



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL METIL PARATIÓN SOBRE  
EL DESEMPEÑO SEXUAL DEL PEZ AMARILLO  
(*GIRARDINICHTHYS MULTIRADIATUS*)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
RODOLFO OMAR ARELLANO AGUILAR**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. CONSTANTINO MACÍAS GARCIA**

**MÉXICO, D.F.**

**OCTUBRE, 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Para Vero con todo mi amor

Para mi pequeña Sofía

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT y a la Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM quienes financiaron esta tesis a través de los programas de beca.

**A mi Tutor,**

Dr. Constantino Macías García por el apoyo, asesoría y las horas invertidas en la revisión, análisis y discusión tanto del diseño experimental como de la interpretación de los resultados de esta investigación. Tino, no sólo quiero agradecerte por la invitación que me hiciste para llevar a cabo esta tesis, sino porque durante todo este tiempo influiste sustancialmente en la consolidación de mi formación académica.

**Al Comité Tutorial,**

Dra. María Eugenia Gonsebatt agradezco infinitamente el apoyo y la asesoría en cada una de las fases de la tesis, en especial en aquellas en las que fueron críticas para llevar a buen termino este proyecto. Además, porque has sido una parte muy importante en mi formación desde la licenciatura hasta este momento en que cierro esta etapa.

Dra. Robyn Hudson muchas gracias por ser parte del comité, tu entusiasmo me enseñó a disfrutar la ciencia. Además, porque la asesoría durante los tutorales y las charlas durante las reuniones de *Lunáticos* me ayudaron a ser más auto-crítico.

**Al Jurado del Examen de Candidatura,**

Dr. Javier Espinosa Aguirre

Dra. Roxana Torres Avilés

Dra. Guillermina Alcaraz Zubeldia

Dr. Eduardo Morales Guillaumin

Dra. María Eugenia Gonsebatt

A todos gracias por sus comentarios y criticas constructivas durante el examen.

**Al Jurado del Examen de Grado,**

Dra. Robyn Hudson

Dra. María Eugenia Gonsebatt

Dra. Claudia Ponce de León Hill

Dr. Alejandro Moyaho Martínez

Dr. Oscar Ríos Cárdenas

Gracias a todos por los comentarios y sugerencias al documento final de la tesis.

## **Agradecimientos personales**

A Pablo Gesundheit, gracias por el apoyo en el trabajo de campo, en la elaboración de los mapas y por supuesto por tu ayuda durante las correcciones de los artículos, pero sobre todo por tu amistad.

A Edgar Ávila Luna, gracias por el apoyo en el trabajo de campo, en el laboratorio, en la colecta de datos, gracias por ser un gran amigo.

A Magdalena Cervantes, María Elena González y Nubia Villasana por su apoyo y asesoría durante los análisis químicos.

A Sandra Hernández por su apoyo y asesoría durante las pruebas moleculares.

### **A quienes con sus comentarios y sugerencias me ayudaron en el proyecto,**

Dr. Miguel Betancourt, Dra. Patricia Ramos Morales, Dra. Cecilia Vanegas, Dra. Regina Montero, Dra. Mari Carmen Uribe, Dra. María del Rocío Cruz Ortega, Dr. Carlos Cordero, Enrique Solís, Sebastián Zuñiga, Victor Dávila y Dr. José Luis Osorno†.

### **A mis amigos y compañeros del laboratorio,**

Alejandro González Voyer, Gabriel García Peña, César González, Fabrice Dentressangle, Sin-Yeon Kim, Mylene Mariette, Jaime Zaldivar, Miguel Serrano, Larisa Lee, Adriana Vallarino, Claudia Valderrabano, Alejandro Ríos Chelén, Jimena Nieto, Georgina Contreras, Alejandra Valero, Oscar Sánchez, Cristina Carmona (Momo), Natalia Lifshitz, Ruth Rodríguez, Irene Barbosa, René Beamonte, Isabel López, Sergio Ancona, Irari Brumón, Eira Bermúdez, Bianca Centeno, Elvia Ramírez, Cristina Rodríguez, Dr. Hugh Drummond, y a todos los *Lunáticos*.

### **A mi familia,**

A mi madre (Ma. Elena), a mi padre (Rodolfo), a mis hermanos (Jorge, Raquel y Gabriela), a mi abuela María de la Luz (gracias por su apoyo).

A mis suegros y cuñados (gracias).

A Héctor Eduardo Ríos Torres, Mauricio Hoyos Padilla y Erika Morales.

A todo el personal del Instituto de Ecología y del Posgrado en Ciencias Biológicas.

## PRESENTACIÓN

Esta tesis es una investigación sobre las consecuencias de exposiciones subletales al plaguicida organofosforado metil paratión (MeP) en la reproducción, el desarrollo, la expresión de ornamentos y conducta reproductiva del pez vivíparo *Girardinichthys multiradiatus*. El documento está dividido de la siguiente manera:

En el capítulo I se hace una introducción general para plantear el marco teórico de la tesis a partir de los factores que favorecen la contaminación por plaguicidas en los cuerpos de agua. Además se presentan los antecedentes que motivaron el análisis de los efectos del MeP en *G. multiradiatus*. En consecuencia, se revisan las características biológicas y ecológicas de la especie de estudio y se explica por qué es pertinente estudiar los efectos del MeP en la expresión de los caracteres sexuales secundarios. A partir de este marco se desprenden las hipótesis y los objetivos de la tesis.

En el capítulo II se reportan los resultados de los experimentos que tuvieron como objetivos evaluar, en cautiverio, la bioacumulación del MeP en *G. multiradiatus*, los efectos tóxicos en peces adultos y en organismos en desarrollo embrionario, así como las consecuencias a largo plazo en términos de supervivencia a la edad adulta. Además, se reporta la caracterización ambiental del MeP en cuerpos de agua habitados por *G. multiradiatus*. Artículo publicado en la revista *Environmental Toxicology*; acceso en línea desde el 17 de junio de 2008; doi: 10.1002/tox.20414.

En el capítulo III se reporta el experimento que tuvo como objetivo explorar una posible explicación de por qué los embriones son más susceptibles a MeP. En este experimento se cuantificó la inducción de la actividad catalítica de las enzimas monooxigenasas P450 en el hígado de hembras grávidas y sus embriones expuestas a 0.1 µg de MeP g<sup>-1</sup> alimento por 96 horas. Además, se discuten las razones por las que los resultados obtenidos de este estudio no fueron concluyentes.

En el capítulo IV se hace una revisión de los estudios publicados con relación a las enzimas monooxigenasas P450 en peces teleósteos. En este trabajo se identifican las funciones y los principales sitios de expresión, incluyendo aquellas isoformas con actividad durante el desarrollo embrionario. Además, se revisan los conceptos de especies centinelas y biomarcadores. Finalmente, se discute la situación actual en el

conocimiento de las enzimas P450 en los peces y su aplicación como biomarcadores en los programas de monitoreo ambiental.

De acuerdo con los objetivos planteados en la tesis, en el Capítulo V se reportan los resultados del efecto del MeP en la expresión de los ornamentos, los despliegues de cortejo de los machos y la preferencia sexual de las hembras cuyas madres estuvieron expuestas durante el periodo de gestación a 0.005  $\mu\text{g}$  de MeP  $\text{g}^{-1}$  alimento diariamente. Artículo publicado en la revista *Proceedings of The Royal Society B* (2008), 275: 1343-1350; doi: 10.1098/rspb.2008.0163.

En el capítulo VI se hace el análisis general de los resultados más relevantes de la tesis y se proponen futuros trabajos.

El apéndice *Uso de plaguicidas en la Cuenca Lerma-Chapala* es una revisión de los datos oficiales del grado de deterioro de la calidad del agua en la cuenca del río Lerma, haciendo énfasis en la situación del uso de agroquímicos en la región. Esta sección es en consecuencia un complemento de la introducción.



## CONTENIDO

Agradecimientos	ii
Presentación	v
Contenido	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tablas	xi
Resumen	xiii
Abstract	xv

### Capítulo I

Introducción General	
I.1 Contaminación por plaguicidas en cuerpos de agua	1
I.1.1 El caso de la Presa Ignacio Ramírez	2
I.2 Biología y ecología de pez amarillo <i>Girardinichthys multiradiatus</i>	2
I.3 Mecanismos de toxicidad de los plaguicidas organofosforados	5
I.3.1 Mecanismo I	6
I.3.2 Mecanismo II	7
I.3.3 Mecanismo III	8
I.4 Efectos tóxicos por exposición a metil paratión	8
I.5 La selección sexual y los factores antropogénicos que afectan la reproducción	11
I.6 Hipótesis	14
I.7 Objetivos	15
I.8 Referencias	16

### Capítulo II

Effects of methyl parathion exposure on development and reproduction in the viviparous fish <i>Girardinichthys multiradiatus</i>	
II.1 Resumen (Abstract)	26[1]
II.2 Introducción (Introduction)	26[1]
II.3 Materiales y Métodos (Materials and Methods)	27[2]
II.4 Resultados (Results)	29[4]
II.5 Discusión (Discussion)	30[5]

**Capítulo III**

Reporte del experimento para determinar la inducción del citocromo CYP2B de hembras *Girardinichthys multiradiatus* expuestas a metil paratión

III.1 Introducción	36
III.2 Materiales y Métodos	38
III.3 Resultados	41
III.4 Discusión	43
III.5 Referencias	45

**Capítulo IV**

Revisión de la literatura referente a las enzimas monooxigenasas P450 en peces teleósteos: sitios de expresión, función endógena, especificidad y sensibilidad

Resumen	49
IV.1 Introducción	50
IV.2 P450: biomarcador de exposición	52
IV.3 Clasificación de los citocromos P450	53
IV.4 La superfamilia P450 en peces teleósteos	54
IV.5 Sitios de inducción y funciones endógenas de las monooxigenasas	55
IV.6 Subfamilia CYP2B	56
IV.7 Inductores de P450	57
IV.8 Uso de P450 en el monitoreo ambiental	58
IV.9 Consideraciones finales	59
IV.10 Referencias	61

**Capítulo V**

Exposure to pesticides impairs the expression of fish ornaments reducing the availability of attractive males

V.1 Introducción (Introduction)	77[1343]
V.2 Material y Métodos (Material and Methods)	78[1344]
V.3 Resultados (Results)	79[1345]

V.4 Discusión (Discussion)	81[1347]
V.5 Referencias (References)	83[1349]
<b>Capítulo VI</b>	
Discusión General	86
VI.1 Futuros trabajos	95
VI.2 Referencias	95
<b>Sección de Apéndices</b>	99
<b>Apéndice 1</b>	
Uso de plaguicidas en la Cuenca Lerma-Chapala	
AI.1 Introducción	100
AI.2 Diagnóstico de la cuenca en relación con la calidad del agua	101
AI.3 Uso de plaguicidas en la cuenca	102
AI.4 Conclusión	103
AI.5 Referencias	104
<b>Apéndice 2</b>	
Regiones de los registros morfológicas y colorimétricos	110
<b>Apéndice 3</b>	
Diseño de acuarios para las pruebas de conducta	111
<b>Apéndice 4</b>	
Imágenes de acuarios de exposición y de mantenimiento	112

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Capítulo I</b>		
Figura I.1A	Ovario de goodeido <i>Ilyodon whitei</i> barra=50µm (tomada de Uribe et al., 2005, con autorización de Mari Carmen Uribe).	4
Figura I.1B	Representación de un embrión goodeido con trofotenia	4
Figura I.2	Transformación metabólica del metil paratión	7
<b>Capítulo II</b>		
Figura 1	Hydrographic map of Central Mexico showing locations of sampling stations. (Mapa hidrográfico de México Central mostrando la localización de las estaciones de muestreo)	28[3]
Figura 2	Percentage of initial body length (%IBL) after exposure to methyl paration (MeP). (Porcentaje de la longitud corporal inicial (%IBL) después de	30[5]

Figura 3	la exposición a metil paratión). Common lateral curvature of the spine (scoliosis) in malformed offspring born to females exposed to 0.005 and 0.1 µg/g methyl parathion. (Curvatura lateral de la espina (escoliosis) de peces malformados que nacieron de hembras expuestas a 0.005 y 0.1µg/g metil paratión).	31[6]
Figura 4A	Proportion of malformed offspring (MO). (Procentaje de críos malformados).	31[6]
Figura 4B	Proportion of offspring surviving to adulthood (OSA). (Proporción de críos supervivientes a la edad adulta).	31[6]
<b>Capítulo III</b>		
Figura III.1	Análisis de inmunodetección de la proteína microsomal CYP2B1/2.	43
<b>Capítulo V</b>		
Figura 1	The first principal components gave large loadings to the measurements reflecting overall size, and significantly (p= 0.003) separated exposed (to 0.005 µg g <sup>-1</sup> , filled symbols) and control fish (open symbols). (El primer componente principal asignó un gran peso a las mediciones que reflejan talla, separando significativamente (p= 0.003) los peces expuestos (a 0.005 µg g <sup>-1</sup> , símbolos llenos) de los peces controles (símbolos abiertos).	80[1346]
Figura 2	Ornament development (PC2) of control males (filled circles) was a function of paternal ornamentation. (Desarrollo de ornamentos [PC2] de machos controles [Círculos llenos] fue una función de la ornamentación paterna).	80[1346]
<b>Capítulo VI</b>		
Figura VI.1	Resumen de los factores involucrados en los efectos del MeP sobre el desempeño sexual de <i>G. multiradiatus</i> .	94
<b>Apéndice</b>		
Figura A1.1	Incremento en las toneladas usadas de plaguicidas en relación al incremento de área de cultivo en el periodo de 1997 a 2001.	106
Figura A1.2	Cantidad de agroquímicos usados en el periodo de 1997 a 2002 en la cuenca Lerma-Chapala. La figura esta dividida por fertilizantes (nitrogenados o fosfatados) e insecticidas y plaguicidas.	107

## ÍNDICE DE TABLAS

### Capítulo I

Tabla I.1	Efectos causados por la exposición a metil paratión en varios niveles de organización biológica	10
Tabla I.2	Efectos de dirruptores hormonales en la conducta reproductiva en peces	14

### Capítulo II

Tabla 1	Methyl parathion (MeP) and 4-nitrophenol (4-np) concentrations in water from aquaria and fish after 30 d of exposure. (Concentraciones de metil paratión y 4-nitrofenol en agua de los acuarios y en peces después de una exposición por 30 días)	29[4]
Tabla 2	Summary of data from the experiment exposing females to methyl parathion during pregnancy. (Resumen de datos experimentales de las hembras expuestas a metil paratión durante la gravidez)	30[5]
Tabla 3	Levels of methyl parathion in surface water. (Niveles de metil paratión en el agua superficial).	32[7]

### Capítulo III

Tabla III.1	Concentración de proteína microsomal (mg/ml) en muestras de tejido hepático y de gónadas de hembras controles y expuestas a 0.1 µg/g metil paratión	42
-------------	---	----

### Capítulo IV

Tabla IV.1	Biomarcadores por tipo de daño de acuerdo a la clasificación de Walker et al., 1996 y Peakall & Walker 1994	68
Tabla IV.2	Enzimas monooxigenasas del citocromo P450 descritas en peces teleósteos	69
Tabla IV.3	Sitios de inducción de las monooxigenasas P450 en peces teleósteos	74
Tabla IV.4	Función endógena de las monooxigenasas P450 en peces teleósteos	75

### Capítulo V

Tabla 1	Eleven males were given the opportunity to mate with one or two pairs of matched females, but only five males (A-E) had broods with two matched females. (Se les dio la oportunidad de aparearse a once machos con un o dos pares de hembras, únicamente cinco machos (A-E) tuvieron descendencia con ambas hembras).	79[1345]
Tabla 2	Comparisons of colour ( $\bar{x} \pm s.e.$ , rounded to two decimals) between Amarillo fish exposed to MeP during gestation (E) and their half-sibling control (C). (Comparación de color ( $\bar{x} \pm e.s.$ , redondeado a dos decimales) entre los peces expuestos a MeP durante la	81[1347]

gestación (E) y sus medios hermanos controles (C).

## **Apéndice 1**

		108
Tabla A1.1	Usos del Agua Cuenca Lerma-Chapala.	
Tabla A1.1	Calificación de las regiones hídricas comprendidas en la Cuenca Lerma- Santiago-Pacífico.	108
Tabla A1.3	Descargas de los principales municipios y parques industriales de la cuenca.	109
Tabla A1.4	Niveles de plaguicidas detectados en la presa Ignacio Ramírez región del Alto Lerma.	109

# **Evaluación del efecto del metil paratión sobre el desempeño sexual del pez amarillo (*Girardinichthys multiradiatus*)**

## **Resumen**

La incorporación de los plaguicidas en los ecosistemas acuáticos puede alterar procesos biológicos tales como el crecimiento, la reproducción y la supervivencia de los organismos. Lo anterior ha sido ampliamente estudiado y ha derivado entre otras cosas en el uso de compuestos menos persistentes en el ambiente (e.g. carbamatos y organofosforados). Sin embargo, la detección de niveles subletales de plaguicidas, particularmente organofosforados (OP, por sus siglas en inglés) es frecuente en los cuerpos de agua cercanos a zonas agrícolas. Los OP inhiben la actividad catalítica de las  $\beta$ -esterasas, alteran el sistema inmune y son bioacumulados por los organismos como los peces teleósteos. Un ejemplo de lo anterior es el reporte de la acumulación del metil paratión (MeP) en el pez amarillo (*Girardinichthys multiradiatus*). Este compuesto se detectó en tejidos embrionarios a niveles por arriba de las acumuladas por los adultos, lo que condujo a la siguiente pregunta ¿Cuáles son las implicaciones de que durante el desarrollo embrionario los *G. multiradiatus* se encuentren expuestos al MeP? El pez amarillo es endémico de la parte Central de México, pertenece a la familia Goodeidae, un grupo de especies vivíparas que se encuentra amenazada por diversos factores antropogénicos. Entre los goodeidos, los machos *G. multiradiatus* presentan las aletas más ornamentadas y un repertorio conductual muy elaborado. La presencia de estos caracteres ha sido explicada bajo los mecanismos que operan la selección sexual. La presencia de contaminantes como el MeP en las poblaciones de *G. multiradiatus*, aún a niveles subletales, puede imponer retos energéticos que incrementarían los costos de producir, exhibir o mantener los ornamentos. Lo anterior podría repercutir en la adecuación de los individuos; mecanismo que ha sido un aspecto de los contaminantes poco explorado. Esta investigación tuvo como objetivos evaluar los efectos toxicológicos de niveles subletales de MeP en la reproducción y desarrollo de *G. multiradiatus*, comparar la capacidad de la actividad enzimática entre hembras grávidas y embriones para explicar un posible mecanismo de los efectos del MeP en los estados tempranos de desarrollo y evaluar los efectos del plaguicida en la expresión de ornamentos y el desempeño sexual de adultos que estuvieron expuestos a MeP durante la fase embrionaria. Los resultados mostraron que la acumulación de MeP en *G. multiradiatus* es de forma dosis-dependiente en organismos adultos. La

exposición a concentraciones de 0.008, 0.02 y 0.04  $\mu\text{g/g}$  en un periodo de 30 días provocaron la reducción del peso y la talla. El MeP fue letal a 0.165  $\mu\text{g/g}$ . En cuanto a los resultados obtenidos de las hembras grávidas expuestas a 0.005, 0.01 y 0.1  $\mu\text{g/g}$ , MeP no afectó la condición de las hembras durante la gestación, sin embargo, indujo alteraciones en los descendientes. Las camadas que estuvieron expuestas a 0.005 y 0.01  $\mu\text{g/g}$  presentaron malformaciones a nivel de notocorda y a 0.01 y 0.1  $\mu\text{g/g}$  la proporción de juveniles que alcanzaron la edad adulta fue menor que en los grupos controles. El estudio en campo reveló la presencia de MeP en dos de siete localidades donde se distribuye *G. multiradiatus* (en la presa San Juanico a 0.0036  $\mu\text{g/g}$  y en la presa Salazar a 0.037  $\mu\text{g/g}$ ), esto mostró que las poblaciones que habitan en las presas pueden ser más susceptibles a MeP. Además, se buscó cuantificar la inducción de la actividad catalítica de las monooxigenasas P450 (isoforma CYP2B; involucrada en la biotransformación del MeP) en hígados de hembras grávidas y tejidos embrionarios expuestos a 0.1  $\mu\text{g/g}$  MeP por 96 horas. Aunque no se encontró una respuesta clara, la revisión de los reportes sobre la presencia de P450 en peces mostró que sólo 12 de las 34 isoformas descritas hasta el momento en peces se han detectado en tejidos embrionarios, lo que sugiere que los estados tempranos de desarrollo pudieran ser deficientes metabólicamente y por lo tanto pueden ser más vulnerables a los contaminantes. Finalmente, la exposición subletal a MeP (0.005  $\mu\text{g/g}$ ) durante el desarrollo embrionario repercutió en la condición de los adultos. Observé que hembras y machos de camadas expuestas durante la gestación a 0.005  $\mu\text{g/g}$  MeP tuvieron tallas menores, siendo mayor el efecto en los caracteres sexuales (i.e. aletas ornamentadas). Además, las aletas ornamentadas presentaron menor saturación de color en las longitudes de onda del amarillo y el rojo, lo cual podría estar indicando una reducción en la capacidad de sintetizar pigmentos carotenoides. Además, observé que los machos tienden a desplegar conductas de cortejo más parsimoniosas, lo que resulta, en combinación con los parámetros anteriores de talla y coloración, en una menor preferencia de las hembras hacia los machos expuestos. En conclusión, la exposición a MeP durante la gestación trasciende en la edad adulta de *G. multiradiatus*, la expresión de los caracteres sexuales secundarios se ve comprometida y el desempeño sexual de los machos se reduce. Lo anterior podría tener implicaciones en la estructura de las poblaciones.



# **Evaluation of the effects of methyl parathion in sexual performance of the Amarillo fish (*Girardinichthys multiradiatus*)**

## **Abstract**

The incorporation of pesticides into aquatic ecosystems can alter biological processes such as growth, reproduction and survival of organisms. This has been extensively studied and has derived among other things in the use of compounds that are less persistent in the environment (e.g. carbamates and organophosphates). However, the detection of sublethal levels of pesticides, particularly organophosphates is frequent in water bodies close to agricultural fields. Organophosphates inhibit the catalytic activity of  $\beta$ -esterases, alter the immune system and are bioaccumulated by organisms such as fish. An example of this is the report of accumulation of methyl parathion (MeP) in the Amarillo fish (*Girardinichthys multiradiatus*). This compound has been detected in embryonic tissue in concentrations above those found in adults, which leads to the question ¿What are the implications of exposure to MeP during embryonic development for *G. multiradiatus*? The Amarillo fish is endemic to Central Mexico and belongs to family Goodeidae, a group of viviparous species that is threatened by several anthropogenic factors. Among goodeids, males of *G. multiradiatus* have the most ornamented fins and elaborated behavioural repertoire. The presence of these traits has been explained by sexual selection mechanisms. Pollutants as MeP present in water bodies inhabited by *G. multiradiatus*, even though at sublethal levels, could impose an energetic demand which would increase the cost of producing, maintaining or displaying ornaments. This could have a repercussion on fitness, which has been a little studied aspect of pollutants. This research had as aims to evaluate the toxicological effects of sublethal MeP levels in the reproduction and development of *G. multiradiatus*, to compare the enzymatic capacity between gravid females and their embryos as a possible mechanism to explain the vulnerability to MeP in early development stages, and to evaluate the expression of ornaments and sexual performance of adults exposed to MeP during the embryonic phase. The results showed that accumulation of MeP in *G. multiradiatus* is a dose-dependent relationship in adult organisms. Fish exposed to concentrations of 0.008, 0.02 and 0.04  $\mu\text{g/g}$  for 30 days showed a reduction in size and weight. Methyl parathion was lethal at 0.165  $\mu\text{g/g}$ . In the case of the results obtained in gravid females exposed to 0.005, 0.01 and

0.1  $\mu\text{g/g}$ , MeP did not affect the females' condition during gestation, however, it induced malformation in their offspring. The broods exposed to 0.005 and 0.01  $\mu\text{g/g}$  showed spinal cord malformation, and at 0.01 and 0.1  $\mu\text{g/g}$  the proportion of offspring surviving to adulthood was lesser than in control groups. The field study revealed the presence of MeP in two out of seven sampled localities inhabited by *G. multiradiatus* (San Juanico dam at 0.0036  $\mu\text{g/g}$  and Salazar dam at 0.037  $\mu\text{g/g}$ ), therefore wild fish living in dams could be being affected by MeP. In addition, I looked for a measure of induction of catalytic activity of monooxygenases P450 (isoform CYP2B; involved in biotransformation of MeP) in liver of gravid females and embryonic tissue exposed to 0.1  $\mu\text{g/g}$  MeP for 96 hrs. Although I did not obtain positive results, a review of literature on cytochrome P450 in fish showed that only 12 out of 34 isoforms described up to now have been detected in embryonic tissue, suggesting that early development stages might be metabolically deficient and could be more susceptible to pollutants. Lastly, sublethal exposure to MeP during embryonic development affects the condition of adults. I observed that both females and males from broods exposed during gestation to 0.005  $\mu\text{g/g}$  MeP had a smaller size, the effect being higher in sexual characters (i.e. ornamental fins). Ornamented fins showed lesser color saturation in wavelengths of yellow and red, which could be indicating a reduction in the capability for carotenoid pigment synthesis. In addition, I observed that exposed males had a tendency to display more parsimoniously during courtship, which resulted, in combination with parameters of size and color, in reduced female preference to exposed males. In conclusion, MeP exposure during gestation transcends to adulthood in *G. multiradiatus*, the expression of sexual secondary characters is compromised, and the sexual performance of males is reduced. This might have implications in the structure of populations.

## **CAPÍTULO I**

### INTRODUCCIÓN GENERAL

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN GENERAL

#### I.1 Contaminación por plaguicidas en cuerpos de agua

Los ecosistemas acuáticos cercanos a las zonas agrícolas reciben por escurrimientos una gran cantidad de agroquímicos durante las temporadas de lluvias. Ejemplo de ello son las altas concentraciones de plaguicidas registradas en el valle de California EU., donde se han detectado hasta 69.99  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de diazinón cuando las precipitaciones rebasan los 0.41  $\text{cm}^3$  de agua por más de 4 h (Schiff & Sutula 2004). Estas descargas incluso pueden aportar una mayor cantidad de agroquímicos cuando las aplicaciones son recientes (DeVlaming et al., 2000). Entre los agroquímicos que comúnmente pueden detectarse en ríos, presas o lagos se encuentran los plaguicidas organoclorados (e.g. dicloro-difenil-tricloroetano *DDT*, lindano, endosulfan, los hexaclorohexanos, aldrin, dieldrin, heptacloro, etc.), organofosforados (e.g. malatión, diazinón, paratión, metil paratión) y carbamatos (carbofuran, carbaril). Cuando estas sustancias se incorporan a los ecosistemas acuáticos entran en contacto con la biota y pueden ser transportadas por la red trófica mediante los procesos de bioacumulación y biomagnificación. Lo anterior genera un problema ambiental que en el caso de México ha sido poco atendido y un ejemplo de ello ocurre en la cuenca del río Lerma (en el apéndice se amplía la información).

El grado de impacto de los plaguicidas en los ecosistemas acuáticos depende en gran medida de la persistencia (tiempo de vida media  $t_{1/2}$ ) de cada compuesto. Por ejemplo, los organofosforados (ésteres orgánicos de ácidos fosfóricos) tienen  $t_{1/2}$  de días hasta meses en ambientes acuáticos, mientras que los organoclorados pueden persistir por más de 50 años. Los factores que determinan el  $t_{1/2}$ , además de las características químicas del compuesto (e.g. polaridad, presión de vapor, estabilidad química), son las características físico-químicas del cuerpo de agua receptor (Walker et al., 1996). Por ejemplo, los compuestos malatión, diazinón y clorpirifos tienen  $t_{1/2}$  de 3 a 24 días en ambientes aerobios, sin embargo, en ambientes anaerobios (e.g. eutroficados) el  $t_{1/2}$  de estos mismos compuestos se extiende de 58 a 223 días (Bondarenko & Gan 2004) y

algunos compuestos como el metil paratión o el etil paratión pueden ser difíciles de degradar (Xu et al., 2003).

### I.1.1 El caso de la Presa Ignacio Ramírez

En México el uso de plaguicidas se ha incrementado con la producción agrícola. En la cuenca del Lerma, por ejemplo, se utilizan poco más de 15,000 toneladas de plaguicidas al año (en el apéndice se amplía la información). Lo anterior es preocupante considerando que la cuenca del Lerma constituye uno de los sistemas hídricos más grandes del país y la zona más rica en endemismos de ictiofauna (Espinosa Pérez et al., 1998). Entre los cuerpos de agua en los que se ha documentado la presencia de plaguicidas se encuentra la presa Ignacio Ramírez en el Estado de México, que pertenece a la región del Alto Lerma. En esta presa se han reportado concentraciones de organoclorados como el aldrin, dieldrin, edrin, así como de los organofosforados malatión y metil paratión (De La Vega Salazar et al., 1997; Favari et al., 2002). Además, estos contaminantes se han detectado bioacumulados en la fauna de la presa, como en el acocil mexicano (*Cambarellus montezumae*), los oligoquetos (*Aelosoma sp.*), la carpa (*Cyprinus carpio*), el charal de Santiago (*Chirostoma rioja*) y en particular en el pez amarillo (*Girardinichthys multiradiatus*), en donde los niveles de metil paratión alcanzan concentraciones de 0.1 a 0.7 µg/g (De La Vega Salazar et al., 1997; Favari et al., 2002).

### I.2 Biología y ecología del pez amarillo *Girardinichthys multiradiatus*

El pez amarillo (*Girardinichthys multiradiatus*; familia Goodeidae; tribu Girardinichthyini) tiene una distribución restringida en la Mesa Central de México, en la cuenca del Alto Lerma y en las cuencas altas del río Tula (Pánuco) y de los ríos Zitácuaro y Tilostoc (Balsas) que se encuentran entre los 1800 y 2900 msnm (Gesundheit 2004; Gesundheit & Macías Garcia 2005; Miller 2005). Los primeros estudios en México sobre la biología de esta especie se remontan a la década de 1940. Del Villar (1949) reportó que *G. multiradiatus* habita las zonas someras de los cuerpos de agua medianamente turbios (entre 0.25 y 1.2 m de profundidad) con temperaturas que fluctúan entre los 14 y 27 °C, con oxígeno disuelto entre 4.5 y 15 ml/L y pH de 7.6

a 7.7. Además, en las poblaciones de la cuenca del Pánuco, Del Villar (1946) observó que entre los meses de marzo y agosto hay un incremento demográfico y determinó que el crecimiento entre hembras y machos es alométrico y que la proporción de sexos en las poblaciones es de 3.6:1 (hembras: machos); también en las poblaciones del Alto Lerma se han registrado proporciones sexuales similares (ver Macías Garcia 1994). Se ha observado que a lo largo del año se obtienen dos generaciones con una proporción sexual en la camada de 78.33% de machos y 21.60% de hembras (Del Villar 1949). De acuerdo con Saborío (2002) en cautiverio el periodo de gestación dura  $53 \pm 7.9$  días.

Las adaptaciones reproductivas de *G. multiradiatus* al igual que de otros goodeidos son poco comunes en los peces teleósteos. Se trata de peces vivíparos matrotroáficos. Esto significa que los embriones se alimentan de nutrientes que secreta la hembra en el lumen ovárico durante la gestación (Fig. I.1A; Schindler 2005; Uribe et al., 2005). Los nutrientes que secreta la hembra hacia el lumen son proteínas, aminoácidos, glucosa, lípidos y vitelogenina que son tomados por los embriones a través de un órgano especializado llamado Trofotaenia (Lombardi & Wourms 1985a; Lombardi & Wourms 1985b; Schindler 2005; Vega-Lopez et al., 2007). Por microscopía electrónica de barrido se ha observado que éste órgano está constituido por filamentos que originan una masa tubular que se extiende fuera de la región perianal del embrión (Fig. I.1B; Lombardi & Wourms 1985b). En el género *Girardinichthys*, las células trofoteniales contienen en el citoplasma supranuclear una gran cantidad de mitocondrias que indican transporte transmembranal con gasto energético, por lo que es de suponer que el epitelio trofotencial en éste género toma las macromoléculas del lumen ovárico mediante mecanismos de endocitosis (Schindler 2005), proceso que podría favorecer el ingreso y acumulación de contaminantes orgánicos como los plaguicidas (Van der Oost et al., 2003).

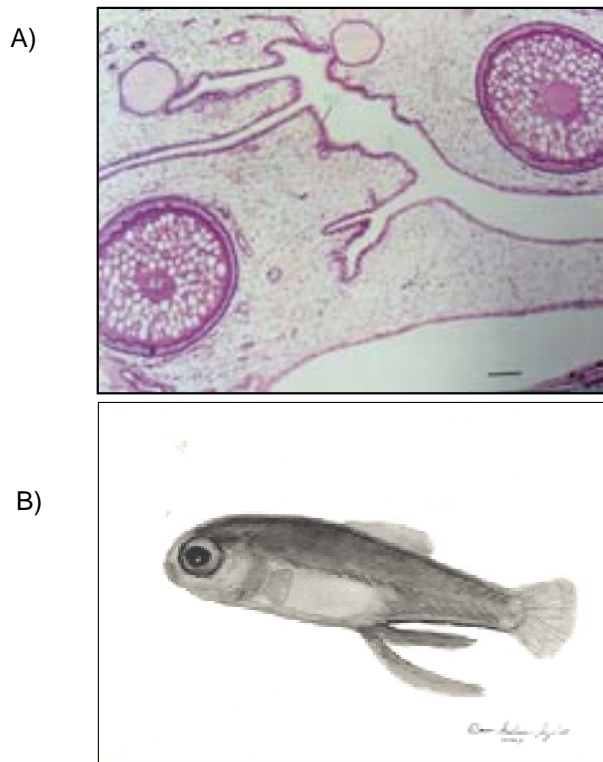


Fig. I. A) Ovario de goodeido *Ilyodon whitei*, barra=50 $\mu$ m (tomada de Uribe et al., 2005, con autorización de Mari Carmen Uribe). B) Representación de un embrión goodeido con trofotenia.

En la edad adulta o reproductiva, los machos *G. multiradiatus* despliegan elaboradas conductas de cortejo durante el apareamiento y presentan aletas proporcionalmente mayores que las hembras (Macías García 1991; Macías García 1994; González Zuarth & Macías García 2006), además de que lucen pigmentos de amarillo intenso a anaranjado con algunos tonos oscuros (Macías García 1994), de ahí el nombre común de pez amarillo. La evolución de estos rasgos o caracteres epigámicos ha sido explicada a través de los mecanismos de selección sexual. Se ha demostrado que las hembras prefieren a los machos cuyos caracteres son los más conspicuos y muestran mayor interés por aquellos que despliegan intensamente conductas de cortejo (Macías García 1991). La presencia de estos caracteres produce en los machos una disyuntiva, debido a que los hace vulnerables a los depredadores como la culebra de río *Thamnophis melanogaster* (Macías García et al., 1994).

En cuanto al estatus de conservación, *G. multiradiatus* no se encuentra registrado en ninguna categoría en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001)

aunque actualmente la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN por sus siglas en inglés) le asigna la categoría de especie vulnerable (IUCN 2007). A nivel de familia se ha documentado que de las 36 especies de goodeidos dos están extintas (*Allotoca catarinae* y *Skiffia francesae*), dos se encuentran en peligro extremo de extinción (*Zoogoneticus tequila* y *Ameca splendens*) y para otras seis especies sólo queda una localidad en la naturaleza (De La Vega Salazar & Macías García 2005). Los principales factores que han puesto en riesgo de extinción local o extirpación de las poblaciones de goodeidos son la degradación ambiental (e.g. eutroficación), la introducción de especies exóticas y la fragmentación del hábitat a causa de la construcción de presas y diques (De La Vega Salazar et al., 2003). Aunado a lo anterior, la presencia de contaminantes ambientales como los plaguicidas en las poblaciones de goodeidos como el pez amarillo podría imponer retos energéticos o metabólicos que incrementarían los costos de producir, exhibir y mantener ornamentos sexuales en esta especie. Lo anterior podría reducir en los machos la probabilidad de obtener parejas afectando la adecuación de éstos. Como consecuencia de la exposición a plaguicidas (e.g. organofosforados) y de las características biológicas de la especie, las poblaciones podrían ser vulnerables a los efectos tóxicos, lo que podría acelerar los procesos de extinción local debido al déficit de parejas potenciales. Para entender cuáles podrían ser los mecanismos por los cuales la exposición a contaminantes como los plaguicidas organofosforados puede afectar la salud de los organismos a continuación se revisarán los mecanismos de toxicidad.

### I.3 Mecanismos de toxicidad de los plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados (OP por sus siglas en inglés) se dividen en dos grupos dependiendo de su estructura química: el primer grupo está constituido por los fosforotiatos (e.g. metil paratión, paratión, fenitrotión y diazinón) y el segundo por los fosforoditioatos (e.g. malatión, dimetoato y azinfosmetil; Jakanović et al., 2001). Ambos grupos actúan mediante tres mecanismos principales de toxicidad: el primero depende de la inhibición de la actividad catalítica de las  $\beta$ -esterasas (i.e. acetilcolinesterasa, carboxilesterasa, tripsina), el segundo de la bioacumulación del compuesto parental (Vittozzi et al., 2001) y el tercero del efecto sobre el sistema inmune a través de dos



procesos: por inhibición de enzimas serina-hidrolasas (i.e. proteasas) y por daño oxidativo (inducción de apoptosis [muerte celular] en los linfocitos T; Li 2007).

### I.3.1 Mecanismo I

Este mecanismo ocurre durante la fase I del metabolismo, cuando la molécula es transformada en el retículo endoplasmático mediante reacciones de desulfuración oxidativa (Jakanović et al., 2001). En éstas reacciones la molécula parental pasa a su forma *oxon*, la cual puede ser mil veces más tóxica, proceso llamado activación. Por ejemplo, en el caso del metil paratión (O,O-Dimetil O-(4-nitrofenol) fosforotioato; MeP; Fig. I.2), una vez que entra en contacto con el organismo, la primera transformación ocurre cuando el grupo tioeter ( $P=S \rightarrow P=O$ ) de la molécula se oxida por acción catalítica de P450 (isoformas CYP2B y CYP3A4) y se produce el metabolito reactivo metil paraoxon (Chambers et al., 1991, Abu-Qare et al., 2000, Albores et al., 2001). Este metabolito se une al sitio activo (grupo hidroxilo de la serina 203) de la acetilcolinesterasa (AChE) y produce una inhibición irreversible de la actividad de la enzima (Abu-Qare et al., 2000; Abu-Qare et al., 2001). El sulfuro que se libera del proceso de oxidación puede eliminarse por orina, pero también, puede tener efectos inhibitorios sobre la enzima P450 por uniones covalentes entre el sulfuro (S) y el grupo *hemo* de la proteína (De Matteis, 1974). Cuando la transformación del MeP es por dearilación oxidativa e hidrólisis se produce en la molécula una ruptura entre la unión del fósforo y el aril-éster, lo que genera ácido dimetil-fosforotióico y *p*-nitrofenol; metabolitos no tóxicos que son excretados (Jakanović et al., 2001; Xu et al., 2003). El metil paratión también puede ser transformado por las enzimas de la fase II del metabolismo. Por ejemplo, las enzimas glutathion S-transferasas actúan desmetilando o desalquilando al compuesto, lo que evita la formación de metabolitos reactivos *oxon* mediante la producción de grupos GS-conjugados (O-alkilos y O-arilos; metabolitos poco tóxicos como el S-metil glutathion, S-*p*-nitrofenol glutathion y *p*-nitrofenol; Abel et al., 2004). En condiciones *in vitro*, por ejemplo, se ha observado que las glutathion S-transferasas son más afines a los compuestos que contienen grupos metoxi como los fosforotioatos (e.g. paratión y metil paratión). Así mismo, una segunda transformación del metil paratión puede ocurrir cuando el metabolito *oxon* interactúa con las enzimas  $\beta$ -esterasas (Abu-Qare et al. 2000; Abu-Qare et al., 2001). Esta interacción provoca

que la concentración del metabolito *oxon* disminuya en el torrente sanguíneo de tal manera que se reduce el riesgo tóxico. También la eliminación de los metabolitos *oxon* puede llevarse a cabo por las reacciones de hidrólisis en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o por la interacción con las  $\alpha$ -esterasas (paraoxonasa, somanasa; Jakanović et al., 2001).

