



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA
UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN SISAL, YUCATAN
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

TOXICIDAD DEL CLORPIRIFOS Y EL EFECTO DE ANTI Y PRO OXIDANTES EN LA
ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA EN EMBRIONES DE
PEZ CEBRA (*Danio rerio*).

T E S I S
que para optar por el grado de
Maestría en Ciencias
Química Acuática

P r e s e n t a
LBM. Fernando Jesús Rubio Escalante

Director de Tesis: Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes.
Facultad de Química, UMDI Sisal, Yucatán.

Comité Tutorial:

M. en C. Santiago Capella Vizcaíno
Facultad de Química, UMDI Sisal, Yucatán.

Dra. Cecilia Vanegas Pérez
Facultad de Ciencias, UNAM

Dr. Martín G. Frías Espericueta
Facultad de Ciencias del Mar, UAS

Dr. Carlos Rosas Vázquez
Facultad de ciencias, UMDI Sisal, Yucatán

Sisal, Yucatán Febrero 2016



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.

Índice general

ÍNDICE GENERAL	2
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	12
RESUMEN.	13
INTRODUCCIÓN.	14
ANTECEDENTES	15
<i>Clorpirifos</i>	16
<i>Toxicidad del Clorpirifos</i>	19
<i>Estrés oxidante</i>	23
<i>Defensas antioxidantes</i>	26
<i>Mecanismos antioxidantes</i>	31
<i>Pez cebra (Danio rerio)</i>	32
OBJETIVOS	33
<i>Objetivo general</i>	33
<i>Objetivos particulares</i>	33
HIPÓTESIS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
<i>Origen y mantenimiento de organismos</i>	34
<i>Exposición de embriones</i>	35
ANÁLISIS DE MUESTRAS	36
<i>Análisis morfométrico</i>	36
ANÁLISIS FISIOLÓGICO	38
<i>Análisis Bioquímicos</i>	39
<i>Actividad Enzimática de la Acetilcolinesterasa</i>	39
<i>Biomarcadores enzimáticos de estrés oxidante</i>	41
<i>Catalasa</i>	41
<i>Superóxido Dismutasa</i>	42
<i>Biomarcadores no enzimáticos de estrés oxidante</i>	43
<i>Glutatión total</i>	43

<i>Peroxidación Lipídica</i>	43
EXPRESIÓN RELATIVA DE LAS ENZIMAS	44
<i>Análisis estadístico de resultados</i>	47
RESULTADOS	47
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ACETILCOLINESTERASA.....	47
CATALASA.....	51
SUPEROXIDO DISMUTASA	54
GLUTATIÓN (CONCENTRACIÓN TOTAL Y EXPRESIÓN RELATIVA).....	57
HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS	60
MORFOLOGÍA.....	61
RESPUESTA FISIOLÓGICA.....	70
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXOS	92

Índice de figuras

FIGURA 1.	ESTRUCTURA BÁSICA DE LOS PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS, CUYA BASE ELEMENTAL ES EL FÓSFORO.	15
FIGURA 2.	PRINCIPALES PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y SU ESTRUCTURA QUÍMICA, COMPUESTOS POR EL FÓSFORO Y DOBLES ENLACES CON EL AZUFRE O EL OXÍGENO.	16
FIGURA 3.	SE OBSERVA LA ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CLORPIRIFOS Y SUS COMPONENTES, COMPUESTO DE RADICALES ETILO, LA FRACCIÓN DEL ÉSTER DE ÁCIDO FOSFÓRICO Y SU DOBLE ENLACE CON EL AZUFRE, ASÍ COMO LA MOLÉCULA DE PIRIDINA CON TRES ENLACES DE CLORO.....	17
FIGURA 4.	VÍAS DE TRANSPORTE MÁS COMUNES DE LOS PLAGUICIDAS, DESDE SU FUENTE DE EMISIÓN HASTA SU DESTINO EN AMBIENTES U ORGANISMOS ACUÁTICOS, EL CUAL PUEDE SER A TRAVÉS DE ADHESIÓN A PARTÍCULAS O TRANSPORTE ACTIVO (ALBERT & BENÍTEZ 2005).	18
FIGURA 5.	PORCENTAJES DE USO DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS PARA LA ZONA COSTERA DEL GOLFO DE MÉXICO (DATOS TOMADOS DE BENÍTEZ <i>ET AL</i> , 1996).....	18
FIGURA 6.	TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL NERVIOSA DESDE LAS TERMINALES PRE-SINÁPTICAS A LOS RECEPTORES (M1) DE LAS TERMINALES POST-SINÁPTICAS, DONDE SE OBSERVA LA LIBERACIÓN DE LOS NEUROTRANSMISORES Y COMO ESTOS SON HIDROLIZADOS POR LA ENZIMA AChE PRODUCIENDO ACETATO Y COLINA.	20
FIGURA 7.	BLOQUEO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA AChE POR FOSFORILACIÓN DEL SITIO ACTIVO, SE OBSERVA UNA ACUMULACIÓN DEL NEUROTRANSMISOR ACETILCOLINA, LO QUE PRODUCE UNA SOBRE-ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNIDOS Y NICOTÍNIDOS, LO QUE GENERA DIVERSOS SÍNTOMAS COLINÉRGICOS.....	21
FIGURA 8.	METABOLISMO DEL CPR, LOS CUALES SON MEDIADOS POR ENZIMAS DE LA FAMILIA CYP, LAS CUALES PUEDEN PRODUCIR DIETILFOSFATO Y TCP POR DEARILACIÓN O CPR-OXON POR DESULFURACIÓN.	22
FIGURA 9.	REACCIÓN EN CADENA DE LA FORMACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS COMO PRODUCTO DE UNA REACCIÓN CON RADICALES LIBRES HIDRÓXIDO, REACCIONANDO PARA FORMARSE RADICALES CARBONADOS (1), UNA INTERACCIÓN CON OXÍGENO MOLECULAR PRODUCE RADICALES LIPOPERÓXIDO (2) ALTAMENTE REACTIVO QUE TOMA EL H DEL ÁCIDO ADYACENTE PARA EL PRODUCTO HIDROPERÓXIDO (3).....	25
FIGURA 10.	ECUACIÓN DE DISMUTACIÓN DEL ION SUPERÓXIDO A TRAVÉS DE LA ENZIMA SOD.....	26
FIGURA 11.	PROCESO DE DISMUTACIÓN DE DOS MOLÉCULAS DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN UNA MOLÉCULA DE OXÍGENO Y DOS DE AGUA, POR ACCIÓN DE LA ENZIMA ANTIOXIDANTE CAT.....	27
FIGURA 12.	REACCIÓN CATALÍTICA DE LA ENZIMA GPx, ENZIMA ANTIOXIDANTE QUE UTILIZA COMO SUSTRATO ACEPTOR DE PROTONES LA MOLÉCULA DE GLUTATIÓN REDUCIDO, PARA OBTENER GLUTATIÓN OXIDADO Y TRANSFORMAR EL RADICAL PERÓXIDO EN ALCOHOL.	27
FIGURA 13.	MODIFICACIONES QUE SE PRESENTAN EN EL SITIO ACTIVO DE LA ENZIMA GPx DURANTE EL PROCESO DE CATÁLISIS DE RADICALES LIBRES DONDE SE EMPLEAN DOS MOLÉCULAS DE GLUTATIÓN SULFHIDRILO, MEDIANTE CAMBIOS DEL	

RESIDUO DE SELENOCISTEINA (SELENOATO) PASANDO POR ÁCIDO SELÉNICO, SELENOSULFATO Y DE REGRESO A SU FORMA ORIGINAL.	28
FIGURA 14. CICLO DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA GR, EL CUAL EMPLEA UN DONADOR DE PROTONES PARA PODER LLEVAR A CABO LA REDUCCIÓN DE GLUTATIÓN OXIDADO A DISULFURO COMO SE OBSERVA EN L ECUACIÓN, LA SECCIÓN INFERIOR SE REFIERE AL SISTEMA QUE EMPLEA LA ENZIMA PARA PODER REDUCIR EL GSSG.	28
FIGURA 15. MOLÉCULA DEL TRIPÉPTIDO GLUTATIÓN (γ -GLUTAMILCISTEINGLICINA) PROVENIENTE DE RESIDUOS DE ÁCIDO GLUTÁMICO MEDIANTE UNIÓN INUSUAL DEL CARBOXILO γ (MODIFICADA DE BERG ET AL. 1995).	29
FIGURA 16. SISTEMA GLUTATIÓN PARA LA CONJUGACIÓN DE RADICALES LIBRES GENERADORAS DE ESTRÉS OXIDANTE, DONDE PARTICIPAN LAS ENZIMAS GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx), GLUTATIÓN REDUCTASA (GR), EL TRIPEPTIDO EN SU FORMA SULFHIDRILO (GSH) Y SU FORMA DISULFURO (GSSG); EN COLOR ROJO CON AZUL SE ENCUENTRA EL RADICAL LIBRE, EN COLOR ROJO EL GRUPO ALCOHOL RESULTANTE DE LA CATÁLISIS DE GPx, ASÍ COMO LA MOLÉCULA DE AGUA CON LOS ELECTRONES (EN VERDE) PROVENIENTES DE LA REDUCCIÓN DE GSSG A GSH (MODIFICADO DE PEÑA-LLOPIS ET AL. 2003).	30
FIGURA 17. CONJUGACIÓN DE LA MOLÉCULA DE GLUTATIÓN, CUANDO ÉSTA REALIZA UNIONES PARA INCREMENTAR LA SOLUBILIDAD DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS EN EL ORGANISMO (TOMADO DE BERG ET AL. 1995).	30
FIGURA 18. FORMAS EN LAS CUALES PUEDE PRESENTARSE EN EL ORGANISMO LA VITAMINA C, A ES SINTETIZADA COMO ÁCIDO ASCÓRBICO, SU FORMA IONIZADA EN ASCORBATO Y ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO COMO FORMA OXIDADA CON ELEVADO POTENCIAL ANTIOXIDANTE.	31
FIGURA 19. A) ACUARIOS DE ACLIMATACIÓN POR GÉNERO DE LOS ADULTOS REPRODUCTORES. B) RECOLECCIÓN DE EMBRIONES UTILIZADOS EN LOS BIENSAYOS, PARA SU POSTERIOR LIMPIEZA.	34
FIGURA 20. A) PECERAS INSTALADAS CON TRAMPAS DE ECLOSIÓN CONTENIENDO A LOS MACHOS Y HEMBRAS, LOS EMBRIONES POR GRAVEDAD PERMANECEN EN EL FONDO, LEJOS DE LA DEPREDAIÓN DE LOS ADULTOS. B) SE OBSERVA UN GRUPO DE HUEVOS FECUNDADOS Y LIMPIOS QUE SERÁN SEPARADOS Y EMPLEADOS PARA SU EXPOSICIÓN (FOTOS: RUBIO-ESCALANTE 2012).	35
FIGURA 21. A) MANIPULACIÓN DE EMBRIONES DENTRO DE LAS PLACAS, PARA SU POSTERIOR EXPOSICIÓN. B) PLACAS DE EXPOSICIÓN DE 6 POZOS CADA UNA, EN LA IMAGEN SE APRECIAN LAS EXPOSICIONES PARA EL BIOENSAYO A, CON LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CPR ANTES DE SER COLOCADAS EN LA ZONA DE EXPOSICIÓN.	36
FIGURA 22. DISPOSITIVO EMPLEADO PARA LA OBSERVACIÓN Y MEDICIÓN DE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y MORFOLÓGICOS DE EMBRIONES DE PEZ CEBRA.	37
FIGURA 23. MEDICIÓN DE ORGANISMOS EMPLEANDO LAS TÉCNICAS DE FRAYSSE Y COLABORADORES (2006) CON LA FINALIDAD DE OBSERVAR LA PRESENCIA DE ALTERACIONES PRODUCTO DE LA EXPOSICIÓN A ORGANOFOSFORADOS A) ORGANISMO CONTROL, LONGITUD TOTAL Y MEDIDAS DEL ÁREA DE PERICARDIO EN MM B) ORGANISMO AFECTADO POR MALFORMACIÓN CÓNCAVA DENOMINADA LORDOSIS.	38

FIGURA 24.	CUANTIFICACIÓN DE LOS ORGANISMOS MUERTOS DESPUÉS DE LAS 72 HORAS DE EXPOSICIÓN PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS, AL IGUAL QUE LOS ORGANISMOS ECLOSIONADOS. LOS ORGANISMOS MUERTOS ESTÁN SEÑALIZADOS POR LAS FLECHAS COLOR ROJO, Y LOS ECLOSIONADOS POR LAS FLECHAS AZULES.	39
FIGURA 25.	ECUACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ACETILCOLINESTERASA, DONDE 1/10000 REPRESENTA EL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN DEL TNB POR POZO DE MICROPLACA. EN LA SEGUNDA SECCIÓN DE LA ECUACIÓN LA PENDIENTE ES REPRESENTADA POR EL CAMBIO EN ABSORBANCIA POR MINUTO, QUE SE ENCUENTRA NORMALIZADO POR EL VOLUMEN TOTAL DE MUESTRA ENTRE EL VOLUMEN TOTAL DEL POZO Y EL CONTENIDO PROTEICO (CP) OBTENIDO MEDIANTE EL MÉTODO DE BRADFORD, AL FINAL SE MULTIPLICA POR 1000000 PARA CONVERTIR DE $M \text{ MIN}^{-1} G^{-1}$ A $NMOL^{-1} \text{ MIN MG}^{-1}$ LAS UNIDADES.	39
FIGURA 26.	CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD, EMPLEANDO ESTÁNDARES DE ALBÚMINA BOVINA. . SE INCLUYE LA ECUACIÓN OBTENIDA, EMPLEADA PARA OBTENER LAS CONCENTRACIONES DE PROTEÍNA, Y EL VALOR DE CORRELACIÓN EN LA LÍNEA DE TENDENCIA (R^2) PARA DICHO EJEMPLO. ...	41
FIGURA 27.	DIAGRAMA DEL PRINCIPIO DE CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATALASA, LA CUAL CATABOLIZA EL METANOL EN FORMALDEHIDO, EN PRESENCIA DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO. EL COMPUESTO RESULTANTE REACCIONA CON EL PURPALD PARA SER LEÍDO A 540 NM DE LONGITUD DE ONDA.	42
FIGURA 28.	DIAGRAMA DE FLUJO DONDE SE OBSERVA LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES A PARTIR DE LA ACCIÓN CATALÍTICA DE XANITNA OXIDASA, DICHS RADICALES SON EL SUSTRATO DE LA ENZIMA SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD), EN UNA MENOR CANTIDAD DE RADICALES SUPERÓXIDO NO METABOLIZADOS, ÉSTOS REACCIONAN CON LA SAL DE TETRAZOLIO PARA GENERAR UN COMPUESTO COLORIDO DE FORMAZÁN, DETECTABLE A 450 NM DE LONGITUD DE ONDA.	42
FIGURA 29.	A) EJEMPLO DE UNA CURVA DE AMPLIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE LAS DIFERENTES MUESTRAS TRATADAS, SE OBSERVAN LAS TRES FASES DEL PROCESO DE PCR, LOS CICLOS DE LATENCIA, EL PERIODO DE AMPLIFICACIÓN Ó FASE EXPONENCIAL Y DONDE ES ESTABLECE LA FASE PLANA O DE MESETA. B) EJEMPLO DE UN GRÁFICO DE DISOCIACIÓN DE ADN, DONDE SE PRECIA LA FASE EXPONENCIAL Y NO EXISTE LA FORMACIÓN DE DÍMEROS U OTROS EMPALMES DISTINTOS DURANTE EL PCR.....	46
FIGURA 30.	ACTIVIDAD DE ACHÉ A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CPR SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($F=3.382$, $p<0.05$) ENTRE EL CONTROL Y LA CONCENTRACIÓN DE $400 \mu\text{G L}^{-1}$, LA CUAL REPRESENTA UNA DISMINUCIÓN DEL 45% RESPECTO AL CONTROL. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS. B) EXPRESIÓN RELATIVA AL CONTROL DEL GEN ACHÉ DONDE EXISTE UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN GENÉTICA SIGNIFICATIVA EN $200 \mu\text{G L}^{-1}$, ($F=7.49$, $p<0.05$), CON RESPECTO AL CONTROL, NO SE ENCONTRARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON LAS DEMÁS CONCENTRACIONES.	48
FIGURA 31.	A) LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ACHÉ EN ORGANISMOS EXPUESTOS A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE VC, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.21$; $F= 0.87$) ENTRE LOS TRATAMIENTOS. B) LA ACTIVIDAD DE ACHÉ SI PRESENTÓ DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p< 0.05$; $F= 15.40$) ENTRE EL CONTROL Y LAS CONCENTRACIONES DE CO-EXPOSICIÓN VC+CPR SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.....	49

FIGURA 32.	A) EXPOSICIONES A VC PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS, DONDE EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN AChE NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.18; F= 2.05). B) EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN AChE EN LAS CO-EXPOSICIONES CPR+VC, NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS (P= 0.24; F=1.59). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.	49
FIGURA 33.	A) ACTIVIDAD DE AChE PARA LOS TRATAMIENTOS EXPUESTOS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TBOOH, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.06; F= 3.86) ENTRE LOS TRATAMIENTOS. B) ACTIVIDAD DE AChE DE LOS EMBRIONES TRATADOS CON LAS CO-EXPOSICIONES DE TBOOH-CPR, SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P< 0.05; F= 23.30) SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.	50
FIGURA 34.	A) EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN AChE EN LAS EXPOSICIONES A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TBOOH, LOS TRATAMIENTOS NO PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.239; F= 1.72). B) EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN AChE DURANTE LAS CO-EXPOSICIONES CPR-TBOOH , SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P< 0.05; F= 7.22) SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.....	51
FIGURA 35.	A) ACTIVIDAD DE CAT DONDE SE APRECIA UN AUMENTO EN LA ACTIVIDAD SIN QUE FUERA SIGNIFICATIVO (F=0.988, p=0.43). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. B) EXPRESIÓN RELATIVA AL CONTROL DEL GEN CAT CON RESPECTO AL CONTROL PARA LAS EXPOSICIONES A CAT SIN QUE EXISTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (F=1.57, p=0.27).	51
FIGURA 36.	A) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CAT DURANTE LAS EXPOSICIONES A CONCENTRACIONES DE VC, DONDE NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.09; F= 2.94). B) ACTIVIDAD DE CAT EN EMBRIONES EXPUESTOS A CO-EXPOSICIONES DE CPR+VitC, NO HAY PRESENCIA DE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.11; F= 2.46). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.....	52
FIGURA 37.	A) EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN CAT EXPUESTO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VC, NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.44; F= 0.99). B) CO-EXPOSICIÓN CPR+VitC PARA LA EXPRESIÓN RELATIVA DE CAT, NO EXISTIERON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE ELLOS (P=0.35; F= 1.24). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.	52
FIGURA 38.	FIGURA 68 A) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CAT, SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P <0.05; F=13.89) B) ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CAT EN LAS CO-EXPOSICIONES CPR+TBOOH, SE OBSERVAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P< 0.05; F=4.326) SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.	53
FIGURA 39.	A) EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN CAT DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL TBOOH, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.875; F= 0.226) ENTRE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS. B) EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN CAT DURANTE LAS CO-EXPOSICIONES TBOOH+CPR, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.99; F= 0.068). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.	54

- FIGURA 40. A) ACTIVIDAD DE CAT DONDE SE APRECIA UN AUMENTO EN LA ACTIVIDAD SIN QUE FUERA SIGNIFICATIVO ($F=0.988$, $p=0.43$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. B) ACTIVIDAD DE SOD, NO EXISTIERON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS ($H=1.679$, $p=0.79$). B) EXPRESIONES RELATIVAS RESPECTO AL CONTROL PARA EL GEN DE LA ENZIMA SOD, NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($F=3.13$, $p=0.08$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR..... 54
- FIGURA 41. A) ACTIVIDAD DE SOD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VC, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.40$; $F= 1.09$). B) ACTIVIDAD DE SOD EN LAS CO-EXPOSICIONES DE CPR+VITC, NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.74$; $F=0.48$) ENTRE LOS TRATAMIENTOS. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS..... 55
- FIGURA 42. A) EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN SOD A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VC E, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.98$; $F= 0.05$) DURANTE EL PERIODO DE EXPOSICIÓN. B) CO-EXPOSICIONES DE CPR+VITC, NO EXISTIERON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS EN LA EXPRESIÓN RELATIVA DE SOD ($p= 0.34$; $F= 1.27$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR..... 55
- FIGURA 43. A) ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SOD EXPUESTAS A LAS CONCENTRACIONES DE TBOOH, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.23$; $F= 1.76$). B) ACTIVIDAD DE SOD EN LAS CONCENTRACIONES DE CO-EXPOSICIÓN TBOOH+CPR, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.607$; $F= 0.703$) ENTRE LOS TRATAMIENTOS. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR..... 56
- FIGURA 44. A) EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN SOD, DE LOS EMBRIONES EXPUESTOS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TBOOH, EL PRO-OXIDANTE NO PRODUJO DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.443$; $F= 0.993$) ENTRE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS. B) EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN SOD, DESPUÉS DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN A TBOOH+CPR NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.750$; $F= 0.480$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. 56
- FIGURA 45. A) GLUTATIÓN TOTAL EN ORGANISMOS EXPUESTOS A CPR, PRESENTÓ DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE EL CONTROL Y $200 \mu\text{G L}^{-1}$ INCREMENTANDO LA CONCENTRACIÓN ($F=4.33$, $p<0.05$). EXPRESIÓN RELATIVA AL CONTROL DEL GEN GPX, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS ($F=3.803$, $p=0.058$) SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS..... 57
- FIGURA 46. A) CONTENIDO TOTAL DE GLUTATIÓN EN ORGANISMOS EXPUESTOS A VC DONDE NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.31$; $F= 1.40$). B) CO-EXPOSICIÓN CPR+VC, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS Y LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR 58
- FIGURA 47. A) EXPRESIÓN RELATIVA AL CONTROL PARA EL GEN GPX, NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.36$; $F= 1.21$) PARA LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL ANTIOXIDANTE. B) EXPRESIÓN RELATIVA DE GPX NO PRESENTÓ DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS DURANTE LA EXPOSICIÓN A CPR+VITC ($p= 0.11$; $F= 2.42$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. 58

- FIGURA 48. A) CONTENIDO DE GLUTATIÓN TOTAL, NO PRESENTÓ DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.194$; $F= 1.98$) ENTRE LOS TRATAMIENTOS EXPUESTOS A LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TBOOH. B) GLUTATIÓN TOTAL, NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.134$; $F= 2.262$) ENTRE LOS GRUPOS EXPUESTOS A LA COMBINACIÓN DE TBOOH-CPR. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. 59
- FIGURA 49. A) GRÁFICO DE LA VARIABLE EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN ACHE, PARA LOS TRATAMIENTOS CON LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TBOOH NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.146$; $F= 2.373$) PARA ESTA VARIABLE. B) LAS CO-EXPOSICIONES TBOOH-CPR NO PRODUJERON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.750$; $F= 0.480$) ENTRE LOS TRATAMIENTOS PARA LA VARIABLE EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN ACHE SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. 59
- FIGURA 50. HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS ($F=0.712$, $p=0.58$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS..... 60
- FIGURA 51. A) HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS, MEDIDO EN EQUIVALENTES DE FOX, EXPUESTOS A VC NO EXISTIÓ UNA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ($p=0.06$; $F= 3.65$) ENTRE LOS TRATAMIENTOS. B) CO-EXPOSICIONES DE VC + CPR NO PRODUJERON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p=0.77$; $F=0.44$) SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. 61
- FIGURA 52. A) CONTENIDO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS, SE OBSERVAN LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p< 0.05$; $F= 28.14$) ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE TBOOH, B) CONTENIDO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS PARA LOS TRATAMIENTOS CO-EXPUESTOS DE TBOOH+CPR, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS. 61
- FIGURA 53. A) LONGITUD TOTAL DE LOS DIFERENTES EMBRIONES EXPUESTOS A CPR, EN LOS CUALES NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL CONTROL ($F=0.745$, $p=0.74$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. B) SE OBSERVA COMO EJEMPLO UN ORGANISMO DE LONGITUD PROMEDIO (2.60 MM), PARA EL TRATAMIENTO CONTROL (IMAGEN RUBIO-ESCALANTE). 62
- FIGURA 54. A) LONGITUD TOTAL DE EMBRIONES EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VC NO SE PRESENTAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.06$) EN ESTOS TRATAMIENTOS. B) LONGITUD TOTAL DE LOS ORGANISMOS EXPUESTOS A LAS CO-EXPOSICIONES DE VC+CPR, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE ELLOS ($p= 0.223$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. 62
- FIGURA 55. A) LONGITUD TOTAL DE ORGANISMOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TBOOH, SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p <0.05$; $F=8.123$) B) LONGITUD TOTAL, EN CO-EXPOSICIONES DE TBOOH+CPR, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA ESTA VARIABLE ($p= 0.23$; $F= 5.57$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS..... 63
- FIGURA 56. A) ÁREA DE PERICARDIO DE ORGANISMOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CPR, DONDE NO EXISTIERON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($F=2.044$, $p=0.088$) CON RESPECTO AL CONTROL. B) ORGANISMO DEL GRUPO

CONTROL CON UN ÁREA DE PERICARDIO PROMEDIO DE 0.030 MM² PARA ÉSTE TRATAMIENTO (IMAGEN RUBIO-ESCALANTE).

