodus lineatus*, *Cichlasoma dimerus* y *Piaractus mesopotamicus*).

- Evaluar efectos fisiológicos de concentraciones subletales de ED en dichas especies, a través de la medición de biomarcadores morfológicos, hematológicos, de estrés oxidativo y marcadores de daño tisular.
- Evaluar efectos fisiológicos de concentraciones subletales de ED en combinación con una formulación comercial del insecticida piretroide  $\lambda$ -cialotrina (mezcla), a través de la medición de biomarcadores morfológicos, hematológicos, de estrés oxidativo y marcadores de daño tisular.



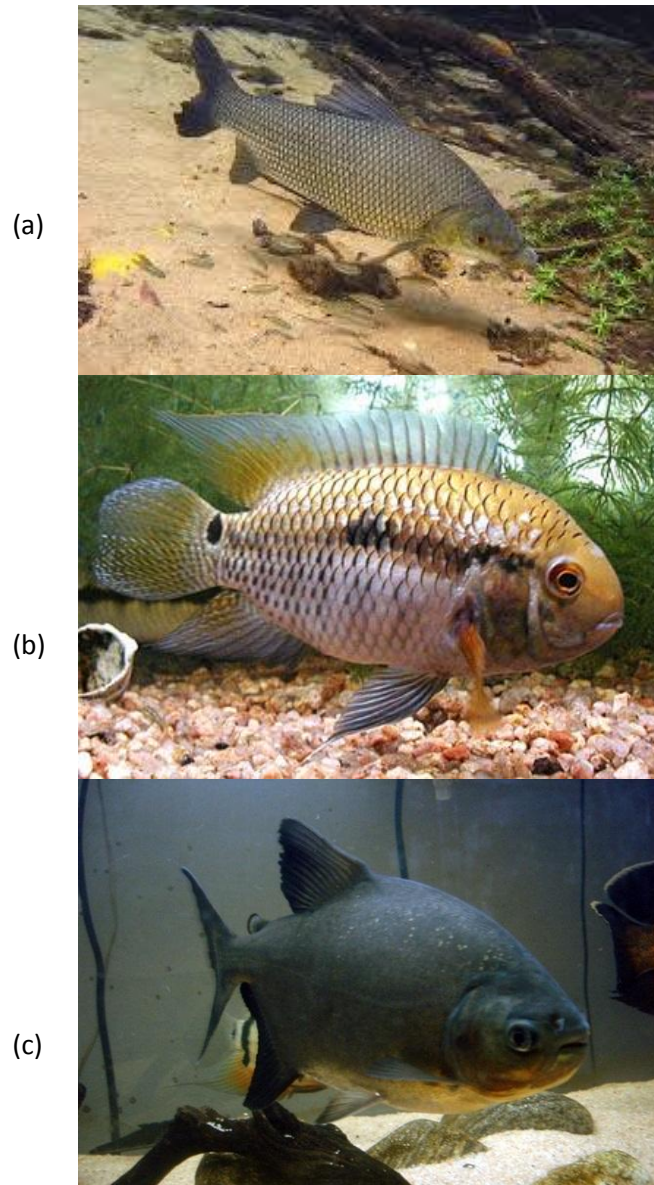
## 2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

### 2.1.1 Caracterización de las especies utilizadas

*Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) (Figura 2.1a) es la especie más abundante y el principal recurso de la pesca comercial en el río Paraná Medio (Rossi y col., 2007). Además, el “sábalo” representa una especie adecuada para el monitoreo del medio acuático, ya que es un pez detritívoro y, por lo tanto, que está en contacto con xenobióticos a través del agua y sedimentos (Camargo y Martínez, 2006; Vanzella y col., 2007; Carvalho y Fernandes, 2008; Cavalcante y col., 2008; Cazenave y col., 2009).

*Cichlasoma dimerus* (Pisces, Cichlidae) (Figura 2.1b) es un pez teleósteo sudamericano del Orden de los Perciformes, que habita en aguas tranquilas y poco profundas de cuencas de los ríos Paraná y Paraguay (Kullander, 1983). Se los denomina vulgarmente “chanchitas” o “peinetas”. Esta especie de agua dulce se adapta fácilmente a condiciones de cautiverio y muestra características como altas tasas de desove y supervivencia, proporcionando un modelo apropiado para estudios de laboratorio (Rey Vásquez y Guerrero, 2007; Pandolfi y col., 2009; Alonso y col., 2011).

El “pacú” (*Piaractus mesopotamicus*) (Pisces, Characidae) (Figura 2.1c) es un pez omnívoro sudamericano que habita los ríos Paraná, Uruguay, Paraguay y Río de la Plata. Es muy utilizado en piscicultura debido a su buena tasa de crecimiento en cultivos, la calidad de su carne y las excelentes oportunidades para su comercialización en el mercado interno (Martínez y Wicki, 1997; Jomori y col., 2003; Garcia y col., 2007).



**Figura 2.1** Ejemplar adulto de (a) *Prochilodus lineatus*, (b) *Cichlasoma dimerus*, y (c) *Piaractus mesopotamicus*.

### 2.1.2 Recolección y aclimatación de los peces

Los ejemplares juveniles de *P. lineatus* y los ejemplares adultos de *C. dimerus* fueron colectados con red de arrastre en una zona no contaminada del río Paraná (31 ° 42 'S, 60 ° 45' W), Argentina. Los ejemplares juveniles de *P. mesopotamicus* fueron obtenidos del criadero "Pez Campero" (Paraná, Argentina).

Durante el traslado de los ejemplares desde los sitios de colecta hasta el laboratorio, los mismos fueron mantenidos en tanques con aireación constante. En el laboratorio, se realizó un examen exploratorio para detectar posibles anomalías, enfermedades, parásitos u hongos en las áreas superficiales visibles de los peces (Herman, 1990). Los ejemplares que presentaron algún tipo de anomalía fueron separados y descartados para su empleo en los ensayos. Antes de ser emplazados en los tanques para aclimatación, los peces fueron medidos con un ictiómetro (longitud estándar, LE; longitud total, LT) y pesados (peso total, Pt) con una balanza de precisión Sartorius 2100 g x 0,01 g. Estas medidas se utilizaron para calcular el factor de condición (FC) de los peces, como indicador del estado general de los mismos (Tabla 2.1). El FC fue calculado según Goede y Barton (1990) a través de la siguiente ecuación:

$$FC = Pt \times 100 / LE^3$$

Pt= peso total (g)  
LE= longitud estándar (cm)

Especie	n	LT (cm)	LE (cm)	Pt (g)	FC
<i>Prochilodus lineatus</i>	90	16 ± 1,8	12,9 ± 1,6	49,9 ± 21,5	2,2 ± 0,2
<i>Cichlasoma dimerus</i>	90	10,3 ± 1,1	7,6 ± 0,8	26,2 ± 8,7	5,8 ± 0,5
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	100	10,2 ± 0,7	8,1 ± 0,5	23,9 ± 4,4	4,5 ± 0,3

Los valores se expresan como medias ± desvío estándar

**Tabla 2.1** Número total (n) y medidas de los ejemplares utilizados en los ensayos de toxicidad (LT: longitud total, LE: longitud estándar, Pt: peso total, FC: factor de condición).

Durante la aclimatación, los peces fueron mantenidos en tanques de 150 L de capacidad durante dos semanas y fueron alimentados una vez al día, con pellets comerciales. La densidad de peces mantenidas en dichos tanques fue de 1g·L<sup>-1</sup> (Parrish, 1985). La renovación de agua y medición de variables de calidad del agua se llevaron a cabo de forma periódica. La etapa de aclimatación se realizó con un fotoperiodo de 12:12 h luz-oscuridad, y las características del agua de ensayo fueron: temperatura 25 ± 1 °C, pH 6,9 ± 0,2, y dureza total 48 ± 0,1 ppmCO<sub>3</sub>Ca.

### 2.1.3 Condiciones experimentales

#### 2.2.3.1 Condiciones generales

Las soluciones de Endosulfán (ED) fueron preparadas a partir de una formulación comercial que contenía 35% de ingrediente activo (Zebra Ciagro®, Ciagro Argentina S.A.), ya que el ED en este grado se emplea con frecuencia en las prácticas agrícolas. En la Figura 2.2 se encuentra representada la ficha técnica de la formulación comercial de ED utilizada en los ensayos. Las concentraciones de ED fueron calculadas en base al porcentaje de principio activo presente en el formulado comercial, y fueron cuantificadas en el agua de los tratamientos al inicio de cada experimento por GC-ECD, de acuerdo con la US EPA (1989), mostrando una recuperación del 95% del valor nominal.

**INSECTICIDA**



**CONCENTRADO EMULSIONABLE**

**COMPOSICIÓN:**

endosulfán: hexacloro-endometileno-biciclohepteno-bis (oximetileno) sulfito ... 35 g	
solventes y emulsionantes, c.s.p. ... 100 cm <sup>3</sup>	

LEA INTEGRAMENTE ESTA ETIQUETA ANTES DE UTILIZAR EL PRODUCTO

Inscrito en el SENASA (SAGP y A) con el N° 34.181

Industria Argentina	Lote N°:
CONTENIDO NETO: <b>1 Lt.</b>	Fecha de Vencimiento:

**INFLAMABLE DE 3° CATEGORÍA**



Atuel 596 - (C1437EPH) Buenos Aires

Tel/Fax: (011) 4912-0045 / 48

**NOTA: CIAGRO S.A.** no acepta ninguna responsabilidad por daños que pudieran derivar del almacenamiento o aplicación inadecuados o que no se ajusten a las recomendaciones de uso indicados en este marbete.

**GENERALIDADES:**  
ZEBRA CIAGRO® es un insecticida orgánico que actúa por contacto e ingestión y con altas temperaturas tiene acción por inhalación. Controla insectos chupadores y masticadores en todo tipo de cultivo, e incluso en viveros e invernáculos.

**PREPARACION:**  
Verter el producto a utilizar en una pequeña cantidad de agua. Luego de formada la emulsión, agregar en el tanque del pulverizador con agua hasta la mitad y completar el volumen de trabajo.

**EQUIPOS, VOLÚMENES Y TÉCNICAS DE APLICACIÓN:**  
Se puede usar equipo terrestre y/o avión. En ambos casos se debe lograr una aplicación uniforme del cultivo para lo cual hay que calibrar los equipos en forma correcta. Se recomienda para lograr un uso óptimo del producto:  
- Respetar dosis indicadas  
- Cobertura correcta  
- Respetar momento de aplicación  
- Usar pastillas de cono hueco para insecticidas pudiendo elegir entre las que ofrece el mercado. Respetar la presión de trabajo en función del flujo y tamaño de gota producida recomendado por el fabricante. Lograr una cobertura correcta llegando a 50 a 70 gotas/cm<sup>2</sup> y un C.V de 50%. Evitar hacer pulverización con vientos mayores a 10 km/h.  
- Consulte a un Ingeniero Agrónomo para calibrar correctamente su equipo.

**RECOMENDACIONES DE USO:** Ver Cuadro Adjunto

**RESTRICCIONES DE USO:**  
Se deberán respetar los siguientes periodos de carencia (días desde la última aplicación a cosecha):  
Manzana Granny Smith: 7 días.  
Pera Packams Triumph: 8 días.  
Frutilla: 4 días.  
Frutales de pepita (manzano, membrillero, pera): 14 días.  
Alcaucil, berenjena, pimiento, repollo, tomate, melón, sandía, zapallo, zapallito y pepino: 3 días.  
Batata y papa: 7 días.  
Brócoli, berro y maíz dulce: 14 días.  
Arveja y poroto: 15 días.  
Pastos y cultivos forrajeros: 14 días.  
Algodón (semilla): 14 días.  
Tabaco: 5 días.  
Cultivos oleaginosos y sorgo: 14 días.  
Otros cereales: 20 días.  
Florales: sin restricciones.

En caso que el cultivo o sus subproductos se destinen a la exportación, deberán conocerse el límite máximo de residuos del país de destino y observar el período de carencia que corresponda a ese valor de tolerancia.

**COMPATIBILIDAD:**  
Se puede combinar con la mayoría de fungicidas, insecticidas, herbicidas y coadyuvantes con excepción de aquellos que tienen una reacción fuertemente ácida o alcalina. La mezcla con piretroides para determinadas plagas mejora la acción individual del producto.

**FITOTOXICIDAD:**  
A las dosis y momentos de aplicación indicados, ZEBRA CIAGRO® no es fitotóxico para los cultivos recomendados.

**GENERALIDADES:**  
ZEBRA CIAGRO® es un insecticida orgánico que actúa por contacto e ingestión y con altas temperaturas tiene acción por inhalación. Controla insectos chupadores y masticadores en todo tipo de cultivo, e incluso en viveros e invernáculos.

**PREPARACION:**  
Verter el producto a utilizar en una pequeña cantidad de agua. Luego de formada la emulsión, agregar en el tanque del pulverizador con agua hasta la mitad y completar el volumen de trabajo.

**EQUIPOS, VOLÚMENES Y TÉCNICAS DE APLICACIÓN:**  
Se puede usar equipo terrestre y/o avión. En ambos casos se debe lograr una aplicación uniforme del cultivo para lo cual hay que calibrar los equipos en forma correcta. Se recomienda para lograr un uso óptimo del producto:  
- Respetar dosis indicadas  
- Cobertura correcta  
- Respetar momento de aplicación  
- Usar pastillas de cono hueco para insecticidas pudiendo elegir entre las que ofrece el mercado. Respetar la presión de trabajo en función del flujo y tamaño de gota producida recomendado por el fabricante. Lograr una cobertura correcta llegando a 50 a 70 gotas/cm<sup>2</sup> y un C.V de 50%. Evitar hacer pulverización con vientos mayores a 10 km/h.  
- Consulte a un Ingeniero Agrónomo para calibrar correctamente su equipo.

**RECOMENDACIONES DE USO:** Ver Cuadro Adjunto

**RESTRICCIONES DE USO:**  
Se deberán respetar los siguientes periodos de carencia (días desde la última aplicación a cosecha):  
Manzana Granny Smith: 7 días.  
Pera Packams Triumph: 8 días.  
Frutilla: 4 días.  
Frutales de pepita (manzano, membrillero, pera): 14 días.  
Alcaucil, berenjena, pimiento, repollo, tomate, melón, sandía, zapallo, zapallito y pepino: 3 días.  
Batata y papa: 7 días.  
Brócoli, berro y maíz dulce: 14 días.  
Arveja y poroto: 15 días.  
Pastos y cultivos forrajeros: 14 días.  
Algodón (semilla): 14 días.  
Tabaco: 5 días.  
Cultivos oleaginosos y sorgo: 14 días.  
Otros cereales: 20 días.  
Florales: sin restricciones.

En caso que el cultivo o sus subproductos se destinen a la exportación, deberán conocerse el límite máximo de residuos del país de destino y observar el período de carencia que corresponda a ese valor de tolerancia.

**COMPATIBILIDAD:**  
Se puede combinar con la mayoría de fungicidas, insecticidas, herbicidas y coadyuvantes con excepción de aquellos que tienen una reacción fuertemente ácida o alcalina. La mezcla con piretroides para determinadas plagas mejora la acción individual del producto.

**FITOTOXICIDAD:**  
A las dosis y momentos de aplicación indicados, ZEBRA CIAGRO® no es fitotóxico para los cultivos recomendados.



**CUIDADADO**

Figura 2.2 Ficha técnica del formulado comercial de Endosulfán Zebra Ciagro® (Ciagro Argentina S.A.).

Las soluciones del insecticida piretroide  $\lambda$ -cialotrina fueron preparadas a partir de una formulación comercial que contiene 5% de ingrediente activo (Cilambda®, Ciagro Argentina S.A.). Las concentraciones de  $\lambda$ -cialotrina fueron calculadas en base al porcentaje de principio activo presente en el formulado comercial.

Los experimentos se realizaron en acuarios de vidrio de 25 L de capacidad, en condiciones estáticas (ensayos con *P. lineatus* y *C. dimerus*) o semi-estáticas (ensayos con *P. mesopotamicus*), siguiendo las recomendaciones de la *Organization for Economic Cooperation and Development* para ensayos de toxicidad con compuestos químicos en peces (OCDE, 1992). En los ensayos semi-estáticos el agua se renovó cada 24 horas. Al igual que el periodo de aclimatación, los experimentos se llevaron a cabo con un fotoperiodo de 12:12 h luz-oscuridad, a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C; las características del agua de ensayo fueron similares a las reportadas para el agua de aclimatación. La alimentación de los peces fue suspendida 24 horas antes del comienzo de las pruebas.

#### 2.2.3.1 Ensayos de toxicidad aguda

Para los ensayos de toxicidad aguda (96 horas), se llevaron a cabo pruebas preliminares para establecer un rango de mortalidad y definir las concentraciones definitivas de ensayo.

Los registros de mortalidad se realizaron cada 12 horas. La detención del movimiento opercular se tomó como criterio de muerte, removiendo inmediatamente los ejemplares muertos.

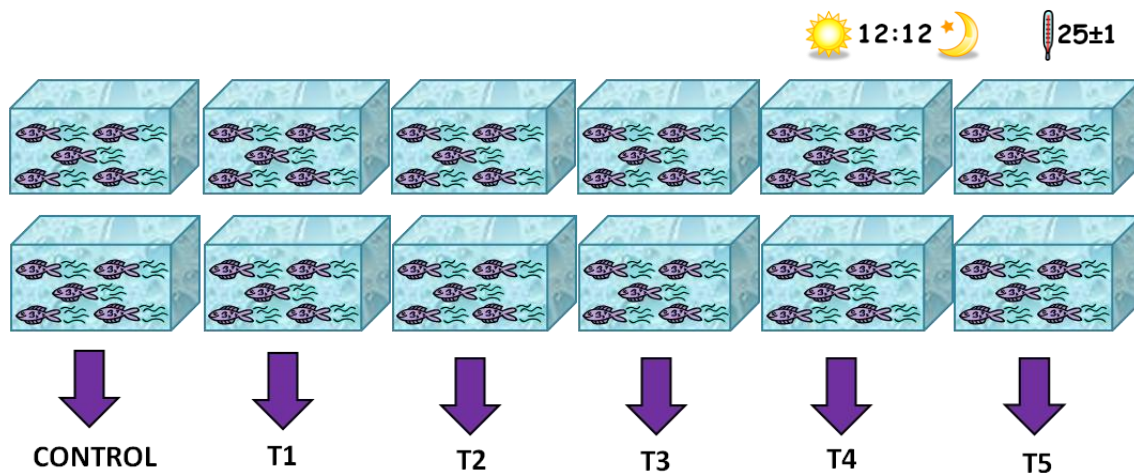
Los ensayos de toxicidad aguda consistieron en la exposición de grupos de 5 ejemplares, a 5 concentraciones de ED, que fueron definidas según los resultados obtenidos en los ensayos preliminares, para cada especie (Tabla 2.2). Un grupo adicional sirvió como control y se mantuvo en agua de red declorada. Tratamientos y control se realizaron por duplicado (Figura 2.3). A partir de los datos de mortalidad obtenidos en cada ensayo se calculó la *concentración letal media* ( $CL_{50}$ ), que se define como la concentración de una sustancia tóxica que produce la mortalidad del 50% de la población expuesta (Rand y Petrochelli, 1985). La estimación de la  $CL_{50}$ -24, 48, 72 y 96h para cada especie se realizó por el método computacional PROBIT.



Especie	Concentraciones de ED ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Factor de dilución
<i>Prochilodus lineatus</i>	2,2 - 2,8 - 3,5 - 4,4 - 5,5	0,8
<i>Cichlasoma dimerus</i>	14,0 - 15,6 - 17,3 - 19,3 - 21,4	0,9
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	2,2 - 2,8 - 3,5 - 4,4 - 5,5	0,8

**Tabla 2.2** Concentraciones de Endosulfán utilizadas durante los ensayos de toxicidad aguda, y el factor de dilución utilizado para definir las.

Para definir las concentraciones de  $\lambda$ -cialotrina utilizadas para el ensayo subletal del ED en mezcla (con *P. mesopotamicus*), se realizó un ensayo de toxicidad aguda de las mismas características a las realizadas con el ED. Este ensayo consistió en la exposición de grupos de 5 ejemplares, a 5 concentraciones de  $\lambda$ -cialotrina: 1,8 - 2,2 - 2,8 - 3,5 - 4,4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (factor de dilución: 0,8).



**Figura 2.3** Diseño experimental de los ensayos de toxicidad aguda (T: tratamiento).

### 2.2.3.2 Ensayos subletales

Los ensayos de toxicidad subletal (96 horas) consistieron en la exposición de grupos de 5 ejemplares, a concentraciones de ED (y  $\lambda$ -cialotrina en el caso de los ensayos de mezcla con *P. mesopotamicus*) que fueron definidas según los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda, para cada especie y tóxico, a través del cálculo de

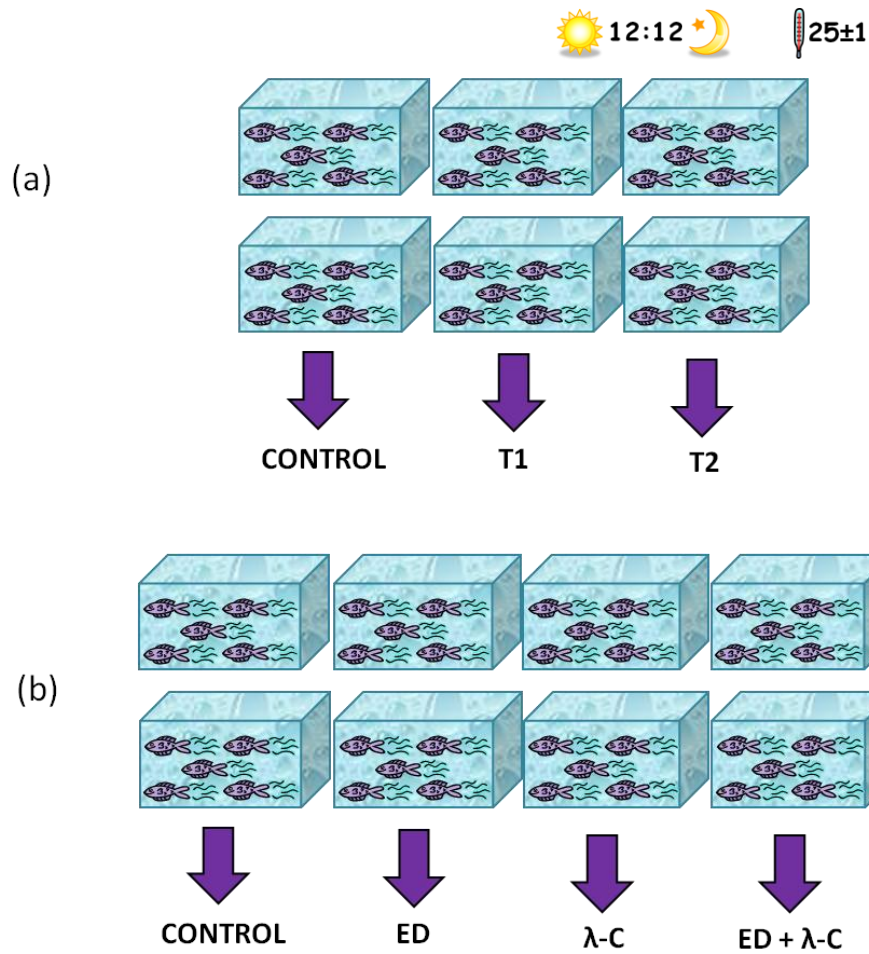
determinados porcentajes de las  $CL_{50-96h}$  (Figura 2.4). Un grupo adicional sirvió como control y se mantuvo en agua de red de clorada. Tratamientos y control se realizaron por duplicado.

A las 96 horas, los ejemplares del grupo control y de cada tratamiento fueron retirados de los acuarios, anestesiados, medidos y pesados. Después de tomar muestras de sangre, los peces fueron sacrificados y disectados. Los anestésicos utilizados y órganos extraídos dependieron de cada especie (Tabla 2.3). Los tejidos fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido (termo Taylor-Wharton, modelo LD 25) y almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en ultrafreezer (Righi, modelo ULT  $-80/-100^{\circ}\text{C}$ ) hasta que se llevaron a cabo las determinaciones bioquímicas.

Para el ensayo de toxicidad subletal con *P. lineatus*, grupos de 5 peces fueron expuestos a las siguientes concentraciones de ED: 0 (control), 1,2 (50%  $CL_{1-96h}$ ) y  $2,4\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $CL_{1-96h}$ ); fueron anestesiados con benzocaína según Parma de Croux (1990). Para el ensayo con *C. dimerus*, grupos de 5 peces fueron expuestos a: 0 (control), 3,4 (25%  $CL_{1-96h}$ ) y  $6,8\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (50%  $CL_{1-96h}$ ) de ED; fueron anestesiados con benzocaína según Vissio y col. (2008).

El ensayo de mezcla con *P. mesopotamicus* consistió en la exposición de grupos de 5 ejemplares a tres tratamientos y un control: ED ( $1,1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 50%  $CL_{1-96h}$ ),  $\lambda$ -cialotrina ( $0,7\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 50%  $CL_{1-96h}$ ) y a una mezcla de ambos tóxicos ( $1,1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ED +  $0,7\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\lambda$ -cialotrina). El tratamiento mezcla fue definido como la adición de las concentraciones de ambos tóxicos individuales. Los ejemplares fueron anestesiados por inmersión en agua fría durante unos segundos.

Cabe aclarar que si bien en líneas generales la metodología se mantuvo en los diferentes ensayos subletales, los tejidos extraídos y los biomarcadores medidos dependieron de la especie utilizada, la disponibilidad de tejido para las determinaciones y la puesta a punto de nuevas técnicas llevadas a cabo en diferentes etapas de la presente Tesis Doctoral.