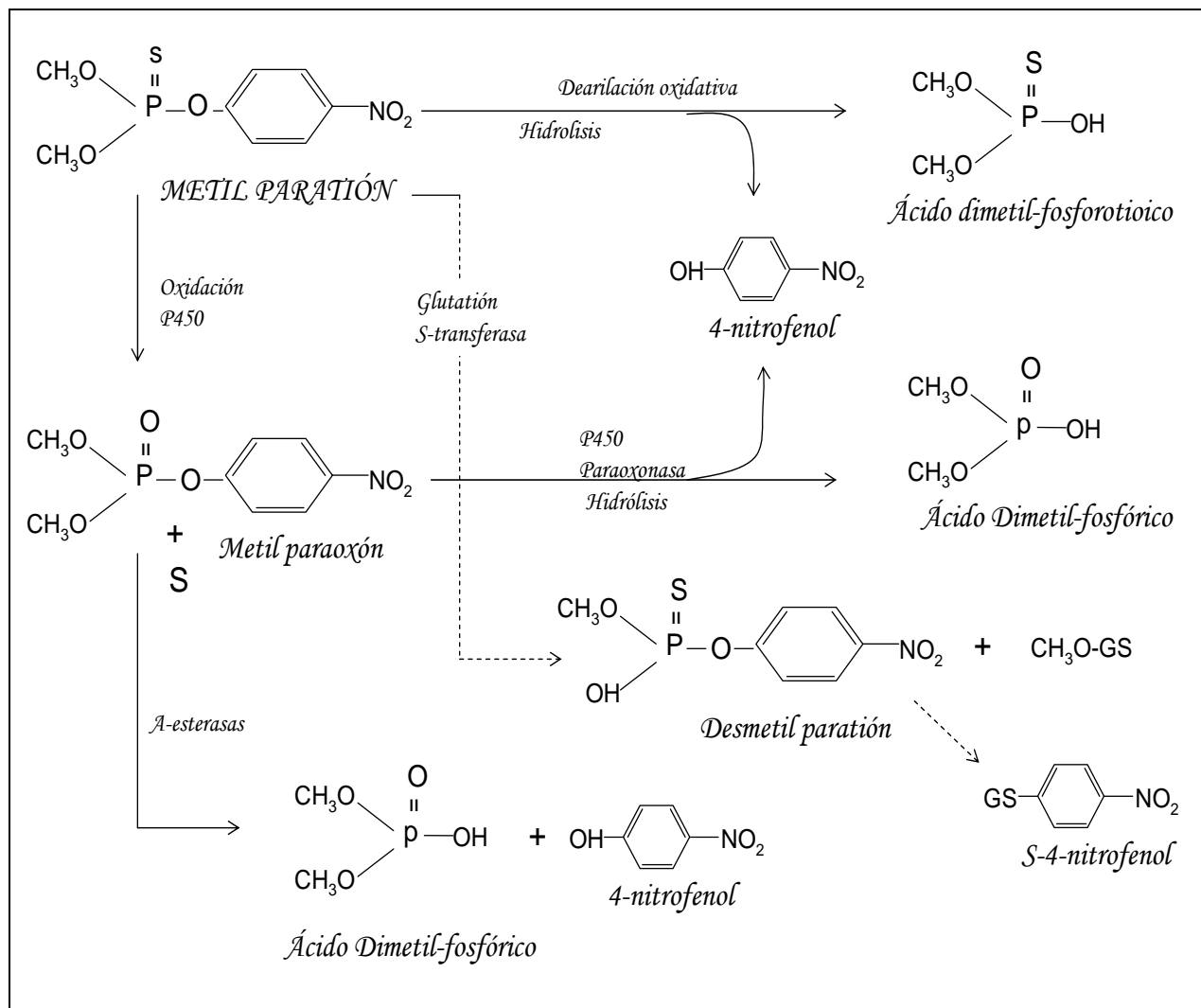


Figura I.2. Transformación metabólica del metil paratión (referencias en el texto).

### I.3.2 Mecanismo II

Este mecanismo implica que los OP son acumulados por el organismo, evitando así su acción sobre las enzimas blanco. Este proceso se facilita por las características lipofílicas de los OP (principalmente fosforotioatoatos como el metil paratión) que tienen alta afinidad por los tejidos grasos, micelios lipo-proteicos y membranas celulares

(Walker et al., 1996; Videria et al., 2001). Sin embargo, el almacenamiento en tejido adiposo es temporal. En periodos en que los organismos migran, se reproducen o cuando los periodos de dieta se extienden o los organismos se enferman, los depósitos de grasa se movilizan y con ellos los plaguicidas, provocando una intoxicación endógena (Jakanović et al., 2001). Con la liberación del compuesto de los tejidos grasos, los efectos tóxicos vuelven a presentarse poniendo en riesgo la integridad de los organismos (Franke et al., 1994; Van der Oost et al., 2003).

### I.3.3 Mecanismo III

Este mecanismo ocurre mediante la biotransformación oxidativa en que se generan radicales libres o compuestos oxido-reactivos (e.g. anión superóxido  $[O_2^-]$ , peróxido de hidrógeno  $[H_2O_2]$  y el radical hidroxilo  $[OH]$ ; Monteiro et al., 2006). Los radicales libres en concentraciones altas pueden producir efectos negativos sobre las proteínas (oxidación proteica) y los lípidos (peroxidación lipídica) afectando las membranas celulares o causando daño sobre las moléculas de ADN, lo que puede conducir a mutagénesis y cáncer (ver revisión de Dröge 2001; Monteiro et al., 2006).

### I.4 Efectos tóxicos por exposición a metil paratión

El metil paratión (MeP) se usa como acaricida e insecticida en cultivos de algodón, alfalfa, maíz, frijón y frutales (Sarma et al., 2001). Los efectos tóxicos por exposición a MeP han sido ampliamente estudiados (Tabla I.1). Principalmente el MeP tiene acción inhibitoria sobre la actividad catalítica de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE), las cuales participan en la comunicación colinérgica del sistema neuromuscular (Chuiko 2000). La inhibición de las esterasas provoca en vertebrados síntomas como mareos, vómitos, pérdida de la visión, espasmos epilépticos y muerte (Garcia et al., 2003). La exposición al MeP supone un riesgo para los organismos porque además de ser un inhibidor de la AChE, puede ser acumulado por largos periodos de tiempo en tejidos musculares, grasas y en órganos como el hígado, riñón, glándulas salivales y gónadas (ECOTOXNET 1996; Garcia-Repetto et al., 1997; Vale 1998, Locke 1999; Aditya et al., 2002; Fanta et al., 2003).

Un aspecto importante en el estudio de contaminantes como el metil paratión en el ambiente radica en que aún a concentraciones sub-letales puede afectar la supervivencia y la reproducción de los organismos, lo que implica repercusiones a nivel poblacional (ECOTOXNET 1996). Sin embargo, los mecanismos por los que actúan aún no se han descrito en su totalidad. Por ejemplo, en vertebrados se han documentado los efectos negativos del MeP en la expresión de la conducta, principalmente en el desplazamiento e interacciones agnósticas, pero no hay suficientes datos acerca de los efectos sobre las conductas reproductivas (Welsh & Hanselka 1972; Calumpang et al., 1997, Abad-Rosales 2000, Baganz et al., 2001, Bretaud et al., 2000). También se tienen datos sobre los efectos de MeP en organismos en estados tempranos de desarrollo expuestos vía materna. Por ejemplo, Abu-Qare & Abou-Donia (2000) y Abu-Qare et al. (2001) observaron que en ratas gestantes el MeP inhibe la actividad de la AChE del cerebro materno y del feto, además de que se acumula en tejido placentario. Incluso hay evidencia que muestra que los efectos neurotóxicos del MeP (inhibición de la actividad de las  $\beta$ -esterasas) afectan a los organismos en estados tempranos de desarrollo (Parker & Goldstein 2000). Por otro lado, uno de los riesgos ambientales que podría ocasionar la acumulación del MeP en organismos es la biomagnificación, proceso en el que la concentración del contaminante aumenta en relación a los niveles tróficos involucrados (De La Vega Salazar et al., 1997). Sin embargo, también faltan datos empíricos al respecto.

Tabla I.1. Efectos causados por la exposición a metil paratión en varios niveles de organización biológica.

Tipo de Alteraciones	Clasificación	Referencias
Inhibición de Acetilcolinesterasa (AChE).	Neurotóxico	Boone & Chambers (1997)
Inducción de daño genético por aberraciones cromosómicas en linfocitos.	Mutagénico e Inmunosupresor	Blasiak & Kowalik (1999) Das & John (1999) Osaba et al. (1999)
Alteración de la absorción de nutrientes que repercute en el crecimiento. Inducción de cambios en la movilización de reservas lipogénicas.	Tóxico metabólico y fisiológico	Abu-Qare et al. (2000) Fanta et al. (2003)
Alteración estructural de membranas celulares por intercalaciones en los fosfolípidos, lo cual causa hipertrofia en ovarios.	Citotóxico	Dhondup & Kaliwal (1997) Videira et al. (2001)
Inducción de daño histológico en hígado, branquias y epitelio intestinal.	Histopatotóxico	Fanta et al. (2003)
Acumulación en órganos blanco (e.g. músculo, sistema nervioso, glándulas salivales, tejido embrionario y placentario).	Bioacumulación	De La Vega Salazar et al. (1997) Garcia-Repetto et al. (1997)
Alteración en el peso y supervivencia de puestas en aves.	Teratogénico	Parker & Goldstein (2000)
Alteración en conductas: agonísticas, defensa del territorio y cuidado paterno.	Conductual	Welsh & Hanselka (1972) Castillo et al. (2002) Walker (2003)
Alteración en las relaciones presa-depredador por cambios demográficos en las poblaciones.	Demográfico	Gama-Flores et al. (1999) Sarma et al. (2001)

Hay poca información sobre los efectos subletales causados por compuestos como el MeP en organismos acuáticos. Lo anterior nos obliga a caracterizar y cuantificar los efectos tanto a nivel individual como a nivel poblacional, así como las implicaciones ecológicas a largo plazo (Smith et al., 1997). Además, es preciso estudiar el impacto ecológico de los plaguicidas en especies nativas o endémica (e.g. charal de Santiago, *C. riojai*; pez amarillo, *G. multiradiatus*) y no sólo en especies ampliamente

distribuidas (e.g. carpas, *Cyprinus carpio*; tilapia, *Oreochromis niloticus*; trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*), ya que la distribución restringida de las primeras, supone que dichas especies podrían ser más vulnerables a los procesos de extinción local que las de amplia distribución.

La pérdida de unas cuantas poblaciones por factores antropogénicos puede impactar significativamente en la poza génica de las especies nativas. Por ejemplo, en especies como el pez amarillo cuyas hembras promueven la exageración de los ornamentos masculinos (caracteres sexuales secundarios), la intensidad de la selección intersexual es un factor de riesgo que de manera natural puede disminuir el tamaño poblacional y conducir a un déficit de parejas potencialmente aceptables (Macías Garcia et al., 1994; Macías Garcia et al., 1998). Sumado a lo anterior, la pérdida de hábitat por la degradación de los ecosistema podría provocar en las especies que presentan un dimorfismo sexual marcado un mayor riesgo de extinción, en otras palabras, los costos de portar y exhibir ornamentos se incrementa con la degradación/modificación del hábitat, por lo que las especies en que la selección sexual es más intensa (i.e. especies que presentan conductas de cortejo y ornamentos conspicuos), podrían experimentar una mayor probabilidad de extinción que las especies con menos intensidad de selección sexual.

### I.5 La selección sexual y los factores antropogénicos que afectan la reproducción

Mediante la teoría de la selección sexual, Darwin (1871) explicó la presencia de los rasgos fenotípicos que proveen ventajas reproductivas de unos individuos sobre otros del mismo sexo durante el apareamiento. En principio, esta fuerza evolutiva opera a través de dos mecanismos: la competencia entre miembros del mismo sexo (típicamente en machos; selección intrasexual) y la elección de parejas (selección intersexual; Andersson 1994). Estos mecanismos favorecen, generalmente en los machos, el desarrollo exagerado de los ornamentos y despliegues conductuales que, aunque costosos (ver más abajo), proveen de beneficios reproductivos para los machos que los portan (i.e. adecuación; Hamilton & Zuk 1982; Millinski & Bakker 1990; Reid 2007) y de señales que usan las hembras para seleccionar parejas potenciales de las

cuales también obtienen beneficios reproductivos (Andersson 1994, Ryan 1997). Por ejemplo, de acuerdo con Andersson (1994), los beneficios reproductivos directos a través de la elección de pareja son: la obtención de buenos territorios de forrajeo y refugios, la reducción del riesgo de infertilidad, la obtención de nutrientes a través de los fluidos seminales o regalos nupciales, la reducción de enfermedades contagiosas y en algunas especies el cuidado paterno compartido. Todos estos beneficios finalmente serán traducidos en descendencias de mejor capacidad (o calidad) para sobrevivir y reproducirse.

La evolución de la preferencia por ornamentos conspicuos se ha explicado a través de distintos mecanismos, por ejemplo, el proceso desbocado de Fisher, el indicador o hándicap, los efectos fenotípicos directos y los sesgos sensoriales (ver revisión de Andersson & Simmons 2006). Sin embargo, el consenso es que la presencia de ornamentos que han evolucionado ya sea por selección intrasexual o por selección intersexual impone costos sobre la viabilidad de los individuos que los portan (Harvey & Bradbury 1991). Estos costos pueden ser directos (e.g. aumento en el riesgo por depredación) o indirectos (e.g. gasto energético o reducción en la respuesta inmune; Kotiaho 2001) y provocan en los organismos una disyuntiva entre la reproducción y la supervivencia (Macías Garcia et al., 1998, Magurran & Macías Garcia 2000; Kotiaho 2001). Además, los costos pueden tener diferente grado de impacto en los organismos dependiendo de la condición (o calidad) genética de cada individuo, es decir, los costos pueden ser menores en individuos en buena condición (e.g. salud, reservas energéticas o fertilidad) en comparación con individuos en mala condición (Kotiaho 2001). Este es uno de los principales supuestos en el que se basa la hipótesis de la evolución de elección de pareja por *hándicap* (Zahavi 1975; Hamilton & Zuk 1982; Iwasa & Pomiankowski 1999). Además, recientemente, se ha propuesto que la calidad de los individuos está determinada por factores ambientales que inciden directamente sobre su capacidad reproductiva (Cotton et al., 2004). Es por ello que los rasgos sexuales dependientes de la condición pueden evolucionar como señales que indican la calidad genética o ambiental, o ambas (Cotton & Pomiankowski 2007). En este contexto, es posible que la condición de los individuos pueda ser afectada por factores antropogénicos (e.g. contaminantes) que incrementarían los costos de producir o mantener ornamentos sexualmente seleccionados. Lo anterior puede ser de suma

importancia debido a que los ornamentos podrían ser indicadores de la calidad ambiental en ciertos momentos de la historia de vida de los organismos.

Pocos trabajos han estudiado los efectos de contaminantes sobre la expresión de ornamentos y conductas reproductivas, así como de las consecuencias en el éxito reproductivo (revisado por Jones & Reynolds 1997). Por ejemplo, se ha reportado que la intensidad de la selección sexual en el gobio común (*Pomatoschistus microps*) y en el guppy (*Poecilia reticulata*) se altera por factores de estrés como la disminución en la intensidad de luz y las condiciones hipóxicas en ambientes eutroficados (Reynolds et al., 1993, Reynolds & Jones 1999, Jones & Reynolds 1999a, 1999b). La mayoría de los estudios se han centrado en evaluar los efectos de contaminantes antropogénicos, particularmente los disruptores hormonales (e.g. el octifenol, el  $17\beta$ -estradiol) y algunos plaguicidas organoclorados sobre el éxito reproductivo mediante la inducción de reversión sexual, infertilidad o alteraciones en la diferenciación de gónadas durante el desarrollo embrionario (Kimberg et al., 2003) o a través de las alteraciones en la expresión de conductas reproductivas (Tabla I.2). Sin embargo, son menos los estudios que han evaluado los efectos de contaminantes ambientales sobre procesos biológicos como la selección sexual y sobre la calidad de los ornamentos sexuales (0.046% de 19,199 trabajos revisados por Jones & Reynolds 1997). Es por lo anterior que resulta interesante evaluar los efectos de la exposición a un plaguicida común como es el metil paratión sobre *G. multiradiatus*, especie que ha evolucionado bajo una presión de selección sexual intensa.



Tabla I.2. Efectos de disruptores hormonales sobre la conducta reproductiva en peces

Sustancias	Especies	Efectos	Referencias
Desechos fenólicos industriales.	<i>Gambusia affinis</i>	Conductas masculinizadas de hembras. Incremento en agresividad de machos y alteración de la expresión de caracteres sexuales secundarios.	Howell et al. (1980)
4- <i>tert</i> -octifenol 17 $\beta$ -estradiol	<i>Poecilia reticulata</i>	Disminución en la frecuencia de despliegues sexuales de machos.	Bayley et al. (1999)
Etil-oestradiol	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Disminución en la agresividad y cortejo	Bell (2001)
17 $\beta$ -estradiol	<i>Carassius auratus</i>	Alteración de conductas reproductivas	Bjerselius et al. (2001)
Viclozolin, <i>p-p'</i> -DDE y flutamida	<i>P. reticulata</i>	Reducción en la duración y frecuencia de despliegues de cortejo sigmoidales.	Bayley et al. (2002)
Etilestradiol	<i>Danio rerio</i>	Alteración de conductas de apareamiento	Segner et al. (2003)

## 1.6 HIPÓTESIS

Las hipótesis de este trabajo son que debido a la biología reproductiva y a la forma como procede la selección sexual en esta especie, a concentraciones subletales como las encontradas en el campo, el metil paratión tiene al menos tres consecuencias en *Girardinichthys multiradiatus*:

1. La exposición a contaminantes ambientales como el MeP podría imponer costos metabólicos tales que limitan la cantidad de recursos que los machos adultos pueden usar para producir, mantener y exhibir sus ornamentos.
2. La diferencia en la bioacumulación del metil paratión en tejidos embrionarios y en los adultos podría deberse a diferencias en las capacidades metabólicas entre clases de edad.
3. Los efectos del MeP durante estados tempranos de desarrollo podrían reflejarse en la calidad de los ornamentos y en la expresión de conductas reproductivas (e.g. cortejo).

Como consecuencia de lo anterior: el desempeño sexual de los machos expuestos a MeP será deficiente, por lo que serán discriminados negativamente por las hembras.

## I.7 OBJETIVOS

- Evaluar los efectos toxicológicos de concentraciones subletales de metil paratión (MeP) en la reproducción y desarrollo de *Girardinichthys multiradiatus* (Capítulo II).
- Comparar la inducción de la actividad enzimática entre hembras y embriones expuestos a MeP para explicar un posible mecanismo de los efectos del este plaguicida sobre los organismos en estados tempranos de desarrollo (Capítulo III).
- Revisar la literatura referente a las enzimas monooxigenasas del citocromo P450 presentes en peces teleósteos (Capítulo IV).
- Evaluar los efectos de concentraciones subletales del MeP en la expresión de ornamentos y el desempeño sexual de machos *G. multiradiatus* expuestos al plaguicida durante el desarrollo embrionario (Capítulo V).

## I.8 Referencias

- Abad-Rosales S. 2000. Exposición del camarón blanco *Litopeneus vannamei* al organofosforado metil paratión y su efecto sobre el proceso de infección de una cepa bacteriana de *Vibrio parahaemolyticus*. Tesis de Maestría en Ciencias. Mazatlán Sinaloa. México.
- Abel LE., Bammker KT., Eaton LD. 2004. Biotransformation of methyl parathion by glutathione S-transferases. *Toxicological Science* 79: 224-232.
- Abu-Qare WA., Abdel-Rahman AA., Kishk MA. Abou-Donia MB. 2000a. Placental transfer and pharmacokinetics of a single dermal dose of [<sup>14</sup>C] methyl parathion in rats *Toxicological Sciences* 53: 5-12.
- Abu-Qare WA., Abou-Donia MB. 2000. Urinary excretion of metabolites following a single dermal dose of [<sup>14</sup>C] methyl parathion in pregnant rats. *Toxicology* 150: 119-127.
- Abu-Qare WA., Abdel-Rahman A., Brownie C., Kishk MA., Abou-Donia M.B. 2001. Inhibition of cholinesterase enzymes following a single dermal dose of chlorpyrifos and methyl parathion, alone and in combination, in pregnant rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 63: 173-189.
- Aditya AK, Chattopadhyay S, Mitra S. 2002. Effect of mercury and methyl parathion on the ovaries of *Labeo rohita* (Ham). *Journal of Environmental Biology* 23:61-64.
- Albores A., Ortega-Mantilla G., Sierra-Santoyo A., Cebrián ME., Muñoz-Sánchez JL., Calderón-Salinas JV., Manno M. 2001. Cytochrome P450 2B (CYP2B)-mediated activation of methyl-parathion in rat brain extracts. *Toxicology Letters* 124: 1-10.
- Andersson M. 1994. *Sexual selection*. Princeton, New Jersey., p. 599.
- Andersson M., Simmons WL. 2006. *Sexual selection and mate choice*. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 296-302.
- Baganz D., Staaks G., Spieser HO., Steinberg CEW. 2001. How to use fish behavior analysis to sensitively assess the hazard potentials of environmental chemicals. En: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change 2*. FM. Butterworth, A. Gunatilaka, ME. Gonshebbatt (Eds.), Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York., p. 450.

- Bayley M., Nielsen R.J., Baatrup E. 1999. Guppy sexual behavior as an effect biomarker of estrogen mimics. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43: 68-73.
- Bayley M., Junge M.E., Baatrup E. 2002. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes desmasculinization and a reduced sperm count in adult males. *Aquatic Toxicology* 56: 227-239.
- Bell M.A. 2001. Effects of an endocrine disrupter on courtship and aggressive behaviour of male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculatus*. *Animal Behaviour* 62: 775-780.
- Bjerselius R., Lundstedt-Enkel K., Olsé H., Mayer I., Dimberg K. 2001. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 $\beta$ - estradiol. *Aquatic Toxicology* 53: 139-152.
- Blasiak J., Kowalik J. 1999. Effect of paraxon-methyl and parathion-methyl on ADN in human lymphocytes and protective action of vitamin C. *Pesticide Science* 23:1182-1186.
- Bondarenko S., Gan J. 2004. Degradation and sorption of selected organophosphate and carbamate insecticides in urban stream sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:1809-1814.
- Bonne S.J., Chambers E.J. 1996. Biochemical factors contributing to toxicity differences among chlorpyrifos, parathion, and methyl parathion in mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Aquatic Toxicology* 39: 333-343.
- Brethead S., Toutant J.P., Saglio P. 2000. Effects of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47: 117-124.
- Calumpang F.M.S., Medina M.J.B., Tejada W.A., Medina R. 1997. Toxicity of Chlorpyrifos, Fenubucarb, Monocrotophos, and Methyl Parathion to fish and frogs after a simulated overflow of paddy water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58: 909-914.
- Castillo C.G., Montante M., Dufour M.L., Martinez M., Jimenez-Capdeville M. 2002. Behavioural effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats. *Neurotoxicology and Teratology* 24: 797-804.

- Chambers JE., Chambers HW., Snawder JE. 1991. Target site and activation of the neurotoxic organophosphorus insecticide parathion in partially hepatectomized rats. *Life Science* 48: 1023-1029.
- Chuiko GM. 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part. C.* 127: 233-242.
- Cotton S., Fowler K., Pomiankowski A. 2004. Do sexual ornaments demonstrate heightened condition-dependent expression as predicted by the handicap hypothesis? *Proceeding of the Royal Society of London* 266: 85-91.
- Cotton S., Pomiankowski 2007. Sexual selection: Does condition dependence fail to resolve the “Lek paradox”? *Current Biology* 17: 335-337.
- Darwin C. 1871. *The descent of man and selection in relation to sex.* J Murray (Ed.), London.
- Das P., John G. 1999. Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in vivo in *Etroplus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticides. *Toxicology Letters* 104: 111-116.
- De La Vega Salazar MY., Tabche ML., Macías Garcia C. 1997. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramírez Dam in México. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38: 53-62.
- De La Vega Salazar MY., Ávila-Luna E., Macías Garcia C. 2003. Ecological evaluation of local extinction: the case of two genera of endemic mexican fish, *Zoogoneticus* and *Skiffia*. *Biodiversity and Conservation* 12: 2043-2056.
- De La Vega Salazar MY., Macías Garcia C. 2005. Principal factors in the decline of the mexican endemic viviparous fishes (Goodeinae: Goodeidae). En: *Viviparous Fishes.* Mari Carmen Uribe & Harry J. Grier (Eds.) New Life Publication, Homestead, Florida., pp. 505-513.
- De Matteis F. 1974. Covalent binding of sulphur to microsoms and loss of cytochrome P-450 during the oxidative desulfuration and several chemicals. *Molecular Pharmacology* 10: 849-854.
- Del Villar A. 1949. Ictiología dulceacuícola mexicana. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 10 (1-4): 309-337.

- DeVlaming V., Connor V., DiGiorgio C., Bailey H., Deanovic J., Hinton D. 2000. Application of whole effluent toxicity test procedure to ambient water quality assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 42-62.
- Dhondup P., Kaliwal BB. 1997. Inhibition of ovarian compensatory hypertrophy by the administration of methyl parathion in hemicastrated albino rats. *Reproductive Toxicology* 11: 77-84.
- Drögue W. 2001. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiology Review* 82: 47-95.
- ECOTOXNET 1996. Extension Toxicology Network: Pesticide Information Profile; methyl parathion. Archivo; [http://: methylpa.htm](http://methylpa.htm).
- Espinosa Pérez H., Fuentes Mata P., Gaspar TM., Dillanes TM., Arenas V. 1998. Notas acerca de la ictiofauna mexicana. En: *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. TP. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (Comps.), Instituto de Biología, UNAM, pp. 227-249.
- Fanta E., Rios F., Romao S., Vianna AC., Freiburger S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicological and Environmental Safety* 54: 119-130.
- Favari L., López E., Martínez-Tabche L., Díaz-Pardo E. 2002. Effect of insecticides on plankton and fish of Ignacio Ramirez reservoir (Mexico): a biochemical and biomagnification study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 177-186.
- Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U., 1994. The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501-1514.
- Gama-Flores JL., Sarma SSS., Fernandez-Araiza MA. 1999. Combined effects of *Chlorella* density and methyl parathion concentration on the population growth of *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62: 769-775.
- Garcia JS., Abu-Qare WA., Meeker-O'Connell AW., Borton JA., Abou-Donia BM. 2003. Methyl parathion: a review of health effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B* 6: 185-210.
- García-Repetto R., Martinez D., Repetto M. 1997. Biodisposition study of the organophosphorus pesticides, methyl-parathion. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59: 901-908.

- Gesundheit Montero P 2004. Biogeografía evolutiva de la familia Goodeidae (Cyprinodontiformes). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias., p. 71.
- Gesundheit P, Macías Garcia C. 2005. Biogeografía cladística de la familia Goodeidae (Cyprinodontiformes). En: Regionalización biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines. Llorente Bousquets J., Morrone JJ. (Eds.), CONABIO, Mexico., pp. 319-338.
- González Zuarth C., Macías Garcia C. 2006. Phenotypic differentiation and pre-mating isolation between allopatric populations of *Girardinichthys multiradiatus*. Proceedings of the Royal Society 273: 301-307.
- Hamilton WD., Zuk K. 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? Science 218: 384-387.
- Harvey HP., Bradbury WJ. 1991. Sexual selection. En: Behavioural Ecology: an evolutionary approach 3ed. JR. Krebs & N. Davies (Eds.) Blackwell Scientific Publications., pp. 203-233.
- Howell WM., Black DA., Bortone SA. 1980. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally-induced masculinization. Copeia 1980: 676-681.
- IUCN. 2007. Red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org>. (Consulta 27 de junio, 2008).
- Iwasa Y., Pomiankowski A. 1999. Good parent and good genes models of handicap evolution. Journal Theoretical Biology 200: 97-109.
- Jakanović M. 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. Toxicology 166: 139-160.
- Jones JC., Reynolds JD. 1997. Effects of pollution on reproductive behaviour. Reviews in Fish Biology and Fisheries 7: 463-491.
- Jones JC., Reynolds JD. 1999a. The influence of oxygen stress on female choice for male nest structure in the common goby. Animal Behaviour 57: 189-196
- Jones JC., Reynolds JD. 1999b. Oxygen and the trade-off between egg ventilation and brood protection in the common goby. Behaviour 136: 819-832.
- Kimbreg K., Korsgaard B., Bjerregaard P. 2003. Effects of octylphenol and 17 $\beta$ -estradiol on the gonads of guppies (*Poecilia reticulata*) exposed as adults via the water or as embryos via the mother. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 134: 45-55

- Kotiaho S. 2001. Costs of sexual traits: a mismatch between theoretical consideration and empirical evidence. *Biology Review* 76: 365-367.
- Li O. 2007. New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity. *Journal of Nippon Medical School* 74 (2). Sitio Web: <http://www.nms.ac.jp/jnms/>
- Locke D. 1999. Human Health Risk Assessment: Methyl Parathion. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs Health Effects Division (7509C) August 2: 1-313.
- Lombardi J., Wourms JP. 1985a. The trophotaenial placenta of a viviparous goodeid fish I. Ultrastructure of internal ovarian epithelium, the maternal component. *Journal of Morphology* 184: 277-292.
- Lombardi J., Wourms JP. 1985b. The trophotaenial placenta of a viviparous goodeid fish II. Ultrastructure of trophotaeniae, the embryonic component. *Journal of Morphology* 184: 293-309.
- Norma Oficial Mexicana NOM 059-SEMARNAT-2001. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación, marzo 2002.
- Macías Garcia C. 1991. Sexual behaviour and trade-offs in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*. PhD thesis, University of East Anglia.
- Macías Garcia C. 1994. Social behaviour and operational sex ratio in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Copeia* 1994: 919-925.
- Macías Garcia C., Jiménez G., Contreras B. 1994. Correlational evidence of a sexually selected handicap. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 35: 253-259.
- Macías Garcia, Saborío E., Barea C. 1998. Does male-biased predation lead to male scarcity in viviparous fish? *New Journal of Fish Biology* 53 (supplement A): 104-117.
- Magurran EA., Macías Garcia C. 2000. Sex differences in behavior as an indirect consequence of mating system. *Journal of Fish Biology* 57: 839-857.
- Miller RR. 2005. Freshwater fishes of México. Chicago: The University of Chicago press., p. 280.
- Milinski M., Bakker TCM. 1990. Female stickleback use male coloration in mate choice and hence avoid parasitized males. *Nature* 344: 330-333.



- Monteiro AD., Alves de Almeida J., Rantin TF., Kalinin LA. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Bryeon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemic and Physiology C* 143:141-149.
- Osaba L., Aguirre A., Alonso A., Graf U. 1999. Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research* 439: 49-61.
- Parker M., Goldstein M. 2000. Differential toxicities of organophosphate and carbamate insecticides in the nestling European starling (*Sturnus vulgaris*). *Archives of Environmental and Contamination Toxicology* 39: 233-242.
- Reid MJ. 2007. Secondary sexual ornamentation and non-additive genetic benefits of female mate choice. *Proceedings of the Royal Society* 274: 13-1402.
- Reynolds JD., Gross RT., Coombs MJ. 1993. Environmental conditions and male morphology determine alternative mating behavior in Trinidadian guppies. *Animal Behaviour* 45: 145-152.
- Reynolds JD., Jones JC. 1999. Female preference for preferred male is reversed under low oxygen conditions in the common goby (*Pomatoschistus microps*). *Behavioral Ecology* 10: 149-154.
- Ryan JM. 1997. Sexual selection and mate choice. En: *Behavioural Ecology: an evolutionary approach* 4ed. JR Krebs & NB Davies (Eds.) Blackwell Publishing., p.179.
- Saborío Fernández E. 2002. Diferencias en la sustitución espermática en dos especies del género *Girardinichthys* (Familia: Goodeidae). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Sarma SSS., Nandini S., Gama-Flores JL., Fernández-Araiza AM. 2001. Population growth of *Euchlandis dilatata* (Rotifera): Combined effects of methyl parathion and food (*Chlorella vulgaris*). *Journal of Environmental Science Health B* 36: 1-12.
- Schiff K., Sutula M. 2004. Organophosphorus pesticides in storm-water runoff from southern California (USA). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1815-1821.
- Schindler J. 2005. Digestion of embryotrophic protein in Goodeid teleosts. En: *Viviparous Fishes*. Mari Carmen Uribe & Harry J. Grier (Eds.) New Life Publication, Homestead, Florida., pp. 266-267.

- Segner H., Carroll K., Fenske M., Janssen RC., Maack G., Pascoe D., Schäfer C., Vandenberg GF., Watts M., Wenzel A. 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 302-314.
- Smith H., Edmund D., Logan T. 1997. Linking environmental toxicology, ethology, and conservation. En: *Behavioral approaches to conservation in the wild*. Clemmons JR. & R. Buchholz (Eds.) Cambridge University Press., p. 382.
- Uribe MC., Rosa-Cruz G., García-Alarcón A. 2005. The ovary of viviparous teleostes. Morphological differences between the ovaries of *Goodea attripinnis* and *Ilyodon whitei* (Goodeidae). En: *Viviparous Fishes*. Mari Carmen Uribe & Harry J. Grier (Eds.) New Life Publication, Homestead, Florida., pp. 217-235.
- Vale JA. 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticides poisoning. *Toxicology Letters* 102-103: 649-652.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen EPN. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
- Vega-Lopez A., Ortiz-Ordóñez E., Uria-Galicia E., Mendoza-Santana EL., Hernández-Cornejo R., Atondo-Mexía R., García-Gasca A., García-Latorre E., Domínguez-Lopez ML. 2007. The role of vitellogenin during gestation of *Girardinichthys viviparus* and *Ameioba splendens*; two goodeid fish with matrotrophic viviparity. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147: 731-742.
- Videria AR., Antunes-Madeira C., Lopes V., Madeira CMV. 2001. Changes induced by malathion, methyl parathion and parathion on membrane lipid physicochemical properties correlate with their toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1511: 360-368.
- Vittozzi L, Fabrizi L, Consigliko DE, Testai E. 2001. Mechanistic aspects of organophosphorothionate toxicity in fish and humans. *Environmental International* 26:125-129.
- Walker HC. 2003. Neurotoxic pesticides and behavioral effects upon bird. *Ecotoxicology* 12: 307-316.
- Walker HC., Hopkin PS., Sibly MR., Peakall BD. 1996. *Principles of ecotoxicology*. Taylor & Francis. London., pp. 14-15.

- Welsh JM., Hanselka WC. 1972. Toxicity and sublethal effects of methyl parathion on behavior of Siamese fighting fish (*Betta splendens*). The Texas Journal of Science 4: 519-529.
- Xu P., Yuan D., Zhong S., Lin Q. 2003. Determination of organophosphorus pesticides and related compound in water samples by membrane extraction and gas chromatography. Environmental Monitoring and Assessment 87: 155-168.
- Zahavi A. 1975. Mate selection--a selection for a handicap. Journal of Theoretical Biology 53: 205-214.

## **CAPÍTULO II**

### EFFECTS OF METHYL PARATHION EXPOSURE ON DEVELOPMENT AND REPRODUCTION IN THE VIVIPAROUS FISH *GIRARDINICHTHYS MULTIRADIATUS*

En este capítulo se reportan los resultados de la exposición de *Girardinichthys multiradiatus* al metil paratión (MeP; experimentos I y II) y la detección de este insecticida en cuerpos de agua habitados por esta especie.

- Experimento I: bioacumulación de MeP y efectos en el peso y crecimiento de peces adultos.
- Experimento II: efectos del MeP en las hembras y en sus camadas expuestas a concentraciones subletales durante el periodo de gestación.
- Caracterización ambiental del MeP en localidades habitadas por *G. multiradiatus*.

Artículo publicado en *Environmental Toxicology*. En línea en Wiley InterScience,

([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com))

(DOI: 10.1002/tox.20414)

# Effects of Methyl Parathion Exposure on Development and Reproduction in the Viviparous Fish *Girardinichthys multiradiatus*

Omar Arellano-Aguilar, Constantino Macías García

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70-275, México, C.P. 04510, México

Received 18 December 2007; revised 22 April 2008; accepted 4 May 2008

**ABSTRACT:** Methyl parathion (MeP), an insecticide commonly used in Mexico, has been detected in water bodies adjacent to agricultural crops and is accumulated in the tissue of the amarillo (*Girardinichthys multiradiatus*), a viviparous fish unique to Central Mexico. Evidence of MeP accumulation in a *G. multiradiatus* population prompted assessment of the consequences of exposure to MeP during the gestation period and adult life. We exposed adult fish to MeP in the diet at concentrations ranging from 0.001 to 0.165  $\mu\text{g/g}$  dry weight of food. Fish accumulated MeP at concentrations from 0.21 to 5.87  $\mu\text{g/g}$  of fish and exhibited a significant reduction in weight and growth rate. We also evaluated the effects on broods of pregnant females exposed to 0.005, 0.01, and 0.1  $\mu\text{g/g}$  dry weight of food. Although these pregnant females were not affected, their offspring showed an increase in spinal cord malformation and a reduction in survival to adulthood. Finally, we sampled seven localities inhabited by *G. multiradiatus*; this revealed the presence of MeP in two water bodies at concentrations of 0.0036 and 0.037  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Our results suggest that low MeP concentrations affect immature fish with possible consequences later in life.

© 2008 Wiley Periodicals, Inc. *Environ Toxicol* 00: 000–000, 2008

**Keywords:** viviparous fish; Goodeinae; accumulation; malformation; methyl parathion

## INTRODUCTION

The amarillo fish (*Girardinichthys multiradiatus*) belongs to the Goodeinae, a clade of viviparous topminnows endemic to Central Mexico (Miller, 2005). This species inhabits mainly the Lerma River basin, with fringe populations in the Pánuco and Balsas basins (Gesundheit and Macías García, 2005; Miller, 2005). It is sexually dimorphic; males develop large colorful fins and have a complex courtship display, and the mating system is driven by female mate choice (Macías García, 1994). In addition, females have internal fertilization with a long gestation pe-

riod ( $53 \pm 7.9$  days; Saborío and Macías García, 2002, unpublished data). During this period, the females transfer lipoproteins and nutrients (such as glucose and amino acids) to embryos (Lombardi and Wourms, 1985). Embryos absorb maternally supplied nutrients through the trophotaenial placenta, a specialized embryonic tissue (Lombardi and Wourms, 1995) which is an external projection of the hindgut (Schindler, 2005). The unusual breeding biology and reproductive behavior of *G. multiradiatus* have called the attention of embryologists and ecologists.

The Goodeinae constitute the most distinctive fish group in Central Mexico; yet, most of their habitat is threatened by urban, industrial, and agricultural pollutants such as benzene, xylene, phenol, and pesticides (Hansen and Afferden, 2001). The organophosphorus compound methyl parathion [MeP; O,O-dimethyl O-p-nitrophenyl phosphorothioate] is extensively used as a pesticide in developing countries. A

Correspondence to: O. Arellano-Aguilar; e-mail: aao\_2000ms@ya2so.com.mx

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/etox.20414

© 2008 Wiley Periodicals, Inc.

report by De La Vega Salazar et al. (1997) detected MeP in water, sediment and fish from the Ignacio Ramírez Dam, one of the localities inhabited by *G. multiradiatus* in the Lerma River basin. The concentrations at which it was found were 0.05–0.1  $\mu\text{g/L}$ , 0.26–0.7  $\mu\text{g/kg}$ , and 0.05  $\mu\text{g/g}$  and 0.7  $\mu\text{g/g}$  in adult and embryonic tissues, respectively. In addition, the authors reported bioaccumulation factors of 4 and 13,461 in fish collected during the dry and rainy seasons, respectively.