63

FIGURA 57. A) ÁREA DEL PERICARDIO EN EMBRIONES DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON VC, DONDE NO EXISTIERON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS CON RESPECTO AL CONTROL B) ÁREA DE PERICARDIO EN LAS COEXPOSICIONES VC Y CPR SE OBSERVA UN INCREMENTO SIGNIFICATIVO EN EL ÁREA DEL PERICARDIO EN LAS CO-EXPOSICIONES CON CPR. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS 64

FIGURA 58. FIGURA 59 A) AREA DE PERICARDIO EN ORGANISMOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TBOOH , LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P< 0.05; F= 23.86) B) AREA DE PERICARDIO DURANTE CO- ES POSICIONES TBOOH+CPR, , SE OBSERVAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P<0.05; F=38.22), SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS. 65

FIGURA 59. A) PREVALENCIA DE LORDOSIS EN ORGANISMOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CPR, NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS TRATAMIENTOS (F=2.038, P=0.140). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. B) ORGANISMO CON UNA EVIDENTE MALFORMACIÓN CÓNCAVA (LORDOSIS) EN LA ESPINA DORSAL, EL EMBRIÓN PERTENECE AL TRATAMIENTO DE 200 µG L⁻¹ DE CPR. PORCENTAJE PROMEDIO DE CIFOSIS POR TRATAMIENTO SIN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE ELLOS..... 65

FIGURA 60. A) PREVALENCIA DE CIFOSIS EN LOS EMBRIONES EXPUESTOS A CPR, DONDE NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (H=3.312, P=0.507). B) ORGANISMO EXPUESTO A 200 µG L⁻¹ DE CPR CON MALFORMACIÓN DORSAL (CIFOSIS). 66

FIGURA 61. A) PREVALENCIA DE LORDOSIS EN ORGANISMOS EXPUESTOS A LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DE VC, DONDE NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.133; F= 2.22). B) PREVALENCIA DE LORDOSIS EN LOS TRATAMIENTOS DE LAS CO-EXPOSICIONES DE CPR Y VC, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.95; F= 0.25). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS. 66

FIGURA 62. A) PREVALENCIA DE CIFOSIS DE LOS TRATAMIENTOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VC, NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.146; F=2.15). B) LAS CO-EXPOSICIONES DE VC-CPR NO GENERARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.17; F= 1.85) EN EL PORCENTAJE DE CIFOSIS PARA LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. 67

FIGURA 63. FIGURA 60 A) PREVALENCIA DE LORDOSIS PARA LOS TRATAMIENTOS EXPUESTOS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TBOOH, NO SE OBSERVAN DIFERENCIA SIGNIFICATIVAS (P= 0.78; F=0.363) ENTRE ELLOS. B) SE OBSERVA QUE NO EXISTIERON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.95; F= 0.25) ENTRE LOS TRATAMIENTOS CO-EXPOSTOS A TBOOH-CPR, PARA LA VARIABLE PORCENTAJE DE LORDOSIS. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS ± LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS..... 67

FIGURA 64. FIGURA 61 A) PREVALENCIA DE CIFOSIS, DONDE NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS (P= 0.80; F= 0.333) ENTRE LOS TRATAMIENTOS EXPUESTOS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL TBOOH. B) PORCENTAJE DE

- CIFOSIS DE LOS TRATAMIENTOS CON LAS CO-EXPOSICIONES DE PRO-OXIDANTE Y PLAGUICIDA, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.57$; $F= 0.753$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. 68
- FIGURA 65. A) PREVALENCIA DE EDEMAS PARA EXPOSICIONES A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE CPR, DICHS VALORES NO PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($F=0.420$, $p=0.791$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. B) EDEMA DE PERICARDO, SE OBSERVA UN INCREMENTO EN EL ÁREA EN COMPARACIÓN CON ORGANISMOS CONTROL. 69
- FIGURA 66. FIGURA 45 A) PORCENTAJE DE EDEMAS OBSERVADOS EN LOS ORGANISMOS EXPUESTOS A LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES DE VITC, NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.14$; $KW= 5.32$) EN DICHA VARIABLE. B) PORCENTAJE DE EDEMAS CORRESPONDIENTE A LAS CO-EXPOSICIONES VC+CPR , DONDE NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.08$; $F= 2.49$) PARA LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS Y LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. 69
- FIGURA 67. FIGURA 62 A) PORCENTAJE DE EDEMAS DE LOS TRATAMIENTOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TBOOH, NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.426$; $F= 4.88$). B) DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p < 0.05$; $F= 4.88$) PRESENTES ENTRE EL CONTROL Y $600 \mu\text{g L}^{-1}$ TBOOH + 400L^{-1} CPR, PARA LAS CO-EXPOSICIONES DE TBOOH+CPR. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS. 70
- FIGURA 68. A) FRECUENCIA CARDIACA EN ORGANISMOS EXPUESTOS A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE CPR, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($F=2.043$, $p=0.113$) ENTRE ELLOS. B) PORCENTAJE DE MORTALIDAD PARA LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CPR, SE OBSERVAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE EL CONTROL Y LOS VALORES DE $800 \mu\text{g L}^{-1}$ ($F=7.088$, $p<0.05$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. 71
- FIGURA 69. PORCENTAJE DE ECLOSIÓN PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON CPR, DONDE NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($F=1.128$, $p=0.3417$) ENTRE ELLOS. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS Y LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. 71
- FIGURA 70. A) FRECUENCIAS CARDIACAS EN ORGANISMOS EXPUESTOS A VC SE OBSERVA QUE EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p < 0.05$; $F=5.39$) ENTRE LAS CONCENTRACIONES CONTROL Y $200 \mu\text{g L}^{-1}$; TAMBIÉN CON $400 \mu\text{g L}^{-1}$. B) CO-EXPOSICIÓN A VC+CPR, NO SE OBSERVARÓN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.06$; $F= 2.30$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS..... 72
- FIGURA 71. A) MORTALIDAD EN ORGANISMOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VC ($p= 0.25$; $F=$. B) CO-EXPOSICIÓN A VC+CPR, NO PRODUJERON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA EL PORCENTAJE DE MORTALIDAD ($p= 0.76$; $F= 0.46$). SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. 72
- FIGURA 72. A) PORCENTAJE DE ECLOSIÓN EN ORGANISMOS EXPUESTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE VC, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p= 0.61$; $F= 0.62$). B) LAS CO-EXPOSICIONES VC+CPR NO PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS PARA EL PORCENTAJE DE ECLOSIÓN . SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

FIGURA 73.	A) FRECUENCIA CARDIACA, DONDE SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p < 0.05$; $F = 18.17$). B) LA FRECUENCIA CARDIACA NO PRESENTÓ DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p = 0.20$; $F = 1.49$) ENTRE LOS TRATAMIENTOS EXPUESTOS A TBOOH-CPR. SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.....	73
FIGURA 74.	A) PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LOS ORGANISMOS, EXPUESTOS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TBOOH, NO SE OBSERVARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p = 0.289$; $F = 1.49$) PARA DICHA VARIABLE. B) PORCENTAJE DE MORTALIDAD PARA LAS CO-EXPOSICIONES DE TBOOH+-CPR, EN LOS TRATAMIENTOS SE OBSERVAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p < 0.05$; $F = 7.45$) SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.	74
FIGURA 75.	A) PORCENTAJE DE ECLOSIÓN PARA LAS EXPOSICIONES A CONCENTRACIONES CRECIENTES DEL PRO-OXIDANTE, NO SE PRESENTARON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p = 0.391$; $F = 1.136$) ENTRE LOS TRATAMIENTOS B) S PORCENTAJE DE ECLOSIÓN DURANTE LAS CO-EXPOSICIONES TBOOH-CPR, SE APRECIA LA PRESENCIA DE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($p < 0.05$; $F = 4.35$), SE REPRESENTAN LAS MEDIAS \pm LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR. LETRAS DIFERENTES SEÑALAN LOS PARES CON DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.	75
FIGURA 76.	EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CPR A NIVEL CELULAR, DONDE SE OBSERVA UN PROCESO DE METABOLIZACIÓN GRACIAS A ENZIMAS DE LA FAMILIA CYP, CUANDO PRODUCEN BIOACTIVACIÓN GENERAN CPR-OXON METABOLITO INHIBIDOR DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DURANTE REACCIONES DE FASE I; UNA INHIBICIÓN ENZIMÁTICA A NIVEL ORGANISMO PRODUCE ALTERACIONES QUE GENERAN LA MUERTE. EN REACCIONES DE FASE II, LA ENZIMA GST ES LA ENCARGADA DE GENERAR COMPLEJOS DE GSH-CPR PARA LA DESINTOXICACIÓN DE L CÉLULA, LA PRODUCCIÓN DE ESTOS COMPLEJOS CAUSA UN INCREMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE GSH. NO EXISTE EVIDENCIA DE RADICALES LIBRES QUE PRODUZCAN ESTRÉS OXIDANTE.	76

Índice de tablas

TABLA 1.	ANÁLISIS REALIZADOS POR TRATAMIENTO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS VARIABLES EN CADA UNO DE LOS DISTINTOS BIOENSAYOS.	35
TABLA 2.	DISTRIBUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS PARA LOS BIOENSAYOS, JUNTO CON SUS RESPECTIVAS COMBINACIONES, CADA UNO CON 3 RÉPLICAS.	36
TABLA 3.	SECUENCIAS DE CEBADORES EMPLEADAS EN EL ANÁLISIS DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA, EN TIEMPO REAL (REAL TIME-PCR) PARA LA ENZIMA ACHÉ Y LAS ENZIMAS INDICADORAS DE ESTRÉS OXIDANTE.	45

Resumen.

En los últimos años el uso de plaguicidas se ha incrementado, afectando organismos en medios acuáticos o terrestres. Entre los principales daños se han reportado alteraciones en actividades neurológicas consecuencia de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Por otro lado, los plaguicidas alteran el sistema redox de las células por generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales conducen situaciones de estrés oxidante celular, reflejado en peroxidación lipídica en las membranas celulares, apoptosis, o muerte del organismo. Algunos autores han reportado que ERO afectan la actividad enzimática de AChE y su expresión genética sin establecer una relación entre el estrés oxidante y la inhibición enzimática. En el presente trabajo se expusieron embriones de pez cebra a diferentes concentraciones del plaguicida Clorpirifos (CPR), para determinar el comportamiento enzimático de AChE y de los sistemas antioxidantes de las células. En una segunda etapa se produjo una co-exposición entre CPR y vitamina C (antioxidante); así como CPR con tertbutil hidroperóxido (tBOOH) como compuesto pro-oxidante, para determinar la influencia de estos compuestos en el comportamiento celular durante situaciones de intoxicación por CPR. Las exposiciones con CPR generaron inhibición de la actividad de AChE y cambios en los niveles basales de las enzimas antioxidantes sin producir estrés oxidante. En las co-exposiciones de CPR y vitamina C no se presentaron efectos sobre la actividad o expresión de AChE, tampoco se observó un efecto protector de la vitamina C a la actividad enzimática, ni fue posible observar estrés oxidante para estas co-exposiciones; sin embargo fue posible observar un incremento en el ritmo cardiaco y el área del pericardio a través de un mecanismo desconocido. El tertbutil hidroperóxido no produjo cambios en la actividad de la enzima AChE, y se observó una correlación negativa entre las concentraciones de exposición y los niveles de expresión de la AChE. La exposición a tBOOH produjo estrés oxidante, lo cual se evidenció en un aumento en la cantidad de lípidos peroxidados y cambios significativos en la actividad de CAT. Sin embargo al combinarlo con CPR solo fue posible observar una reducción en la actividad y expresión de la AChE pero sin evidencia de estrés oxidante. Estos resultados proporcionan evidencia adicional del papel de los pro-oxidantes en la actividad y expresión de la AChE. A nivel fisiológico y morfológico, se observaron cambios en la mortalidad, ritmo cardiaco y área del pericardio, lo cual sugiere que la inhibición de AChE en embriones es más sensible por el CPR que a situaciones de estrés oxidante.

Introducción.

La constante búsqueda de producción más barata y eficiente en la agricultura, ha generado un incremento en el uso de compuestos organofosforados (OF) para el combate de plagas, sin embargo existen reportes de efectos negativos sobre otros organismos acuáticos o terrestres. El principal mecanismo de toxicidad de los OF es a través de una inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), desencadenando daños neurológicos. La AChE en los organismos participa en la hidrólisis del neurotransmisor molecular acetilcolina (ACh). Este neurotransmisor es el encargado de iniciar el impulso nervioso, a partir de cambios en los receptores muscarínicos y nicotínicos en las células neuronales. Al existir inhibición enzimática a causa del OF se produce una excesiva estimulación en las terminales nerviosas provocando la aparición de síntomas colinérgicos (mareos, náuseas, vómito, etc.), que pueden conducir a la muerte del organismo. Por otro lado, recientes estudios en relación a intoxicación con OF revelaron producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) asociadas a estos compuestos. Las ERO son especies reactivas que se producen de manera endógena en el organismo, siendo regulados sus niveles por mecanismos de defensa en el organismo. Las ERO tienen una elevada reactividad molecular, generando daños a nivel celular, entre los que destacan peroxidación lipídica de las membranas celulares, alteraciones en el ADN y activación de los mecanismos de apoptosis. Otros autores reportan, que el incremento de ERO en el organismo está relacionado a padecimientos como aterosclerosis, cáncer, catarata senil, insuficiencia renal, Alzheimer, Parkinson, muerte súbita, entre otros. Estos reportes indican que los principales daños por parte de las ERO son causadas por un desbalance en el sistema de regulación de las mismas denominado estrés oxidante, el cual se genera por una producción excesiva de especies reactivas, y los sistemas de defensa no son suficientes para su regulación. Los principales sistemas de defensa antioxidante reportados existen los compuestos por enzimas y por moléculas. Entre las principales enzimas que participan en la regulación se encuentran la Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Glutatión Reductasa (GR), Glutatión peroxidasa (GPx) los principales compuestos son la vitamina C y el glutatión. En los últimos años, la cuantificación de la actividad de las enzimas y la cuantificación molecular de estos sistemas, se han convertido en una herramienta ampliamente utilizada para la detección de estrés oxidante. Adicional a esto, se ha encontrado que durante estrés oxidante se presentan cambios en la función de AChE sin evidencia de una relación directa con plaguicidas OF, por ejemplo Corrêa y colaboradores (2008) detectaron disminución de la actividad de AChE en pacientes hipertensos en situaciones de estrés oxidante; así mismo especies reactivas de oxígeno como el peróxido de

hidrógeno causan inhibición en la enzima acetilcolinesterasa y compuestos productores de estrés, como el etanol, tienen consecuencias a nivel transcripcional en la enzima.

En el presente trabajo se realizó la determinación del efecto del estrés oxidante sobre la expresión genética y la actividad de las enzimas AChE, SOD y CAT utilizando como modelo de estudio embriones del pez cebra (*Danio rerio*). El objetivo es entender el impacto del estrés oxidante en la transcripción y regulación de la AChE durante una intoxicación por Clorpirifos.

Antecedentes.

Se le denomina plaguicida a cualquier sustancia o mezcla de sustancias, cuyo origen orgánico o inorgánico, están destinadas a combatir, controlar, repeler o atraer plagas. Éstas pueden estar compuestas de insectos, ácaros, roedores o cualquier especie indeseable de plantas o animales, que tienen un efecto perjudicial para el hombre provocando daño y/o pérdida económica, así como la transmisión o producción de enfermedades (CDPR 2006; UNPL 2010; INECC 2012; EPA 2012). Los plaguicidas pueden incluir además de la sustancia activa, otros compuestos transportadores, diluyentes o solventes orgánicos, aditivos e impurezas que pueden tener potencial tóxico por sí solos (UNPL, 2010).

En general, los plaguicidas se clasifican de acuerdo a su acción y composición química, dividiéndose en 4 grandes grupos: Herbicidas, Fungicidas, Rodenticidas e Insecticidas. Estos últimos se clasifican a su vez de acuerdo a su origen en minerales, vegetales, orgánicos de base mineral y orgánicos de síntesis. Dentro de los orgánicos de síntesis podemos encontrar a los plaguicidas organofosforados (Luna González 2008; EPA 2012).

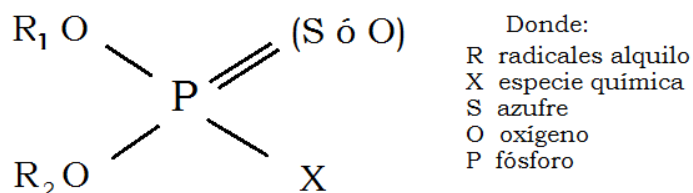


Figura 1. Estructura básica de los plaguicidas organofosforados, cuya base elemental es el fósforo.

Los plaguicidas OF (Figura 1) son sustancias que en la actualidad han incrementado su uso, principalmente en la agricultura de especies de importancia comercial, como consecuencia de

motivación económica, efectividad y su baja persistencia en el ambiente en comparación con otros plaguicidas, como los organoclorados (Luna González 2008; Murcia O & Stashenko 2008; Cárdenas et al. 2010), se denominan plaguicidas organofosforados a todas aquellas sustancias orgánicas derivadas de la estructura química del fósforo., cuya estructura química esta compuest por ésteres del ácido fosfórico y una variedad de alcoholes, dentro de los principales (Figura 2) encontramos: Paratión, Diazinón, Diclorvos, Malatión, Dimetoato y Clorpirifos (Luna González 2008; Fernández et al. 2010).

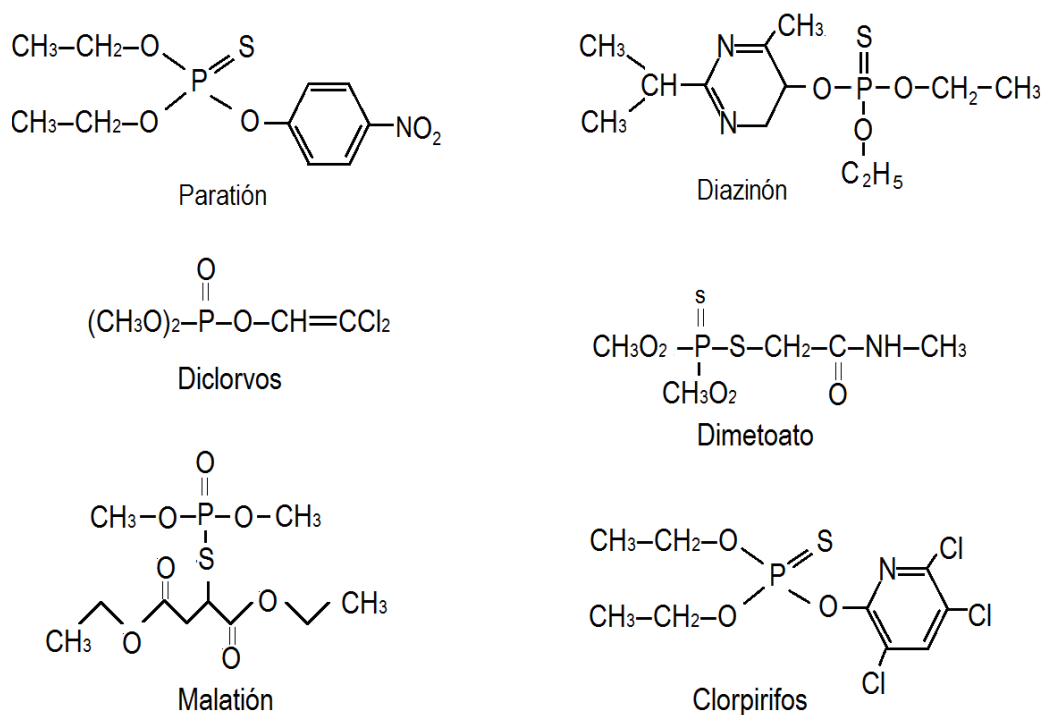


Figura 2. Principales plaguicidas organofosforados y su estructura química, compuestos por el fósforo y dobles enlaces con el azufre o el oxígeno.

Clorpirifos.

El Clorpirifos (CPR, O-O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato) es un insecticida sólido blanco cuya fórmula general es $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$, de peso molecular $350.59 \text{ g mol}^{-1}$ y un Log Kow = 4.7, de apariencia cristalina y aroma fuerte, insoluble en agua ya que produce emulsiones; para su aplicación es comúnmente solubilizado en aceites o solventes orgánicos (Dow AgroSciences 2001; Rodríguez Fuentes et al. 2008). En estado líquido posee una densidad relativa 1076 g m^{-1} con un pH de 5.19 y punto de ebullición a 143°C . Este plaguicida está compuesto principalmente de un éster de ácido fosfórico y una estructura de piridina con 3 átomos de cloro (Figura 3). El CPR ha

sido reportado como un efectivo insecticida gracias a su potencial neurológico, en lo referente a salud humana se considera en el grupo II de categoría toxicológica; registrándose niveles máximos de tolerancia en productos agrícolas de 0.05 – 0.15 ppm y en aguas para consumo humano en 0.03 mg L⁻¹ posicionando a éste plaguicida dentro del listado de sustancias peligrosas de acuerdo a la clasificación EPA (ATSDR 1997; Dow AgroSciences 2001).

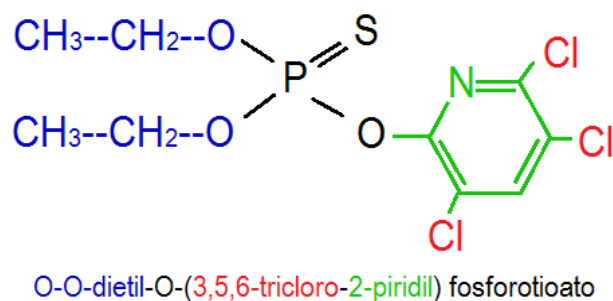


Figura 3. Se observa la estructura química del Clorpirifos y sus componentes, compuesto de radicales etilo, la fracción del éster de ácido fosfórico y su doble enlace con el azufre, así como la molécula de piridina con tres enlaces de cloro.

Se ha encontrado que la persistencia del compuesto CPR, puede ser de 30 a 60 días de vida media en suelos, y de 3 a 4 semanas en cuerpos de agua, por lo que es un compuesto con efectos sobre el medio ambiente, como se ha reportado en abejas un potencial alto de toxicidad con una DL₅₀ al contacto de 0.31 µg por organismo; en el caso de las aves la toxicidad es moderada y se presenta por ingesta con una DL₅₀ de 170 mg kg⁻¹ de codorniz; para organismos acuáticos en el pez cebra se registra una CL₅₀ a 96 horas de 2.96 mg L⁻¹ considerándolo un compuesto moderadamente tóxico (Dow AgroSciences 2001).

En México del uso de CPR, se tiene registro de un incremento durante las últimas décadas, como consecuencia de grandes inversiones para el desarrollo la agricultura y a la política pública, lo cual repercute en la introducción cada vez más frecuente de estos compuestos al medio elevando el riesgo de efectos nocivos en la biota (Albert 2005; Albert & Benítez 2005; García-Gutiérrez & Durga 2012). De manera eventual, grandes cantidades de CPR terminan por llegar a los distintos cuerpos de agua a través de transportación por aire y por agua adsorbidas a partículas disueltas (Figura 4), sin esclarecerse las cantidades exactas por la influencia de sus propiedades fisicoquímicas (Albert & Benítez 2005).

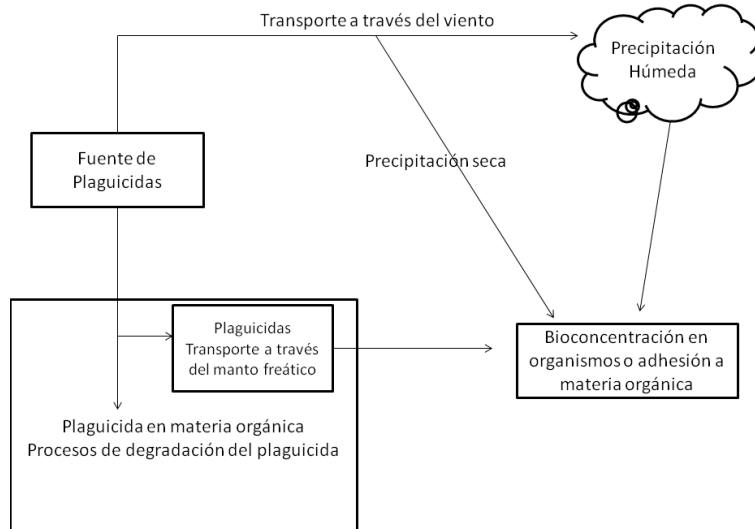


Figura 4. Vías de transporte más comunes de los plaguicidas, desde su fuente de emisión hasta su destino en ambientes u organismos acuáticos, el cual puede ser a través de adhesión a partículas o transporte activo (Albert & Benítez 2005).

El Clorpirifos es uno de los plaguicidas organofosforados más ampliamente utilizados a nivel mundial. Se utiliza para proteger una gran cantidad de cultivos como son maíz, alfalfa, cítricos, cacahuates y otros. El Clorpirifos fue lanzado al mercado en 1965. En la actualidad su uso está registrado en más de 98 países, incluyendo muchos países desarrollados. Datos reportados por Benítez *et al.*, 1996 indican que el Clorpirifos es el plaguicida organofosforado que más se emplea en la zona costera del Golfo de México, con un volumen de aplicación de 647012 kg de ingrediente activo representando el 49% del total de los organofosforados aplicados (Figura 5).

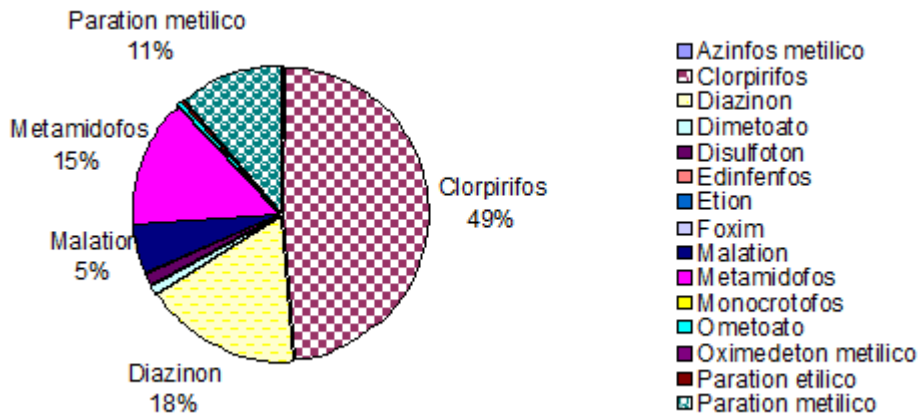


Figura 5. Porcentajes de uso de plaguicidas organofosforados para la Zona Costera del Golfo de México (datos tomados de Benítez *et al.*, 1996)

Toxicidad del Clorpirifos.

Estudios en relación con CPR indican un elevado potencial inhibitorio de las enzimas de la familia colinesterasas. Éstas son estereasas complejas que tienen alta afinidad por los enlaces éster. Son divididas en dos grupos butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8) y acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7), división basada en la preferencia por el sustrato (Nunes 2011; Rodríguez Fuentes 2005).

La enzima AChE tiene una mayor especificidad con el neurotransmisor ACh, por otro lado la BChE o colinesterasa plasmática tiene preferencia por butirilcolina. Ambas enzimas son compuestas de glucoproteínas y pueden encontrarse unidas a la membrana o ser liberadas en el espacio extracelular (Sánchez-Chávez & Salceda 2008). También se encuentran presentes en la gran mayoría de los grandes grupos de organismos, se han detectado en anélidos terrestres, parásitos, invertebrados terrestres y marinos, peces, reptiles, aves y mamíferos (Bui & Ochillo 1987; DeVos & Dick 1992; Caselli et al. 2006; Sohn et al. 2004; Leticia & Gerardo 2008; Xuereb et al. 2009; Oropesa et al. 2013; Rodríguez-Fuentes et al. 2013; Oropesa et al. 2014), Por otro lado, se han reportado organismos acuáticos que carecen del BChE, como en el pez cebra *Danio rerio* (Küster 2005; Coyac Herrera 2010).

La enzima AChE actúa hidrolizando la ACh, el cual es un transmisor químico del impulso nervioso necesario para la comunicación entre neuronas, este neurotransmisor pasa de la membrana pre-sináptica a la membrana post-sináptica (Figura 6), donde tiene preferencia sobre receptores específicos desencadenando cambios en el potencial neuronal (Timbrell 1995; Sánchez-Chávez & Salceda 2008).

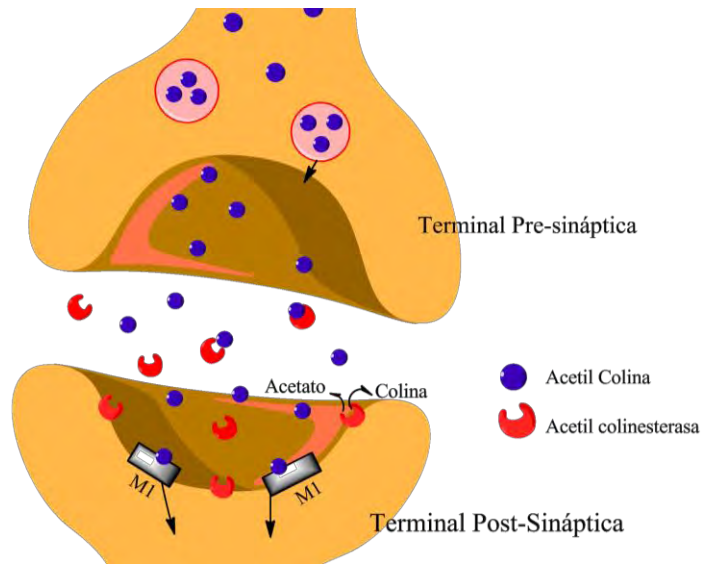


Figura 6. Transmisión de la señal nerviosa desde las terminales pre-sinápticas a los receptores (M1) de las terminales post-sinápticas, donde se observa la liberación de los neurotransmisores y como estos son hidrolizados por la enzima AChE produciendo acetato y colina.

La inhibición de la enzima por CPR es producto de una fosforilación competitiva con el sustrato ACh, donde el plaguicida tiene afinidad hacia el sitio activo de la enzima por su similitud con la acetilcolina (Timbrell 1995). Al inhabilitarse la función hidrolítica de la AChE, se produce una acumulación del transmisor en la zona post-sináptica lo que produce una excesiva estimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos (Figura 7), estas estimulaciones generan síntomas colinérgicos con muerte, resultante de una parálisis neuromuscular y depresión central por daño a los nervios periféricos. Los principales síntomas muscarínicos se consideran visión borrosa, miosis, hiperemia conjuntiva, rinorrea, broncorrea, sialorrea, náusea, vómito, diarrea, cólico abdominal, incontinencia de esfínteres y bradicardia; los nicotínicos se caracterizan por vasoconstricción periférica, calambres, mialgias, fasciculaciones, debilidad, parálisis flácida e hiperglicemia; los daños en el sistema nervioso se caracterizan por cefalea, ansiedad, confusión, irritabilidad, alteración del estado de conciencia, ataxia, depresión respiratoria y convulsiones, esta inhibición puede ser reversible o irreversible dependiendo de la naturaleza del compuesto (Timbrell 1995; Fernández A. et al. 2010).

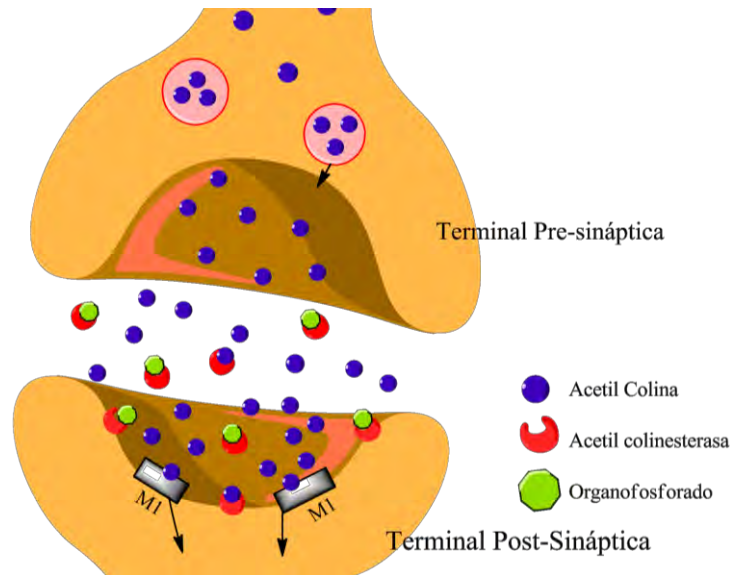


Figura 7. Bloqueo de la actividad de la enzima AChE por fosforilación del sitio activo, se observa una acumulación del neurotransmisor acetilcolina, lo que produce una sobreestimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos, lo que genera diversos síntomas colinérgicos.

La elevada afinidad de CPR con la enzima AChE ha incrementado el uso de esta como un indicador de intoxicaciones por el plaguicida (Hill et al. 2005a). Autores que han empleado el pez cebra reportan en diferentes concentraciones disminuciones en la capacidad para locomoción, latencia, incremento en el consumo de alimento pero bajo peso, disminución en longitud corporal, en el diámetro de los ojos, convulsiones, etc., reflejo de la inhibición de AChE en diferentes concentraciones y etapas de desarrollo; sin embargo, después de un prolongado estado sin exposición ciertos organismos presentan recuperación (Levin et al. 2003; Levin et al. 2004; Cook et al. 2005), la cual es atribuida a procesos de síntesis de la enzima AChE (Timbrell 1995).

En los procesos de metabolización del CPR en los organismos, destaca la catálisis de la molécula del organofosforado produciendo la separación del éster fosfórico y la piridina, proceso conocido como dearilación, que se realiza por acción de CYP resultando en compuestos que no inhiben la AChE (Dietilfosfato y TCP). Por otra parte, se producen también procesos de desulfuración donde el azufre se reemplaza por un átomo de oxígeno; dicho proceso genera un metabolito secundario que se conoce como clorpirifos-oxon, molécula responsable de la inhibición enzimática de AChE. Este proceso está relacionado con la acción oxidante del CYP (CYP2D6 y CYP3A4) dentro de la célula, responsable de la biotransformación del clorpirifos, como se observa en la imagen 8 (Sams et al. 2000; Rodríguez Fuentes. 2005).