**Figura 2.4** Diseño experimental de los ensayos subletales. (a) Ensayos con *P. lineatus* y *C. dimerus*; (b) ensayos con *P. mesopotamicus* (T: tratamiento; ED: Endosulfán; λ-C: λ-cialotrina).

Órgano	<i>Prochilodus lineatus</i>	<i>Cichlasoma dimerus</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>
Branquias	X	X	X
Hígado/hepatopáncreas	X	X	X
Riñón			X
Intestino	X		X
Cerebro	X	X	X
Músculo			X

**Tabla 2.3** Órganos extraídos en cada ensayo subletal.

## 2.2 BIOMARCADORES

### 2.2.1 Índice hepato-somático

Se calculó el índice hepato-somático (IHS), a través de la siguiente ecuación (Goede y Barton, 1990):

$$\text{IHS} = \text{Pt} / \text{PHg}$$

Pt= peso total (g)  
PHg= peso del hígado (g)

### 2.2.2 Biomarcadores hematológicos

La sangre fue extraída rápidamente de la vena caudal por la disección del pedúnculo caudal (Reichenbach-Klinke, 1980; Roberts, 1981) (Figura 2.5), utilizando jeringas o capilares heparinizados.

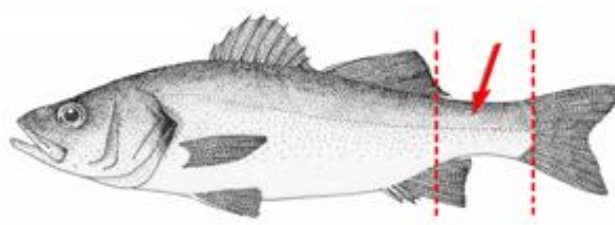


Figura 2.5 Pedúnculo caudal en los peces (Arias y col., 2010).

El conteo de glóbulos rojos (CGR) se realizó en una cámara de Neubauer bajo microscopio óptico (Nikon HFX, modelo OPTIPHOT-2), con solución fisiológica para la dilución. Los valores de hematocrito (Ht) fueron determinados utilizando tubos capilares que se centrifugaron a 1409 *g* durante 10 min (centrífuga Rolco, modelo 2036). El contenido de hemoglobina (Hb) se midió por el método de la cianohemoglobina a una longitud de onda de 546 nm en un espectrofotómetro (HACH, modelo DR 5000) (Houston, 1990). El volumen corpuscular medio (VCM), la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) se calcularon a partir de los índices primarios, según las siguientes ecuaciones:

$$\text{VCM} = \text{Ht} \times 10 / \text{CGR}$$

$$\text{HCM} = \text{Hb} \times 10 / \text{CGR}$$

$$\text{CHCM} = \text{Hb} \times 100 / \text{Ht}$$

Ht= hematocrito  
CGR= conteo de glóbulos rojos  
Hb= contenido de hemoglobina

Se utilizaron extendidos sanguíneos para el conteo de glóbulos blancos (CGB) y el conteo diferencial de leucocitos (CDL), según las técnicas descritas por Tavares-Dias y de Moraes (2007). Los extendidos sanguíneos se realizaron por duplicado, y fueron teñidos con May-Grünwald-Giemsa y fijados con Bálsamo de Canadá.

El CGB se determinó en relación con el número de eritrocitos contados en los extendidos, en campos seleccionados al azar y se calculó por unidad de volumen:

$$\text{CGB}/1 = \text{n}^\circ \text{ glóbulos blancos contados} \times (\text{CGR}/\mu\text{L}/4000 \text{ glóbulos rojos contados})$$

CGR= conteo de glóbulos rojos

El CDL se realizó mediante la identificación de 100 glóbulos blancos en cada extendido y el cálculo del porcentaje de cada uno de los siguientes tipos: linfocitos (Li), neutrófilos (Ne), monocitos (Mo), eosinófilos (Eo), basófilos (Ba) y trombocitos (Tr).

El plasma fue separado de la sangre total por centrifugación a 1409 *g* durante 10 min. La concentración de glucosa (GL) y proteínas totales (PT) se determinó colorimétricamente utilizando kits comerciales (Wiener Lab®).

### **2.2.3 Transaminasas y fosfatasa alcalina**

Para la extracción enzimática, las muestras de hígado, hepatopáncreas y riñón se homogeneizaron en buffer fosfato (pH 7,4). El homogeneizado se centrifugó a 15000 *g* (4 °C) durante 15 min (Hanil, modelo Mega 17R), el sobrenadante fue recogido y almacenado a -80°C en ultrafreezer para los estudios enzimáticos.

Las actividades de la aspartato aminotransferasa (AST) (L-aspartato aminotransferasa-2-oxaloglutarato, EC 2.6.1.1) y la alanino aminotransferasa (ALT) (L-alanina aminotransferasa-2-oxaloglutarato, EC 2.6.1.2), se estimaron según Reitman y Frankel (1957). La mezcla de reacción contenía 2 mmol · L<sup>-1</sup> α-cetoglutarato, sustratos específicos de la AST y ALT (100 y 200 mmol · L<sup>-1</sup> de aspartato y alanina L-1, respectivamente) en tampón fosfato (100 mM pH 7,4). La reacción se inició mediante la adición de alícuotas del homogeneizado; después de 30 minutos de incubación a 37 °C, se adicionó 2,4-dinitrofenilhidrazina y el producto de la reacción se midió espectrofotométricamente a 505 nm. La actividad de la fosfatasa alcalina (FAL) (monoéster ortofosfórico fosfohidrolasa, EC 3.1.3.1) se determinó colorimétricamente utilizando un kit comercial (Wiener Lab®). Cada muestra se midió por triplicado, y la actividad enzimática se calculó en función del contenido de proteínas (Bradford, 1976) usando albúmina plasmática como estándar, y se expresó en mU·mg prot<sup>-1</sup>.

### **2.2.4 Biomarcadores de estrés oxidativo**

#### **2.2.4.1 Enzimas antioxidantes**

Para la extracción enzimática, las muestras de tejidos fueron homogeneizadas en buffer fosfato 0,1M (pH 6,5), conteniendo glicerol 20%, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1mN y dithioerythritol (DTE) 1,4 mM. El homogeneizado se centrifugó a 20000 *g* (4 °C) durante 30 min, el sobrenadante fue recogido y almacenado a -80°C para las mediciones enzimáticas.

Las actividades enzimáticas fueron determinadas colorimétricamente. La actividad de la glutatión S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18) fue determinada según Habib y col. (1974), usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) como sustrato. La actividad de la glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2) fue establecida de acuerdo a Tanaka y col. (1994). Para la medición de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) se siguió la técnica de Drotar y col. (1985), usando  $H_2O_2$  como sustrato. La actividad de la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) fue determinada según Beutler (1982). Cada muestra se midió por triplicado, y la actividad enzimática se calculó en función del contenido de proteínas (Bradford, 1976), y se expresó en  $mU \cdot mg \text{ prot}^{-1}$ , excepto la CAT que se expresó en  $U \cdot mg \text{ prot}^{-1}$ .

#### 2.2.4.2 Peroxidación lipídica

Se determinó la peroxidación lipídica (LPO) en todos los órganos extraídos, mediante la medición de la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA), de acuerdo con Fátima y col. (2000). Esta técnica se basa en que el malondialdehído (producto formado durante la LPO de ácidos grasos poliinsaturados) reacciona con el TBA dando un compuesto fuertemente coloreado que absorbe a 535 nm.

Los tejidos se homogeneizaron individualmente con una solución de cloruro de potasio 0,15 M en un homogeneizador de vidrio. Entonces, 1 ml del homogeneizado se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación continua. Posteriormente, se agregaron 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 5% y 1 ml de TBA 0,67% a cada muestra. Cada vial se centrifugó a 1409 *g* durante 10 min. El sobrenadante se separó y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se midió en espectrofotómetro a 535 nm. La LPO se expresó como nanomoles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) formados por hora, por miligramo de proteínas ( $nmol \text{ TBARS} \cdot mg \text{ prot}^{-1}$ ). El contenido de proteína de cada muestra se determinó de acuerdo a Bradford (1976).

### 2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon los valores de  $CL_{50}$  y sus correspondientes límites de confianza (95%) para las 24, 48, 72 y 96 horas, utilizando la versión gratuita del software Probit 1.5 (US EPA, 1992).

Todos los datos se presentaron como media  $\pm$  error estándar. Se utilizó el programa estadístico de uso gratuito PASW (Predictive Analytics SoftWare) Statistics. Los datos obtenidos para los parámetros bioquímicos se testaron para normalidad y homocedasticidad con las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. Para evaluar los cambios en los biomarcadores entre los tratamientos y el grupo control se realizaron análisis de la varianza (ANOVA), seguido de una prueba *a posteriori* (Tukey). Las variables que no cumplieron con los supuestos fueron analizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .





### 3.1 TOXICIDAD AGUDA DEL ENDOSULFÁN

Los resultados obtenidos de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del Endosulfán (ED) para *Prochilodus lineatus*, *Cichlasoma dimerus*, y *Piaractus mesopotamicus* se muestran en la Tabla 3.1.

Especie	24 h		48 h		72 h		96 h	
	CL <sub>50</sub>	Límites	CL <sub>50</sub>	Límites	CL <sub>50</sub>	Límites	CL <sub>50</sub>	Límites
<i>P. lineatus</i>	<b>4,1</b>	3,7-4,5	<b>3,9</b>	3,6-4,3	<b>3,7</b>	3,3-4,1	<b>3,7</b>	3,3-4,1
<i>C. dimerus</i>	<b>18,4</b>	17,5-19,6	<b>18,1</b>	17,1-19,2	<b>17,9</b>	16,8-19,1	<b>17,1</b>	16,7-18,8
<i>P. mesopotamicus</i>		N/D	<b>4,1</b>	3,6-4,8	<b>3,8</b>	3,3-4,4	<b>3,6</b>	3,1-4,1

N/D: CL<sub>50</sub> no determinada (sin mortalidad)

**Tabla 3.1** Toxicidad aguda del Endosulfán expresada como CL<sub>50</sub> (µg·L<sup>-1</sup>) a 24, 48, 72 y 96 horas de exposición para *P. lineatus*, *C. dimerus* y *P. mesopotamicus*. Los límites (superior e inferior) corresponden a un 95% de confianza, según el método PROBIT.

No hubo mortalidad en el grupo control y en la concentración más baja de ED correspondiente a cada ensayo. El 100% de mortalidad se observó después de 72 (*P. lineatus*), 24 (*C. dimerus*) y 48 horas (*P. mesopotamicus*), en la concentración más alta de ED correspondiente a cada ensayo.

### 3.2 EFECTOS FISIOLÓGICOS SUBLETALES DEL ENDOSULFÁN

#### 3.2.1 *Prochilodus lineatus*

Los resultados mostraron que concentraciones subletales de ED produjeron cambios en la mayoría de los parámetros hematológicos medidos (Tabla 3.2).

Parámetro	Control	Concentración de ED ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
		1,2	2,4
CGR ( $10^6\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	1,64 $\pm$ 0,04	1,92 $\pm$ 0,12 *	1,63 $\pm$ 0,04
Ht (%)	34,52 $\pm$ 1,11	34,70 $\pm$ 1,11	31,60 $\pm$ 1,97
Hb ( $\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ )	6,56 $\pm$ 0,27	7,46 $\pm$ 0,35	5,35 $\pm$ 0,18 *
HCM (pg)	38,53 $\pm$ 1,19	39,42 $\pm$ 1,08	32,88 $\pm$ 0,88 *
VCM ( $\mu\text{m}^3$ )	200,61 $\pm$ 6,88	185,07 $\pm$ 7,26	194,54 $\pm$ 12,29
CHCM (%)	18,51 $\pm$ 0,65	21,42 $\pm$ 0,46 *	17,40 $\pm$ 0,94
CGB ( $\mu\text{L}$ )	27401 $\pm$ 3965	32520 $\pm$ 5480	54656 $\pm$ 9004 *
GL ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0,56 $\pm$ 0,10	0,72 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,07 *
PT ( $\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ )	2,60 $\pm$ 0,06	2,26 $\pm$ 0,11 *	1,84 $\pm$ 0,06 *

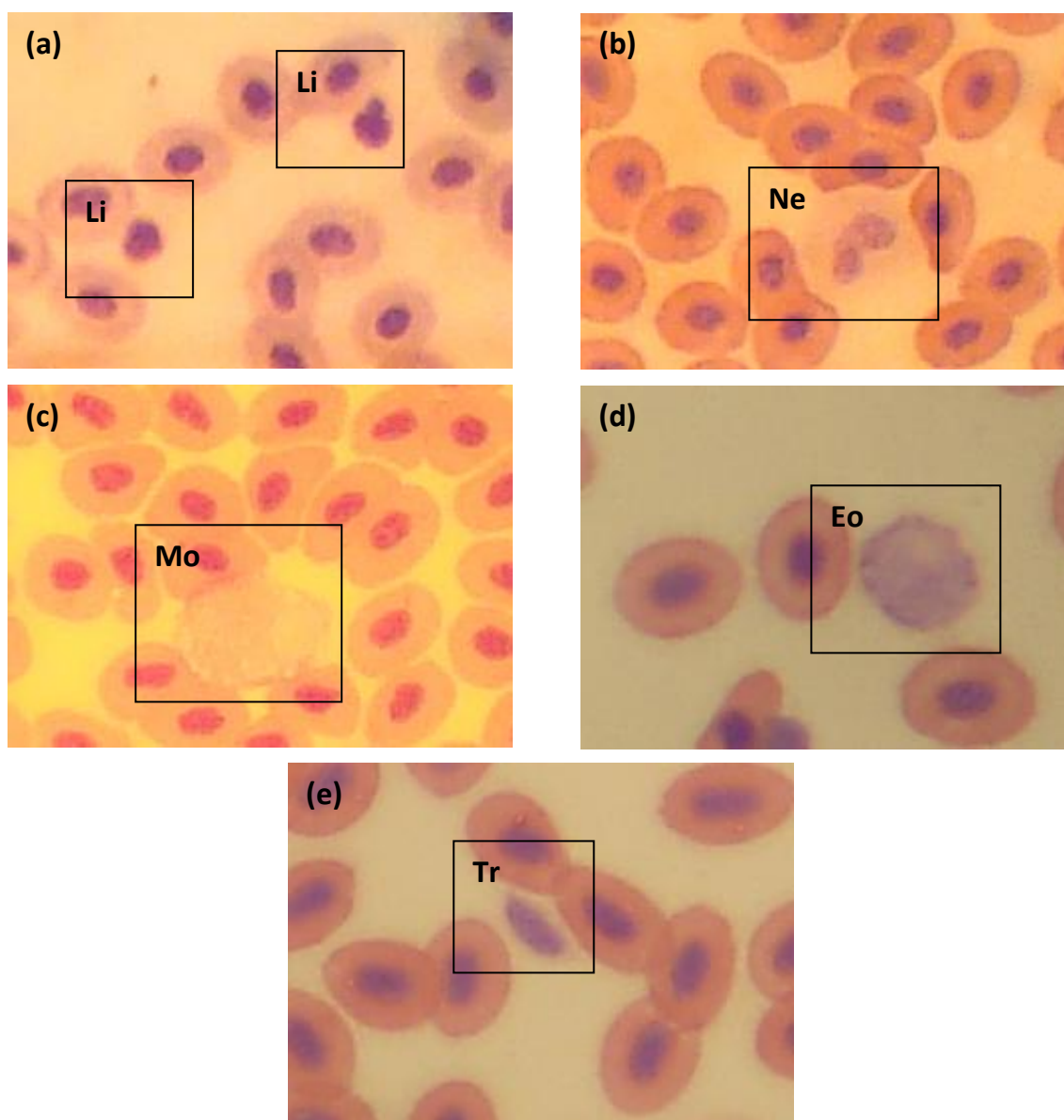
Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar

\* $p < 0,05$ , diferencias significativas en relación al control

**Tabla 3.2** Parámetros hematológicos en *P. lineatus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán por 96 horas. Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar. Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .

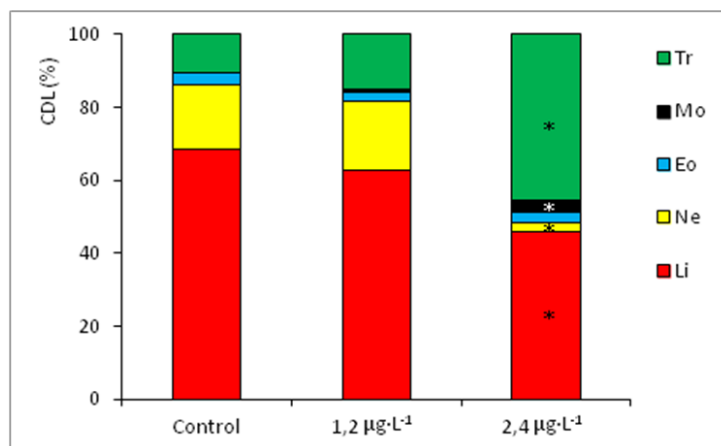
La concentración más alta de ED ( $2,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) produjo una disminución del contenido de hemoglobina (Hb), hemoglobina corpuscular media (HCM), y proteínas totales (PT) en plasma, y un aumento significativo del conteo de glóbulos blancos (CGB) y glucosa plasmática (GL).

En la Figura 3.1 se muestran ejemplos de tipos morfológicos encontrados en los extendidos y tomados como referencia para el conteo diferencial de leucocitos (CDL) en las tres especies de peces analizadas.



**Figura 3.1** Tipos morfológicos de leucocitos. (a) Linfocitos (Li), (b) neutrófilo (Ne), (c) monocito (Mo), (d) eosinófilo (Eo), y (e) trombocito (Tr).

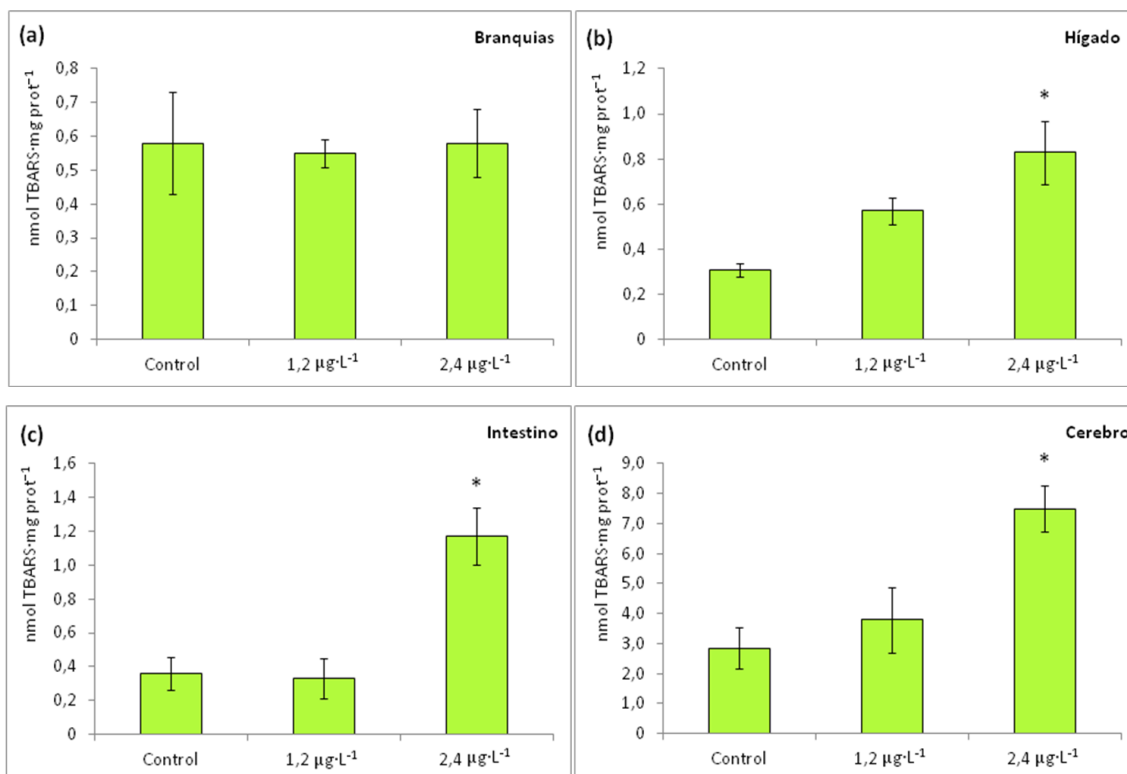
En *P. lineatus*, el CDL resultó alterado, por la ocurrencia de una mayor proporción de trombocitos (Tr) y monocitos (Mo), y menor proporción de linfocitos (Li) y neutrófilos (Ne) en los peces expuestos a  $2,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 3.2). Los basófilos (Ba) no se encontraron en los extendidos, y los eosinófilos (Eo) y Mo fueron los glóbulos blancos más raros.



**Figura 3.2** Conteo diferencial de leucocitos (CDL) en *P. lineatus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán por 96 horas (Tr: Trombocitos; Mo: Monocitos; Eo Eosinófilos; Ne: Neutrófilos; Li: Linfocitos).

(\*) Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .

En la concentración más alta, se observó un aumento significativo de los niveles de peroxidación lipídica (LPO) en hígado, intestino y cerebro, no siendo significativas las diferencias en los niveles en branquias, entre tratamientos y control (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Niveles de peroxidación lipídica en (a) branquias, (b) hígado, (c) intestino, y (d) cerebro de *P. lineatus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán por 96 horas. Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar. (\*) Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .

### 3.2.2 *Cichlasoma dimerus*

Los resultados mostraron que no hubo cambios en el índice hepato-somático (IHS) de los peces expuestos a concentraciones subletales de ED, en comparación con el grupo control. Por el contrario, la exposición a ED alteró algunos de los parámetros hematológicos medidos (Tabla 3.3). Un aumento significativo de la Hb se registró sólo en la concentración más alta ( $6,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), mientras que un aumento de CGB se observó en peces expuestos a ambas concentraciones de ED. El CDL también se vio afectado, mostrando una mayor proporción de Ne en los peces expuestos. Los Ba no se hallaron en los extendidos, y los Eo fueron los glóbulos blancos más raros.

Parámetro	Control	Concentración de ED ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
		3,4	6,8
IHS	0.40 $\pm$ 0.06	0.39 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.07
CGR ( $10^6\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	2.57 $\pm$ 0.26	2.98 $\pm$ 0.41	2.98 $\pm$ 0.36 *
Ht (%)	54.80 $\pm$ 2.88	54.63 $\pm$ 3.27	53.60 $\pm$ 5.07
Hb ( $\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ )	9.07 $\pm$ 1.29	8.00 $\pm$ 0.89	10.38 $\pm$ 1.01
HCM ( $\mu\text{g}$ )	34.81 $\pm$ 2.85	27.02 $\pm$ 1.87 *	34.96 $\pm$ 2.35
VCM ( $\mu\text{m}^3$ )	164.30 $\pm$ 21.82	166.96 $\pm$ 10.77	186.90 $\pm$ 6.61
CHCM (%)	18.26 $\pm$ 3.58	15.66 $\pm$ 0.24	19.24 $\pm$ 1.26
CGB ( $\mu\text{L}$ )	14816 $\pm$ 5368	44257 $\pm$ 600 *	40520 $\pm$ 13925 *
Li (%)	94.46 $\pm$ 2.24	95.42 $\pm$ 2.24	86.06 $\pm$ 11.16
Ne (%)	1.90 $\pm$ 1.56	0.70 $\pm$ 0.91	8.47 $\pm$ 7.78 *
Eo (%)	3.45 $\pm$ 1.92	2.94 $\pm$ 1.15	5.27 $\pm$ 5.90
Mo (%)	0	0.23 $\pm$ 0.45	0.20 $\pm$ 0.45
Tr (%)	0.19 $\pm$ 0.42	0.71 $\pm$ 0.91	0
GL ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0.71 $\pm$ 0.10	0.88 $\pm$ 0.06	0.99 $\pm$ 0.36
PT ( $\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$ )	3.52 $\pm$ 0.79	4.14 $\pm$ 0.60	4.95 $\pm$ 0.14

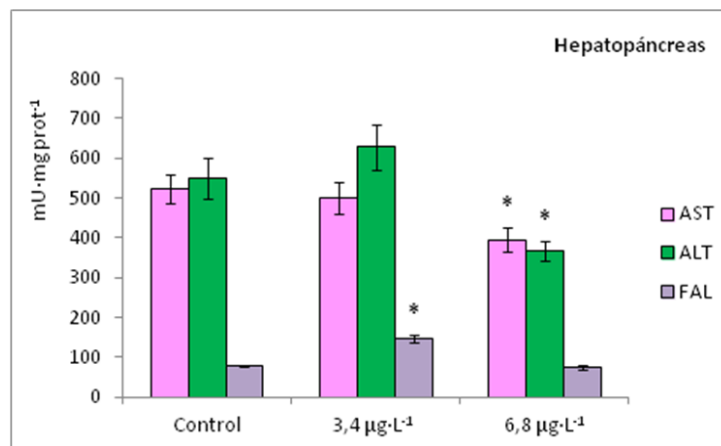
Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar

\* $p<0.05$ , diferencias significativas en relación al control

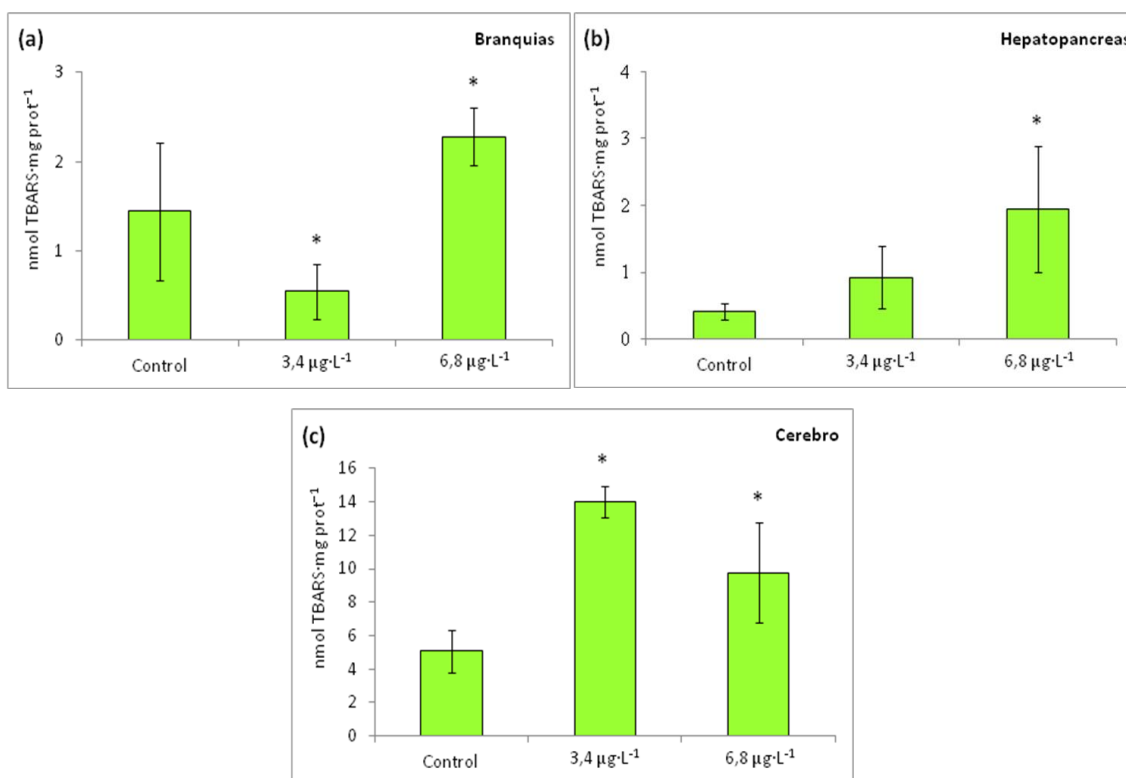
**Tabla 3.3** Parámetros hematológicos y morfológicos en *C. dimerus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán por 96 horas. Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar. Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p<0,05$ .