Methyl parathion has an organic carbon partition coefficient ( $K_{oc}$ ) of 476, an octanol/water partition coefficient ( $\log K_{ow}$ ) of 2.68 and a water solubility of 55 mg/L (EPA, 1999; Castilho et al., 2000; Tariq et al., 2004). These characteristics favor the diffusion of MeP throughout a water body (Castilho et al., 2000; Na et al., 2006), which represents a serious threat to aquatic organisms. Similarly to other organophosphorus pesticides (OPs), MeP is metabolically transformed into several metabolites, such as methyl paraoxon and 4-nitrophenol (4-np) by microsomal monooxygenase P450 activity (Jakanovic, 2001). Methyl paraoxon inhibits acetylcholinesterase (AChE) activity (Chuiko, 2000), causing accumulation of acetylcholine at the nerve synapses and disruption of nerve function, which can lead to tremors, motor dysfunction and death (EPA, 1999; Chuiko, 2000; Shaonan et al., 2004). The acute toxicity of OPs leads to a combination of muscarinic and nicotinic symptoms, and eventually to death by respiratory distress (Galloway and Handy, 2003). In addition, MeP is rapidly accumulated in fat, liver, kidney, and brain (García-Repetto et al., 1997; Abu-Qare et al., 2001). The gonads also appear to be suitable organs for deposition of MeP, particularly in fish (De La Vega Salazar et al., 1997; Aditya et al., 2002). It also causes histopathological damage, thyroidal malfunction, and immunotoxicity (Fanta et al., 2003; Brown et al., 2004). For these reasons, the World Health Organization has classified MeP as an extremely hazardous pesticide (WHO, 2005). However, as in other developing countries, it is still authorized for agricultural use in Mexico.

De La Vega Salazar et al. (1997) suggested that the reproductive output of populations of *G. multiradiatus* exposed to sublethal concentrations of MeP may be at serious risk, because embryos accumulate MeP at seven times the rate of adults. However, effects that could be occurring through indirect exposure during gestation are unknown. Evidence of MeP accumulation in a wild population prompted this assessment of toxic effects during the gestation period and their consequences. This study attempts to determine the degree of accumulation of MeP and its effects in adult fish following chronic dietary exposure, and to assess the effects of low concentrations of this pesticide in broods of exposed pregnant females. Lastly, we report field concentrations of MeP at additional water bodies inhabited by *G. multiradiatus* to further characterize its risk of exposure.

## MATERIALS AND METHODS

### Organisms and Preparation of Experimental Food

Experimental fish were the second generation of a captive population originally collected at San Juanico Dam, State of Mexico (19°55' N, 99°47' W). They were maintained in 20 L aquaria at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  and 12 h dark/12 h light photoperiod and fed commercial food flakes (Sera Vipan<sup>®</sup>, Bentivoglio, Italy) twice a day.

Experiment 1: In the first experiment, we assessed the dietary accumulation of MeP in adult amarillos under controlled conditions. We randomly selected 56 fish of the same age ( $100 \pm 2$  days), weight ( $0.51 \pm 0.19$  g), and standard length ( $18.8 \pm 1.6$  mm). These were exposed to a gradient of concentrations by incorporating MeP (99.4% purity; Tecrom<sup>®</sup>, Mexico City, Mexico) into food using acetonitrile (Tecsiquim, Mexico City, Mexico) as a solvent carrier (procedure modified from Comoglio et al., 2005). This procedure has proved harmless to aquatic organisms and does not affect food palatability in fish and shrimp (Fanta et al., 2003; Comoglio et al., 2005; Roque et al., 2005). After total evaporation of acetonitrile, MeP-spiked food was stored in the dark at  $-20^\circ\text{C}$ . We prepared eight concentrations (0.001, 0.002, 0.004, 0.008, 0.02, 0.04, 0.08, and 0.165  $\mu\text{g/g}$  dry weight of food), and control food (treated with the same amount of acetonitrile but without MeP). We allocated seven fish to each concentration and fed them with 0.1 g of spiked food per day for 30 days. We measured fish weight (g) and standard length (mm) at the beginning and at the end of the experiment to calculate growth and final weight gain or loss. Growth was calculated as  $([\text{final length} - \text{initial length}] / \text{initial length}) \times 100$  and expressed as percentage of initial body length (%IBL). We also recorded the date of any death occurring during the period of exposure. This datum was used as a covariate in the analysis (see under Statistical Analyses). Dead fish were stored at  $-20^\circ\text{C}$  and surviving fish were sacrificed by freezing at the end of the experiment. Because the amount of tissue per individual fish was insufficient for gas chromatography, we used the total (pooled) fish biomass from each concentration to quantify MeP and 4-np concentrations in tissue. Methyl parathion concentrations in water, food, and tissue were measured using gas chromatography as described under Chromatographic Method.

We calculated the bioaccumulation factor (BAF) as follows:

$$\text{BAF} = \frac{\text{MeP body concentration}}{\text{MeP food concentration} + \text{MeP water concentration}}$$

Experiment 2: In the second experiment, we evaluated the effect of MeP on the offspring of exposed pregnant females. To compare the offspring of untreated and treated females, we placed pairs of females together (one to be used as control and the other as the treatment), with an adult male in the same tank for 10 days to obtain

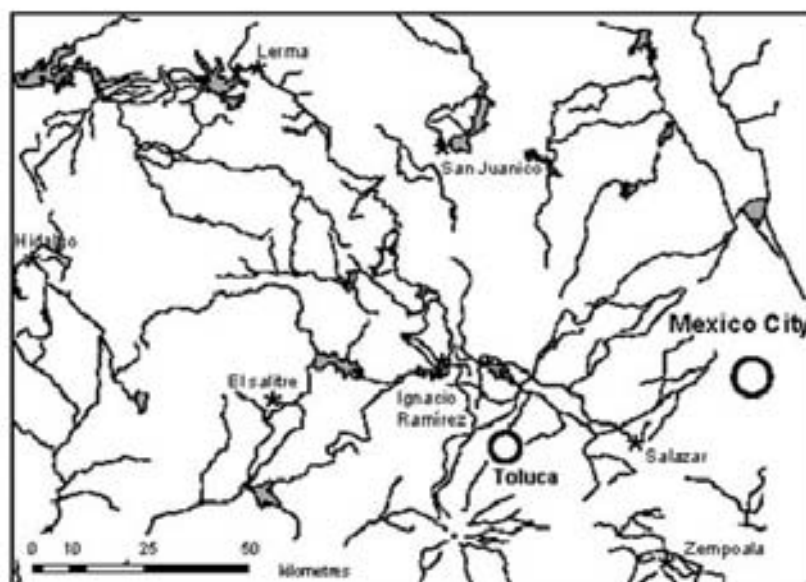


Fig. 1. Hydrographic map of Central Mexico showing locations of sampling stations. A lake in a National park L. Zempoala, (19°03' N, 99°10' W), three dams immersed in agricultural fields: Salazar (19°18' N, 99°23' W), Ignacio Ramírez (19°28' N, 99°47' W), and San Juanico (19°55' N, 99°47' W), and three rivers: Hidalgo (19°40' N, 100°38' W), Salitre (19°23' N, 100°08' W), and Lerma (20°05' N, 100°10' W).

synchronic pregnant females and thus same-age broods of paternal half-sibs. In this way, we could obtain offspring with similar genetic information from the father. Females were then transferred to individual 3 L aquaria, and kept at constant temperature and photoperiod (25°C; 12 h dark/12 h light). Groups of between 12 and 16 pairs of females (weight:  $1.81 \pm 1.27$  g and standard length:  $32.81 \pm 0.48$  mm) were fed 0.1 g of MeP-spiked food. Our experiment consisted of three different concentrations (0.005, 0.01, and 0.1  $\mu\text{g/g}$  dry weight of food) for 50 days of exposure (gestation period in the laboratory is  $53 \pm 7.9$  days; Saborio and Macías García, 2002, unpublished data). One MeP-free control food group was established for each exposed group to compare MeP effects on offspring condition; which was measured in terms of survival to adulthood. Three control groups were used because the different concentrations were not tested simultaneously. The control groups were given food treated with acetonitrile as described earlier. We measured the mass of females before mating and 10 days later (just before beginning the exposure to MeP-spiked food) to register possible effects of mating on female weight. They were then weighed every 15 days until parturition was deemed imminent, when their mass was measured again (~2 days before giving birth). This mass was compared with their mass immediately after offspring were born to assess reproductive output. To detect possible toxic

effects of MeP during the gestation period, we recorded maternal size (standard length; mm), any death, birth date of offspring, brood size (number of fish in each brood), mean per-offspring mass (difference in female weight before and after birth divided by the number of offspring), miscarriages, and stillbirths. Additionally, we recorded any observable malformation in the offspring (i.e., scoliosis, kyphosis, or lordosis) to obtain the proportion of malformed offspring for each brood (number of malformed fish divided by total number of fish born). Each brood was put into an MeP-free 40 L aquarium and kept under controlled conditions ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$  and 12 h dark/12 h light photoperiod) for subsequent observation of mortality for a 3-month period. We calculated the proportion of offspring surviving to adulthood for each brood (number of adult fish divided by total number of fish born). Both proportions of malformed offspring and offspring surviving to adulthood in exposed groups were compared with the proportion in their respective control groups.

Field study: potential field exposure of *G. multiradiatus* to MeP was assessed at seven localities (a lake at a National Park, three dams in agricultural fields, including Ignacio Ramírez Dam, and three rivers; Fig. 1). We chose these localities because they reasonably cover the amarillo's distribution (Gesundheit and Macías García, 2005). At each location, we collected six samples of water and sediment during February of 2005 (the dry season in Central Mexico), when

**TABLE I.** Methyl parathion (MeP) and 4-nitrophenol (4-np) concentrations in water from aquaria and in fish after 30 days of exposure

MeP Dose Supplied by Food ( $\mu\text{g/g}$ )	Total Fish Biomass (g)	Mortality (%)	Water Concentrations ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>		Body Concentrations ( $\mu\text{g/g}$ )		BAF <sup>b</sup>
			4-np	MeP	4-np	MeP	
0	1.04	14	0	0	0	0	0
0.001	0.91	0	$0.97 \pm 0.65$	$0.01 \pm 0.0008$	ND <sup>c</sup>	0.21	19.4
0.002	1.1	0	$3.6 \pm 3.07$	$0.21 \pm 0.25$	14.71	0.33	1.6
0.004	1.1	0	$5.01 \pm 5.36$	$0.37 \pm 0.49$	16.81	0.58	1.6
0.008	0.95	28	–	–	16.92	0.48	–
0.02	0.89	57	$8.06 \pm 2.89$	$0.43 \pm 0.02$	22.65	1.67	3.7
0.04	0.75	28	$4.4 \pm 0.97$	$1.49 \pm 0.17$	23.21	2.50	1.6
0.08	0.82	0	$10.5 \pm 1.17$	$2.81 \pm 0.24$	22.23	3.73	1.3
0.165	0.73	100	$13.2 \pm 1.30$	$8.10 \pm 1.09$	20.6	5.87	–

<sup>a</sup>Mean  $\pm$  standard error.<sup>b</sup>BAF, bioaccumulation factor = [MeP body concentration]/[MeP food concentration + MeP water concentration].<sup>c</sup>ND, not detected.

there is no intensive agricultural activity and the populations of *G. multiradiatus* are reproducing (Macías García, 1994; Macías García et al., 1998). We selected sampling stations based on our knowledge of habitat use by the amarillo. At each site, 50 mL samples of water and sediment were taken 50 m apart. Methyl parathion concentration in the samples was determined by gas chromatography as described later.

### Chromatographic Method

Fish tissues, water, sediment samples, and control and MeP-spiked food were analyzed for organophosphorus pesticides following the Official Mexican Norm (Norma Oficial Mexicana, 1995). We used a gas chromatograph (Hewlett Packard, 6890-GC System, Santa Clara, CA, USA) equipped with a nitrogen-phosphorus thermionic detector (NPD; Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA) and a DB-1701 column (30 m long  $\times$  0.25 mm internal diameter, film thickness of 0.25  $\mu\text{m}$ ; J&W Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at the National Commission of Agriculture and Public Health (Spanish acronym CENAPA, Mexico). Nitrogen was used as a carrier at a 2 mL/min flow. The injector temperature was 230°C and the detector temperature was 320°C. Temperature was programmed to rise from 100 to 185°C starting with 2 min at 100°C; then increased at a rate of 10°C/min until it reached 185°C; held for 10 min, and increased again at a rate of 15°C/min until it reached 300°C and held constant for 15 min. For calibration purposes, the internal standards were ethyl parathion (95% purity) and methyl parathion (99% purity) with limits of detection at 0.7  $\mu\text{g/mL}$  and 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

### Statistical Analyses

Parametric statistics were used when data met the assumption of normality (Kolmogorov-Smirnov goodness of fit

test  $P > 0.05$ ) and homogeneity of variance (Levene's test  $F$  test  $P > 0.05$ ). We used analysis of covariance (ANCOVA) and Tukey's post hoc test to compare weight and %IBL between control and exposed fish at each concentration. The date of death of any fish dying before the exposure period was over was used as covariate in the analysis, as this could have also affected the outcome. Treatment effects on female mortality rates were compared using the Mann-Whitney  $U$ -test. Treatment effects on maternal size, brood size, and mean per-offspring mass were compared using a Wilcoxon matched pairs test. Frequencies of miscarriages, malformations, and offspring surviving to adulthood were compared among treatments using Kruskal-Wallis tests and Statistica<sup>®</sup> version 5 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). For all analyses we set  $\alpha = 0.05$ .

### RESULTS

Chromatographic analyses confirmed the accumulation of MeP and its metabolite 4-np in fish tissue. Concentration ranges were from 0.21 to 5.87  $\mu\text{g/g}$  of MeP, and 14.71 to 20.60  $\mu\text{g/g}$  of 4-np. We observed that the minimum BAF was 1.3 at 0.08  $\mu\text{g/g}$  and the maximum was 19.4 at 0.001  $\mu\text{g/g}$  (Table I). The value of the BAF at 0.165  $\mu\text{g/g}$  was not calculated because this concentration proved lethal for the fish. Food concentrations of 0.008, 0.02, and 0.04  $\mu\text{g/g}$  caused 28%, 57%, and 28% mortality, respectively (Table I). The remaining concentrations, 0.002 and 0.004  $\mu\text{g/g}$ , had no effect. Background mortality in the control group during the same period was 14%. Both MeP and 4-np were found in water from experimental aquaria, with concentrations proving higher than in spiked food (Table I). Final fish weight was significantly lower in exposed fish than in controls at 0.001  $\mu\text{g/g}$  ( $F_{8,53} = 3.79$ ,  $P < 0.05$ ) only. The percentage of initial body length (%IBL) showed that fish



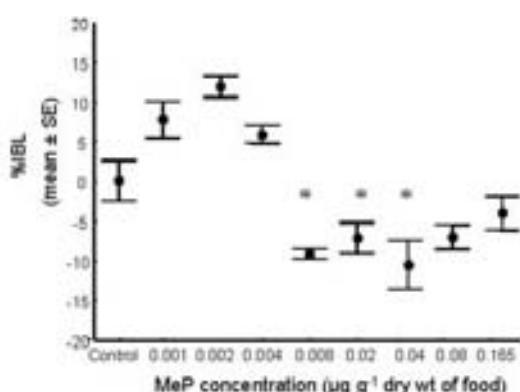


Fig. 2. Percentage of initial body length (%IBL) after exposure to methyl parathion (MeP). An asterisk indicates a significant difference compared with control (analysis of variance,  $P < 0.05$ ). The data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE).

in the exposed groups were significantly smaller than their controls at 0.008 to 0.04  $\mu\text{g/g}$  ( $F_{8,53} = 17.61$ ,  $P < 0.05$ ; Fig. 2).

With respect to the impact of MeP during gestation period, only an average of 48% of females became pregnant, which reduced the sample size for analyses (Table II). There were no significant differences between control and exposed females in frequency of miscarriages and mean per-offspring mass (Table II). Brood size showed a small, nonsignificant tendency to be larger in exposed groups. Female mortality rate was not significantly different between groups ( $D = 0.49$   $P < 0.01$ ,  $U_{13,8} = 42$   $P = 0.3$ ; Table II).

Although there were no evident effects of MeP on pregnant females at any of the concentrations, low concentrations of MeP induced offspring deformities, mostly scoliosis (lateral curvature of the spine; Fig. 3). The proportion of malformations was significantly higher in groups exposed

to 0.005  $\mu\text{g/g}$  ( $D = 0.471$   $P < 0.01$ ,  $H_{1,11} = 5.64$   $P < 0.05$ ) and 0.01  $\mu\text{g/g}$  ( $H_{1,11} = 4.4$   $P < 0.05$ ) than in those exposed to 0.1  $\mu\text{g/g}$  or the control group [Fig. 4(A)]. Scoliosis resulted in deficient swimming in young fish. As a result of high the offspring mortality occurring during the first week of life, the proportion of offspring surviving to adulthood was significantly lower in exposed than in control groups at 0.01  $\mu\text{g/g}$  ( $D = 0.186$   $P < 0.2$ ,  $H_{1,11} = 6.22$   $P < 0.05$ ) and at 0.1  $\mu\text{g/g}$  [ $H_{1,11} = 5.47$   $P < 0.05$ ; Fig. 4(B)].

Our field data revealed the presence of MeP in surface water in two out of seven sampled localities. The concentrations at which it was found are relatively high, when compared with concentrations reported in other studies (Table III). Methyl parathion was below the limits of detection in the rest of the samples, including Ignacio Ramírez Dam, where it had been previously detected (De La Vega Salazar et al., 1997; Favari et al., 2002).

## DISCUSSION

Methyl parathion is an insecticide which has well-known toxic effects on fish such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*; EPA, 1999). However, in species with an unusual breeding biology such as *G. multiradiatus*, (a matrotrophic livebearer where the mother transfers nutrients to embryos during a ~2 month gestation), and which have not been traditional test organisms, the effects of exposure to MeP and other pollutants are yet unknown. To determine what risk does exposure to MeP during the gestation period present to *G. multiradiatus*, we assessed its toxic effects during the gestation period and later in life. De La Vega Salazar et al. (1997) suggested that the zooplanktivore feeding habit of *G. multiradiatus* could be a likely route of MeP accumulation. For this reason, dietary exposure to MeP was selected for the experimental treatment. As a first step, we conducted experiment 1 to evaluate MeP toxicity in *G. multiradiatus*. Our results (Table I) show that MeP was

TABLE II. Summary of data from the experiment exposing females to methyl parathion during pregnancy

Parameters	0.005 $\mu\text{g/g}$	Control	0.01 $\mu\text{g/g}$	Control	0.1 $\mu\text{g/g}$	Control
Exposed females (n)	17	16	15	15	12	18
Pregnant females (n)	5	8	5	6	8	13
Dead females (n)	0	0	0	0	4	4
Miscarriages (n)	0	0	2	1	0	0
Total number of produced offspring (n)	65	45	73	59	55	67
Brood size	13.0 $\pm$ 4.72	5.62 $\pm$ 1.26	14.6 $\pm$ 7.21	9.8 $\pm$ 2.24	13.75 $\pm$ 5.57	7.4 $\pm$ 1.47
Mean per-offspring mass (gram)	0.03 $\pm$ 0.007	0.05 $\pm$ 0.009	0.02 $\pm$ 0.005	0.04 $\pm$ 0.017	0.07 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.008
Malformed offspring (n)	13	0	8	0	3	0
Surviving offspring (n)	21	41	0	43	8	54

Brood size and mean per offspring mass are given as mean  $\pm$  standard error.



Fig. 3. Common lateral curvature of the spine (scoliosis) in malformed offspring born to females exposed to 0.005 and 0.01  $\mu\text{g/g}$  methyl parathion (bar = 1 mm). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

accumulated by exposed adult fish at BAFs within (and also below) the range reported for the amarillo population at Ignacio Ramírez Dam (De La Vega Salazar et al., 1997). These results are therefore relevant to the situation in the field. The BAF at the lowest concentration (0.001  $\mu\text{g/g}$ ) was higher than at the other concentrations; which may be because of factors such as uptake and depuration kinetics, which could depend on the availability of MeP in food and water (see Van der Oost et al., 2003). In addition to MeP, we detected concentrations of the 4-*np* metabolite in fish tissues at concentrations above those found for MeP (Table I). This metabolite is a final product of the MeP metabolic pathway of oxidation and hydrolysis (Jakanovic, 2001; Vittozzi et al., 2001), but is also produced by MeP photocatalytic oxidation (Moctezuma et al., 2007). The 4-*np* concentrations in water from experimental aquaria suggest that MeP transformation by fish was not the only source of this metabolite, and that it could also have been taken up directly from water.

Chronic exposure to MeP affected fish weight and growth (as %IBL) at 0.001  $\mu\text{g/g}$  and at 0.005 to 0.04  $\mu\text{g/g}$

concentrations, respectively (Fig. 2), and was lethal at 0.165  $\mu\text{g/g}$  (Table I). Comparable effects have also been reported in other fish species exposed to MeP and have been explained as a consequence of starvation by inhibition of feeding behavior (Little et al., 1990) and/or histopathological damage at the gastrointestinal level decreasing the absorption of nutrients from food (Fanta et al., 2003). Similar physiological effects of MeP toxicity have been reported in other aquatic nonfish species as well. For example, Comoglio et al. (2005) reported weight loss in Brazilian shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with MeP-spiked food at 0.62 and 1.31  $\mu\text{g/g}$ , and Moore et al. (2007) reported growth impairment in amphipods (*Hyalella azteca*) exposed to MeP-contaminated water and sediment from the Mississippi River Delta, USA. Our results strongly suggest that both uptake routes of exposure (water and food) took place, due to MeP dilution in water (from spiked food; Table I). Both MeP uptake routes could contribute to damage to target organs such as gills and liver, and led to reduced weight and growth (as %IBL) in *G. multiradiatus*. In fish, these organs are the main targets of MeP, as reported by Fanta

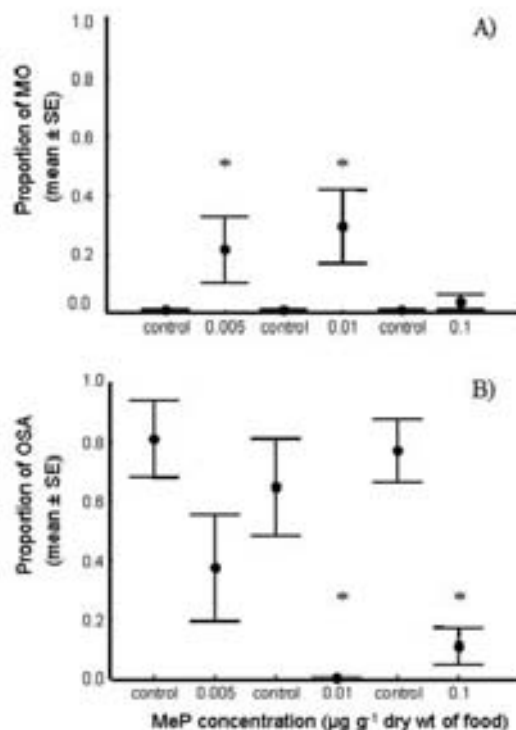


Fig. 4. A) Proportion of malformed offspring (MO) and B) proportion of offspring surviving to adulthood (OSA). An asterisk indicates a significant difference compared with respective controls (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.05$ ). The data are expressed as mean  $\pm$  standard error (SE).

TABLE III. Levels of methyl parathion in surface water

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Localities	References
0.00005–0.0001	Ignacio Ramírez Dam, Mexico	De La Vega Salazar et al. (1997)
0.0000045–0.00024	Atoya River, Nicaragua	Castilho et al. (2000)
0.035–0.21	Ignacio Ramírez Dam, Mexico	Favari et al. (2002)
0.0056	Shallow groundwater in Punjab, Pakistan	Tariq et al. (2004)
0.0000017	Yumana River, India	Aleem and Malik (2005)
0.000001–0.00005	Taihu Lake, China	Na et al. (2006)
$0.0036 \pm 0.0025^a$	San Juanico Dam, Mexico	This study
$0.037 \pm 0.03^a$	Salazar Dam, Mexico	This study

<sup>a</sup>Mean  $\pm$  standard error.

et al. (2003), who analyzed the histopathological damage in *Corydoras paleatus* by both uptake routes, at 0.00058  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (in water) and 0.083  $\mu\text{g}/\text{g}$  (in food). Fanta et al. (2003) concluded that regardless of how MeP enters the organism, liver function was always impaired in *C. paleatus*, and future work shall verify whether this is also the case in *G. multiradiatus*.

In the second experiment, we evaluated the effects of MeP on offspring from exposed pregnant females at three concentrations. Females of *G. multiradiatus* commonly avoid mating when they are confined with a single male, with only about 60% of the females in such an experimental treatment becoming pregnant (Macías García and Saborío, 2004; González Zuarth and Macías García, 2006). This may be one of the reasons why the number of pregnant females was reduced (Table II). Despite this potential bias in our experiment, we still found that exposed pregnant females were not affected by low concentrations of MeP because mortality rate, brood size, frequency of miscarriages, and mean per-offspring mass were not different from those of control groups. However, their offspring showed a 20% increase in abnormalities of the spinal cord at 0.005 and 0.01  $\mu\text{g}/\text{g}$  [Fig. 4(A)]. In the case of the group exposed to 0.1  $\mu\text{g}/\text{g}$ , we did not observe abnormal fish, probably because of high embryonic mortality followed by female reabsorption and ingestion of dead tissue by siblings (Greven and Grossherr, 1992). In vertebrates, teratogenic effects of exposure to OPs have been documented. For example, Kumar and Devi (1992) reported teratogenic signs (short neck, muscular hypoplasia of legs and retarded growth) in developing chick embryos exposed to MeP. Bonfanti et al. (2004) reported that malathion and chlorpyrifos induce congenital muscular dystrophy in frog embryos, and Cook et al. (2005) reported that sublethal concentrations of malathion induce malformations (reductions in body length and eye diameter), as well as a decrease in survival, in zebra fish (*Danio rerio*) embryos. Our results may provide further evidence of OP teratogenic activity since the observed scoliosis could be due to alterations during the development of the nervous system; specifically of the notochord. A possible mechanism of teratogenic effects by

OPs has been proposed by Brimijoin (2005), who suggested that acute inhibition of AChE by long-term exposure to OPs in developing organisms might affect the morphogenic functions of AChE and cause abnormal development of the nervous system via direct neurotoxic effects. In addition, Bonfanti et al. (2004) found a strong correlation between AChE inhibition and notochord malformation.

Our results also show a heightened mortality in juvenile fish at 0.01 and 0.1  $\mu\text{g}/\text{g}$  but not at 0.005  $\mu\text{g}/\text{g}$ . Both offspring malformation and early mortality in exposed groups contributed to reduce the proportion of offspring surviving to adulthood [Fig. 4(B)]. Our results lead to the conclusion that developing fish are more sensitive to low concentrations of MeP than their mothers. Analogous results have been reported in other vertebrates by Solecki et al. (1996) who showed that birds fed MeP-spiked food laid fewer and lighter eggs than controls. Whereas Abu-Qare et al. (2001) reported that AChE activity in fetal brains is more sensitive to MeP than maternal AChE activity. The same occurs with other pollutants, for example, Atterberry et al. (1997) reported that younger rats are much more sensitive to the lethal effects of parathion and chlorpyrifos than adults, and Roling et al. (2006) proposed that early-life stages of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) are more sensitive to chromium than the adult stage because in young organisms relatively new tissues are growing, developing, and differentiating.

In the case of the amarillo fish, we believe that the lipophilicity of MeP favors intraovarian exposure, and that it could be absorbed by young fish during the gestation period. We suggest that pollutants such as MeP could be absorbed by larval fish through the trophotaenial tissue in a similar manner to how maternal lipoproteins are taken from the ovarian lumen (see Lombardi and Wourms, 1985; Schindler, 2005). This is a hypothesis that deserves to be tested in the future.

The presence of MeP in water bodies has been clearly demonstrated by us and others (Table III). Moreover, we detected high levels of the pesticide during the dry season when the density of *G. multiradiatus* is highest (Macías García et al., 1998). Therefore, wild pregnant females and

their broods could be currently being affected by MeP concentrations. Since our data demonstrate that this pesticide affects the health of developing (embryonic) amarillo fish with negative consequences later in life, this study hints at a possible link between the highly specialized reproductive biology of *G. multiradiatus* and its vulnerability to MeP. Future studies should focus on the long-term effects of embryonic MeP exposure on survival and subsequent reproductive fitness.

We wish to thank M. E. González, M. Cervantes, and N. Villazana from CENAPA, E. Ávila Luna and P. Gesundheit from IIE-UNAM, and M.E. Gombatti, R. Hudson, D. Keugman, F. García-Formentí, A. Valero, and S. Kenyon who kindly commented on earlier versions of the manuscript. This work is part of Arellano-Aguilar's PhD Thesis, supported by scholarships from the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT) and UNAM.

## REFERENCES

- Abu-Qare WA, Abdel-Rahman A, Brownie C, Kishk MA, Abou-Donia MB. 2001. Inhibition of cholinesterase enzymes following a single dermal dose of chlorpyrifos and methyl parathion, alone and in combination, in pregnant rats. *J Toxicol Environ Health* 63:173–189.
- Aditya AK, Chattopadhyay S, Mitra S. 2002. Effect of mercury and methyl parathion on the ovaries of *Labeo rohita* (Ham). *J Environ Biol* 23:61–64.
- Aleem A, Malik A. 2005. Genotoxicity of the Yamuna river water at Okhla (Delhi), India. *Ecotoxicol Environ Saf* 61:404–412.
- Atterberry TT, Burnett WT, Chambers JE. 1997. Age-related differences in parathion and chlorpyrifos toxicity in male rats: Target and nontarget esterase sensitivity and cytochrome P450-mediated metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 147:411–418.
- Bonfanti P, Colombo A, Ossi F, Niceto I, Andrioletti M, Baccetta R, Mantecchia P, Fascio U, Vallati G, Vismara C. 2004. Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development. *Aquat Toxicol* 10:189–200.
- Brimjoin S. 2005. Can cholinesterase inhibitors affect neural development? *Environ Toxicol Pharmacol* 19:429–432.
- Brown BS, Adams AB, Cyr GD, Geoffrey EJ. 2004. Review contamination effects on the teleost fish thyroid. *Environ Toxicol Chem* 23:1680–1710.
- Castillo JA, Fenzl N, Guillen SM, Nascimento FS. 2000. Organochlorine and organophosphorus pesticides residues in the Atoya river basin, Chinandega, Nicaragua. *Environ Pollut* 110:523–533.
- Chaiko GM. 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and *in vitro* inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comp Biochem Physiol C* 127:233–242.
- Comoglio L, Azin O, Roque A, Betancourt-Lozano M, Angus D, Haro BM. 2005. Evaluation of sublethal biomarkers in *Litopenaeus vannamei* on foodborne exposure to methyl parathion. *Ecotoxicol Environ Saf* 62:66–74.
- Cook W, Paradise JC, Lom B. 2005. The pesticide malathion reduce survival and growth in developing zebrafish. *Environ Toxicol Chem* 24:1745–1750.
- De La Vega Salazar M, Tabche ML, Macías García C. 1997. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramírez Dam in México. *Ecotoxicol Environ Saf* 38:53–62.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1999. Revised environmental fate and effects assessment for methyl parathion. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. USA. World Wide Web.
- Fanta E, Rios FS, Romao S, Vianna AC, Freiberger S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicol Environ Saf* 54:119–130.
- Favari L, López E, Martínez Tabche L, Díaz-Pardo E. 2002. Effect of insecticides on plankton and fish of Ignacio Ramírez Reservoir (Mexico): A biochemical and biomagnification study. *Ecotox Environ Saf* 51:177–186.
- Galloway T, Handy R. 2003. Immunotoxicity of organophosphorus pesticides. *Ecotoxicology* 12:345–363.
- García-Repetto R, Martínez D, Repetto M. 1997. Biodisposition study of the organophosphorus pesticide, methyl-parathion. *Bull Environ Contam Toxicol* 59:901–908.
- Gesundheit P, Macías García C. 2005. Biogeografía cladística de la familia Goodeidae (Cyprinodontiformes). In: Lorente Bousquets J, McErone JJ, editors. Regionalización Biogeográfica en IBEROAMÉRICA y Tópicos Afines. Mexico City: CONABIO. pp 319–338.
- González Zuarth C, Macías García C. 2006. Phenotypic differentiation and pre-mating isolation between allopatric populations of *Girardinichthys multiradiatus*. *Proc Biol Sci B* 273:301–307.
- Greven H, Grossherr M. 1992. Adelphophagy and oophagy in *Ameba splendens* Miller & Fitzsimons, 1971 (Goodeidae, Teleostei). *Z Fischkunde* 1:193–197.
- Hansen MA, Afferden VM. 2001. Toxic substances. In: Hansen AM, van Afferden M, editors. *The Lerma-Chapala Watershed*. New York: Kluwer Academic/Plenum. pp 95–122.
- Jakanovic M. 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166:139–160.
- Kumar KB, Devi KS. 1992. Teratogenic effects of methyl parathion in developing chick embryos. *Vet Hum Toxicol* 34:408–410.
- Little EE, Archeski RD, Flerov BA, Kozlovskaya VI. 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch Environ Contam Toxicol* 19:380–385.
- Lombardi J, Wourms JP. 1985. The trophotaenial placenta of a viviparous goodeid fish. I. Ultrastructure of internal ovarian epithelium, the maternal component. *J Morphol* 184:277–292.
- Macías García C. 1994. Social behavior and operational sex ratio in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Copeia* 1994:919–925.
- Macías García C, Saborío E. 2004. Sperm competition in a viviparous fish. *Environ Biol Fishes* 70:211–217.
- Macías García C, Saborío E, Berra C. 1998. Does male-biased predation lead to male scarcity in viviparous fish? *J Fish Biol (Supplement A)* 53:104–117.

- Miller RR. 2005. *Freshwater Fishes of México*. Chicago: The University of Chicago press. 280 p.
- Moctezuma E, Leyva E, Palestino G, de Lasa H. 2007. Photocatalytic degradation of methyl parathion: Reaction pathways and intermediate reaction products. *J Photochem Photobiol A: Chem* 186:71–84.
- Moore MT, Lizotte RE Jr, Knight SS, Smith S Jr, Cooper CM. 2007. Assessment of pesticide concentration in three Mississippi Delta oxbow lakes using *Hyalella azteca*. *Chemosphere* 67:2184–2191.
- Na T, Fang Z, Zhanqi G, Ming Z, Cheng S. 2006. The status of pesticide residues in the drinking water sources in Meiliangwan bay, Taihu lake of China. *Environ Monit Assess* 123:351–370.
- Norma Oficial Mexicana. 1995. Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados, en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, cérvidos y aves, por cromatografía de gases (NOM-028-ZOO-1995). Mexico City, Mexico: Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Diario Oficial de la Federación.
- Roling AJ, Bain JL, Garden-Torresdey J, Bader J, Baldwin SW. 2006. Hexavalent chromium reduces larvae growth and alters gene expression in Mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ Toxicol Chem* 25:2725–2733.
- Roque A, Abad S, Betancourt-Lozano M, Garcia de la Parra LM, Baud D, Guerra-Flores AL, Gomez Gil B. 2005. Evaluation of the susceptibility of cultured shrimp *Litopenaeus vannamei* to vibriosis when orally exposed to the insecticide methyl parathion. *Chemosphere* 60:126–134.
- Schindler J. 2005. Digestion of embryotrophic protein in Goodeid teleosts. In: Uribe CM, Grier JH, editors. *Viviparous Fish*. Homestead, FL: New Life. pp 266–267.
- Shorran L, Xianchuan X, Guonian Z, Yajun T. 2004. Kinetic characters and resistance to crude and purified brain acetylcholinesterase of three freshwater fishes by organophosphate. *Aquat Toxicol* 68:293–299.
- Solecki R, Faqi AS, Pfeil R, Hilbig V. 1996. Effects of methyl parathion on reproduction in the Japanese quail. *Bull Environ Contam Toxicol* 57:902–908.
- Tariq MI, Afzal S, Hussain I. 2004. Pesticides in shallow groundwater of Bahawalnagar, Muzafargarh, D.G. Khan and Raja Pur districts of Punjab, Pakistan. *Environ Int* 30:471–479.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57–149.
- Vittozzi L, Fabrizi L, Consiglio DE, Testai E. 2001. Mechanistic aspects of organophosphorothionate toxicity in fish and humans. *Environ Int* 26:125–129.
- World Health Organization (WHO). 2005. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2004*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 54 p.

### **CAPÍTULO III**

#### REPORTE DEL EXPERIMENTO PARA DETERMINAR LA INDUCCIÓN DEL CITOCROMO CYP2B DE HEMBRAS *GIRARDINICHTHYS MULTIRADIATUS* EXPUESTAS A METIL PARATIÓN

En este capítulo se reporta el experimento para identificar la actividad catalítica de P450 tanto en hígados de hembras gestantes como en tejidos embrionarios expuestos a 0.1 µg/g de metil paratión.



## CAPÍTULO III

### REPORTE DEL EXPERIMENTO PARA DETERMINAR LA INDUCCIÓN DEL CITOCROMO CYP2B DE HEMBRAS *GIRARDINICHTHYS MULTIRADIATUS* EXPUESTAS A METIL PARATIÓN

Omar Arellano-Aguilar<sup>1</sup>, Sandra Hernández<sup>2</sup>, Javier Espinosa Aguirre<sup>2</sup>, Constantino Macías García<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Conducta Animal, Instituto de Ecología, UNAM, <sup>2</sup>Laboratorio de Toxicología Genómica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Resumen: los objetivos de este trabajo fueron establecer la actividad catalítica basal de la isoforma CYP2B en hembras (*Girardinichthys multiradiatus*) y comparar la inducción de CYP2B en gónadas de hembras preñadas y no preñadas expuestas a 0.1 µg de metil paratión/g alimento mediante ensayos de actividad catalítica de la enzima y por inmunodetección. Los resultados no son concluyentes, sin embargo, consideramos que éstos pueden ser útiles para futuros trabajos que deseen explorar la actividad de las enzimas monooxigenasas P450 en esta especie.

*Palabras clave: citocromo P450; metil paratión; pez amarillo*

#### III.1 Introducción

Los compuestos hidrofóbicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los plaguicidas, los dibenzofuranos policlorados y las dibenzo *p*-dioxinas son contaminantes frecuentes en los cuerpos de agua. Estos contaminantes se caracterizan por tener coeficientes de partición octanol/agua (log K<sub>ow</sub> por sus siglas en inglés) mayores a 6. El valor de log K<sub>ow</sub> es un indicativo del balance entre la solubilidad en lípidos y la solubilidad en agua. De acuerdo con Van der Oost et al. (2003), los compuestos con coeficiente de partición altos son más afines a los tejidos grasos en los organismos y pueden ser transferidos a distintos niveles de la red trófica. La acumulación (o bioacumulación) de contaminantes hidrofóbicos es un proceso que se basa en las tasas de absorción y remoción del compuesto químico en el organismo en relación con el tiempo de exposición (Walker et al., 1996). La función que describe este

proceso está determinada por la concentración del químico en la biota ( $C_B$ ) en un tiempo determinado ( $t$ ). Esta función se expresa de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \frac{dC_B}{dt} &= [K_{ag}C_{ag} + K_{alm}C_{alm}] - K_B C_B \\ &= [K_{ag}C_{ag} + K_{alm}C_{alm}] - [K_{exc} + K_{met}]C_B \end{aligned}$$

Donde  $C$  se refiere a la concentración del compuesto y  $K$  es una tasa constante. Los sufijos  $B$ ,  $ag$ ,  $alm$ ,  $exc$  y  $met$  se refieren a la biota, agua, alimento, excreción y metabolismo respectivamente. En los organismos acuáticos la absorción de un contaminante puede ocurrir por dos rutas principales; directamente del agua y/o a través del alimento. De acuerdo con el modelo anterior, la bioacumulación de un contaminante hidrofóbico depende de la disponibilidad y persistencia del compuesto en el ambiente y de los factores metabólicos y de excreción que están determinados por la genética de los organismos, el sexo, edad, talla, dieta, etcétera (Van der Oost et al., 2003).