METABOLISMO CPR

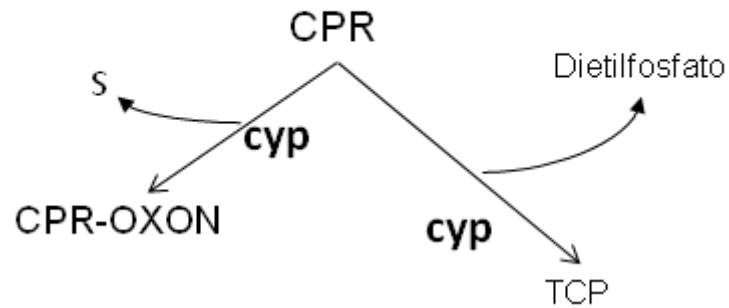


Figura 8. Metabolismo del CPR, los cuales son mediados por enzimas de la familia CYP, las cuales pueden producir dietilfosfato y TCP por dearilación o CPR-oxon por desulfuración.

Los efectos del CPR en las diferentes especies están relacionados con las concentraciones en que se presentan, la exposición y la sensibilidad de los organismos, algunos autores han reportado resistencia a los efectos del compuesto sobre la actividad de AChE en concentraciones de hasta $1000 \mu\text{g L}^{-1}$; observando un porcentaje bajo (25 a 30%) de inhibición de la enzima en cuatro especies de renacuajos (Widder & Bidwell 2008). Contrario a esto, en concentraciones de $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ del plaguicida el salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*) presentó cambios en su comportamiento, principalmente la reducción de nado y alimentación, como consecuencia de una disminución en la actividad de AChE (Sandahl et al. 2005). En varias especies se ha determinado la concentración inhibitoria media (IC_{50}) del CPR, como en el caso de *Fundulus heteroclitus* establecida en $4.7 \mu\text{g L}^{-1}$; en exposiciones a una mayor concentración ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), este organismo presenta daños en las vértebras caudales después de su desarrollo, como consecuencia de la inhibición de AChE (Thirugnanam & Forgash 1977; Karen et al. 1998). En otras especies mayores, como en el bagre australiano (*Tandanus tandanus*), se presenta una disminución de su peso corporal, un aumento en el índice hepatosomático, en la velocidad de crecimiento y en la actividad enzimática de AChE (Huynh & Nugegoda 2012). Otros autores observaron que los valores de IC_{50} se encuentran en concentraciones un poco más elevadas, como es el ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*), donde a concentraciones de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ se registra su concentración inhibitoria media, con efectos sobre el organismo reflejados en una disminución en la capacidad motriz en relación a la inhibición enzimática (Robles-Mendoza et al. 2011).

Para concentraciones más elevadas como lo son $250 \mu\text{g L}^{-1}$ algunos autores reportan en el pez cebra adulto cambios en su comportamiento y en su actividad de nado, relacionadas con síntomas colinérgicos, resultado de una inhibición de AChE por CPR (Kienle et al. 2009). Por otro lado, en etapas más tempranas concentraciones similares ($300 \mu\text{g L}^{-1}$), se ha observado daños y anomalías en la formación del exoesqueleto, como en el erizo *Paracentrotus lividus*, que a esta concentración sufre modificaciones en el ensamblaje del citoesqueleto y alteraciones del mismo, producto de la inhibición enzimática. Al incrementar las concentraciones de CPR hasta $500 \mu\text{g L}^{-1}$ el desarrollo larvario de esta especie se detiene por completo (Buono et al. 2012). Algunos autores han mantenido un porcentaje de efecto inhibitorio fijo en sus pruebas, con la finalidad de entender mejor los mecanismos de toxicidad del CPR, en este sentido se ha reportado el desarrollo del pez cebra bajo condiciones de 43% de inhibición enzimática de AChE, siendo este porcentaje suficiente para producir el desarrollo muscular de los organismos (Jacobson et al. 2010).

El mecanismo de toxicidad de los CPR no se encuentra limitado a efectos sobre la actividad de AChE y sus consecuencias, recientemente se ha descubierto que son compuestos capaces de inducir una mayor producción de ERO en las células de los organismos, esta situación conduce a estrés oxidante. En 2004 Adbollahi *et al.* plantea la hipótesis de que el CPR es productor de estrés oxidante en las células, demostrándose después por Kavitha y Rao (2007) la existencia de estrés en organismos acuáticos expuestos a concentraciones de organofosforados. López-Granero y colaboradores (2012) concluyeron una relación entre los daños cognoscitivos y estrés oxidante a través de mecanismos de respuesta en intoxicaciones por OF; Santos y colaboradores (2012) observaron que la inhibición enzimática de AChE tiene como consecuencia estrés oxidante en las células cerebrales. De igual manera Salyha (2013) demostró la presencia de estrés oxidante en células del hipocampo expuestas a CPR.

Estrés oxidante.

Entre las principales especies reactivas de encuentras las ERO por su abundancia y capacidad de oxidar una gran diversidad de compuestos (Abdollahi et al. 2004; López 2008; Salyha 2013). Además de factores externos de producción de ERO, se ha reportado la generación de estas especies por vías endógenas como lo es una reducción incompleta de la molécula del agua o por el sistema de NADPH oxidasas, metabolismo celular, parasitismo y respiración celular (Dalton et al.

1999; Gamaley & Klyubin 1999; Elejealde Guerra 2001; Dautremepuits et al. 2003), lo que desencadena en el organismo la regulación funciones celulares, procesos transcripcionales y post-transcripcionales (enzimas antioxidantes y proteínas estructurales) a través de señales simples provenientes de reacciones redox, ejemplo: cambios en tioles intracelulares (Chandan & Packer 1996; Chaudière & Ferrari-iliou 1999; Dalton et al. 1999; Gamaley & Klyubin 1999). La producción endógena de ERO es controlada mediante mecanismos antioxidantes, evitando una sobreproducción y daño celular. Existen adaptaciones enzimáticas y moleculares que les confieren protección y regulación de los niveles endógenos de radicales libres, (Julka et al. 1992; Chaudière & Ferrari-iliou 1999; Avello & Suwalsky 2007; Limón-Pacheco & Gonsebatt 2009; Mayor Oxilia 2010). Dentro de los mecanismos antioxidantes enzimáticos encontramos a las enzimas SOD, CAT, GPx y GR. Por otro lado los mecanismos de regulación antioxidante no enzimáticos están compuestos principalmente por la molécula Glutación, vitamina C, entre otros. En diversos organismos se han registrado la existencia de diversas enzimas involucradas en el mantenimiento del estado redox celular las más estudiadas son CAT y SOD (Kale et al. 1999; Lionetto et al. 2003; López 2008). Uno de los biomarcadores no enzimáticos del balance antioxidante del organismo es la molécula glutación, antioxidante sintetizado en las células del organismo que se ve afectado por la introducción de xenobióticos y en respuesta a situaciones de estrés oxidante, lo cual se refleja principalmente en el desbalance en la regulación de sus formas sulfhidrilo y disulfuro (Peña et al. 2000; Peña-Llopis et al. 2001; Peña-Llopis et al. 2003; Oñate Mardones 2009). Así mismo, la peroxidación de lípidos es buen indicador del daño por estrés oxidante, pues los radicales libres producidos atacan los ácidos grasos poli-insaturados de las membranas celulares, en una reacción en cadena de peroxidación (Banerjee et al. 1999; Velásquez 2000; Goel et al. 2005).

Una situación de estrés oxidante puede conducir a daños celulares importantes y hasta la muerte del organismo, la peroxidación lipídica, la cual es considerada evidencia de daño por estrés oxidante en el organismo. Esta alteración consiste en la formación de hidroperóxidos lipídicos provenientes de los ácidos grasos poliinsaturados y saturados de las membranas celulares (Banerjee et al. 1999; Kale et al. 1999; Abilés 2007). La formación de hidroperóxidos es inducida por una ERO (HO^\cdot) que reacciona con el grupo metilo de los ácidos grasos sustrayendo un hidrógeno de la cadena lateral produciendo un radical carbonado (1, Figura 9), éste reacciona con el oxígeno molecular para formar una radical lipoperoxido (2, Figura 9); finalmente este radical altamente reactivo reacciona con el ácido graso adyacente sustrayendo el H para finalmente

convertirse en un producto estable denominado hidroperóxido lipídico (3, Figura 9), quedando nuevamente un radical lipoperóxido que reacciona de nuevo con otro ácido graso generando una reacción en cadena (Avello & Suwalsky 2007).

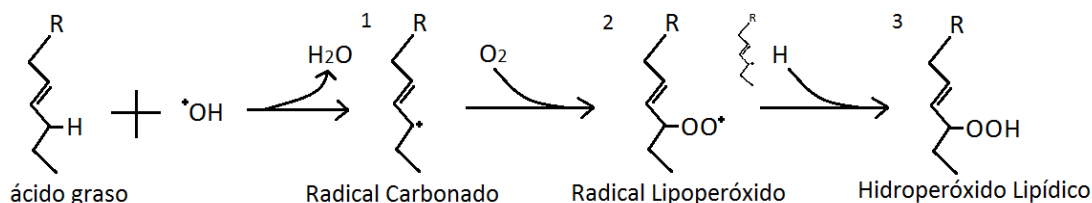


Figura 9. Reacción en cadena de la formación de hidroperóxidos lipídicos como producto de una reacción con radicales libres hidroxilo, reaccionando para formarse radicales carbonados (1), una interacción con oxígeno molecular produce radicales lipoperóxido (2) altamente reactivo que toma el H del ácido adyacente para el producto hidroperóxido (3).

La presencia de ERO puede también repercutir en la célula a un nivel de daño más amplio desencadenando apoptosis en la misma; la apoptosis es definida como la muerte o finalización de las actividades celulares de forma programada o controlada, las células que presentan apoptosis son aquellas con cambios morfológicos característicos así como las que presentan cambios bioquímicos irreversibles. La apoptosis celular se lleva a cabo por un grupo de enzimas proteasas denominadas Caspasas, las cuales son las encargadas de finalizar las funciones celulares por descomposición; estas enzimas se presentan por una reacción sintetizadora en cadena que incrementa su número de manera exponencial. Una de las causas para que inicie la reacción en cadena de las Caspasas es por daños en la mitocondria, ésta al sufrir modificaciones irreversibles libera proteínas especializadas que se encuentran en el espacio intermembranal que desencadena la síntesis de las enzimas proteolíticas (Alberts et al. 2008). Una de las evidencias del daño del estrés oxidantees la presencia de apoptosis celular, a través de daños por oxidación en la mitocondria producto de las especies reactivas de oxígeno, estas afecciones resultan de la fosforilación de la triosina lo que induce cambios en la mitocondria que provocan la activación de las Caspasas (Simon et al. 2000; Deng et al. 2009; Gupta et al. 2010).

El estrés oxidante es un estado celular de los organismos, durante el cual existe un desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno o radicales libres y las defensas antioxidantes del mismo, estas situaciones pueden ser provocadas por agentes externos o internos. Los radicales

libres son considerados como moléculas y/o elementos con uno o más átomos no pareados y son capaces de una gran reactividad (Abdollahi et al. 2004; López 2008; Salyha 2013).

Por otro lado existen compuestos pro-oxidantes naturales o sintéticos, dentro de los sintéticos podemos mencionar el tertbutil hidroperóxido (hidroperóxido de tertbutilo, hidroperóxido de dimetilo), compuesto con el grupo funcional hidroperóxido (HOOH') de peso molecular 90.14, cuya fórmula química es (CH₃)₃COOH, es un líquido incoloro con olor acre con punto de ebullición de 89°C y de fusión de -3°C. Este compuesto se obtiene por adición catalizada con ácido sulfúrico, de peróxido de hidrógeno al isobutileno, conocido como catalizador de oxidaciones entre otros (INSHT 1994; Seymour & Carraher 2002; Cedeño-Caero et al. 2005).

Defensas antioxidantes.

La SOD (EC 1.15.1.1) es una enzima de sustrato específico que se encuentra en la mitocondria y en el citosol de la célula, es considerada como una metaloenzima de organismos aerobios. Se ha estudiado su síntesis a partir de la oxidación de la hemoglobina por metalohemoglobina en el fluido sanguíneo, en otros tejidos se forma por acción de Citocromo P450 reductasa y por la xantina oxidasa; esta enzima tiene un arreglo de grupos cargados en la superficie que funcionan como guía electrostática de los sustratos hacia el sitio activo permitiéndoles tener varias reacciones catalíticas cada vez que coinciden con moléculas sustrato (Hassan 1988; Murray et al. 2003; Voet & Voet 2011). El incremento en la síntesis es por un aumento en la presencia de sustrato, y es considerada por algunos autores como la principal línea de defensa de los organismos ante ERO (Hassan 1988; Murray et al. 2003; Yan et al. 2008). La enzima SOD protege a la célula del radical Superóxido (O₂^{•-}) a través de una reacción de dismutación (Figura 10) teniendo como sustrato dos moléculas O₂^{•-} y como producto un O₂ y una molécula de peróxido de hidrógeno (Hassan 1988; Lehninger 1995; Berg et al. 1995).

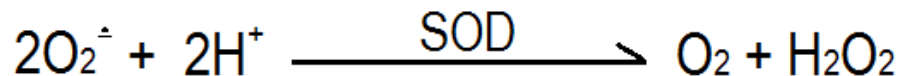


Figura 10. Ecuación de dismutación del ion superóxido a través de la enzima SOD.

La CAT (EC 1.11.1.6) perteneciente al grupo de las hemoenzimas o hemoproteínas cuya característica principal es la conformación por un grupo de ferroprotoporfirina, puede ser

encontrada en la mayoría de las células de los organismos principalmente en los peroxisomas celulares; durante su acción catalítica presenta cambios transitorios en la unión del sitio activo con el sustrato, por la formación y descomposición del complejo (Lehninger 1995; Murray et al. 2003). La CAT provee acción protectora de los radicales libres teniendo como sustrato el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mediante un proceso de dismutación del radical (Figura 11) dando como producto una molécula de oxígeno y dos moléculas de agua (Berg et al. 1995; Voet & Voet 2011).

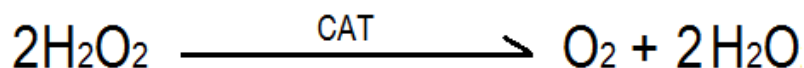


Figura 11. Proceso de dismutación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno en una molécula de oxígeno y dos de agua, por acción de la enzima antioxidante CAT.

La enzima GPx (EC 1.11.1.9) es una proteína que contiene un residuo de selenocisteína como sitio activo, resultante de la conversión del Selenio (Se) en un bioelemento capaz de accionar catalíticamente con el sustrato empleando otras sustancias como aceptores de electrones. La GPx tiene como sustrato el peróxido de hidrógeno y radicales peróxido los cuales metaboliza para la obtención de agua y alcohol, sin embargo como se menciona anteriormente se auxilia de otro co-sustrato para poder llevar a cabo la reacción (Berg et al. 1995; Murray et al. 2003; Kulinsky & Kolesnichenko 2009). La molécula de glutatión es empleada por la GPx para la metabolización de los radicales libres empleando 2 moléculas de glutatión sulfhídrido (GSH) y el sustrato, resultando en una molécula de glutatión disulfuro (GSSG), agua y un alcohol (Figura 12).

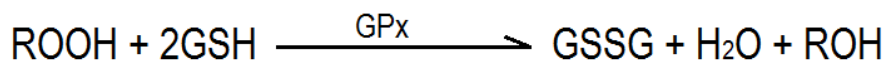


Figura 12. Reacción catalítica de la enzima GPx, enzima antioxidante que utiliza como sustrato aceptor de protones la molécula de glutatión reducido, para obtener glutatión oxidado y transformar el radical peróxido en alcohol.

La reacción en el sitio activo de la enzima inicia cuando el peróxido es reducido en alcohol en la forma selenolato del sitio activo, convirtiendo a éste en ácido selénico, quien posteriormente en conjunto con una molécula de GSH produce la liberación de agua convirtiendo el ácido del sitio activo en forma selenosulfato, ésta regresa a su forma original de selenolato al presentarse una segunda molécula de GSH la cual es metabolizada en GSSG (Figura 12) para producir el ciclo de la oxidación de la molécula de glutatión, uno de los papeles de desintoxicación más importantes y

cruciales contra las especies reactivas producidas por xenobióticos, cuya importancia es mayor que la desintoxicación por la enzima CAT (Doroshov 1995; Berg et al. 1995; Kulinsky & Kolesnichenko 2009).

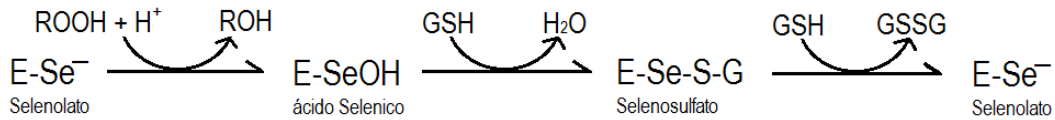


Figura 13. Modificaciones que se presentan en el sitio activo de la enzima GPx durante el proceso de catálisis de radicales libres donde se emplean dos moléculas de glutatión sulfhidrilo, mediante cambios del residuo de selenocisteína (selenoato) pasando por ácido selénico, selenosulfato y de regreso a su forma original.

La GRed (E.C. 1.6.4.2), actualmente conocida también como glutatión disulfuro reductasa (E.C. 1.8.1.7) es una flavoproteína asociada al ciclo pentosa-6-fosfato; esta enzima emplea $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ como fuente de electrones para llevar a cabo su acción catalítica. Esta proteína es un dímero homólogo de otras enzimas compuestas de Fe^+ , cuya principal función está asociada al ciclo del glutatión reduciendo su forma disulfuro a sulfhidrilo con auxilio de una fuente de electrones (Figura 13), los cuales no son directamente transferidos al enlace disulfuro del glutatión oxidado, sino mediante un enlace en el sitio activo (sitio FAD) en la enzima y subsecuentemente a la molécula oxidada (Berg et al. 1995; Berg et al. 2003; Voet & Voet 2011).

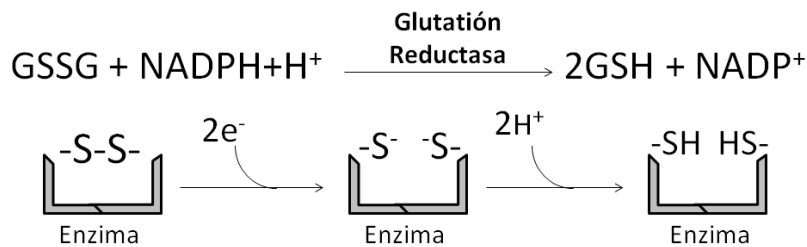


Figura 14. Ciclo de actividad de la enzima GR, el cual emplea un donador de protones para poder llevar a cabo la reducción de glutatión oxidado a disulfuro como se observa en la ecuación, la sección inferior se refiere al sistema que emplea la enzima para poder reducir el GSSG.

Entre los principales antioxidantes no enzimáticos se encuentra la molécula de glutatión (γ -glutamilcisteinglicina, Figura 14), tripéptido no protéico formado por restos de ácido glutámico que se encuentran unidos por un enlace inusual donde interviene un grupo γ -carboxilo. Su síntesis se lleva a cabo durante dos grandes etapas, donde el glutamato, la cisteína y el ATP son

metabolizados por la γ -Glutamilcisteina sintetasa generando una molécula de γ -glutamilcisteina; en una segunda etapa la γ -glutamilcisteina, la glicina y una segunda molécula de ATP son procesadas por la enzima Glutación sintetasa para producir el tripéptido (Lehninger 1995; Voet & Voet 2011).

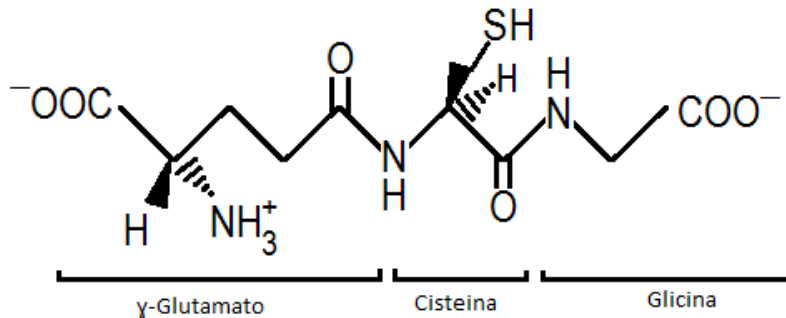


Figura 15. Molécula del tripéptido glutación (γ -glutamilcisteinglicina) proveniente de residuos de ácido glutámico mediante unión inusual del carboxilo γ (modificada de Berg et al. 1995).

El glutación es una molécula con diversas funciones, como el transporte de aminoácidos extracelulares al interior de la misma, por procesos de catálisis y síntesis de la molécula; así mismo participa en la activación de diversas enzimas principalmente de protección celular y mantiene los niveles de grupos sulfhidrilo de proteínas intracelulares, a través de un equilibrio entre su forma reducida y su forma oxidada. De igual manera la proporción entre estas formas es un sistema efectivo de protección antioxidante, donde el equilibrio entre las especies es mantenido con la intervención de las enzimas antioxidantes GPx (que oxida el GSH a su forma GSSG) y GR que restablece los niveles de GSH (Figura 16), el poder reductor esta mediado por la presencia de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ proveniente de la vía pentosa-6-fosfato (Berg et al. 1995; Lehninger 1995; Cnubben et al. 2001; Murray et al. 2003; Voet & Voet 2011).

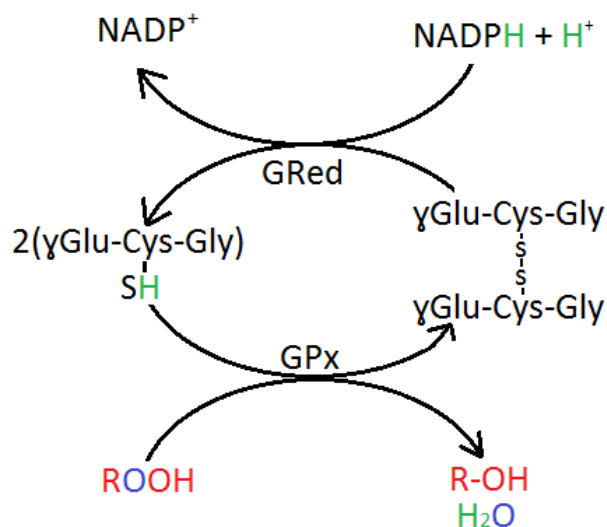


Figura 16. Sistema glutatión para la conjugación de radicales libres generadoras de estrés oxidante, donde participan las enzimas Glutatión peroxidasa (GPx), Glutatión reductasa (GR), el tripeptido en su forma sulfhidrilo (GSH) y su forma disulfuro (GSSG); en color rojo con azul se encuentra el radical libre, en color rojo el grupo alcohol resultante de la catálisis de GPx, así como la molécula de agua con los electrones (en verde) provenientes de la reducción de GSSG a GSH (modificado de Peña-Llopis et al. 2003).

Por otro lado, también se tiene reportado, la capacidad de la molécula glutatión para conjugar compuestos xenobióticos incrementando su solubilidad (Figura 17), y como proveedor de identificadores que los reconocen como blancos de excreción (Berg et al. 1995).



Figura 17. Conjugación de la molécula de glutatión, cuando ésta realiza uniones para incrementar la solubilidad de compuestos xenobióticos en el organismo (tomado de Berg et al. 1995).

Se ha registrado que los contenidos del tripéptido, así como su síntesis incrementan en presencia de compuestos xenobióticos, como resultado del combate a las especies que producen estrés oxidante, una coordinación del sistema glutatión (GSH/GSSG, enzimas de reducción, peroxidación y síntesis) es esencial para una defensa efectiva (Peña et al. 2000; Cnubben et al. 2001; Peña-Llopis et al. 2001). En una intoxicación por organofosforados, se sabe que la estimulación de la síntesis del glutatión produce un aumento en la supervivencia de los organismos, actuando como un

sistema para contrarrestar el daño por el compuesto (Peña-Llopis et al. 2003; Antolino-Lobo et al. 2011).

Existen otras moléculas con carácter de antioxidantes, las cuales pueden ser metabolizadas por el organismo o incorporadas por ingesta, como es el caso de la vitamina C (ácido ascórbico) el cual es considerado el azúcar ácido más importante en los organismos principalmente por su rol antioxidante. Éste compuesto es un derivado de la γ -lactona de un ácido hexónico; su síntesis proviene de la oxidación del compuesto L-gulono- γ -lactona en ácido L-ascórbico; este compuesto también actúa en la síntesis de colágeno a partir de la activación enzimática de propil-hidroxilasa, de igual manera participa de auxiliar en el mantenimiento de otras vitaminas y en la reducción de peroxidación lipídica; puede presentarse en tres formas (Figura 18) la reducida o ácido ascórbico, su forma antioxidante o ionizada (ascorbato) y su forma oxidada conocida como ácido dehidroascórbico (Berg et al. 1995; Lehninger 1995; Murray et al. 2003; Mancilla Chávez 2010; Voet & Voet 2011).

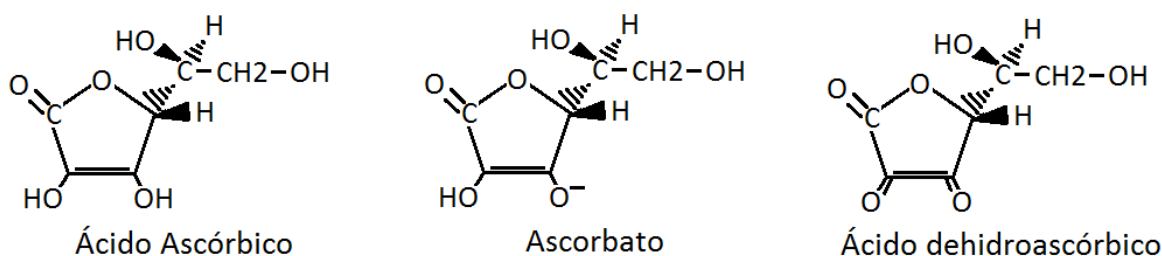


Figura 18. Formas en las cuales puede presentarse en el organismo la vitamina C, a es sintetizada como ácido ascórbico, su forma ionizada en ascorbato y ácido dehidroascórbico como forma oxidada con elevado potencial antioxidante.

La capacidad antioxidante de la vitamina C tiene una importancia relevante en los últimos años, siendo evidente su capacidad para atenuar la peroxidación lipídica de las células cuando existe un incremento de radicales libres (Gultekin et al. 2001; Vismara et al. 2001; Carvalho et al. 2004; Özcan Oruç 2010).

Mecanismos antioxidantes.

El compuesto CPR en su estructura original no presenta daños o reacciones sobre los organismos, sin embargo existe una acción enzimática sobre el mismo. El CPR es metabolizado por enzimas de la familia CYP (CYP2D6 y CYP3A4) que lo oxidan en su fracción CPR-oxon que es un inhibidor enzimático de AChE (Sams et al. 2000), dicha inhibición tiene como resultado el incremento del

neurotransmisor acetilcolina estimulando los receptores muscarínicos de las células neuronales, desencadenando una hiperexcitación neuronal y convulsiones, con lo cual se liberan aminoácidos excitatorios al exterior de la célula, elevadas concentraciones de estos aminoácidos producen un aumento en la actividad del receptor N-metil-D-aspartato permitiendo un flujo de ion Ca^{2+} al interior de la célula, estos iones incrementan la actividad de enzimas proteolíticas, síntesis de óxido nítrico y radicales libres (Peña-Llopis et al. 2003). Otra de las vías de producción de radicales libres y EROs es la actividad y síntesis de enzimas CYP, generando radicales superóxido e incrementando los niveles de estrés en la célula (Cederbaum 1989, Lushchak 2011). Por otro lado, el radical superóxido es una de las especies reactivas que se producen con mayor frecuencia en el organismo ej. la producción de ATP en la respiración aeróbica, si dicha molécula es metabolizada por acción de la SOD dando como residuo una molécula de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es catalizado por la enzima CAT en una molécula de oxígeno y dos de agua (Berg et al. 1995; Lehninger 1995). Por otro lado, la enzima GPx lleva a cabo la metabolización del peróxido en agua y radicales OH, a través del co-factor molecular glutatión mediante la transferencia de electrones oxidándolo a su forma disulfuro; Esta molécula es reducida por la enzima glutatión reductasa a su forma glutatión, donde nuevamente está disponible para la reducción de peróxidos a través del ciclo del glutatión (Lehninger 1995; Kulinsky & Kolesnichenko 2009). En este ciclo, se tiene evidencia de la participación de diversas enzimas ajenas al mismo, que regulan los contenidos de la molécula, ya sea en su forma disulfuro o en su forma reducida (GSSG ó GSH) como son las proteínas asociadas a la resistencia a multidrogas (MRP) y la glutatión transferasa (GST) respectivamente (Choi et al. 2006, Regoli et al. 2011).

Pez cebra (*Danio rerio*).