En los peces expuestos a 6,8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , se observó una disminución en la actividad de las transaminasas alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) en hepatopáncreas, después de 96 horas de exposición (Figura 3.4). Por el contrario, la fosfatasa alcalina (FAL) se incrementó en el grupo expuesto a 3,4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ED.

En el grupo de 6,8  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , también se observó un aumento significativo de los niveles de LPO en las branquias, hepatopáncreas y cerebro, mientras que en el grupo de 3,4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  disminuyó en las branquias, y aumentó en cerebro (Figura 3.5).



**Figura 3.4** Actividad de la aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FAL) en hepatopáncreas de *C. dimerus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán por 96 horas. Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar. (\*) Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .



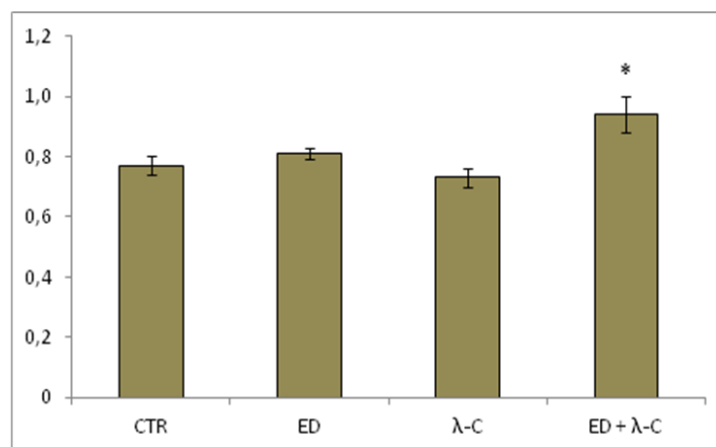
**Figura 3.5** Niveles de peroxidación lipídica en (a) branquias, (b) hepatopáncreas y (c) cerebro de *C. dimerus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán por 96 horas. Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar. (\*) Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .



### 3.3 EFECTOS FISIOLÓGICOS SUBLETALES DEL ENDOSULFÁN EN *Piaractus mesopotamicus*, DE MODO INDIVIDUAL Y EN COMBINACIÓN CON $\lambda$ -CIALOTRINA

#### 3.3.1 Índice hepato-somático

Los peces expuestos a una combinación de ED ( $1,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y  $\lambda$ -cialotrina ( $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) mostraron un aumento significativo del IHS, que no se observó en los expuestos a los pesticidas de modo individual (Figura 3.6).



**Figura 3.6** Índice hepato-somático en *P. mesopotamicus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán (ED),  $\lambda$ -cialotrina ( $\lambda$ -C) y una mezcla de ambos (ED +  $\lambda$ -C), por 96 horas (CTR: control). Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar. (\*) Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .

### 3.3.2 Biomarcadores hematológicos

El ED produjo cambios significativos en algunas variables hematológicas de la serie roja (disminución de CGR y Hb), y alteración en el CDL debido a una disminución de Ne. Por su parte, el piretroide alteró la fórmula leucocitaria y los parámetros bioquímicos plasmáticos (GL y PT). La mezcla de ambos pesticidas produjo un aumento de CGB, así como también una marcada alteración de los componentes leucocitarios, representada principalmente por una disminución en el porcentaje de Li (Tabla 3.4).

	Control	Endosulfán (ED)	$\lambda$ -cialotrina ( $\lambda$ -C)	ED + $\lambda$ -C
<b>CGR</b> ( $10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	2,15 $\pm$ 0,06	1,80 $\pm$ 0,11 *	2,19 $\pm$ 0,11	2,35 $\pm$ 0,08
<b>Ht</b> (%)	38,72 $\pm$ 1,00	34,72 $\pm$ 0,94 *	38,78 $\pm$ 1,08	39,26 $\pm$ 1,08
<b>Hb</b> (g·dL <sup>-1</sup> )	7,43 $\pm$ 0,21	7,12 $\pm$ 0,28	7,54 $\pm$ 0,31	7,74 $\pm$ 0,25
<b>HCM</b> (pg)	36,10 $\pm$ 0,97	38,71 $\pm$ 2,89	33,49 $\pm$ 1,45	34,30 $\pm$ 1,23
<b>VCM</b> ( $\mu\text{m}^3$ )	185,00 $\pm$ 7,33	177,08 $\pm$ 11,88	173,20 $\pm$ 12,19	164,06 $\pm$ 10,78
<b>CHCM</b> (%)	19,86 $\pm$ 0,69	21,14 $\pm$ 0,73	19,58 $\pm$ 0,69	20,14 $\pm$ 0,78
<b>CGB</b> ( $\mu\text{L}$ )	4559 $\pm$ 612	4559 $\pm$ 612	5417 $\pm$ 524	9837 $\pm$ 1030 *
<b>Li</b> (%)	23,73 $\pm$ 6,17	41,34 $\pm$ 5,86	28,81 $\pm$ 4,32	9,21 $\pm$ 3,27 *
<b>Ne</b> (%)	50,93 $\pm$ 4,89	33,23 $\pm$ 4,83 *	35,03 $\pm$ 7,92 *	66,22 $\pm$ 8,55
<b>Eo</b> (%)	0,92 $\pm$ 0,78	1,45 $\pm$ 0,68	0,35 $\pm$ 0,17	9,45 $\pm$ 2,58 *
<b>Mo</b> (%)	14,13 $\pm$ 3,15	18,10 $\pm$ 3,18	18,12 $\pm$ 3,25	14,06 $\pm$ 3,39
<b>Tr</b> (%)	6,28 $\pm$ 2,59	5,88 $\pm$ 1,78	17,68 $\pm$ 5,82 *	1,06 $\pm$ 0,31 *
<b>GL</b> (g·L <sup>-1</sup> )	0,07 $\pm$ 0,005	0,07 $\pm$ 0,004	0,11 $\pm$ 0,01 *	0,07 $\pm$ 0,01
<b>PT</b> (g·dL <sup>-1</sup> )	3,20 $\pm$ 0,19	2,86 $\pm$ 0,18	2,06 $\pm$ 0,23 *	3,43 $\pm$ 0,26

Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar

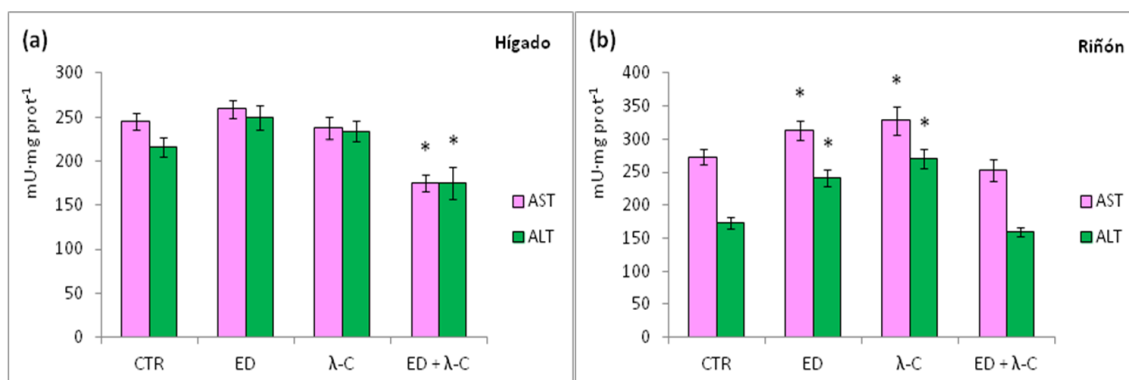
\* $p < 0,05$ , diferencias significativas en relación al control

**Tabla 3.4** Parámetros hematológicos en *P. mesopotamicus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán,  $\lambda$ -cialotrina y una mezcla de ambos, por 96 horas. Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar. Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .

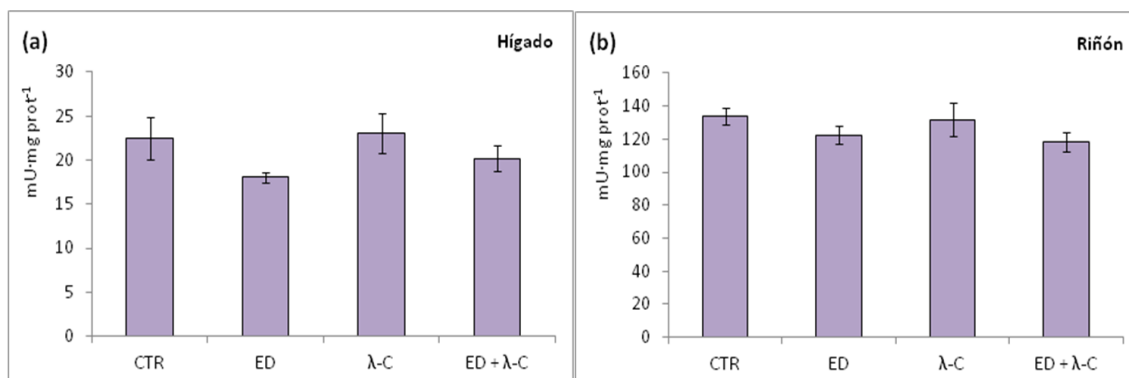
### 3.3.3 Transaminasas y fosfatasa alcalina

Con respecto a las enzimas indicadoras de daño tisular, no se observaron cambios en las enzimas hepáticas de los peces expuestos a ED y  $\lambda$ -cialotrina de modo individual. Sin embargo, la mezcla de ambos pesticidas produjo una disminución significativa en la actividad de ambas transaminasas (Figura 3.7a).

En riñón sólo se observó un aumento de la AST y ALT en los peces expuestos a ambos insecticidas de modo individual (Figura 3.7b), mientras que no se observaron cambios en la actividad de la FAL en ninguno de los tratamientos ni órganos analizados (Figura 3.8).



**Figura 3.7** Actividad de la aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT) en (a) hígado, y (b) riñón de *P. mesopotamicus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán (ED),  $\lambda$ -cialotrina ( $\lambda$ -C) y una mezcla de ambos (ED +  $\lambda$ -C), por 96 horas (CTR: control). Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar. (\*) Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .

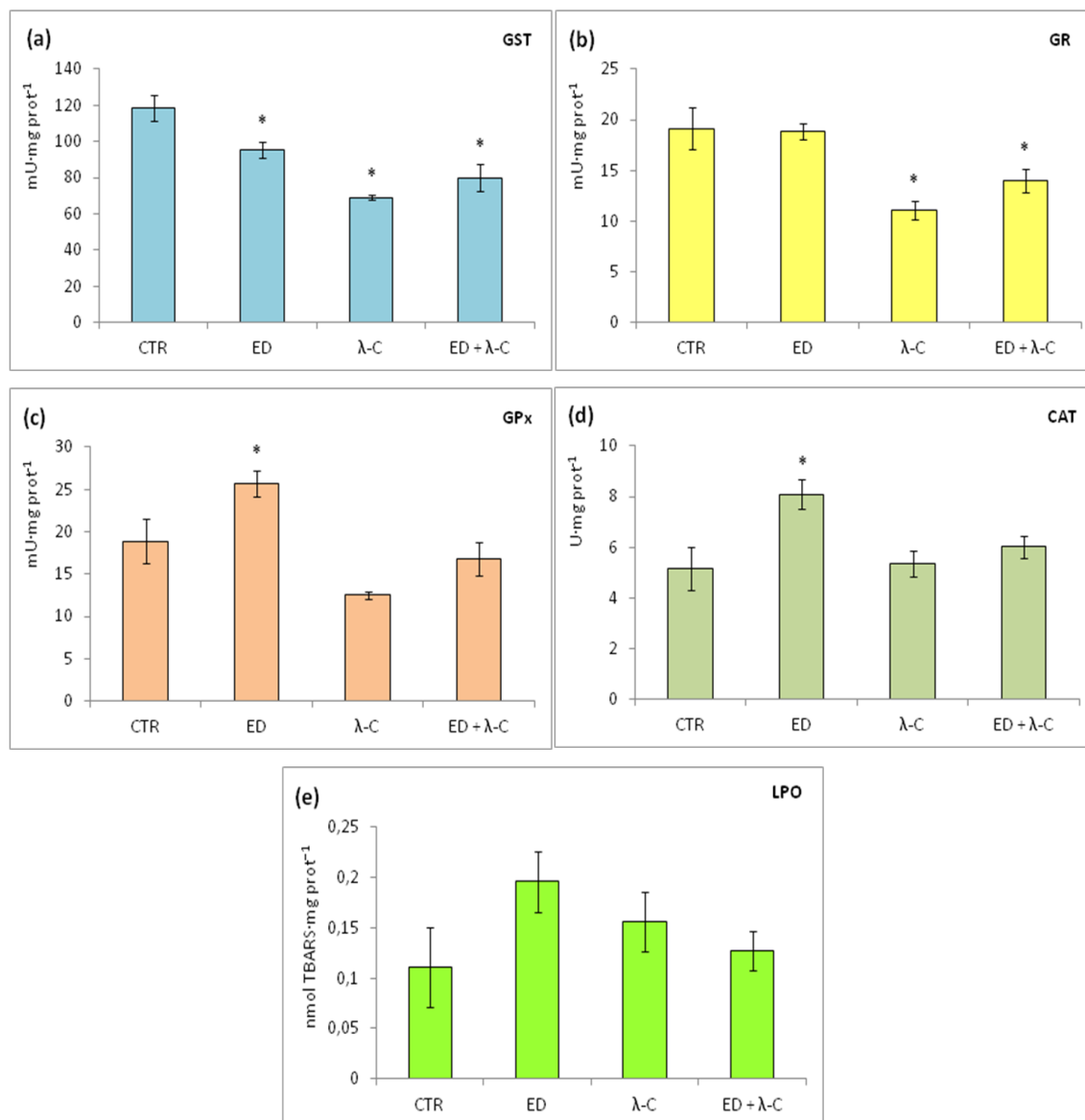


**Figura 3.8** Actividad de la fosfatasa alcalina (FAL) en (a) hígado, y (b) riñón de *P. mesopotamicus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán (ED),  $\lambda$ -cialotrina ( $\lambda$ -C) y una mezcla de ambos (ED +  $\lambda$ -C), por 96 horas (CTR: control). Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar.

### 3.3.4 Biomarcadores de estrés oxidativo

#### 3.3.4.1 Branquias

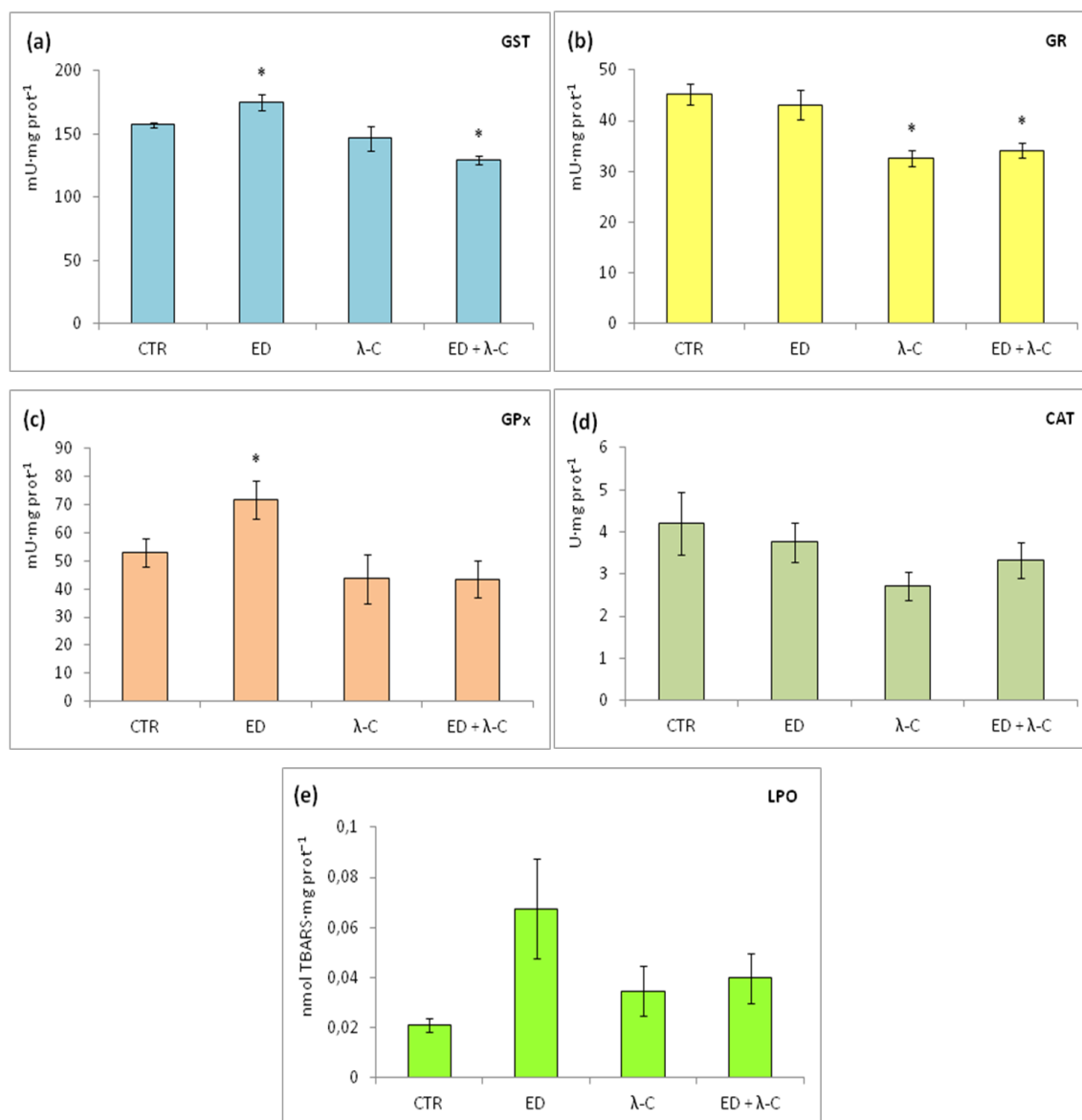
En las branquias se observó una alteración de la actividad de enzimas antioxidantes en los peces expuestos a los pesticidas de modo individual y en mezcla, sin registrarse cambios en los niveles de LPO en ninguno de los tratamientos (Figura 3.9).



**Figura 3.9** Actividad de las enzimas (a) glutatión S-transferasa (GST), (b) glutatión reductasa (GR), (c) glutatión peroxidasa (GPx), (d) catalasa (CAT), y (e) niveles de peroxidación lipídica (LPO), en **branquias** de *P. mesopotamicus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán (ED), λ-cialotrina (λ-C) y una mezcla de ambos (ED + λ-C), por 96 horas (CTR: control). Los valores se expresan como medias ± error estándar. (\*) Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .

### 3.3.4.2 Intestino

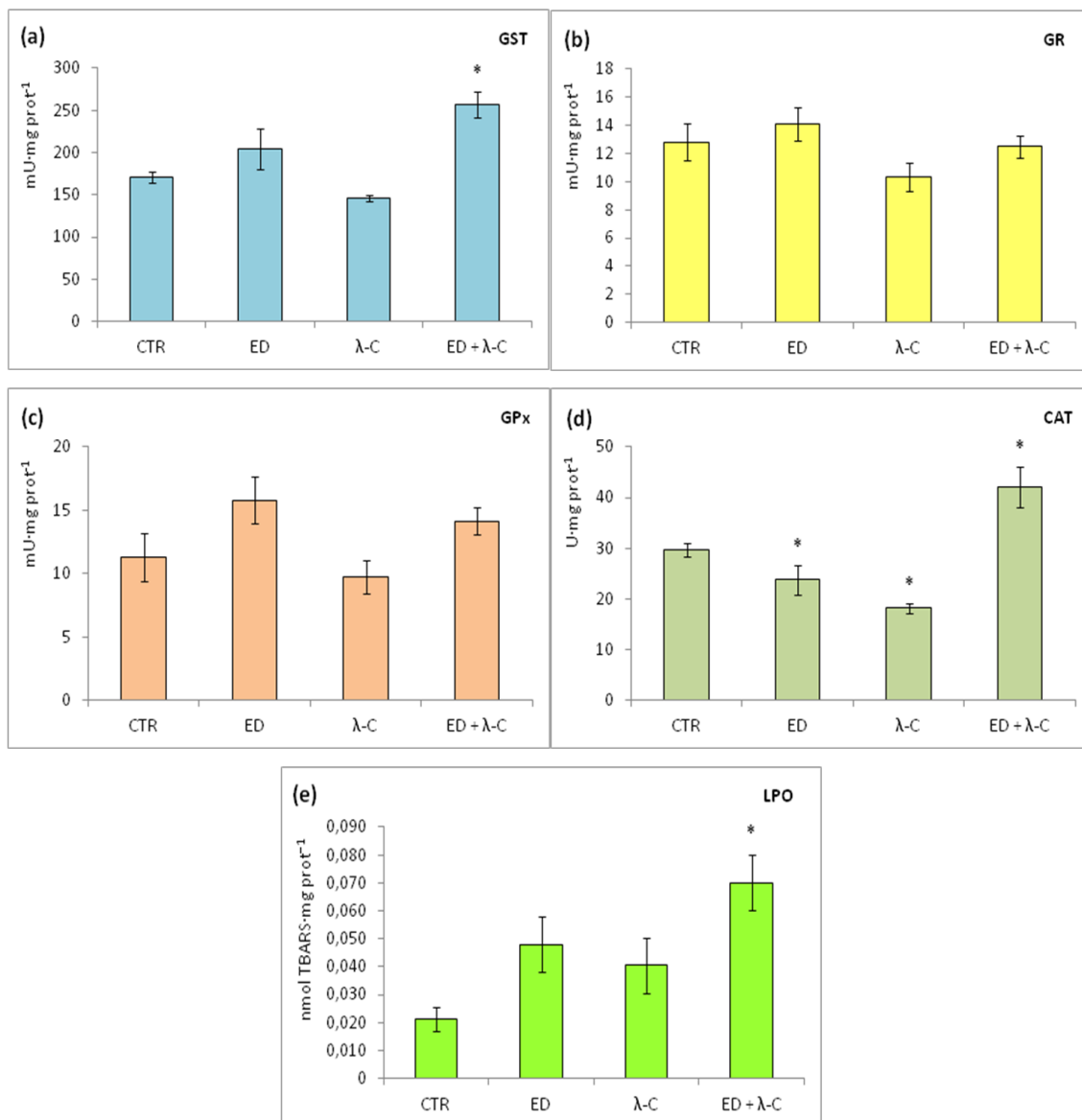
Se registraron sólo algunos cambios en la actividad de enzimas antioxidantes en el intestino de los peces expuestos a los pesticidas de modo individual. Al igual que en las branquias, se observó una disminución de las enzimas GST y GR en la mezcla, y no hubo cambios en los niveles de LPO en ninguno de los tratamientos (Figura 3.10).



**Figura 3.10** Actividad de las enzimas (a) glutatión S-transferasa (GST), (b) glutatión reductasa (GR), (c) glutatión peroxidasa (GPx), (d) catalasa (CAT), y (e) niveles de peroxidación lipídica (LPO), en **intestino** de *P. mesopotamicus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán (ED), λ-cialotrina (λ-C) y una mezcla de ambos (ED + λ-C), por 96 horas (CTR: control). Los valores se expresan como medias ± error estándar. (\*) Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .

### 3.3.4.3 Hígado

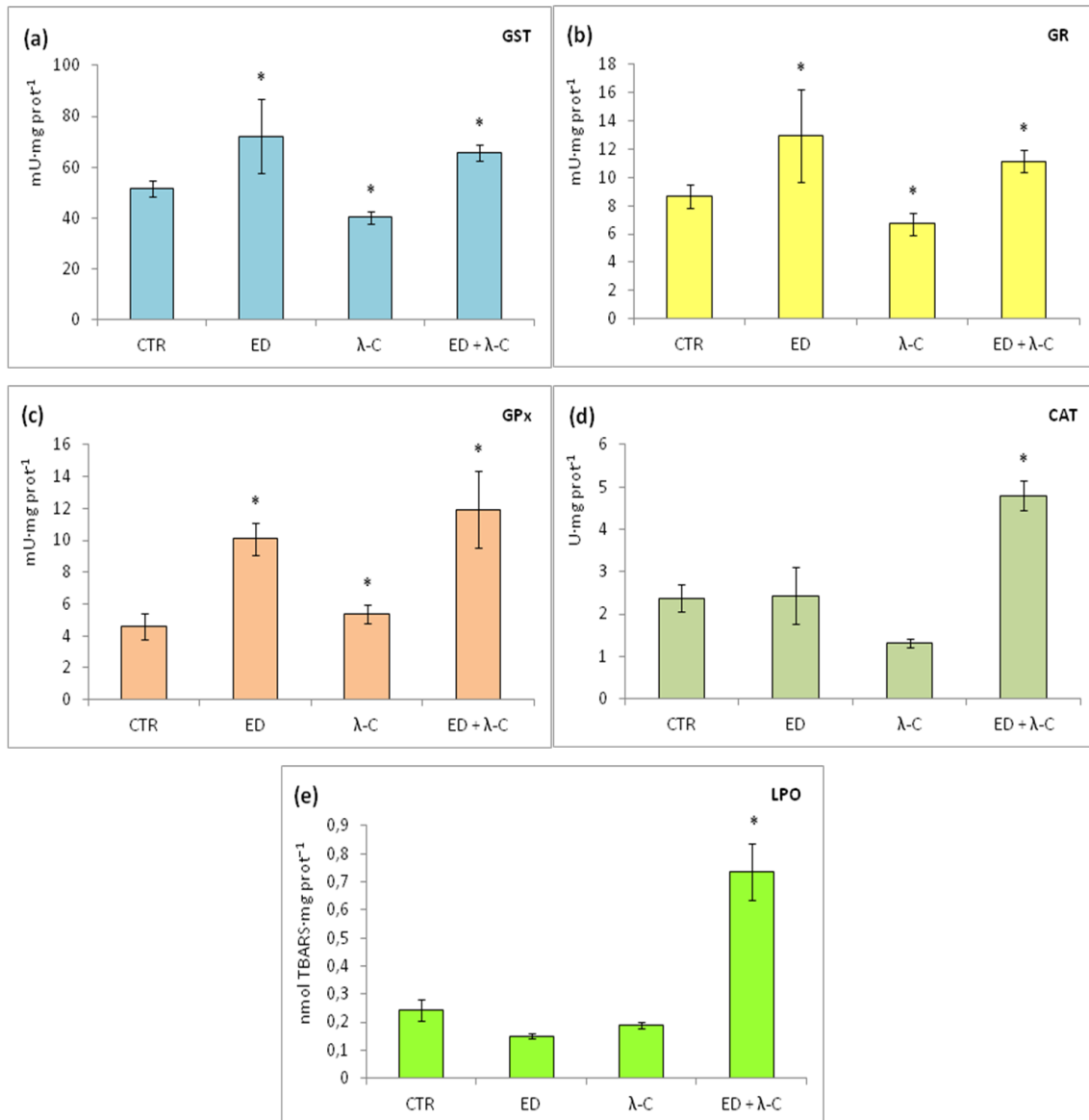
En el hígado, sólo se registró una disminución de la CAT en los peces expuestos a ED y  $\lambda$ -cialotrina de modo individual, mientras que en la mezcla, la actividad de la GST, CAT y los niveles de LPO se incrementaron (Figura 3.11).



**Figura 3.11** Actividad de las enzimas (a) glutatión S-transferasa (GST), (b) glutatión reductasa (GR), (c) glutatión peroxidasa (GPx), (d) catalasa (CAT), y (e) niveles de peroxidación lipídica (LPO), en **hígado** de *P. mesopotamicus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán (ED),  $\lambda$ -cialotrina ( $\lambda$ -C) y una mezcla de ambos (ED +  $\lambda$ -C), por 96 horas (CTR: control). Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar. (\*) Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .

### 3.3.4.4 Riñón

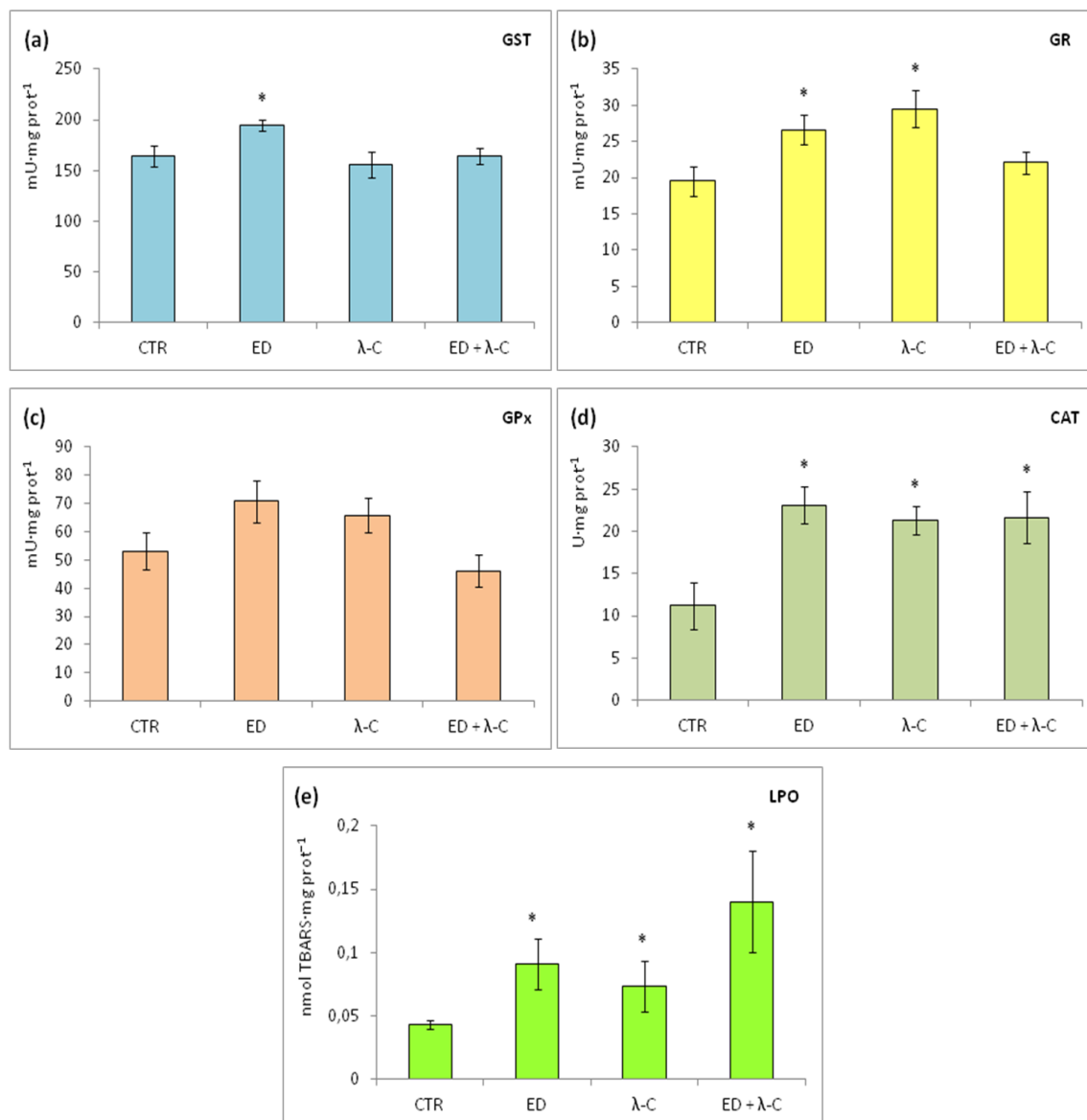
En el riñón de los peces expuestos a los pesticidas de modo individual, se observaron cambios en la actividad de las enzimas GST, GR y GPx, sin registrarse alteraciones en los niveles de LPO en dichos tratamientos (Figura 3.12). Por otro lado, todas las enzimas analizadas resultaron aumentadas en el riñón de los peces expuestos a la mezcla, así como también aumentaron los niveles LPO.



**Figura 3.12** Actividad de las enzimas (a) glutatión S-transferasa (GST), (b) glutatión reductasa (GR), (c) glutatión peroxidasa (GPx), (d) catalasa (CAT), y (e) niveles de peroxidación lipídica (LPO), en **riñón** de *P. mesopotamicus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán (ED), λ-cialotrina (λ-C) y una mezcla de ambos (ED + λ-C), por 96 horas (CTR: control). Los valores se expresan como medias ± error estándar. (\*) Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .

### 3.3.4.5 Cerebro

En general, se observó un aumento en la actividad de todas las enzimas antioxidantes analizadas en los peces expuestos a ambos pesticidas de modo individual, con excepción de la GPx, que no resultó alterada. La mezcla de ambos pesticidas produjo sólo un aumento de la CAT. Estos cambios fueron acompañados por un incremento en los niveles de LPO en todos los tratamientos (Figura 3.13).

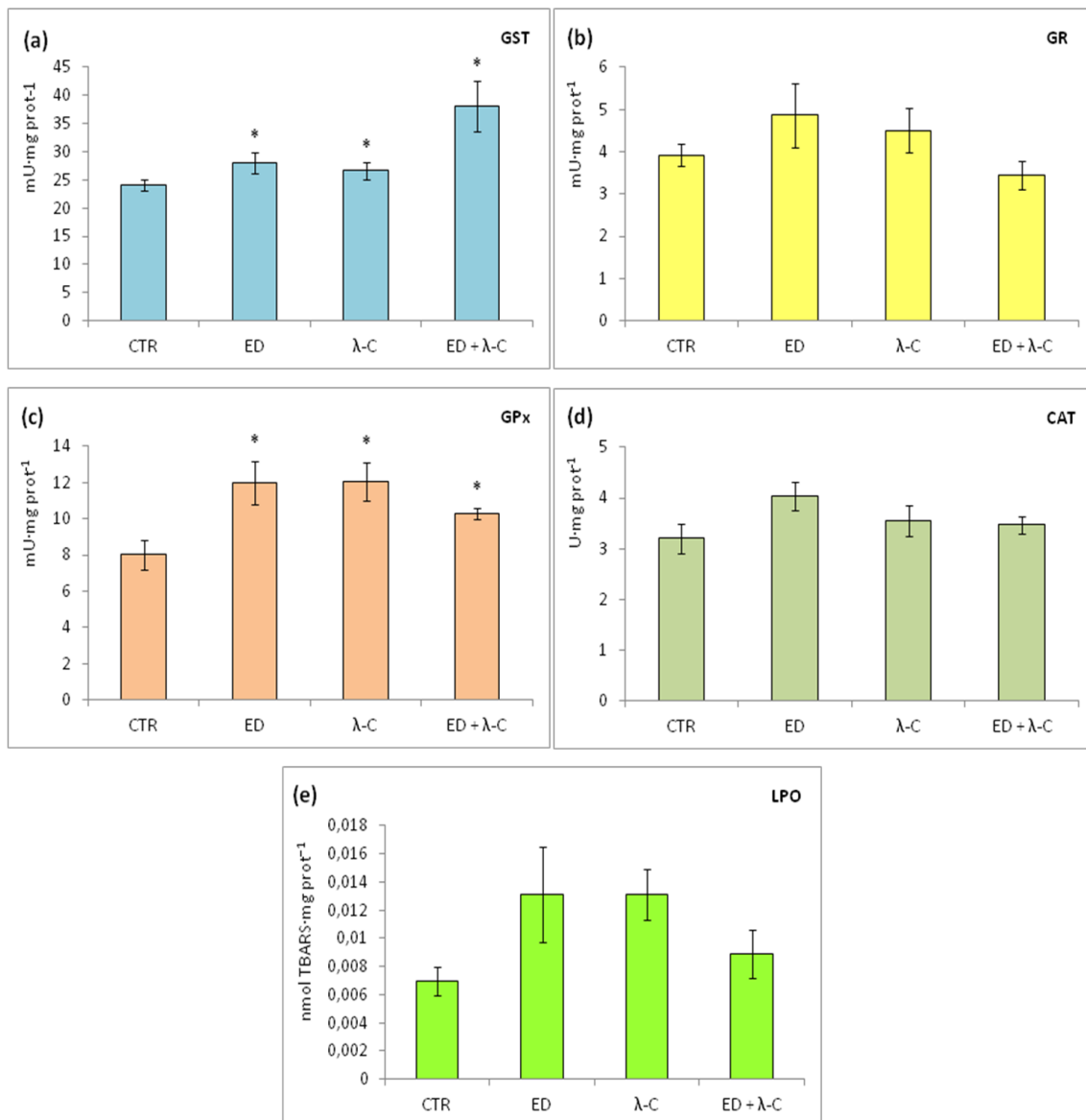


**Figura 3.13** Actividad de las enzimas (a) glutatión S-transferasa (GST), (b) glutatión reductasa (GR), (c) glutatión peroxidasa (GPx), (d) catalasa (CAT), y (e) niveles de peroxidación lipídica (LPO), en **cerebro** de *P. mesopotamicus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán (ED), λ-cialotrina (λ-C) y una mezcla de ambos (ED + λ-C), por 96 horas (CTR: control). Los valores se expresan como medias ± error estándar. (\*) Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .



### 3.3.4.6 Músculo

Se observó un aumento significativo en la actividad de la GST y GPx en el músculo de los peces expuestos a ED y  $\lambda$ -cialotrina de modo individual y en mezcla. No se observaron cambios significativos en los niveles de LPO en ninguno de los tratamientos (Figura 3.14).



**Figura 3.14** Actividad de las enzimas (a) glutatión S-transferasa (GST), (b) glutatión reductasa (GR), (c) glutatión peroxidasa (GPx), (d) catalasa (CAT), y (e) niveles de peroxidación lipídica (LPO), en **músculo** de *P. mesopotamicus* expuestos a diferentes concentraciones de Endosulfán (ED),  $\lambda$ -cialotrina ( $\lambda$ -C) y una mezcla de ambos (ED +  $\lambda$ -C), por 96 horas (CTR: control). Los valores se expresan como medias  $\pm$  error estándar. (\*) Las diferencias fueron significativas respecto del control cuando  $p < 0,05$ .



#### 4.1 TOXICIDAD AGUDA DEL ENDOSULFÁN

Los valores de la concentración letal media a las 96 horas ( $CL_{50-96h}$ ) del Endosulfán (ED) para *Piaractus mesopotamicus* ( $3,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), *Prochilodus lineatus* ( $3,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y *Cichlasoma dimerus* ( $17,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se encontraron dentro del rango de valores hallados en estudios publicados anteriormente con otras especies de peces (Tabla 4.1). La anguila asiática (*Monopterus albus*), *Jenynsia multidentata* y *Chanos chanos* parecen ser las especies más sensibles, con valores de  $CL_{50}$  inferiores a los de *P. mesopotamicus* y *P. lineatus* (Magesh y Kumaraguru, 2006; Ballesteros y col., 2007; Hii y col., 2007). Por otra parte, Wan y col. (2005) y Pandey y col. (2006), encontraron valores superiores en *Oncorhynchus mykiss* y *Channa punctatus*, con registros de  $4,6$  y  $7,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente.

La  $CL_{50-96h}$  para *C. dimerus* fue de  $17,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ED. Téllez-Bañuelos y col. (2009) registraron valores similares para *Oreochromis niloticus* ( $12,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Esta similitud en la sensibilidad al ED puede deberse a que ambas especies pertenecen a la Familia Cichlidae, conocida como una familia de peces relativamente tolerantes a condiciones de estrés. Debe considerarse que los diseños experimentales utilizados en cada estudio también fueron similares, ya que ambos fueron en condiciones estáticas y con un formulado comercial del ED con un 35% de principio activo. Estos valores de  $CL_{50-96h}$ , contrastan con los registrados por Da Cuña y col. (2011) para *C. dimerus* ( $2,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), y por Kumar y col. (2011) para *Oreochromis mossambicus* ( $3,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ya que son valores marcadamente más bajos. Esto puede deberse a que los autores utilizaron ED en su grado técnico (95-99 % de pureza) para la realización de los experimentos. Se conoce que la toxicidad de una sustancia química puede verse afectada por su formulación (Pereira y col., 2009). La

formulación comercial de un pesticida incluye ingredientes activos de grado técnico conocidos como “otros” ingredientes, que son considerados secretos comerciales y no son de conocimiento público. Allí se conocen casos donde los “otros” ingredientes han hecho la formulación comercial más tóxica que el ingrediente activo de grado técnico (Folmar y col., 1979; Tsui y Chu, 2003; Kitulagodage y col., 2008). Sin embargo, Puglis y Boone (2011) observaron que los ingredientes activos de grado técnico de los insecticidas  $\beta$ -ciflutrina, permetrina (piretroides) y carbaril (organofosforado) fueron más tóxicos para renacuajos que los formulados comerciales correspondientes. Como lineamiento de tareas para el futuro, son necesarios nuevos estudios para comprender las diferencias en la toxicidad de formulados comerciales del pesticida ED, en relación al ingrediente activo de grado técnico.

Especie	Pureza (%)	Sistema	CL <sub>50</sub>	Referencias
<i>Monopterus albus</i>	33	Estático	0,4	Hii y col. (2007)
<i>Chanos chanos</i>	35	Semi-estático	0,6	Magesh y Kumaraguru (2006)
<i>Jenynsia multidentata</i> ♂	35	Estático	0,7	Ballesteros y col. (2007)
<i>Clarias gariepinus</i>	96	Semi-estático	0,8	Ezemonye y Ikpesu (2010)
<i>Jenynsia multidentata</i> ♀	35	Estático	1,3	Ballesteros y col. (2007)
<i>Mystus vittatus</i>	35	Estático	2,0	Sharma y col. (2007)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	33	Semi-estático	1,7	Capkim y col. (2006)
<i>Cichlasoma dimerus</i>	95	Semi-estático	2,6	Da Cuña y col. (2011)
<i>Macrogathus aculeatum</i>	96	Flujo continuo	3,5	Rao y col. (1981)
<b><i>Piaractus mesopotamicus</i></b>	<b>35</b>	<b>Semi-estático</b>	<b>3,6</b>	<b>Presente estudio</b>
<i>Oreochromis mossambicus</i>	99	Estático	3,6	Kumar y col. 2011
<b><i>Prochilodus lineatus</i></b>	<b>35</b>	<b>Estático</b>	<b>3,7</b>	<b>Presente estudio</b>
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	40	Estático	4,6	Wan y col. (2005)
<i>Channa punctatus</i>	35	Flujo continuo	7,7	Pandey y col. (2006)
<i>Oreochromis niloticus</i>	35	Estático	12,8	Tellez-Bañuelos y col. (2009)
<b><i>Cichlasoma dimerus</i></b>	<b>35</b>	<b>Estático</b>	<b>17,7</b>	<b>Presente estudio</b>

**Tabla 4.1** Concentración letal media a las 96 horas (CL<sub>50</sub>-96h,  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) del Endosulfán para diferente especies de peces.

Las diferencias en la toxicidad del ED en varias especies ícticas, puede deberse a varios factores, tales como las diferencias en la sensibilidad del sitio de acción, los sistemas de detoxificación, el contenido de lípidos y el tamaño de los peces. Los procesos

metabólicos determinarán la cantidad de sustancia tóxica disponible para la interacción con los tejidos blanco (Chambers y Carr, 1995). Por ejemplo, los insecticidas organoclorados suelen ser altamente lipofílicos y suelen mantenerse fuera de circulación almacenándose en los depósitos y tejidos con alta concentración de lípidos. A pesar de que el ED es menos lipofílico que otros organoclorados (como el DDT, PCBs), Ballesteros y col. (2007) encontraron valores más bajos de  $CL_{50}$  en machos de *J. multidentata*, atribuido por los autores al mayor contenido de lípidos en hembras de esta especie. Otros factores conocidos que afectan la toxicidad del ED en organismos acuáticos son: la temperatura, salinidad, etapa del ciclo de vida del organismo, y las condiciones experimentales (Naqvi y Vaishnavi, 1993).

La estructura química y caminos metabólicos pueden ser determinantes importantes de la toxicidad de los pesticidas. El ED de grado técnico es una mezcla de los isómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ -endosulfán, en una proporción de 02:01-07:03. La biotransformación de ambos isómeros se produce en el hígado, a través de la oxidación del citocromo P450 (Lee y col., 2006). Esta vía metabólica conduce a la formación de endosulfán sulfato (ENS), el producto principal de la biotransformación de los dos isómeros en los organismos acuáticos (Wan y col., 2005). De todos los metabolitos del ED, el ENS parece ser el que se acumula en los peces, principalmente en hígado y riñones. Berntssen y col. (2008) encontraron una formación relativamente baja de este metabolito y mayor proporción de  $\alpha$ - y  $\beta$ -endosulfan en músculo de *Salmo salar* expuestos a ED a través de la dieta durante 92 días. Carriger y col. (2010) llevaron a cabo un ensayo agudo de toxicidad en dos peces autóctonos del sur de Florida expuestos a ENS. Se encontraron valores de  $CL_{50-96 h}$  de 2,1 y 2,7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para *Heterandria formosa* y *Gambusia affinis*, respectivamente, mostrando concentraciones letales similares a las reportadas para el ED de grado técnico.

Según los datos obtenidos sobre la toxicidad aguda del ED en *P. mesopotamicus*, *P. lineatus* y *C. dimerus*, puede concluirse que este insecticida es altamente tóxico para dichos peces neotropicales, al igual que para otras especies ícticas (US EPA, 2002). Además, es importante destacar que las concentraciones ambientales detectadas en cuerpos de agua de Argentina exceden los valores de  $CL_{50}$  hallados, por lo que puede suponerse que existe un peligro potencial que amenaza la integridad de las poblaciones de estas especies.

## 4.2 EFECTOS FISIOLÓGICOS SUBLETALES DEL ENDOSULFÁN. EXPERIMENTOS CON *Prochilodus lineatus* Y *Cichlasoma dimerus*

### 4.2.1 Índice hepato-somático

El índice hepato-somático (IHS) puede reflejar demanda de energía metabólica y estatus nutricional de corto plazo, y puede ser considerado un indicador general de la salud de un organismo, sensible a los efectos tóxicos de contaminantes ambientales (Everaarts y col., 1993; Almeida y col., 2005), particularmente pesticidas (Monteiro y col., 2006; Sancho y col., 2009; Thomaz y col., 2009). Luego de la exposición de *C. dimerus* a concentraciones subletales de ED, el IHS no resultó alterado. A pesar de que el valor promedio del IHS fue menor en los ejemplares expuestos a  $6,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , esta reducción no fue estadísticamente significativa. Coimbra y col. (2007) y Berntssen y col. (2010) encontraron una disminución significativa en el IHS del salmón del Atlántico y de la tilapia del Nilo expuestos por 16 a 35 días a ED, a través de la dieta. Por otro lado, Salvo y col. (2008) observaron una reducción en este índice en *Cyprinus carpio* expuestos a ED durante 15 días, la cual fue explicada por una disminución en el glucógeno hepático. Contrariamente, no se observaron cambios en el IHS en *Danio rerio* expuestos a concentraciones subletales de ED por 14 y 28 días (Velasco-Santamaría y col., 2011). La ausencia de una respuesta marcada en *C. dimerus* podría deberse a diferencias en la duración y ruta de exposición del ED.

#### 4.2.2 Hematología

Parámetros hematológicos, como el conteo de glóbulos rojos (CGR) o blancos (CGB), así como también los índices derivados, han sido considerados buenos indicadores de toxicosis en peces luego de la exposición a insecticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides (Singh y Srivastava, 2010). Por tratarse de componentes sanguíneos esenciales, la concentración de glóbulos rojos y blancos es mantenida dentro de límites definidos para cada especie de pez, a menos que se produzca un disturbio en el balance entre su producción y eliminación causado por procesos patológicos.

Los parámetros hematológicos en los peces del grupo control se hallaron dentro del rango de valores normales previamente descriptos por Parma de Croux (1994) para *P. lineatus*, y por Rey Vázquez y Guerrero (2007) para *C. dimerus*. Concentraciones subletales de ED tuvieron efectos adversos sobre los biomarcadores hematológicos en *P. lineatus*, principalmente en la concentración más alta ( $2,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Luego de 96 horas de exposición, el contenido de hemoglobina (Hb) y volumen corpuscular medio (VCM) disminuyeron significativamente en los peces expuestos. En estudios previos se observó una disminución del CGR, hematocrito (Ht) y Hb en peces expuestos a ED durante 96 horas (Shafiq-ur-Rehman, 2006; Hii y col., 2007; Kumar y col., 2011). En *P. lineatus*, Parma y col. (2007) y Simonato y col. (2008) reportaron resultados similares después de la exposición a cipermetrina y diesel, respectivamente, y concluyeron que los peces presentaban un cuadro de anemia causado por la exposición a dichas sustancias tóxicas. En peces expuestos al insecticida organofosforado clorpirifos, también fue observada una disminución de la Hb luego de 24 horas de exposición. Los autores argumentan que dicho cambio puede deberse a la rápida oxidación de la Hb a metahemoglobina, o a la liberación de radicales del oxígeno provocada por el estrés tóxico (Ramesh y Saravanan, 2008).