Se ha reportado bioacumulación de metil paratión en embriones y adultos del pez amarillo *Girardinichthys multiradiatus* (De La Vega Salazar et al., 1997). El metil paratión presenta un valor de  $\log K_{ow}$  de 2.83, lo que significa que es un compuesto ligeramente hidrofóbico y por lo tanto su tasa de bioacumulación es baja en comparación con compuestos como los organoclorados ( $\log K_{ow} \geq 7$ ; Fisk et al., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que compuestos con valores de  $\log K_{ow}$  menores a 6 pueden mantenerse en equilibrio entre el agua y la biota hasta por un año (Van der Oost et al., 2003). De La Vega Salazar et al. (1997) reportaron que en los tejidos embrionarios se acumulan concentraciones mayores de MeP que en los adultos. Además, se ha demostrado que el MeP a bajas concentraciones produce efectos tóxicos en los embriones pero no en las hembras gestantes (Arellano-Aguilar y Macías Garcia 2008). Sin embargo, se desconocen los mecanismos que subyacen a las diferencias de



bioacumulación del MeP entre embriones y organismos adultos reportadas por De La Vega Salazar et al. (1997). Una posible explicación es que la capacidad metabólica puede ser distinta entre los embriones y los adultos. Choundary et al. (2003) reportaron que la expresión enzimática de los embriones se incrementa gradualmente a medida que avanza el tiempo de gestación, y recientemente Johri et al. (2006) demostraron que los organismos prematuros presentan una capacidad metabólica limitada para activar los mecanismos de desintoxicación conducidos por las enzimas de los citocromos P450. Por lo anterior, suponemos que los embriones *G. multiradiatus* pueden ser metabólicamente deficientes para desintoxicarse y por ello ser más sensibles a la exposición del MeP.

La mayor parte de la transformación del MeP en los organismos ocurre durante la fase I del metabolismo por la acción catalítica de las enzimas monooxigenasas P450. Particularmente, en mamíferos se encontró que los citocromos de la familia CYP2B conducen específicamente el proceso de oxidación del MeP (Albores et al., 2001). En una prueba piloto indagamos si en *G. multiradiatus* se podía detectar el CYP2B usando como indicador el sustrato pentoxirresorufin-*O*-depentylasa (PROD). Los resultados de la prueba detectaron actividades basales de los citocromos CYP2B1 y CYP2B2 en hembras adultas (48.5 pmol res/min/mg de proteína y de 34.91 pmol res/min/mg de proteína respectivamente), lo que nos indicó que era posible cuantificar la inducción de P450 por exposición a MeP y permitió plantear los siguientes objetivos: 1) establecer la actividad catalítica basal de CYP2B en hígados de hembras preñadas de *G. multiradiatus*, 2) evaluar la inducción de CYP2B en gónadas de hembras preñadas expuestas a MeP y 3) cuantificar la presencia de CYP2B mediante ensayos de inmunodetección en tejidos de hembras expuestas al insecticida.

### III.2 Materiales y Métodos

**Peces y tratamiento:** usamos 48 hembras de apariencia sanas *G. multiradiatus* (24 hembras no preñadas y 24 preñadas) de una población mantenida en cautiverio en el Instituto de Ecología, UNAM originaria de la localidad San Juanico, Edo. de México. Cada hembra fue colocada en un acuario de 3 L y diariamente se les proporcionaba 0.1 g de alimento seco (Sera Vipán®, Italia), fotoperiodo 12h/12h (luz/oscuridad) a

25°C. Antes de iniciar el experimento las hembras fueron sometidas a un ayuno de 24 horas. El experimento se hizo por triplicado, utilizando 4 hembras por cada grupo (controles: hembras no preñadas y preñadas, y expuestas: hembras no preñadas y preñadas). Al grupo de hembras expuestas les administramos una concentración de 0.1 µg MeP/g de alimento por 96 h. El alimento lo preparamos usando una solución stock de 0.09 µg MeP/ml de acetonitrilo del cual se tomaron 11 ml y se aplicaron a 10 g de alimento. Una vez preparado el alimento, éste se colocó durante tres horas en oscuridad a temperatura ambiente para que el acetonitrilo se evaporara. El alimento preparado se almacenó a -20°C. Al grupo de hembras controles les administramos alimento preparado con la misma cantidad de acetonitrilo pero sin MeP.

**Extracción y análisis de tejidos:** a las 96 horas de exposición, cada hembra (no preñada y preñada) fue puesta a -20°C por 5 min para aletargarla y sacrificarla por decapitación. Mediante una incisión en la base del abdomen extrajimos de cada hembra el hígado y la gónada (en el caso de hembras preñadas junto con los embriones). Todos los tejidos los pesamos y los colocamos en una solución fisiológica de 0.15 M KCL a 4°C en una relación 1:3 (m/v) con respecto al peso del tejido. A continuación reunimos en una sola muestra los tejidos (hígados o gónadas) de 4 hembras de cada grupo. Homogenizamos las muestras y posteriormente mediante centrifugación (9000 g por 10 min; equipo Hettich Mikro 20) obtuvimos el sobrenadante, el cual contiene la fracción S9 hepático. De la fracción S9 se obtienen los microsomas por ultra centrifugación a 100,000 g por 60 min (equipo Beckman L8-55), manteniendo la temperatura a 4°C. A continuación removimos el botón resultante de la ultracentrifugación y agregamos el primer amortiguador (fosfatos de potasio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.1 M a pH 7.4 y sacarosa a 0.25 M), manteniendo el volumen inicial de la muestra. Este procedimiento permite obtener el retículo endoplasmático en donde se encuentran las enzimas. Nuevamente por ultracentrifugación (100,000 g por 60 min a 4°C) obtuvimos un botón resultante y lo homogenizamos agregando un segundo amortiguador (fosfatos de potasio 0.1M a pH 7.4, adicionado con EDTA 1 mM, DTT 0.1 mM y glicerol al 20% [v/v]). Este procedimiento permite proteger las muestras de la congelación. De cada muestra preparamos alícuotas de 50 y 20 µl y las almacenamos a -80°C.

Para cuantificar la concentración de proteína microsomal, usamos cada muestra por triplicado y cada una fue diluida en una relación 1:1 (v/v) con agua destilada de las que se tomaron 20  $\mu$ l y les agregamos 1 ml de colorante diluido *Bio-Rad Protein Assay*, incubándolas por 5 min. Mediante el método estandarizado Bradford (1976) obtuvimos la curva estandarizada de albúmina bovina y la concentración de proteína microsomal. Utilizamos un espectrofotómetro (Versa Fluor™ BIORAD) con filtro de excitación EX/530/20 (No. Cat. 520) y filtro de emisión EW/0590/10 (No. Cat. 585) ajustado a  $\lambda=595$  nm. Posteriormente cuantificamos la actividad enzimática de CYP2B por el método de fluorometría (Burke et al., 1994). La fluorescencia fue calibrada con la curva patrón de resorufina (940  $\mu$ g de resorufina disuelta en 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO)). La mezcla de reacción (1 mL) contenía  $\sim 1.4$  mg/ml de proteína microsomal, Tris 50 mM y  $MgCl_2$  25 mM (pH 7.6) y el sustrato pentoxirresorufin-*O*-depentylasa (PROD). Las muestras fueron preincubadas a 37°C por tres minutos, en un baño con agua, la reacción la iniciamos con la adición del NADPH (10  $\mu$ L de la solución 50 mM). Las lecturas fluorométricas fueron programadas cada 15 segundos por un periodo de 5 min. Con los datos de la concentración de proteína microsomal y de la pendiente de la curva de los datos fluorométricos de las muestras, estimamos la actividad del citocromo CYP2B1 expresada como picomoles de resolución por minuto por miligramo de proteína microsomal (pmol res/min/mg de proteína microsomal).

Para cuantificar la modulación de la síntesis de la proteína CYP2B1/2 usamos 20  $\mu$ l de cada muestra y les aplicamos anticuerpos policlonales para la prueba inmuno-específica *Wester blot* del citocromo P450 isoformas CYP2B1/2. Usamos como control positivo un supersoma (BD-Gentest), el cual contiene microsomas obtenidos de sistemas de sobre-expresión en células de insecto, infectadas con Baculovirus de CYP2B1 de rata. El gel de acrilamida fue cargado con 20  $\mu$ l de cada muestra ( $\sim 0.1$   $\mu$ g de proteína microsomal) y 10  $\mu$ l del supersoma de rata. La electroforesis la hicimos a 200 Volts por una hora. Posteriormente, transferimos las proteínas del gel de acrilamida a la membrana de nitrocelulosa, durante 1 hora a 100 Volts. La transferencia se verificó aplicando a la membrana el colorante Ponceu S por 10 min y al término de este periodo enjuagamos la membrana con agua destilada. La membrana fue bloqueada con albúmina al 3% por una hora en refrigeración. Después de este periodo enjuagamos la membrana con una solución amortiguadora de PBS (Fosfatos

de sodio y cloruro de sodio) y “Tween” al 0.3%. Enseguida se expuso la membrana a los anticuerpos específicos rabbit-anti-rat CYP2B1/2 (catálogo ROI-CYP2B12 abr; suero de 100 µl; Lot: 0507005787; Fitzgerald Industries Internacional INC. USA). El primer anticuerpo reconoce la proteína de conejo CYP2B y fue aplicado en la membrana por una hora, seguido de tres enjuagues cada 10 minutos. El segundo anticuerpo, el cual reconoce al primer anticuerpo y permite observar la proteína, también estuvo en contacto con la membrana por una hora y tras tres enjuagues de 10 min cada uno, aplicamos la solución reveladora (3,3'-diaminobencidina en amortiguador de PBS y peróxido de hidrógeno al 30%).

**Análisis estadísticos:** los datos de la concentración de proteína microsomal (mg/ml) de las muestras de tejido controles y expuestos a 0.1 µg/g de MeP fueron transformados usando el logaritmo base 10 para cumplir los supuestos de normalidad y homoscedasticidad. Se aplicó una prueba paramétrica de varianza ANOVA.

### III.3 Resultados

Las concentraciones de proteína microsomal en el hígado de las hembras no preñadas y preñadas expuestas no difirieron significativamente de las obtenidas en el grupo de las hembras controles (ANOVA,  $F_{5,12} = 0.84$   $p = 0.89$ ). Sin embargo, observamos ciertas tendencias. Por ejemplo, en el grupo control, las hembras no preñadas presentaron una concentración mayor de proteína microsomal que las hembras preñadas (Tabla III.1). En cambio en el grupo de las hembras expuestas, la concentración de proteína microsomal fue similar entre los hígados de hembras no preñadas y preñadas (Tabla III.1). Y en el caso de las muestras de los ovarios de hembras preñadas, observamos que las expuestas presentan una concentración de proteína microsomal mayor que las gónadas controles, aunque con un error estándar alto en la muestra de las gónadas preñadas expuestas (Tabla III.1).

Tabla III.1. Concentración de proteína microsomal (mg/ml) en muestras de tejido hepático y de gónadas de hembras controles y expuestas a 0.1 µg/g de metil paratión.

	No. Organismos por muestra	Proteína microsomal promedio (mg/ml)	Error estándar	Intervalos de confianza (95%)		valor mínimo	valor máximo
				Límite inferior	Límite superior		
<b>Tejido hepático control</b>							
Hembra no preñada	4	1.51	0.82	-2.02	5.04	0.16	2.99
Hembra preñada	4	0.48	0.16	-0.20	1.15	0.16	0.65
<b>Tejido hepático expuesto</b>							
Hembra no preñada	4	0.43	0.08	0.09	0.77	0.28	0.55
Hembra preñada	4	0.35	0.09	-0.02	0.73	0.18	0.45
<b>Gónadas</b>							
Preñada control	4	0.51	0.08	0.17	0.85	0.36	0.63
Preñada expuesta	4	1.87	1.53	-4.71	8.46	0.20	4.93

Los datos fluorométricos estuvieron fuera de la curva patrón y no fue posible cuantificar la actividad basal de CYP2B en las muestras de tejido hepático y de gónadas. En cuanto a los resultados del ensayo de inmunodetección por *Wester blot*, nuestras pruebas tampoco mostraron la presencia de CYP2B1 en las muestras de tejido hepático, ni en las gónadas en las hembras expuestas y controles (Fig. III.1).



Figura III.1. Análisis de la inmunodetección de la proteína microsomal CPY2B1/2. De izquierda a derecha se observa en el carril 1: gónada de hembra preñada expuesta a 0.1µg/g metil paratión, en el carril 2: hígado de hembra preñada expuesta, en el carril 3: hígado de hembra no preñada expuesta y en el carril 4: hígado de hembra preñada control. Como control positivo se usó el supersoma (carril 5). El volumen de muestra cargado en cada carril fue de 20 µl (~0.1 µg de proteína microsomal). El CYP2B1/2 (peso molecular 54 KDa) esta marcado sobre la membrana del *Western blot*.

#### III.4 Discusión

Con base en nuestros resultados no fue posible establecer la actividad basal de la expresión de CYP2B en el hígado de hembras preñadas. Tampoco podemos afirmar que el metil paratión indujo en las hembras expuestas la actividad catalítica del CYP2B en los tejidos hepáticos y en gónadas, ni mucho menos determinar alguna diferencia en la actividad de este citocromo entre hembras no preñadas y preñadas. Este resultado contrasta con lo que habíamos obtenido en la prueba piloto (ver introducción) en la cual determinamos la actividad enzimática de las isoformas CYP2B1 y CYP2B2 usando una muestra de tejido hepático de 4 hembras adultas. No obstante que para este estudio seguimos el mismo protocolo que en la prueba piloto, creemos que la concentración de proteína microsomal de las muestras de tejido puede explicar porque no obtuvimos resultados en este trabajo. En la prueba piloto la concentración de proteína microsomal fue de 1.76 mg/ml, mientras que en este experimento en promedio la concentración de la proteína fue de  $0.85 \pm 0.65$  mg/ml. Es probable que esta diferencia se deba a diversos factores entre ellos la edad, peso o talla de los organismos usados para este experimento. Además, es probable que este mismo

problema en el tamaño de muestra (concentración de proteína microsomal) fuera la causa que limitó la detección de CYP2B por *Western Blot*. Stegeman et al. (1997) reportaron la presencia de CYP2B en peces teleósteos cargando cada línea del inmunoensayo con 30 µg de proteína microsomal, mientras que en este estudio usamos ~0.1 µg de proteína, por lo que el tamaño de muestra en nuestro experimento fue insuficiente para que la prueba de inmunoensayo fuera adecuada.

No obstante de que no alcanzamos los objetivos planteados, consideramos que este trabajo puede servir como una guía para poner a prueba nuestra hipótesis en estudios futuros. En la literatura existen únicamente tres reportes de la cuantificación de CYP2B en peces teleósteos. El primero es de Stegeman et al. (1997) quienes reportaron la inmunodetección del citocromo CYP2B por el método *Western blot* y la actividad catalítica de la enzima usando como sustrato la PROD. Los otros dos trabajos Klinger et al. (2001) y Parente et al. (2004) reportaron la actividad de CYP2B mediante el ensayo de actividad catalítica utilizando como sustrato la PROD en la carpa (*Ciprinus carpio*) y en la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuestos a fenobarbital y muestras de agua contaminadas por plaguicidas respectivamente. Sin embargo, a excepción del trabajo de Stegeman et al. (1997), la mayoría de los estudios han mostrado que en peces las isoformas de la familia CYP2B están ausentes o no responden a los compuestos típicos que se han usado para cuantificar esta clase de isoformas (Goksoyr & Forlin 1992; Ruus et al., 2002; Iwata et al., 2002). Así mismo, hay una postura muy fuerte en contra de atribuir la presencia de CYP2B usando como sustrato la PROD en peces teleósteos (Cap. IV de esta tesis) porque de acuerdo con Goksoyr & Forlin (1992) y Ruus et al. (2002), la isoforma CYP1A en peces teleósteos es la que conduce la transformación catalítica de la PROD.

Es evidente que debemos caracterizar la actividad metabólica entre tejidos adultos y embrionarios para dilucidar cuales son los factores determinantes en las diferencias de la tasa de bioacumulación y de los efectos tóxicos en *G. multiradiatus*. Sin embargo, es necesario calibrar las pruebas que se hicieron en este trabajo para en *G. multiradiatus* y reducir las fuentes de variación. A continuación sugerimos algunas modificaciones a nuestro protocolo: 1) aislar a los embriones de la gónada para evitar interferencia entre tejidos de distinto origen, 2) analizar al mismo tiempo al menos tres

isoformas de distintas familias P450 que estén relacionadas con la biotransformación de compuestos organofosforados: necesariamente se deberá incluir la isoforma CYP1A como biomarcador de exposición y 3) se requiere aumentar el tamaño de muestra para incrementar la concentración de proteínas microsomales (al menos a 2 mg/ml para actividad enzimática y a 30 µg para *Western blot*). Es recomendable aplicar ensayos más sensibles como la hibridación *in situ* de P450 o la detección de los transcritos (ARN mensajero) de P450 mediante la técnica RT-PCR para determinar la presencia de la actividad de P450 en embriones de *G. multiradiatus*.

**Agradecimientos:** a Victor Dávila por sus recomendaciones durante el experimento.

### III. 5 Referencias

- Albores A., Ortega-Mantilla G., Sierra-Santoyo A., Cebrián ME., Muñoz-Sánchez JL., Calderón-Salinas, JV., Manno, M. 2001. Cythochrome P450 2B(CYP2B)-mediated activation of metil-parathion in rat brain extracts. *Toxicology Letter* 124:1-10.
- Arellano-Aguilar O., Macías Garcia C. 2008. Effects of methyl parathion exposure on development and reproduction in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Environmental Toxicology* (publicado en línea).
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Burke D., Thompson S., Weaver SR., Wolf RC., Mayer TR. 1994. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochemical Pharmacology* 48: 923-936.
- Choudhary D., Jansson I., Schenkman BJ., Sarfarazi M., Stoilov I. 2003. Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414: 91-100.
- De La Vega Salazar MY., Tabche ML., Macías Garcia C., 1997. Bioaccumulation of metil parati6n and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ram6rez Dam in M6xico. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38: 53-62.
- Fisk AT., Norstro, RJ., Cymbalisky CD., Muir DCG. 1998. Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: bioacummulation parameters and their



- relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 951-961.
- Goksoyr A., Forlin L. 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* 22: 287-312.
- Iwata H., Yoshinari K., Negishi M., Stegeman JJ. 2002. Species-specific responses of constitutively active receptor (CAR)-CYP2B coupling: lack of CYP2B inducer-responsive nuclear translocation of CAR in marine teleost, scup (*Stenotomus chrysops*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 131: 501-510.
- Johri A., Dhawan A., Singh LR., Parmar D. 2006. Effects of prenatal exposure of deltamethrin on the ontogeny of xenobiotic metabolizing cytochrome P450s in the brain and liver of offsprings. *Toxicology and Applied Pharmacology* 214: 279-289.
- Klinger W., Lupp A., Barth A., Karge E., Knels L., Kuhn U., Muller D., Schiller F., Demme U., Lindstrom-Seppa P., Hanninen O. 2001. Cytochrome P450 (P450) isoforms expression, P450 concentration, monooxygenase activities reactive oxygen species formation lipid peroxidation, and glutathione content in wild catch carp and tench liver—influence of a two weeks exposure to Phenobarbital. *Experimental Toxicology and Pathology* 22: 513-522.
- Parente, MET., De-Oliveira, XACA., Silva, BI., Araujo GF., Paumgartten RJF. 2004. Induced alkoxyresorufin-O-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere* 54: 1613-1618.
- Ruus A., Sandvik M., Ugland KI., Skaare JU. 2002. Factors influencing activities of biotransformation enzymes, concentrations and compositional patters of organochlorine contaminants in members of a marine food web. *Aquatic Toxicology* 61: 73-87.
- Stegeman JJ., Woodin BR., Singh H., Oleksiak MF., Celander M. 1997. Cytochromes P450 (CYP) in tropical fishes: catalytic activities, expression of multiple CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fish from Bermuda. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 116: 61-75.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen EPN. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
- Walker HC., Hopkin PS., Sibly MR., Peakall BD. 1996. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis. London.

## **CAPÍTULO IV**

### REVISIÓN DE LAS ENZIMAS MONOOXIGENASAS P450 EN PECES TELEÓSTEOS: SITIOS DE EXPRESIÓN, FUNCIÓN ENDÓGENA, ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD

En este capítulo se presenta la revisión de la familia enzimática del grupo de citocromos-monooxigenasas P450 descritas en 57 especies de peces teleósteos. Asimismo, se revisa el concepto de biomarcador.

## CAPÍTULO IV

### REVISIÓN DE LAS ENZIMAS MONOOXIGENASAS P450 EN PECES TELEÓSTEOS: SITIOS DE EXPRESIÓN, FUNCIÓN ENDÓGENA, ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD

Omar Arellano-Aguilar<sup>1</sup>, Regina Montero<sup>2</sup>, Constantino Macías García<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ecología, UNAM. <sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

#### ÍNDICE

Introducción

P450: biomarcador de exposición

Clasificación de los citocromos P450

La superfamilia P450 en peces teleósteos

Sitios de inducción y funciones endógenas de las monooxigenasas

Subfamilia CYP2B

Inductores de P450

Uso de P450 en el monitoreo ambiental

Consideraciones finales

Referencias

Tabla IV.1

Tabla IV.2

Tabla IV.3

Tabla IV.4

**Resumen:** los programas de monitoreo ambiental utilizan herramientas biológicas para evaluar el impacto de la contaminación sobre los ecosistemas. Estas herramientas son organismos sensibles a contaminantes llamados centinelas e indicadores biológicos suborganísmicos conocidos como biomarcadores. En este trabajo revisamos uno de los grupos de especies centinelas más empleados en los programas de monitoreo, los peces teleósteos, y uno de los biomarcadores de exposición, las enzimas monooxigenasas del citocromo P450. Observamos que en 57 especies de peces se ha descrito alguno de los elementos de este grupo de enzimas. A partir de la comparación de los sitios de inducción y de las funciones endógenas que desempeñan estas enzimas en peces discutimos sobre la especificidad y sensibilidad de este grupo para ser usado en los programas de monitoreo. Los estudios de los últimos años muestran que hasta el momento la función de la mayoría de las isoformas P450 descritas en peces es desconocida, que contrariamente a lo que se creía, los mecanismos de inducción entre peces y mamíferos son distintos y por lo tanto la inducción sustrato- específica no es equiparable. Además, se desconocen las causas y significado biológico de la ocurrencia de isoformas con las mismas funciones endógenas. Sugerimos que es indispensable avanzar en el entendimiento de las funciones de las P450 si hemos de interpretar adecuadamente el significado de los datos sobre actividad catalítica de las monooxigenasas que arrojan los programas de monitoreo ambiental.

Palabras clave: *monooxigenasas, peces teleósteos, biomarcadores, biomonitoreo.*

## IV.1 Introducción

La contaminación de los cuerpos de agua es una preocupación permanente debido a las implicaciones que tiene sobre los ecosistemas acuáticos y la salud humana. Para evaluar el impacto de los contaminantes sobre la integridad y calidad de los ambientes se han establecido programas de monitoreo ambiental que miden el grado de deterioro y riesgo a contaminantes (Morse et al., 2007). Estos programas emplean además de las herramientas fisico-químicas, las biológicas que suelen ser modelos (i.e. organismos) a los cuales se les miden variables particulares que permiten en teoría estimar los riesgos por exposición a contaminantes. Estas variables o parámetros pueden ser demográficos (e.g. estructura de comunidades), epidemiológicos, de historias de vida, toxicológicos como la bioacumulación de sustancias químicas, etcétera. Estos modelos se usan tanto *in situ* como en laboratorio. Los modelos *in situ* o de campo, también llamados especies centinelas o bioindicadores, deben reunir ciertas características para ser considerados en los programas de monitoreo. Manly (1995), Walker et al. (1996) y Beeby (2001) recomendaron que las especies centinelas deben ser organismos: 1) fáciles de identificar en campo, 2) abundantes y representativos en su ecosistema, 3) con ciclos cortos de reproducción, 4) con capacidad de bioacumular contaminantes, 5) con capacidad de reflejar los niveles de contaminación y fuentes de emisión, además de que 6) se debería conocer ampliamente su biología, ecología y distribución. Claramente se trata de una lista restrictiva y algunos atributos podrían restringir la aplicabilidad de los datos que aportan (e.g. los procesos de bioacumulación pueden diferir enormemente entre organismos de vida corta y especies longevas).

Los peces teleósteos son los centinelas más usados en el monitoreo ambiental de ambientes acuáticos, ya que suelen ser vulnerables a los contaminantes, ocupar los sitios más altos de las redes tróficas y ser la mayor fuente proteica de varias especies (Solbé 1994; Simon et al., 1998; Henczová et al., 2006). Entre los peces más usados en estudios toxicológicos y en el monitoreo ambiental se encuentran el pez cebra (*Danio rerio*), la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), el bagre de canal (channel catfish: *Ictalurus punctatus*), el medaka japonés (*Oryzias latipes*), el fúndulo (*Fundulus heteroclitus*), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), el sargo de América del Norte (*Stenotomus chrysops*) y la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Algunas de estas

especies como el salmón, el bagre de canal o la tilapia del Nilo se empezaron a usar como centinelas por su importancia económica para las pesquerías. En cambio el pez cebrá, el medaka japonés o el sargo son especies que por sus características biológicas son fáciles de mantener en cautiverio y que las hacen modelos económicos para los estudios toxicológicos, además de que se ha avanzado mucho en el mapeo de sus genomas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/zebrafish/>). Se ha observado que en ambientes contaminados estas especies desarrollan procesos mutagénicos o enfermedades reproductivas (Haasch 1993), permitiendo con esto describir los mecanismos de acción de compuestos químicos (Wang-Buhler et al., 2005) y alertar de la presencia de compuestos cancerígenos y disruptores hormonales en el ambiente. Una de las principales ventajas de los peces teleósteos como modelos toxicológicos es la cantidad de similitudes en las funciones hepáticas entre éstos y los mamíferos, así como el sistema de excreción, que en peces lo constituyen las branquias y los riñones (Reinert 1992; Wang-Buhler et al., 2005). Estos atributos permiten estudiar en los peces los mecanismos de biotransformación y excreción de diversos agentes químicos contaminantes que ponen en riesgo la salud del ecosistema y de los humanos.

A partir de los mecanismos de acción se han obtenido nuevas herramientas biológicas para la evaluación ambiental (Dorward-King et al., 2001). Estas herramientas, llamadas biomarcadores, son respuestas a nivel molecular, celular u orgánico que han sido clasificadas como biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad potencial (Dorward-King et al., 2001). De acuerdo con Walker et al. (1996), los biomarcadores de exposición reflejan la presencia de compuestos tóxicos en el ambiente mediante la inducción de enzimas con funciones desintoxicantes. En cambio los biomarcadores de efecto miden los daños sobre la salud y supervivencia de los organismos. En cuanto a los biomarcadores de susceptibilidad potencial, éstos son los polimorfismos genéticos que producen individuos metabólicamente deficientes a cierto contaminantes (e.g. Glutatión S-transferasa; GSTM1, GSTT1, GSTP1 (Sabbioni et al., 2006). En los programas de monitoreo ambiental se han adoptado un número importante de biomarcadores tanto de exposición como de efecto (Tabla IV.1), entre los cuales destacan la inducción de la actividad de las enzimas monooxigenasas P450, las glutatión S- transferasas, las metalotioneínas, las esterasas (e.g. acetilcolinesterasa AChE) o la formación de aductos de ADN (formación de complejos entre compuestos químicos y la

cadena de ADN mediante enlaces azúcar-fosfato), los cambios en los niveles de retinol, porfirinas y suero en sangre, así como las respuestas del sistema inmune (Walker et al., 1996). El valor de un biomarcador depende de ciertas características que según Walker et al. (1998) debería reunir idealmente, como son la sensibilidad (i.e. detección), la especificidad, la simplicidad y la estabilidad.

Según algunos autores, la variedad de técnicas y clasificaciones de los biomarcadores han traído confusión acerca del uso de estas herramientas para evaluar el ambiente (Dorward-King et al., 2001). Incluso se ha advertido que aunque los biomarcadores presentan ventajas y múltiples usos en el monitoreo, no todas las ventajas y usos son aplicables a todos los biomarcadores (Dorward-King et al., 2001). Lo anterior se debe en principio a las diferencias de las respuestas entre individuos, estados de desarrollo, especies, así como las características del contaminante en cuanto a la disponibilidad y rutas metabólicas involucradas (Walker et al., 1998). Las respuestas de los biomarcadores dependen de los factores ambientales como la estacionalidad, la temperatura, el fotoperiodo, la dieta, etcétera, por lo que los resultados frecuentemente difieren entre estudios de laboratorio y campo. Lo anterior ocurre por ejemplo con las enzimas monooxigenasas del citocromo P450 (CYP450) que se utilizan como biomarcadores de exposición de ambientes contaminados en los programas de monitoreo. En este trabajo revisamos aquellos trabajos en donde se ha reportado la actividad de las CYP450 en peces teleósteos para conocer los principales sitios de inducción y las funciones metabólicas en las que participan. Además, discutimos si los resultados obtenidos en los últimos años muestran que estas enzimas son verdaderamente específicas y sensibles a la presencia de contaminantes, requisitos para considerar una variable biológica como biomarcador.

#### IV.2 P450: biomarcador de exposición

Las enzimas monooxigenasas del citocromo P450 se usan como biomarcadores de exposición porque responden a la presencia de contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los bifenilos policlorados (PCB), el benzo-(a)-pireno (BaP), las dioxinas, diversos plaguicidas, metales pesados y fármacos con actividad esteroideogénica (Whyte et al., 2000). Las enzimas CYP450 se localizan en el retículo

endoplasmático de los hepatocitos y su síntesis se induce también en órganos como intestino, riñón, pulmones, cerebro, corazón, piel, gónadas y tejidos placentarios (Van der Oost et al., 2003). Estas enzimas dirigen las reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis durante la fase 1 del metabolismo y su función es la biosíntesis de compuestos como los esteroides, los ácidos grasos y las prostaglandinas (Groves 2005a). Tanto los mecanismos de inducción como de regulación han sido revisados extensamente en diversos trabajos (Walker et al., 1996; Werck-Reichhart & Feyereisen 2000; Honkakosky & Negishi 2000; Tredger & Stoll, 2000; Azenbacher & Azenbacherova 2001; Ioannides et al., 2004; Dickins 2004). Lo anterior ha permitido el consenso en cuanto al mecanismo de activación del ciclo catalítico, el cual inicia con la interacción entre el sustrato y la enzima P450 para formar el complejo enzima-sustrato. La reacción depende de la presencia de NADPH y oxígeno molecular para reducir el Fe<sup>III</sup> contenido en la molécula del citocromo. Posteriormente, los átomos de oxígeno se unen al grupo hemo-ferroso del citocromo, lo que promueve una segunda reducción y protonación favoreciendo la formación del complejo Fe<sup>III</sup>-hidroperóxido. La protonación y el espacio heterolítico entre el puente oxígeno-oxígeno generan una producción simultánea de agua molecular y un intermediario hierro-oxón. Finalmente, uno de los átomos de oxígeno se trasfiere del complejo hierro-oxón hacia el sustrato produciendo un complejo oxidado y con esta reacción el producto se disocia completándose el ciclo catalítico (Guengerich 2002; Groves 2005b).

#### IV.3 Clasificación de los citocromos P450

Las enzimas P450 se clasifican por sus características tridimensionales, por su afinidad a grupos de sustratos o por su secuencia de aminoácidos que codifican su síntesis. Una clasificación que puede ser considerada como básica es por cómo son transportados los electrones del NADPH en el sitio catalítico de la enzima. Ésta clasificación considera cuatro clases de enzimas P450: las de clase I requieren tanto de una reductasa que contenga flavín-adenín-dinucleótido (FAD) como de un hierro redoxín-sulfuro; la clase II requiere solamente de una P450 reductasa que contenga FDA/ Flavín mononucleótido (FMN) para transferir electrones, la clase III no requiere de donadores de electrones y la clase IV recibe electrones directamente del NADPH (Werke-Reichhart & Feyereisen 2000). Las enzimas de la clase I y II son las más comunes en eucariontes y están directamente



relacionadas con los procesos de desintoxicación y activación de xenobioticos como fármacos y plaguicidas (Werke-Reichhart & Feyereisen 2000). Otro tipo de clasificación es el propuesto por el Comité de Estandarización de la Nomenclatura de los Citocromos P450, en ésta se designan y agrupan los genes P450 en isoformas, subfamilias y familias usando como criterio inicial el porcentaje de homología entre las secuencias de aminoácidos (Nelson et al., 1996). Esta clasificación considera a genes CYP450 dentro de una familia cuando el porcentaje de homología es mayor al 40% y dentro de una subfamilia cuando es mayor al 55% (Nelson et al., 1996). No obstante de que esta clasificación es la más usada en la actualidad, recientemente se ha debatido sobre la viabilidad de ésta en el futuro, ya que con el gran número de secuencias descritas hasta el momento los cambios en uno o algunos cuantos aminoácidos en la secuencia del gen pueden hacer la clasificación más compleja (Kelly et al., 2006). En consecuencia, en el 8vo. Simposio Internacional sobre P450 se propuso un nuevo sistema de clasificación usando como criterio las funciones biológicas de estas enzimas (Kelly et al., 2006).

#### IV.4 La superfamilia P450 en peces teleósteos

En los peces se han descrito 34 isoformas que se agrupan en 19 subfamilias y constituyen 8 familias de P450 (CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP11, CYP17, CYP19 y CYP26; Tabla IV.2). Las familias de peces más estudiadas son la Cyprinidae, Salmonidae, Fundulidae, Ictaluridae, Cichlidae, Sparidae y Adrianichthyidae (Tabla IV.2). Estas familias incluyen especies de importancia comercial, de fácil mantenimiento en cautiverio y artificialmente amplia distribución geográfica (Burr & Manden 1992). Entre las especies más usadas para identificar isoformas P450 en peces se encuentran el pez cebra, la trucha arcoiris, el fúndulo, la tilapia del Nilo, el bagre de canal y el medaka japonés (Tabla IV.2). De las 57 especies de peces mostradas en la Tabla IV.2, la isoforma CYP1A se ha reportado en el 64% de las especies, mientras que las isoformas CYP19A en el 17.5%, la CYP17C en el 15.7% y las CYP1B1, CYP1C, CYP2E1 y CYP17C entre el 14 y el 15%. Las isoformas de las subfamilias CYP2K y CYP2M se reportan en el 10.5% de las especies y por debajo de este porcentaje se encuentran las enzimas de las subfamilias CYP2N, CYP2P, CYP2X, CYP3A, CYP3C, CYP4T1, CYP11A1 y los miembros de la familia CYP26. Las diferencias porcentuales en la frecuencia de isoformas entre la CYP1A y las otras isoformas en peces se deben a que la CYP1A es la más usada biomarcador de

exposición prototipo y por ello la más buscada. Lo anterior coincide con la revisión de Whyte et al. (2000) y Siroka & Drastichova (2004) sobre los estudios del CYP1A en peces teleósteos.

#### IV.5 Sitios de inducción y funciones endógenas de las monooxigenasas

La identificación y descripción de los sitios de inducción de los P450 se hacen mediante ensayos de actividad catalítica, de inmunodetección o de cuantificación del ARN mensajero (Saraqueste & Senger 2000). En los teleósteos, las enzimas P450 se han identificado en hígado, intestino, gónadas, riñones, cerebro y branquias, así como en sangre, bazo, piel (en aletas) y ojos (Tabla IV.3). En particular, los citocromos de las familias CYP1, CYP2, CYP3, CYP19 y CYP26 se han identificado durante la embriogénesis y la organogénesis en tejidos del sistema nervioso y reproductivo, en donde se ha propuesto que tienen relación incluso con la determinación y diferenciación sexual (Rich & Boobis 1997; Kazeto et al., 2001; Kudoh et al., 2002; Hallaren et al., 2006; Wang et al., 2006; Tabla IV.3).

Los estudios sobre las funciones endógenas en las que participan los P450 en peces son recientes (Lewis 2001). Éstos muestran que la mayoría de las isoformas descritas tienen complementos similares en mamíferos (Kashiwada et al., 2005). Por ejemplo, las primeras cuatro familias de citocromos (CYP1-4) en mamíferos están relacionadas con el metabolismo de los sustratos bilirrubina, androsteronas, ácido retinoico, pregnanos, glucocorticoides y ácidos grasos (Lewis et al., 2002). En los peces estas familias, a excepción de la CYP4, también cumplen funciones metabólicas relacionadas con la biosíntesis de esteroides y de ácidos grasos (Tabla IV.4). Sin embargo, como se discute más adelante, en algunos casos las funciones de las CYP450 en peces difieren de las de los mamíferos a pesar de tener la misma estructura. En general, los citocromos de la familia 1 llevan a cabo la hidroxilación de la pregnenolona y algunos estudios muestran su participación como reguladores de los fluidos en branquias y durante la embriogénesis (Leaver et al., 2000; Godard et al., 2005). En cuanto a los miembros de la familia 2, éstos básicamente participan en peces teleósteos en el metabolismo de los ácidos grasos (Tabla IV.4). En algunos miembros de la familia 3 se ha detectado la actividad sobre la testosterona, aunque de otros la función es desconocida

(Tabla IV.4). Lo anterior ocurre también para la familia 4 y las subfamilias 17A y 17B de las que no se han reportado funciones específicas (Tabla IV.4). En cuanto a los miembros de las familias 19 y 26, éstos participan en la aromatización de esteroides y la hidroxilación del ácido retinoico durante el desarrollo embrionario respectivamente. Un caso particular es la subfamilia CYP2B, que no se ha identificado en peces: incluso la literatura muestra resultados ambiguos lo que ha generado un debate entre los que han reportado la presencia de CY2B (Stegeman et al., 1997) y los que afirman su ausencia en peces teleósteos (Goksoyr & Forlin 1992; Ruus et al., 2002).

#### IV.6 Subfamilia CYP2B

Los miembros de la CYP2B de mamíferos son usados como biomarcadores debido a que su síntesis se induce típicamente por la exposición a hidrocarburos no planares como los bifenilos policlorados (BPC), el fenobarbital, la  $\beta$ -naftoflavona (BNF) y plaguicidas organofosforados como el metil paratión (Stegeman et al., 1997; Albores et al., 2001). En peces, sin embargo, los estudios de Goksoyr et al. (1986) en el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) mostraron que el inductor típico de CY2B (i.e. BNF), en realidad induce la actividad de CYP1C. Por lo anterior, Goksoyr & Forlin (1992) concluyeron que la subfamilia CYP2B se encuentra totalmente ausente en peces. Sin embargo, Stegeman et al. (1997) reportaron la presencia de las isoformas CYP2B en cuatro de diez especies de Perciformes usando la actividad catalítica de la pentoxirresorufin-*O*-depentilasa (PROD; indicador de la actividad de CYP2B) y la detección de la proteína mediante inmunoensayos. Recientemente, Ruus et al. (2002) cuestionaron el uso de PROD como indicador de CYP2B ya que sus estudios en el bacalao del atlántico mostraron que la isoforma CYP1A dirige la catálisis de PROD, por lo que enmascara la presencia de CYP2B. En otro estudio Iwata et al. (2002) reportaron la presencia del receptor nuclear CAR (regulador de CYP2B en mamíferos) en el sargo de América del Norte. Sin embargo, estos autores observaron que no hay activación de CAR, ni expresión de CYP2B en peces expuestos a uno de los inductores más potentes de CYP2B. Parece probable que los mecanismos de activación de esta subfamilia pudieran ser diferentes entre peces y mamíferos.

Con el ejemplo anterior podemos inferir que existen además de mecanismos distintos de activación catalítica de las P450 entre peces y mamíferos, diferencias

metabólicas entre especies de peces además de las diferencias entre las técnicas usadas para cuantificar las P450 en términos de especificidad y sensibilidad. Asimismo, observamos que los inductores estándares de las P450 no son siempre eficaces.