En los últimos años el uso del pez cebra *D. rerio* como modelo para pruebas toxicológicas se ha incrementado, una de los principales motivos es su rápida adaptabilidad a condiciones de cautiverio, fácil manejo y relativamente bajo costo de manutención. Igual son adecuados para experimentación en campo y en laboratorio por su sencilla manipulación y suficiente información de su desarrollo, y genética. Para análisis toxicológicos sobre el desarrollo embrionario se han posicionado también como el modelo ideal gracias a la relativamente sencilla visibilidad que proporcionan gracias a la transparencia del embrión; por otro lado su sensibilidad a diferentes compuestos químicos le permite proveer un sinfín de información sobre los mecanismos de toxicidad de los compuestos con los que se experimenta. Sumado a esto, los avances en todos los

campos experimentales, una manipulación genética sencilla, tamaño pequeño, bajo costo, rápido desarrollo, fecundación y desarrollo externo, así como una gran gama de mutaciones le posicionan como un excelente modelo para pruebas de toxicidad (Kimmel et al. 1995; Estepa 2001; Hill et al. 2005a; Deng et al. 2009; Lessman 2011).

Objetivos.

Objetivo general.

Determinar el efecto del estrés oxidante en la expresión genética y la actividad de la enzima Acetilcolinesterasa durante una intoxicación por CPR, en embriones de *D. rerio*.

Objetivos particulares.

1.- Determinar el efecto del plaguicida CPR en la actividad y expresión relativa de la enzima Acetilcolinesterasa en embriones de pez cebra (*Danio rerio*).

2.- Valorar los efectos del CPR en el desarrollo de los embriones del pez cebra mediante variables morfológicas (presencia de edemas en el pericardio o saco vitelino, lordosis, cifosis, longitud total) y fisiológicas (ritmo cardíaco, mortalidad, eclosión).

3.- Evaluar el efecto del CPR sobre el balance redox celular mediante la cuantificación de la actividad y la expresión genética de las enzimas CAT, SOD; así como el contenido total de glutatión y determinar el estrés oxidante mediante los niveles de peroxidación lipídica.

4.- Determinar el impacto de agentes anti y pro oxidantes en los diferentes biomarcadores de estrés oxidante y su efecto en la actividad y transcripción de la AChE durante una intoxicación con CPR

Hipótesis.

Existirá un incremento en la expresión genética y en la inhibición enzimática de la enzima AChE al incrementar la concentración de CPR. La exposición a CPR producirá estrés oxidante, lo cual generará una regulación negativa en la transcripción y actividad de AChE cuyo efecto disminuye al adicionar un compuesto antioxidante como la vitamina C y cuyo efecto se incrementa al adicionar el compuesto prooxidante tertbutil hidroperóxido.

Materiales y Métodos.

Origen y mantenimiento de organismos.

Los organismos fueron adquiridos directamente de la granja piscícola “Enmanuel” ubicada en la carretera Hunucmá – Sisal, en Yucatán, México. Se inició con aproximadamente 150 organismos machos y 150 hembras (Figura 19). Los cuales fueron aclimatados en peceras de 40 litros durante aproximadamente dos meses, se les administró alimento en hojuelas 3 veces al día, y alimento vivo que consistió ocasionalmente de *Artemia sp* y una vez al día por *Daphnia sp*. Las condiciones durante su alimentación y crecimiento consistieron en mantener un pH entre 7 – 8; temperatura entre los 24 y 28 °C; salinidad no mayor a 0.3 ‰ y densidad de 5 organismos/litro en acuarios de 40 litros (Lawrence 2007). Los organismos fueron separados por género en adultos reproductores. Las condiciones ambientales en el agua fueron preservadas mediante recambios parciales del agua cuando las condiciones cambiaban, en periodos quincenales mediante un constante monitoreo de los parámetros.

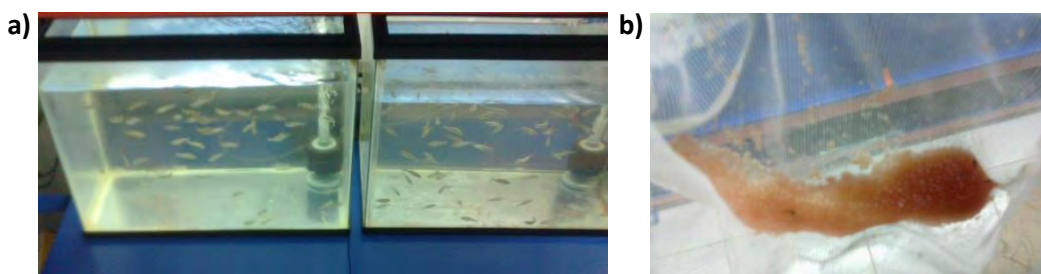


Figura 19. a) Acuarios de aclimatación por género de los adultos reproductores. b) Recolección de embriones utilizados en los biensayos, para su posterior limpieza.

Una vez que los organismos reproductores alcanzaron las condiciones deseadas para su desove, fueron seleccionados mediante observación las hembras más grandes con la finalidad de obtener el mayor número de embriones fertilizados. Estos fueron separados en peceras con una proporción de aproximadamente de 14 hembras y 8 machos en un mismo acuario. Dichas peceras fueron adaptadas con trampas de eclosión diseñadas especialmente para los desoves (Figura 20). Las condiciones del agua fueron similares a las de la aclimatación y la temperatura se mantuvo a 28 °C utilizando termostatos para acuario, con la finalidad de proveer las condiciones ideales para el desove, el cual sucede al amanecer (Lawrence 2007; Uusi-Heikkilä et al. 2010; Spence et al. 2008).

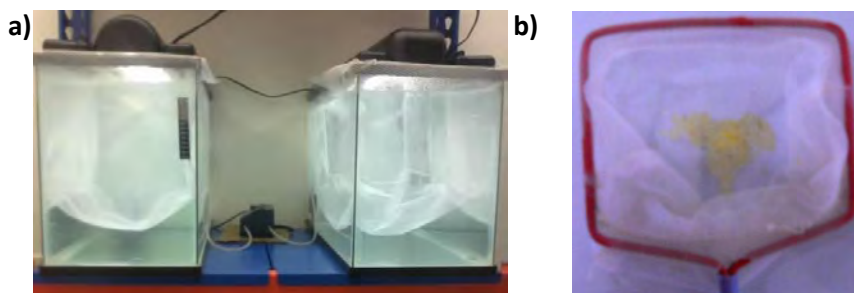


Figura 20. a) Peceras instaladas con trampas de eclosión conteniendo a los machos y hembras, los embriones por gravedad permanecen en el fondo, lejos de la depredación de los adultos. b) Se observa un grupo de huevos fecundados y limpios que serán separados y empleados para su exposición (fotos: Rubio-Escalante 2012).

Exposición de embriones

Una vez obtenidos los embriones fecundados, en un tiempo no mayor a dos horas después de la misma se procedió a la colecta, así como a su limpieza con agua del mismo estanque y su posterior exposición. Se realizaron tres bioensayos en total. Se colocaron 50 embriones fecundados en cada pozo de una placa de exposición, para un total de tres réplicas por cada variable a analizar, con un total de 18 pozos por cada exposición (Figura 21). Cada tratamiento tenía embriones suficientes para realizar seis análisis diferentes por triplicado cada uno de ellos (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis realizados por tratamiento para la cuantificación de las variables en cada uno de los distintos bioensayos.

Ensayo	Variable	Ensayo	Variable
1	Actividad AChE	4	Actividad CAT
2	Glutatión Total	5	Actividad SOD
3	Biología Molecular	6	Peroxidación lipídica

Las exposiciones se realizaron utilizando Clorpirifos como organofosforado tóxico, antioxidante Vitamina C y pro-oxidante el tert-butil hidroperóxido de marca Sigma-Aldrich grado reactivo. Una vez separado el número de embriones fecundados para cada réplica, se colocaron 5 ml de cada solución de exposición por pozo por tratamiento. Todos los bioensayos contaron con un tratamiento control (agua) y un control solvente (agua más etanol al 0.01%). El primer bioensayo consistió en exposiciones de 200, 400 y 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Clorpirifos. En el segundo ensayo se utilizó una concentración de 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Clorpirifos en combinación con 200, 400 y 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ de antioxidante (Vitamina C, ácido ascórbico), así como exposiciones conteniendo únicamente la vitamina C en esas mismas concentraciones. Finalmente se realizó un tercer bioensayo empleando

los mismos valores y combinaciones que en el bioensayo dos utilizando esta vez el pro-oxidante, en la tabla 2 se presenta un resumen de los tratamientos utilizados.

Tabla 2. Distribución de los tratamientos aplicados para los bioensayos, junto con sus respectivas combinaciones, cada uno con 3 réplicas.

	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3	Trat. 4	Trat. 5	Trat. 6	Trat. 7	Trat.8
Bio. A	H ₂ O	ET al 0.01%	200* CPR	400* CPR	800* CPR			
Bio. B	H ₂ O	ET al 0.01%	200* VIT	400* VIT	600* VIT	200* VIT + 400* CPR	400* VIT + 400* CPR	600* VIT + 400* CPR
Bio. C	H ₂ O	ET al 0.01%	200* TB	400* TB	600* TB	200* TB + 400* CPR	400* TB + 400* CPR	600* TB + 400* CPR

* = Concentración en $\mu\text{g L}^{-1}$; CPR = Clorpirifos; VIT = ácido ascórbico; Bio = Bioensayo
TB = Tert-Butil Hidroperóxido; H₂O = agua de garrafón; ET = etanol; Trat. = tratamiento.

Cada bioensayo tuvo una duración de 72 horas a una temperatura de 27° C, con un fotoperiodo de 12:12 horas, luz: oscuridad.

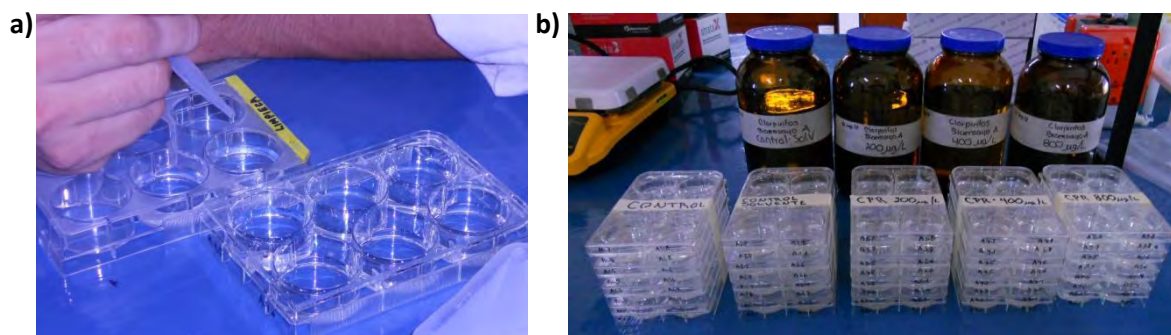


Figura 21. a) Manipulación de embriones dentro de las placas, para su posterior exposición. b) Placas de exposición de 6 pozos cada una, en la imagen se aprecian las exposiciones para el bioensayo a, con las diferentes concentraciones de CPR antes de ser colocadas en la zona de exposición.

Al finalizar la exposición de los embriones, se procedió a su recolección en tubos para microcentrífuga de capacidad 1.5 ml. Una vez que se obtenían todos los embriones fueron sacrificados por choque hipotérmico y las muestras fueron fijadas en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su posterior análisis.

Análisis de muestras

Análisis morfométrico

La morfología y fisiología de los organismos se realizó con un microscopio Micromaster de Fisher Scientific® a un objetivo de 4x, dicho microscopio se encuentra equipado con una cámara de alta definición Real View System que se encuentra conectado a un software especializado, mediante el cual se pudieron realizar observaciones en vivo de los organismos, así como la toma de imágenes de alta resolución al finalizar el periodo de exposición (Figura 22).



Figura 22. Dispositivo empleado para la observación y medición de los parámetros fisiológicos y morfológicos de embriones de pez cebra.

Una vez finalizado el tiempo de exposición de los organismos, y previo a su preservación se realizaron observaciones de 48 organismos seleccionados al azar por cada tratamiento, los cuales fueron fotografiados y posteriormente analizados para determinar la presencia de anomalías durante el desarrollo, evaluando si existen o no edemas en el área del pericardio y el saco vitelino, así como malformaciones de la columna vertebral. Estas alteraciones morfológicas han sido identificadas como consecuencia de exposición a contaminantes (Kienle et al. 2009; Hallare et al. 2005; Hallare et al. 2006; Hill et al. 2005b). El análisis de las imágenes se realizó con el uso de software libre Image J transformando la medición de píxeles en mm a través del mismo, para la calibración de dicha medida fue necesario el uso de un portaobjetos especializado Nikon® (Frayse et al. 2006; Johnson et al. 2007). La longitud total se obtuvo midiendo desde el inicio de la notocorda hasta la punta final de la cola de manera lineal, la medida del pericardio fue obtenida a través del cálculo del área de un polígono que rodea el pericardio (Figura 23). Para determinar la presencia de “lordosis o cifosis” (arqueo cóncavo o convexo de la columna vertebral respectivamente) se dibujó una línea desde el tercer somita de la notocorda hasta el final de la misma, si la columna se sitúa por debajo de la línea corresponde a un organismo con cifosis, en caso contrario (columna por arriba de la línea) es un caso de lordosis (Frayse et al. 2006).



Figura 23. Medición de organismos empleando las técnicas de Fraysse y colaboradores (2006) con la finalidad de observar la presencia de alteraciones producto de la exposición a organofosforados a) organismo control, longitud total y medidas del área de pericardio en mm b) organismo afectado por malformación cóncava denominada lordosis.

Análisis Fisiológico.

En las alteraciones fisiológicas, se cuantificó el número de latidos del organismo en un lapso de diez segundos, gracias a las observaciones en tiempo continuo utilizando el microscopio y la cámara de alta resolución. Se contabilizaron 24 embriones por tratamiento, los cuales fueron seleccionados al azar; así mismo el registro del número de latidos fue mediante el uso de contadores y el tiempo de conteo se mantuvo homogéneo gracias al uso de un temporizador sencillo (Fraysse et al. 2006). El porcentaje de mortalidad se calculó a partir del número de organismos que mostraron un estado evidente de muerte, como son embriones blancos o que no presentaron movilidad ni ritmo cardíaco incluso después de una estimulación mecánica. El porcentaje de eclosión se obtuvo a partir del número de organismos que se encontraban completamente fuera del corion, el cual se lleva a cabo después de 48 hrs en condiciones naturales (Figura 24).

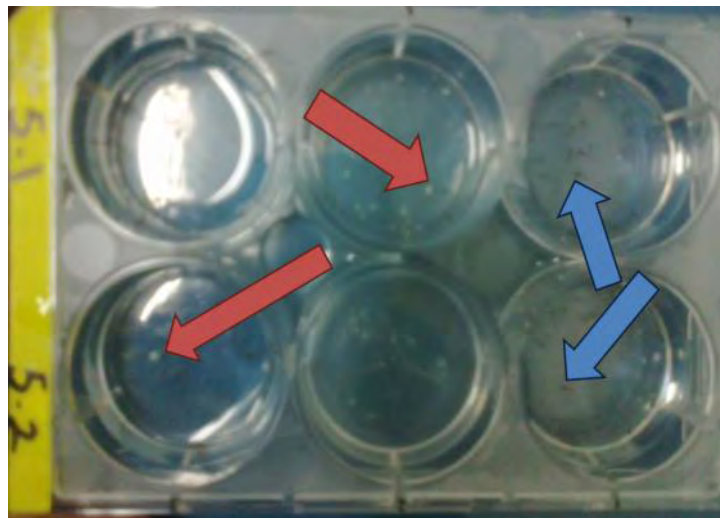


Figura 24. Cuantificación de los organismos muertos después de las 72 horas de exposición para los diferentes tratamientos, al igual que los organismos eclosionados. Los organismos muertos están señalizados por las flechas color rojo, y los eclosionados por las flechas azules.

Análisis Bioquímicos

Se cuantificó la actividad enzimática de la AChE, así como marcadores de estrés oxidante, se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD. Así mismo, el contenido de glutatión total (reducido + oxidado) y la cantidad de hidroperóxidos lipídicos.

Actividad Enzimática de la Acetilcolinesterasa.

La actividad enzimática de Acetilcolinesterasa (AChE) fue cuantificada mediante el método de Ellman acoplado a microplaca (Rodríguez Fuentes et al. 2008, Anexo 1), este método consiste en la cuantificación de la actividad enzimática mediante la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina (ASChI) por parte de AChE; el cual se lleva a cabo en un medio que contiene 5'5 ditiobis (2-acido nitrobenzoco; DTNB), mismo que reacciona con tiocolina uno de los productos de la catálisis enzimática de ASChI, la reacción produce una coloración amarilla que es sensible a una longitud de onda de 405 nm. El método para medir la actividad de la enzima se basa en la cinética enzimática de la AChE, la lectura de la absorbancia es realizada a diferentes tiempos para obtener así el cambio de la absorbancia por minuto (Figura 25). Los resultados se normalizan respecto al contenido total de proteína mediante el método de Bradford et al., 1976 (Anexo 2) modificado a microplaca, el cual se basa en la tinción de la proteína por reacción intermolecular con azul de Comassie, el cual presenta una coloración marrón en su forma original, esta coloración cambia a azul por interacción con el grupo aniónico y el grupo amino de los aminoácidos que componen la proteína mediante una unión electrostática (Fazekas et al. 1962; Reisner et al. 1975; Compton & Jones 1985). Para cuantificar el contenido de proteína, se realizó una curva de calibración utilizando suero albumina (SAB) de Fluka analytical®, en concentraciones conocidas de 0 hasta 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ como estándar. La absorbancia se determinó mediante un espectrofotómetro de placas a una longitud de onda de 595 nm.

$$\text{Actividad en } \mathbf{nmol\ min^{-1}\ mg^{-1}} = \left(\frac{1}{10000} * \frac{\Delta Abs / min}{(Vh/Vt) * CP} \right) * 1000000$$

Figura 25. Ecuación para la determinación de la actividad enzimática de Acetilcolinesterasa, donde 1/10000 representa el coeficiente de extinción del TNB por pozo de microplaca. En la segunda sección de la ecuación la pendiente es representada por el cambio en absorbancia por minuto, que se encuentra normalizado por el volumen total de muestra entre el

volumen total del pozo y el contenido proteico (CP) obtenido mediante el método de Bradford, al final se multiplica por 1000000 para convertir de $M \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ a $\text{nmol}^{-1} \text{ min mg}^{-1}$ las unidades.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia de los estándares referencia de SAB, se realizó una gráfica para calcular las concentraciones de proteína por unidad. Se plasmaron los valores en el eje de las "X" la concentración conocida, y en el eje de las "Y" los valores de absorbancia del espectrofotómetro; la curva resultante no es lineal, esta linealidad se presenta solo en concentraciones estándar de 20 a 500 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$, a diferentes concentraciones los resultados provenientes de una recta son pobres por la naturaleza de la curva, donde la no linealidad proviene del mismo reactivo porque traspone las dos diferentes formas de coloración, al incrementar los complejos de proteína el color de fondo disminuye de manera proporcional y ambos son detectables a 590 nm, éste cambio en los complejos produce una distorsión que afecta la respuesta lineal. Para corregir este inconveniente, es necesario utilizar una línea de tendencia polinomial en segundo grado (Figura 26) y su ecuación, la cual proporciona una base más confiable al interpolar las concentraciones provenientes del estándar, la línea polinomial incrementa la certeza (reflejada en el valor de R^2) de concentraciones exactas (Bradford 1976; Expedeon n.d.; Zhu & Strong 1976; Compton & Jones 1985; Scientific 2007). Para emplear una curva lineal es necesario realizar una lectura de fondo a 450 nm, e igualmente a 590 nm y obtener la razón entre el complejo proteico y la coloración de fondo (Ernst & Zor 2010).

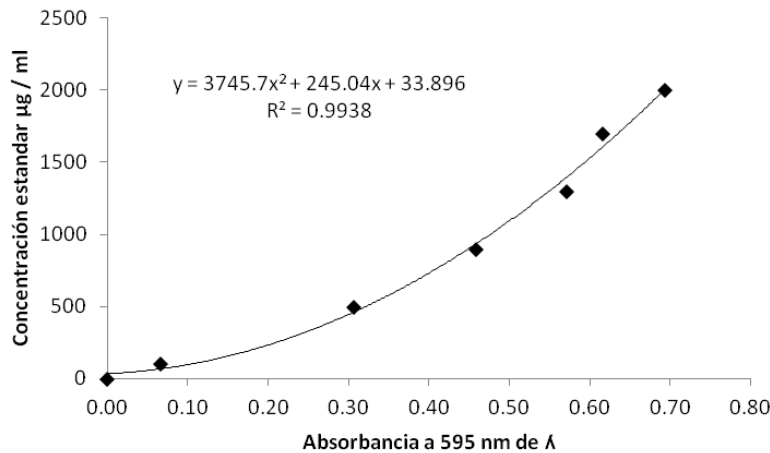


Figura 26. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, empleando estándares de albúmina bovina. Se incluye la ecuación obtenida, empleada para obtener las concentraciones de proteína, y el valor de correlación en la línea de tendencia (R^2) para dicho ejemplo.

Biomarcadores enzimáticos de estrés oxidante.

Catalasa.

Se realizó la cuantificación de la actividad de CAT, mediante el uso de un kit de pruebas especializado para la enzima marca Cayman[®] (Anexo 3), el cual utiliza la reacción del producto catalizado con un cromógeno altamente oxidable para la producción de coloración (Cayman Chemical 2010a). El principio de la prueba se basa en la actividad peroxidativa de la enzima, empleando como sustrato metanol grado analítico en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el metanol es transformado a formaldehído que tiene una reacción con el compuesto Purlpald (4-amino-3-hidrazino-5mercapto-1,2,4-triazol) mismo que al oxidarse produce una coloración púrpura detectable a una longitud de onda de 540 nm, la cuantificación es expresada en $nmol\ min^{-1}$ y normalizada a mg de proteína (Johansson & Hakan Borg 1988 , Figura 27).

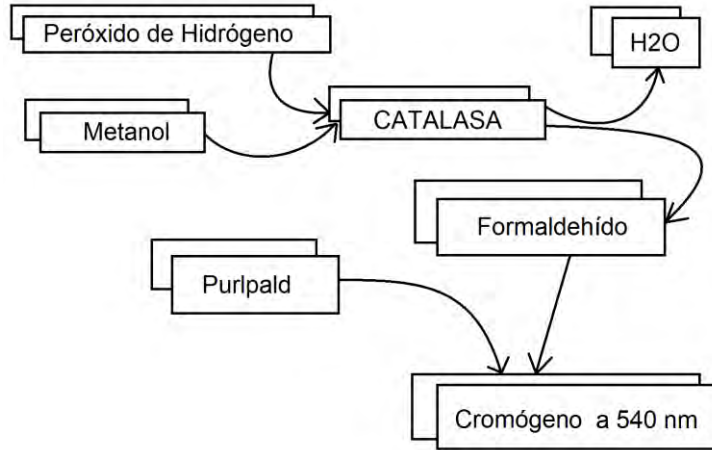


Figura 27. Diagrama del principio de cuantificación de la actividad enzimática de la Catalasa, la cual cataboliza el metanol en formaldehído, en presencia de peróxido de hidrógeno. El compuesto resultante reacciona con el Purpald para ser leído a 540 nm de longitud de onda.

Superóxido Dismutasa.

Se realizó la cuantificación en la actividad enzimática total, mediante la dismutación de ion superoxido en agua y oxígeno, dicho ion procede de la oxidación de oxígeno y Xantina por la acción de la enzima Xantina oxidasa administrada en la prueba. Los iones no catalizados por la SOD reaccionan con la sal de tetrazolio y generan coloración, por lo que el decremento en color es indicativo de una mayor actividad enzimática (Figura 28) , esta cuantificación se realizó con el kit Cayman (Anexo 4) para Superoxido dismutasa a una longitud de onda de 405 nm, el resultado se obtiene en nmol min^{-1} y es normalizada en unidades de proteína (Cayman Chemical 2010b).

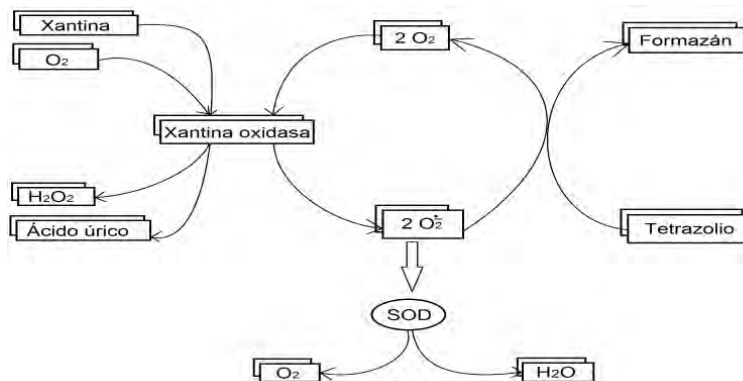


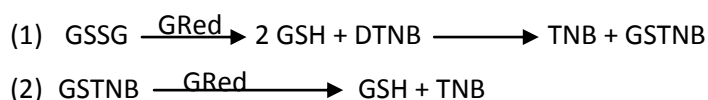
Figura 28. Diagrama de flujo donde se observa la producción de radicales libres a partir de la acción catalítica de Xantina oxidasa, dichos radicales son el sustrato de la enzima Superóxido dismutasa (SOD), en una menor cantidad de radicales Superóxido no

metabolizados, éstos reaccionan con la sal de Tetrazolio para generar un compuesto colorido de Formazán, detectable a 450 nm de longitud de onda.

Biomarcadores no enzimáticos de estrés oxidante.

Glutación total.

Para determinar la concentración del total de glutación presente en la muestra, se utilizó el kit de prueba Cayman® para glutación total (Anexo 5), el método se basa en el reciclaje hecho por la enzima Glutación Reductasa (GR) del glutación disulfuro y glutación sulfhidrilo presente en la muestra. Éste reacciona con el reactivo ácido 5-5'ditiobios-(2-nitro-5tiobenzoico) ó DTNB (reactivo de Ellman), para obtener TNB y GSTNB (ecuación 1), donde el TNB es el colorante que se observa a 405 nm de longitud de onda; mientras que el GSTNB es nuevamente catalizado por GRx para resultar en más TNB y GSH (ecuación 2) que reacciona nuevamente con el reactivo de DTNB.



Este proceso de producción de TNB es directamente proporcional con la velocidad de reciclaje, que a su vez es directamente proporcional con la concentración de GSH presente en la muestra (Tietze 1969; Cayman Chemical 2011).

Peroxidación Lipídica.

En la prueba para detección de hidroperóxidos, se empleó la formación de complejos de hierro con naranja de Xilenol (FOX por sus siglas en inglés, Anexo 6). En cuestión de efecto de los radicales libres, producto de las sustancias reactivas es conocida la producción de ácidos grasos peroxidados, mismos que sufren un acotamiento en su cadena lateral con lo cual liberan Malonaldehido (MDA), el cual es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados, comúnmente medidas empleando la técnica de ácido tiobarbitúrico (TBA); sin embargo, esta prueba subestima la peroxidación lipídica por ejemplo, la descomposición de hidroperóxidos en células lipídicas como el colesterol no producen MDA; por lo tanto se sugiere la el uso de la prueba de FOX para complejos biológicos (Jiang et al. 1992; Fina 2009).

La cuantificación de peroxidación lipídica se realizó con la técnica de FOX la cual tiene como principio la cuantificación que depende de la rápida hidroperoxidación mediada por la oxidación

de Fe^{2+} a Fe^{3+} bajo condiciones ácidas. El Fe^{3+} forma un complejo con el naranja de xilenol, este cromóforo es leído en una longitud de onda de 560 nm (Jiang et al. 1991; Jiang et al. 1992; Hermes-lima et al. 1995).

Expresión relativa de las enzimas.

En los análisis de biología molecular, se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en tiempo real, el uso de esta técnica se ha incrementado a partir de su descubrimiento por su facilidad en el empleo, mayor rapidez, menor riesgo de contaminación de muestras, permite la detección de daños en secciones del genoma más vulnerables a genotóxicos, así como el monitoreo simultáneo de varias copias de ADN, entre otros; convirtiéndose en una herramienta eficaz y poderosa en estudios de Ecotoxicología (Costa 2004; Vinueza-Burgos 2009; Meyer 2010). Para los análisis, se identificaron los cambios a nivel genético, producto de la presencia de xenobióticos en el organismo y como éstos afectan las actividades celulares, dichos cambios pueden ser medidos a partir de secciones específicas de ARN mensajero (ARNm) al ser éste proporcional a la expresión genética que codifica las proteínas necesarias para el organismo (Bustin et al. 2005; Vinueza-Burgos 2009).

La extracción del contenido de ARN total se realizó con un estuche de extracción GenElute™ para el total de ARN, marca Sigma-Aldrich® (Anexo 7) el cual consiste en la separación ARN de las células y tejidos de los organismos, mediante un proceso de filtración en columnas especializadas que sirven como filtros de absorción del ARN, después se someten a un rápido proceso de purificación y separación de las columnas, para obtener el producto en aproximadamente 50 µl de muestra. La muestra se preserva a -80°C hasta su posterior análisis (Aldrich, 2010).

Una vez obtenidos los extractos de ARN de todas las muestras, se procedió a la cuantificación de éste, empleando un kit de cuantificación marca Invitrogen™, Quant-iT™ (Anexo 8) el cual consiste en la medición mediante emisión/excitación de fluorescencia para su cuantificación. Se emplean reactivos proporcionados para la prueba, así mismo se calculan los resultados realizando una curva de calibración con concentraciones estándar incluidas en el kit, con la seguridad de que la prueba es altamente selectiva en ARN sobre las dobles hélices del ADN. La fluorescencia que se mide es lineal y la prueba es estable hasta por 3 horas (Invitrogen 2009).

Una vez cuantificado el ARN, se procedió a adicionar 100 ng de muestra realizando el cálculo de acuerdo al contenido de ARN de cada una. La generación de la cadena de ADN complementario (ADNc) mediante el kit de síntesis de cADN de un solo paso, iScript™ (Anexo 9). Los productos obtenidos se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis (Bio-Rad 2000).