Por el contrario, *C. dimerus* expuestos a  $6,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mostraron mayores valores de Hb que los controles, lo que podría representar un aumento de la necesidad de transporte de oxígeno como resultado de los procesos de aclimatación al tóxico. Petri y col. (2006) también encontraron un aumento de la Hb y hemoglobina corpuscular media (HCM) en *S. salar* expuestos a concentraciones subletales de ED por 96 horas. Pimpão y col. (2007) observaron cambios similares en *Ancistrus multispinis* expuestos a deltametrina. Estos autores sostienen que un aumento en parámetros sanguíneos como la Hb, puede estar relacionado al mecanismo de neurotoxicidad de los piretroides. Al igual que estos

insecticidas, el ED inhibe los canales GABA, lo cual resulta en una estimulación excesiva del sistema nervioso central. Esta sobre-estimulación puede producir cierto grado de hipoxia en tejidos periféricos, y la consiguiente compensación a través del aumento del transporte de oxígeno desde la sangre.

Los pesticidas son fuertes inmuno-moduladores, que expresan sus efectos, ya sea por la inmunosupresión o inmunoestimulación (Bhattacharya, 2001). Los efectos del ED sobre la respuesta inmune de los peces han sido previamente estudiados. Por ejemplo, la exposición a concentraciones subletales de este insecticida disminuyó significativamente la actividad fagocítica en la tilapia del Nilo (Girón-Pérez y col., 2008) y el CGB en *M. albus* y *O. mossambicus* (Hii y col., 2007; Kumar y col., 2011). Por el contrario, en *P. lineatus* y *C. dimerus* expuestos a ED se observó un aumento significativo del CGB, lo que evidencia inmuno-estimulación. Una respuesta inmunológica similar fue observada por Téllez-Bañuelos y col. (2009), quienes registraron una activación de los macrófagos en el bazo de peces expuestos a ED. La leucocitosis reportada en estos estudios puede ser atribuida a una mayor movilización de leucocitos para proteger el cuerpo contra posibles infecciones en los tejidos dañados por el insecticida. Otros autores argumentan que un incremento en el CGB en peces expuestos a insecticidas refleja un estado general de toxicosis, que deriva en un deterioro de los mecanismos de defensa (Dutta y col., 1992; Ramesh y Saravanan, 2008).

El conteo diferencial de leucocitos (CDL) mostró que los linfocitos (Li) fueron los glóbulos blancos más frecuentes en la sangre de *P. lineatus* y *C. dimerus*, resultados que coinciden con los obtenidos para otras especies de peces (Páliková y col., 1999; Ranzani-Paiva y col., 2003; Velíšek y col., 2009). Los Li en peces han sido considerados como inmunocompetentes y, por lo tanto, son responsables de la producción de anticuerpos en reacciones inmunológicas (Singh y Srivastava, 2010). Los porcentajes de Li y neutrófilos (Ne) disminuyeron significativamente en *P. lineatus* expuestos a ED. Por el contrario, hubo un aumento en el porcentaje de monocitos (Mo) y trombocitos (Tr), mientras que los eosinófilos (Eo) se mantuvieron sin diferencias significativas, respecto al grupo control. Los resultados obtenidos en *P. lineatus* concuerdan con los encontrados por Shafiq-ur-Rehman (2006) en carpas (*Cyprinus carpio* var. *specularis*) expuestas a ED. Mazón y col. (2002) registraron un descenso significativo de Li y un aumento de Mo en *Prochilodus scrofa* expuesto a cobre, pero los Tr se mantuvieron sin cambios. Los Tr son comparables a las plaquetas de la sangre de mamíferos y actúan en la coagulación sanguínea, mientras que los Mo son los precursores y funcionan como macrófagos (Takashima y Hibisha,



1995). Puede sugerirse que los pesticidas desencadenan una movilización rápida del sistema hematopoyético y los peces modifican el tiempo de coagulación de la sangre mediante el aumento de la cantidad de Tr circulantes (Agrahari y col., 2006). Un gran número de estos glóbulos blancos puede reducir el tiempo de coagulación y prevenir la pérdida de sangre por hemorragias (Mazón y col., 2002). Esto fue corroborado por Adedeji y col. (2009), quienes reportaron un aumento significativo en el porcentaje de Tr, acompañado por una aceleración del tiempo de coagulación en peces expuestos al insecticida diazinon. Los Mo fagocitan no sólo materiales extraños, como bacterias, sino también las células muertas. Puede sugerirse que la migración de Mo en los peces expuestos a ED se debe a procesos inflamatorios en los tejidos dañados.

Por otro lado, en *C. dimerus* se observó una disminución del porcentaje de Ne en los peces expuestos a ED, mientras que los Li, Eo, Mo y Tr permanecieron sin cambios. La liberación de glucocorticoides durante situaciones de estrés estimula la afluencia de Ne en la sangre desde la médula ósea (neutrofilia) y la salida de los mismos desde la sangre a otros compartimentos (Bishop y col., 1968). Esta respuesta también fue observada en *P. lineatus* expuestos a una formulación comercial del herbicida glifosato durante 96 horas (Modesto y Martínez, 2010).

Cambios en los parámetros relacionados a la bioquímica plasmática sólo fueron observados en los ejemplares de *P. lineatus* expuestos a ED. Estos cambios consistieron en un aumento de los niveles de glucosa (GL) y una disminución de las proteínas totales (PT) en plasma. Resultados similares fueron hallados por Kumar y col. (2011) en tilapias expuestas a ED durante 96 horas. Un aumento de la GL en la sangre refleja una respuesta de estrés a una variedad de condiciones ambientales. Esto también se ha observado en *P. lineatus* expuestos a otros pesticidas (Winkaler y col., 2007; Langiano y Martínez, 2008; Pereira Maduenho y Martínez, 2008) así como también en ejemplares de esta especie colectados en sitios contaminados (Cazenave y col., 2009). Sastry y Siddiqui (1983) han informado una disminución en los niveles de GL en *C. punctatus* después de 30 días de exposición al ED. Es probable que un aumento del tiempo de exposición produzca cambios en el metabolismo de los hidratos de carbono, o derive en el uso de otros tipos de sustrato para asistir la demanda de energía provocada por el estrés toxicológico. La hiperglucemia es principalmente mediada por la acción del cortisol que estimula la gluconeogénesis hepática y detiene la absorción de azúcar periférica (Jobling, 1995). Sin embargo, estudios *in vivo* han demostrado una disminución en los niveles de cortisol en plasma de los peces expuestos a concentraciones subletales de ED (Thangavel y col., 2010). Dorval y col.

(2003) observaron los mismos resultados en células de riñón de trucha arco iris expuestas *in vitro* a ED. No obstante, se han observado aumentos de la GL en la sangre aun cuando la secreción de cortisol se altera. Trenzado y col. (2003) sugieren que un aumento de la glucosa puede ser atribuido a un mecanismo diferente, no vinculado al cortisol. En este sentido, se ha demostrado que las catecolaminas también pueden aumentar los niveles de azúcar en sangre (Wagner y col., 2003). Por lo tanto, se necesitan más estudios para explicar el mecanismo que conduce a un aumento de los niveles de glucosa inducida por el ED. Por otro lado, las PT del plasma en *P. lineatus* disminuyeron significativamente en ambos tratamientos de ED. Resultados similares se han reportado en peces expuestos a otros agroquímicos (por ejemplo, Gluszczak y col., 2006; Sweilum, 2006; John, 2007). Una reducción de esta naturaleza puede estar relacionado con una disminución de la síntesis de proteínas en el hígado (Joseph y Raj, 2011).

#### **4.2.3 Transaminasas y fosfatasa alcalina**

Las enzimas aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT), comúnmente denominadas transaminasas, son enzimas que intervienen en el metabolismo de los aminoácidos, y cambios en sus niveles pueden indicar daño hepático y renal (Karan y col., 1998; Begum, 2004; de la Torre y col., 2005, Borges y col., 2007). En el ensayo con *C. dimerus*, la actividad de las enzimas AST y ALT en hepatopáncreas se redujo significativamente en los peces expuestos a la mayor concentración de ED, que probablemente está relacionado con una citólisis y liberación de estas enzimas hacia la sangre. Rao y col. (2006) observaron una disminución de las transaminasas en hígado de peces expuestos a un insecticida organofosforado, acompañada por un aumento de estas enzimas en plasma, lo cual indicaría la utilización de aminoácidos para oxidación o glucogénesis.

La fosfatasa alcalina (FAL) es una enzima de origen hepato-biliar y muestra una baja actividad en el tejido hepático normal (Ramaiah y col., 2007). La actividad de la FAL aumentó significativamente en hepatopáncreas de *C. dimerus* expuestos a 3,4 µg·L<sup>-1</sup> de ED. Esta respuesta fue observada también por Peri y col. (2003), luego de la exposición de esta especie a diferentes concentraciones de efluentes de papeleras. Por lo general, elevados niveles de FAL se observan como resultado de una mayor actividad osteoblástica o debido a procesos de obstrucción biliar (Jyothi y Narayan, 1999). Bhavan y Geraldine (2001)

encontraron resultados similares en el camarón de agua dulce *Macrobrachium malcolmsonii* expuestos a ED durante 21 días, a una concentración de 0,032  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 4.2.4 Estrés oxidativo

El papel de los lípidos como componentes celulares destaca la importancia de comprender los mecanismos y las consecuencias de la peroxidación lipídica (LPO) en los sistemas biológicos (Kelly y col., 1998). Los contaminantes químicos, como los pesticidas, son una fuente importante de especies reactivas del oxígeno (ROS) en los organismos vivos (Valavanidis y col., 2006), y se ha demostrado que son capaces de alterar el equilibrio celular redox por diferentes mecanismos (Franco y col., 2009). Algunos autores sugieren que el ED induce daño oxidativo a través de la generación de ROS. Cuando las células de *Saccharomyces cerevisiae* (hongo unicelular tipo levadura) fueron expuestas a 250 mM de ED, la generación de ROS se incrementó 410% en comparación con el grupo control, lo que resultó en un aumento de la LPO (Sonh y col., 2004). Además, Téllez-Bañuelos y col. (2009) reportaron un aumento en la producción de ROS, la fagocitosis y LPO en macrófagos de tilapia del Nilo expuestos a ED. El exceso de ROS es contrarrestado por las enzimas antioxidantes para evitar el estrés oxidativo y daño celular. Sin embargo, es probable que el deterioro del sistema antioxidante, observado en las células renales de trucha arco iris expuestas *in vitro* a ED, afecte la capacidad de las células para defenderse, produciendo estrés oxidativo (Dorval y col., 2003).

En el presente estudio, se observó un aumento significativo de la LPO en hígado, intestino y cerebro de *P. lineatus* expuestos a concentraciones subletales de ED, mientras que no hubo cambios en los niveles de LPO en branquias. Por otro lado, un aumento significativo en este parámetro se observó en hepatopáncreas, branquias y cerebro de *C. dimerus*.

El hígado, así como también el hepatopáncreas, son órganos blanco potenciales para la acción tóxica de los pesticidas, ya que durante los procesos de biotransformación aumentan los radicales libres liberados en las reacciones redox con metales de transición y radicales libres de origen orgánico (Winston y Di Giulio, 1991). Ballesteros y col. (2009b) encontraron un aumento de LPO en hígado de *J. multidentata* expuestos a este pesticida, mientras que no se registraron cambios en el intestino. *P. lineatus* es un pez detritívoro

con un sistema digestivo complejo (Sverlij y col., 1993), lo que puede convertir al intestino en un órgano blanco susceptible a estrés oxidativo.

El aumento en los niveles de LPO en branquias de *C. dimerus* también ha sido reportado por Pandey y col. (2001) y Atif y col. (2005) en *Channa punctata* expuestos a ED, así como también en otros peces expuestos a insecticidas organofosforados (Monteiro y col., 2006; Oruç y Usta, 2007). En los peces, las branquias son órganos blanco sensibles por su gran área de intercambio entre los entornos externo e interno (Wendelaar Bonga y Lock, 2008). El estrés oxidativo en las branquias puede conducir a un deterioro de las funciones vitales, tales como el intercambio de gases, la regulación de iones y excreción de nitrógeno. Además, el aumento en la Hb en la sangre de *C. dimerus* refuerza la hipótesis de un deterioro de la capacidad respiratoria de los peces expuestos.

Como se observa en lo citado anteriormente, en ambas especies se registró un aumento de los niveles de LPO en el cerebro de los peces expuestos a ED. Estos resultados coinciden con los encontrados por Shafiq-ur-Rehman (2006) y Ballesteros y col. (2009b) en peces expuestos a concentraciones subletales de ED durante 96 horas. De acuerdo a Matés (2000), el cerebro es especialmente sensible al daño oxidativo. A pesar de la elevada tasa de producción de ROS, una alta tasa de metabolismo oxidativo y abundancia de PUFAs en la membrana celular, el cerebro tiene un sistema relativamente débil de defensa antioxidante.

### **4.3 EFECTOS FISIOLÓGICOS SUBLETALES DEL ENDOSULFÁN EN *Piaractus mesopotamicus*, DE MODO INDIVIDUAL Y EN COMBINACIÓN CON $\lambda$ -CIALOTRINA**

#### **4.3.1 *Índice hepato-somático***

Los peces expuestos a una combinación de ED ( $1,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y  $\lambda$ -cialotrina ( $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) mostraron un aumento significativo del IHS, que no fue observado en los expuestos a los tóxicos individuales. El incremento del tamaño del hígado, que deriva en un aumento del IHS, puede ser causado por procesos histológicos como la hiperplasia (aumento en el número de células) o hipertrofia (aumento del tamaño celular), y puede aumentar la capacidad del órgano de transformar xenobióticos (Martin y Black, 1998; Almeida y col., 2005). Slooff y col. (1983) resumen un número de estudios, que soportan la hipótesis de que hay una relación causal entre el agrandamiento del hígado y la exposición a compuestos químicos. Basados en análisis bioquímicos e histológicos, estos autores concluyeron que el aumento en el IHS en peces colectados en áreas contaminadas fue causado principalmente por la hipertrofia de los hepatocitos. Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los encontrados por Arnold y col. (1995), quienes observaron un aumento del IHS en *O. mykiss* expuestos a una mezcla de ED y el insecticida organofosforado disulfoton. Por último, dicho cambio fue también observado en peces expuestos a mezclas ambientales complejas de compuestos organoclorados (Gadagbui y Goksøyr, 1996).

### 4.3.2 Hematología

Si bien en *P. mesopotamicus* no se observaron cambios en la Hb e índices hematimétricos derivados, sí se produjo una disminución significativa del CGR y Ht en los peces expuestos a ED de modo individual. Estudios anteriores reportaron una disminución de estos biomarcadores en peces expuestos a concentraciones subletales del insecticida durante diferentes periodos de tiempo (Chandrasekar y Jayabalan, 1993; Shafiq-ur-Rehman, 2006; Hii y col., 2007; Velasco-Santamaría y col., 2011). Una respuesta similar de los parámetros hematológicos fue registrada por Tavares-Dias y col. (2002) en *P. mesopotamicus* expuestos a varias aplicaciones de sulfato de cobre. Kumar y col. (2011) también observaron una disminución del CGR en tilapias expuestas a ED, y argumentan que la exposición aguda causa un estado de anemia en los peces, debido al poder hemolítico del ED sobre las membranas de los glóbulos rojos. Otros autores opinan que una disminución del CGR puede ser atribuido a una reducción en la vida media de los glóbulos rojos y/o a un efecto supresor del insecticida en los tejido hematopoyéticos, que resulta en el fracaso de la producción de células sanguíneas (Adedeji y col., 2009).

Con respecto a los peces expuestos a  $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  del insecticida  $\lambda$ -cialotrina de modo individual, los cambios observados estuvieron relacionados principalmente a la bioquímica plasmática, ya que la exposición al piretroide produjo un aumento significativo de los niveles de GL y una disminución de las PT. Estudios anteriores reportaron resultados similares en peces expuestos a los piretroides cipermetrina y bifentrin (Borges y col., 2007; Velíšek y col., 2009). Estos cambios en los niveles de GL y PT en plasma observados en *P. mesopotamicus* expuestos a  $\lambda$ -cialotrina, también fueron observados en *P. lineatus* expuestos a ED. Las posibles causas de la ocurrencia de dichas alteraciones ya fueron discutidas en la Sección 4.2.2.

En los peces expuestos a la mezcla de ambos pesticidas se observó un aumento del CGB, cambio que no fue observado en los expuestos a ED y  $\lambda$ -cialotrina de modo individual. Como se expuso anteriormente, concentraciones subletales de ED son capaces de inducir una respuesta del sistema inmune en peces, como la observada en *P. lineatus* y *C. dimerus* en el presente estudio. Sin embargo, otros resultados son opuestos a los observados para estas especies (Hii y col., 2007; Kumar y col., 2011). Las respuestas observadas en peces expuestos a piretroides, tampoco son completamente consistentes, observándose efectos diversos en el CGB (Velíšek y col., 2007, 2009; Borges y col., 2007; Pimpão y col., 2007). Es probable que el aumento de este biomarcador en *P. mesopotamicus* expuestos a la mezcla

de ED y  $\lambda$ -cialotrina, sea debido a la adición de ambas concentraciones de los insecticidas, que de forma individual no alcanzaron a tener efectos significativos en los peces expuestos.

El CDL en los ensayos con *P. mesopotamicus* no mostraron tendencias claras relacionadas a la exposición individual o a la mezcla de ambos pesticidas. Los Ne fueron los glóbulos blancos más frecuentes en los ejemplares del grupo control. En los peces expuestos a ED y  $\lambda$ -cialotrina de modo individual, se observó una disminución significativa de estos glóbulos blancos, que no fue registrada en los expuestos a la mezcla. Esta respuesta también fue observada en *C. dimerus* expuestos a  $6,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ED, y su significado fisiológico ya fue discutido en la Sección 4.2.2. Si bien no se cuenta con antecedentes del efecto de pesticidas en el CDL de *P. mesopotamicus*, sí se observó una disminución del porcentaje de Ne en esta especie luego de la exposición a  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}$  de sulfato de cobre (Tavares-Dias y col., 2002).

En los peces expuestos a la mezcla de ED y  $\lambda$ -cialotrina, se registraron una disminución del porcentaje de Tr y Li, y un aumento de los Eo. Varios estudios reportaron estos cambios en peces expuestos a diferentes tipos de pesticidas (Kumar y col., 1999; Chandrasekara y Pathiratne, 2005). Adedeji y col. (2009) sostienen que una estimulación prolongada del sistema inmune causada por la exposición a insecticidas resulta en el desarrollo de linfopenia, acompañado por un incremento en el número de Ne y Eo. Este estado condiciona drásticamente la capacidad de los peces de reaccionar ante, por ejemplo, parásitos o enfermedades provenientes del ambiente.

Los procesos de sinergismo y antagonismo de mezclas de compuestos orgánicos son complejos, y no se cuenta con antecedentes de estudios que evalúen variables hematológicas en organismos expuestos a mezclas de pesticidas, aunque si pueden citarse trabajos con mezclas de metales (ej. Firat y Kargin, 2010)

### **4.3.3 Transaminasas y fosfatasa alcalina**

Se produjo un aumento en la actividad de las enzimas AST y ALT en el riñón de *P. mesopotamicus* expuestos a ED y  $\lambda$ -cialotrina de modo individual, respuesta que no fue observada en los expuestos a la mezcla de ambos pesticidas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Poleksic y Karan (1999) y Rao y col. (2006), quienes hallaron un aumento de la actividad de ambas transaminasas en el riñón de peces expuestos a

pesticidas. Estas enzimas son indicadores sensibles de daño celular, y un aumento de su actividad es indicador de problemas hepáticos (Karan y col., 1998; Begum, 2004; Borges y col., 2007; Ramaiah y col., 2007).

Luego de 96 horas de exposición a la mezcla de pesticidas, los peces mostraron una disminución significativa en los niveles de ambas transaminasas hepáticas. Aunque esta respuesta no fue observada en los peces expuestos a los tóxicos de modo individual, coincide con lo hallado en hepatopáncreas de *C. dimerus* expuestos a 6,8 µg·L<sup>-1</sup> de ED. La inhibición de las transaminasas se ha observado anteriormente en peces expuestos al herbicida 2,4-D, al insecticida Folidol, y a nonilfenol (Oruç y Üner, 1999; de Aguiar y col., 2004; Bhattacharya y col., 2008), aunque algunos autores han reportado niveles elevados de transaminasas hepáticas como consecuencia de la exposición a pesticidas (Philip y Rajasree, 1996; David y col., 2004; Crestani y col., 2006; Sancho y col., 2009, 2010).

La FAL no resultó alterada en ninguno de los tratamientos ni órganos analizados. Si se consideran los resultados obtenidos, puede concluirse que las transaminasas parecen ser más sensibles a la presencia de pesticidas que la FAL.

#### **4.3.4 Estrés oxidativo**

##### **4.3.4.1 Branquias**

En las branquias de *P. mesopotamicus* se observó una alteración en la actividad de enzimas antioxidantes de los peces expuestos a los pesticidas de modo individual y en mezcla, sin registrarse cambios en los niveles de LPO en ninguno de los tratamientos.

Uno de los cambios observados consistió en el aumento de la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) en los expuestos a ED de modo individual, que no fue observado en los expuestos a λ-cialotrina o a la mezcla de ambos pesticidas. Otros estudios reportaron un aumento en la GPx y otras enzimas antioxidantes en branquias de peces expuestos a ED por 24 horas, aparentemente con el fin de proveer protección contra posibles daños causados por ROS (Pandey y col., 2001; Atif y col., 2005). Sin embargo, en estos estudios, el aumento de la GPx fue acompañado por una disminución de la CAT, resultado opuesto al obtenido en el presente estudio. Contrariamente, Kumar y col. (2011) observaron un aumento de la actividad de la CAT en peces expuestos a ED por 96 horas. Estos autores argumentan que la CAT resultó ser la enzima antioxidante más sensible y con el mayor poder protector contra el daño oxidativo



en branquias de *O. mossambicus*. Según Zhang y col. (2004), la enzima GPx juega un papel importante contra la LPO, debido a que está involucrada principalmente en la remoción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de origen orgánico, protegiendo las membranas del daño causado por la oxidación. Esta observación sugiere que la función principal de detoxificación de la GPx es la terminación de la cadena de propagación de la LPO (van der Oost y col., 2003). En este contexto, el aumento de esta enzima en las branquias puede reflejar un mecanismo de defensa antioxidante efectivo, ya que no se observó aumento en los niveles de LPO en *P. mesopotamicus* expuestos a ED de forma individual.

Por otro lado, la exposición a ED y  $\lambda$ -cialotrina de modo individual y en mezcla produjo una disminución de la actividad de las enzimas glutatión S-transferasa (GST) y glutatión reductasa (GR) en las branquias de los peces expuestos. De modo similar, Ballesteros y col. (2009b) y Pesce y col. (2008) observaron una inhibición de la GST en branquias de peces neotropicales expuestos a ED y lindano, respectivamente. Esta respuesta fue observada también en *Carassius auratus* expuestos a tres insecticidas organofosforados y carbamatos, de modo individual y en mezcla, observándose una inhibición de la GST en todos los tratamientos (Wang y col., 2009). Las reacciones de biotransformación llevadas a cabo por enzimas de la fase I, como el citocromo P450, pueden producir una serie de metabolitos, que compiten con el sustrato de la GST por los sitios activos de esta enzima, inhibiendo su actividad (Egaas y col., 1999). Almlí y col. (2002) también registraron una disminución de la GST en branquias de trucha expuestas a una mezcla de dos fungicidas, aunque, contrariamente a lo observado en el presente estudio, dicha respuesta no fue observada en los expuestos a los fungicidas de modo individual. Como se citó anteriormente, la exposición a una mezcla de ED y  $\lambda$ -cialotrina produjo una disminución significativa de la GR, respuesta observada también en *C. punctata* expuestos a ED de modo individual, y a una mezcla de ED y cadmio (Atif y col., 2005). Lushchak y col. (2009) argumentan que una disminución en la actividad de ésta y otras enzimas, está relacionada a su inactivación por la presencia de determinadas clases de ROS. Por ejemplo, se conoce que tanto la GST como la GR son sensibles a los productos de la reacción de Harber-Weiss y de Fenton (Gutierrez-Correa y Stoppani, 1997; Hermes-Lima, 2004).

#### 4.3.4.2 Intestino

En el intestino de los peces expuestos a ED de modo individual, se observó un aumento de la actividad de la GST y de la GPx, mientras que, al igual que en las branquias,

la GST y la GR disminuyeron en los expuestos a la mezcla de ambos pesticidas. No son numerosos los antecedentes de medición de parámetros de estrés oxidativo en intestino de peces y otros organismos, y a su vez, muchas veces estos son inconsistentes. Pueden citarse los trabajos de Berntssen y col. (2010), Glover y col. (2007) y Ballesteros y col. (2009b) quienes estudiaron los efectos del ED (a través del agua o la dieta) en el intestino de peces, y no observaron cambios en ninguna de las enzimas analizadas. Por otro lado, un estudio reciente reportó un aumento de la actividad de la GST en el intestino de ejemplares adultos de anfibios (*Bufo regularis*) expuestos a diferentes concentraciones de ED y diazinon, de modo individual (Ezemonye y Tongo, 2010). El aumento de la actividad de la GST y GPX en *P. mesopotamicus* expuestos a ED de modo individual, fue acompañado por un aumento, aunque no significativo, de los niveles de LPO en dicho tratamiento.