#### IV.7 Inductores de P450

En las técnicas tradicionales de detección de las enzimas P450 se usan compuestos químicos de referencia para activar la inducción de las monooxigenasas y poderlas identificar. Por ejemplo, la actividad de las enzimas de la familia 1 es inducida en peces por los compuestos 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD),  $\beta$ -naftoflavona, fenobarbital (PB); y es inhibida por surfactantes, metales pesados y corticosteroides (Haasch et al., 1993; Berndston & Chen 1994; Larno et al., 2001; Petkam et al., 2003; Da Silva & Meirelles 2004). En cambio, la actividad de la familia CYP26 se induce específicamente con ácido retinoico (White et al., 1996; Kudoh et al., 2002; Gu et al., 2005). Algunos compuestos pueden inducir al mismo tiempo la actividad de distintas familias de enzimas como es el caso del 17 $\beta$ - estradiol que influye en la expresión de CYP1A1, CYP2K1, CYP2M1, CYP3A27, CYP11A1 y CYP19A1/2 (Buhler et al., 2000; Govoroun et al., 2001; Kazeto et al., 2004; Patel et al., 2006), o el BaP, que induce la actividad de CYP1A, CYP1B, CYP1C, CYP19A1/2 y CYP17 (Kazeto et al., 2004; Hoffman & Oris 2006; Wang et al., 2006; Willet et al., 2006). Sin embargo, algunos compuestos de referencia que se han usado para inducir la expresión de ciertas P450 en mamíferos no la inducen en las contrapartes de peces. Ejemplo de lo anterior es la relación entre el fenobarbital y la CYP2B (Iwata et al., 2002) o el metoxicloro y la CYP3A (Stuchal et al., 2006). Además, tampoco parece cierta la idea de que las monooxigenasas P450 muestran un comportamiento tejido-específico (Tabla IV.3). Aunque existen excepciones como en el caso de la isoforma CYP2K6, cuya actividad se ha detectado únicamente en hígado y en ovarios (pero se desconoce su función; Wang-Buhler et al., 2005) o el CYP19A2, cuya actividad se induce en cerebro y no en ovario, a diferencia de lo que ocurre en la isoforma hermana, CYP19A1, aunque ambas isoformas están involucrados en el metabolismo de esteroides (Meucci & Arukwe 2006). A partir de estas observaciones se ha propuesto que las diferencias en la expresión tejido-específica entre citocromos, incluso de la misma subfamilia (como en el caso de CYP19A), estarían dadas por las funciones metabólicas en las que se involucran particularmente en cada tejido (Patel et al., 2006). Sin embargo, en

ciertos casos la naturaleza tejido-específica de la función aún no es clara. Por ejemplo, la isoforma CYP17 metaboliza precursores esteroideogénicos que promueven la maduración de los folículos ováricos, y en peces además de expresarse en gónadas, hígado, cerebro e intestino, se expresa en branquias, aunque su función en estos órganos es desconocida hasta el momento (Wang & Ge 2004).

#### IV.8 Uso de P450 en el monitoreo ambiental

En los programas de monitoreo ambiental las CYP450 son usadas para evidenciar la presencia de contaminantes en el ambiente debido a su alta afinidad por xenobióticos. Por ejemplo, la medición de la actividad de las monooxigenasas (particularmente CYP1A) en los hígados de trucha arcoiris, la solla (*Platichthys flesus*) y la Limanda nórdica (*Limanda limanda*) se usa en el programa de monitoreo de los efluentes industriales y de los cuerpos de agua de las costas del mar del norte en Alemania (Pluta, 1993). La experiencia de este programa ha determinado que CYP1A es altamente sensible a la presencia de contaminantes, su respuesta claramente depende de la concentración y es una medición consistente y reproducible (Pluta, 1993). Empero, se ha detectado que la variabilidad en la actividad enzimática es mucho mayor en muestras de campo que de laboratorio debido probablemente a factores como la migración, las diferencias fisiológicas, los tiempos de exposición, los sitios de muestreo y las concentraciones de contaminantes bioacumulados durante la historia individual de los organismos (Pluta, 1993). Se ha sugerido por tanto que los programas de monitoreo deben establecer las actividades enzimáticas basales *in situ* entre organismos de sitios de referencia (no contaminados) y contaminados. Este procedimiento se ha aplicado en varios lugares como en el Río Hikiji de la prefectura de Kanagawa (Japón), en donde los niveles de policlorinados, dibenzo-*p*-dioxinas, dibenzofuranos y PCB inducen la actividad del CYP1A y reducen tanto la concentración de estrógenos en plasma como el índice gonadosomático, comprometiendo de esta manera las funciones reproductivas de las carpas (Sakamoto et al. 2003). En otros casos se compara la actividad enzimática de P450 de distintos sitios para evidenciar posibles riesgos por contaminación. Por ejemplo, en el río Guandu de Brasil, fuente de agua potable para la ciudad de Rio de Janeiro, se ha usado la actividad de las monooxigenasas en tilapias de ciertas zonas del río para alertar a la población humana de posibles riesgos por contaminantes organoclorados

(Parente et al., 2004). Otra práctica común en el biomonitoreo es el trasplante de organismos de sitios no contaminados a sitios con niveles medibles de contaminación. Un ejemplo es el trabajo de Zhu et al. (2006), quienes utilizaron ensayos de inmunodetección para cuantificar la actividad de P450 (isoformas de las familias CYP1 y CYP2) en peces arrecifales de zonas cercanas a las plataformas petroleras del oeste Australiano. Estos autores mostraron que usando este procedimiento se pueden obtener bioindicadores que permiten alertar sobre riesgos a la salud de las poblaciones de peces por descargas de hidrocarburos.

#### IV.9 Consideraciones finales

La interpretación de los resultados que se obtienen a través de un biomarcador depende de las premisas siguientes: de acuerdo con Van der Oost et al. (2003) se debe tener especial cuidado con las siguientes fuentes de variación: 1) las diferencias entre los resultados de laboratorio y de campo, 2) el significado e interpretación de la inducción de actividad de enzimas en términos de relevancia biológica y toxicológica y 3) la interferencia de factores no relacionados con contaminantes que inciden en la actividad de las enzimas y que pueden confundir los factores causales (e.g. estrés por manipulación). Por lo anterior es recomendable el uso de varios biomarcadores en combinación con la cuantificación de la bioacumulación de contaminantes para establecer relaciones de causa-efecto. En los peces, los biomarcadores que se usan con frecuencia son los fisiológicos (e.g. índice gonadosomático, índice somático del hígado y parámetros morfométricos), los reproductivos (e.g. niveles de vitelogenina VTG en plasma) y los moleculares (e.g. inhibición de AChE y actividad de CYP1A1; Orrego et al., 2006). Según Van der Oost et al. (2003), los biomarcadores más sensibles en peces (considerando los criterios de Walker et al., 1998) son las enzimas de fase 1 (e.g. actividad de CYP1A), los productos de biotransformación (e.g. metabolitos de HAP biliares), los parámetros reproductivos (e.g. VTG en plasma) y los parámetros genotóxicos (e.g. aductos de ADN hepático). En la práctica, según Orrego et al. (2006) los biomarcadores en peces más estables y por lo tanto los que representan herramientas biológicas útiles en el monitoreo ambiental son la inducción de CYP1A, el índice de madurez gonadal y los niveles de VTG, debido a que los patrones de respuestas de estos indicadores en laboratorio y en campo se correlacionan positivamente.

Otros factores que se deben considerar cuando se usan biomarcadores como las P450 son la sensibilidad de la técnica de cuantificación y el tipo de isoforma que se evalúa. Por ejemplo, la actividad catalítica, la inmunodetección de la proteína o la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) son técnicas de rutina para cuantificar o detectar la inducción catalítica de la síntesis de CYP450. Estos ensayos difieren en sensibilidad. Autores como Haash et al. (1993) han recomendado el ensayo de hibridación de ARNm de los P450 como la prueba más sensible para el monitoreo ambiental, ya que este ensayo proporciona resultados confiables desde las primeras horas de exposición y en exposiciones crónicas antes que las pruebas de actividad catalítica o de inmunoensayo. En cuanto a los tipos de isoformas que se usan en el monitoreo ambiental, la isoforma CYP1A ha sido la más empleada en los programas de monitoreo (Whyte et al., 2000). Sin embargo, se ha observado por ejemplo, que la isoforma CYP1B es más sensible que la CYP1A en branquias de peces expuestos a BaP, TCDD y PCB (Willett et al., 2006). En otro caso la isoforma CYP19A2 mostró más sensibilidad que CYP1A, CYP11A, CYP17C y CYP19A1 en hígados de peces expuestos a BaP (Hoffman & Oris 2006).

Desde que en 1954 se descubrió la primera enzima P450 por Martín Klingenberg y David Garfinkel (Porter 2004) se han reportado alrededor de 3000 secuencias. De las diferentes isoformas descritas 1277 se encuentran en animales, 1098 en plantas, 207 en eucariontes inferiores y 461 en bacterias (<http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450>). De acuerdo con nuestra revisión, en términos de monitoreo ambiental sólo algunas isoformas P450 reúnen los requisitos establecidos para calificar a una variable biológica como biomarcador. Ello se debe a que los estudios recientes de las P450 en peces muestran que los mecanismos de inducción de ciertas isoformas no son los mismos entre especies y a que no siempre presentan un patrón tejido-específico, ni una respuesta sustrato-específica clara como se había supuesto en los últimos 20 años. Además, aún no se entiende por qué algunos P450 presentan funciones endógenas redundantes e incluso responden a los mismos sustratos. Es recomendable que antes de aplicar una nueva isoforma P450 como estimador del grado de perturbación o de riesgo ambiental entendamos primero cuáles son las funciones que desempeña en los procesos metabólicos, la actividad basal en

diferentes especies tomando en cuenta que ésta depende de los requerimientos ecológicos en términos de hábitos alimenticios, distribución, sexos, estados de desarrollo, etcétera. Asimismo, es necesario establecer los sitios de inducción biológicamente más relevantes, es decir, aquellos órganos y tejidos que comprometen la supervivencia y reproducción de los organismos. La información anterior deberá ser conocida previamente para interpretar correctamente los datos de la inducción de la actividad catalítica de P450 en los programas de monitoreo ambiental.

#### IV.10 Referencias

- Al-Arabi MAS., Goksoyr A. 2002. Cytochrome P4501A responses in two tropical fish species, riverine catfish (*Rita rita*) and marine mudfish (*Apocryptes bato*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 131: 61-71.
- Albores A., Ortega-Mantilla G., Sierra-Santoyo A., Cebrián EM., Muñoz-Sánchez LJ., Calderón-Salinas VJ., Manno M. 2001. Cytochrome P450 2B (CYP2B)-mediated activation of methyl-parathion in rat brain extracts. *Toxicology Letters* 124: 1-10.
- Anulacion FB, Myers SM., Willis LM., Collier KT. 1998. Quantitation of CYP1A expression in two flatfish species showing different prevalences of contaminant-induced hepatic disease. *Marine Environmental Research* 46: 7-11.
- Azenbacher P., Azenbacherová E. 2001. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 737-747.
- Beeby A. (2001). What do sentinels stand for? *Environmental Pollution* 112: 285-298.
- Berndtson KA., Chen TT. 1994. Two unique CYP1 genes are expressed in response to 3-methylcholanthrene treatment in rainbow trout. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 310: 187-195.
- Buchmann A., Wannemacher R., Kulzer E., Buhler DR., Bock KW. 1993. Immunohistochemical localization of the cytochrome P450 isozymes LMC2 and LM4B (P4501A1) in 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-treated Zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 123: 160-169.
- Buhler RD., Yang Y-H., Dreher WT., Miranda LC., Wang J-L. 1994. Cloning and sequencing of the major rainbow trout constitutive cytochrome P450 (CYP2K1): identification of a new cytochrome P450 gene subfamily and its expression in mature rainbow trout liver and trunk kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 312: 45-51.
- Buhler RD., Miranda LC., Henderson CM., Yang H-Y., Lee J-S., Wang-Buhler L-J. 2000. Effects of 17 $\beta$ -Estradiol and Testosterone on hepatic mRNA/protein levels and catalytic activities of CYP2M1, CYP2K1, and CYP3A27 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 168: 91-101.
- Burr MB., Mayden RL. 1992. Phylogenetic and North American freshwater fishes. En: *Systemics, Historical Ecology, and North American Freshwater Fishes*. Richard L., & Mayden R.L. (Eds.), Stanford University Press, California., pp. 969
- Callard VG., Tchoudakova VA., Kishida M., Wood E. 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in the teleost fish. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 79: 305-314.
- Celander M., Förlin L. 1995. Decreased responsiveness of the hepatic cytochrome P450 1A1 system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to PCB. *Aquatic Toxicology* 33: 141-153.
- Celander M., Stegeman JJ., Foerlin L. 1996. CYP1A1-, CYP2B- and CYP3 A-like proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: CYP1A1-specific down-regulation after prolonged exposure to PCB. *Marine Environmental Research* 42: 1-4.
- Celander, M., Stegeman, J.J. 1997. Isolation of a cytochrome P450 3A cDNA sequence (CYP3A30) from the marine teleost *Fundulus heteroclitus* and phylogenetic analyses of CYP3A genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236: 306-312.



- Cok I., Wang-Buhler L-J., Kedzierski M.M., Miranda LC., Yang H-Y., Buhler RD. 1998. Expression of CYP2M1, CYP2K1, and CYP3A27 in brain, blood, small intestine, and other tissues of rainbow trout. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 790-795.
- Corley-Smith EG., Su T-H., Wang-Buhler L-J., Tseng P-H., Hu H-C., Hoang T., Chung G-W., Buhler RD. 2006. CYP3C1, the first member of a new cytochrome P450 subfamily found in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 1039-1046.
- Craft JA., Robertson FE., McPhail ME., Brown E., Stagg R.M. 2001. Measurement of cytochrome P4501A induction in dab (*Limanda limanda*) and other teleosts with species-specific cDNA probes: isolation and characterisation of dab cDNA and its use in expression studies with beta-naphthoflavone-treated fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 129:115-27.
- Crivello JF., Schultz RJ. 1995. Genetic variation in the temperature dependence of liver microsomal CYP2E1 activity, within and between species of the viviparous fish *Poeciliopsis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 1-18.
- Da Silva FEM., Meirelles CN. 2004. Interaction of non-ionic surfactants with hepatic CYP in *Prochilodus scrofa*. *Toxicology in Vitro* 18: 859-867.
- Dickins M. 2004. Induction of cytochrome P450. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4: 1745-1766.
- Dorwad-King E., Surte II WG., Kapustka AL., Mount RD., Reed-Judkins KD., Cormier MS., Dyer DS., Luxon GM., Parrish R., Burton Jr AG. 2001. Distinguishing among factors that influence ecosystem. En: *Ecological Variability: Separating Natural from Anthropogenic Causes of Ecosystem Impairment*. Donal J. Baird & G. Allen Burton Jr (Eds.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). Pensacola, Florida., pp.18-19.
- El-Kady MA., Kaminishi Y., Itakura T. 2004. Isolation of novel cytochrome P450 1B gene, CYP1B2, from carp (*Cyprinus carpio*) and its induced expression in gills. *Environmental Sciences* 11: 345-354.
- Falckh JHP., Wu KQ., Ahokas PJ. 1997. CYP4T1-A cytochrome P450 expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 236: 302-305.
- Fernandes D., Potrykus J., Morsiani C., Raldua D., Lavado R., Porte C. 2002. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality in two low-stream rivers (NE Spain). *Environmental Research* 90:169-78.
- Filby, L.A., Thorpe, L.K., Maack, G., Tyler, R.C. 2007. Gene expression profiles revealing the mechanism of anti-androgen- and estrogen-induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology* 81: 219-231.
- Godard JAC., Leaver JM., Said RM., Dickerson LR., George S., Stegeman JJ. 2000. Identification of cytochrome P450 1B-like sequences in two teleost fish species (scup, *Stenotomus chrysops* and plaice, *Pleuronectes platessa*) and in a cetacean (striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*). *Marine Environmental Research* 50: 7-10.
- Godard JAC., Goldstone VJ., Said RM., Dickerson LR., Woodin RB., Stegeman JJ. 2005. The new vertebrate CYP1C family: cloning of new subfamily members and phylogenetic analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331: 1016-1024.
- Goksoyr A., Solbakken JE., Klungsoyr J. 1986. Regioselective metabolism of phenanthrene in Atlantic cod (*Gadus morhua*); studies on the effects of monooxygenase inducers and role of cytochrome P450. *Chemical Biology Interaction* 60: 247-263.
- Goksoyr A., Forlin L. 1992. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* 22: 287-312.
- Govoroun M., McMeel MO., Mecherouki H., Smith JT., Guiguen Y. 2001. 17 $\beta$ -Estradiol treatment decreases steroidogenic enzymes messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis. *Endocrinology* 142: 1841-1848.
- Groves TJ. 2005a. Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry, 3ed. En: *Models and Mechanism of Cytochrome P450 action*. Paul R Ortiz de Montellano (Ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Groves TJ. 2005b. Models and mechanism of cytochrome P450 action. En: *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry* 3ed. Paul R. Ortiz de Montellano (Ed.), Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.
- Gu X., Xu F., Wang X., Gao X., Zhao Q. 2005. Molecular cloning and expression of a novel CYP26 gene (*cyp26d1*) during zebrafish early development. *Gene Expression Patterns* 5: 733-739.
- Guengerich P. 2002. Rate -Limiting Steps in Cytochrome P450 Catalysis. *Biological Chemistry* 383: 1553-1564.
- Haasch LM., Quardokus ME., Sutherland AL., Goodrich SM., Lech JJ. 1993. Hepatic CYP1A1 Induction in Rainbow Trout by Continuous Flowthrough Exposure to  $\beta$ -Naphthoflavone. *Fundamental and Applied Toxicology* 20: 72-82.

- Haasch LM. 2002. Effects of vehicle, diet and gender on the expression of PMP70- and CYP2K1/2M1-like proteins in the mummichog. *Marine Environmental Research* 54: 297-301.
- Hallgren ELS., Linderoth M., Olsén H. 2006. Inhibition of cytochrome p450 brain aromatase reduces two male specific sexual behaviour in the male Endler guppy (*Poecilia reticulata*). *General and Comparative Endocrinology* 147: 323-328.
- Halm S., Kwon YJ., Rand-Weaver M., Sumpter PJ., Pounds N., Hutchinson HT., Tyler RC. 2003. Cloning and gene expression of P450 17 $\alpha$ -hydroxylase,17,20-lyase cDNA in the gonads and brain of the fathead minnow *Pimephales promelas*. *General and Comparative Endocrinology* 130: 256-266.
- Hegelund T., Celander MC. 2003. Hepatic versus extrahepatic expression of CYP3A30 and CYP3A56 in adult killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquatic Toxicology* 64: 277-291.
- Heilmann LJ., Sheen YY., Bigelow SW., Nebert DW. 1988. Trout P450IA1: cDNA and deduced protein sequence, expression in liver, and evolutionary significance. *DNA* 7:379-87.
- Henczová M., Deér KA., Komlósi V., Mink J. 2006. Detection of toxic effects of Cd<sup>2+</sup> on different fish species via liver cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and FTIR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385: 652-659.
- Hoffmann LJ., Oris TJ. 2006. Altered gene expression: A mechanism for reproductive toxicity in zebrafish exposed to benzo[a]pyrene. *Aquatic Toxicology* 78: 332-340.
- Honkakoski P., Negishi M. 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptor. *The Biochemical Journal* 347: 321-337.
- Ioannides C., Lewis V., David F. 2004. Cytochrome p450 in the bioactivation of chemicals. *Current Topic in Medicinal Chemistry* 4: 1767-1788.
- Itakura T., El-Kady M., Mitsuo R., Kaminishi Y. 2005. Complementary DNA cloning and constitutive expresión of cytochrome P450 1C1 in the gills of carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Sciences* 12: 111-120.
- Iwata H., Yoshinari K., Negishi M., Stegeman JJ. 2002. Species-specific responses of constitutively active receptor (CAR)-CYP2B coupling: lack of CYP2B inducer-responsive nuclear translocation of CAR in marine teleost, scup (*Stenotomus chrysops*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 131: 501-510.
- Kanda H., Okunbo T., Omori N., Niihara H., Matsumoto N., Yamada K., Yoshimoto S., Ito M., Yamashita S., Shiba T., Takamatsu N. 2006. Transcriptional regulation of the rainbow trout CYP19a gene by FTZ-F1 homologue. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 99: 85-92.
- Kaplan LAE., Shultz ME., Shultz RJ., Crivello JF. 1991. Nitrosodiethylamine metabolism in the viviparous fish *Poeciliopsis*: evidence for the existence of liver P450pj activity and expression. *Carcinogenesis* 12: 647-652.
- Kaplan EAL., Fielding E., Crivello JF. 1999. Genetic regulation of liver microsomal CYP2E1 activity among strains of the viviparous fishes *Poeciliopsis occidentalis* and *Poeciliopsis lucida*. *Environmental Biology of Fishes* 54: 337-343.
- Kaplan EAL., Fielding E., Crivello FJ. 2001. The genetic regulation of liver microsomal CYP2E1 activity among strains of the viviparous fish *Poeciliopsis*. *Comparative Biochemistry Physiology Part C* 128: 143-152.
- Kashiwada S., Hinton ED., Kullman WS. 2005. Functional characterization of medaka CYP3A38 and CYP3A40: kinetics and catalysis by expression in a recombinant baculovirus system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 141: 338-348.
- Kazeto Y., Ljiri MS., Place RA., Zohar Y., Trant MJ. 2001. The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288: 503-508.
- Kazeto Y., Place AR., Trant JM. 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology* 69: 25-34.
- Kazeto Y., Trant MJ. 2005. Molecular biology of channel catfish brain cytochrome P450 aromatase (CYP19A2): cloning, preovulatory induction of gene expression, hormonal gene regulation and analysis of promoter region. *Journal of Molecular Endocrinology* 35: 571-583.
- Kazeto Y., Ljiri S., Adachi S., Yamauchi K. 2006. Cloning and characterization of a cDNA encoding cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (CYP11A1): tissue-distribution and changes in the transcript abundance in ovarian tissue of japanese eel, *Anguilla japonica*, during artificially induced sexual development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 99: 121-128.
- Kelly LS., Lamb CD., Kelly ED. 2006. Cytochrome P450 biodiversity and biotechnology. *Biochemical Society Transaction* 34(6): 1159-1160.

- Kim C-I., Kim JY., Yoon D-Y., Kawamura S., Lee S-Y., Lee S-J. 2004. Cloning of cytochrome P450 1A (CYP1A) genes from the hermaphrodite fish *Rivulus marmoratus* and the Japanese medaka *Oryzias latipes*. *Marine Environmental Research* 58: 125-129.
- Kishida M., Callard VG. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology* 142: 740-750.
- Kobayashi T., Makamura M., Kajiura-Kobayashi H., Young G., Nagahama Y. 1998. Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450scc, P450c17, P450arom, and 3 $\beta$ -HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cellular Tissue Research* 292: 573-577.
- Kudoh T., Wilson WS., Dawid BI. 2002. Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development* 129: 4335-4346.
- Kullman SW., Hamm JT., Hinton DE. 2000. Identification and characterization of a cDNA encoding cytochrome P450 3A from the fresh water teleost medaka (*Oryzias latipes*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 380: 29-38.
- Kullman SW., Hinton DE. 2001. Identification, characterization, and ontogeny of a second cytochrome P450 3A gene from the fresh water teleost medaka (*Oryzias latipes*). *Molecular Reproduction and Development* 58: 149-58.
- Larno V., Laroche J., Launey S., Flammarion P., Devaux A. 2001. Responses of chub (*Leuciscus cephalus*) populations to chemical stress, assessed by genetic markers, DNA damage and cytochrome P4501A induction. *Ecotoxicology* 10: 145-158.
- Leaver JM., George GS. 2000. A cytochrome P4501B gene from a fish, *Pleuronectes platessa*. *Gene* 256: 83-91.
- Lee J-S., Wang-Buhler L-J., Cok I., Yu S-T., Yang H-Y., Miranda LC., Lech J., Buhler RD. 1998. Cloning, sequencing, and tissue expression of CYP3A27, a new member of the CYP3A subfamily from embryonic and adult rainbow trout livers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 360: 53-61.
- Lee J-S., Hedstrom RO., Fischer K., Wang-Buhler L-J., Sen A., Cok I., Buhler RD. 2001. Immunohistochemical localization and differential expression of cytochrome P450 3A27 in the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology* 177: 94-102.
- Lee J-S., Buhler RD. 2003. Cloning, tissue distribution, and functional studies of a new cytochrome P450 3A subfamily member, CYP3A45, from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal ceca. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 412: 77-89.
- Lester SM., Braunbeck T., The SJ., Stegeman JJ., Miller MR., Hinton DE. 1993. Hepatic cellular distribution of cytochrome P4501A1 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: an immunohisto- and cytochemical study. *Cancer Research* 53: 3000-3006.
- Lewis VFD., Jacobs NM., Dickins M., Lake GB. 2002. Quantitative structure-activity relationships for inducers of cytochromes P450 and nuclear receptor ligands involved in P450 regulation within the CYP1, CYP2, CYP3 and CYP4 families. *Toxicology* 176: 51-57.
- Lewis VFD 2001. *Guide to Cytochromes P450 structure and function*. Taylor & Francis Inc., London
- Linderoth M., Norman A., Noaksson E., Zebühr Y., Norrgren L., Balk L. 2006. Steroid biosynthetic enzyme activities in leachate-exposed female perch (*Perca fluviatilis*) as biomarkers for endocrine disruption. *Science of the Total Environment* 366: 638-648.
- Lindstrom-Seppa P., Korytko JP., Hahn EM., Stegeman JJ. 1994. Uptake of waterborne 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and organ and cell-specific induction of cytochrome P4501A in adult and larval fathead minnow *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology* 3-4: 147-167.
- Lipscomb JC., Buttler GW., Confer PD. 1997. Chloral hydrate formation in the Japanese medaka minnow. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 27: 157-162.
- Luo W-C., Pisarska DM., Hsueh WJA. 2005. Identification of a stanniocalcin paralog, stanniocalcin-2, in fish and the paracrine actions of stanniocalcin-2 in the mammalian ovary. *Endocrinology* 146: 469-476.
- Manly R. 1995. Indicator Biological. En: *Environmental Analytical Chemistry*. F.W. Fifield & P.J. Haine (Eds.), Blackie Academic & Professional. Chapman & Hall.
- Marionnet D., Taysse L., Chambras C., Deschaux P. 1997. 3-Methylcholanthrene-induced EROD activity and cytochrome P450 in immune organs of carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 118: 165-170.
- McArthur GA., Hegelund T., Cox LR., Stegeman JJ., Liljenberg M., Olsson U., Sundberg P., Celander CM. 2003. Phylogenetic analysis of the cytochrome P450 3(CYP3) gene family. *Journal of Molecular Evolution* 57: 200-211.

- Meucci V., Arukwe A. 2006. Transcriptional modulation of brain and hepatic estrogen receptor and P450arom isotypes in juvenile atlantic salmon (*Salmo salar*) after waterborne exposure to the xenoestrogen, 4-nonylphenol. *Aquatic Toxicology* 77: 167-177.
- Moise R.A., Isken A., Dominguez M., Lera RA., Linting von J., Palczewski K. 2007. Specificity of zebrafish retinol saturase: formation of All-*trans*-13,14-dihydroretinol and All-*trans*-7,8-dihydroretinol. *Biochemistry* 46: 1811-1820.
- Morcillo Y., Janer G., O'Hara SC., Livingstone DR., Porte C. 2004. Interaction of tributyltin with hepatic cytochrome P450 and uridine diphosphate-glucuronosyl transferase systems of fish: in vitro studies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 990-6.
- Morrison HG., Oleksiak MF., Cornell NW., Sogin ML., Stegeman JJ. 1995. Identification of cytochrome P-450 1A (CYP1A) genes from two teleost fish, toadfish (*Opsanus tau*) and scup (*Stenotomus chrysops*), and phylogenetic analysis of CYP1A genes. *The Biochemical Journal* 308: 97-104.
- Morrison HG., Weil EJ., Karchner SI., Sogin ML., Stegeman JJ. 1998. Molecular cloning of CYP1A from the estuarine fish *Fundulus heteroclitus* and phylogenetic analysis of CYP1 genes: update with new sequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 121: 231-40.
- Morse CJ., Bea JY., Munkhjargal G., Sangpradub N., Tanida K., Ushevskova ST., Wang B., Yang L., Yule MC. 2007. Freshwater biomonitoring with macroinvertebrates in East Asia. *Frontiers in Ecology and Environment* 5: 33-42.
- Nakamura I., Evans CJ., Kusakabe M., Nagahama Y., Young G. 2005. Changes in steroidogenic enzymes and steroidogenic acute regulatory protein messenger RNAs in ovarian follicles during ovarian development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 144: 224-231.
- Napierska D., Podolska M. 2005. Biomarkers of contaminant exposure: results of a field study with flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 50: 758-767.
- Nelson RD. 1999. A second CYP26 P450 in human and zebrafish: CYP26B1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 371: 345-347.
- Nunez S.B., Evans NA., Simpson AM., Wong PW., Ip KY. 2006. Characterization of cDNAs encoding cholesterol side chain cleavage and  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the freshwater stingray *Potamotrygon motoro*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 145: 306-317.
- Oleksiak FM., Wu S., Parker C., Karchner IS., Stegeman JJ., Zeldin CD. 2000. Identification, functional characterization, and regulation of a new cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ns. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 2312-2321.
- Oleksiak FM., Wu S., Parker C., Qu W., Cox R., Zeldin CD., Stegeman JJ. 2003. Identification and regulation of a new vertebrate cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ps, and functional characterization of CYP2P3, a conserved arachidonic acid epoxygenase/19-hydroxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 411: 223-234.
- Orrego R., Burgos A., Moraga-Cid G., Inzunza B., Gonzalez M. 2006. Effects of pulp and paper mill discharges on caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): biomarker responses along a pollution gradient in the Biobio river, Chile. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 2280-2287.
- Ortiz-Delgado BJ., Segner H., Sarasquete C. 2005. Cellular distribution and induction of CYP1A following exposure of gilthead seabream, *Sparus aurata*, to waterborne and dietary benzo(a)pyrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: an immunohistochemical approach. *Aquatic Toxicology* 75: 144-161.
- Parente MET., De-Oliveira XACA., Silva BI., Araujo GF., Paumgartten RJF. 2004. Induced alkoxyresorufin-O-dealkylases in tilapias (*Oreochromis niloticus*) from Guandu river, Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere* 54: 1613-1618.
- Patel RM., Scheffler EB., Wang L., Willett LK. 2006. Effects of benzo(a)pyrene exposure on killifish (*Fundulus heteroclitus*) aromatase activities and mRNA. *Aquatic Toxicology* 77: 267-278.
- Peakall BD., Walker HC. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (3) vertebrates. *Ecotoxicology* 3: 1573-3017.
- Perkins EJ., Schelk D. 1998. Immunochemical characterization of hepatic cytochrome P450 isozymes in the channel catfish: assessment of sexual, developmental and treatment-related effects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 121: 305-10.
- Petkam R., Renaud RL., Leatherland JF. 2003. The role of CYP1A1 in the in vitro metabolism of pregnenolone by the liver of rainbow trout embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135: 277-284.
- Pluta H-J. 1993. Investigations on biotransformation (mixed function oxygenase activities) in fish liver. In *Fish Ecotoxicology and Ecophysiology*. T. Braunbeck, W. Hanke and H. Segner (Eds.), VCH Weinheim, New York., pp.13-28.

- Porter DT. 2004. Jud Coon: 35 years of P450 research, a synopsis of 450 history. *Drug Metabolism and Disposition* 32: 1-6.
- Raza H., Otaiba A., Montague W. 1995. Beta-naphthoflavone-inducible cytochrome P4501A1 activity in liver microsomes of the marine sea fish (*Siganus canaliculatus*). *Biochemical Pharmacology* 50:1401-6.
- Reinert ER. 1992. Fish physiology. En: *Aquarology*. John B. Gratzek & Janice R. Matthews (Eds.), Tetra Press USA., pp. 161-183.
- Rich KJ., Boobis AR. 1997. Expression and inducibility of P450 enzymes during liver ontogeny. *Microscopy Research and Technique* 39: 424-435.
- Ruus A., Sandvik M., Ugland KI., Skaare JU. 2002. Factors influencing activities of biotransformation enzymes, concentrations and compositional patterns of organochlorine contaminants in members of a marine food web. *Aquatic Toxicology* 61: 73-87.
- Sabbioni G., Jones RC., Sepai O., Hirvonen A., Forppa H., Järventus H., Glatt H., Pomplun D., Yan H., Brooks RL., Warren HS., DeMarini M., Liu Y-Y. 2006. Biomarkers of exposure, effects, and susceptibility in workers exposed to nitrotoluenes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 15: 559-566.
- Sadar MD., Ash R., Andersson TB. 1995. Picrotoxin is a CYP1A1 inducer in rainbow trout hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 214: 1060-1066.
- Sakamoto QK., Nakai K., Aoto T., Yokoyama A., Ushikoshi R., Hirose H., Ishizuka M., Kazusaka A., Fujita S. 2003. Cytochrome P450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharges of dioxin contaminated effluent to the Hikiji river, Kanagawa prefecture, Japan. *Chemosphere* 51: 491-500.
- Sarasquete C., Segner H. 2000. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *The Science of the Total Environment* 247: 313-332.
- Schlenk D., Stresser MD., McCants CJ., Nimrod CA., Benson HW. 1997. Influence of  $\beta$ -naphthoflavone and methoxychlor pretreatment on the biotransformation and estrogenic activity of methoxychlor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 145: 349-356.
- Schlenk D., Furnes B., Zhou X., Debusk C.B. 2002. Cloning and sequencing of cytochrome P4502X1 from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Marine Environmental Research* 54: 391-394.
- Shang EH., Yu RM., Wu RS. 2006. Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology* 40: 3118-3122.
- Simon D., Helliwel S., Robards K. 1998. Pesticide toxicity endpoint in aquatic ecosystem. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6: 159-177.
- Siroka Z., Drastichova J. 2004. Biochemical Markers of aquatic Environment Contamination-Cytochrome P450 in Fish. A review. *Acta Veterinaria* 73: 123-132.
- Slobé L., De FL. 1994. Freshwater fish. En: *Handbook of Ecotoxicology*. Calow P. (Ed.), Blackwell Science, New York., pp. 885.
- Smolowitz RM., Schultz ME., Stegeman JJ. 1992. Cytochrome P4501A induction in tissues, including olfactory epithelium, of topminnows (*Poeciliopsis* spp.) by waterborne benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 13: 2395-2402.
- Soimasuo MR., Karels AE., Leppanen H., Santti R., Oikari AO. 1998. Biomarker responses in whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s.l.) experimentally exposed in a large lake receiving effluents from pulp and paper industry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34: 69-80.
- Stegeman JJ., Woodin BR., Singh H., Oleksiak MF., Celandier M. 1997. Cytochromes P450 (CYP) in tropical fishes: catalytic activities, expression of multiple CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fish from Bermuda. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 116: 61-75.
- Stuchal DL., Kleinow MK., Stegeman JJ., James OM. 2006. Demethylation of the pesticide methoxychlor in liver and intestine from untreated, methoxychlor-treated, and 3-methylcholanthrene-treated channel catfish (*Ictalurus punctatus*): evidence for roles of CYP1 and CYP3 family isozymes. *Drug Metabolism and Disposition* 34: 932-938.
- Tchoudakova A., Callard VG. 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology* 139: 2179-2189.
- Tchoudakova A., Kishida M., Wood E., Callard VG. 2001. Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 78: 427-439.
- Thibaut R., Debrauwer L., Perdu E., Goksøyr A., Cravedi PJ., Arukwe A. 2002. Regio-specific hydroxylation of nonylphenol and the involvement of CYP2K- and CYP2M-like iso-enzymes in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* 56: 177-190.

- Trant MJ., Gavasso S., Ackers J., Chung C-B., Place RA. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Zoology* 2009: 475-483.
- Tredger MJ., Stoll S. 2002. Cytochrome P450-Their impact on drug treatment. *Hospital Pharmacist* 9: 167-173.
- Tseng P-H., Hseu H-T., Buhler R-D., Wang D-W., Hu H-C. 2005. Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. *Toxicology and Applied Pharmacology* 205: 247-258.
- Ueng, YF., Ueng TH. 1995. Induction and purification of cytochrome P450 1A1 from 3-methylcholanthrene-treated tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 322: 347-56.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen EPN. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
- Van Veld PA., Vogelbein WK., Smolowitz R., Woodin BR., Stegeman JJ. 1992. Cytochrome P450IA1 in hepatic lesions of a teleost fish (*Fundulus heteroclitus*) collected from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated site. *Carcinogenesis* 13: 505-507.
- Van Veld PA., Vogelbein KW., Cochran KM., Goksøyr A., Stegeman JJ. 1997. Route-specific cellular expression of cytochrome P450IA (CYP1A) in fish (*Fundulus heteroclitus*) following exposure to aqueous and dietary benzo[a]pyrene. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142: 348-359 .
- Walker HC., Hopkin PS., Sibly MR., Peakall DB. 1996. The fate of organic pollutants in individual and in ecosystem. En: *Principles of Ecotoxicology*. Walker H.C. Hopkin P.S. Sibly M.R. & Peakall D.B. (Eds.), Taylor and Francis, University of Reading, UK., pp.77-79
- Walker C., Kaiser K., Klein W., Lagadic L., Peakall D., Sheffield S., Soldan T., Yasumo M. 1998. 13<sup>th</sup> meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals (SGOMSEC): alternative testing methodologies of ecotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 106: 441-451.
- Wall KL., Crivello J. 1998. Chlorzoxane metabolism by winter flounder liver microsomes: evidence for existence of a CYP2E1-like isoform in teleost. *Toxicology and Applied Pharmacology* 151: 98-104.
- Wang-Buhler LJ., Lee JS., Chung GW., Stevens FJ., Tseng PH., Hseu HT., Hu HC., Westerfield M., Yang HY., Miranda LC., Buhler RD. 2005. CYP2K6 from zebrafish (*Danio rerio*): cloning, mapping, developmental/tissue expression, and aflatoxin B1 activation by baculovirus expressed enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 140: 207-219.
- Wang L., Scheffler EB., Willett LK. 2006. CYP1C1 messenger RNA expression is inducible by benzo[a]pyrene in *Fundulus heteroclitus* embryos and Adults. *Toxicological Sciences* 93: 331-340.
- Wang Y., Ge W. 2004. Cloning of zebrafish ovarian P450c17 (CYP17, 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20-lyase) and characterization of its expression in gonadal and extra-gonadal tissues. *General and Comparative Endocrinology* 135: 241-249.
- Werck-Reichhart D., Feyereisen R. 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology* 1: 3003.1-3003.9.
- White AJ., Guo D-Y., Baetz K., Beckett-Jones B., Bonasoro J., Hsu EK., Dilworth J. Jones G., Petkovich M. 1996. Identification of the retinoic acid-inducible All-*trans*-retinoic acid 4-hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 29922-29927.
- Whyte JJ., Jung ER., Schmitt JC., Tillitt ED. 2000. Ethoxyresorufin-O-dethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 30: 347-570.
- Willett LK., Ganesan S., Patel M., Metzger C., Quiniou S., Waldbieser G., Scheffler B. 2006. In vivo and in vitro CYP1B mRNA expression in channel catfish. *Marine Environmental Research* 62: 332-336.
- Winkelhake JL., Vodicnik MJ., Taylor JL. 1983. Induction in rainbow trout of an acute phase (C-reactive) protein by chemicals of environmental concern. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 74: 55-8.
- Yang H-Y., Miranda LC., Henderson CM., Wang-Buhler L-J., Buhler RD. 2000. Heterologous expression of CYP2K1 and identification of the expressed protein (BV-CYP2K1) as lauric acid ( $\omega$ -1)-hydroxylase and aflatoxin B1 exo-epoxidase. *Drug Metabolism and Disposition* 28: 1279-1283.
- Yu H., Cheng H., Gou Y., Xia L., Zhou R. 2003. Alternative splicing and differential expression of P450c17 (CYP17) in gonads during sex transformations in the rice field eel. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307: 165-171.
- Zhao Q., Dobbs-McAuliffe B., Linney E. 2005. Expression of *cyp26b1* during zebrafish early development. *Gene Expression Patterns* 5: 363-369.
- Zhu S., King SC., Haasch ML. 2006. Environmental induction of CYP1A-, CYP2M1- and CYP2K1-like proteins in tropical fish species by produced formation water on the northwest shelf of Australia. *Marine Environmental Research* 62: 322-326.