El diseño de los cebadores (Primers) se llevó a cabo específicamente para el organismo *D. rerio*, en sus enzimas AChE, CAT y GPx. Así mismo se trabajó con las secuencias probadas por Gonzales y colaboradores (2006) para SOD. Las secuencias de genes empleadas como control interno fueron para pez cebra β -actina. El diseño de los cebadores para incrementar la eficiencia de amplificación, se basa en la proporción de bases que debe ser aproximadamente de 50% de de guanina y citosina, una longitud próxima a 20 pares de bases y temperatura de fusión próxima a los 60°C (Soto 2011). En la Tabla 3 se presentan las secuencias de los cebadores empleados.

Tabla 3. Secuencias de cebadores empleadas en el análisis de reacción en cadena de la polimerasa, en tiempo real (real time-PCR) para la enzima AChE y las enzimas indicadoras de estrés oxidante.

Gen	Forward	Reverse	T° empalme	
			F	R
AChE	CAAGTTCTTCCCTGGAGCAG	TCCCTCATCCTGATTTACGC	63.9°C	63.9°C
GPx	GAAATACGTCCGTCCTGGAA	TCTCCCATAAGGGACACAGG	63.8°C	63.9°C
SOD_{cu/zn}	TGAGACACGTCGGAGACC	TGCCGATCACTCCACAGG	62.8°C	66.4°C
CAT	CAGGAGCGTTTGGCTACTTC	ATCTGATGACCCAGCCTCAC	63.8°C	64.2°C
β-actin	GTGCCATCTACGAGGCTTA	TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG	63.8°C	64.3°C
18s	ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG	AACGCCACTTGTCCCTCTAA	63.8°C	63.5°C

AChE: Enzima Acetilcolinesterasa, GPx: Enzima Glutatión Peroxidasa, SOD_{cu/zn}: Enzima Superoxido Dismutasa cobre/zinc

CAT: enzima Catalasa.

Para los diferentes genes se realizaron curvas de eficiencia a través de una cadena de diluciones de una en cinco partes, en concentraciones que van desde 15.8 ng/ μ l hasta los 0.1264 ng/ μ l, los ciclos de amplificación y lectura en tiempo real se realizaron en un termociclador IQ5 Multicolor Real-Time Detector System de la compañía Bio-Rad®, mismo conectado a un equipo de cómputo el cual al finalizar con los ciclos de amplificación y lecturas de emisión del SYBR® Green, obteniendo los valores de Ct de cada una de las muestras gracias al Software IQ5 Optical System V1.0. Los cálculos de la curva de eficiencia se realizaron con los valores de amplificación y obteniendo su regresión

lineal (ecuación 3), los resultados de esta curva varían entre 1.6 y 2 asegurando una amplificación eficiente de los pares de bases (Dorak 2006).

$$(3) \quad \text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

La técnica de cuantificación por medio de PCR (qPCR por sus siglas en inglés) es una herramienta poderosa que consiste en la amplificación de productos específicos del cADN proveniente del ARN, con la finalidad de cuantificar la expresión genética relativa. Esta técnica se basa en la fluorescencia de moléculas para monitorear la producción de amplificación en cada ciclo de reacción. Las moléculas del componente fluorescente que provienen del fluoróforo SYBR® Green, éste se asocia únicamente con ADN de doble hebra producto de la amplificación, la fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de ADN (Pfaffl 2001; Bustin et al. 2005; Soto 2011).

El protocolo PCR consistió en un ciclo a 95°C por tres min para la desnaturalización inicial de las hebras de ADN, la amplificación inicio con la separación de las cadenas de cADN que a una temperatura de 95°C por 30 segundos, la alineación y extensión se realizó a 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos de manera respectiva por 40 ciclos. Una vez finalizado los ciclos de amplificación se lleva a cabo una curva de disociación del ADN para corroborar que las amplificaciones producto de los cebadores no hayan generado dímeros o errores en su amplificación. La medición de prueba se realizó con un rango de temperatura entre 50 a 95°C, incrementando 0.5°C cada ciclo hasta completar los 90 ciclos (95°C) resultando una gráfica con un solo pico, el cual corresponde a la temperatura de disociación de producto de amplificación (Figura 29).

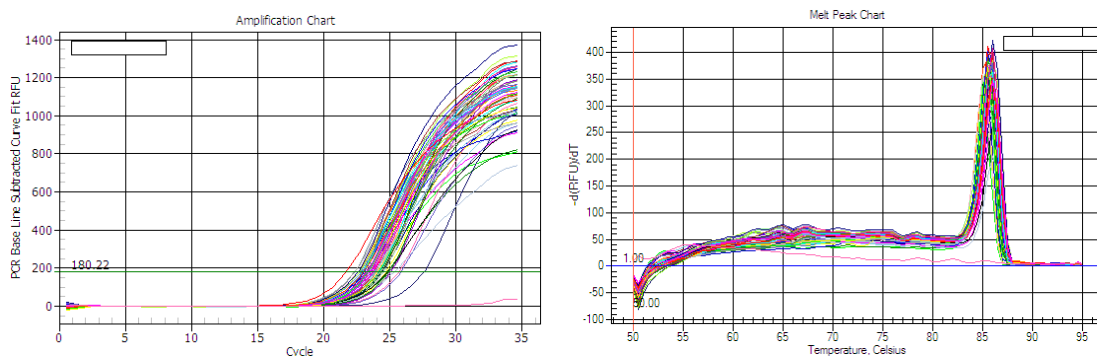


Figura 29. a) Ejemplo de una curva de amplificación por PCR en tiempo real de las diferentes muestras tratadas, se observan las tres fases del proceso de PCR, los ciclos de latencia, el

periodo de amplificación ó fase exponencial y donde se establece la fase plana o de meseta.
b) Ejemplo de un gráfico de disociación de ADN, donde se aprecia la fase exponencial y no existe la formación de dímeros u otros empalmes distintos durante el PCR.

La cuantificación relativa ($\Delta\Delta Ct$) se llevó a cabo normalizando con los valores del gen β -actina el cálculo fue basado en los valores de Ct de las amplificaciones, por ser un gen control estable para pruebas toxicológicas (McCurley & Callard 2008). Como primer paso se obtiene el valor de ΔCt para el total de muestras, este valor se basa en la normalización respecto al gen de control interno de referencia (ecuación 4).

$$(4) \quad \Delta Ct = Ct \text{ de la muestra} - Ct \text{ referencia } (\beta \text{actin})$$

Una vez calculados los valores de ΔCt de todas las muestras, se obtienen los valores de $\Delta\Delta Ct$ sustrayendo al ΔCt de la muestra el valor de ΔCt del control de las muestras (ecuación 5), finalmente se calculan los valores de expresión relativa de las muestras elevando el dos (ecuación 6) a la potencia $-\Delta\Delta Ct$ ((Pfaffl 2001; Bustin et al. 2005; Dorak 2006).

$$(5) \quad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ control}$$

$$(6) \quad 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Análisis estadístico de resultados.

Los resultados fueron analizados a través de software estadístico Statistics® para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y procesados a través de Graph Pad Prism 5® para la obtención de gráficos. La determinación de diferencias significativas para las actividades enzimáticas y los valores de cuantificación genética de los distintos tratamientos y bioensayos, se realizó con una ANOVA de una vía, en caso de presentarse diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó una prueba de Tukey para determinar entre quienes fueron las diferencias. Para las variables que no se ajustaban a un modelo lineal, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de Dunns para encontrar diferencias entre tratamientos.

Resultados.

Actividad enzimática de la Acetilcolinesterasa.

En la actividad enzimática, se observó que la AChE presentó una actividad promedio de $99.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ para el control, en los tres tratamientos con Clorpirifos existió una disminución en la actividad enzimática, siendo significativa ($F=3.382$, $p<0.05$) para la concentración de $400 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 30), donde ésta obtuvo un promedio de actividad del $54.36 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$, produciendo una inhibición del 45.25%; para 200 y $400 \mu\text{g L}^{-1}$ se presentó una inhibición del 37.39% y 40.32% respectivamente, sin que fueran significativos. Para la expresión relativa de AChE se presentó una sobreexpresión significativa del gen ($F=7.49$, $p<0.05$) en la concentración de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de 138.8% con respecto al control. Para $400 \mu\text{g L}^{-1}$ y $800 \mu\text{g L}^{-1}$ existió un aumento del 35% y 38% con respecto al control sin ser significativo (Figura 30).

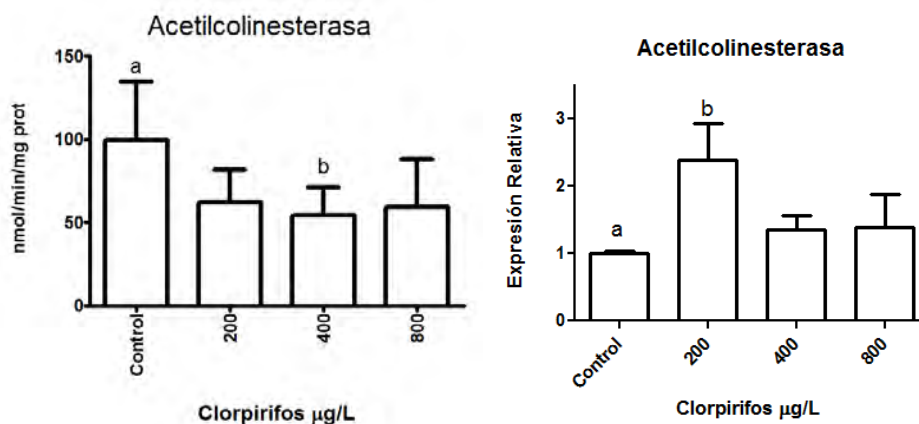


Figura 30. Actividad de AChE a diferentes concentraciones de CPR se presentaron diferencias significativas ($F=3.382$, $p<0.05$) entre el control y la concentración de $400 \mu\text{g L}^{-1}$, la cual representa una disminución del 45% respecto al control. Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan las diferencias significativas. b) Expresión relativa al control del gen AChE donde existe un aumento en la expresión genética significativa en $200 \mu\text{g L}^{-1}$, ($F=7.49$, $p<0.05$), con respecto al control, no se encontraron diferencias significativas con las demás concentraciones.

En la actividad de la enzima AChE, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de exposición a la vitamina C con las diferentes concentraciones ($p= 0.21$; $F= 0.87$), por otro lado las co-exposiciones del antioxidante con el plaguicida CPR si generaron diferencias significativas ($p< 0.05$; $F= 15.40$), éstas fueron entre el tratamiento control con todas las concentraciones, es decir entre control y $400 \mu\text{g L}^{-1}$ CPR, 200; 400 y $600 \mu\text{g L}^{-1}$ de vitamina C con $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPR (Figura 31).

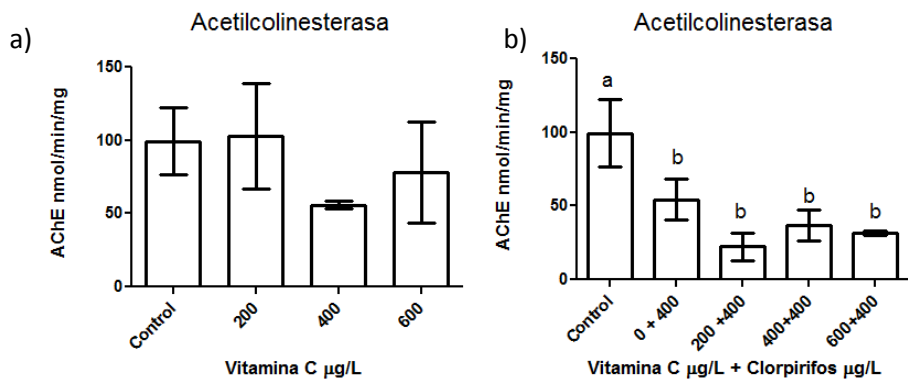


Figura 31. a) La actividad enzimática de la AChE en organismos expuestos a distintas concentraciones de VC, no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.21$; $F= 0.87$) entre los tratamientos. b) La actividad de AChE si presentó diferencias significativas ($p< 0.05$; $F= 15.40$) entre el control y las concentraciones de co-exposición VC+CPR. Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

La expresión relativa del gen AChE, durante las exposiciones en diferentes concentraciones de CPR no presentó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p= 0.18$; $F= 2.06$). Las co-exposiciones de vitamina con CPR, tampoco fueron productoras de diferencias significativas ($p= 0.24$; $F= 1.59$) para la expresión relativa del gen AChE (Figura 32).

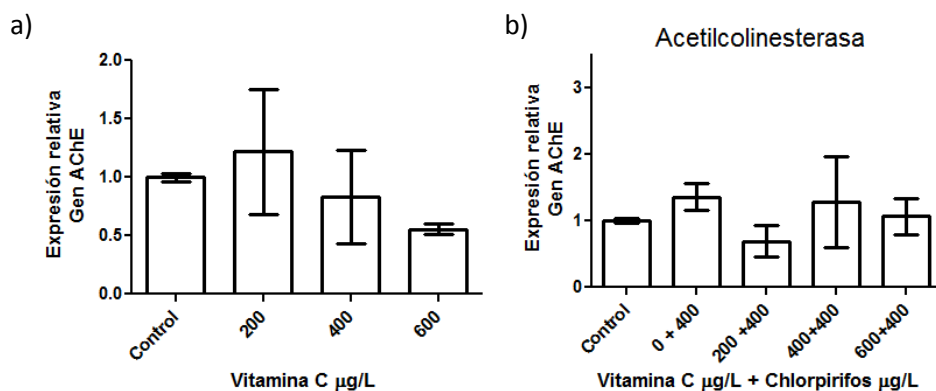


Figura 32. a) Exposiciones a VC para los diferentes tratamientos, donde en la expresión relativa del gen AChE no se observaron diferencias significativas ($p= 0.18$; $F= 2.05$). b) Expresión relativa del gen AChE en las co-exposiciones CPR+VC, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p= 0.24$; $F=1.59$). Se representan las medias \pm la desviación estándar.

En la actividad de AChE se observó que no existieron diferencias significativas ($p= 0.06$; $F= 3.86$), en los tratamientos expuestos a las diferentes concentraciones del tBOOH; sin embargo en las co-

exposiciones del pro-oxidante con $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPR existió un decremento significativo ($p < 0.05$; $F=23.30$), estas diferencias se presentaron entre la concentración control y todas las demás concentraciones. (Figura 33).

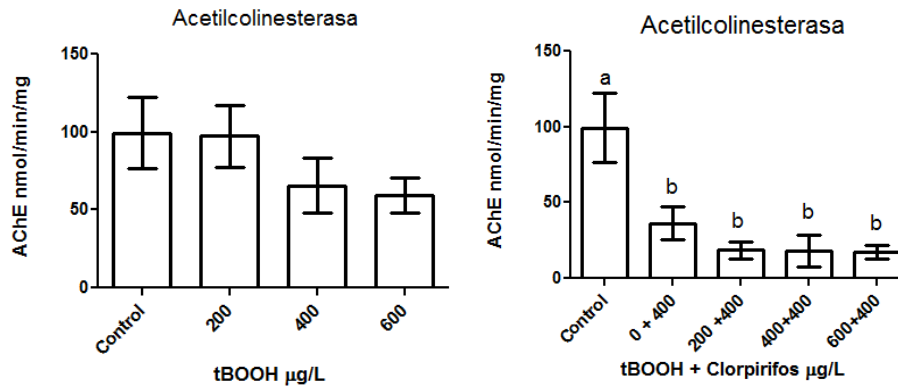


Figura 33. a) Actividad de AChE para los tratamientos expuestos a las diferentes concentraciones de tBOOH, no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.06$; $F= 3.86$) entre los tratamientos. b) Actividad de AChE de los embriones tratados con las co-exposiciones de tBOOH-CPR, se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F= 23.30$) Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

Las diferentes concentraciones del pro-oxidante tBOOH no produjeron diferencias significativas ($p= 0.239$; $F= 1.72$) en la expresión del gen AChE en los embriones expuestos. En las co-exposiciones si se produjeron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F= 7.22$) entre los distintos tratamientos expuestos, estas fueron entre la concentración 0 tBOOH + $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPR con las concentraciones de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ tBOOH + $400 \mu\text{g L}^{-1}$ CPR; $400 \mu\text{g L}^{-1}$ tBOOH + $400 \mu\text{g L}^{-1}$ CPR y $600 \mu\text{g L}^{-1}$ tBOOH + $400 \mu\text{g L}^{-1}$ CPR (Figura 34).

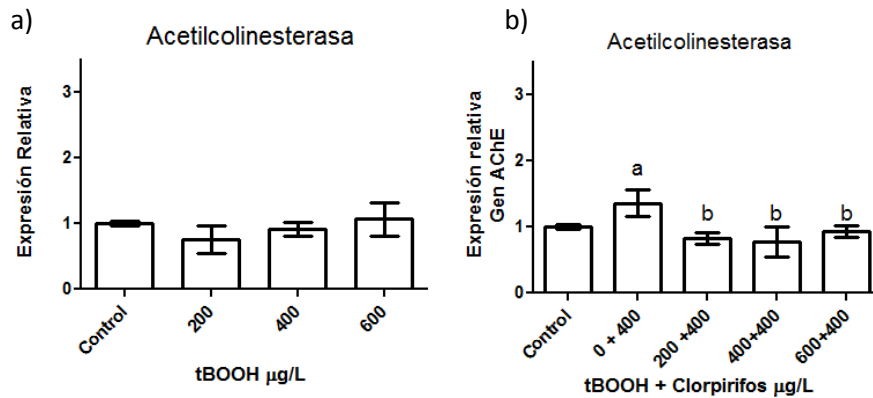


Figura 34. a) Expresión relativa del gen AChE en las exposiciones a distintas concentraciones de tBOOH, los tratamientos no presentaron diferencias significativas ($p= 0.239$; $F= 1.72$). b) expresión relativa del gen AChE durante las co-exposiciones CPR-tBOOH , se presentaron diferencias significativas ($p< 0.05$; $F= 7.22$) Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

Catalasa

En las enzimas antioxidantes (Figura 35), la actividad de CAT los valores promedio en el tratamiento control fue de $5.39 (\pm 1.37)$ nmol min⁻¹ mg proteína⁻¹, en las concentraciones de 200, 400 y 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ existió un incremento del 27, 27 y 20% respectivamente sobre la actividad de dicha enzima sin que fuera significativo ($F=0.988$, $p=0.435$). La expresión relativa del gen CAT no presentó diferencias significativas ($F=1.570$, $p=0.270$) entre los tratamientos para la exposición en Clorpirifos, se observa un incremento en la expresión con respecto al control de 86% para 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1% para 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 32% con 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ sin ser valores significativos.

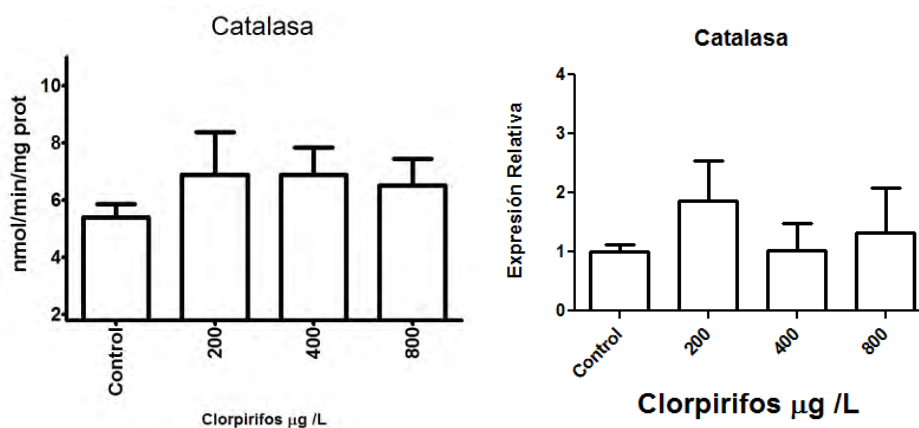


Figura 35. a) Actividad de CAT donde se aprecia un aumento en la actividad sin que fuera significativo ($F=0.988$, $p=0.43$). Se representan las medias \pm la desviación estándar. b) Expresión relativa al control del gen CAT con respecto al control para las exposiciones a CAT sin que existan diferencias significativas ($F=1.57$, $p=0.27$).

La actividad enzimática de CAT, no presentó diferencias significativas ($p= 0.09$; $F= 2.94$) durante la exposición a las diferentes concentraciones de vitamina C sola. Las co-exposiciones del antioxidante con CPR no generó diferencias significativas ($p= 0.11$; $F= 2.46$) para las concentraciones empleadas (Figura 36).

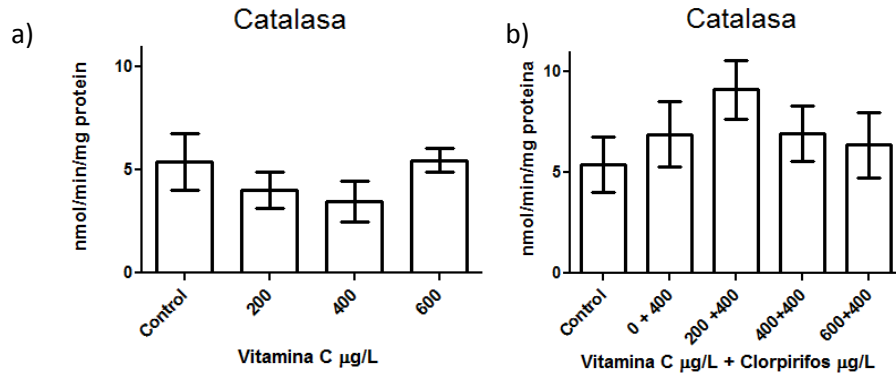


Figura 36. a) Actividad enzimática de CAT durante las exposiciones a concentraciones de VC, donde no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.09$; $F= 2.94$). b) Actividad de CAT en embriones expuestos a co-exposiciones de CPR+VitC, no hay presencia de diferencias significativas ($p= 0.11$; $F= 2.46$). Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

Las diferentes concentraciones de VC, al igual que las co-exposiciones entre VC y CPR, no fueron suficientes para generar diferencias significativas ($p= 0.44$; $F= 0.99$ y $p= 0.35$; $F= 1.24$ respectivamente) en la expresión relativa del gen CAT, para los embriones expuestos durante el tiempo de estudio (Figura 37).

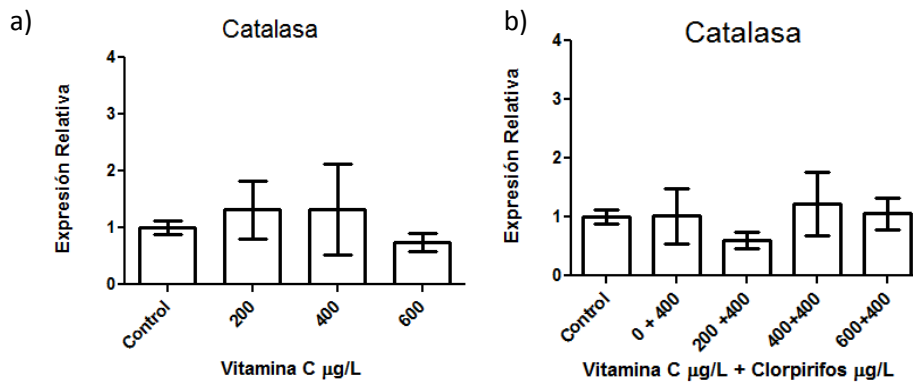


Figura 37. a) Expresión relativa del gen CAT expuesto a diferentes concentraciones de VC, no se observaron diferencias significativas ($p= 0.44$; $F= 0.99$). b) Co-exposición CPR+VitC para la expresión relativa de CAT, no existieron diferencias significativas entre ellos ($p=0.35$; $F= 1.24$). Se representan las medias \pm la desviación estándar.

La actividad enzimática de CAT si presentó diferencias significativas ($p < 0.05$; $F=13.89$) en las exposiciones de tBOOH durante el periodo de exposición, las diferencias fueron en disminución de las actividades en comparación con el control. Por otro lado, durante las co-exposiciones del pro-

oxidante con el CPR, igual que en el caso anterior, se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F=4.326$), éstas fueron el control y la exposición 0 tBOOH + 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ CPR con las diferentes concentraciones de exposición del tBOOH (200 $\mu\text{g L}^{-1}$ tBOOH + 400 CPR $\mu\text{g L}^{-1}$; 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ tBOOH + 400 $\mu\text{g L}^{-1}$; y 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ tBOOH + 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ CPR. Figura 38).

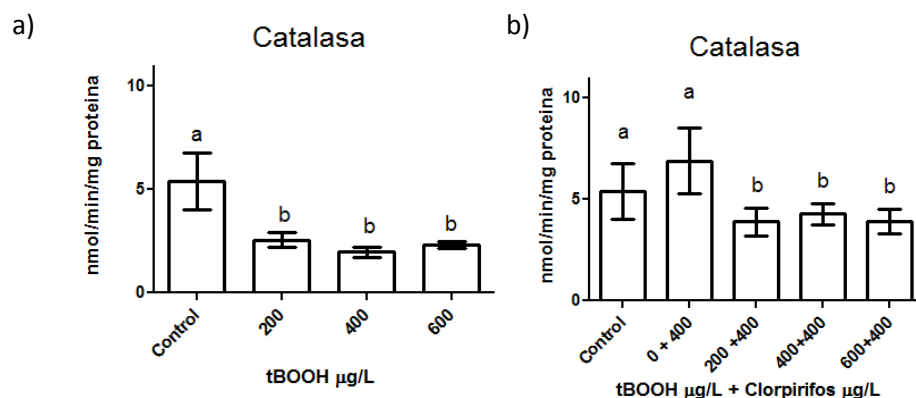


Figura 38. Figura 68 a) Actividad enzimática de CAT, se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F=13.89$) b) Actividad de la enzima CAT en las co-exposiciones CPR+tBOOH, se observan diferencias significativas ($p < 0.05$; $F=4.326$) Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

La enzima CAT en su expresión genética relativa, no produjo diferencias significativas ($p=0.875$; $F=0.226$) después de estar expuesto a las diferentes concentraciones del tBOOH. El mismo escenario se observó, al ser expuestos los embriones a las diferentes exposiciones de tBOOH en combinación con el CPR, es decir en las co-exposiciones del pro-oxidante con el plaguicida no produjeron diferencias significativas ($p=0.99$; $F=0.068$. Figura 39).

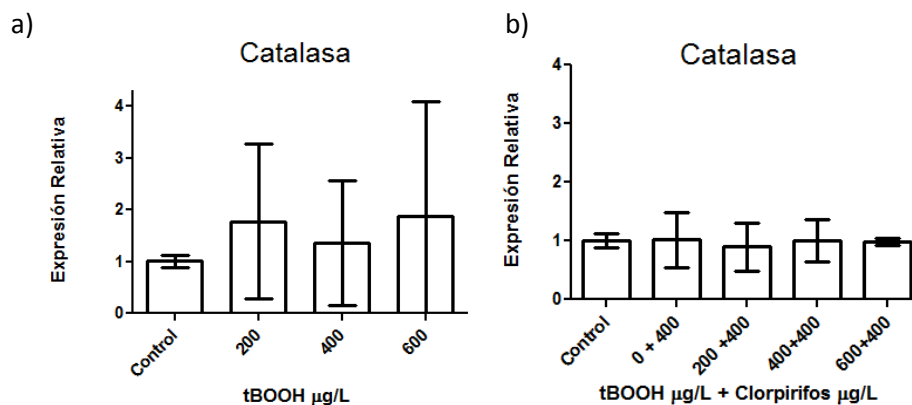


Figura 39. a) Expresión relativa del gen CAT después de la exposición a las distintas concentraciones del tBOOH, no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.875$; $F= 0.226$) entre los diferentes tratamientos. b) Expresión relativa del gen CAT durante las co-exposiciones tBOOH+CPR, no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.99$; $F= 0.068$). Se representan las medias \pm la desviación estándar.

Superoxido Dismutasa

La actividad de SOD en los tratamientos presentó una disminución en su actividad con respecto al control, el cual tuvo un valor promedio de $3.2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$, sin embargo estas disminuciones no resultaron ser significativas ($H=1.679$, $p=0.794$). La expresión para SOD generó un incremento del 79% en la concentración de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ con respecto al control, esta expresión fue disminuyendo en lo que aumentaban las concentraciones, a 1% para $400 \mu\text{g L}^{-1}$ y una disminución del 34% con $800 \mu\text{g L}^{-1}$ con respecto al control, sin embargo ninguno de estos cambios generaron diferencias significativas ($F=3.137$, $p=0.087$) entre tratamientos (Figura 40).

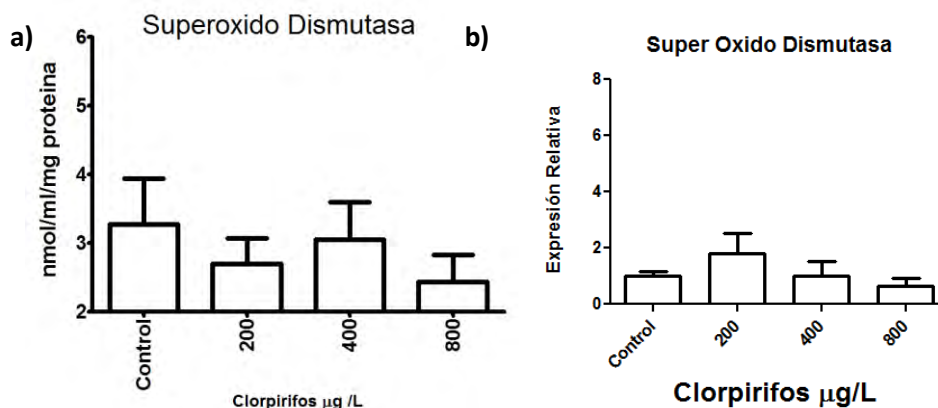


Figura 40. a) Actividad de CAT donde se aprecia un aumento en la actividad sin que fuera significativo ($F=0.988$, $p=0.43$). Se representan las medias \pm la desviación estándar. b) Actividad de SOD, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos ($H=1.679$, $p=0.79$). b) Expresiones relativas respecto al control para el gen de la enzima SOD, no se observan diferencias significativas ($F=3.13$, $p=0.08$). Se representan las medias \pm la desviación estándar

La actividad de la enzima SOD en las exposiciones, con el antioxidante vitamina C, no presentó diferencias significativas ($p= 0.40$; $F= 1.09$) durante el tiempo de estudio; así mismo las co-exposiciones con $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPR tampoco fueron capaces de producir diferencias significativas ($p= 0.74$; $F= 0.48$) en las actividades enzimáticas (Figura 41).