#### 4.3.4.3 Hígado

En el hígado de los peces expuestos a ED y  $\lambda$ -cialotrina de modo individual, sólo se registró una disminución de la CAT, mientras que en la mezcla, se produjo una inducción de la actividad de las enzimas antioxidantes GST y CAT, acompañado por un aumento de los niveles de LPO.

La inhibición de la actividad de la CAT en hígado, ha sido reportada en numerosos estudios sobre la exposición de peces a diferentes concentraciones de ED (Pandey y col., 2001; Atif y col., 2005; Ballesteros y col., 2009b), del piretroide deltametrina (Sayeed y col., 2003), y de otros pesticidas (Crestani y col., 2007; Ferreira y col., 2010). Estos autores argumentan que la caída en la actividad enzimática de la CAT puede ser explicada por el aumento del flujo de aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) debido a la ocurrencia de estrés oxidativo, y correlacionan el aumento de los niveles de LPO en hígado, con la inhibición de la actividad de esta enzima. Si bien sólo se observó un aumento significativo en los niveles hepáticos de LPO en *P. mesopotamicus* expuestos a la mezcla, la exposición a los pesticidas de modo individual también produjo un leve incremento de los mismos, no significativo, respecto de los peces control. De modo contrario, la mezcla de ED y  $\lambda$ -cialotrina produjo un aumento de la CAT, que actúa específicamente sobre radicales  $H_2O_2$ , formando oxígeno y agua, y protegiendo los componentes celulares del daño oxidativo. El aumento en la actividad de esta enzima en el hígado de los peces expuestos a la mezcla, probablemente indica el incremento en la producción de  $H_2O_2$  durante las primeras fases del metabolismo de los insecticidas.

De modo similar, la mezcla produjo un aumento significativo de la actividad de la GST en el hígado de los peces expuestos. Una respuesta similar de la GST fue observada en *C. auratus* y *O. mykiss* expuestos a mezclas complejas de insecticidas (Oruç y Üner, 2000; Arnold y col., 2005; Wang y col., 2009). Esta respuesta es comúnmente esperada, ya que la GST juega un rol importante en la detoxificación y eliminación de compuestos electrofílicos, aunque también ha sido reportada su inhibición en hígado de *C. auratus* expuestos al herbicida glifosato (Lushchak y col., 2009). La inducción de la GST registrada en el presente estudio, podría indicar que las reacciones de conjugación que se producen en la fase II del metabolismo de xenobióticos sería una de las vías en el metabolismo de pesticidas en *P. mesopotamicus*. Se conoce que estas reacciones pueden generar ROS, y causar daños en componentes celulares, como los lípidos, lo cual podría estar relacionado con el aumento de la actividad de la CAT, con el fin de proteger dichos componentes. De este modo, numerosos estudios reportan la inducción simultánea de la GST y la CAT en hígado de peces expuestos a diferentes clases de pesticidas (Monteiro y col., 2006; Pereira Maduenho y Martinez, 2008; Thomaz y col., 2009; Kumar y col., 2011). Sin embargo, la puesta en marcha de los mecanismos de detoxificación y antioxidantes no logró contrarrestar el daño oxidativo, ya que los niveles hepáticos de LPO aumentaron significativamente en los peces expuestos a la mezcla de ED y  $\lambda$ -cialotrina, resultado que coincide con lo observado por Arnold y col. (1995) en trucha arco iris expuestas a la mezcla de ED y disulfoton.

#### 4.3.4.4 Riñón

En el presente estudio, se observó que el ED de modo individual y en combinación con  $\lambda$ -cialotrina indujo todas las enzimas antioxidantes testeadas (GST, GR, GPx y CAT) en el riñón de *P. mesopotamicus*. Estos resultados sugieren que la exposición al ED y la mezcla indujeron la producción de  $O_2^{\cdot-}$  que son convertidos a  $H_2O_2$  por la superóxido dismutasa (SOD), y éstos convertidos a agua y oxígeno por la CAT y la GPx. El camino metabólico de la GPx también detoxifica peróxidos lipídicos (Winston y Di Giulio, 1991) y requiere de la GR para mantener la concentración citosólica de GSH (Vieira y col., 2008). Esta inducción del sistema de defensa antioxidante, reflejada por el aumento de la actividad de múltiples enzimas, fue también reportada por Oruç y col. (2004) en riñón de *O. niloticus* expuestos al herbicida 2,4-D y al insecticida metil azinfos de modo individual, y en mezcla.

Por otro lado, los peces expuestos a  $\lambda$ -cialotrina de modo individual, mostraron una tendencia opuesta a la observada en el tratamiento ED y mezcla, ya que el piretroide

produjo una inhibición de la actividad de las enzimas GST, GPx y GR en el riñón de los peces expuestos. Esta respuesta fue también observada en las branquias de *P. mesopotamicus* expuestos a este tratamiento, así como también por Lushchak y col. (2009), quienes observaron una disminución de la actividad de la GR en riñón de peces expuestos a concentraciones subletales de glifosato. Así, puede suponerse que el ED resultó ser el modulador de la respuesta de las enzimas antioxidantes en el riñón de *P. mesopotamicus* expuestos a la mezcla de ambos pesticidas, ya que su efecto inductor fue observado en todas las enzimas analizadas en el presente estudio.

Más allá de las respuestas opuestas obtenidas en las enzimas antioxidantes en el riñón de los peces expuestos a ED y  $\lambda$ -cialotrina de modo individual, ninguno de estos tratamientos indujo alteraciones en los niveles de LPO, mientras que la mezcla de ambos pesticidas aumentó marcadamente los niveles de este biomarcador. Esto sugiere cierto grado de sinergismo entre los insecticidas ED y  $\lambda$ -cialotrina.

Los resultados obtenidos también resaltan la importancia del riñón en la actividad de detoxificación y antioxidante durante la exposición a insecticidas. El papel principal del hígado en los procesos de biotransformación de xenobióticos es de conocimiento amplio (Kleinow y col., 2008), además de poseer los niveles más altos de enzimas antioxidantes. Sin embargo, la respuesta antioxidante obtenida en el riñón de *P. mesopotamicus* fue relativamente más fuerte y consistente que la obtenida en hígado, sugiriendo que este órgano parece ser más sensible a los procesos de estrés oxidativo.

#### 4.3.4.5 Cerebro

Los peces expuestos al ED de modo individual mostraron una activación de todas las enzimas antioxidantes, excepto la GPx que no resultó alterada. Algunos de estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores en organismos expuestos a ED y otros pesticidas organoclorados. Por ejemplo, Ballesteros y col. (2009b) observaron un aumento en la actividad de la GST en *J. multidentata* expuestos a ED por 96 horas, aunque esta respuesta fue acompañada también por un incremento de la GPx. De modo similar, Pesce y col. (2008) y Ezemonye y Tongo (2010), quienes estudiaron los cambios de la GST en organismos expuestos a lindano y ED, respectivamente, también observaron un aumento de esta enzima en el cerebro de los peces expuestos.

Por otro lado, la actividad de la CAT resultó significativamente incrementada en los peces expuestos a ambos pesticidas de modo individual y en mezcla. Estos resultados son diferentes a los obtenidos por otros autores. Oruç y Üner (2004) y Wang y col. (2009)

observaron una inhibición de enzimas antioxidantes (GST y GPx) en peces expuestos a pesticidas de modo individual y en mezclas complejas, respuesta que no fue observada en el presente estudio. Si bien Lushchak y col. (2009) estudiaron los efectos de pesticidas en la actividad de la CAT en cerebro de peces, esta resultó inalterada luego de 96 horas de exposición.

El cerebro fue el único órgano estudiado que mostró un incremento significativo de los niveles de LPO en todos los tratamientos testeados. Como se citó anteriormente, el cerebro es considerado particularmente susceptible al estrés oxidativo, debido a su alta tasa de metabolismo oxidativo, presencia de neurotransmisores autooxidables (dopamina y norepinefrina), altos niveles de PUFAs, una defensa antioxidante relativamente débil, y la presencia de citocromo P450 (van der Oost y col., 2003). A su vez, debe tenerse en cuenta que ambos pesticidas testeados son neurotóxicos y el sistema nervioso es uno de sus principales órganos blanco. Estos resultados también son corroborados por otros autores, que reportaron un incremento en los niveles de LPO en el cerebro de peces expuestos a ED (Shafiq-ur-Rehman, 2006; Ballesteros y col., 2009b). Sin embargo, Gluszczak y col. (2007) y Moraes y col. (2007) encontraron resultados opuestos en peces opuestos a varios tipos de herbicidas.

#### 4.3.4.6 Músculo

Aunque los procesos de detoxificación ocurren principalmente en el hígado, el músculo está también involucrado en estos procesos. Se ha demostrado que las células del músculo esquelético son capaces de expresar diferentes tipos de enzimas que metabolizan xenobióticos, incluyendo el citocromo P450 (Bainy y col., 1999; Smith y col., 2000) y la GST (Hussey y col., 1991; van der Weiden y col., 1992). La exposición a ED y  $\lambda$ -cialotrina de modo individual, y en mezcla, produjo una inducción de la GST y GPx en el músculo de los peces expuestos. De modo similar, Monteiro y col. (2006) registraron un aumento de la actividad de la GST en músculo de *Brycon cephalus* expuestos al insecticida metil paratión. Estos autores argumentan que, aunque la cantidad relativa de enzimas antioxidantes en el músculo es menor que en el hígado, su importancia en la detoxificación puede ser considerable ya que representa un alto porcentaje de masa corporal. Con respecto a la actividad de la GPx, los resultados obtenidos en el presente trabajo son contradictorios a los observados por otros autores. Por ejemplo, Monteiro y col. (2006) y Ballesteros y col. (2009b) hallaron una inhibición significativa de esta enzima de músculo de peces

expuestos a ED y metil paratión, respectivamente. De modo similar, Sampaio y col. (2010) también encontraron esta respuesta en músculo de *P. mesopotamicus* expuestos a cobre.

Aunque son numerosos los antecedentes que reportan una inducción de LPO en músculo de peces expuestos a diferentes clases de pesticidas (Monteiro y col., 2006; Glusczak y col., 2007; Moraes y col., 2007; Oruç y Usta, 2007), los insecticidas ED y  $\lambda$ -cialotrina, no fueron capaces de producir esta respuesta en *P. mesopotamicus* ni de modo individual, ni en mezcla.

#### 4.4 CONCLUSIONES

- Los datos obtenidos de los ensayos de toxicidad aguda permiten inferir que, de las especies utilizadas en el presente trabajo, *P. mesopotamicus* y *P. lineatus* son las más sensibles a la exposición a ED, con  $CL_{50-96h}$  muy similares (3,6 y 3,7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente). Por otro lado, más alejada se encuentra *C. dimerus*, especie con un alto grado de tolerancia a la exposición respecto de otras especies de peces, reportándose una  $CL_{50-96h}$  de 17,7  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Por esta razón, esta especie podría ser poco recomendada como bioindicador tanto en ensayos de toxicidad en laboratorio, como biomonitoreos a campo. Los datos obtenidos en el presente estudio, refuerzan la premisa de que el ED debe ser clasificado como una sustancia altamente tóxica para los peces. Se espera que el presente estudio sobre la toxicidad aguda en tres especies de peces neotropicales sea una herramienta útil para la evaluación de los posibles riesgos de la contaminación con ED, y la determinación de criterios de calidad de agua para políticas de control y estrategias de conservación en regiones neotropicales.

- Concentraciones subletales de ED modificaron los parámetros hematológicos en *P. lineatus*, y *C. dimerus*. Los resultados obtenidos muestran que hubo cambios en la composición de la sangre, principalmente relacionados con el sistema inmunológico. Aunque estos cambios no producen directamente la muerte del organismo, podrían comprometer su capacidad para manejar las situaciones cambiantes del medio ambiente y los agentes infecciosos. A pesar de que los parámetros analizados no son específicos, estos resultados refuerzan su uso como biomarcadores de exposición a sustancias químicas, y como indicadores del estado de salud general de los peces.

- La exposición a concentraciones subletales de ED afectó órganos vitales en *P. lineatus* y *C. dimerus*, a través de trastornos metabólicos y daño oxidativo de los tejidos analizados, siendo el hígado, o hepatopáncreas, y el cerebro los más sensibles a dicho daño. Cabe destacar que, aunque reversibles, los cambios observados podrían afectar la salud de los peces en exposiciones crónicas, haciéndolos más sensibles a las variaciones del medio ambiente y menos resistentes a las enfermedades.

- La exposición a concentraciones subletales de ED y  $\lambda$ -cialotrina, mezcla comúnmente utilizada en nuestro país para proteger los cultivos de soja, produjo cambios hematológicos, alteración en enzimas metabólicas e inducción de daño oxidativo en órganos vitales de *P. mesopotamicus*, muchos de los cuales no fueron observados en los peces expuestos a los pesticidas de modo individual. De este modo, puede sugerirse que existe cierto grado de sinergismo entre ambos insecticidas. Los órganos más sensibles al daño oxidativo fueron el hígado, riñón y cerebro, pero en riñón se observó la respuesta antioxidante más importante. Así, el presente estudio revela que los peces expuestos desarrollarían respuestas adaptativas específicas de cada tipo de tejido, para proteger las células contra el daño causado por el ED y otros pesticidas. Los organismos de regulación y control deberían contar con escenarios de exposición complejos para evaluar eficazmente el riesgo ambiental. Entender cómo los contaminantes se comportan en mezclas es uno de los principales desafíos de la toxicología actual, y este conocimiento es importante para avanzar en la identificación de los peligros y la búsqueda de métodos de remediación ambiental.





## A

- Aaltonen, T.M.; Jokinen, E.I.; Salo, H.M.; Markkula, S.E. y Lammi, R. (2000a) *Modulation of immune parameters of roach, *Rutilus rutilus*, exposed to untreated ECF and TCF bleached pulp effluents*. *Aquat. Toxicol.* 47: 277 - 289.
- Aaltonen, T.M.; Jokinen, E.I.; Lappivaara, J.; Markkula, S.E.; Salo, H.M.; Leppänen, H. y Lammi, R. (2000b) *Effects of primary- and secondary-treated bleached kraft mill effluents on the immune system and physiological parameters of roach*. *Aquat. Toxicol.* 51: 55 - 67.
- Adams, S.M. (1990) *Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fishes*. *American Fisheries Society Symposium* 8: 1 - 8.
- Adedeji, O.B.; Adedeji, O.A.; Adeyemo, O.K. y Agbede, S.A. (2009) *Acute effects of diazinon on blood parameters in the African catfish (*Clarias gariepinus*)*. *Internet J. Hematol.* 5(2). [http://www.ispub.com/journal/the\\_internet\\_journal\\_of\\_hematology/volume\\_5\\_number\\_2\\_44/article/acute\\_effects\\_of\\_diazinon\\_on\\_blood\\_paramters\\_in\\_the\\_african\\_catfish\\_clarias\\_gariepinus.html](http://www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_hematology/volume_5_number_2_44/article/acute_effects_of_diazinon_on_blood_paramters_in_the_african_catfish_clarias_gariepinus.html)
- Agrahari, S.; Pandey, K.C. y Gopal, K. (2006) *Effect of monocrotophos on erythropoietic activity and hematological parameters of the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch)*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76: 607 - 613.
- Almeida, J.S.; Meletti, P.C. y Martinez, C.B.R. (2005) *Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus**. *Comp. Biochem. Physiol.* 140C (3-4): 356 - 363.

- Almli, B.; Egaas, E.; Christiansen, A.; Eklo, O.M.; Lode, O. y Källqvist, T. (2002) *Effects of three fungicides on glutathione S-transferase activity (GST) and cytochrome P-450 (CYP 1A1) in the liver and gill of brown trout (Salmo trutta)*. Mar. Environ. Res. 54: 237 - 240.
- Alonso, F.; Cánepa, M; Guimarães Moreira, R. y Pandolfi, M. (2011) *Social and reproductive physiology and behavior of the Neotropical cichlid fish Cichlasoma dimerus under laboratory conditions*. Neotropical Ichthyology (en prensa).
- Arias, A.M.; de la Torre, M. y Fijo, M.I. (2010) *Base de datos terminológicos y de identificación de especies pesqueras de las costas de Cádiz y Huelva*. [http://www.ictioterm.es/glosario\\_terminos\\_biologicos.php?lt=P#58](http://www.ictioterm.es/glosario_terminos_biologicos.php?lt=P#58)
- Arnold, H.; Plutab, H.-J. y Braunbeck, T. (1995) *Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton in vivo: ultrastructural; stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Aquat. Toxicol. 33: 17 - 43.
- ATDSR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2000) *Toxicological Profile for Endosulfan*. US Department of Health and Human Services Public Health Service, Atlanta. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp41.pdf>
- Atif, F.; Ali, M.; Kaur, M.; Rehman, H. y Raisuddin, S. (2005) *Modulatory effect of cadmium injection on endosulfan-induced oxidative stress in the freshwater fish Channa punctata Bloch*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 74: 777 - 784.
- Awasthi, N; Ahuja, R y Kumar, A (2000). *Factors influencing the degradation of soil applied endosulfan isomers*. Soil Biol. Biochem. 32: 1697 - 1705.

## B

- Bainy, A.C.D.; Woodin, B.R. t Stegeman, J.J. (1999) *Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir-São Paulo, Brazil*. Comp. Biochem. Physiol. 143C: 141 - 149.
- Ballatori, N. y Villalobos, A. (2002) *Defining the molecular and cellular basis of toxicology using comparative models*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 183: 207 - 220.
- Ballesteros, M.L.; Bianchi, G.B.; Carranza, M. y Bistoni, M.A. (2007) *Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in Jenynsia multidentata (Anablepidae, Cyprinodontiformes)*. J. Environ. Sci. Health 42B: 351 - 357.
- Ballesteros, M.L.; Durando, P.E.; Nores, M.L.; Díaz, M.P.; Bistoni, M. y Wunderlin, D.A. (2009a) *Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase*

- activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae; Cyprinodontiformes). Environ. Pollut. 5: 17 - 43.
- Ballesteros, M.L.; Wunderlin, D.A. y Bistoni, M.A. (2009b) Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72: 199 - 205.
- Barata, C.; Baird D.J.; Nogueira, A.J.A.; Soares, A.M.V.M. y Riva, M.C. (2006) Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. Aquat. Toxicol. 78: 1 - 14.
- Barron, M.G.; Stehly, G.R. y Hayton, W.L. (1990) Pharmacokinetic modeling in aquatic animals, I: models and concepts. Aquat. Toxicol. 18: 61 - 86.
- Baudino, O.M.; Suero, E.A.; Augusto, M.; Gimenez, M.E. y Flores, N. (2003) Monitoring organochlorine pesticides in surface and ground water in San Juan, Argentina. J. Chil. Chem. Soc. 48: 7 - 12.
- Begum, G. (2004) Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. Aquat. Toxicol. 66: 83 - 92.
- Bejarano Gonzales, F.; Casadinho Souza, J.; Weber, J.M.; Guadarrama Zugasti, C.; Escaramilla Prado, E.; Beristáin Ruiz, B.; Acosta, M.; Cárcamo, M.I. y Ramírez Muñoz, F. (2008) *El endosulfán y sus alternativas en América Latina*. Reporte de la Red de Acción de Plaguicidas y sus alternativas para América Latina (RAP-AL), y The International POPs Elimination Network (IPEN). [http://www.rapaluruaguay.org/endosulfan/Alternativas\\_endosulfan.pdf](http://www.rapaluruaguay.org/endosulfan/Alternativas_endosulfan.pdf)
- Bejarano Gonzales F.; Santivañez T.C.; Sarmiento Sanchez S.; Ramírez Muñoz F.; Pérez Consuegra N.; Jiménez Cid L.C.; Gonzáles C.; Maturana E.; Rozas M.E.; Lovera U. y González H. (2009) *El endosulfán y sus alternativas en América Latina 2*. Reporte de la Red de Acción de Plaguicidas y sus alternativas para América Latina (RAP-AL); y The International POPs Elimination Network (IPEN). [http://www.rap-al.org/articulos\\_files/Reporte%20II%20endosulfan%20con%20Port.pdf](http://www.rap-al.org/articulos_files/Reporte%20II%20endosulfan%20con%20Port.pdf)
- Bernabò, I.; Brunelli, E.; Berg, C.; Bonacci, A. y Tripepi, S. (2008) Endosulfan acute toxicity in *Bufo bufo* gills: Ultrastructural changes and nitric oxide synthase localization. Aquat. Toxicol. 86: 447 - 456.
- Berntssen, M.H.G.; Glover, C.N.; Robb, D.H.F.; Jakobsen, J.-V. y Petri, D. (2008) Accumulation and elimination kinetics of dietary endosulfan in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquat. Toxicol. 86: 104 - 111.
- Berntssen, M.H.G.; Tollefsen, K.-E.; Handy, R.D.; Julshamn, K.; Aasen, K.; Helland, E. y Petri, D. (2010) Assessing sensitivity of Atlantic salmon post-smolt to dietary endosulfan using histology and markers of endocrine disruption, oxidative stress, and biotransformation. Aquaculture 303: 86 - 93.

- Beutler, E. (1982) *Catalase*. En: *Red cell metabolism, a manual of biochemical methods* (Ed.: Beutler, E.) Grune and Stratton Inc., New York, p. 105 - 106.
- Beyer, J.; Sandvik, M.; Hylland, K.; Fjeld, E.; Egaas, E.; Aas, E.; Skaare, J.U. y Goksøyr, A. (1996) *Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (Platichthys flesus L.) and Atlantic cod (Gadus morhua L.) exposed by caging to polluted sediments in Sørffjorden, Norway*. *Aquat. Toxicol.* 36: 75 - 98.
- Bhattacharya, S. (2001) *Stress response to pesticides and heavy metals in fish and other vertebrates*. *Proc. Indian Natn. Sci. Acad. (PINS)* B67(5): 215 - 246.
- Bhattacharya, H.; Xiao, Q. y Lun, L. (2008) *Toxicity studies of nonylphenol on rosy barb (Puntius conchionius): A biochemical and histopathological evaluation*. *Tissue and Cell* 40: 243 - 249.
- Bhavan, P.S.; Zayapragassarazan, Z. y Geraldine, P. (1997) *Acute toxicity tests of endosulfan and carbaryl for the freshwater prawn, Macrobrachium malcolmsonii (H. Milne Edwards)*. *Poll. Res.* 16: 5 - 7.
- Bhavan, P.S. y Geraldine, P. (2000) *Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn Macrobrachium malcolmsonii exposed to endosulfan*. *Aquat. Toxicol.* 50: 331 - 339.
- Bhavan, P.S. y Geraldine, P. (2001) *Biochemical stress responses in tissues of the prawn Macrobrachium malcolmsonii on exposure to Endosulfan*. *Pest. Biochem. Physiol.* 70: 27 - 41.
- Biales, A.D.; Bencic, D.C.; Flick, R.L.; Blocksom, K.A.; Lazorchak, J.M. y Lattier, D.L. (2011) *Proteomic analysis of a model fish species exposed to individual pesticides and a binary mixture*. *Aquat. Toxicol.* 101: 196 - 206.
- Bishop, C.R.; Athens, J.W.; Boggs, D.R.; Warner, H.R.; Cartwright, G.E. y Wintrobe, M.M. (1968) *A non-steady-state kinetic evaluation of mechanism of cortisone-induced granulocytosis*. *The Journal of Clinical Investigation* 47: 249 - 260.
- Bisson, M. y Hontela, A. (2002) *Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 180: 110 - 117.
- Borges, A.; Scotti, L.V.; Siqueira, D.R.; Zanini, R.; do Amaral, F.; Jurinitz, D.F. y Wassermann, G.F. (2007) *Changes in hematological and serum biochemical values in jundiá Rhamdia quelen due to sub-lethal toxicity of cypermethrin*. *Chemosphere* 69: 920 - 926.
- Bradbury, S.P.; Carlson, R.W.; Henry, T.R.; Padilla, S. y Cowden, J. (2008). *Toxic responses of the nervous system*. En: *The Toxicology of Fishes*. (Eds. Di Giulio, R.T. y Hinton, D.E.) CRC Press, Boca Raton, p. 417 - 455.

Bradford, M.M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 72: 248 - 254.

## C

Camargo, M.M. y Martinez, C.B.R. (2006) *Biochemical and physiological biomarkers in Prochilodus lineatus submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 21: 61 - 69.

Capkin, E.; Altinok, I. y Karahan, S. (2006) *Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout*. Chemosphere 64: 1793 - 1800.

Carlson, E. y Zeikoff, J.T. (2008) *The immune system of fish: a target organ of toxicity*. En: *The Toxicology of Fishes*. (Eds. Di Giulio, R.T. y Hinton, D.E.) CRC Press, p. 489 - 430.

Carlson, R.W.; Bradbury, S.P.; Drummond, R.A. y Hammermeister, D.E. (1998) *Neurological effects on startle response and escape from predation by medaka exposed to organic chemicals*. Aquat. Toxicol. 43: 51 - 68.

Carriger, J.F.; Hoang, T.C. y Rand, G.M. (2010) *Survival time analysis of least killifish (Heterandria formosa) and mosquitofish (Gambusia affinis) in acute exposures to endosulfan sulfate*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 58: 1015 - 1022.

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*. Comp. Biochem. Physiol. 151A: 437 - 442.

Cavalcante, D.G.S.M.; Martinez, C.B.R. y Sofia, S.H. (2008) *Genotoxic effects of Roundup® on the fish Prochilodus lineatus*. Mut. Res. 655: 41 - 46.