## TABLAS

Tabla IV.1. Biomarcadores agrupados por tipo de daño de acuerdo a la clasificación de Peakall & Walker 1994 y Walker et al., 1996.

Exposición	Efecto	Susceptibilidad
Inducción de metalotioneinas	Inhibición de esterasas (e.g. acetilcolinesterasa) Inhibición del ácido dehidratasa aminolevulinico (ADAL)	Polimorfismos genéticos sensibles (eg. gen GSTM1)
Inducción de glutatión S- transferasa	Reducción de retinol y tiroxina Alteración en parámetros morfométricos (talla y peso Adelgazamiento del cascarón)	
Inducción de monooxigenasas P450	Alteración en el índices somático (hígado y gónadas) Inducción de aberraciones cromosómicas	

Tabla IV.2. Enzimas monooxigenasas del citocromo P450 descritas en peces teleósteos

Orden	Familia & Subfamilia	Especie	CYP450	Referencias
Anguilliformes	Anguillidae	<b>Anguila japonesa</b> <i>Anguilla japonica</i> (Temmink & Schlegel, 1845)	CYP1B1, CYP1C1, CYP11A, CYP17, P450 <sub>scc</sub> , P450 <sub>c17</sub> .	Kazeto et al. (2000), Kazeto et al. (2006)
Synbranchiformes	Synbranchidae	<b>Anguila del arroz</b> <i>Monopterus albus</i> (Zuiew, 1793)	CYP17a, CYP17b, CYP17c	Yu et al. (2003).
Cypriniformes	Cyprinidae	<b>Carpa común</b> <i>Cyprinus carpio capio</i> (Linnaeus, 1758)	CYP 1A, CYP1B1, CYP1B2, CYP1C1, CYP1C2 CYP2, actividad APND, ECOD, EROD.	Marionnet et al. (1996), Fernandes et al. (2002), Sakamoto et al. (2003), El-Kady et al. (2004), Itakura et al. (2005), Henczová et al. (2006). Henczová et al. (2006).
		<b>Carpa plateada</b> <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (Valenciennes, 1844)	Actividad ECOD, EROD, APND	
		<b>Pez dorado</b> <i>Carassius auratus auratus</i> (Linnaeus, 1758)	CYP19A1, CYP19A2	Tchoudakova & Callard (1998), Callard et al. (2001), Tchoudakova et al. (2001)
		<b>Carpita cabeza</b> <i>Pimephales promelas</i> (Rafinesque, 1820)	CYP1A, CYP11A1, CYP17, CYP19A1, CYP19B1	Lindstrom-Seppa et al. (1994), Halm et al. (2003), Filby et al. (2007).
		<b>Pez cebra</b> <i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822)	CYP 1A1, CYP1B1P, CYP2AD3, CYP2AD2, CYP2AA2, CYP2AA1, CYP1B1, CYP20, CYP1C2, CYP1C1, CYP2V1, CYP2K8, CYP2K7, CYP2K6, CYP2K16, CYP2K17, CYP2K18, CYP2K19, CYP2K20, CYP2K21, CYP2K21-de1, CYP2K22, CYP2N13, CYP2P6, CYP2P7, CYP2P8, CYP2P8-de7,8, CYP2P9, CYP2P10, CYP2P10-de9, CYP2P-se1, CYP2X6, CYP2X7, CYP2X7-de9, CYP2X7-de9c, CYP2X8, CYP2X9, CYP2X10, CYP2X11, CYP2X11-de1, CYP2Y3, CYP2Y4, CYP2AA3, CYP2AA4, CYP2AA4-de3, CYP2AA5, CYP2AA6, CYP2AA6-ie6, CYP2AA7, CYP2AA8, CYP2AD6, CYP3C1, CYP3A56, CYP4FA3, CYP4T8, CYP5A1, CYP7A1, CYP7C1, CYP7D1, CYP8A1, CYP2AE1, CYP2AE1-de9, CYP8B1, CYP8B2, CYP8B3, CYP11A1, CYP11A2, CYP11B1, CYP17A1, CYP17A2, CYP17c, CYP19A1, CYP19A2, CYP21, CYP24, CYP26A1, CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1, CYP26D1, CYP27A.a, CYP27A.b, CYP27A.c, CYP27A.d, CYP27B1, CYP27C1, CYP39, CYP46A1, CYP4A2, CYP51A1.	Buchman (1993), White et al. (1996), Nelson (1999), Callard et al. (2001), Kishida & Callard (2001), Trant et al. (2001), Kudoh et al. (2002), Kazeto et al. (2001), (2004), (2005), Wang & Ge (2004), Godard et al. (2005), Gu et al. (2005), Luo et al. (2005), Tseng et al. (2005), Wang-Buhler et al. (2005), Zhao et al. (2005), Corley-Smith et al. (2006), Hoffman & Oris (2006), Nunez et al. (2006), Shang et al. (2006), Moise et al. (2007).
		<b>Cacho</b> <i>Leuciscus cephalus</i> (Linnaeus, 1758)	Actividad EROD	Larno et al. (2001)
		<b>Cachuelo</b> <i>Leuciscus idus</i> (Linnaeus, 1758)	Actividad EROD	Jedamski et al. (1994)



Tabla IV.2. Continuación

Orden	Familia & Subfamilia	Especie	CYP450	Referencias
Salmoniformes	Salmonidae Salmoninae	<b>Trucha arcoiris</b> <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792)	CYP1A1, CYP1A2, CYP1A3, CYP1B1, CYP1B2, probable CYP2B, CYP2K1, CYP2K1v1 CYP2K1v2, CYP2K1v3, CYP2K3, CYP2K4, CYP2K5, CYP2M1, CYP3A, CYP3A27, CYP3A45, CYP4T1, CYP11A1, CYP17, CYP19.	Winkelhake et al. (1983), Sakai et al. (1992), Lester et al. (1993), Haash et al. (1993), Berndston & Chen (1994), Buhler et al. (1994), Celander & Förlin (1995), Sadar et al. (1995), Campbell (1996), Celander et al. (1996), Falckh et al. (1997), Kokayashi et al. (1997), Nunez et al. (1997), Cok (1998), Lee et al. (1998), Heilmann et al. (1998), Kobayashi et al. (1998), Buhler et al. (2000), Yang et al. (2000), Lee et al. (2001), Govouroun et al. (2001), Lee and Buhler (2003), Petkam et al. (2003), Nakamura et al. (2005), Kanda et al. (2006).
		<b>Salmón real</b> <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (Walbaum, 1972)	CYP1A1, Actividad EROD	Wilson et al. (2000)
		<b>Salmón del Atlántico</b> <i>Salmo salar</i> (Linnaeus, 1758)	CYP2K, CYP2M, CYP19, CYP1C	Thibaut et al. (2002), Meucci & Arukwe (2006).
	Salmonidae Coregoninae	<b>Lavareto</b> <i>Coregonus lavaretus</i> (Linnaeus, 1758)	CYP1A1	Soimasuo et al. (1998)
Batrachoidiformes	Batrachoididae	<b>Pejesapo</b> <i>Opsanus tau</i> (Linnaeus, 1766)	CYP 1A	Morrison et al. (1995).
Baloniformes	Adrianichthyidae Oryziinae	<b>Medaka japonés</b> <i>Oryzias latipes</i> (Temminck & Schlegel, 1846)	CYP1A, CYP2E1, CYP 3A, CYP3A27, CYP3A40, CYP3A38, CYP4T1.	Kaplan et al. (1991), Crivello & Schultz (1995), Lipscomb et al. (1997), Wall and Crivello (1998), Kullman and Hinton (2001), Kullman (2000), Al-Arabi (2002). Kim et al. (2004), Kashiwada (2005).
Siluriformes	Bagridae	<b>Rita</b> <i>Rita rita</i> (Hamilton, 1822)	CYP1A	
	Ictaluridae	<b>Bagre de canal</b> <i>Ictalurus punctatus</i> (Rafinesque, 1818)	CYP1A, CYP1B, CYP2K1, CYP2M1, CYP2X1, CYP3A, CYP 11A, CYP17, CYP19A2,	Schlenk et al. (1997), Perkins and Schlenk (1998), Godard et al. (2000), Celander et al. (2002), Schlenk et al. (2002), Kazeto & Trant (2005), Nunez et al. (2006), Stuchal et al. (2006), Willett et al. (2006)

Tabla IV.2. Continuación

Orden	Familia & Subfamilia	Especie	CYP450	Referencias
Cyprinodontiformes	Fundulidae	<b>Fúndulo</b> <i>Fundulus heteroclitus</i> (Linnaeus, 1766)	CYP 1A, CYP3A30, CYP1C1, CYP1C2, CYP2K1, CYP2K2, CYP2N1, CYP2M1, CYP2N2, CYP2P1, CYP2P2, CYP2P3, CYPE, CYP3A30, CYP3A56, CYP19A2, CYP19A1.	Sam & Stegeman (1989), Van Veld et al. (1992), (1997), Celander & Stegeman (1997), Morrison et al. (1998), Oleksiak et al. (2000), Haash (2002), McArthur et al. (2003), Oleksiak et al. (2003), Patel et al. (2006), Wang et al. (2006).
		<b>Poeciliopsis</b> <i>Poeciliopsis sp.</i>	CYP1A, P450jp (CYP2E1)	Crivello & Schultz (1995), Smolowitz et al. (1992)
		<b>Guatopote del Mayo</b> <i>Poeciliopsos monacha</i> (Miller, 1960)	CYP1E1	Crivello & Schultz (1995), Kaplan et al. (1999) (2001)
		<b>Guatopote de San Jeronimo</b> <i>Poeciliopsis fascista</i> (Meek, 1904)	CYP1E1	Crivello & Schultz (1995).
		<b>Guatopote gordito</b> <i>Poeciliopsis viriosa</i> (Miller, 1960)	CYP1E1	Crivello & Schultz (1995), Kaplan et al. (2001)
		<b>Guatopote de Sonora</b> <i>Poeciliopsis occidentalis</i> (Baird & Girard, 1853)	CYP2E1	Crivello & Schultz (1995), Kaplan et al. (1999) (2001).
		<b>Guatopote del mocorito</b> <i>Poeciliopsos lucida</i> (Miller, 1960)	CYP1A, CYP2E1, CYP3A	Crivello & Schultz (1995), Celander et al. (1996), Kaplan et al. (2001).
		<b>Guppy</b> <i>Poecilia reticulata</i> (Peters, 1859)	CYP19arom	Hallgren et al. (2006).
		<b>Almirante de manglar</b> <i>Rivulus marmoratus</i> (Poey, 1880)	CYP1A	Kim et al. (2004)
		Perciformes	Rivulidae	<b>Sigano pintado</b> <i>Siganus canaliculatus</i> (Park, 1797)
Cichidae	<b>Haplo de Burton</b> <i>Haplochromis burtoni</i> (Günther, 1894)		(CYP19)	Registro en Nelson (2004)
Pseudocrenilabrinae	<b>Tilapia del Nilo</b> <i>Oreochromis niloticus niloticus</i> (Linnaeus, 1758)		CYP1A1, CYP1C1, CYP1C2, CYP20, CYP1B1, CYP19A, actividad PROD (CYP2B).	Ueng & Ueng (1995), Parente et al. (2004), Wang et al. (2006).
	<b>Tilapia azul</b> <i>Oreochromis aureus</i> (Steindarchner, 1864)		CYP1A1	Ueng & Ueng (1995)
Sparidae	<b>Xlavitia</b> <i>Lagodon rhomboids</i> (Linnaeus, 1766)		CYP1A, Probable CYP2B, actividad PROD.	Stegeman & Woodin (1997).
	<b>Sargo de América del Norte</b> <i>Stenotomus chrysops</i> (Linnaeus, 1766)		CYP1A, CYP1B, CYP1C1/2, CYP20, CYP2AD4, CYP17, CYP19, actividad PROD	Morrison et al. (1995), Godard et al. (2000), Iwata et al. (2002), Godard et al. (2005).
	<b>Dorada del Pacífico</b> <i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758)		CYP1A	Ortiz-Delgado et al. (2005)
Mullidae	<b>Salmonete de fango</b> <i>Mullus barbatus barbatus</i> (Linnaeus, 1758)	CYP1A	Morcillo et al. (2004)	
Gobiidae	<b>Gobi</b> <i>Apocryptes bato</i> (Hamilton, 1822)	CYP1A	Al-Arabi et al. (2002)	
	Oxudercinae			

Tabla IV.2. Continuación

Orden	Familia & Subfamilia	Especie	CYP450	Referencias	
Perciformes	Carangidae	<b>Jurel centellante</b> <i>Carangoides fulvoguttatus</i> (Forsskål, 1775)	CYP1A, probable CYP2K1, probable CYP2M1.	Zhu et al. (2006).	
		<b>Mariposa de aleta ribeteada</b> <i>Chaetodon auriga</i> (Forsskål, 1775)	CYP2N6	registro en Nelson (2004)	
	Chaetodontidae	<b>Pez de coral Atol</b> <i>Chaetodon mertensii</i> (Cuvier, 1831)	CYP2N4	registro en Nelson (2004)	
		<b>Pez de coral bimanchado</b> <i>Chaetodon plebeius</i> (Cuvier, 1831)	CYP2N8	registro en Nelson (2004)	
		<b>Pez mariposa de manchas</b> <i>Chaetodon punctatofasciatus</i> (Cuvier, 1831)	CYP2N5	registro en Nelson (2004)	
		<b>Pez mariposa naranja</b> <i>Chaetodon xanthurus</i> (Bleeker, 1857)	CYP2N7	registro en Nelson (2004)	
		<b>Pargo abanderado</b> <i>Lutjanus carponotatus</i> (Richardson, 1842)	CYP1A, probable CYP2K1, probable CYP2M1	Zhu et al. (2006)	
		<b>Perca europea</b> <i>Perca fluviatilis</i> (Linnaeus, 1758)	Actividad CYP17	Linderoth et al. (2006)	
	Serranidae	<b>Cherna enjambre</b> <i>Cephalopholis cruentata</i> (Lacepède, 1802)	CYP1A, probable CYP2B, actividad PROD	Stegeman & Woodin (1997)	
	Haemulidae	<b>Ronco</b> <i>Haemulon aurolineatum</i> (Cuvier, 1830)	CYP1A, probable CYP2B, actividad PROD	Stegeman & Woodin (1997)	
	Pomacentridae	<b>Petaca rayada</b> <i>Abudefduf saxatilis</i> (Linnaeus, 1758)	CYP1A, probable CYP2B, actividad PROD	Stegeman & Woodin (1997)	
	Kyphosidae	<b>Chopa blanca</b> <i>Kyphosus sectator</i> (Linnaeus, 1758)	CYP1A, probable CYP2B, actividad PROD	Stegeman & Woodin (1997)	
	Pleuronectiformes	Pleuronectidae	<b>Limanda nórdica</b> <i>Limanda limanda</i> (Linnaeus, 1758)	CYP 1A	Craft et al. (2001)
			<b>Solla roja</b> <i>Pseudopleuronectes americanus</i> (Walbaum, 1792)	CYP2E1	Wall & Crivello (1998)
		Pleuronectinae	<b>Solla europea</b> <i>Pleuronectes platessa</i> (Linnaeus, 1758)	CYP1B	Godard et al. (2000), Leaver et al. (2000), Craft et al. (2001).
			<b>Platija limón</b> <i>Pleuronectes vetulus</i> (Girard, 1854)	CYP1A	Anulacion et al. (1998), Sarasquete et al. (2000), Craft et al. (2001)
			<b>Solla del pacífico</b> <i>Platichthys stellatus</i> (Pallas, 1788)	CYP1A	Craft et al. (2001), Anulacion et al. (1998).
<b>Solla</b> <i>Platichthys flesus</i> (Linnaeus, 1758)			Actividad EROD	Napierska & Podolska (2005).	
<b>Pez verde moteado</b> <i>Tetraodon nigroviridis</i> (Marion de Procé, 1822)			CYP1A, CYP2B, CYP2N3, CYP21, CYP1B1	Registro en Nelson (2004)	
Gasterosteiformes	Gasterosteidae	<b>Espinillo</b> <i>Gasterosteus aculeatus</i> (Linnaeus, 1758)	CYP2AD5, CYP1C	Registro en Nelson (2004),	
Characiformes	Prochilodontidae	<b>Sábalo rayado</b> <i>Prochilodus scrofa</i> (Steindachmer, 1881)	Actividad EROD	Da Silva & Meirelles (2004)	
Gadiformes	Gadidae	<b>Bacalao del Atlántico</b> <i>Gadus morhua</i> (Linnaeus, 1758)	CYP1A, actividad EROD, PROD, P450C	Goksoyr et al. (1986), Ruu et al. (2002).	

Pié de Tabla IV.2. La clasificación taxonómica usada en esta tabla se basó en Froese, R. and D. Pauly. (Eds.) 2007. FishBase ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org).version (01/2007). La compilación de las isoformas presentadas en esta tabla se obtuvo de la literatura y de la lista Nelson DR (2004) publicada en el portal de internet ([http://:drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html](http://drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html)).

APND: aminopireno-*N*-demetilasa, (CYP2B o CYP3A isoenzima); ECOD: 7-ethoxy-coumarin-*O*-deetilasa; EROD: Etoxyresorufina-*O*-deetilasa; PROD: Pentoxyresorufina-*O*-deetilasa. El nombre común de cada especie es en inglés.

Tabla IV.3. Sitios de inducción de las monooxigenasas P450 en peces teleósteos

CYP	Expresión en tejidos														
	CBR	OJ	HDO	CZN	ITNO	BRQ	RÑN	BZO	SGR	PL	MOR	MCL	OVR	TST	EMB
1A			X	X	X+	X	X	X		X	X		X		X
1B1			X		X	X+	X		X						
1B2			X		X	X+									
1C1			X+	X		X	X								X+
1C2			X			X	X								
2E1.			X												
2K1	X		X		X		X+		X						
2K6			X										X		
2M1	X		X+		X		X		X						X
2N1	X	Nd	X	X	X	Nd	Nd	Nd				Nd	Nd	Nd	
2N2	X	X	X	X	X	X	X								
2P1		Nd	X	Nd	X	Nd	Nd					Nd	Nd	Nd	
2P2			X		X										
2P3			X		X										
2X			X												
3A27	X		X		X+				X						
3A38			X												X
3A40			X												X
3A45			X		X+										
3A56	X		X+		X+	X	X						X		
3A30	X		X+		X+	X	X						X		
3A65	X		X	X	X	X									X
3C1		X	X	X	X					X			X		X
4T1			X												
11A1							X						X	X	
17C	X		X		X	X	X						X	X+	
17A1													X	X	
17B													X	X	
17A2													X	X	
19A1	X		X									X	X		X
19A2	X	X	X									X	Nd		X
26A1										X					X
26B1	X	X								X					X
26D1	X	X													X

CYP: citocromo; Nd: no detectado; CBR: cerebro; OJ: ojos; HDO: hígado; CZN: corazón; ITNO: intestino; BRQ: branquias; RÑN: riñones; BZO: bazo; SGR: sangre; PL: piel; MOR: mucosa oral; MCL: músculo; OVR: ovarios; TST: testículos; EMB: tejido embrionario. X: inducción; X+: inducción alta.

Tabla IV.4. Función endógena de las monooxigenasas P450 en peces teleósteos

Subfamilias (CYP)	Función	Referencias
1A1	Hidroxilación de pregnenolona	Ptkam et al., 2003
1B	Probable regulador de gas o fluidos en branquias	Leaver et al., 2000
1C	Probable participación durante la embriogénesis	Godard et al., 2005
2B	Desconocida	Ruus et al., 2002
2E1	Metabolismo de nitrosoetilaminas	Kaplan et al., 1999
2K	Hidroxilación de ácido láurico (ac. graso)	Yang et al., 2000; Wang-Buhler et al., 2005; Thibaut et al., 2002
2M1	Hidroxilación de ácido láurico	Haasch 2002; Thibaut et al., 2002
2N	Hidroxilación/epoxilación de ácido araquidónico	Oleksiak et al., 2000
2P	Hidroxilación/epoxilación de ácido araquidónico	Oleksiak et al., 2003
2X	Desconocida	Schlenk et al., 2002
3A27/38/40/45	Hidroxilación de testosterona	Lee et al., 2001; Kullman et al., 2001; Lee & Buhler 2003; Kashiwada et al., 2005
3A56/30/61	Desconocida	Hegelund & Celander 2003; Tseng et al., 2005
3C1	Desconocida	Corley et al., 2006
4T1	Desconocida	Falckh et al., 1997
11A1	Hidroxilación de colesterol	Kazeto et al., 2006
17C	Hidroxilación de pregnenolona/progesterona/corticosteroides	Hallm et al., 2003; Wang-Buhler et al., 2005; Kazeto et al., 2006
17A	Desconocida	Yu et al., 2003
17B	Desconocida	Yu et al., 2003
19A	Aromatización de androgeno/testosterona	Tchoudakova & Callard 1998; Kazeto & Trant 2005
26A1	Hidroxilación de ácido retinoico	White et al., 1996; Kudoh et al., 2002
26B1	Probable participación en el metabolismo de ácido retinoico	Nelson 1999
26D1	Probable participación en el metabolismo de ácido retinoico	Gu et al., 2005

## **CAPÍTULO V**

### EXPOSURE TO PESTICIDES IMPAIRS THE EXPRESSION OF FISH ORNAMENTS REDUCING THE AVAILABILITY OF ATTRACTIVE MALES

En este capítulo se muestran los resultados del experimento central de la tesis en el cual se evaluaron los efectos del metil paratión sobre los ornamentos (talla y coloración de aletas) y conductas sexuales (cortejo y preferencia) en peces que estuvieron expuestos a 0.005 µg/g durante el periodo de gestación vía materna.

Artículo publicado en *Proceedings of the Royal Society B* (2008) 275, 1343-1350.

(DOI:10.1098/rspb.2008.0163)

## Exposure to pesticides impairs the expression of fish ornaments reducing the availability of attractive males

Omar Arellano-Aguilar and Constantino Macías García\*

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, México, C.P. 04510, México

Ornament magnitude often reflects a local balance between sexual selection and other sources of natural selection opposing their elaboration. Human activity may disrupt this balance if it modifies the costs of producing, maintaining or displaying the ornaments. When costs are increased, a shortage of acceptable partners may ensue, with consequences commensurate with how stringent (and effective) the process of mate choice is. Here, we show that the expression of ornaments in the viviparous amarillo fish (*Girardinichthys multiradiatus*) is influenced by embryonic exposure to low concentrations of an organophosphorus insecticide. Male ornamental fin size, dimorphic yellow coloration and display rates were all compromised in exposed fish, but unaffected in their paternal half-sibling controls and in their sisters (morphology and colour). Exposure resulted in smaller fish of both sexes, thus the differential effect by sex was restricted to attributes such as fin size only above the naturally selected magnitude shown by females. Father phenotype predicted offspring morphology of controls, but not of exposed males, which were discriminated against by both control and exposed females. Since stringent female mate choice can result in females refusing to mate with suboptimal mates, this sub-lethal developmental effect can reduce the effective population size of amarillo fish populations.

**Keywords:** cost of ornaments; sexual selection; handicap; insecticides; viviparous fish

### 1. INTRODUCTION

Implicit in the word ornaments is the idea that epigamic or secondary sexual characters are costly to produce, maintain or display. Their existence, which seemed to be at odds with the economy of design expected under the action of natural selection, led Darwin (1859) to propose the concept of sexual selection to explain exaggeration of traits by the action of (typically female) mate preferences. While it is still debated whether ornaments evolve because they are costly (Zahavi 1975), or they become costly because their magnitude is exaggerated as a result of mate choice (Fisher 1958), there seems to be little doubt that ornaments are expensive to produce and/or maintain (reviewed by Jennions *et al.* 2001). Indeed, ornaments are readily recognized because they are attributes that depart from the naturally selected optimum in one or both sexes, depending on whether the intensity of sexual selection is symmetrical or not. As inferred from the fundamental theorem of natural selection (Fisher 1958), small departures near the optimum trait value are of little selective consequence compared with similar departures when the attribute is already far from its optimum value (Fisher 1958). This means that large ornaments are expected to be much more costly than small ones, and a certain level of plasticity in the production of ornaments may be selectively advantageous. If a developing male can adjust its investment in epigamic characters in response to stress, then their final size will reflect the past condition of the bearer (*i.e.* it will be condition dependent; Andersson 1982).

Condition dependence of the ornament's expression is one possible reason why females base their mate choice on their magnitude. This would lead them to mate with healthy partners either with superior genetic constitution (indirect benefits to be passed to the offspring; after Zahavi 1975) or capable of providing superior resources to the female or to her offspring (direct benefits; see Kokko *et al.* 2002). Another reason to prefer ornamented males would be the exploitation of sensory biases by the males' ornaments (Ryan & Keddy-Hector 1992; Endler & Basolo 1998; Macías García & Ramírez 2005). If they are costly to produce, maintain or display, the ornament's expression can be opposed by other selective forces such as predation (Endler 1980), which may skew the availability of males towards less-preferred morphs (Macías García *et al.* 1998). Owing to the several physiological effects of agrochemicals, we hypothesized that ornament expression would also be affected by the presence of insecticides. We addressed this question experimentally using the expression of ornaments in a viviparous, sexually dimorphic fish.

Sexual selection has been implicated in the origin of large (and yellow) male fins (Macías García *et al.* 1994) and on the flamboyant male courtship display (Macías García & Sabero 2004) of the amarillo fish (*Girardinichthys multiradiatus*), a goodeid which also uses fin colour (Macías García 1991) and UV colour patterns during mate choice (Jurt de Perera & Macías García 2003). There is evidence that developing large fins (assessed from correlated body shape) increases the risk of being captured by aquatic specialist garter snakes (*Thamnophis sularogator*; Macías García *et al.* 1994, 1998), and several sources of evidence

\* Author for correspondence (macias@servidor.unam.mx).



suggest that courtship behaviour is also a liability in this context (Macías García 1994; C. Berea & C. Macías García 1998, unpublished data). Sexual selection, as evidenced by pre-mating isolation among populations, appears to have led to population differentiation in which male, but not female, morphology differs statistically between populations (González Zurrah & Macías García 2006), suggesting that either female preferences vary arbitrarily between localities or that the development of male ornaments is influenced by the local environment. Females can effectively refuse mating with suboptimal males, and, in aquaria, this often results in a large proportion (41–76%) failing to breed altogether (Macías García *et al.* 1998; Macías García & Saborío 2004; González Zurrah & Macías García 2006).

We used the fact that a widespread insecticide is often found in the habitat of the amarillo in low concentrations (De La Vega Salazar *et al.* 1997), to test whether this novel challenge impairs ornament development. Methyl parathion (MeP) is bio-concentrated in embryos, but minimally in the mother's tissues (De La Vega Salazar *et al.* 1997), which may be due to the fact that some metabolic pathways (e.g. the cytochromes of the group P450) needed to combat the toxicity of this organophosphorus compound are not fully functional in the embryos. Preliminary work (O. Arellano-Aguilar & C. Macías García) demonstrates that the concentrations found in the field are sub-lethal, but still produce some toxic effects on the embryos and to a lesser extent on their mothers. We used one such concentration to evaluate the consequences of embryonic intoxication on adult sexual performance (ornament and courtship expression and attractiveness to females).

## 2. MATERIAL AND METHODS

### (a) Sample

Fish were the laboratory-born progeny of fish collected at San Juanico in 2001 and kept in outdoor ponds (described in Macías García *et al.* 1998). We used 11 males as the number of females available was limited to 32, six males were presented with one matched pair of similarly sized non-pregnant females each, and five were presented with two matched pairs of females each. Goodeid females do not store sperm between broods, thus by using only females who had recently given birth we guaranteed that the progeny would be sired by the male we provided. This procedure also meant that the matched broods would be born with very few days of difference, thus simplifying our experimental protocol. Females were introduced to the male home tank and kept there for 10 days, after which they were placed in isolation. A total of 32 females were used, but most failed to become pregnant (normally less than 60% of females become pregnant when presented only one male, e.g. Macías García *et al.* 1998; González Zurrah & Macías García 2006). Each female of those paired to the same male was arbitrarily assigned to either the treatment (exposure to MeP) or the control group (sham exposure; see below). Females were kept in individual 3 l aquaria for 50 days (gestation in laboratory  $53 \pm 7.9$  days,  $n = 13$ ; E. Saborío & C. Macías García 2002, unpublished data), and both female and offspring survival were recorded. Each newborn brood was transferred to a MeP-free 40 l aquarium fitted with an air-powered foam filter, fed ad libitum on commercial fish food flakes and

maintained at 12/12 hours photoperiod and 25°C until they reached 90 days of age.

A dilution of 99.4% purity MeP (TECROM, Mexico) was added to the commercial food flakes (Sera Vipari, Italy) using HPLC-grade acetonitrile (TECSQUIM, Mexico) as carrier so that the concentration of MeP in the food was  $0.005 \mu\text{g g}^{-1}$ . This is twice the concentration measured in water from their locality of origin, and one order of magnitude lower than field concentrations elsewhere. Individual 0.005 g doses wrapped in tin foil to protect the photolabile insecticide were given to the fish twice a day (note that the MeP concentration in the water of the aquaria would then have been well below field measurements). Control females were fed the same food soaked (and subsequently allowed to dry) in acetonitrile, but without the insecticide.

Fish in each brood were separated by sex from approximately 60 days of age, when sexes can already be distinguished, and raised in isolation in cylindrical compartments within single-sex aquaria. Ornaments were measured when fish were fully adult, following behavioural trials that began at the age of approximately 90 days.

### (b) Morphology

The day after the completion of the trials (see 3.2f), fish were anaesthetized with a dilution of 1 g benzocaine per 100 ml acetone, placed next to a ruler on a photographic board and photographed with a digital camera. The images were stored on a computer and subsequently measured using Image Tool software. We followed the protocol used by González Zurrah & Macías García (2006), and measured six attributes historically associated with female mate choice and four not associated with it so far (see fig. 2 of González Zurrah & Macías García 2006). The averages of three measurements of each attribute of males and females mate from all the broods were entered into a principal components analysis (PCA). An independent PCA was performed with only the males that fathered both exposed and control broods.

### (c) Colour

The colour of anaesthetized males (but not of their parents) was assessed using a Minolta CM-2600D hand-held spectrophotometer with pulsed xenon lamps (spectral range was from  $\lambda = 360$  to 740 nm), which was calibrated with the manufacturer's white calibration plate. We obtained the reflectance spectrum of one point in the operculum (known to be reflective in the UV), one point in the flank and one in each of the median fins (dorsal, caudal and anal). We measured the same in females, except that the small size of their dorsal and anal fins (which are not coloured) precluded measuring their reflectance. From the spectra, we calculated total chroma saturation, yellow chroma saturation, red chroma saturation and UV chroma saturation (see 3.3).

### (d) Behaviour

#### (i) Courtship performance

Once fish from one matched brood reached their 90th day of age, each male was individually transferred to an observation tank divided into two compartments by an opaque partition, and left in the male compartment to habituate for 24 hours. One of three standard females from our stocks was then introduced into the female compartment within a transparent plastic bag. After 5 min of habituation to temperature and light conditions the female was presented, always within her bag, to the male. Fish were allowed to settle for a further

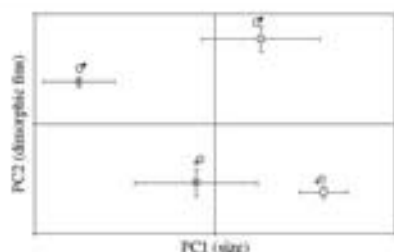


Figure 1. The first principal component gave large loadings to the measurements reflecting overall size, and significantly ( $p=0.003$ ) separated exposed (to  $0.005 \mu\text{g g}^{-1}$ , filled symbol) and control fish (open symbol). Interestingly, owing to the reduced size of exposed females, the reversed sexual size dimorphism common in viviparous fishes is not significant here. The second PC separated fish by sex ( $p<0.001$ ; ♀, females; ♂, males), giving large loadings to the dimorphic fin and body size and shape. Prenatally exposed males, but not females, developed smaller median fins, which when fully grown act as male ornaments in this fish.

dimorphism of experimental and control males against their father's score. This was calculated using only males, yet it again separated size (PC1; 63% of variance explained) and sexually dimorphic shape (PC2; 16.6%), giving high loadings to body height (a correlate of fin size; see Macías García *et al.* 1994) and to the length of both the dorsal and anal fins. We used the scores in the second principal component as a measure of parental ornamentation, and regressed on it the filial PC2 scores separately for exposed and control males (figure 2). The ornament development of control ( $F_{1,3}=34.4$ ,  $p=0.01$ ), but not of experimental males ( $F_{1,3}=1.01$ ,  $p=0.39$ ), was a function of parental ornamentation (figure 2). More importantly, the slope of the exposed males' regression, which was not different from zero, was significantly lower than that of the controls (interaction from an ANOVA with father and treatment as factors:  $F_{1,25}=7.25$ ,  $p=0.036$ ). This confirms that attempting to develop a large ornament is substantially costlier than attempting to develop a modest one (offspring scores converge in the ornament size of the less-ornamented parents; figure 2), a pattern consistent with the idea that the exaggerated male fins of the amarello are condition-dependent ornaments.

#### (c) Colour

There were several differences in colour between treatment and between the sexes, mostly in agreement with our hypothesis that early exposure to insecticides should hamper ornament expression; the results are shown in table 2. We did not anticipate sexual differences in the colour of the operculum or the fish flank, although both reflect in the UV (Macías García & Burt de Perera 2002), and females use UV reflection to select among males. Yet we found that females reflect significantly more UV in both the operculum and the flank than males, but this was unaffected by early exposure to MeP. Conversely, male operculum and flank were more saturated in the red region than those of females (see below), which again was unaffected by the treatment. Total chroma saturation was also higher in males on both the flanks and the

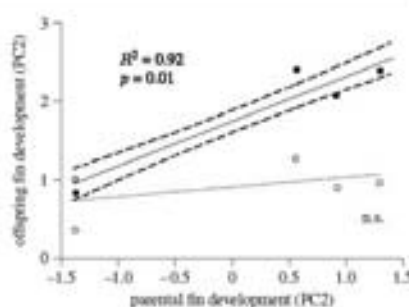


Figure 2. Ornament development (PC2) of control males (filled circles) was a function of paternal ornamentation. Offspring values of singletons or mean values for litters with two males (table 1) were regressed on parental (father) values (Falconer & Mackay 1996). Heritability of male ornamentation was calculated as  $h^2=2m=1.13\pm 0.096$  s.e., a value which may indicate a degree of sex linkage, as has been suggested for male ornaments in *Poecilia reticulata* (Hughes *et al.* 2005). The regression was not significant for exposed males (open circles), and it is traced as a dotted line only to aid comparison.

opercula, and control males had more saturated chroma on the operculum than exposed fish (but the interaction was not significant). Yellow chroma was also higher in the opercula of control than in those of exposed fish of both the sexes (table 2).

We obtained the reflectance of the three median fins of males (dorsal, anal and caudal) and of the caudal fin of females. The caudal fin is normally not dimorphic in colour (to us), yet we found that male caudal fins had higher red chroma saturation than female fins. Yellow chroma was also more saturated in control than in exposed fish, and the total chroma saturation was much higher in control fish, particularly because control males had very high chroma saturation (table 2). Dorsal and anal fins of control males had higher yellow chroma saturation than those of their exposed siblings, and their anal fins were also of higher red chroma saturation than those of exposed males. It is apparently puzzling that UV chroma was higher in the dorsal fins of exposed than in those of control fish (see §4c).

#### (d) Behaviour

##### (i) Courtship performance

In order to capture as much as possible of the variance in courtship behaviour in our analyses, we performed the PCA before calculating the average of the three trials of each male (rather than calculating the average and then performing the PCA). The first two principal components explained 71% of the variance in our data. The first principal component (49% of the variance explained) gave high positive loadings to active courtship behaviours (frequency and duration of courtship fin-folding and flagging, and frequency of figure-of-eight dance), whereas the second one gave even higher, but negative loadings to passive courtship behaviours (frequency and duration of static fin displays). Control males performed more active courtship than their exposed half-siblings; as we were testing a directional prediction, we used a one-tailed test

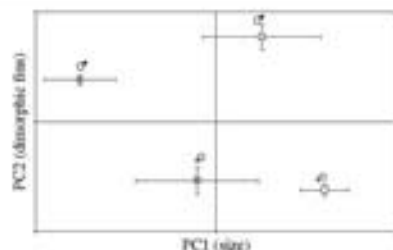


Figure 1. The first principal component gave large loadings to the measurements reflecting overall size, and significantly ( $p < 0.003$ ) separated exposed (to  $0.005 \mu\text{g g}^{-1}$ , filled symbols) and control fish (open symbols). Interestingly, owing to the reduced size of exposed females, the reversed sexual size dimorphism common in viviparous fishes is not significant here. The second PC separated fish by sex ( $p < 0.001$ ; ♀, females; ♂, males), giving large loadings to the dimorphic fin and body size and shape. Prenatally exposed males, but not females, developed smaller median fins, which when fully grown act as male ornaments in this fish.

dimorphism of experimental and control males against their father's score. This was calculated using only males, yet it again separated size (PC1; 63% of variance explained) and sexually dimorphic shape (PC2; 16.6%), giving high loadings to body height (a correlate of fin size; see Macías García *et al.* 1994) and to the length of both the dorsal and anal fins. We used the scores in the second principal component as a measure of parental ornamentation, and regressed on it the filial PC2 scores separately for exposed and control males (Figure 2). The ornament development of control ( $F_{1,3} = 34.4$ ,  $p = 0.01$ ), but not of experimental males ( $F_{1,3} = 1.01$ ,  $p = 0.39$ ), was a function of paternal ornamentation (Figure 2). More importantly, the slope of the exposed males' regression, which was not different from zero, was significantly lower than that of the controls (interaction from an ANOVA with father and treatment as factors:  $F_{1,3} = 7.25$ ,  $p = 0.036$ ). This confirms that attempting to develop a large ornament is substantially costlier than attempting to develop a modest one (offspring scores converge in the ornament size of the less-ornamented parents; Figure 2), a pattern consistent with the idea that the exaggerated male fins of the amarillo are condition-dependent ornaments.

#### (c) Colour

There were several differences in colour between treatment and between the sexes, mostly in agreement with our hypothesis that early exposure to insecticides should hamper ornament expression; the results are shown in Table 2. We did not anticipate sexual differences in the colour of the operculum or the fish flank, although both reflect in the UV (Macías García & Burt de Perera 2002), and females use UV reflection to select among males. Yet we found that females reflect significantly more UV in both the operculum and the flank than males, but this was unaffected by early exposure to MeP. Conversely, male operculum and flank were more saturated in the red region than those of females (see below), which again was unaffected by the treatment. Total chroma saturation was also higher in males on both the flanks and the

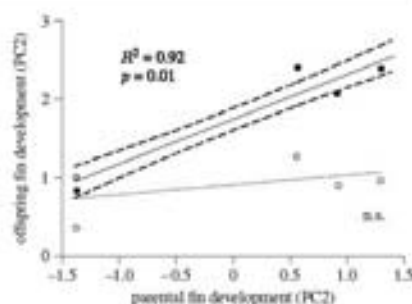


Figure 2. Ornament development (PC2) of control males (filled circles) was a function of paternal ornamentation. Offspring values of singletons or mean values for litters with two males (Table 1) were regressed on parental (father) values (Falconer & Mackay 1996). Heritability of male ornamentation was calculated as  $h^2 = 2m = 1.13 \pm 0.096$  s.e., a value which may indicate a degree of sex linkage, as has been suggested for male ornaments in *Poecilia reticulata* (Hughes *et al.* 2005). The regression was not significant for exposed males (open circles), and it is traced as a dotted line only to aid comparison.

opercula, and control males had more saturated chroma on the operculum than exposed fish (but the interaction was not significant). Yellow chroma was also higher in the opercula of control than in those of exposed fish of both the sexes (Table 2).