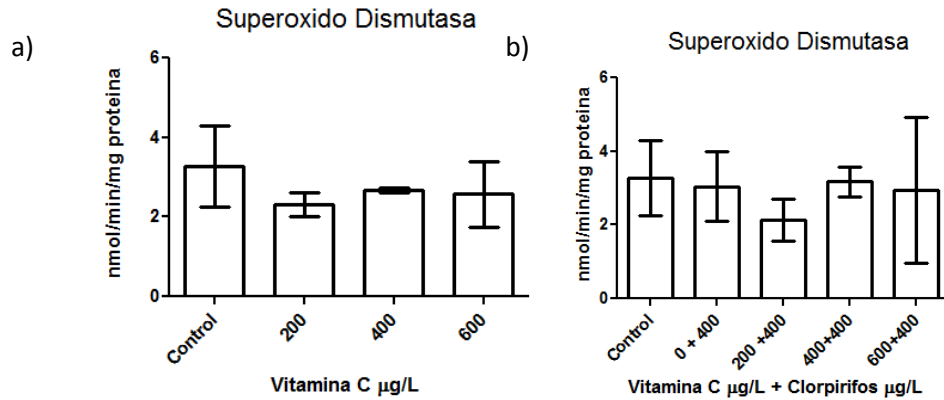


Figura 41. a) Actividad de SOD a diferentes concentraciones de VC, no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.40$; $F= 1.09$). b) Actividad de SOD en las co-exposiciones de CPR+VitC, no se observaron diferencias significativas ($p= 0.74$; $F=0.48$) entre los tratamientos. Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

La expresión relativa del gen SOD permaneció sin diferencias significativas ($p=0.98$; $F= 0.05$) durante el tiempo de exposición de los embriones, en las diferentes concentraciones del antioxidante vitamina C. En la co-exposición vitamina C con CPR no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.34$; $F= 1.27$) entre los tratamientos (Figura 42).

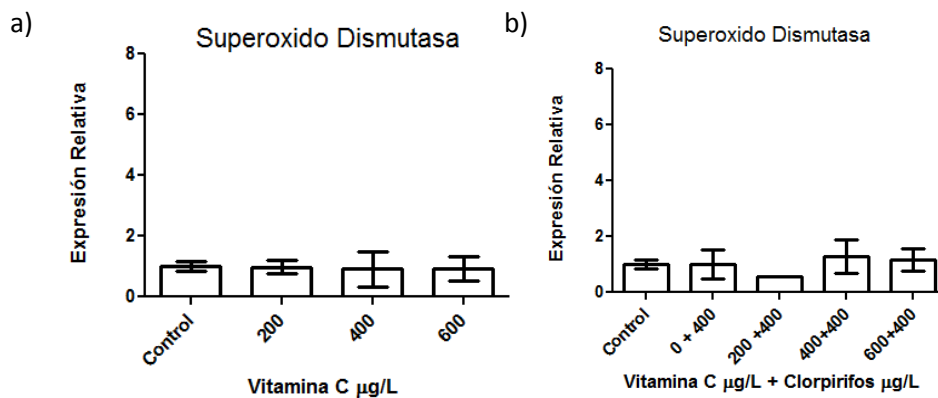


Figura 42. a) Expresión relativa del gen SOD a diferentes concentraciones de VC e, no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.98$; $F= 0.05$) durante el periodo de exposición. b) Co-exposiciones de CPR+VitC, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos en la expresión relativa de SOD ($p= 0.34$; $F= 1.27$). Se representan las medias \pm la desviación estándar.

La enzima SOD no presentó diferencias significativas ($p= 0.23$; $F=1.76$) en cuanto a su actividad, al ser expuestos los organismos a 200, 400 y 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ del tBOOH; En los tratamientos de co-

exposición de las concentraciones antes mencionadas con $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPR no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.607$; $F= 0.703$), en la actividad enzimática (Figura 43).

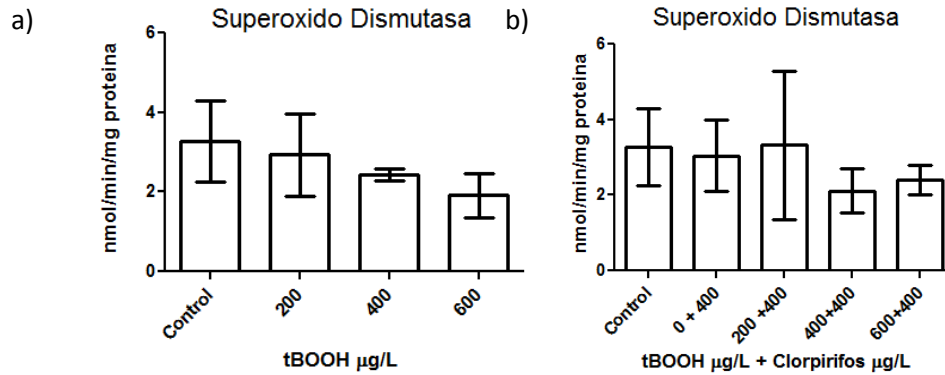


Figura 43. a) Actividad enzimática de SOD expuestas a las concentraciones de tBOOH, no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.23$; $F= 1.76$). b) Actividad de SOD en las concentraciones de co-exposición tBOOH+CPR, no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.607$; $F= 0.703$) entre los tratamientos. Se representan las medias \pm la desviación estándar.

La expresión relativa del gen SOD después de ser expuestos los embriones a las concentraciones de tBOOH, no presentó diferencias significativas ($p= 0.443$; $F= 0.993$) entre los diferentes tratamientos. Las co-exposiciones del pro-oxidante con CPR no fueron suficientes para generar diferencias significativas ($p= 0.218$; $F= 0.480$) en la expresión relativa de SOD entre los tratamientos (Figura 44).

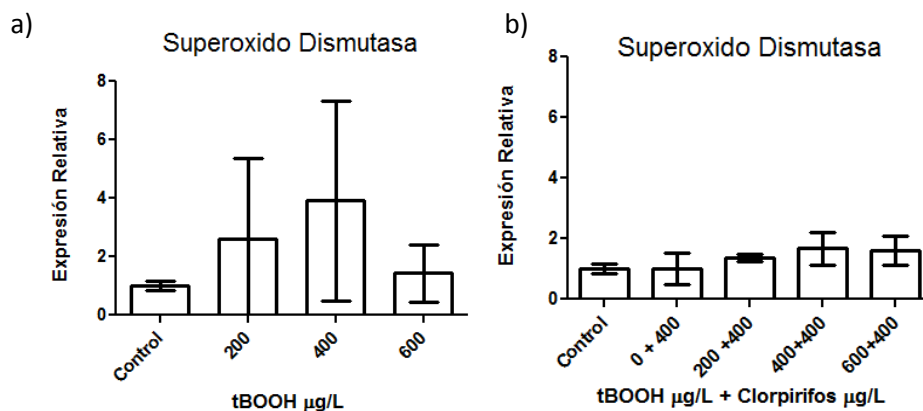


Figura 44. a) Expresión relativa del gen SOD, de los embriones expuestos a las diferentes concentraciones de tBOOH, el pro-oxidante no produjo diferencias significativas ($p= 0.443$; $F= 0.993$) entre los diferentes tratamientos. b) Expresión relativa del gen SOD, después del

tiempo de exposición a tBOOH+CPR no se observaron diferencias significativas ($p=0.750$; $F=0.480$). Se representan las medias \pm la desviación estándar.

Glutación (concentración total y expresión relativa).

El contenido de glutación total, el promedio para el control fue de $1.7 \text{ nmol mg prot}^{-1}$, este tratamiento tuvo diferencias significativas ($F=4.333$, $p<0.05$) con la concentración de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ que se incremento hasta $2.89 \text{ nmol mg}^{-1}$ proteína (68.73%); las concentraciones de 400 y $800 \mu\text{g L}^{-1}$ no presentaron diferencias significativas con el control y contrario a la concentración más baja se obtuvo una disminución del contenido de glutación del 19 y del 16% respectivamente. Sin embargo estas concentraciones si presentaron diferencias significativas con $200 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 50Figura 45a). En referencia a la expresión relativa del gen GPx no se presentaron diferencias significativas ($F=3.803$, $p=0.058$) entre el control y los diferentes tratamientos (Figura 45b).

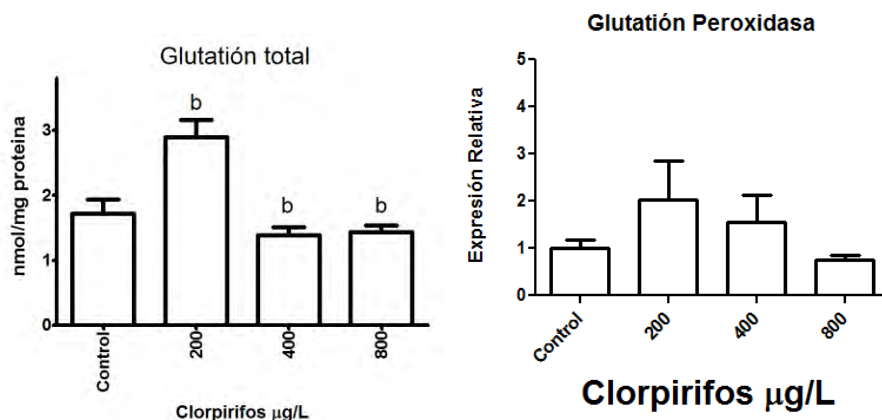


Figura 45. a) Glutación total en organismos expuestos a CPR, presentó diferencias significativas entre el control y $200 \mu\text{g L}^{-1}$ incrementando la concentración ($F=4.33$, $p<0.05$). Expresión relativa al control del gen GPx, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F=3.803$, $p=0.058$) Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas

En el contenido total de glutación, las concentraciones de vitamina C no produjeron diferencias significativas ($p=0.31$; $F=1.40$) para los distintos tratamientos; un escenario similar se obtuvo para las co-exposiciones de vitamina con CPR, no se produjeron diferencias significativas para los tratamientos ($p=0.27$; $F=1.49$. Figura 46).

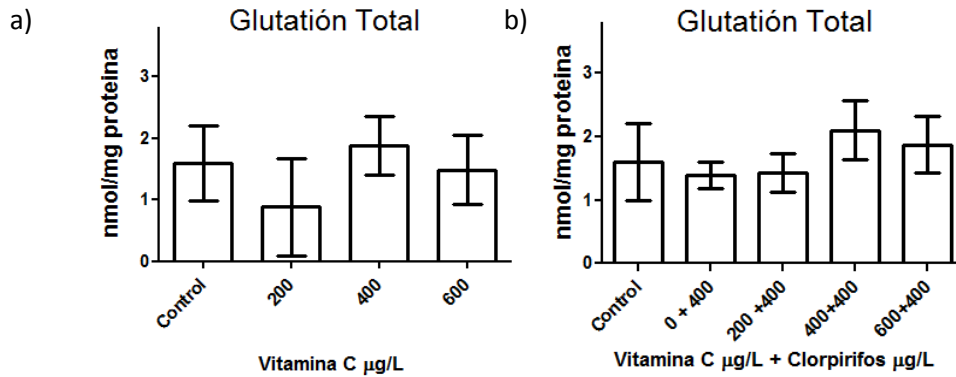


Figura 46. a) Contenido total de glutación en organismos expuestos a VC donde no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.31$; $F= 1.40$). b) co-exposición CPR+VC, no se presentaron diferencias significativas. Se representan las medias y la desviación estándar

La expresión relativa del gen GPx, en los diferentes tratamientos expuestos a las concentraciones de vitamina, no presentó diferencias significativas ($p= 0.36$; $F= 1.21$). En las co-exposiciones con CPR no existieron diferencias significativas ($p= 0.11$; $F= 2.42$) en la expresión relativa del gen GPx (Figura 47).

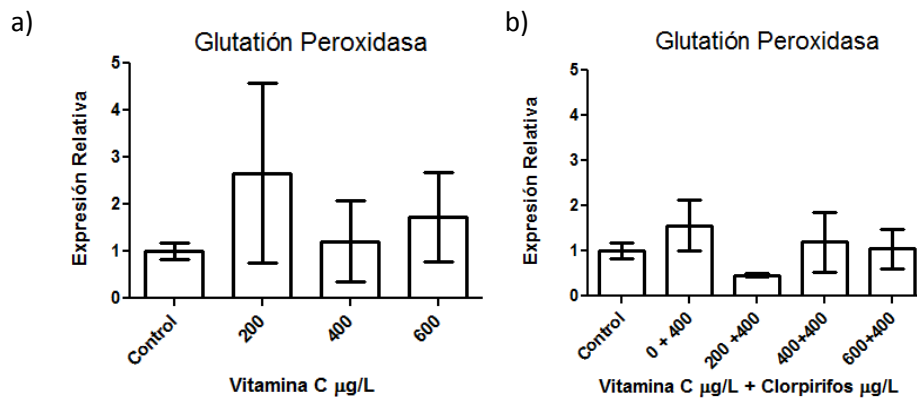


Figura 47. a) Expresión relativa al control para el gen GPx, no se observaron diferencias significativas ($p= 0.36$; $F= 1.21$) para las distintas concentraciones del antioxidante. B) Expresión relativa de GPx no presentó diferencias significativas durante la exposición a CPR+VitC ($p= 0.11$; $F= 2.42$). Se representan las medias \pm la desviación estándar.

La variable contenido total de glutación, las exposiciones con el tBOOH por sí solas, no produjeron diferencias significativas ($p= 0.194$; $F= 1.98$) en los tratamientos. En los tratamientos de los embriones a las diferentes concentraciones de tBOOH con $400 \mu\text{g L}^{-1}$ CPR no se presentaron

diferencias significativas ($p= 0.134$; $F=2.262$) con el contenido total de glutatión durante el tiempo en que fueron expuestos (Figura 48).

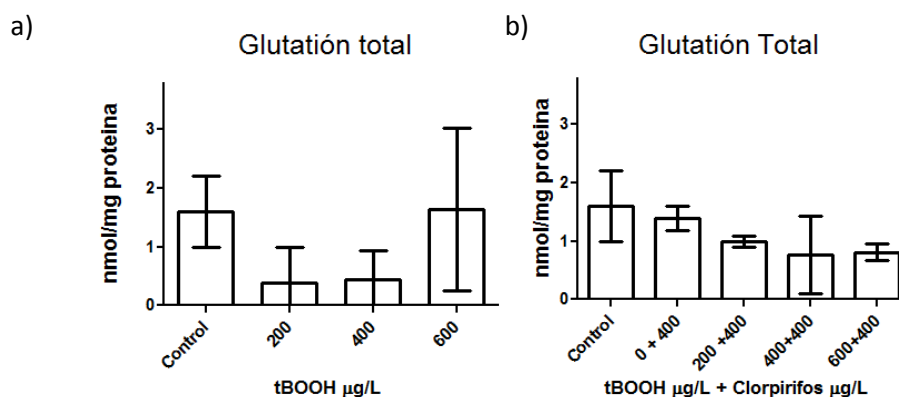


Figura 48. a) Contenido de Glutatión total, no presentó diferencias significativas ($p= 0.194$; $F= 1.98$) entre los tratamientos expuestos a las distintas concentraciones de tBOOH. b) Glutatión total, no se observan diferencias significativas ($p= 0.134$; $F= 2.262$) entre los grupos expuestos a la combinación de tBOOH-CPR. Se representan las medias \pm la desviación estándar.

La expresión relativa del gen GPx no se vio afectada por las diferentes concentraciones del prooxidante tBOOH, es decir no se produjeron diferencias significativas ($p= 0.146$; $F= 2.373$). En los tratamientos co-expuestos de tBOOH con CPR, no se produjeron diferencias significativas ($p= 0.750$; $F= 0.480$) en la expresión de GPx durante el tiempo del experimento (Figura 49).

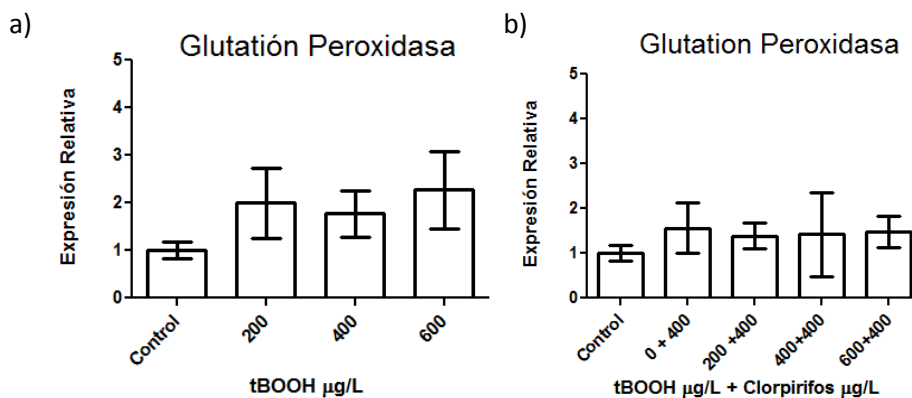


Figura 49. a) Gráfico de la variable expresión relativa del gen AChE, para los tratamientos con las distintas concentraciones de tBOOH no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.146$; $F= 2.373$) para esta variable. b) Las co-exposiciones tBOOH-CPR no produjeron diferencias significativas ($p= 0.750$; $F= 0.480$) entre los tratamientos para la variable expresión relativa del gen AChE. Se representan las medias \pm la desviación estándar.

Hidroperóxidos lipídicos

En referencia contenido de hidroperóxidos lipídicos, los valores del control obtuvieron un promedio de 27.02 equivalentes mg prot^{-1} , las concentraciones de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ y $400 \mu\text{g L}^{-1}$ incrementaron sus valores a 31.9 y 36.4 equivalentes mg prot^{-1} respectivamente. La concentración de Clorpirifos de $800 \mu\text{g L}^{-1}$ tuvo un valor de 23.06 equivalentes mg^{-1} de proteína; sin embargo estas diferencias entre los tratamientos no fueron significativas ($F=0.721$, $p=0.586$; Figura 50).

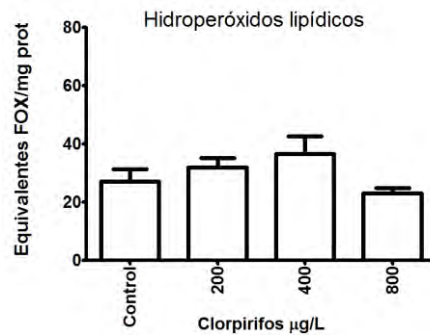


Figura 50. Hidroperóxidos lipídicos, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($F=0.712$, $p=0.58$). Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

La generación de hidroperóxidos lipídicos, medidos en equivalentes de FOX no presentó diferencias significativas ($p=0.06$; $F=3.65$) entre los tratamientos de concentraciones de VC, la co-exposición con el CPR de igual modo, no causó diferencias significativas ($p=0.77$; $F=0.44$) (Figura 51).

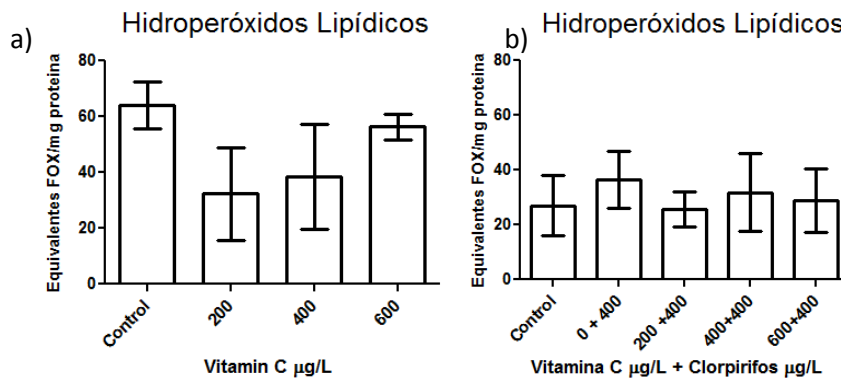


Figura 51. a) Hidroperóxidos lipídicos, medido en equivalentes de FOX, expuestos a VC no existió una diferencia significativa ($p=0.06$; $F= 3.65$) entre los tratamientos. b) Co-exposiciones de VC + CPR no produjeron diferencias significativas ($p=0.77$; $F=0.44$) Se representan las medias \pm la desviación estándar.

El contenido de hidroperóxidos lipídicos medido en equivalentes FOX, presentó diferencias significativas ($p < 0.05$; $F= 28.14$) entre los distintos tratamientos, las diferencias fueron entre el control y las concentraciones de 200 y 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ de tBOOH; también se presentaron entre la concentración de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ con 400 y 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de tBOOH . Las co-exposiciones del tBOOH con CPR no produjeron diferencias significativas ($p= 0.105$; $F= 2.53$) en los tratamientos durante el periodo de exposición (Figura 52).

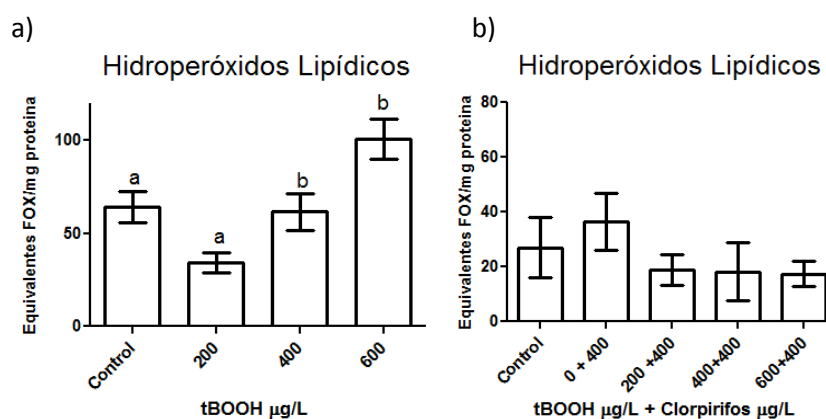


Figura 52. a) Contenido de hidroperóxidos lipídicos, se observan las diferencias significativas ($p < 0.05$; $F= 28.14$) entre las concentraciones de tBOOH, b) Contenido de hidroperóxidos lipídicos para los tratamientos co-expuestos de tBOOH+CPR, no se presentaron diferencias significativas. Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

Morfología.

En lo relacionado a morfología se analizó la longitud total de los organismos con un promedio para el control de 2.60 mm (± 0.11); para los diferentes tratamientos se presentó un promedio máximo de 2.63 mm (± 0.12) y no se observaron diferencias significativas ($F=0.745$, $p=0.74$) en las concentraciones con respecto al control (Figura 53).

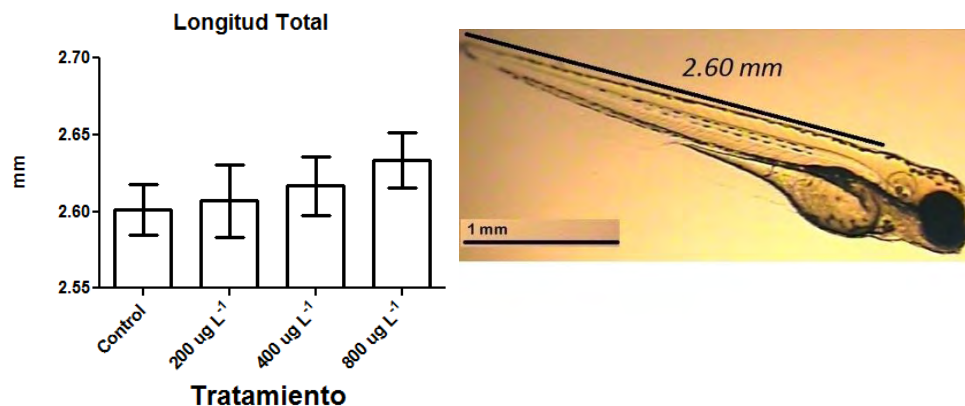


Figura 53. a) Longitud total de los diferentes embriones expuestos a CPR, en los cuales no se presentaron diferencias significativas con respecto al control ($F=0.745$, $p=0.74$). Se representan las medias \pm la desviación estándar. b) Se observa como ejemplo un organismo de longitud promedio (2.60 mm), para el tratamiento control (imagen Rubio-Escalante).

En las diferentes concentraciones de VC, no se presentaron diferencias significativas para la variable longitud total ($p= 0.06$; $F= 7.28$). Para las concentraciones de vitamina C con CPR, no se obtuvieron diferencias significativas ($p= 0.223$; $F= 2.3$) durante el tiempo de exposición de los organismos (Figura 54).

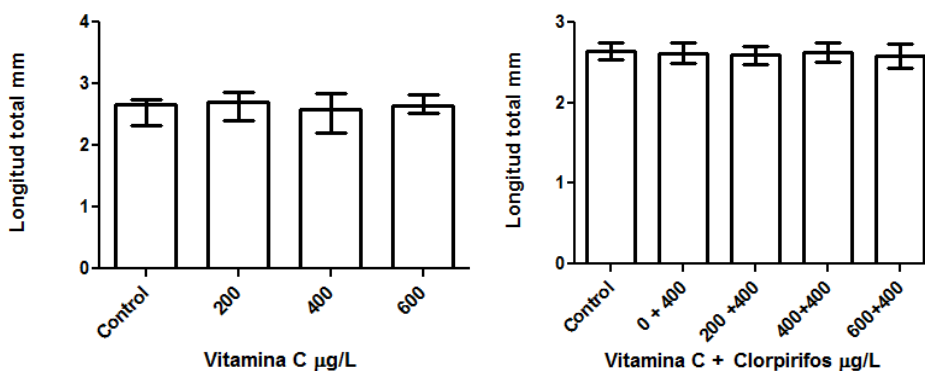


Figura 54. a) Longitud total de embriones expuestos a diferentes concentraciones de VC no se presentan diferencias significativas ($p= 0.06$) en estos tratamientos. b) Longitud total de los organismos expuestos a las co-exposiciones de VC+CPR, no se presentaron diferencias significativas entre ellos ($p= 0.223$). Se representan las medias \pm la desviación estándar.

Las diferentes concentraciones del pro-oxidante tBOOH produjeron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F= 8.123$) para la variable longitud total, dichas diferencias se presentaron entre la concentración más alta (600 µg L⁻¹) y las concentraciones control, 200 y 400 µg L⁻¹, del pro-

oxidante. Por otro lado, las co-exposiciones entre tBOOH-CPR no produjeron efectos significativos ($p= 0.232$; $B= 5.57$) para la longitud total entre los diferentes tratamientos (Figura 55).

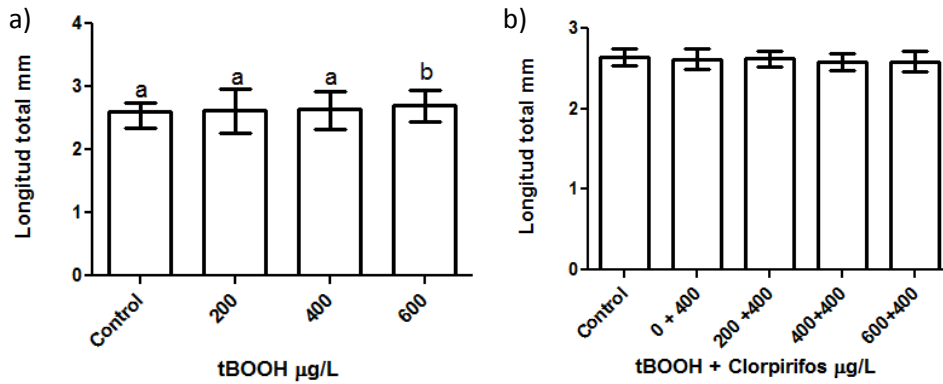


Figura 55. a) Longitud total de organismos expuestos a diferentes concentraciones de tBOOH, se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F=8.123$) b) Longitud total, en co-exposiciones de tBOOH+CPR, no se presentaron diferencias significativas para esta variable ($p= 0.23$; $F= 5.57$). Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

El área del pericardio presentó un promedio de 0.030 mm^2 (± 0.007), el valor promedio más elevado se presentó en $800 \mu\text{g L}^{-1}$ con 0.034 mm^2 (± 0.014), no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($F=2.044$, $p=0.088$) entre los diferentes tratamientos (Figura 56).