Cazenave, J.; Wunderlin, D.A.; Hued, A.C. y Bistoni, M.Á. (2005) *Haematological parameters in a neotropical fish, Corydoras paleatus (Jenyns; 1842) (Pisces; Callichthyidae) captured from pristine and polluted water*. Hydrobiologia 537: 25 - 33.

Cazenave, J.; Bacchetta, C.; Parma, M.J.; Scarabotti, P.A. y Wunderlin, D.A. (2009) *Multiple biomarkers responses in Prochilodus lineatus allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe; Argentina)*. Environ. Poll. 157: 3025 - 3033.

Coimbra, A.M.; Reis-Henriques, M.A. y Darras, V.M. (2005) *Circulationg thyroid hormone levels and iodothyronine deiodinase activities in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) following dietary exposure to Endosulfan and Aroclor 1254*. Comp. Biochem. Physiol. 141C: 8 - 14.

- Coimbra, A.M.; Figueiredo-Fernandes, A. y Reis-Henriques, M.A. (2007) *Nile tilapia (Oreochromis niloticus), liver morphology, CYP1A activity and thyroid hormones after Endosulfan dietary exposure*. Pestic. Biochem. Physiol. 89: 230 - 236.
- Committee on Biological Markers of the International Research Council (1987). *Biological markers in environmental health research*. Environ. Health Perspec. 74: 3 - 9.
- Crestani, M.; Menezes, C.; Glusczak, L.; dos Santos Miron, D.; Lazzari, R.; Duarte, M.F.; Morsch, V.M.; Pippi, A.L. y Vieira, V.P. (2006) *Effects of Clomazone Herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish Rhamdia quelen*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 65: 48 - 55.
- Crestani, M.; Menezes, C.; Glusczak, L.; dos Santos Miron, D.; Spanevello, R.; Silveira, A.; Ferreira Gonçalves, F.; Zanella, R. y Lúcia Loro, V. (2007) *Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (Rhamdia quelen) and recovery pattern*. Chemosphere 67: 2305 - 2311.

## CH

- Chambers, J.H. y Carr, R.L. (1995) *Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity*. Toxicology 105: 291 - 304.
- Chandrasekar, S. y Jayabalan, N. (1993) *Hematological responses of the common carp, Cyprinus carpio L. exposed to the pesticide Endosulfan*. Asian Fisheries Science 6: 331 - 340.
- Chandrasekara, H.U. y Pathiratne, A. (2005) *Influence of low concentrations of trichlorofon on hematological parameters and brain acetylcholinesterase activity in common carp Cyprinus carpio*. Aquacult. Res. 36: 144 -149.
- Chèvre, N.; Maillard, E.; Loepfe, C. y Becker-van Slooten, K. (2008) *Determination of water quality standards for chemical mixtures: extension of a methodology developed for herbicides to a group of insecticides and a group of pharmaceuticals*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 71: 740 - 748.
- Chovanec, A.; Hofer, R. y Schiemer, F. (2003) *Fish as bioindicators*. En: *Bioindicators and Biomonitoring. Principles: Concepts and Applications* (Eds. Markert, B.A.; Breure, A.M. y Zechmeister, H.G) Elsevier, Oxford, p. 639 - 676.

## D

- Da Cuña, R.H.; Rey Vázquez, G.; Piol, M.N.; Guerrero, N.V.; Maggese, M.C. y LoNostro, F.L. (2011) *Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in Cichlasoma dimerus (Teleostei; Perciformes)*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74(4): 1065 - 1073.
- David, M.; Mushigeri, S.B.; Shivakumar, R. y Philip, G.H. (2004) *Response of Cyprinus carpio (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterations in protein metabolic profiles*. *Chemosphere* 56: 347 - 352.
- de Aguiar, L.H.; Moraes, G.; Avilez, M.I.; Altran, A.E. y Correâ, C.F. (2004) *Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, Brycon cephalus*. *Environ. Res.* 95: 224 - 230.
- de la Torre, F.R.; Salibián, A. y Ferrari, L. (2007) *Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish*. *Chemosphere* 68: 1582 - 1590.
- DeLorenzo, M.E.; Scott, G.I. y Ross, P.E. (1999) *Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(12): 2824 - 2835.
- Depledge, M.H. y Fossi, M.C. (1994) *The role of biomarkers in environmental assessment*. *Ecotoxicology* 3: 161 - 172.
- Di Giulio, R.T. y Meyer, J.N. (2008) *Reactive oxygen species and oxidative stress*. En: *The Toxicology of Fishes* (Eds. Di Giulio, R.T. y Hinton, D.E.) CRC Press, Boca Raton, p. 273 - 326.
- Dorts, J.; Silvestre, F.; Tu, H.T.; Tyberghein, A.-E.; Phuong, N.T. y Kestemont, P. (2009) *Oxidative stress; protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiger shrimp, Penaeus monodon, following exposure to endosulfan and deltamethrin*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28: 302 - 310.
- Dorval, J. y Hontela, A. (2003) *Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192(2): 191 - 200.
- Dorval, J.; Leblond, V.S. y Hontela, A. (2003) *Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide*. *Aquat. Toxicol.* 63: 229 - 241.
- Drotar, A.; Phelps, P. y Fall, R. (1985) *Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells*. *Plant Sci.* 42: 35 - 40.



- Dunier, M.; Siwicki, A.K.; Scholtens, J.; Molin, S.D.; Vergnet, C. y Studnicka, M. (1994) *Effects of lindane exposure on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) immunity*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 27: 324 - 334.
- Dutta, H.M. y Arends, D.A. (2003) *Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish*. Environ. Res. 91: 157 - 162.
- Dutta, H.M.; Dogra, J.V.V.; Singh, N.K.; Roy, P.K.; Nasar, S.T.T.; Adhakari, S.; Munshi, J.S.D. y Richmonds, C.R. (1992) *Malathion induced changes in serum protein and hematological parameters of Indian catfish Heteropneustes fossilis (Bloch.)*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 49: 91 - 97.

## E

- EFSA (European Food Safety Authority) (2005) *Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to endosulfan as undesirable substance in animal feed*. The EFSA Journal 234: 1 - 31. <http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/234.pdf>
- Egaas, E.; Sandvik, M.; Fjeld, E.; Kallqvist, T.; Goksøyr, A. y Svensen, A. (1999) *Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (Salmo trutta)*. Comp. Biochem. Physiol. 122C: 337 - 344.
- Elezović, M.; Budimir, M.; Karan, V. y Nešković, N.K. (1994) *Herbicides in water: Subacute toxic effects on fish*. En: *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. (Eds.: Muller, R. y Lloyd, R.) Fishing News Books, p. 30 - 38.
- Erickson, R.J.; Nichols, J.W.; Cook, P.M. y Ankley, G.T. (2008) *Bioavailability of chemical contaminants in aquatic systems*. En: *The Toxicology of Fishes* (Eds. Di Giulio, R.T. y Hinton, D.E.) CRC Press, Boca Raton, p. 9 - 54.
- Everaarts, J.M.; Shugart, L.R.; Gustin, M.K.; Hawkins, W.E. y Walker, W.W. (2003) *Biological markers in fish: DNA integrity, hematological parameters and liver somatic index*. Mar. Environ. Res. 35(1-2): 101 - 107.
- Evrard, E.; Marchand, J.; Theron, M.; Pichavant-Rafini, K.; Durand, G.; Quiniou, L. y Laroche, J. (2010) *Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder Platichthys flesus*. Comp. Biochem. Physiol. 152C: 321 - 331.

Ezemonye, L.I.N. y Ikpesu, T.O. (2011) *Evaluation of sub-lethal effects of endosulfan on cortisol secretion; glutathione-S-transferase and acetylcholinesterase activities in Clarias gariepinus*. Food and Chemical Toxicology 49(9): 1898 - 1903.

Ezemonye, L. y Tongo, I. (2010) *Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (Bufo reguraris)*. Chemosphere 81: 214 - 217.

## F

Fatima, M.; Ahmad, I.; Sayeed, I.; Athar, M. y Raisuddin, S. (2000) *Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues*. Aquat. Toxicol. 49: 243 - 250.

Faust, M.; Altenburger, R.; Backhaus, T.; Blanck, H.; Boedeker, W.; Gramatica, P.; Hamer, V.; Scholze, M.; Vighi, M. y Grimme, L.H. (2003) *Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action*. Aquat. Toxicol. 63: 43 - 63.

Ferrari, L. (2006) *Generalidades sobre Ecotoxicología*. En: *Genética Toxicológica*. (Eds. Mudry, M.D. y Carballo, M.A.) Ed. De los Cuatro Vientos, Buenos Aires, p. 393 - 421.

Ferreira, D.; Costa da Motta, A.; Kreutz, L.C.; Toni, C.; Loro, V.L. y Barcellos, L.J.G. (2010) *Assessment of oxidative stress in Rhamdia quelen exposed to agrochemicals*. Chemosphere 79: 914 - 921.

Firat, Ö. y Kargin, F. (2010) *Individual and combined effects of heavy metals on serum biochemistry of Nile tilapia Oreochromis niloticus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 58(1): 151 - 157.

Folmar, L.C.; Sanders, H.O. y Julin, A.M. (1979) *Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 8: 269 - 278.

Franco, R.; Sánchez-Olea, R.; Reyes-Reyes, E.M. y Panayiotidis, M.I. (2009) *Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois*. Mut. Res. 674: 3 - 22.

## G

- Gadagbui, B.K.M. y Goksøyr, A. (1996) *CYP1A and other biomarker responses to effluents from a textile mill in the Volta river (Ghana) using caged tilapia (*Oreochromis niloticus*) and sediment-exposed mudfish (*Clarias anguillaris*)*. *Biomarkers* 1: 252 - 261.
- Garcia, F.; Pilarski, F.; Onaka, E.M.; Ruas de Moraes, F. y Martins, M.L. (2007) *Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila**. *Aquaculture* 271: 39 - 46.
- Gill, T.S.; Pande, J. y Tewari, H. (1990) *Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon, and endosulfan in fish tissues*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 38(3): 231 - 244.
- Girón-Pérez, M.I.; Montes-López, M.; García-Ramírez, L.A.; Romero-Bañuelos, C.A. y Robledo-Marenco, M.L. (2008) *Effect of sub-lethal concentrations of endosulfan on phagocytic and hematological parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80: 266 - 269.
- Glover, C.N.; Petri, D.; Tollefsen, K.-E.; Jørum, N.; Handy, R.D. y Berntssen, M.H.G. (2007) *Assessing the sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan exposure using tissue biochemistry and histology*. *Aquat. Toxicol.* 84: 346 - 355.
- Gluszczac, L.; dos Santos Miron, D.; Crestani, M.; Braga de Fonseca, M.; de Araújo Pedron, F.; Frescura Duarte, M. y Vieira, D.L. (2006) *Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*)*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65: 48 - 55.
- Gluszczac, L.; dos Santos Miron, D.; Moraes, B.S.; Simões, R.R.; Schetinger, M.R.C.; Morsch, V.M. y Loro, V.L. (2007) *Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*)*. *Comp. Biochem. Physiol.* 146C: 519 - 524.
- Goede, R.W. y Barton, B.A. (1990) *Organismic indices and autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish*. *American Fisheries Society Symposium* 8: 93 - 108.
- Gormley, K.L. y Teather, K.L. (2003) *Developmental; behavioral; and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-term exposure to endosulfan*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54: 330 - 338.
- Gutierrez-Correa, J. y Stoppani, A.O. (1997) *Inactivation of yeast glutathione reductase by Fenton systems: effect of metal chelators, catecholamines and thiol compounds*. *Free Radic. Res.* 27(6): 543 - 55.

## H

- Habig, W.H.; Pabst, M.J. y Jakoby, W.B. (1974) *Glutathione S transferases. The first step in mercapturic acid formation*. J. Biol. Chem. 249: 7130 - 7139.
- Hahn, M.E. y Hestermann, E.V. (2008) *Receptor-mediated mechanism of toxicity*. En: *The Toxicology of Fishes*. (Eds. Di Giulio, R.T. y Hinton, D.E.) CRC Press, p. 235 - 272.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine Fourth Ed.* Oxford University Press, New York.
- Handy, R.D. y Depledge, M.H. (1999) *Physiological responses: Their measurement and use as environmental biomarkers in Ecotoxicology*. Ecotoxicology 8: 329 - 349.
- Harford, A.J.; O'Halloran, K. y Wright, P.F.A. (2005) *The effects of in vitro pesticide exposure on the phagocytic function of four Australian freshwater fish*. Aquat. Toxicol. 75: 330 - 342.
- Herman, R.L. (1990) *The role of Infectious agents in fish kills*. En: *Field Manual for the Investigation of Fish Kills* (Eds.: Meyer, F.P. y Barclay L.A.) United States Department of the Interior; Fish and Wildlife Service, Washington, p. 45 - 62.
- Hermes-Lima, M. (2004) *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of free radicals*. En: *Functional Metabolism. Regulation and Adaptation* (Ed. Stoney, K.B.) Wiley-Liss, New Jersey, p. 319 - 368.
- Hii, Y.S.; Yee, L.M. y Seng, C.T. (2007) *Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan and its effect on behavior and some hematological parameters of Asian swamp eel (Monopterus albus; Zuiew)*. Pestic. Biochem. Physiol. 89: 46 - 53.
- Hinton, D.E.; Segner, H. y Braunbeck, T. (2001) *Toxic response of the liver*. En: *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts Vol I* (Eds. Schlenk, D. y Benson, W.H.) Taylor & Francis, London, p. 224 - 268.
- Hori, T.S.F.; Avilez, I.M.; Inoue, L.K. y Moraes, G. (2006) *Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã Brycon cephalus (Teleostei: Characidae) juveniles*. Comp. Biochem. Physiol. 143C(1): 67 - 72.
- Houston, A.H. (1990) *Blood and Circulation*. En: *Methods for Fish Biology* (Eds.: Schreck, C.B. y Moyle, P.B.) American Fisheries Society, Bethesda, p. 273 - 334.
- Hussey, A.J.; Kerr, L.A.; Cronshaw, A.D.; Harrison, D.J. y Hayes, J.D. (1991) *Variation in the expression of Mu-class glutathione S-transferase isoenzymes from human skeletal muscle. Evidence of the existence of heterodimers*. J. Biochem. 273: 323 - 332.

Huuskonen, S.; Lindström-Seppä, P.; Koponen, K. y Roy, S. (1996) *Effects of non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls (congeners 77 and 126) on cytochrome P4501A and conjugation activities in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Comp. Biochem. Physiol. 113: 205 - 213.

## I

International Programme on Chemical Safety (IPCS) (1984) *Environmental Health Criteria 40; Endosulfan*. Reporte publicado por United Nations Environment Programme, International Labour Organisation, y World Health Organization, Ginebra.  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc40.htm>

## J

Jayashree, R. y Vasudevan, N. (2007) *Persistence and distribution of endosulfan under field condition*. Environ. Monit. Assess. 131: 475 - 487.

Jedamski-Grymlas, J.; Kammann, U.; Tempelmann, A.; Karbe, L. y Siebers, D. (1995) *Biochemical responses and environmental contaminants in breams (Abramis brama L.) caught in the river Elbe*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 31: 49 - 56.

Jergentz, S.; Mugni, H.; Bonetto, C. y Schulz, R. (2005) *Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina*. Chemosphere 61: 817 - 826.

Jobling, M. (1995) *Fish Bioenergetics*. Chapman & Hall, London.

John, P.J. (2007) *Alteration of certain blood parameters of freshwater teleost *Mystus vittatus* after chronic exposure to *Metasystox* and *Sevin**. Fish Physiol. Biochem. 33: 15 - 20.

Jomori, R.; Carneiro, D.J.; Malheiros, E.B. y Portella, M.C. (2003) *Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg; 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors*. Aquaculture 221: 277 - 287.

Jonsson, C.M. y Toledo, M.C.F. (1993) *Acute toxicity of endosulfan to the fish *Hyphessobrycon bifasciatus* and *Brachydanio rerio**. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 24: 151 - 155.

Joseph, B. y Raj, S.J. (2011) *Impact of pesticide toxicity on selected biomarkers in fishes*. Int. J. Zool. Res. 7(2): 212 - 222.

Jyothi, B. y Narayan, G. (1999) *Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish Clarias batrachus (Linn.)*. Food Chem. Toxicol. 37: 417 - 421.

## K

Kalender, S.; Kalender, Y.; Ogutcu, A.; Unluhisarcikli, M.; Durak, D. y Açikgoz, F. (2004) *Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E*. Toxicology 202: 227 - 235.

Kang, H.S.; Gye, M.C. y Kim, M.K. (2008) *Effects of endosulfan on survival and development of Bombina orientalis (Boulenger) embryos*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 81: 262 - 265.

Karan, V.; Vitorovic, S.; Tutundzic, V. y Poleksic, V. (1998) *Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 40: 49 - 55.

Kelly, S.A.; Havrilla, C.M.; Brady, T.C.; Harris Abramo, K. y Levin, E.D. (1998) *Oxidative stress in Toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems*. Environ. Health Perspectives 106: 375 - 384.

King, M.W. (2011) *Introducción al metabolismo de Aminoácidos*. Bioquímica Médica. <http://themedicalbiochemistrypage.org/spanish/amino-acid-metabolism-sp.html>

Kitulagodge, M.; Astheimer, L.B. y Buttemer, W.A. (2008) *Diacetone alcohol, a dispersal solvent, contributes to acute toxicity of a fipronil-based insecticide in a passerine bird*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 71: 597 - 600.

Kleinow K.M.; Nichols J.W.; Cook P.M.; Ankley G.T. (2008) *Toxicokinetics in fishes*. En: *The Toxicology of Fishes* (Eds. Di Giulio, R.T. y Hinton, D.E.) CRC Press, Boca Raton, p. 417 - 455.

Kohen, R. y Nyska, A. (2002) *Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicologic Pathology 30: 620 - 650.

Krøvel, A.V.; Søfteland, L.; Torstensen, V.E. y Olsvik, P.A. (2010) *Endosulfan in vitro toxicity in Atlantic salmon hepatocytes obtained from fish fed either fish oil or vegetable oil*. Comp. Biochem. Physiol. 151C: 175 - 186.

Kullander, S.O. (1983) *A revision of the South American Cichlid Genus Cichlasoma (Teleostei: Cichlidae)*. Swedish Museum of Natural History, Stockholm.

Kumar, S.; Lata, S. y Gopal, K. (1999) *Deltamethrin induced physiological changes in freshwater catfish *Heteropneustes fossilis**. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 62: 254 - 258.

Kumar, N.; Antony Jesu Prabhu, P.; Pal, A.K.; Remya, S.; Aklakur, Md.; Rana, R.S.; Gupta, S.; Raman, R.P. y Jadhao, S.B. (2011) *Anti-oxidative and immuno-hematological status of *Tilapia (Oreochromis mossambicus)* during acute toxicity test of endosulfan*. Pestic. Biochem. Physiol. 99: 45 - 52.

## L

Lajmanovich, R.C.; Cabagna, M.; Peltzer, P.M.; Stringhini, G.A. y Attademo, A.M. (2005) *Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla Pulchella* tadpoles (Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan*. Mut. Res. 587: 67 - 72.

Landis, W.G. y Yu, M.-H. (1999) *Introduction to Environmental Toxicology Second Ed.* Lewis Publishers.

Langiano, V.C. y Martinez, C.B.R. (2008) *Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus**. Comp. Biochem. Physiol. 147C: 222 - 231.

Leatherland, J.F.; Ballantyne, J.S. y van der Kraak, G. (1998) *Diagnostic assessment of non-infectious disorders of captive and wild fish populations and the use of fish as sentinel organisms for environmental studies*. En: *Fish Diseases and Disorders Vol 2: Non-infectious disorders* (Eds. Leatherland, J.F. y Woo, P.T.K.) CABI Publishing, New York, p. 335 - 366.

Lee, H.-K.; Moon, J.-K.; Chang, C.-H.; Choi, H.; Park, H.-W.; Park, B.-S.; Lee, H.-S.; Hwang, E.-C.; Lee, Y.-D.; Liu, K.-H. y Kim, J.-H. (2006) *Stereoselective metabolismo f endosulfan by human liver microsomes and human cytochrome P450 isoforms*. Drug Metabolism and Disposition 34: 1090 - 1095.

Lehninger, A.L. (1985) *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular, Segunda Edición*. Ediciones Omega, Barcelona.

Lemaire-Gony, S.; Lemaire, P. y Pulford, A.L. (1995) *Effects of cadmium and benzo[a]pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass *Dicentrarchus labrax**. Aquat. Toxicol. 31: 297 - 313.

- Leonard, A.W.; Hyne, R.V.; Lim, R.P. y Chapman, J.C. (1999) *Effect of endosulfan runoff from cotton fields on macroinvertebrates in the Namoi River*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42: 125 - 134.
- Lionetto, M.; Caricato, R.; Giordano, M.; Pascariello, M.; Marinosci, L. y Schettino, T. (2003) *Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area*. *Mar. Poll. Bull.* 46: 324 - 330.
- Livingstone, D.R.; Chipman, J.K.; Lowe, D.M.; Minier, C. y Pipe, R.K. (2000) *Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids*. *Int. J. Environ. Poll.* 13: 56 - 91.
- Lushchak, V.I. (2011) *Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals*. *Aquat. Toxicol.* 101: 13 - 30.
- Lushchak, O.V.; Kubrak, O.I.; Storey, J.M.; Storey, K.B.; Lushchak, V.I. (2009) *Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues*. *Chemosphere* 76: 932 - 937.

## M

- Machala, M.; Drabek, P.; Neca, J.; Kolarova, J. y Svobodova, Z. (1998) *Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar polychlorinated biphenyls, organochlorines pesticides, or 2;3;7;8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in trout liver*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41: 107 - 111.
- Magesh, S. y Kumaraguru, A.K. (2006) *Acute toxicity of endosulfan to the milkfish, *Chanos chanos*, of the southeast coast of India*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76: 622 - 628.
- Markert, B.A.; Breure, A.M. y Zechmeister, H.G. (2003) *Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment*. En: *Bioindicators and Biomonitoring. Principles, Concepts and Applications* (Eds. Markert, B.A.; Breure, A.M. y Zechmeister, H.G) Elsevier, Oxford, p. 3 - 39.
- Marking, L.L. (1985) *Toxicity of Chemical Mixtures*. En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. (Eds.: Rand, G.M. y Petrocelli, S.R.) Hemisphere Publishing Corporation, New York, p. 164 - 176.
- Marnett, L.J. (1999) *Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde*. *Mut. Res.* 424: 83 - 95.
- Martin, L.K. y Black, M.C. (1998) *Biomarker assessment of the effects of coal-strip mines contamination on channel fish*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41: 307 - 320.



- Martínez, M. y Wicki, G. (1997) *Guía práctica para el cultivo de pacú (Piaractus mesopotamicus)*. Dirección de Acuicultura; Secretaría de Agricultura; Ganadería; Pesca y Alimentación de la Nación, Argentina.
- Matés, J.M. (2000) *Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology*. *Toxicology* 153: 83 - 104.
- Mazon, A.F.; Monteiro, E.A.S.; Pinheiro, G.H.D. y Fernandes, M.N. (2002) *Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to Cooper in the freshwater fish, Prochilodus scrofa*. *Braz. J. Biol.* 62: 621 - 631.
- McCarty, L.S. y Borgert, C.J. (2006) *Review of the toxicity of chemical mixtures containing at least one organochlorine*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 45: 104 - 118.
- McKim, J.M.; Schmieder, P.K. y Veith, G.D. (1985) *Absorption dynamics of organic chemical transport across trout gills as related to octanol-water partition coefficient*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77: 1 - 10.
- Miller, D.S. (1987) *Aquatic models for the study of renal transport function and pollutant toxicity*. *Environ. Health Perspect.* 71: 59 - 68.
- Mishra, R. y Schuka, S.P. (1994) *Effects of endosulfan on bioenergetic properties of liver mitochondria from freshwater catfish Clarias batrachus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 50: 240 - 246.
- Modesto, K.A. y Martinez, C.B.R. (2010) *Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity*. *Chemosphere* 81(6): 781 - 787.
- Monserrat, J.M.; Martínez, P.E.; Geracitano, L.A.; Amado, L.L.; Martinez Gaspar Martins, C.; Pinho, G.L.L.; Chaves, I.S.; Ferreira-Cravo, M.; Ventura-Lima, J. y Bianchini, A. (2007) *Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives*. *Comp. Biochem. Physiol.* 146C: 221 - 234.
- Montagna, M.C. y Collins, P.A. (2007) *Survival and growth of Palaemonetes argentinus (Decapoda; Caridea) exposed to insecticides with chlorpyrifos and endosulfan as active element*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 371 - 378.
- Montagna, M.C. y Collins, P.A. (2008) *Oxygen consumption and ammonia excretion of the freshwater crab Trichodactylus borellianus exposed to chlorpyrifos and endosulfan insecticides*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 92: 150 - 155.
- Monteiro, D.A.; Alves de Almeida, J.; Rantin F.T. y Kalinin A.L. (2006) *Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, Brycon cephalus, exposed to organophosphorous insecticide Folisuper 600 (methyl parathion)*. *Comp. Biochem. Physiol.* 143C: 141 - 149.

Moraes, B.S.; Loro, V.L.; Gluszczak, L.; Pretto, A.; Menezes, C.; Marchezan, E. y Machado, S.O. (2007) *Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters on teleost fish (Leporinus obtusidens)*. Chemosphere 68: 1597 - 1601.

## N

Naqvi, S.M. y Vaishnavi, C. (1993) *Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals*. Comp. Biochem. Physiol. 105C: 347 - 361.