We obtained the reflectance of the three median fins of males (dorsal, anal and caudal) and of the caudal fin of females. The caudal fin is normally not dimorphic in colour (to us), yet we found that male caudal fins had higher red chroma saturation than female fins. Yellow chroma was also more saturated in control than in exposed fish, and the total chroma saturation was much higher in control fish, particularly because control males had very high chroma saturation (Table 2). Dorsal and anal fins of control males had higher yellow chroma saturation than those of their exposed siblings, and their anal fins were also of higher red chroma saturation than those of exposed males. It is apparently puzzling that UV chroma was higher in the dorsal fins of exposed than in those of control fish (see [4c]).

#### (d) Behaviour

##### (i) Courtship performance

In order to capture as much as possible of the variance in courtship behaviour in our analyses, we performed the PCA before calculating the average of the three trials of each male (rather than calculating the average and then performing the PCA). The first two principal components explained 71% of the variance in our data. The first principal component (49% of the variance explained) gave high positive loadings to active courtship behaviours (frequency and duration of courtship fin-folding and flagging, and frequency of figure-of-eight dance), whereas the second one gave even higher, but negative loadings to passive courtship behaviours (frequency and duration of static fin displays). Control males performed more active courtship than their exposed half-siblings; as we were testing a directional prediction, we used a one-tailed test



**Table 2.** Comparisons of colour ( $\pm$  s.e., rounded to two decimals) between amarello fish exposed to MeP during gestation (E) and their half-sibling controls (C). (Aspects of chroma were defined as follows: spectral saturation,  $G_b = (R_{660} - R_{630})/B_{640}$ ; red chroma,  $C_R = R_{660}/R_{630}$ ; yellow chroma,  $C_Y = R_{580}/R_{630}$ ; UV chroma,  $C_{UV} = R_{380}/R_{430}$ ;  $R$  = reflectance (%) in the specified wavelength ( $\lambda$ ) and  $B_{\lambda}$  (mean brightness) =  $R_{380-740}/n_{\lambda}$  where  $n_{\lambda}$  is the number of wavelength measured. Reflectance of female dorsal and anal fins was not measured. Significant contrasts are given in italics.)

structure	chroma	group			sex		treatment	
			males	females	$F_{1,27}$	$p$	$F_{1,27}$	$p$
operculum	$G_b$	E	1.804 ± 0.100	1.650 ± 0.095	<i>12.62<sup>a</sup></i>	0.002	15.48	0.001 <sup>b,c</sup>
		C	2.292 ± 0.095	1.833 ± 0.095				
	$C_R$	E	0.337 ± 0.016	0.293 ± 0.015	<i>17.95<sup>d</sup></i>	0.0001	0.24 <sup>e</sup>	0.63
		C	0.341 ± 0.015	0.277 ± 0.015				
	$C_Y$	E	0.396 ± 0.008	0.395 ± 0.008	0.22	0.65	6.79	0.02
		C	0.418 ± 0.008	0.412 ± 0.008				
$C_{UV}$	E	0.095 ± 0.005	0.103 ± 0.005	8.37	0.008	1.16	0.29	
	C	0.083 ± 0.005	0.104 ± 0.005					
flank	$G_b$	E	1.872 ± 0.169	1.364 ± 0.158	6.18	0.019	0.00	0.95
		C	1.754 ± 0.158	1.461 ± 0.158				
	$C_R$	E	0.371 ± 0.013	0.322 ± 0.013	<i>19.78<sup>f</sup></i>	0.0002	0.37 <sup>g</sup>	0.55
		C	0.364 ± 0.013	0.316 ± 0.013				
	$C_Y$	E	0.360 ± 0.005	0.347 ± 0.005	2.66	0.11	0.01	0.92
		C	0.355 ± 0.005	0.353 ± 0.005				
$C_{UV}$	E	0.107 ± 0.008	0.133 ± 0.007	<i>16.43<sup>h</sup></i>	0.0004	2.06 <sup>i</sup>	0.16	
	C	0.113 ± 0.007	0.147 ± 0.007					
caudal fin	$G_b$	E	8.058 ± 1.001	7.814 ± 0.936	2.12	0.16	4.90	0.04
		C	11.309 ± 0.936	8.781 ± 0.936				
	$C_R$	E	0.419 ± 0.004	0.407 ± 0.004	<i>4.42<sup>j</sup></i>	0.046	0.10 <sup>k</sup>	0.75
		C	0.413 ± 0.004	0.410 ± 0.004				
	$C_Y$	E	0.406 ± 0.002	0.406 ± 0.002	0.57	0.46	7.42	0.01
		C	0.412 ± 0.002	0.412 ± 0.002				
$C_{UV}$	E	0.035 ± 0.002	0.038 ± 0.002	3.03	0.09	2.09	0.16	
	C	0.032 ± 0.002	0.036 ± 0.002					
sexually dimorphic fins			exposed	control	$F$	d.f.	$p$	
dorsal	$G_b$		7.14 ± 0.767	7.85 ± 0.715	0.56	1,10.5	0.470	
			0.42 ± 0.006	0.43 ± 0.005	2.11	1,9.4	0.178	
	$C_Y$	C > E <sup>l</sup>	0.40 ± 0.002	0.41 ± 0.002	<i>14.25</i>	1,10.3	0.003	
		E > C	0.04 ± 0.002	0.03 ± 0.001	<i>8.23</i>	1,10.3	0.012	
anal	$G_b$		8.24 ± 0.917	7.94 ± 0.855	0.08	1,10.6	0.780	
		C > E	0.42 ± 0.005	0.44 ± 0.003	<i>21.84</i>	1,9.5	0.001	
	$C_Y$	C > E	0.40 ± 0.002	0.41 ± 0.002	<i>5.62</i>	1,10.2	0.039	
			0.04 ± 0.002	0.03 ± 0.001	0.95	1,10.4	0.350	

<sup>a</sup> d.f. = 1,24.5. <sup>b</sup> d.f. = 1,24.4. <sup>c</sup> Sex × treatment,  $F_{1,24.5} = 3.21$ ,  $p = 0.086$ . <sup>d</sup> d.f. = 1,28.5. <sup>e</sup> d.f. = 1,24.1. <sup>f</sup> d.f. = 1,24.2. <sup>g</sup> d.f. = 1,24. <sup>h</sup> d.f. = 1,24.7. <sup>i</sup> d.f. = 1,23.9. <sup>j</sup> Direction of significant contrasts.

here ( $F_{1,24} = 3.21$ ,  $p$  (one-tailed) = 0.048). We conclude that embryonic exposure to MeP impairs courtship performance in adult life.

**(iii) Female preferences**

Exposed and control males received a similar number of visits from both types of female (exposed females' visits to exposed males,  $\bar{x} \pm$  s.e. = 19.9 ± 2.2; to control males,  $\bar{x} \pm$  s.e. = 24 ± 2.2; control females' visits to exposed males,  $\bar{x} \pm$  s.e. = 25.8 ± 2.2; to control males,  $\bar{x} \pm$  s.e. = 22.2 ± 2.2; male contrast,  $F_{1,28} = 0.02$ ,  $p = 0.89$ ; female contrast,  $F_{1,28} = 0.087$ ,  $p = 0.36$ ). Duration of visits, on the other hand, revealed discrimination against exposed males, which received shorter visits from the control females (313.6 ± 24.9 s) than their non-exposed half-siblings (323.5 ± 24.9 s), and also received shorter visits by the exposed females (258 ± 24.9 s) than the controls (356.6 ± 24.9 s); the difference between males being significant ( $F_{1,28} = 4.7$ ,  $p = 0.038$ ). There was no

difference between the two female groups ( $F_{1,28} = 0.2$ ,  $p = 0.66$ ), but exposed females appear to be somewhat more discriminating (male × female interaction,  $F_{1,28} = 3.2$ ,  $p = 0.086$ ). Exposed males also received fewer copulation attempts (the female moved next to the enclosed male and shared in the attempt to embrace) than control males ( $F_{1,28} = 4.74$ ,  $p = 0.038$ ). This again was unaffected by female origin ( $F_{1,28} = 0.027$ ,  $p = 0.87$ ).

**4. DISCUSSION**

**(a) Sample**

It is common for goodeid females to successfully avoid mating when confined with a single male, a condition in which normally no more than approximately 60% become pregnant (Macías García & Saborío 2004; González Zurrah & Macías García 2006), which is one reason why sexual selection is thought to be strong in this fish (Riechle *et al.* 2005). This determined the number of broods to be

Table 2. Comparisons of colour ( $\bar{x} \pm s.e.$ , rounded to two decimals) between amarillo fish exposed to MeP during gestation (E) and their half-sibling controls (C). (Aspects of chroma were defined as follows: spectral saturation,  $G_b = (R_{660} - R_{680})/B_{660}$ ; red chroma,  $G_R = R_{610-740}/R_{740-740}$ ; yellow chroma,  $G_Y = R_{500-630}/R_{740-740}$ ; UV chroma,  $G_{UV} = R_{340-400}/R_{740-740}$ ;  $R$  = reflectance (%) in the specified wavelength ( $\lambda$ ) and  $B_{\lambda}$  (mean brightness) =  $R_{340-740}/n_{\lambda}$ , where  $n_{\lambda}$  is the number of wavelength measured. Reflectance of female dorsal and anal fins was not measured. Significant contrasts are given in italics.)

structure	chroma	group			sex		treatment	
			males	females	$F_{1,27}$	$p$	$F_{1,27}$	$p$
operculum	$G_b$	E	1.804 ± 0.100	1.650 ± 0.095	12.82 <sup>a</sup>	0.002	15.48	0.001 <sup>b,c</sup>
		C	2.292 ± 0.095	1.833 ± 0.095				
	$G_R$	E	0.337 ± 0.016	0.293 ± 0.015	17.95 <sup>d</sup>	0.0001	0.24 <sup>e</sup>	0.63
		C	0.341 ± 0.015	0.277 ± 0.015				
	$G_Y$	E	0.396 ± 0.008	0.395 ± 0.008	0.22	0.65	6.70	0.02
		C	0.418 ± 0.008	0.412 ± 0.008				
$G_{UV}$	E	0.095 ± 0.005	0.103 ± 0.005	8.17	0.008	1.16	0.29	
	C	0.083 ± 0.005	0.104 ± 0.005					
flank	$G_b$	E	1.872 ± 0.169	1.364 ± 0.158	6.18	0.019	0.00	0.95
		C	1.754 ± 0.158	1.461 ± 0.158				
	$G_R$	E	0.371 ± 0.013	0.322 ± 0.013	19.78 <sup>f</sup>	0.0002	0.37 <sup>g</sup>	0.55
		C	0.364 ± 0.013	0.316 ± 0.013				
	$G_Y$	E	0.360 ± 0.005	0.347 ± 0.005	2.66	0.11	0.01	0.92
		C	0.355 ± 0.000	0.353 ± 0.005				
$G_{UV}$	E	0.107 ± 0.008	0.133 ± 0.007	16.43 <sup>h</sup>	0.0004	2.00 <sup>i</sup>	0.16	
	C	0.113 ± 0.007	0.147 ± 0.007					
caudal fin	$G_b$	E	8.058 ± 1.001	7.814 ± 0.936	2.12	0.16	4.90	0.04
		C	11.309 ± 0.936	8.781 ± 0.936				
	$G_R$	E	0.419 ± 0.004	0.407 ± 0.004	4.42 <sup>a</sup>	0.046	0.10 <sup>j</sup>	0.75
		C	0.413 ± 0.004	0.410 ± 0.004				
	$G_Y$	E	0.406 ± 0.002	0.406 ± 0.002	0.57	0.46	7.42	0.01
		C	0.412 ± 0.002	0.412 ± 0.002				
$G_{UV}$	E	0.035 ± 0.002	0.038 ± 0.002	3.03	0.09	2.09	0.16	
	C	0.032 ± 0.002	0.036 ± 0.002					
sexually dimorphic fins			exposed	control	$F$	d.f.	$p$	
dorsal	$G_b$		7.14 ± 0.767	7.85 ± 0.715	0.56	1,10.5	0.470	
			0.42 ± 0.006	0.43 ± 0.005	2.11	1,9.4	0.178	
	$G_Y$	C > E <sup>k</sup>	0.40 ± 0.002	0.41 ± 0.002	14.25	1,10.3	0.003	
		E > C	0.04 ± 0.002	0.03 ± 0.001	9.23	1,10.3	0.012	
anal	$G_b$		8.24 ± 0.917	7.94 ± 0.855	0.08	1,10.6	0.780	
		C > E	0.42 ± 0.005	0.44 ± 0.003	21.84	1,9.5	0.001	
	$G_Y$	C > E	0.40 ± 0.002	0.41 ± 0.002	5.62	1,10.2	0.039	
			0.04 ± 0.002	0.03 ± 0.001	0.95	1,10.4	0.350	

<sup>a</sup> d.f. = 1,24.5. <sup>b</sup> d.f. = 1,24.4. <sup>c</sup> Sex × treatment,  $F_{1,24.4} = 3.21, p = 0.086$ . <sup>d</sup> d.f. = 1,24.5. <sup>e</sup> d.f. = 1,24.1. <sup>f</sup> d.f. = 1,24.2. <sup>g</sup> d.f. = 1,24. <sup>h</sup> d.f. = 1,24.7. <sup>i</sup> d.f. = 1,23.8. <sup>j</sup> Direction of significant contrast.

here ( $F_{1,14} = 3.21, p$  (one-tailed) = 0.048). We conclude that embryonic exposure to MeP impairs courtship performance in adult life.

**(ii) Female preferences**

Exposed and control males received a similar number of visits from both types of female (exposed females' visits to exposed males,  $\bar{x} \pm s.e. = 19.9 \pm 2.2$ ; to control males,  $\bar{x} \pm s.e. = 24 \pm 2.2$ ; control females' visits to exposed males,  $\bar{x} \pm s.e. = 25.8 \pm 2.2$ ; to control males,  $\bar{x} \pm s.e. = 22.2 \pm 2.2$ ; male contrast,  $F_{1,28} = 0.02, p = 0.89$ ; female contrast,  $F_{1,28} = 0.087, p = 0.36$ ). Duration of visits, on the other hand, revealed discrimination against exposed males, which received shorter visits from the control females (313.6 ± 24.9 s) than their non-exposed half-siblings (323.5 ± 24.9 s), and also received shorter visits by the exposed females (258 ± 24.9 s) than the controls (356.6 ± 24.9 s); the difference between males being significant ( $F_{1,28} = 4.7, p = 0.038$ ). There was no

difference between the two female groups ( $F_{1,28} = 0.2, p = 0.66$ ), but exposed females appear to be somewhat more discriminating (male × female interaction,  $F_{1,28} = 3.2, p = 0.086$ ). Exposed males also received fewer copulation attempts (the female moved next to the enclosed male and shared in the attempt to embrace) than control males ( $F_{1,28} = 4.74, p = 0.038$ ). This again was unaffected by female origin ( $F_{1,28} = 0.027, p = 0.87$ ).

**4. DISCUSSION**

**(a) Sample**

It is common for goodeid females to successfully avoid mating when confined with a single male, a condition in which normally no more than approximately 60% become pregnant (Macías García & Sabero 2004; González Zuerth & Macías García 2006), which is one reason why sexual selection is thought to be strong in this fish (Ritchie *et al.* 2005). This determined the number of broods to be

used in our experiments, whereas the number of fish was determined by mortality in the exposed brood. This might potentially bias our results in a conservative direction, since presumably only the best fish would have survived and developed seemingly normal phenotypes after exposure to MeP during their early development, superior exposed fish may thus obscure the hypothesized effect. As we saw this was not the case.

#### (b) Morphology

From the PCA, it may appear that the size differences between exposed and control fish were very large, raising the possibility that exposed fish were abnormal, teratological cases (figure 1). In fact, the magnitude of the difference in standard length between exposed and control fish was small (approx. 1–3 mm;  $\pm$  s.e.; control females  $32.0 \pm 0.4$  mm, exposed females  $31.4 \pm 2.0$  mm, control males  $27.9 \pm 1.3$  mm and exposed males  $25.3 \pm 0.6$  mm), and the males' size was within the lower quartile of that reached by laboratory-born individuals measured when they were twice as old (at the age of six months; Macías García *et al.* 1998). In viviparous fishes (including the amarillo; Macías García & Saborío 2004), fecundity is a function of size, thus the reduction in female size due to embryonic exposure to MeP may have negative fitness consequences, although probably not very large given the rather small effect size.

Males exposed to MeP during gestation grew smaller, but also developed smaller ornaments. The differential effect by sex was evident only on the extent of the sexually dimorphic dorsal and anal fins, and the differences in median fin size between paternal half-sibs were proportional to the attractiveness of the father. This means that the final magnitude of these ornaments is determined by the paternal contribution as well as by the conditions experienced during development. Therefore, the sexually dimorphic dorsal and anal fins of *G. sushinadani* are ornaments that reflect the past condition of the bearer and may thus be used in adaptive mate choice by females (Andersson 1982; Bonduriansky 2007; see §4c).

#### (c) Colour

This fish is known as amarillo, which is Spanish for yellow, owing to the colour of the males' median fins, thus we expected colour differences between the sexes but also between the treatments. There were in fact several colour differences between the sexes and between exposed and control fish. Most notably, yellow chroma saturation was higher in control fish in four of the five areas measured, including the sexually dimorphic fins whose yellow colour in the males is a sexually selected trait (Macías García 1991). It is unlikely that any traces of MeP remained in the adult fish when colour (presumably carotenoids) was being deposited on the fins. It is thus also unlikely that the low yellow chroma saturation of exposed fish is the result of carotenoids being used for the removal of free radicals produced during the detoxification of MeP (Kremsky 2001). Instead, it appears that the insecticide caused some long-lasting damage to the physiology of the embryos, and that some of those effects persist into adulthood, including a reduced capability to process/deposit ornamental carotenoids or to combat oxidative stress: in fact, we know that exposure to MeP can lead to

permanent damage to the nervous system, as well as to the liver (see a review of effects by García *et al.* 2003). If any such indirect process can cause a reduction in the level of signalling, this raises the possibility that carotenoid coloration may be used by animals to reflect past, and not only current, condition; a possibility that deserves future investigation.

There were also differences in UV chroma saturation between exposed and control males (dorsal fins), and between the sexes (operculum and flank). In both cases, the relevant structures had higher spectral or yellow chromatic saturation in fish with lower UV chroma. It is thus possible that UV reflectance is structural, and becomes increasingly evident when pigments (which confer chromatic saturation) such as carotenoids are scarce. If any such mechanism is at work, it should imply that UV marks are produced cheaply or that the cost of producing them is different from that involved in producing equivalent yellow marks. This may suggest that the UV-based female mating preference in the amarillo is not related to quality assessment. Because the main predators of *G. sushinadani*, the snakes of the genus *Thamnophis*, can perceive UV light (Sillman *et al.* 1997), this relative preponderance of UV markings in experimental fish cannot be interpreted as a mechanism used by weak or vulnerable fish to exploit a private communication channel (e.g. Cummings *et al.* 2003).

#### (d) Behaviour

##### (i) Courtship performance

Male–female interactions in the amarillo normally follow a pattern in which the male approaches the female and raises its dorsal and anal fins (fin display), then remains rather static for a few seconds. This can lead to escalated aggression or escalated courtship (Valero *et al.* 2005), and appears to be a relatively inexpensive behaviour. The propensity to escalate into the more energetic flapping or figure-of-eight dance varies between populations (González Zearh & Macías García 2006), and fish not escalating tend to prolong their interactions for much longer than fish which escalate (C. Berca, C. Domínguez, J. Núñez-Farfán & C. Macías García 1998, unpublished data). Here we found that prenatal exposure to MeP produced differences in courtship style between paternal half-sibs as notorious as those found between populations of the amarillo. Compared with the controls, exposed fish had a more parsimonious courtship style, only rarely performing the seemingly more energetic dances that characterize courtship escalation in this species. This was the case even when experimental fish also had smaller ornamental fins than controls, a trait which can hamper swimming performance (Ryan 1988; Nicolletto 1991). Subdued courtship may reflect a generally depressed condition due to metabolic deficiency, but may also betray permanent damage to the central nervous system: both may have similar fitness consequences and further work should aim at assessing the pathway between prenatal exposure to MeP and adult courtship behaviour.

##### (ii) Female preference

Apart from reduced survival, the most damaging consequence of a pesticide must be its capability to reduce reproductive output, through compromising the production

- Ryan, M. J. & Keddy-Hector, A. 1992 Directional patterns of female mate choice and the role of sensory biases. *Am. Nat.* **139**, S4–S35. (doi:10.1086/285303)
- Sillman, A. J., Gavardovski, V. I., Rohlich, P., Southard, J. A. & Loew, E. R. 1997 The photoreceptors and visual pigments of the garter snake (*Thamnophis sirtalis*): a microspectrophotometric, scanning electron microscopic and immunocytochemical study. *J. Comp. Physiol. A* **181**, 89–101. (doi:10.1007/s003590050096)
- Valeo, A., Hudson, R., Lama, E. A. & Macías García, C. 2005 A cost worth paying: energetically expensive interactions with males protect females from intrasexual aggression. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **59**, 262–269. (doi:10.1007/s00265-005-0033-8)
- Wilson, A. J., Pemberton, J. M., Pilkington, J. G., Coltman, D. W., Møller, D. V., Clutton-Brock, T. H. & Kraak, L. E. B. 2006 Environmental coupling of selection and heritability limits evolution. *PLoS Biol.* **4**, 1270–1275. (doi:10.1371/journal.pbio.0040216)
- Zahavi, A. 1975 Mate selection—a selection for a handicap. *J. Theor. Biol.* **53**, 205–214. (doi:10.1016/0022-5193(75)90111-3)

## CAPÍTULO VI

### DISCUSIÓN GENERAL



## CAPÍTULO VI

### DISCUSIÓN GENERAL

Se sabe muy poco sobre los efectos de los compuestos antropogénicos en los procesos de selección sexual (Jones & Reynolds 1997). La evidencia de que el metil paratión (MeP) se bioacumula en el pez amarillo *Girardinichthys multiradiatus* (De La Vega Salazar et al., 1997) permitió diseñar una investigación para evaluar los efectos de este contaminante en la expresión de ornamentos y conductas reproductivas. Un aspecto novedoso de este estudio fue determinar si los efectos del MeP producidos durante el desarrollo embrionario pueden repercutir en la vida adulta, no sólo en términos de supervivencia, sino en términos reproductivos a través de los efectos sobre la expresión de caracteres sexuales secundarios.

El metil paratión al igual que otros plaguicidas organofosforados y carbamatos es un compuesto neurotóxico que actúa inhibiendo la actividad de la acetilcolinesterasa. En peces y en general en vertebrados se han documentado ampliamente los efectos tóxicos de este plaguicida (EPA 1999; García et al., 2003; Capítulo I). Los resultados que obtuve en este estudio coincidieron con el tipo de efectos que se espera de la exposición crónica de peces a MeP (Capítulo II). La exposición a 0.165 µg/g fue letal para *G. multiradiatus*. Los peces perdieron peso al exponerse a una concentración de 0.001 µg/g y su crecimiento fue afectado a concentraciones de 0.008 a 0.04 µg/g. Además, el MeP se acumuló en *G. multiradiatus* de manera dosis-dependiente y los factores de bioacumulación mostraron que la relación entre la acumulación del plaguicida en los peces y la concentración a la que estuvieron expuestos estuvo dentro del rango reportado por De La Vega Salazar et al. (1997). Lo anterior sugiere por lo tanto que el experimento reprodujo razonablemente concentraciones similares a las que los peces están expuestos en la naturaleza.

Una característica biológica importante de *G. multiradiatus* es su reproducción vivípara; los embriones dependen de los nutrientes que aporta la madre durante la gestación (Schindler 2005). Este tipo de reproducción es poco común en peces teleósteos, por tal motivo, la pregunta a contestar fue sí la exposición a MeP durante el

desarrollo embrionario podría imponer costos metabólicos tales que limiten la cantidad de recursos que los machos adultos pueden usar para producir, mantener y exhibir sus ornamentos. Además, De La Vega Salazar et al. (1997) habían sugerido que este plaguicida podría actuar sobre la viabilidad de los embriones porque éstos acumulan más que los organismos adultos. Sin embargo, previamente a este trabajo se desconocían los efectos tóxicos del MeP en *G. multiradiatus*. En consecuencia, uno de los objetivos de la tesis fue determinar los efectos del MeP en el desarrollo y reproducción del pez amarillo (Capítulo II). Encontré que no hubo efectos en la supervivencia y el embarazo de hembras adultas expuestas a 0.005, 0.01 y 0.1 µg/g MeP. Sin embargo, las concentraciones por debajo de 0.1 µg/g indujeron malformaciones en los embriones y a 0.01 y 0.1 µg/g la supervivencia de las camadas a la edad adulta disminuyó significativamente. Los resultados anteriores sugieren que las poblaciones expuestas a MeP en la naturaleza podrían estar enfrentando riesgos por la reducción en el reclutamiento de nuevos individuos. De ocurrir lo anterior, el número de individuos a lo largo de las generaciones disminuiría de tal manera que los procesos de extinción local podrían acelerarse, ya que la pérdida de individuos en las poblaciones expuestas, en principio, provocaría la reducción en la variabilidad genética (Maltby et al., 2001). Además, la mortalidad diferencial de los individuos en las poblaciones expuestas podría repercutir por un lado en la reducción de la proporción operacional de sexos (individuos disponibles para la reproducción; Osorno et al., 2003) y por el otro en la selección de individuos portadores de alelos resistentes (e.g. potencial de glutatión-redox-hepático; Peña-Llopis et al., 2003) que con el tiempo generarían poblaciones tolerantes a los efectos tóxicos del MeP o a otros contaminantes. Lo anterior sin duda plantea la necesidad de estudiar si en *G. multiradiatus* existen alelos resistentes a MeP y que tan intensa debería ser la selección para promover tales adaptaciones.

Entre las diversas preguntas que surgieron de los resultados anteriores, una de ellas fue si este plaguicida realmente representa un riesgo para las poblaciones de *G. multiradiatus*. En el estudio de campo que realicé en 2005 durante la estación de secas (Capítulo II), registré concentraciones de MeP en 2 de 7 cuerpos de agua donde habita *G. multiradiatus*, es decir, en el 28.5% de las poblaciones de esta especie. El MeP fue detectado a altas concentraciones en las presas en comparación con los reportes de

éste en otros tipos de cuerpos de agua (ver Apéndice 1). Este resultado es interesante porque de acuerdo con Lindell (2004), el flujo de agua en las presas y lagos es bajo por lo que la dinámica en términos fisicoquímicos es estable, lo que aumenta la vida media de compuestos químicos en la columna de agua y en los sedimentos. Además, en México es notoria la actividad agrícola en las márgenes de las presas debido a que los agricultores aprovechan la disponibilidad de agua para mantener sus cultivos a lo largo del año. Como consecuencia de la intensa agricultura, las descargas (o escurrimientos) de los agroquímicos como el MeP hacia los cuerpos de agua podrían ser mayores en las presas que en cualquier otro tipo de ambiente acuático. Con base en los datos de este estudio, es muy probable que las poblaciones de *G. multiradiatus* confinadas en las presas sean más vulnerables a contaminantes agroquímicos que aquellas que se encuentran en ríos o manantiales.

Otra pregunta que surgió con los resultados del capítulo II tiene que ver con los mecanismos que subyacen a los efectos teratogénicos y a la reducción en la supervivencia de los peces expuestos durante el desarrollo embrionario, los cuales podrían estar relacionados con las características genéticas, la capacidad metabólica y fisiológica durante el desarrollo y en las primeras horas de vida postnatal. Recientemente, Choudhary et al. (2003), Cook et al. (2005) y Johri et al. (2006) hicieron notar que el metabolismo de los organismos en estados tempranos de desarrollo es deficiente para eliminar compuestos tóxicos. Para determinar si esto podría ocurrir en *G. multiradiatus* propuse cuantificar la inducción de la actividad de las monooxigenasas del citocromo P450 en los hígados de las hembras grávidas y en los embriones mediante una exposición a 0.1 µg MeP/g alimento por 96 h. Escogí este grupo de enzimas, en especial la isoforma CYP2B, porque se ha determinado que es la responsable de la desintoxicación y activación del MeP (Albores et al., 2001; Jacanović et al., 2001). Aunque en una prueba piloto había cuantificado la actividad catalítica de CYP2B a través de la transformación catalítica de PROD (pentoxyrresorufin-O-depentyasa), en el experimento que propuse no obtuve resultados positivos debido a que la concentración de proteína microsomal en las muestras fue muy baja. Sin embargo, considero que éste es un punto de partida de estudios futuros encaminados a cuantificar la actividad de P450 en el pez amarillo y resolver entre otras cosas por qué en los tejidos embrionarios la acumulación de MeP es mayor que en los adultos.

Por lo anterior, incluí el reporte del experimento (Capítulo III). Como complemento, realicé una investigación bibliográfica sobre las enzimas P450 reportadas en los peces teleósteos (Capítulo IV). En la revisión de 141 publicaciones encontré que de las 27 subfamilias de P450 que se han descrito para peces teleósteos en el 40% de éstas se desconocen las funciones endógenas. Por otro lado, hasta la fecha se ha detectado la actividad catalítica de las isoformas CYP1A, CYP1C, CYP2M, CYP3A38/40/65, CYP3C, CYP19 y CYP26 durante el desarrollo embrionario. Estas isoformas participan en procesos de organogénesis, determinación y diferenciación sexual, incluso la actividad catalítica de las isoformas de la subfamilia CYP19 favorece la expresión de conductas reproductivas (Capítulo IV). Además, de las 34 isoformas P450 descritas en peces sólo en la fase embrionaria se expresa el 35%, mientras que en el hígado de peces adultos se expresa el 79% (Capítulo IV). Actualmente, hay un mayor interés en la descripción de los mecanismos involucrados en la embriotoxicidad de contaminantes. En este sentido, *G. multiradiatus* tiene la ventaja de ser una especie vivípara, en donde la relación que se establece entre la madre y los embriones asemeja la reproducción de los mamíferos, y por su tamaño y fácil mantenimiento en cautiverio pudiera ser un modelo para evaluar los efectos de contaminantes en el desarrollo embrionario. Lo anterior siempre y cuando no comprometa la conservación de la especie en la naturaleza.

Los caracteres sexuales secundarios en las especies dimórficas y conductas de cortejo (expresados típicamente por los machos) permiten generar la competencia por pareja (Darwin 1871). Una posible razón por la que los ornamentos evolucionan es que al imponer costos en los organismos portadores (Kotiaho 2001) pueden reflejar la calidad (o condición) de los individuos y por tanto la selección podría actuar por mecanismos de preferencia por el carácter (revisión de Andersson & Simmons 2006). En *G. multiradiatus* los atributos sexuales en los machos están exacerbados en comparación con sus especies hermanas (Macías Garcia 1994). Este trabajo de tesis se planteó bajo el supuesto de que los factores de estrés como la contaminación pueden incrementar los costos de producir, exhibir y mantener los atributos sexuales en el pez amarillo. Debido a las restricciones en cuanto al diseño experimental, el tamaño de muestra para el experimento fue bajo, pero suficiente para obtener resultados con los cuales contestar la pregunta central de este estudio. Los datos del capítulo V

mostraron que los descendientes (hembras y machos) de las hembras grávidas expuestas a 0.005 µg/g alcanzaron tallas menores a la edad reproductiva en comparación con sus medios hermanos controles, lo que muestra que el MeP produjo un efecto en el crecimiento de los organismos que podría estar relacionado con posibles efectos en la glándula tiroides (Yadav & Singh 1987; Brown et al., 2004). Además, el efecto sobre las aletas fue marcado en los machos (sexo que presenta el ornamento), lo que indica que el rasgo sexualmente seleccionado de los machos fue afectado por la exposición a MeP y por tanto este resultado supone que la producción del ornamento es costosa. Al estimar la heredabilidad ( $h^2$ ) del ornamento (e.i. aletas ornamentadas) entre los machos descendientes (expuestos y controles) y sus padres encontré que la pendiente de la regresión en el grupo control demuestra que este atributo está ligado al sexo ( $h^2 = 2m = 1.13 \pm 0.096$ ). Sin embargo, este efecto se pierde en el grupo de medios hermanos expuestos a MeP, lo que refuerza la idea de que el ornamento es probablemente un indicador de la condición pasada de los individuos (Capítulo V).

En cuanto a la coloración fue evidente que hembras y machos difieren en la intensidad del color medido como índices de saturación del croma total ( $C_h$ ) y croma amarillo ( $C_Y$ ), rojo ( $C_R$ ) y ultravioleta ( $C_{UV}$ ; Capítulo V). Las aletas ornamentadas de los machos expuestos mostraron que los índices de color en las longitudes de onda de los carotenos son menores que en sus medios hermanos controles. De igual modo, los índices de color corporal en las hembras fueron afectados. Los resultados anteriores muestran que la exposición a MeP durante el desarrollo embrionario produjo efectos en órganos involucrados en la síntesis o absorción de pigmentos que fueron evidentes hasta la edad adulta cuando los ornamentos (aletas dimórficas) se expresan. En general los resultados antes descritos contribuyen con un aspecto de los efectos de contaminantes ambientales como el MeP en peces ornamentados que no se había documentado hasta ahora. Sólo Monteiro et al. (2006) habían reportado, de manera anecdótica, la baja intensidad del color amarillo en el *Brycon cephalus* expuesto a 2 µg/ml de MeP por 96 horas en agua, pero estos autores no discutieron sobre cuáles podrían ser las implicaciones de esta observación o si este efecto podría tener algún significado en la condición de los peces.

En cuanto a los resultados de las pruebas conductuales, éstos mostraron que los machos expuestos a MeP desplegaron conductas de cortejo energéticamente menos demandantes y que las hembras sesgaron su preferencia hacia los machos control al incrementar los intentos de cópulas, siendo incluso las hembras expuestas más selectivas (Capítulo V). Lo anterior indica por un lado que la exposición a MeP causó efectos (daño en hígado o sistema neuromotor) que limitaron los despliegues de conductas de cortejo activas en los machos y por el otro que el MeP no repercutió en la preferencia de las hembras. En consecuencia los resultados del capítulo V muestran dos aspectos importantes: por un lado, los machos expuestos a MeP están en franca desventaja con respecto a sus medios hermanos controles porque éstos son menos preferidos por las hembras, y por el otro, aunque las hembras expuestas son más selectivas, éstas al presentar tallas menores pudieran ser menos fecundas o menos atractivas para los machos debido a que en peces y en particular en *G. multiradiatus* la fecundidad correlaciona con el tamaño (Magurran & Macías Garcia 2000; Macías Garcia & Saborío 2004). La fecundidad o atractividad de este tipo de hembras expuestas a MeP es un aspecto que deberá tomarse en cuenta en subsecuentes estudios.

El tamaño y el color, en ciertas especies son atributos sexualmente seleccionados que pueden reflejar la condición de los individuos (Bounduriansky 2007). De acuerdo con los resultados antes descritos, la condición (o calidad) de los peces expuestos a MeP fue afectada y ésta se reflejó en la expresión de los ornamentos y en el despliegue de conductas de cortejo. Por tanto, este estudio apoya fuertemente una de las predicciones clave en el modelo de *hándicap*; la expresión de ornamentos sexuales es dependiente de la condición (Pomiankowski & Iwasa 1998; Iwasa & Pomiankowski 1999). Además, este trabajo muestra que la exposición subletal a MeP produce machos poco atractivos y potencialmente puede reducir la proporción operacional de sexos. Lo anterior pudiera tener implicaciones en el tamaño efectivo de las poblaciones (número de individuos que realmente se reproducen), y en consecuencia afectar la viabilidad de las poblaciones expuestas, acelerando así los procesos de extinción. Lo anterior es un punto crítico considerando que ciertos goodeidos (e.g. *Ameba splendens* y *Zoogoneticus tequila*) se encuentran en un serio peligro de extinción (Bailey et al., 2007).

Con los resultados de este estudio y con la evidencia de los efectos tóxicos del MeP en otras especies de peces a continuación presento un diagrama en donde integro los posibles mecanismos que subyacen los efectos del MeP sobre la expresión de los atributos sexuales y las conductas reproductivas (Fig. VI.1). La exposición a MeP durante el desarrollo probablemente produjo alteraciones en el funcionamiento de órganos como la glándula tiroidea, el hígado, el intestino (Yadav et al., 1987; Ghosh et al., 1989; Fanta et al., 2003; Brown et al., 2004) e incluso en la trofotenia (efecto que deberá ser probado). Estos daños en el funcionamiento de órganos blanco pudieron generarse por daño oxidativo (Drögue 2001; Monteiro et al., 2006) o por la intercalación de MeP entre los grupos polares de los fosfolípidos en las membranas celulares (Videria et al., 2001). Los efectos del MeP durante el desarrollo embrionario pudieron trascender hasta la edad reproductiva y provocar un funcionamiento deficiente en la asimilación de nutrientes que repercutió en el crecimiento de los organismos y en particular en las aletas ornamentadas de los machos. De igual modo, a través de la alteración en la función hepática (Castillo et al., 2002; Fanta et al., 2003; Chon et al., 2005) se puede explicar por qué los machos expuestos tienden a desplegar conductas de cortejo energéticamente menos demandantes y por qué tanto hembras como machos presentaron índices menores de saturación de color. Los pigmentos lipoproteicos (e.g. carotenoides ; Bertrand et al., 2006; McGraw 2006) se obtienen a través de la dieta y requieren del metabolismo para ser transformados como factores antioxidantes o para ser enviados a los sitios de almacenamiento (e.g. piel, gónadas; Grether et al., 2008), en donde cumplen, en ciertas estructuras, funciones en la expresión de ornamentos. Los bajos índices de saturación de color en los ornamentos de los machos y en las estructuras corporales de las hembras expuestas podrían estar indicando deficiencias metabólicas como una consecuencia de la exposición a MeP durante la ontogénesis. En el caso de las hembras expuestas, en éstas probablemente se desencadenaron en la edad adulta mecanismos de compensación conductual que explicarían por qué fueron más selectivas hacia machos controles. Este resultado en particular coincide con el trabajo de Grether et al. (2005), quienes observaron que las hembras de guppies (*Poecilia reticulata*) con dietas pobres en pigmentos carotenoides compensan sus deficiencias apareándose con macho cuyos ornamentos reflejan una dieta rica en carotenos o niveles altos de carotenoides. En conclusión, con este estudio

demuestro que los contaminantes como el metil paratión aún a concentraciones subletales producen efectos negativos en la reproducción de *G. multiradiatus*, lo que podría tener implicaciones negativas a nivel poblacional. Finalmente, es importante señalar que las poblaciones no se encuentran expuestas a contaminantes aislados en la naturaleza, sino que sobreviven en presencia de mezclas complejas de contaminantes que pueden tener efectos sinérgicos o antagónicos en los individuos en combinación con otros factores de estrés tanto naturales como antropogénicos.