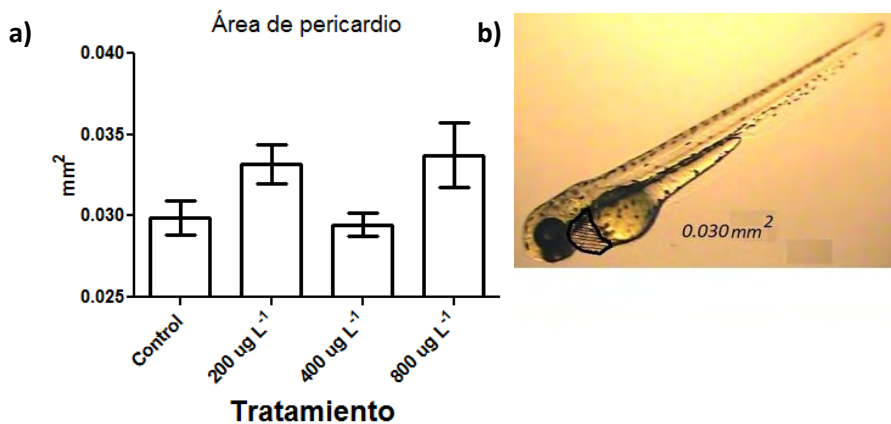


Figura 56. a) Área de pericardio de organismos expuestos a diferentes concentraciones de CPR, donde no existieron diferencias significativas ($F=2.044$, $p=0.088$) con respecto al control. b) Organismo del grupo control con un área de pericardio promedio de 0.030 mm^2 para éste tratamiento (imagen Rubio-Escalante).

Al analizar concentraciones crecientes de VC en el área del pericardio, las co-exposiciones con el plaguicida provocaron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F = 10.07$), siendo las diferencias entre el control y las concentraciones de vitamina con CPR (200, 400 y 600) y la concentración de CPR sola con 200, 400 y 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de las co-exposiciones con el plaguicida (Figura 57).

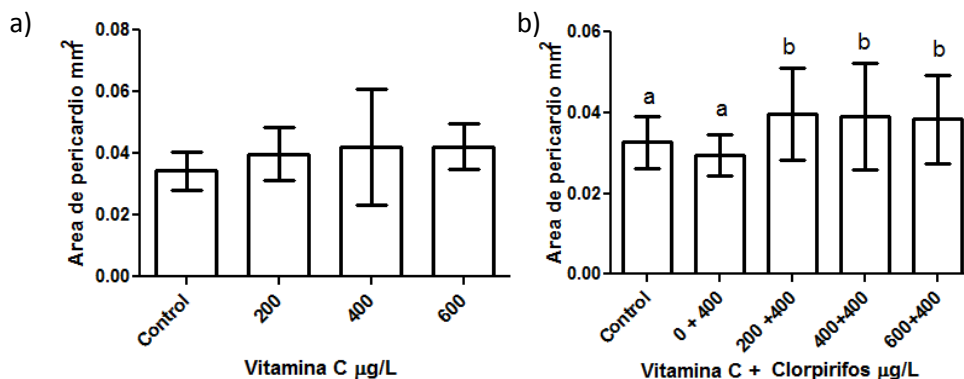


Figura 57. a) Área del pericardio en embriones de los diferentes tratamientos con VC, donde no existieron diferencias significativas con respecto al control b) Área de pericardio en las coexposiciones VC y CPR se observa un incremento significativo en el área del pericardio en las co-exposiciones con CPR. Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas

La variable área de pericardio presentó diferencias significativas ($p < 0.05$; $F = 23.86$) entre las diferentes concentraciones de tBOOH a las cuales fueron expuestos los organismos, las diferencias se dieron entre el control con las concentraciones del pro-oxidantes (200, 400 y 600 $\mu\text{g L}^{-1}$). Para las co-exposiciones de tBOOH-CPR también se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F = 38.22$) entre los tratamientos de la variable área de pericardio, estas diferencias fueron entre el control y los tratamientos de co-exposición, es decir control con 200, 400 y 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de tBOOH con 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ CPR; también se presentaron diferencias significativas entre 0 tBOOH + 400 CPR con las concentraciones de 200, 400 y 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ tBOOH con CPR; finalmente se presentaron diferencias entre 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ tBOOH + 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ CPR y 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ tBOOH + 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ CPR (Figura 58).

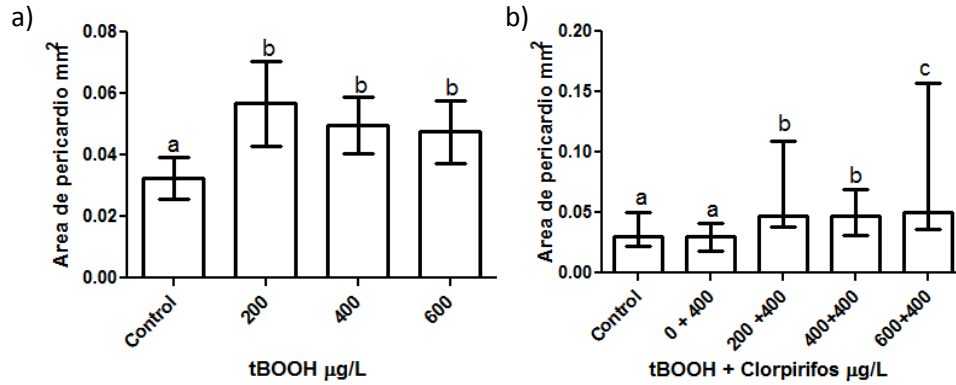


Figura 58. Figura 59 a) Área de pericardio en organismos expuestos a diferentes concentraciones de tBOOH , las diferencias significativas ($p < 0.05$; $F = 23.86$) b) Área de pericardio durante co- es posiciones tBOOH+CPR, , se observan diferencias significativas ($p < 0.05$; $F = 38.22$), Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

El porcentaje de malformaciones en la espina dorsal, lordosis no presentaron diferencias significativas ($F = 2.038$, $p = 0.140$) entre los promedios de cada tratamiento para las exposiciones a CPR. El grupo control no presentó ningún organismo con malformaciones, a diferencia de los tratamientos con el plaguicida (Figura 59). En lo que se refiere al promedio de cifosis el grupo control presentó un promedio de 4.16% y no presentaron diferencias significativas ($H = 3.312$, $p = 0.507$) entre los tratamientos (Figura 60).

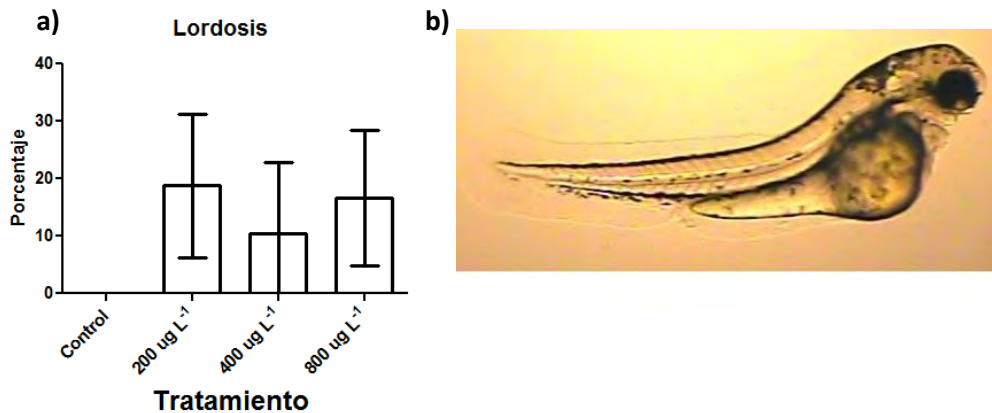


Figura 59. a) Prevalencia de lordosis en organismos expuestos a diferentes concentraciones de CPR, no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 2.038$, $p = 0.140$). Se representan las medias \pm la desviación estándar. b) organismo con una evidente malformación cóncava (lordosis) en la espina dorsal, el embrión pertenece al tratamiento de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CPR. Porcentaje promedio de cifosis por tratamiento sin diferencias significativas entre ellos.

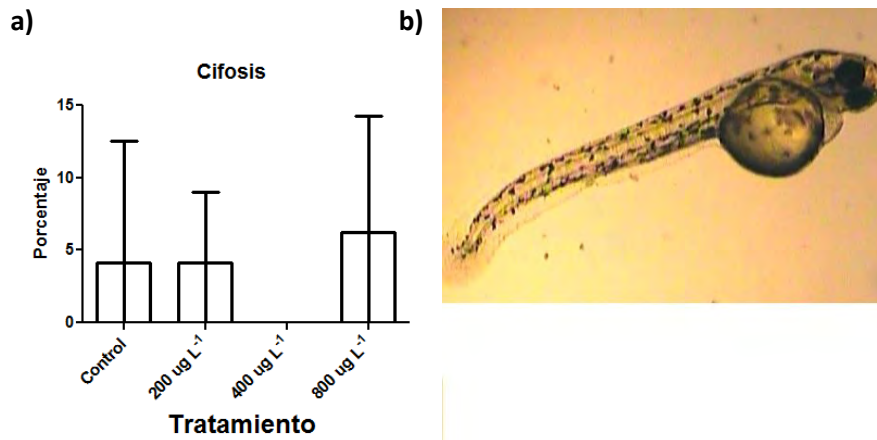


Figura 60. a) Prevalencia de cifosis en los embriones expuestos a CPR, donde no se presentaron diferencias significativas ($H=3.312$, $p=0.507$). b) organismo expuesto a 200 µg L⁻¹ de CPR con malformación dorsal (cifosis).

La variable porcentaje de lordosis no produjo diferencias significativas ($p= 0.133$; $F= 2.22$) entre las diferentes concentraciones de vitamina C solas, un escenario similar se presentó con las co-exposiciones de vitamina y CPR, donde no existieron diferencias significativas ($p= 0.95$; $F= 0.25$) entre los distintos tratamientos (Figura 61).

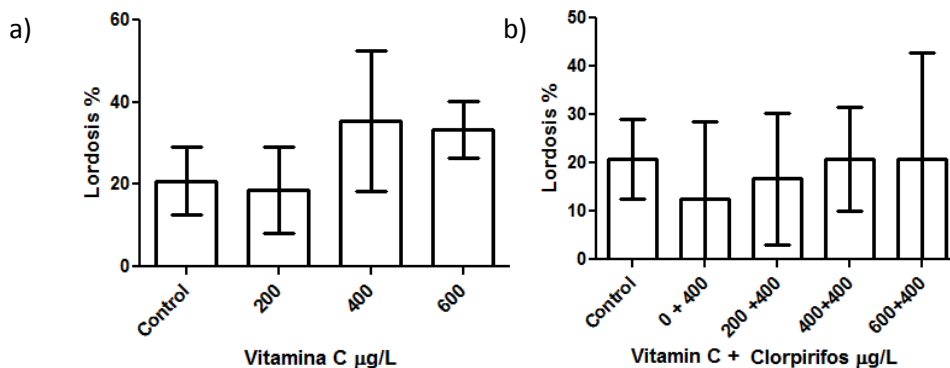


Figura 61. a) Prevalencia de lordosis en organismos expuestos a las distintas concentraciones de VC, donde no se observaron diferencias significativas ($p= 0.133$; $F= 2.22$). b) Prevalencia de lordosis en los tratamientos de las co-exposiciones de CPR y VC, no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.95$; $F= 0.25$). Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

En los tratamientos con diferentes concentraciones de VC no se observaron diferencias significativas ($p= 0.146$; $F= 2.15$) durante el tiempo de exposición para el porcentaje de cifosis; Las

combinaciones de VC con CPR no produjeron diferencias significativas ($p= 0.17$; $F= 1.85$) entre los diferentes embriones expuestos (Figura 62).

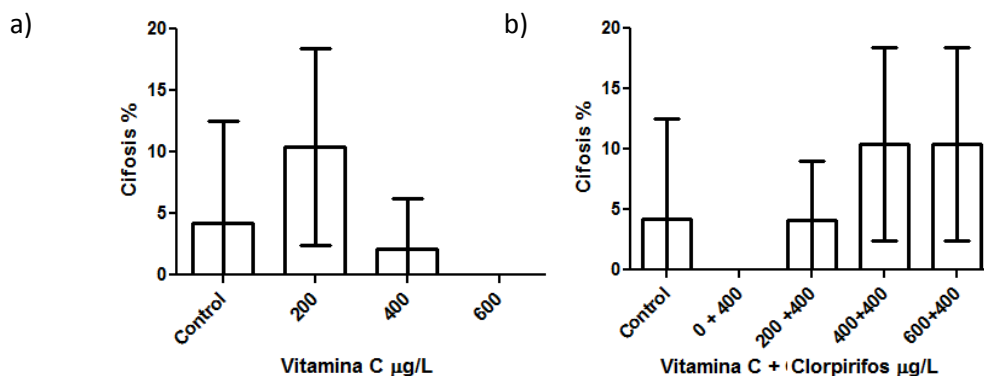


Figura 62. a) Prevalencia de cifosis de los tratamientos expuestos a diferentes concentraciones de VC, no se observaron diferencias significativas ($p= 0.146$; $F=2.15$). b) Las co-exposiciones de VC-CPR no generaron diferencias significativas ($p= 0.17$; $F= 1.85$) en el porcentaje de cifosis para los distintos tratamientos. Se representan las medias \pm la desviación estándar.

Las diferentes concentraciones de tBOOH, no presentaron diferencias significativas ($p= 0.78$; $F= 0.363$) en la variable porcentaje de lordosis durante el tiempo de exposición de los organismos; Las co-exposiciones del pro-oxidante con CPR no generaron diferencias significativas ($p= 0.95$; $F= 0.25$) entre los tratamientos (Figura 63).

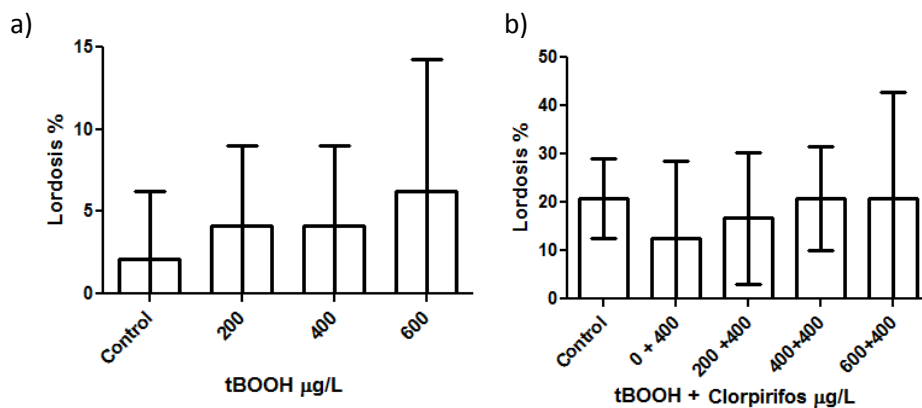


Figura 63. a) Prevalencia de lordosis para los tratamientos expuestos a las diferentes concentraciones de tBOOH, no se observan diferencias significativas ($p= 0.78$; $F=0.363$) entre ellos. b) se observa que no existieron diferencias significativas ($p= 0.95$; $F= 0.25$) entre los tratamientos co-expuestos a tBOOH-CPR, para la variable porcentaje de

lordosis. Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

El porcentaje de cifosis no presentó diferencias significativas ($p= 0.80$; $F= 0.333$) entre los tratamientos expuestos a las concentraciones de tBOOH, durante el tiempo de exposición de los embriones. Así mismo las co-exposiciones de tBOOH-CPR no produjeron diferencias significativas ($p= 0.57$; $F= 0.753$) en sus exposiciones, para el porcentaje de cifosis en los embriones expuestos (Figura 64).

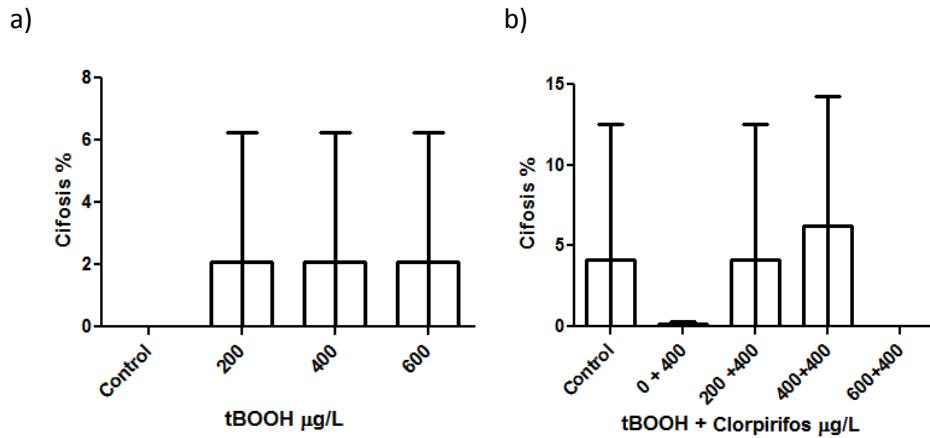


Figura 64. Figura 61 a) Prevalencia de cifosis, donde no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.80$; $F= 0.333$) entre los tratamientos expuestos a las diferentes concentraciones del tBOOH. b) Porcentaje de cifosis de los tratamientos con las co-exposiciones de pro-oxidante y plaguicida, no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.57$; $F= 0.753$). Se representan las medias \pm la desviación estándar.

Se analizó un promedio del porcentaje de edemas para cada tratamiento de exposición a las diferentes concentraciones de CPR (Figura 65), al igual que en los casos anteriores los análisis de varianza no mostraron la existencia de diferencias significativas estadísticamente hablando ($F=0.420$, $p=0.791$).

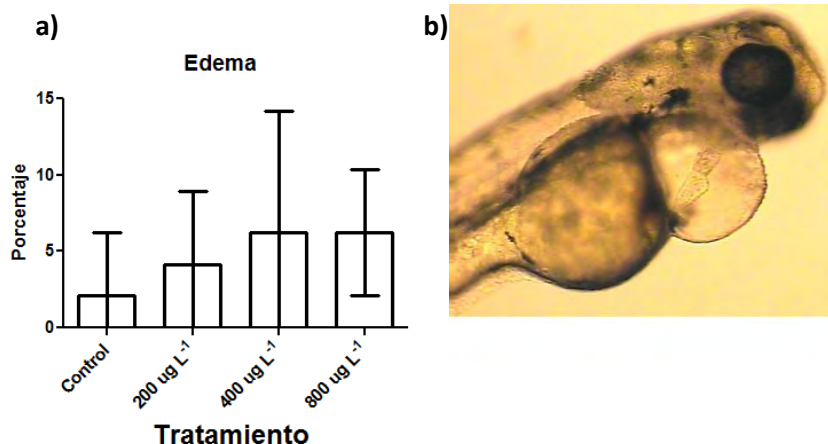


Figura 65. a) Prevalencia de edemas para exposiciones a concentraciones crecientes de CPR, dichos valores no presentaron diferencias significativas ($F=0.420$, $p=0.791$). Se representan las medias \pm la desviación estándar. b) Edema de pericardo, se observa un incremento en el área en comparación con organismos control.

Las concentraciones de vitamina C no causaron diferencias significativas ($p=0.14$; $KW=5.32$) entre los distintos tratamientos para el porcentaje de edemas en los organismos. Los tratamientos de coexposiciones entre la vitamina C y el CPR, también resultaron sin diferencias significativas ($p=0.08$; $F=2.49$. Figura 66).

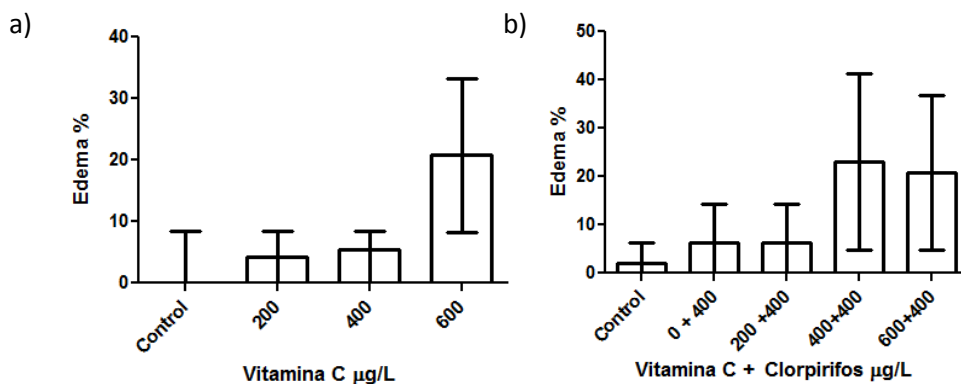


Figura 66. Figura 45 a) Porcentaje de edemas observados en los organismos expuestos a las distintas concentraciones de VitC, no se observaron diferencias significativas ($p=0.14$; $KW=5.32$) en dicha variable. b) Porcentaje de edemas correspondiente a las co-exposiciones VC+CPR, donde no se presentaron diferencias significativas ($p=0.08$; $F=2.49$) para los distintos tratamientos. Se representan las medias y la desviación estándar.

En los tratamientos expuestos a los diferentes concentraciones del pro-oxidante tBOOH, la variable porcentaje de edemas no presentaron diferencias significativas ($p=4.26$; $F=1.00$) entre ellos durante el tiempo de exposición. Por otro lado, las co-exposiciones de tBOOH-CPR si

produjeron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F = 4.88$) ente los tratamientos para el porcentaje de edemas, las diferencias se presentan entre el control y la concentración más elevada de las co-exposiciones ($600 \mu\text{g L}^{-1}$ tBOOH + 400L^{-1} CPR. Figura 67).

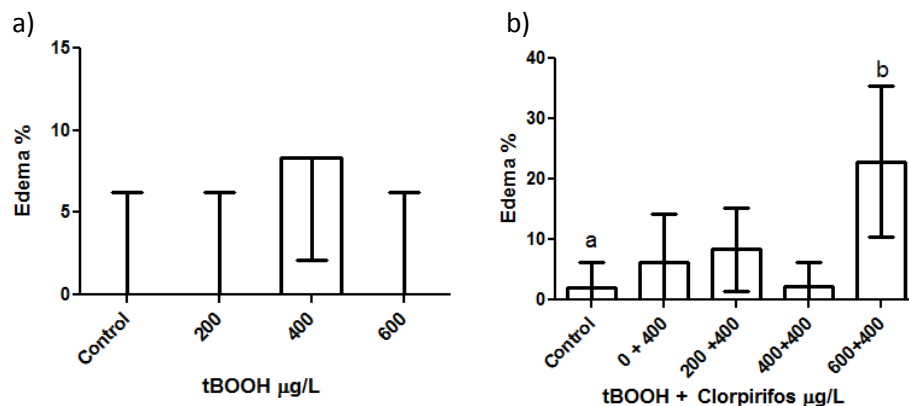


Figura 67. Figura 62 a) Porcentaje de edemas de los tratamientos expuestos a diferentes concentraciones de tBOOH, no se observaron diferencias significativas ($p = 0.426$; $F = 4.88$). b) diferencias significativas ($p < 0.05$; $F = 4.88$) presentes entre el control y $600 \mu\text{g L}^{-1}$ tBOOH + 400L^{-1} CPR, para las co-exposiciones de tBOOH+CPR. Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

Respuesta Fisiológica

En las variables fisiológicas, los valores para el ritmo cardiaco se obtuvo un valor con el control de 22 latidos cada 10 segundos, los tratamientos no presentaron diferencias significativas ($F = 2.043$, $p = 0.113$, Figura 68). Por otro lado, se presentó un promedio de 3% de mortalidad en el grupo control, existiendo diferencias significativas ($F = 7.088$, $p < 0.05$) entre éste y la concentración de $800 \mu\text{g L}^{-1}$.

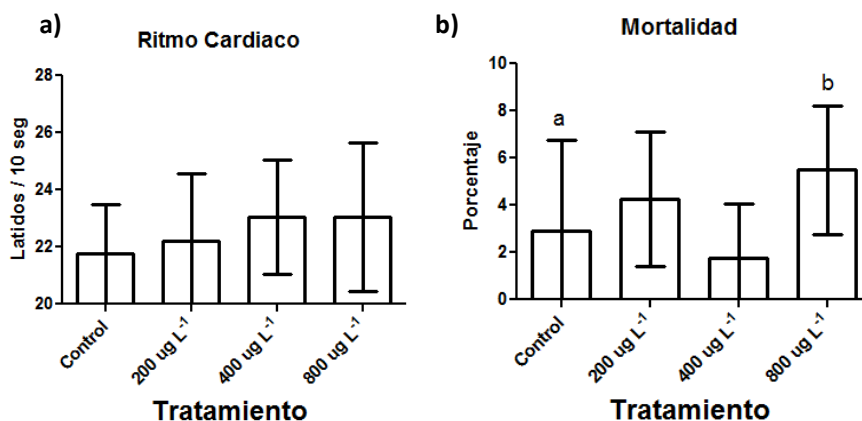


Figura 68. a) Frecuencia cardiaca en organismos expuestos a concentraciones crecientes de CPR, no se presentaron diferencias significativas ($F=2.043$, $p=0.113$) entre ellos. b) Porcentaje de mortalidad para las diferentes concentraciones de CPR, se observan diferencias significativas entre el control y los valores de $800 \mu\text{g L}^{-1}$ ($F=7.088$, $p<0.05$). Se representan las medias \pm la desviación estándar.

En el porcentaje de eclosión de organismos, el grupo control tuvo un 89% de eclosión (± 7) y no existieron diferencias significativas entre los tratamientos y el control ($F=1.128$, $p=0.3417$) como se puede apreciar en la Figura 61.

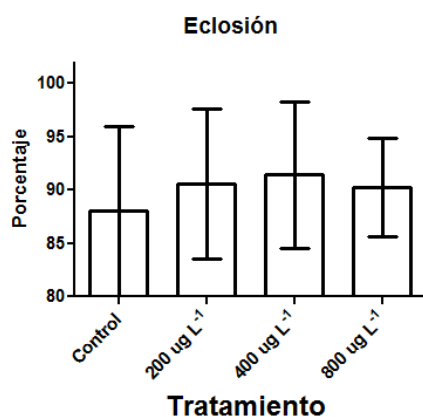


Figura 69. Porcentaje de eclosión para los diferentes tratamientos con CPR, donde no se observan diferencias significativas ($F=1.128$, $p=0.3417$) entre ellos. Se representan las medias y la desviación estándar.

En las exposiciones de Vitamina C, si existieron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F= 5.39$) entre los diferentes tratamientos, la prueba post hoc de Tukey indicó que se presentaron diferencias entre el tratamiento control y las concentraciones de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ y $600 \mu\text{g L}^{-1}$ para el antioxidante. Por otro lado, las coexposiciones con CPR no produjeron diferencias significativas ($p= 0.06$; $F= 2.30$) durante el tiempo de exposición (Figura 70).

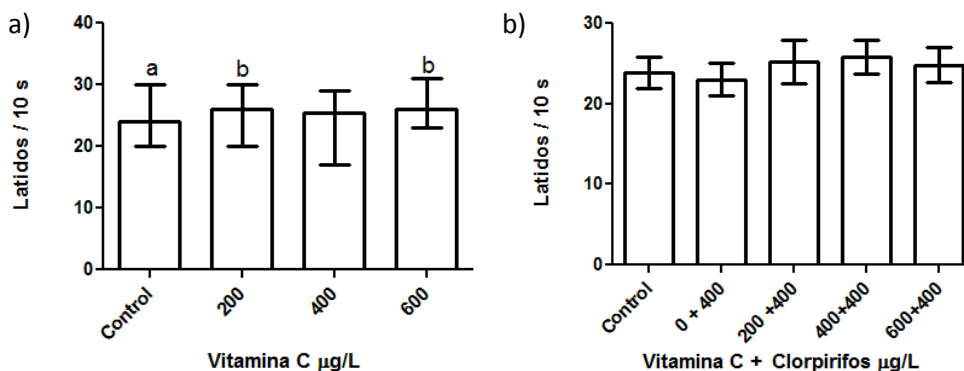


Figura 70. a) Frecuencias cardiacas en organismos expuestos a VC se observa que existen diferencias significativas ($p < 0.05$; $f=5.39$) entre las concentraciones control y $200 \mu\text{g L}^{-1}$; también con $400 \mu\text{g L}^{-1}$. b) Co-exposición a VC+CPR, no se observaron diferencias significativas ($p= 0.06$; $F= 2.30$). Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

La variable porcentaje de mortalidad no presentó diferencias significativas ($p= 0.25$; $F= 1.63$) entre las diferentes concentraciones de vitamina C en los embriones expuestos. El mismo escenario se presentó con las co-exposiciones entre vitamina y el CPR, los tratamientos no presentaron diferencias significativas ($p= 0.76$; $F= 0.46$) durante el tiempo de exposición (Figura 71).

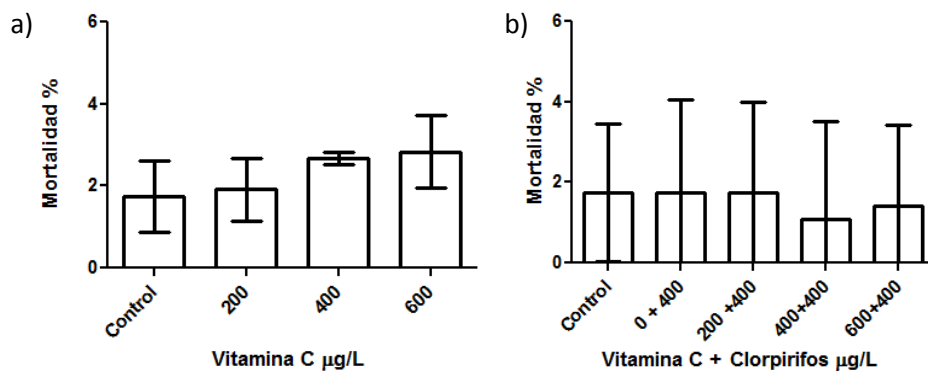


Figura 71. a) Mortalidad en organismos expuestos a diferentes concentraciones de VC ($p= 0.25$; $F=$). b) Co-exposición a VC+CPR, no produjeron diferencias significativas para el porcentaje de mortalidad ($p= 0.76$; $F= 0.46$). Se representan las medias \pm la desviación estándar.

En las exposiciones con diferentes concentraciones de vitamina C, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p= 0.61$; $F= 0.62$), en la variable porcentaje de eclosión. Así mismo, las co-exposiciones de vitamina con CPR tampoco produjeron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los embriones expuestos (Figura 72).