Newman, M.C. y Unger, M.A. (2003) *Fundamentals of Ecotoxicology Second Ed.* Lewis Publishers, Boca Raton.

Niimi, A.J. (1990) *Review of biochemical methods and other indicators to assess fish health in aquatic ecosystems containing toxic chemicals*. Journal of Great Lakes Research 16: 529 - 541.

Nimmo, D.R. (1985) *Pesticides*. En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. (Eds.: Rand, G.M. y Petrocelli, S.R.) Hemisphere Publishing Corporation, New York, p. 335 - 373.

Nowak, B. (1996) *Relationship between endosulfan residue level and ultrastructural changes in liver of catfish; Tandanus tandanus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 30: 195 - 202.

## O

Oakes, K.D.; McMaster, M.E. y van der Kraak, G.J. (2004) *Oxidative stress response in longnose sucker (Catostomus catostomus) exposed to pulp and paper mill and municipal sewage effluents*. Aquat. Toxicol. 67: 255 - 271.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) (1992) *Guideline for the testing of chemicals: fish; acute toxicity test N° 203*. <http://www.oecd.org/dataoecd/45/30/41888165.pdf>

Oliveira Ribeiro, C.A.; Filipak Neto, F.; Mela, M.; Silva, P.H.; Randi, M.A.F.; Rabitto, I.S.; Alves Costa, J.R.M. y Pelletier, E. (2006) *Hematological findings in neotropical fish Hoplias malabaricus exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride*. Environ. Res. 101: 74 - 80.

- Oruc, E.Ö. y Üner, N. (1999) *Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of Cyprinus carpio*. Environ. Poll. 105: 267 - 272.
- Oruc, E.Ö. y Üner, N. (2000) *Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of Oreochromis niloticus*. Comp. Biochem. Physiol. 127C: 291 - 296.
- Oruc, E.Ö. y Usta, D. (2007) *Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of Cyprinus carpio*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 23: 48 - 55.
- Oruç, E.Ö.; Sevgiler, Y. y Üner, N. (2004) *Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl*. Comp. Biochem. Physiol. 137C: 43 - 51.

## P

- Páliková, M.; Mareš, J. y Jirásek, J. (1999) *Characteristics of leukocytes and thrombocytes of selected sturgeon species from intensive breeding*. Acta Veterinaria Brunensis 68: 259 - 264.
- Palma, P.; Palma, V.L.; Fernandes, R.M.; Soares, A.M.V.M. y Barbosa, I.R. (2009) *Endosulfan sulphate interferes with reproduction, embryonic development and sex differentiation in Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72: 344 - 350.
- Pandey, S.; Parvez, A.S.; Bin-Hafeez, B.; Haque, R. y Raisuddin, S. (2001) *Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish Channa punctatus Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by cooper preexposure*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41: 345 - 352.
- Pandey, S.; Nagpure, N.S.; Kumar, R.; Sharma, S.; Srivastava, S.K. y Verma, M.S. (2006) *Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost Channa punctatus (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 65: 56 - 61.
- Pandolfi, M.; Cánepa, M.M.; Meijide, F.J.; Alonso, F.; Rey Vázquez, G.; Maggese, M.C. y Vissio, A.P. (2009) *Studies on the reproductive and developmental biology of Cichlasoma dimerus (Perciformes, Cichlidae)*. Biocell 33(1): 1 - 18.
- 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*. J. Environ. Biol. 28: 147 - 149.
- Parma de Croux, M.J. (1990) *Benzocaine (Ethyl-p-Aminobenzoate) as an anaesthetic for Prochilodus lineatus, Valenciennes (Pisces, Curimatidae)*. J. Appl. Ichthyol. 6: 189 - 192.

- Parma de Croux, M.J. (1994) *Some hematological parameters in Prochilodus lineatus (Pisces, Curimatidae)*. Revue d'Hydrobiologie tropicale 27: 113 - 119.
- Parrish, P.R. (1985) *Acute Toxicity Tests*. En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. (Eds.: Rand, G.M. y Petrocelli, S.R.) Hemisphere Publishing Corporation, New York, p. 31 - 57.
- Peakall, D.W. (1994) *Biomarkers: the way forward in environmental assessment*. Toxicol. Ecotoxicol. News 1: 55 - 60.
- Pereira, J.L.; Antunes, S.C.; Castro, B.B.; Marques, C.R.; Gonçalves, A.M.; Gonçalves, F. y Pereira, R. (2009) *Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient*. Ecotoxicology 18(4): 455 - 63.
- Pereira Maduenho, L. y Martinez, C.B.R. (2008) *Acute effects of diflubenzuron on the fish Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol. 148C: 265 - 272.
- Peri, S.I.; Pereira, L. y Quintero Blanco, S. (2003) *Biomarcadores en Cichlasoma facetum (Jenyns, 1842) expuestos a efluentes de papeleras de arroyos periurbanos*. Biología Acuática 20: 80 - 83.
- Pesce, S.F.; Cazenave, J.; Monferrán, M.V.; Frede, S. y Wunderlin, D.A. (2008). *Integrated survey on toxic effects of lindane on neotropical fish: Corydoras paleatus and Jenynsia multidentata*. Environ. Poll. 156(3): 775 - 783.
- Pesonen, M.; Andersson, T.B.; Sorri, V. y Korkalainen, M. (1999) *Biochemical and ultrastructural changes in the liver of Baltic salmon sac fry suffering from high mortality (M74)*. Environ. Toxicol. Chem. 18(5): 1007 - 1013.
- Petri, D.; Glover, C.N.; Ylving, S.; Kolås, K.; Fremmersvik, G.; Waagbø, R. y Berntssen, M.H.G. (2006) *Sensitivity of Atlantic salmon (Salmo salar) to dietary endosulfan as assessed by hematology, blood biochemistry, and growth parameters*. Aquat. Toxicol. 80: 207 - 216.
- Philip, G.H. y Rajasree, B.H. (1996) *Action of cypermethrin on tissue transamination during nitrogen metabolism in Cyprinus carpio*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 34: 174 - 179.
- Pimpão, C.T.; Zampronio, A.R. y Silva de Assis, H.C. (2007). *Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in Ancistrus multispinis (Pisces, Teleostei)*. Pestic. Biochem. Physiol 88: 122 - 127.
- Poleksic, V. y Karan, V. (1999) *Effects of Trifluralin on carp: Biochemical and histological evaluation*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 43: 213 - 221.
- Puglis, H.J. y Boone, M.D. (2011) *Effects of technical-grade active ingredient vs. commercial formulation of seven pesticides in the presence or absence of UV radiation on survival of green frog tadpoles*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 60: 145 - 155.

## Q

Quijano, R.F. (2000) *Risk assessment in a third world reality: an Endosulfan case history*. Inter. J. Occup. Environ. Health 6(4): 312 - 317.

## R

Ramaiah, S.K. (2007) *A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters*. Food Chem. Toxicol. 45: 1551 - 1557.

Ramesh, M. y Saravanan, M. (2008) *Haematological and biochemical responses in a freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to chlorpyrifos*. Int. J. Integr. Biol. 3(1): 80 - 83.

Rand, G.M. y Petrocelli, S.R. (1985) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, New York.

Ranzani-Paiva, M.J.T.; Rodriguez, E.L.; Veiga, M.L.; Eiras, A.C. y Campos, B.E.S. (2003) *Diferencial leukocyte counts in "doraudo", *Salminus maxillosus* Valenciennes, 184, from the Mogi-Guaçu river, Pirassununga, SP*. Braz. J. Biol. 63: 517 - 525.

Rao, V.J. (2006) *Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus**. Pestic. Biochem. Physiol. 86: 78 - 84.

Rao, D.M.R. y Murty, A.S. (1980) *Persistence of endosulfan in soils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 28: 1099 - 1101.

Rao, D.M.R.; Devi, A.P. y Murty, A.S. (1981) *Toxicity and metabolism of endosulfan and its effect on oxygen consumption and total nitrogen excretion of the fish *Macrogathus aculeatum**. Pestic. Biochem. Physiol. 15: 282 - 287.

Reichenbach-Klinke, H.H. (1980) *Enfermedades de los peces*. Acribia, Zaragoza.

Reitman, S. y Frankel, F. (1957) *A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic acid transaminase*. Am. J. Clin. Path. 28: 56 - 63.

Rey Vázquez, G. y Guerrero, G.A. (2007) *Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei; Perciformes)*. Tissue and Cell 39: 151 - 160.

- Roberts, R.J. (1981) *Patología de los peces*. Mundiprensa, Madrid.
- Rodwell, V.W. (1997) *Catabolismo de proteínas y del nitrógeno de aminoácidos*. En: *Bioquímica de Harper* (Eds. Murray, R.K.; Mayes, P.A.; Granner, D.K.; Rodwell, V.W.) Ed. El Manual Moderno 14<sup>ed</sup>, México, p. 351 - 362.
- Rossi, L.; Cordiviola, E. y Parma, M.J. (2007) *Fishes*. En: *The Middle Paraná River. Limnology of a Subtropical Wetland*. (Eds.: Iriondo, M.H.; Paggi, J.C. y Parma, M.J.) Springer, Berlin, p. 305 - 321.

## S

- Salvo, L.M.; Sinhorini, I.L.; Malucelli, B.E.; Klemz, C.; Sanchez, D.C.O.; Nicaretta, L.; Malucelli, M.I.C.; Bacila, M. y Assis, H.C.S. (2008) *Effects of endosulfan sublethal concentrations on carp (Cyprinus carpio, Linnaeus, 1758): Morphometric, histologic, ultrastructural analyses and cholinesterase activity evaluation*. Braz. J. Vet. Re. Anim. Sci. 45(2): 87 - 94.
- Sampaio, F.G.; Boijink, C.L.; dos Santos, L.R.B; Oba, E.T.; Kalinin, A.L. y Rantin, F.T. (2010) *The combined effect of cooper and low pH on antioxidant defenses and biochemical parameters in neotropical fish pacu, Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887)*. Ecotoxicology 19: 963 - 976.
- Sanchez-Dardon, J.; Voccia, I.; Hontela, A.; Chilmonczyk, S.; Dunier, M.; Boermans, H.; Blakley, B. y Fournier, M. (1999) *Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed in vivo*. Environ. Toxicol. Chem. 18(7): 1492 - 1497.
- Sancho, E.; Fernández-Vega, C.; Andreu, E. y Ferrando, M.D. (2009) *Effects of propanil on the European eel Anguilla anguilla and post-exposure recovery using selected biomarkers as effect criteria*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72: 704 - 713.
- Sancho, E.; Villarroel, M.J.; Fernández, C.; Andreu, E. y Ferrando, M.D. (2010) *Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (Danio rerio)*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73: 370 - 376.
- Sarma, K.; Pal, A.K.; Sahu, N.P.; Ayyappan, S. y Baruah, K. (2009) *Dietary high protein and vitamin C mitigates endosulfan toxicity in the spotted murrel, Channa punctatus (Bloch, 1793)*. Sci. Total Environ. 407: 3668 - 3673.

- Sastry, K.V. y Siddiqui, A.A. (1983) *Metabolic changes in the snake head fish Channa punctatus chronically exposed to endosulfan*. Water, Air, and Soil Pollution 19: 133 - 141.
- Saxena, K.K. y Seth, N. (2002) *Toxic effects of cypermethrin on certain hematological aspects of fresh water fish Channa punctatus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 69: 364 - 369.
- Sayed, I.; Parvez, S.; Pandey, S.; Bin-Hafeez, B.; Rizwanul, H. y Raisuddin, S. (2003) *Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, Channa punctatus Bloch*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56: 295 - 301.
- Schlenk, D.; Handy, R.; Steinert, S.; Depledge, M.H. y Benson, W. (2008a). *Biomarkers*. En: *The Toxicology of Fishes* (Eds. Di Giulio, R.T. y Hinton, D.E.) CRC Press, Boca Raton, p. 683 - 731.
- Schlenk, D.; Celander, M.; Gallagher, E.P.; George, S.; James, M.; Kullman, S.W.; van der Hurk, P. y Willett, K. (2008b) *Biotransformation in fishes*. En: *The Toxicology of Fishes* (Eds. Di Giulio, R.T. y Hinton, D.E.) CRC Press, Boca Raton, p. 153-234.
- Schultz, I.R.; Orner, G.; Merdink, J.K. y Skilman, A. (2001) *Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascular administration of 17alpha-ethynylestradiol*. Aquat. Toxicol. 51: 305 - 318.
- Shafiq-ur-Rehman (2006) *Endosulfan toxicity and its reduction by selenium: a behavioral, hematological and peroxidative stress evaluation*. The Internet Journal of Toxicology 3(1) <http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-toxicology/volume-3-number-1-55.html>
- Sharma, S.; Nagpure, N.S.; Kumar, R.; Pandey, S.; Srivastava, S.K.; Singh, P.J. y Mathur, P.K. (2007) *Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish Mystus vittatus using comet assay*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 53: 617 - 623.
- Shivaramaiah, H.M. y Kennedy, I.R. (2006) *Biodegradation of endosulfan by a soil bacterium*. J. Environ. Sci. Health 41B: 895 - 905.
- Silva, E.; Rajapakse, N. y Kortenkamp, A. (2002) *Something from "Nothing" - eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects*. Environ. Sci. Technol. 36: 1751 - 1756.
- Silva, C.; Boia, C.; Valente, J. y Borrego, C. (2005) *Pesticides in Esteros del Ibera (AR): evaluation of impacts and proposal of guidelines for water quality protection*. Ecol. Model. 186: 85 - 97.
- Simonato, J.D.; Guedes, C.L.B. y Martinez, C.B.R. (2008) *Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish Prochilodus lineatus exposed to diesel oil*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69: 112 - 120.
- Singh, N.N. y Srivastava, A.K. (2010) *Haematological parameters as bioindicators of insecticide exposure in teleosts*. Ecotoxicology 19: 838 - 854.

- Slooff, W.; van Kreijl, C.F. y Baars, A.J. (1983) *Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands*. *Aquat. Toxicol.* 4: 1 - 14.
- Smith, C.; Stamm, S.C.; Riggs J.E.; Stauber, W.; Harsh, V.; Gannet, P.M.; Hobbs, G. y Miller, M.R. (2000) *Ethanol-mediated CYP1A1/2 induction in rat skeletal muscle tissue*. *Exp. Mol. Pathol.* 69: 223 - 232.
- Sohn, H.-S.; Kwon, C.-S.; Kwon, G.-S.; Lee, J.-B. y Kim, E. (2004) *Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage*. *Toxicol. Lett.* 151: 357 - 365.
- Spacie, A. y Hamelink, J.L. (1985) *Bioaccumulation*. En: *Fundamentals of Aquatic Toxicology* (Eds.: Rand, G.M. y Petrocelli, S.R.) Hemisphere Publishing Corporation, New York, p. 495 - 525.
- Stanley, K.A.; Curtis, L.R.; Simonich, M. y Tanguay, R.L. (2009) *Endosulfan I and endosulfan sulfate disrupts zebrafish embryonic development*. *Aquat. Toxicol.* 95: 355 - 361.
- Suryavanshi, U.; Sreepada, R.A.; Ansari, Z.A.; Nigam, S. y Badesab, S. (2009) *A study on biochemical changes in the penaeid shrimp, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) following exposure to sublethal doses of organochlorine pesticide (endosulfan)*. *Chemosphere* 77: 1540 - 1550.
- Sverlij, S.B.; Espinach Ros, A. y Orti, G. (1993) *Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del sábalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847)*. FAO Sinopsis sobre la pesca N° 154, Roma.
- Sweilum, M.A. (2006) *Effect of sublethal toxicity of some pesticides on growth parameters, hematological properties and total production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) and water quality ponds*. *Aquacult. Res.* 37: 1079 - 1089.

## T

- Takashima, F. y Hibiya, T. (1995) *An atlas of fish histology. Normal and pathological features Second Ed.*. Kodansha Ltd., Tokio.
- Tanaka, K.; Sano, T.; Ishizuka, K.; Kitta, K. y Kawamura, Y. (1994) *Comparison of properties of leaf and root glutathione reductases from spinach*. *Physiol. Plant.* 91: 353 - 358.
- Tavares-Dias, M. y de Moraes, F.R. (2007) *Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf); with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features*. *Vet. Clin. Pathol.* 36: 49 - 54.



- Tavares-Dias, M.; Martins, M.L.; Schalch, S.H.C.; Onaka, E.M.; Quintana, C.I.F.; de Moraes, J.R.E. y de Moraes F.R. (2002). *Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>)*. Acta Sci. 24(2): 547 - 554.
- Tellez-Bañuelos, M.C.; Santerre, A.; Casas-Solis, J.; Bravo-Cuellar, A. y Zaitseva, G. (2009) *Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) exposed to sublethal concentration of endosulfan*. Fish Shellfish Immunol. 27: 105 - 111.
- Thangavel, P.; Ramaswamy, M.; Sumathiral, K. y Amutha, K. (2005) *Individual and combined effects of dimecron-ziram on the levels of serum prolactin and selected minerals of an edible freshwater fish, Oreochromis mossambicus (Peters)*. Pestic. Biochem. Physiol. 81: 24 - 31.
- Thangavel, P.; Sumathiral, K.; Maheswari, S.; Rita, S. y Ramaswamy, M. (2010) *Hormone profile of an edible, freshwater teleost, Sarotherodon mossambicus (Peters) under endosulfan toxicity*. Pestic. Biochem. Physiol. 97: 229 - 234.
- Thomaz, J.M.; Martins, N.D.; Monteiro, D.A., Rantin, F.T. y Kalinin, A.L. (2009) *Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON®)*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72: 1413 - 1424.
- Tilton, F.A.; Bammler, T.K. y Gallagher, E.P. (2011) *Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures*. Comp. Biochem. Physiol. 153C: 9 - 16.
- Townsend, D.M. y Tew, K.D. (2003) *The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance*. Oncogene 22: 7369 - 7375.
- Trenzado, C.E.; Carrick, T.R. y Pottinger, T.G. (2003) *Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress*. General and Comparative Endocrinology 133: 332 - 340.
- Tripathi, G. y Verma, P. (2004) *Endosulfan-mediated biochemical changes in the freshwater fish Clarias batrachus*. Biomed. Environ. Sci. 17: 47 - 56.
- Tsuda, T.; Aoki, S.; Inoue, T. y Kojima, M. (1995a) *Accumulation of IBP, parathion and EPN by killifish: comparison of individual and mixed pesticides*. Comp. Biochem. Physiol. 111C(1): 19 - 22.
- Tsuda, T.; Aoki, S.; Inoue, T.; Kojima, M. (1995b) *Accumulation and excretion of diazinon, fenthion and fenitrothion by killifish: comparison of individual and mixed pesticides*. Wat. Res. 29(2): 455 - 458.
- Tsui, M.T.K. y Chu, L.M. (2003) *Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors*. Chemosphere 52: 1189 - 1197.

## U

- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (1989) *Method 508: Determination of chlorinated pesticides in water by gas chromatography with an electron capture detector*. National Exposure Research Laboratory Office of Research and Development U.S., Cincinnati, Ohio. <http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/508.pdf>
- US EPA (1992) *Probit analysis program used for calculating LC/EC values Version 1.5*. Ecological Monitoring Research Division. Environmental Monitoring Systems Laboratory U.S., Cincinnati, Ohio.
- US EPA (2002) *Reregistration eligibility decision (RED) document for endosulfan*. N° 738-F-02-012. Office of the Pesticide Programs (OPP), US EPA, Washington DC. [http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/endosulfan\\_red.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/endosulfan_red.pdf)

## V

- Valavanidis, A.; Vlahogianni, T.; Dassenakis, M. y Scoullou, M. (2006) *Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64: 178 - 189.
- van der Oost, R.; Goksøyr, A.; Celander, M.; Heida, H. y Vermeulen, N.P.E. (1996) *Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (Anguilla anguilla): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses*. *Aquat. Toxicol.* 36: 189 - 222.
- van der Oost, R.; Lopes, S.C.C.; Komen, H.; Satumalay, K.; van den Bos, R.; Heida, H. y Vermeulen, N.P.E. (1998) *Assessment of environmental quality and inland water pollution using biomarker responses in caged carp (Cyprinus carpio): Use of a bioactivation, detoxication ratio as biotransformation index (BTI)*. *Mar. Environ. Pollut.* 46: 315 - 319.
- van der Oost, R.; Beyer, J. y Vermeulen, N.P.E. (2003) *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57 - 149.
- van der Weiden, M.E.J.; van der Kolk, J.; Bleumink, R.; Seinen, W. y van den Berg, M. (1992) *Concurrence of P450 IAI induction and toxic effects after administration of a low dose of*

- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin (TCDD) in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 24: 123 - 142.
- Vanzella, T.P.; Martinez, C.B.R. y Cólus, I.M.S. (2007) *Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species*. *Mut. Res.* 631: 36 - 43.
- Velasco-Santamaría, Y.M.; Handy, R.D. y Sloman, K.A. (2011) *Endosulfan affects health variables in adult zebrafish (*Danio rerio*) and induces alterations in larvae development*. *Comp. Biochem. Physiol.* 153C: 372 - 380.
- Velíšek, J.; Jurčíková, J.; Dobšíková, R.; Svobodová, Z.; Piačková, V.; Máchová, J.; Novotný, L. (2007) *Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23(3): 297 - 301.
- Velíšek, J.; Svobodová, Z. y Piačková, V. (2009) *Effects of acute exposure to bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*. *Veterinarni Medicina* 54(3): 131 - 137.
- Verma, S.R.; Rani, S.; Balsal, S.K. y Dalela, R.C. (1980) *Effects of the pesticides thiothox, dichlorvos and carbofuran on the test fish *Mystus vittatus**. *Water, Air, and Soil Pollution* 13: 229 - 234.
- Vieira, L.R.; Sousa, A.; Frasco, M.F.; Lima, I.; Morgado, F. y Guilhermino, L. (2008) *Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae)*. *Sci. Total Environ.* 395: 87 - 100.
- Viganò, L.; Arillo, A.; Melodia, F.; Bagnasco, M.; Bennicelli, C. y De Flora, S. (1995) *Hepatic and biliary biomarkers in rainbow trout injected with sediment extracts from the river Po (Italy)*. *Chemosphere* 30: 2117 - 2128.
- Vissio, P.G.; Cánepa, M.M. y Maggese, M.C. (2008) *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-like immunoreactivity localization in the retina and brain of *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes)*. *Tissue and Cell* 40: 261 - 270.
- Vittozzi, L. y De Angelis, G. (1991) *A critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish*. *Aquat. Toxicol.* 19: 167 - 204.

## W

- Wagner, G.N.; Singer, T.D. y McKinley, R.S. (2003) *The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)*. *Aquacult. Res.* 34: 1139 - 1146.

- Walker, C.H.; Hopkin, S.P.; Sibly, R.M. y Peakall, D.B. (2001) *Principles of Ecotoxicology Second Ed.* Taylor & Francis, London.
- Wan, M.T.; Kuo, J.-N.; Buday, C.; Schroeder, G.; Van Aggelen, G. y Pasternak, J. (2005) *Toxicity of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, ( $\alpha+\beta$ )-endosulfan and their formulated and degradation products to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus kitsutch*, and biological implications in streams.* Environ. Toxicol. Chem. 24: 1146 - 1154.
- Wang, C.; Lu, G.; Cui, J. y Wang, P. (2009) *Sublethal effects of pesticide mixtures on selected biomarkers of *Carassius auratus*.* Environ. Toxicol. Pharmacol. 28: 414 - 419.
- Weber, J.; Halsall, C.J.; Teixeira, C.; Small, J.; Solomon, K.; Hermanson, M.; Hung, H. y Bidleman, T. (2010) *Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic.* Sci. Total Environ. 408(15): 2966 - 2984.
- Wendelaar Bonga, S.E. y Lock, R.A.C. (2008) *The osmoregulatory system.* En: *The Toxicology of Fishes* (Eds. Di Giulio, R.T. y Hinton, D.E.) CRC Press, Boca Raton, p. 417-455.
- Wester, P.W.; Vethaak, D. y van Muiswinkel, W.B. (1994) *Fish as biomarkers in immunotoxicology.* Toxicology 86: 213 - 232.
- WHO (World Health Organization) International Programme on Chemical Safety (IPCS) (1993) *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles.* Environmental Health Criteria 155, WHO, Ginebra. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm>
- Willey, J.B. y Krone, P.H. (2001) *Effects of endosulfan and nonylphenol on the primordial germ cell population in pre-larval zebrafish embryos.* Aquat. Toxicol. 54: 113 - 123.
- Winkaler, E.U.; Santos, T.R.M.; Machado-Neto, J.G. y Martinez, C.B.R. (2007) *Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*.* Comp. Biochem. Physiol. 145C: 236 - 244.
- Winston, G.W. y Di Giulio, R.T. (1991) *Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms.* Aquat. Toxicol. 19: 137 - 161.
- Wirth, E.F.; Lund, S.A.; Fulton, M.H. y Scott, G.I. (2001) *Determination of acute mortality in adults and sublethal embryo responses of *Palaemonetes pugio* to endosulfan and methoprene exposure.* Aquat. Toxicol. 53: 9 - 18.
- Wright, P.; Heming, T. y Randall, D. (1991) *Downstream pH changes in water flowing over the gills of rainbow trout.* J. Exp. Biol. 126: 499 - 512.

**Z**

- Zhang, J.; Shen, H.; Wang, X.; Wu, J. y Xue, Y. (2004) *Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish Carassius auratus*. Chemosphere 55: 167 - 174.
- Zhang, X.; Yang, F.; Zhang, X.; Xu, Y.; Liao, T.; Song, S. y Wang, J. (2008) *Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (Gobiocypris rarus) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD)*. Aquat. Toxicol. 86: 4 - 11.