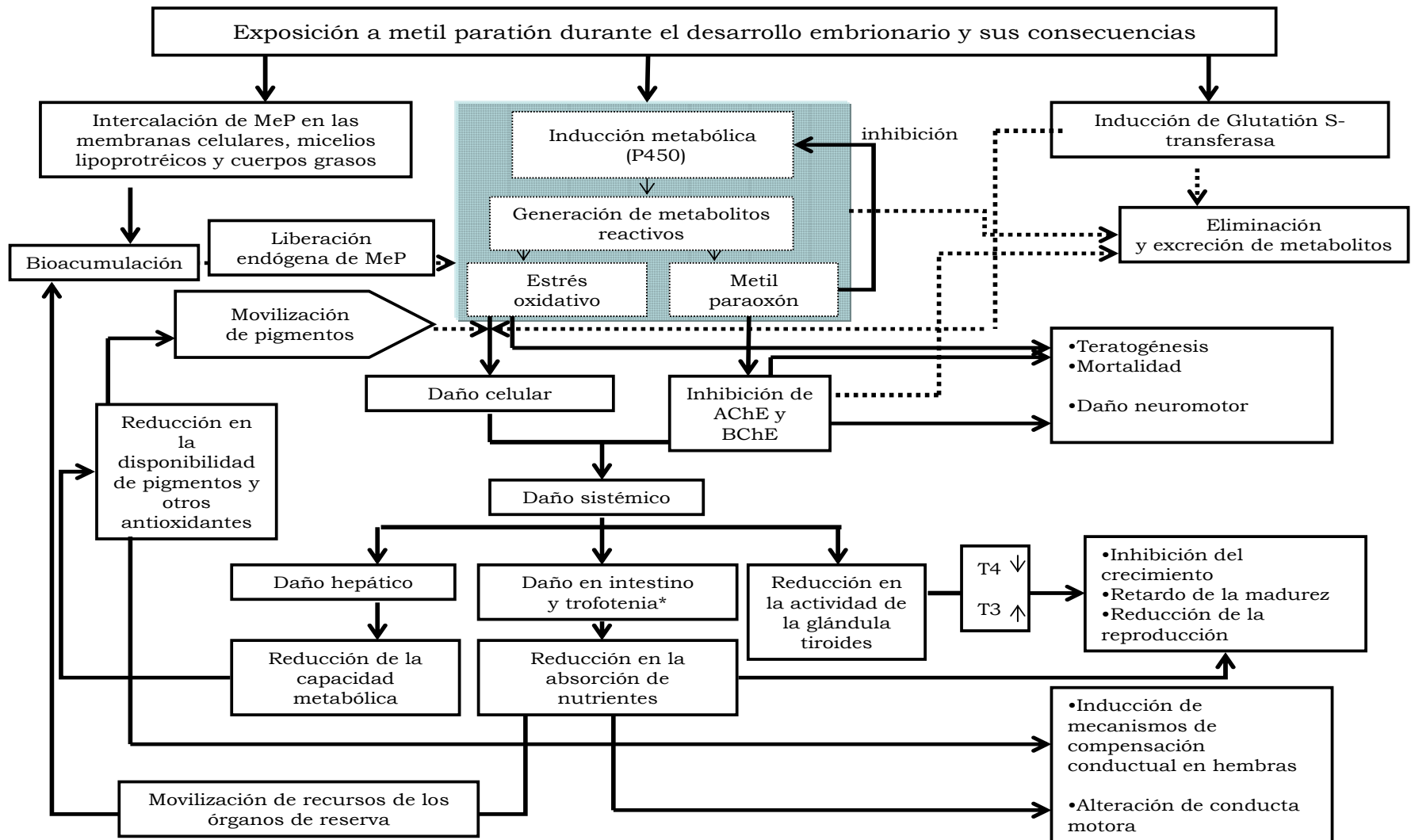


Figura VI.1. Integración de los posibles mecanismos involucrados en los efectos del metil paratión sobre el desempeño sexual de *G. multiradiatus*. Las líneas sólidas representan efectos tóxicos y las líneas punteadas procesos de desintoxicación o eliminación (referencias en el texto). (\*) Actualmente se desconocen los efectos del insecticida sobre el tejido trofoténico. Hormonas tiroideas (T<sub>4</sub>; T<sub>3</sub>).

## VI.1 Futuros trabajos

Estudios futuros deberán estar encaminados a evaluar las implicaciones de exposiciones continuas de contaminantes como MeP en poblaciones de *G. multiradiatus* tanto en cautiverio como en campo. De los resultados que se obtengan deberán tomarse medidas para reducir el riesgo en las poblaciones expuestas a contaminantes. Además, se deberá continuar con la evaluación de más compuestos químicos para validar a *G. multiradiatus* como un posible biomonitor local y a la coloración de los ornamentos como un posible biomarcador no invasivo de exposición. Lo anterior sería de utilidad en los programas de monitoreo ambiental y de remediación en zonas donde se distribuye esta especie. Además, se deberá continuar con los estudios que determinen cuáles son los factores que participan en las diferencias metabólicas entre organismos en estados tempranos de desarrollo y adultos. Finalmente, se deberá continuar con la determinación de los efectos de compuestos antropogénicos en los atributos sexuales y sus implicaciones sobre la adecuación de los organismos.

## VI.2 Referencias

- Albores A., Ortega-Mantilla G., Sierra-Santoyo A., Cebrián ME., Muñoz-Sánchez JL., Calderón-Salinas JV., Manno M. 2001. Cythochrome P450 2B (CYP2B)-mediated activation of methyl-parathion in rat brain extracts. *Toxicology Letters* 124:1-10.
- Andersson M., Simmons WL. 2006. Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 296-302.
- Bailey WN., Macías Garcia C., Ritchie GM. 2007. Beyond the point of no return? A comparison of genetic diversity in captive and wild populations of two nearly extinct species of Goodeid fish reveals that one is inbred in the wild. *Heredity* 2007: 1-8.
- Bertrand S., Faivre B., Sorci G. 2006. Do carotenoid-based sexual traits signal the availability of non-pigmentary antioxidants ? *The Journal of Experimental Biology* 209: 4414-4419.
- Bonduriansky R. 2007. The evolution of condition-dependent sexual dimorphism. *American Naturalist* 169: 9-19.

- Brown BS, Adams AB, Cyr GD, Geoffrey EJ. 2004. Contamination effects on the teleost fish thyroid. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:1680-1710.
- Castillo CG., Montante M., Dufour ML., Martinez M., Jimenez-Capdeville M. 2002. Behavioural effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats. *Neurotoxicology and Teratology* 24: 797-804.
- Chon TS., Chung N., Kwak SI., Kim SJ., Koh SC., Lee KS., Leem BJ., Cha YE. 2005. Movement behaviour of medaka (*Oryzias latipes*) in response to sublethal treatments of diazinon and cholinesterase activity in semi-natural conditions. *Environmental Monitoring and Assessment* 101: 1-21.
- Choudhary D., Jansson I., Schenkman BJ., Sarfarazi M., Stoilov I. 2003. Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414: 91-100.
- Cook W., Paradise JC., Lom B. 2005. The pesticide malathion reduces survival and growth in developing zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:1745-1750.
- Darwin C. 1871. The descent of man and selection in relation to sex. J Murray (Ed.), London.
- De la Vega Salazar MY., Tabche ML., Macías Garcia C. 1997. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in Ignacio Ramírez Dam in México. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38: 53-62.
- Drögue W. 2001. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiology Review* 82:47-95.
- EPA. 1999. Revised environmental fate and effects assessment for methyl parathion. EPA, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. Online. Available [http://www.epa.gov/pesticides/op/methyl\\_parathion/mpefed.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/op/methyl_parathion/mpefed.pdf). (Accessed 30 April 2007).
- Fanta E., Rios F., Romao S., Vianna AC., Freiburger S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicological and Environmental Safety* 54: 119-130.

- Garcia JS., Abu-Qare WA., Meeker-O'Connell AW., Borton JA., Abou-Donia BM. 2003. Methyl parathion: a review of health effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 6: 185-210.
- Ghosh P., Bhattacharya S., Bhattacharya S. 1989. Impact of non-lethal levels of Metacid-50 and carbaryl on thyroid function and cholinergic system of *Channa punctatus*. *Biomedical Environmental Science* 2: 92-97.
- Grether FG., Kolluru RG., Rodd HF., de la Cerda J., Shimazaki K. 2005. Carotenoid availability affects the development of a colour-based mate preference and the sensory bias to which it is genetically linked. *Proceedings of the Royal Society of London B* 272: 2181-2188.
- Grether FG., Kolluru RG., Lin K., Quiroz AM., Robertson G., Snyder JA. 2008. Maternal effects of carotenoid consumption in guppies (*Poecilia reticulata*). *Functional Ecology* 22: 294-302.
- Iwasa Y., Pomiankowski A. 1999. Good parent and good genes models of handicap evolution. *Journal Theoretical Biology* 200: 97-109.
- Jakanović M. 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166: 139-160.
- Johri A., Dhawan A., Singh LR., Parmar D. 2006. Effects of prenatal exposure of deltamethrin on the ontogeny of xenobiotic metabolizing cytochrome P450s in the brain and liver of offsprings. *Toxicology Applied Pharmacology* 214: 279-289.
- Jones JC., Reynolds JD. 1997. Effects of pollution on reproductive behaviour. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7: 463-491.
- Kotiaho S. 2001. Costs of sexual traits: a mismatch between theoretical considerations and empirical evidence. *Biology Review* 76: 365-367.
- Lindell T. 2004. Hydrographic characteristic. En: *Pollutant effects in freshwater applied limnology* 3ed. EB. Welch, JM. Jacoby, T. Lindell (Eds.), Spon Press. London, pp. 21-55.
- Macías Garcia C. 1994. Social behaviour and operational sex ratio in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Copeia* 4: 919-925.
- Magurran EA., Macías Garcia C. 2000. Sex differences in behavior as an indirect consequence of mating system. *Journal of Fish Biology* 57: 839-857.
- Macías Garcia C., Saborío E. 2004. Sperm competition in a viviparous fish. *Environmental Biology of Fish* 70: 211-217.

- Maltby L., Kedwards JT., Forbes EV., Grasman K., Kammenga EJ., Munns RWJr., Ringwood HA., Weis SJ., Wood NS. 2001. Linking individual-level responses and population-level consequences. En: Ecological Variability: Separating Natural from Anthropogenic Causes of Ecosystem Impairment. Donal J. Baird & G. Allen Burton, Jr., (Eds.), SETAC Press., p. 39.
- McGraw JK. 2006. Mechanics of carotenoid-based coloration. En: Bird Coloration: Mechanisms and Measurements. Geoffrey E. Hill & Kevin J. McGraw (Eds.), Harvard University Press., pp. 117-242.
- Monteiro AD., Alves de Almeida J., Rantin TF., Kalinin LA. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Bryeon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). Comparative Biochemistry and Physiology Part C 143:141-149.
- Osorno LJ, Torres R, Macías-García C. 2003. El papel del estudio de la conducta en la conservación de las aves. En: Conservación de Aves experiencias en México. H Gómez de Silva & A. Oliveras de Ita (Eds.), Consejo Internacional para la Preservación de las Aves, AC., CIPAMEX, México.
- Peña-Llopis S., Ferrand DM., Peña BJ. 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. Aquatic Toxicology 65: 337-360.
- Pomiankowski A., Iwasa Y. 1998. Runaway ornament diversity caused by Fisherian sexual selection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 5106-5111.
- Schindler J. 2005. Digestion of embryotrophic protein in Goodeid teleosts. En: Uribe CM, Grier JH (Eds.), Viviparous Fish. New Life Publications, Florida, pp. 266-267.
- Videria AR., Antunes-Madeira C., Lopes V., Madeira CMV. 2001. Changes induced by malathion, methyl parathion and parati6n on membrane lipid physicochemical properties correlate with their toxicity. Biochimica et Biophysica Acta 1511: 360-368.
- Yadav KA., Singh PT. 1987. Pesticide-induced impairment of thyroid physiology in the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. Environmental Pollution 43: 29-38.

## SECCIÓN DE APÉNDICES

## **APÉNDICE 1**

### USO DE PLAGUICIDAS EN LA CUENCA LERMA-CHAPALA

#### AI.1 Introducción

La cuenca Lerma-Chapala se encuentra en la zona centro de la República Mexicana, tiene una extensión de 53,591 km<sup>2</sup> y un gradiente altitudinal de los 4690 a los 1600 msnm. La cuenca esta dividida en tres regiones hidrológicas; Alto, Medio y Bajo Lerma (INE 2003). Estas regiones abarcan los estados de México, Querétaro, Guanajuato, Michoacán y Jalisco. Según el Compendio Nacional de la Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT 2004), la cuenca registró en 2000 una disponibilidad de agua de 39,479 hm<sup>3</sup>, de escurrimiento superficial virgen de 32,370 hm<sup>3</sup> y de recarga de los acuíferos de 7,109 hm<sup>3</sup>. Lerma-Chapala es una zona con alta riqueza de endemismos tanto de flora como de fauna (Arriaga et al., 2000). Al mismo tiempo, también es importante por la producción agrícola y pecuaria, y es la más densamente poblada del país, comprendiendo el 38% de la población y el 15 % de los municipios del país (INEGI 2003). Lo anterior produce en la cuenca una presión fuerte sobre sus recursos hídricos que ascienden a los 9,032Mm<sup>3</sup> anuales. De la cantidad de agua de la región Lerma-Chapala, el 73% se utiliza únicamente para la actividad agrícola, lo que representa poco más del 53% de la cobertura total de la cuenca (INEGI 2003; Tabla A1.1). Los cultivos que predominan son de riego y humedad, de temporal y plantación forestal. De éstos tres, el cultivo de temporal es el más común (INEGI 2003). Los principales cultivos son de maíz, sorgo, trigo y en menor medida, papa, alfalfa y arroz (<http://www.redagua-lsp.org.mx/esp01/cuenca/cuenca.htm>).

Como resultado de la precaria planeación en el desarrollo de los asentamientos humanos, los problemas políticos y de gobierno, la explotación de agua, la actividad industrial, la ganadería y la agricultura, en la cuenca se ha acelerado en los últimos 50 años el cambio de uso de suelo y con ello el deterioro ambiental (Caire 2004). Por ejemplo, entre 1976 y 2000 la cobertura de área boscosa cambió de 5,162.50 km<sup>2</sup> a 3,600.30 km<sup>2</sup>, lo que representó una tasa de cambio de -0.015 (INE 2003). De igual

modo, se produjo una reducción de de la cobertura de los cuerpos de agua (96.38 km<sup>2</sup>), debido a los proceso de desecación (INE 2003). Las coberturas que aumentaron fueron las zonas de cultivos y pastizales (INE 2003). Dado que en la actividad agrícola se usa una gran variedad de agroquímicos, el objetivo de este estudio fue hacer una revisión de los informes del gobierno en cuanto a los niveles de plaguicidas y su impacto en los cuerpos de agua de la cuenca Lerma-Chapala, principal zona de distribución del pez amarillo *Girardinichthys multiradiatus*.

## AI.2 Diagnóstico de la cuenca en relación con la calidad de agua

La Gerencia de Saneamiento y Calidad de Agua SGT de la Comisión Nacional de Agua (CNA) reportó en 2002 con base en la Demanda Química de Oxígeno (DQO<sub>5</sub>), que el 51.2% de las estaciones de monitoreo de la Cuenca Lerma-Santiago-Pacífico presentaron buena calidad de agua (rango: >20mg/l <100 mg/L DQO) y sólo el 1.2% de las estaciones se encontraban fuertemente contaminadas (rango: >1000 mg/L; INE 2003). El cuerpo de agua más contaminado en la cuenca según el reporte del Instituto Nacional de Ecología (2003) fue el Río Turbio con niveles de DQO en el rango de 250 a 500 mg/L. Por parte de la Gerencia Regional Lerma-Santiago-Pacífico, ésta determinó 69 cuerpos de agua en la región y los clasificó en aptos o no aptos para el abastecimiento público, recreación, vida acuática, industrial y agrícola. El diagnóstico mostró que para el abastecimiento público el 36% es apto, el 42% no es apto y en un 21% no hay datos, para la vida acuática el 39% es apto, el 39% no es apto, y del 21% no hay datos, y para uso industrial y agrícola el 72% es apto, el 7.2% no es apto y del 20% no hay datos (Tabla A1.2).

En el informe general de 1995 de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) se dictaminó que los agroquímicos son los principales causantes del deterioro de la calidad de agua del Lerma. Al analizar los datos que reportó INEGI (2004) en cuanto las hectáreas de cultivo y el uso de agroquímicos en el periodo comprendido de 1997 a 2001, se observa una correlación positiva ( $r^2=0.91$ ,  $t=1110$ ,  $P<0.05$ ) entre el incremento de campos de cultivo (tasa anual de 0.11) y de plaguicidas (tasa anual de 0.14; Fig.A1.1). Aunque se ha observado una disminución en la aplicación de fertilizantes nitrogenados y fosfatados entre 1997 y 2001, el uso de plaguicidas y en particular de insecticidas ha ido en aumento (Fig. A1.2; INEGI 2003). Por lo anterior, se



puede deducir que la cuenca enfrenta serios problemas ambientales a causa de la contaminación por agroquímicos, particularmente de plaguicidas, lo cual coincide con el informe general de CONABIO 1995.

### AI.3 Uso de plaguicidas en la cuenca

La incorporación de sólidos suspendidos en los cuerpos de agua por la erosión del suelo, los asentamientos humanos y los productos agroquímicos de los cultivos ha ido en aumento en la cuenca del Lerma (INE 2003). A finales de 1970 la cuenca recibía descargas de 7.5 millones de habitantes, de las que el 33.85% provenían de la industria de productos químicos y del 33.81% de los asentamientos humanos (Vizcaíno 1975). Actualmente la cuenca recibe la descarga de aguas residuales de las industrias químicas, petroquímicas, agroindustriales y de 20 millones de habitantes, por lo que el deterioro en la calidad de agua es evidente (Tabla AI.3). Los informes de SEMARNAT muestran que las bacterias, la materia orgánica (i.e. grasas, aceites, detergentes), mezclas de aguas industriales, metales pesados, sales orgánicas y diversos plaguicidas usados en cultivos de trigo, cebada, maíz, arroz, algodón, flores y plantas de ornato y tabaco son los contaminantes más comunes en la cuenca (<http://www.semarnat.gob.mx/regiones/chapala/problematika.shtml>). Sin embargo, los informes no especifican cuáles son los tipos de plaguicidas que se usan en la cuenca y cuáles son los riesgos ambientales que se corren. En México se cuenta con un listado de plaguicidas que están autorizados (CICLOPLAFEST 1998). De estos 68 se sabe que pueden causar cáncer en humanos, 21 alteran el desarrollo embrionario y causan daños reproductivos, 33 son disruptores endocrinos, 21 pueden debilitar el sistema inmune y 50 están relacionados con problemas de infertilidad masculina (RAPAM 2004). La Red de Investigadores del Agua de la Región Lerma-Chapala-Santiago ha informado que en el Medio y Bajo Lerma los contaminantes principales son los plaguicidas organoclorados. Entre los tramos más críticos por las concentraciones de plaguicidas se encuentran los cuerpos de agua de Merkazusa y La Piedad. Además, esta Red de Investigadores ha reportado que en los ríos Turbio, Guanajuato y Duero también se han detectado altos niveles de tóxicos, sin precisar cuáles son éstos. En las regiones de la cuenca que comprenden los estados de Querétaro y Guanajuato se han reportado altas

concentraciones de metales pesados como zinc y cadmio (SEMARNAT 2005). En el lago de Chapala también se han detectado altos niveles de organoclorados. Los datos muestran que el lago se encuentra altamente contaminado en un 51%, moderadamente contaminado en un 41% y sólo el 8% de agua superficial esta considerado como aceptable. De acuerdo con un informe de la Asociación Amigos del Lago A.C., en el lago de Chapala se detectaron concentraciones de DDT (de 100 a 350  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) y de Hexaclorohexano (de 500 a 3000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). En otros reportes se han mencionado altas concentraciones de fósforo y fosfatos en el lago de Chapala (Anda et al., 2001). Hansen & Afferden (2001) reportaron además la presencia de plaguicidas como el aldrin, dieldrin, heptaclor epóxico, hexaclorobenceno y lindano, así como DDT y sus metabolitos p,p'-DDE, p,p'-DDD en la Presa Solís, Salamanca, Río Turbio y La Piedad. Asimismo, hay datos de niveles de metales pesados en el lago de Chapala, en el río La Piedad y el río Guanajuato. En cuanto al monitoreo de plaguicidas en la cuenca destaca el seguimiento que se le ha dado a la presa Ignacio Ramírez en la región del Alto Lerma (Tabla A1.4). Además, Arellano-Aguilar & Macías Garcia (2008) reportaron concentraciones altas de metil paratión en las Presas Salazar y San Juanico del Estado de México (ver Capítulo II).

#### AI.4 Conclusión

En la cuenca del Lerma la urbanización, industrialización, construcción de presas y la agricultura han ocasionado la reducción en el flujo de agua y la contaminación por sustancias tóxicas, lo que afecta la calidad del agua y a sus ecosistemas (Bueno et al., 1996; Hansen & Arffenden 2001). México cuenta con 506 especies de peces continentales y de éstas el 32% son especies endémicas (Miller 2005), por lo que es alarmante que el mayor sistema hidrológico del país, la cuenca Lerma-Chapala, se encuentre amenazado por la degradación ambiental. Los informes muestran que la concentración de plaguicidas en la cuenca va en aumento y que a pesar de los esfuerzos para reducir la contaminación no se ha revertido esta tendencia, por lo que los efectos sobre los ecosistemas de la cuenca se van agravando. Pese a que algunos datos muestran que los niveles de plaguicidas en los cuerpos de agua están en niveles por debajo de los permitidos, se desconoce si estos niveles son un riesgo para las especies endémicas. Por otro lado, los inventarios de los plaguicidas que se utilizan en la zona son escasos o no se

han realizado por lo que se desconoce la situación y manejo de estas sustancias incluso a nivel nacional. Es importante elaborar el inventario de plaguicidas utilizados en la cuenca, así como determinar el modo y la frecuencia con que se aplican estos agroquímicos. También, se requiere de programas de monitoreo que determinen las concentraciones de los plaguicidas y sus efectos sobre la biota para alertar posibles riesgos sobre los ecosistemas y la salud humana.

#### A1.5 Referencias

- Anda J., Shear H., Maniak U., Riedel G. 2001. Phosphates in Lake Chapala, Mexico. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 6: 313-321.
- Arellano-Aguilar O., Macías García C. 2008. Effects of methyl parathion exposure on development and reproduction in the viviparous fish *Girardinichthys multiradiatus*. *Environmental Toxicology* (publicado en línea).
- Arriaga Cabrera L., Aguilar Sierra V., Alcocer Duran J. 2000 Aguas continentales y diversidad biológica de México. CONABIO, México.
- Asociación Amigos del Lago A.C. ([www.amigosdelago.org](http://www.amigosdelago.org)).
- Bueno J., Alexander H., Mazari M. Piñero D. 1996. Los residuos Peligrosos y su impacto en los ecosistemas. Cap.2. En: Los residuos Peligrosos de México. Editado por Octavio R., Ponciano R. y S. González. Programa Universitario del Medio Ambiente PUMA. México.
- Caire G. 2004. El manejo integral de cuencas en México: estudios y reflexiones para orientar la política ambiental. Helena Cotler (compilador), SEMARNAT-INE., p. 194.
- CICLOPLAFEST. 1998. Lista de plaguicidas autorizados en México. Semarnap, Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, Secretaría de Ganadería y Desarrollo Rural. México
- CNA. 2001. Comisión Nacional del Agua. Documento en línea: [www.cna.gob.mx](http://www.cna.gob.mx).
- CONABIO. 1995. Programa de Medio Ambiente 1995-2000. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, SEMARNAP, México.
- De la Vega Salazar MY., Tabche ML. Macías García C. 1997. Bioaccumulation of methyl parathion and its toxicology in several species of the freshwater community in

- Ignacio Ramirez dam in Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 38: 53-62.
- Favari L., López E., Martínez-Tabche L., Díaz-Pardo E. 2002. Effect of insecticides on plankton and fish of Ignacio Ramirez reservoir (Mexico): a biochemical and biomagnification study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 177-186.
- Gerencia Regional Lerma-Santiago Pacífico (2001). *Calidad del Agua*.
- Hansen MA., Van Arffenden M. 2001. Toxic Substances. En: *The Lerma-Chapala Watershed*. Hansen & Arffenden (Eds.), Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- INE. 2003. Diagnóstico biofísico y socioeconómico de la cuenca Lerma-Chapala. Instituto Nacional de Ecología, México.
- INEGI. 2003. Empleo de agroquímicos en los últimos seis años en la cuenca Lerma-Chapala (fertilizantes nitrogenados, fosfatados, insecticidas y plaguicidas). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática México.
- INEGI. 2004. Relación del número de hectáreas cultivadas y el uso de plaguicidas en el periodo (1997 – 2001). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México.
- Miller RR. 2005. *Freshwater fishes of México*. Chicago: The University of Chicago press.
- RAPAM. 2004. Daños crónicos a la salud provocados por los plaguicidas. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México.
- Red de Investigadores del Agua de la Región Lerma-Chapala-Santiago ([www.redagua.isp.org/esp01/esp01.htm](http://www.redagua.isp.org/esp01/esp01.htm)).
- SEMARNAT. 2004. Compendio Nacional. Capítulo Agua 4. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- SEMARNAT. 2005. Problemática de Chapala. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales documento en línea: <http://www.semarnat.gob.mx/regiones/chapala/problematika.shtml>
- Vizcaíno MF. 1975. *La contaminación en México*. Fondo de Cultura Económica. México.
- Walker HC., Hopkin PS., Sibly MR., Peakall DB. 1996. *Principles of ecotoxicology*. Taylor & Francis.

## FIGURAS

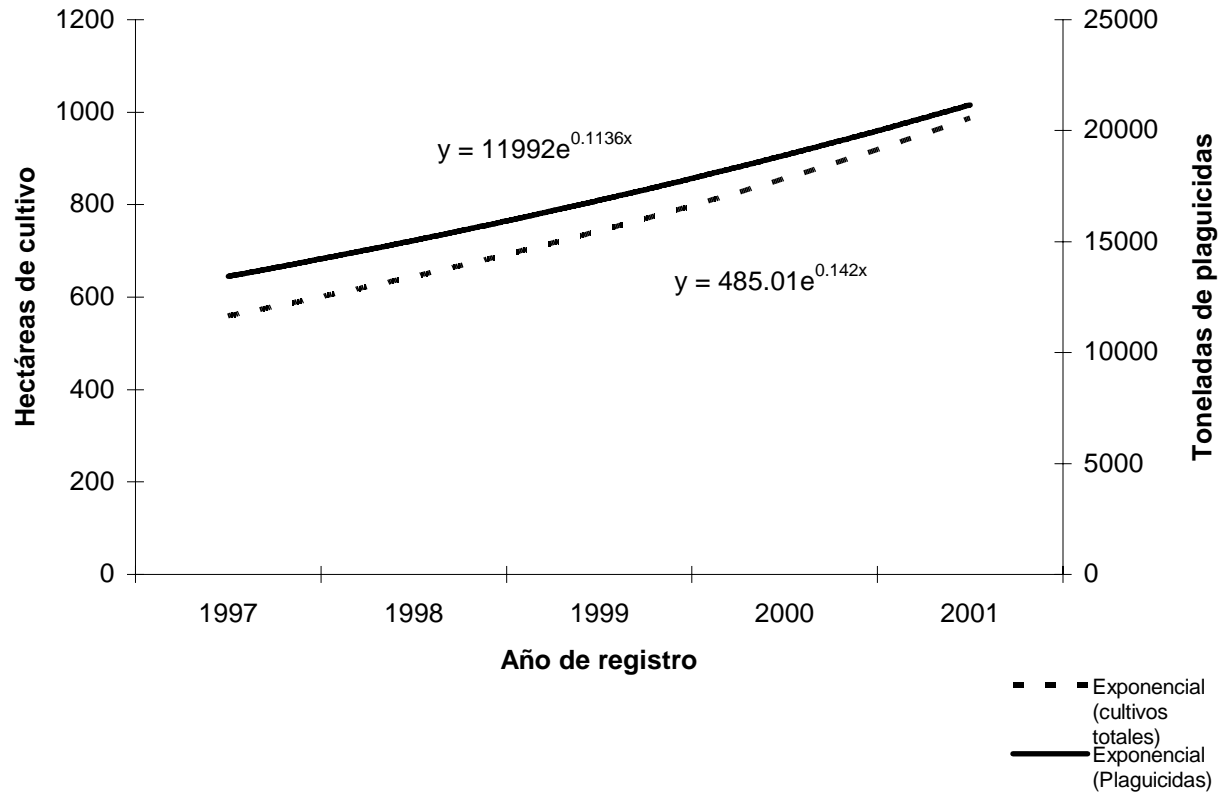


Figura A1.1. Incremento en las toneladas usadas de plaguicidas en relación al incremento de área de cultivo en el periodo de 1997 a 2001. Fuente: INEGI 2004.

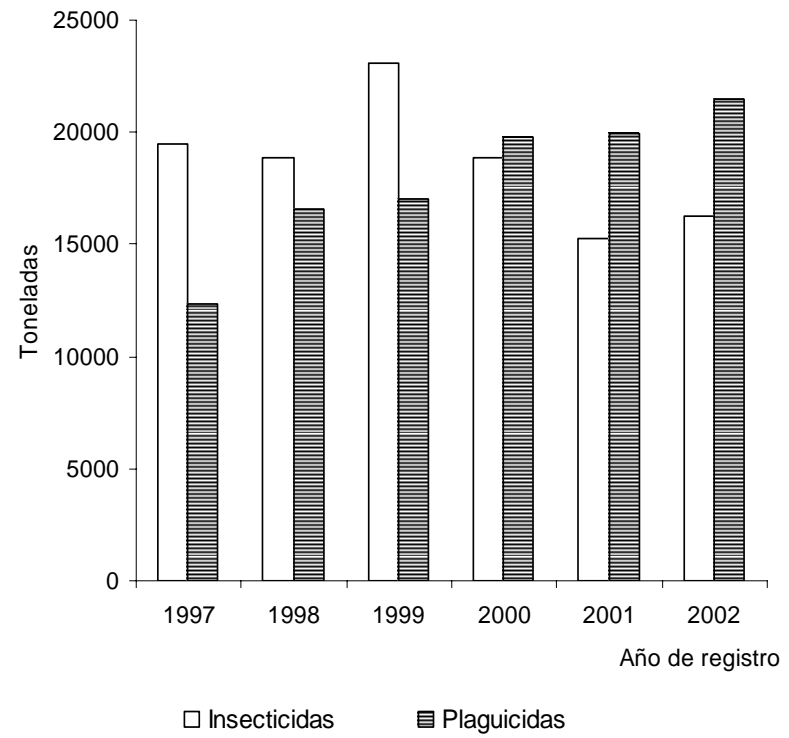
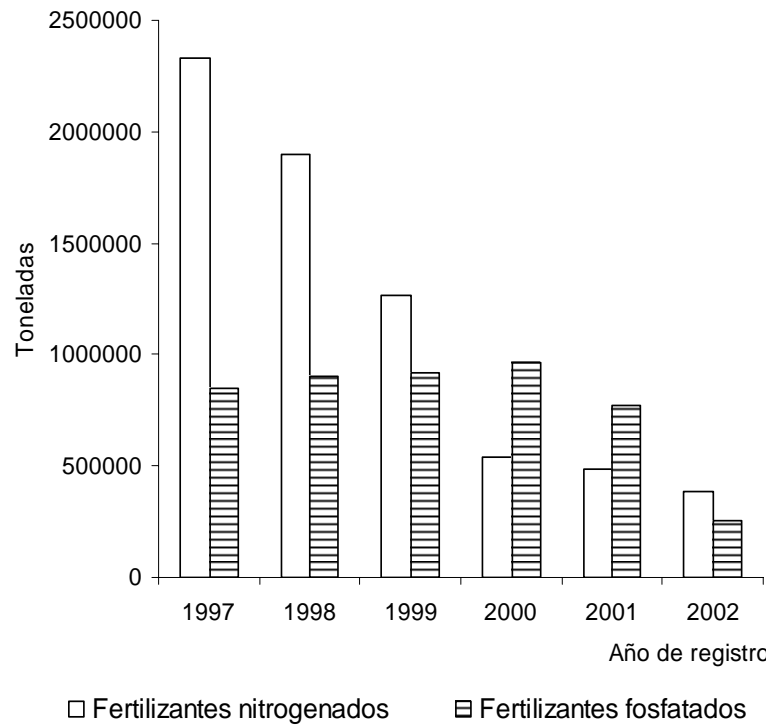


Figura A1.2. Cantidad de agroquímicos usados en el periodo de 1997 a 2002 en la cuenca Lerma-Chapala. La figura esta dividida por fertilizantes (nitrogenados o fosfatados) e insecticidas y plaguicidas. Fuente: INEGI 2003.

## TABLAS

Tabla A1.1. Usos del agua de la Cuenca Lerma-Chapala

Subcuenca	Municipal	Agrícola	Pecuario	Industrial	Total de abastecimiento
Alto Lerma	562.99	877.80	60.12	117.67	2,170.30
Medio Lerma	387.48	4,380.40	165.95	127.19	5,079.53
Bajo Lerma	313.73	1,348.50	87.21	32.74	1,782.18
<b>Total</b>	<b>1,264.20</b>	<b>6,606.70</b>	<b>313.28</b>	<b>277.60</b>	<b>9,032.01</b>

Los datos están expresados en Mm<sup>3</sup>. Fuente: Inf Lerma, N12 mayo 1998. Boletín del Centro de Información de la Cuenca Lerma-Chapala. <http://136.142.158.105/LASAA98/VargasVelazquez.pdf>.

Tabla A1.2. Calificación de las regiones hídricas comprendidas en la Cuenca Lerma- Santiago-Pacífico.

Regiones	Cuerpos De agua	Abastecimiento Público			Recreación			Pesca y vida acuática			Industrial y agrícola		
		Apto (%)	No Apto (%)	S/D (%)	Apto (%)	No Apto (%)	S/D (%)	Apto (%)	No apto (%)	S/D (%)	Apto (%)	No Apto (%)	S/D (%)
<b>Lerma-Santiago</b>	<b>69</b>	<b>36</b>	<b>42</b>	<b>21</b>	<b>39</b>	<b>39</b>	<b>21</b>	<b>39</b>	<b>39</b>	<b>21</b>	<b>72</b>	<b>7.2</b>	<b>20</b>
Huicicila	1	100	0	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0
Ameca	7	0	57	42	0	57	42	14	42	42	57	0	42
Costa de Jalisco	7	28	0	71	14	0	85	1	0	0	1	0	0
Armeria de Coahuayana	8	62.5	25	0	50	37.5	0	50	37.5	0	87.5	0	0
Costa de Michoacán	1	SD	SD	0	SD	SD	0	SD	SD	0	SD	SD	0

SD; sin dato

Tabla A1.3. Descargas de los principales municipios y parques industriales de la cuenca (tomando de <http://www.semarnat.gob.mx/regiones/chapala/problematika.shtml>).

Subcuencas	Descarga de agua residuales e industriales	Calidad del agua
Alto Lerma	Parques industriales: Santiago Tianguistengo y Lerma-Toluca Municipales: Toluca, Lerma, Atlacomulco y pequeños poblados del Estado de México.	Fuertemente contaminado
Medio Lerma	Industriales: Querétaro, Celaya, Irapuato y Salamanca. Municipales: Villa corregidora, Cortázar y Villagrán	Fuertemente contaminado
Bajo Lerma	Municipales: León, Abasolo, Pénjamo, La Piedad y La Barca	Contaminado

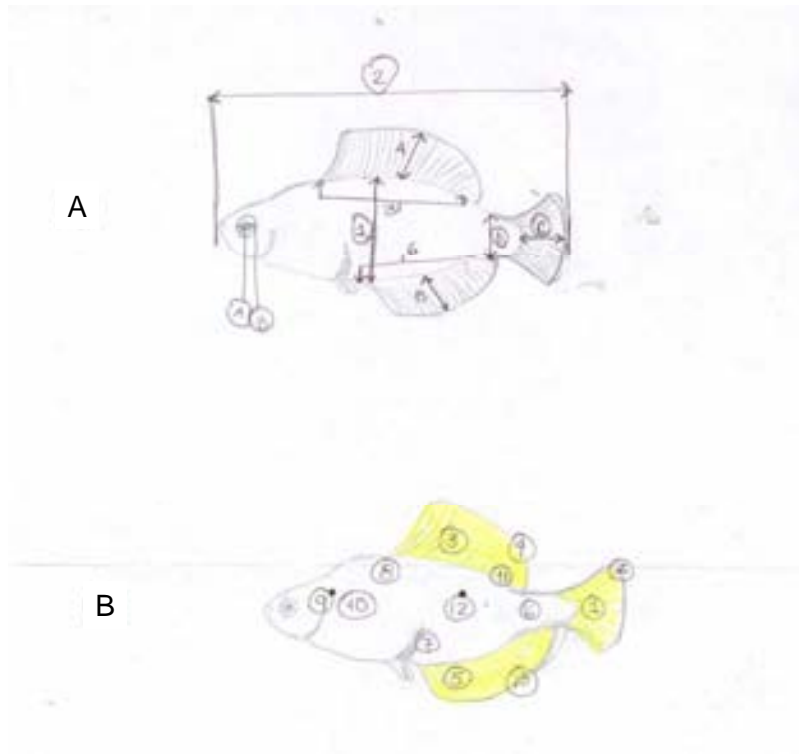
Tabla A1.4. Niveles de plaguicidas detectados en la presa Ignacio Ramírez región del Alto Lerma.

Compuesto químico	Concentración (mg/L)	Referencia
Metil paratión	0.00005 - 0.0001	De La Vega Salazar et al., 1997
Metil paratión	0.0002 - 0.00035	Favari et al., 2002
Malatión	0.000024 - 0.00013	Favari et al., 2002
Aldrin	0.016 - 0.024	Favari et al., 2002
Dieldrin	0.067 - 0.27	Favari et al., 2002
Endrin	0.06 - 0.17	Favari et al., 2002
Metil paratión	No detectado	Arellano-Aguilar & Macías Garcia 2008



## **APÉNDICE 2**

Regiones de los registros morfológicas y colorimétricos



A) Medidas corporales., 1) profundidad del cuerpo, 2) longitud total, 3-6) dimensiones de las aletas, A y B) diámetros de ojo y pupila, C) longitud de aleta caudal, D) pedúnculo.

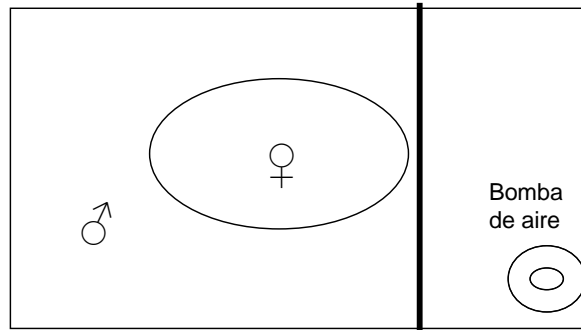
B) Zonas corporales donde se midieron los porcentajes de reflectancia (360-740 nm).

### APÉNDICE 3

#### Diseño de los acuarios para las pruebas de conducta

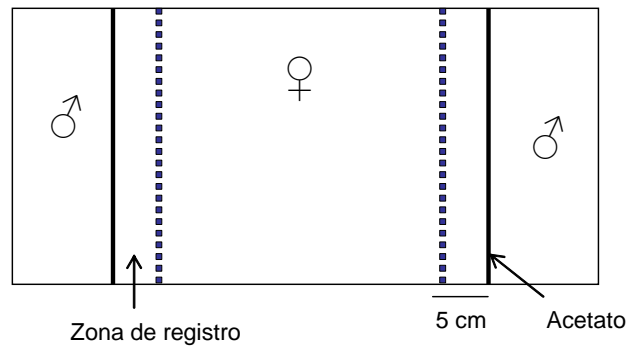
##### Cortejo

Habitación	♂	24:00 h
Aclimatación	♀	00:05'
Habitación a la bolsa	♀	00:05'
REGISTRO		00:15'



##### Elección de pareja

Habitación	♀	24:00 h
Aclimatación	♂	00:05'
Habitación a la caja	♂	00:05'
REGISTRO		00:20'



## **APÉNDICE 4**

### Acuarios de Exposición



Foto: Arellano-Aguilar

### Acuarios de Mantenimiento

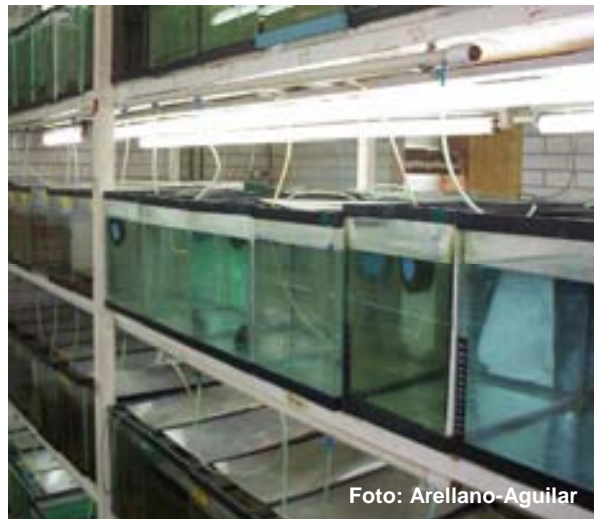


Foto: Arellano-Aguilar