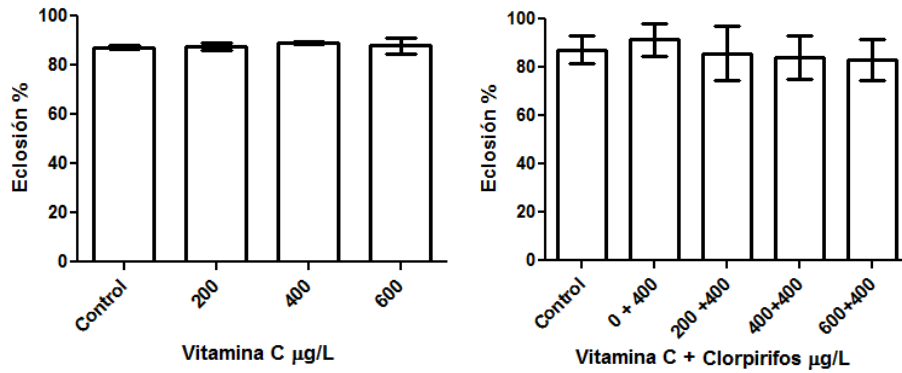


Figura 72. a) Porcentaje de eclosión en organismos expuestos a diferentes concentraciones de VC, no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.61$; $F= 0.62$). b) Las co-exposiciones VC+CPR no presentaron diferencias significativas para el porcentaje de eclosión. Se representan las medias \pm la desviación estándar.

En la variable ritmo cardiaco, se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F= 18.17$) en los tratamientos expuestos a el pro-oxidante, las diferencias significativas fueron entre el control y las concentraciones de 200 y 400 $\mu\text{g L}^{-1}$; estas concentraciones presentaron también diferencias significativas con la concentración más elevada del prooxidante (600 $\mu\text{g L}^{-1}$). Por otro lado, las co-exposiciones del tBOOH con CPR no generaron diferencias significativas ($p= 0.20$; $F= 1.49$) entre los tratamientos expuestos (Figura 73).

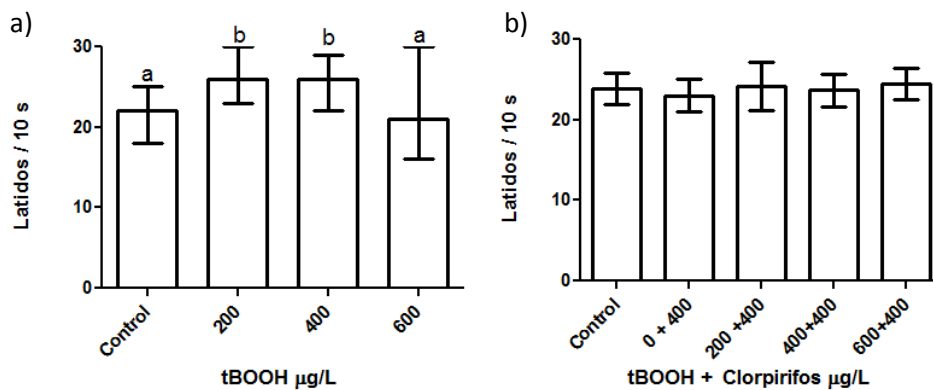


Figura 73. a) Frecuencia cardiaca, donde se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F= 18.17$). b) La frecuencia cardiaca no presentó diferencias significativas ($p= 0.20$; $F= 1.49$) entre los tratamientos expuestos a tBOOH-CPR. Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

Las concentraciones del tBOOH para la variable porcentaje de mortalidad no causaron diferencias significativas ($p= 0.289$; $F= 1.49$) en las distintas concentraciones, sin embargo para las co-exposiciones con el CPR si existieron diferencias significativas ($p< 0.05$; $F= 7.45$), éstas fueron entre las concentraciones control y $400 \mu\text{g L}^{-1}$ CPR, con las concentraciones en $\mu\text{g L}^{-1}$ de $200 \text{ tBOOH} + 400 \text{ CPR}$, $400 \text{ tBOOH} + 400 \text{ CPR}$ y $600 \text{ tBOOH} + 400 \text{ CPR}$ (Figura 74).

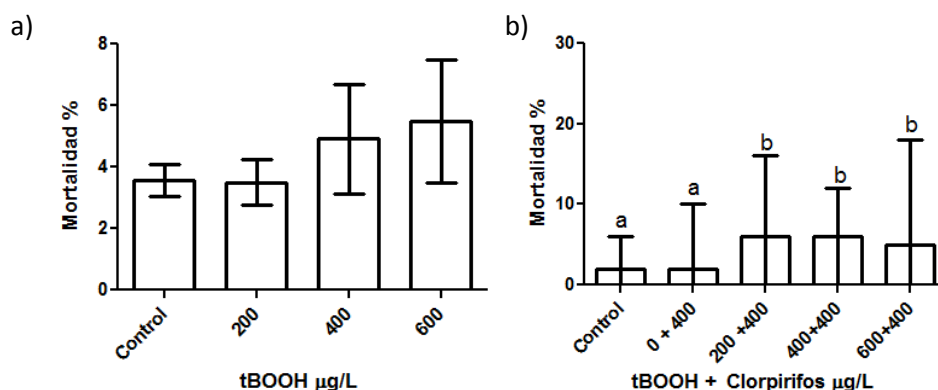


Figura 74. a) Porcentaje de mortalidad de los organismos, expuestos a las diferentes concentraciones de tBOOH, no se observaron diferencias significativas ($p= 0.289$; $F= 1.49$) para dicha variable. b) Porcentaje de mortalidad para las co-exposiciones de tBOOH+CPR, en los tratamientos se observan diferencias significativas ($p < 0.05$; $F= 7.45$) Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

El porcentaje de eclosión no presentó diferencias significativas ($p= 0.391$; $F= 1.136$) entre los tratamientos a concentraciones de tBOOH, durante el periodo de exposición de los embriones. En las co-exposiciones de tBOOH con $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de CPR, si se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$; $F= 4.35$), esta diferencia se encuentran entre $0 \text{ tBOOH} + 400 \mu\text{g L}^{-1}$ con las concentración $400 \mu\text{g L}^{-1} \text{ tBOOH} + 400 \mu\text{g L}^{-1} \text{ CPR}$ para el periodo de exposición (Figura 75).

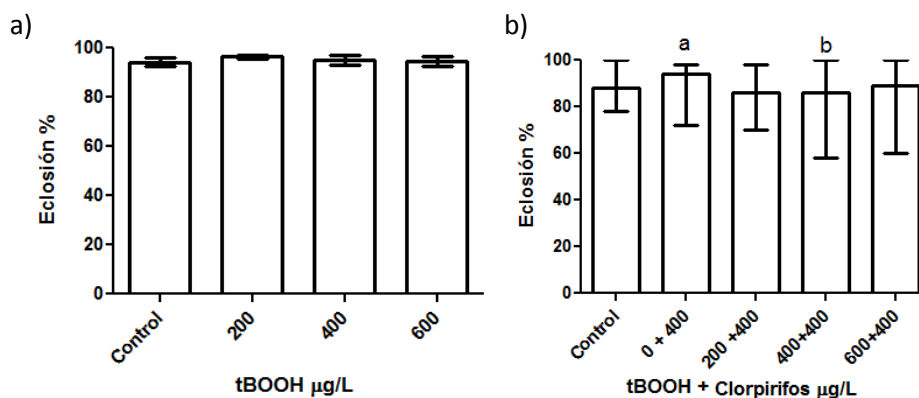


Figura 75. a) Porcentaje de eclosión para las exposiciones a concentraciones crecientes del pro-oxidante, no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.391$; $F= 1.136$) entre los tratamientos; b) Porcentaje de eclosión durante las co-exposiciones tBOOH-CPR, se aprecia la presencia de diferencias significativas ($p< 0.05$; $F= 4.35$), Se representan las medias \pm la desviación estándar. Letras diferentes señalan los pares con diferencias significativas.

Discusión

Las exposiciones a Clorpirifos han demostrado que producen inhibición de la actividad enzimática de AChE en varias especies acuáticas, desde embriones hasta organismos adultos (Jacobson et al. 2010; Oruc 2012), aún en concentraciones bajas, indicando la efectividad del uso de esta enzima como biomarcador de exposición a plaguicidas (Thirugnanam & Forgash 1977; Karen et al. 1998; Fulton & Key 2001; Key et al. 2003; Roex et al. 2003; Küster 2005; Beltran & Pocsidio 2010). En el presente estudio, los resultados de exposición a CPR en el bioensayo A presentaron una inhibición enzimática por arriba del 35% en todas las concentraciones con respecto al control, sin embargo solo a $400 \mu\text{g L}^{-1}$ (45%) fue una inhibición significativa de la actividad de la AChE. La inhibición enzimática se presenta por biotransformación del compuesto CPR en su metabolito activo Clorpirifos-oxón (CPR-O); tal y como lo demuestran diversos autores, donde la presencia de reacciones de fase I por parte de enzimas de la familia del citocromo P450 (CYP450) producen la desulfuración oxidante, del CPR (Amitai et al. 1998; Sams et al. 2000; Rodríguez Fuentes 2005; Eyer et al. 2009). La expresión relativa de la AChE tuvo un incremento únicamente en la concentración de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ lo que parece sugerir que un aumento en la concentración de CPR no produce cambios en la expresión genética. Resultados similares fueron reportados con anterioridad, indicando que no existe una relación entre los niveles de exposición a CPR y la expresión genética, esto es debido a que la actividad enzimática se ve afectada por factores que no interfieren con la síntesis (Vuaden et al. 2012; Estevan et al. 2013). No se observó evidencia de estrés oxidante en la mayoría de los biomarcadores empleados, pero se apreció una disminución en el contenido de glutatión al aumentar la concentración del plaguicida. Este comportamiento sugiere tal vez que el GSH se está utilizando como un conjugante, mediante reacciones de Fase II por la Glutatión transferasa GST, generando un complejo de GSH-CPR como principal mecanismo de desintoxicación mediante reacciones fase II. Se ha reportado la importancia de este mecanismo, el cual puede ser aún más importante que la biotransformación (Choi et al. 2006).

Tampoco se produjeron diferencias significativas sobre las variables morfométricas y fisiológicas de los organismos expuestos únicamente se observó un aumento en la mortalidad en la concentración más alta, otros autores han demostrado que existe un incremento en el porcentaje de mortalidad asociado a las concentraciones de exposición del plaguicida por efecto de la inhibición de la AChE (Figura 75).

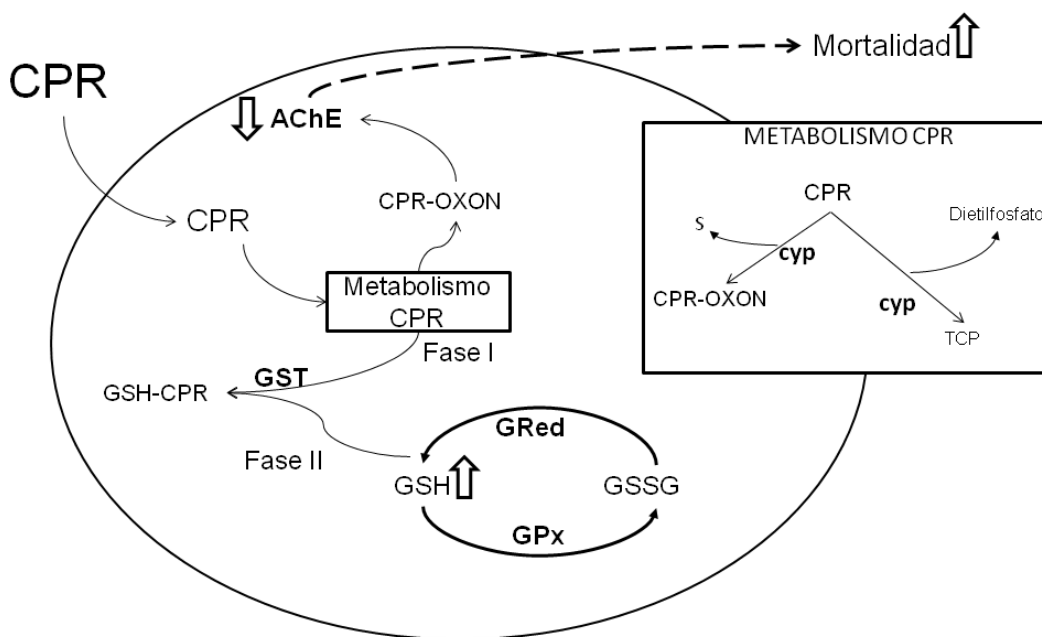


Figura 76. Efecto de la concentración de CPR a nivel celular, donde se observa un proceso de metabolización gracias a enzimas de la familia cyp, cuando producen bioactivación generan CPR-OXON metabolito inhibidor de la actividad enzimática durante reacciones de fase I; una inhibición enzimática a nivel organismo produce alteraciones que generan la muerte. En reacciones de fase II, la enzima GST es la encargada de generar complejos de GSH-CPR para la desintoxicación de la célula, la producción de estos complejos causa un incremento en la producción de GSH. No existe evidencia de radicales libres que produzcan estrés oxidante.

Resumiendo lo anterior, durante el bioensayo A obtuvimos una disminución de la actividad de la AChE, lo cual llevó a un aumento de la mortalidad. Por otro lado ya se discutió que el aumento y posterior disminución del GSH total pudiera estar relacionada con un efectivo sistema de conjugación vía reacciones de Fase II. La incógnita es por lo tanto porque no se observó movimiento en los biomarcadores de estrés oxidante. Una de las posibilidades es que debido a una efectiva desintoxicación por medio de la GST que evitó que se produjera radicales libres a partir del CPR. Aunque durante las exposiciones a CPR se observó inhibición de la AChE, resulta interesante notar que los niveles de inhibición obtenidos rondan el 45% cuando los organismos

tienen 72 hpf. Otros estudios con organismos de la misma edad expuestos a concentraciones similares obtuvieron resultados similares (Yang et al., 2011, Yen et al. 2011). Sin embargo, al exponer organismos de mayor edad (96-120 hpf) o adultos a concentraciones similares o menores produjeron más del 70% de inhibición de la AChE (Tilton et al., 2011, Yen et al. 2011). Es importante señalar que la expresión de la AChE del pez cebra ocurre en los embriones después de las 12 hpf (Bertrand et al. 2001), Yen et al., (2011) observaron un incremento del 800% en la actividad catalítica de la AChE de las 24 a las 72 hpf, lo cual indica que existen diferencias de desarrollo en la expresión y la actividad de la AChE, lo cual pudiera permitir a los organismos más jóvenes ser más resistente a los plaguicidas OP en comparación a organismos mayores. Aunado a esto, se ha reportado que durante los estadios tempranos de desarrollo algunas enzimas de desintoxicación CYP450 no están aun expresadas, lo cual produce cambios en los procesos de biotransformación de los contaminantes. Por ejemplo en el pez cebra, la expresión de CYP450 comienza a partir de las 36 horas después de la fertilización y no existe un aumento en la síntesis por presencia xenobióticos (Andreasen et al. 2002). Recordemos que el CPR necesita bioactivación para poder tener un efecto inhibitor en la AChE, existen reportes de que exposiciones a 350 ug L^{-1} de CPR en organismos con una edad de 72 horas después de la eclosión no se obtuvieron concentraciones medibles de CPR-O, lo cual sugiere que en estadios de desarrollo temprano los peces cebra pueden estar desintoxicando el CPR por reacciones de fase II, por otras rutas metabólicas y/o que no presentan la enzima para la producción del oxón por desulfuración (Yang et al., 2011). Por otro lado el papel protector del corión de los organismos, reduce el porcentaje de entrada de los diferentes compuestos actuando como barrera protectora consecuencia de su papel evolutivo. El corión retrasa la entrada de sustancias químicas reduciendo significativamente su paso a través de la barrera (Braunbeck & Lammer 2006), se ha comprobado que sustancias con pK_{ow} similar al de CPR retrasan su entrada a través del corion, incluso con solventes que faciliten su transporte (Kais et al. 2013).

Si consideramos que el tiempo de desarrollo del organismo presenta una pérdida total del corion hasta las 42 horas, se tendría que el tiempo de exposición de los organismos directamente con el plaguicida fue de 30 horas. La falta de actividad de diversas enzimas de biotransformación y el papel protector del corión contribuyeron a disminuir la toxicidad del CPR y por lo tanto no se observó un efecto a nivel organismo. Estudios adicionales de exposiciones a concentraciones más

altas de CPR en organismos en estadios de desarrollo más susceptibles proveerá más evidencia respecto al papel del estrés oxidante como un mecanismo de toxicidad.

La VC no produjo alteraciones sobre la actividad o expresión genética de la enzima AChE. El efecto neuroprotector de la VC ha sido observado previamente donde se ha visto un incremento en la actividad de la AChE en organismos expuestos a compuestos inhibidores (Bano and Bhatt, 2010, Delwing-de Lima et al., 2010). De manera similar, se reportó que la VC tuvo un papel protector contra el estrés oxidante producido por CPR (Özkan et al., 2012). Debido a que el CPR no produjo estrés oxidante en los organismos expuestos en el presente trabajo, la protección antioxidante no fue necesaria y por lo tanto no se observaron efectos durante las co-exposiciones con CPR. Aunque no hubo alteraciones en estrés oxidante durante las exposiciones con VC, existieron algunos efectos dañinos en los biomarcadores a nivel organismo. Por ejemplo, la frecuencia cardíaca y el área de pericardio aumentaron durante las co-exposiciones. La vitamina C es un nutriente esencial y participa como una sustancia activa en numerosas funciones celulares asociadas con respuesta inmune (Surefa et al., 2006). Entre estos roles, muchos están relacionados a prevenir o curar las condiciones inflamatorias producidas por o que conducen a una elevada producción de ERO y especies reactivas de nitrógeno (Amatore et al., 2008). Sin embargo, bajo algunas circunstancias la VC y sus derivados ascórbicos se comportan como pro-oxidantes (Pepperell et al., 2003, Amatore et al., 2008). La incubación de AChE con VC y iones cúpricos, bajo condiciones aerobias, produjeron una pérdida irreversible de la actividad enzimática causada por reacciones redox (Kanazawa et al., 1995). Por lo tanto, en exceso la VC puede tener un efecto dañino en el pez cebra, por un mecanismo desconocido.

La exposición a diferentes concentraciones del pro-oxidante tBOOH no tuvo un efecto significativo en la actividad de la AChE con respecto al control, sin embargo, una correlación negativa entre la concentración de tBOOH y la actividad de AChE fue observada ($r= 0.7$). La expresión genética de AChE también permaneció sin alteraciones cuando el compuesto fue administrado solo, pero en combinación con CPR se produjo una reducción significativa en la expresión respecto al tratamiento que únicamente tenía CPR. Estudios anteriores han reportado el papel de los pro-oxidantes en la regulación de la actividad y transcripción de la AChE. Por ejemplo, un estudio in vitro presentó que concentraciones bajas de peróxido de hidrógeno incrementan la actividad de AChE humana recombinante, mientras que las concentraciones altas inhibieron a la enzima (Schallreuter et al., 2004). Se reportó también que el peróxido de hidrógeno modifica la estructura

de la membrana de los eritrocitos y por tanto produce cambios en la actividad de la AChE (Molochkina et al, 2005). Se determinó que la activación/ desactivación de la AChE en la piel por peróxido de hidrógeno es un proceso de oxidación reversible (Schallreuter and Elwary, 2007). El tBOOH es un potente pro-oxidante y demostró la producción de estrés oxidante en el presente estudio mediante una reducción en la actividad de CAT y un aumento en la peroxidación de lípidos. Pero, cuando el tBOOH fue co-expuesto con el CPR las diferencias en los biomarcadores de estrés oxidante solo se observaron en los niveles de actividad de CAT. Un estudio anterior encontró que el peróxido de hidrógeno incrementó la toxicosis por organofosforados en pollos, produciendo una disminución en la DL50 del diclorvos y diazinón y reduciendo la actividad de la AChE, sugiriendo una interacción tóxica entre el plaguicida y el peróxido (Al-Baggou et al., 2011). Este efecto puede ser atribuido al pro-oxidante, que modula la actividad de las ChE (Schallreuter et al., 2004; Molochkina et al., 2005). En el presente estudio, la combinación de tBOOH con CPR también redujo la expresión y la actividad de la AChE. Por lo tanto, basado en los datos para este estadio de desarrollo en particular, parece ser que la inhibición de la AChE puede ser el principal modo de acción de la toxicidad por CPR y no el estrés oxidante.

Conclusiones

En resumen, se observó una inhibición cercana al 45% durante la exposición al CPR, sin embargo no se detectó estrés oxidante ni un efecto en los biomarcadores a nivel organismo en los embriones de pez cebra. La adición de VC no produjo estrés oxidante ni tuvo efecto en la actividad/transcripción de la AChE, pero se incrementó el área del pericardio y el ritmo cardiaco por efecto de un mecanismo desconocido. El tBOOH disminuyó la expresión de la AChE y la actividad y originó estrés oxidante cuando fue administrado de forma única. Pero, en combinación con CPR solo se observaron cambios en la actividad de la AChE, sin cambios aparentes en el estrés oxidante (solo se observó una disminución en la actividad de CAT). Todo lo anterior sugiere que los efectos adversos observados a nivel organismo pueden ser por efecto de la inhibición de la AChE y no por estrés oxidante. El presente trabajo proporciona más evidencia sobre el papel de los pro-oxidantes en la actividad y transcripción de la AChE.

Bibliografía

- Abdollahi, M. et al., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, 10(6), pp.141–148.
- Abilés, J.S., 2007. *Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico*. Universidad de Granada.
- Albert, L.A., 2005. Panorama de los plaguicidas en México. *Revista de toxicología en línea*, pp.1–17. Available at: <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>.
- Albert, L.A. & Benítez, J.A., 2005. Impacto ambiental de los plaguicidas en los ecosistemas costeros. In A. V. Botello et al., eds. *Golfo de México Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. México: Univ. Autón de Campeche, Univ. Nac. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología, pp. 157–176.
- Alberts, B. et al., 2008. Apoptosis. In D. Schanck et al., eds. *Molecular Biology of the Cell*. New York, United States of America: Taylor & Francis, p. 1726.
- Aldrich, S., 2010. GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit.
- Amitai, G. et al., 1998. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by chlorpyrifos-oxon. *Biochemical Pharmacology*, 56(3), pp.293–299. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9744565>.
- Andreasen, E.A. et al., 2002. Tissue-Specific Expression of AHR2 , ARNT2 , and CYP1A in Zebrafish Embryos and Larvae : Effects of Developmental Stage and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Exposure. *Toxicological sciences*, 68, pp.403–419.
- Antolino-Lobo, I. et al., 2011. Induction of glutathione synthesis and conjugation by including the protective role of some antioxidants. *Toxicology*, 289(2-3), pp.175–184. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2011.08.012>.
- ATSDR, A. para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 1997. Clorpirifos. *Agency for toxic substances and disease registry*, p.2.
- Avello, M. & Suwalsky, M., 2007. Radicales Libres , Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. , pp.1–6.
- Banerjee, B.D. et al., 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology letters*, 107(1-3), pp.33–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10414779>.
- Beltran, K.S. & Pocsidio, G.N., 2010. Acetylcholinesterase activity in *Corbicula fluminea* Mull., as a biomarker of organophosphate pesticide pollution in Pinacanauan River, Philippines. *Environ Monit Assess*, 165, pp.331–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19444631> [Accessed February 9, 2012].

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 1995. *Biochemistry* Seventh. L. Samols et al., eds., New York, United States of America: W.H. Freeman and Company.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 2003. *Biochemistry* 5th editio., W.H. Freeman and Company.
- Bio-Rad, 2000. iScript cDNA Synthesis Kit. , p.2.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.
- Braunbeck, T. & Lammer, E., 2006. Fish embryo toxicity assays. *Contract*, (203), p.40.
- Bui, K. & Ochillo, R.F., 1987. Marinus, Characterization of cholinesterase of muscularis muscle of *Bufo marinus*. *Comparative biochemistry and physiology.*, 87(1), pp.107–111.
- Buono, S. et al., 2012. Toxic effects of pentachlorophenol, azinphos-methyl and chlorpyrifos on the development of *Paracentrotus lividus* embryos. *Ecotoxicology (London, England)*, 21(3), pp.688–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101977> [Accessed August 7, 2013].
- Bustin, S. a et al., 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34(3), pp.597–601. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956331> [Accessed August 11, 2013].
- Cárdenas, O., Silva, E. & Ortiz, J.E., 2010. Uso de plaguicidas inhibidores de acetilcolinesterasa en once entidades territoriales de salud en Colombia , 2002-2005. *Biomédica*, 30(1), pp.95 – 106.
- Carvalho, M. et al., 2004. The toxicity of N-methyl-a-methyldopamine to freshly isolated rat hepatocytes is prevented by ascorbic acid and N-acetylcysteine. *Toxicology*, 200, pp.193–203.
- Caselli, F. et al., 2006. In vitro characterization of cholinesterases in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 143(4), pp.416–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753348> [Accessed January 21, 2014].
- Cayman Chemical, C., 2010a. Catalase Assay Kit. , (707002), p.24.
- Cayman Chemical, C., 2011. Glutathione Assay Kit. , (703002), p.28.
- Cayman Chemical, C., 2010b. Superoxide Dismutase Assay Kit. , (706002), p.20.
- CDPR, C.D. of P.R., 2006. ¿ Qué es un pesticida ? , p.2.

- Cedeño-Caero, L. et al., 2005. Desulfuración de organoazufrados presentes en diesel por oxidación y extracción. Parte.I. Catalizadores de cobre soportados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 4(3), pp.241–252.
- Chandan, K. Sen & Packer, L., 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription species. *The FASEB journal*, 10, pp.709–720.
- Chaudière, J. & Ferrari-iliou, R., 1999. Intracellular Antioxidants : from Chemical to Biochemical Mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37, pp.949–962.
- Choi, K. et al., 2006. Metabolism of chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon by human hepatocytes. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 20(6), pp.279–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17163483>.
- Cnubben, N.H. et al., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental toxicology and pharmacology*, 10(4), pp.141–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21782570>.
- Compton, S.J. & Jones, C.G., 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry*, 151(2), pp.369–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4096375>.
- Cook, L.W., Paradise, C.J. & Lom, B., 2005. The pesticide malathion reduces survival and growth in developing zebrafish. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 24(7), pp.1745–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16050592>.
- Costa, J., 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(5), pp.299–305.
- Coyac Herrera, G., 2010. *Caracterización de las Colinesterasas presentes en diferentes etapas de desarrollo del pez cebra (Danio rerio) y el efecto de los plaguicidas organofosforados Clorpirifos y Fentión*. Universidad Autónoma de Puebla.
- Dalton, T.P., Shertzer, H.G. & Puga, a, 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39, pp.67–101. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331077>.
- Dautremepuits, C., Betoulle, S. & Vernet, G., 2003. Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp (Cestoda). *Fish and Shellfish Immunology*, 15, pp.467–471.
- Deng, J. et al., 2009. Hexabromocyclododecane-induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 93(1), pp.29–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19356805> [Accessed March 1, 2012].
- DeVos, T. & Dick, T.A., 1992. Characterization of cholinesterases from parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Comparative biochemistry and physiology.*, 103(1), pp.129–134.

- Dorak, T., 2006. *Real-time PCR*, New York, NY.
- Doroshov, J.H., 1995. Glutathione peroxidase and oxidative stress. *Toxicology letters*, 82/83, pp.395–398.
- Dow AgroSciences, 2001. Clorpirifos. , pp.1–7.
- Elejealde Guerra, J.I., 2001. Estrés oxidativo , enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18(6), pp.326–335.
- EPA, 2012. PLAGUICIDAD: salud y seguridad. *Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por plaguicidas*, p.16. Available at: www.epa.gov/appfead1/safety/spanish/healthcare/handbook/contents.html [Accessed January 16, 2014].
- Ernst, O. & Zor, T., 2010. Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (38), pp.1–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3164080&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 17, 2013].
- Estepa, A., 2001. *¿Porqué el Pez Cebra?*, España. Available at: www.inia.es/gcontrec/pub/PaperSecalZebrafish_1054109421470.pdf.
- Estevan, C., Vilanova, E. & Sogorb, M. a, 2013. Chlorpyrifos and its metabolites alter gene expression at non-cytotoxic concentrations in D3 mouse embryonic stem cells under in vitro differentiation: Considerations for embryotoxic risk assessment. *Toxicology letters*, 217(1), pp.14–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220036> [Accessed February 13, 2013].
- Expedeon, Bradford. , p.4. Available at: www.expedeon.com.
- Eyer, F. et al., 2009. Extreme variability in the formation of chlorpyrifos oxon (CPO) in patients poisoned by chlorpyrifos (CPF). *Biochemical pharmacology*, 78(5), pp.531–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2714474&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 9, 2014].
- Fazekas, de S.G.S., Webster, R.G. & Datyner, A., 1962. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochemica et Biophysica Acta*, 71, pp.377–391.
- Fernández A., D.G., Mancipe G., L.C. & Fernández A., D.C., 2010. Intoxicación por organofosforados. *Revista Med*, 18(1), pp.84–92.
- Fina, B., 2009. *Estrés oxidativo*, Rosario - Argentina. Available at: www.biologiaosea.com.ar.

- Frayse, B., Mons, R. & Garric, J., 2006. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(2), pp.253–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16677909> [Accessed August 7, 2012].
- Fulton, M.H. & Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 20(1), pp.37–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11351414>.
- Gamaley, I. a & Klyubin, I. V, 1999. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *International review of cytology*, 188, pp.203–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10208013>.
- García-Gutiérrez, C. & Durga, R.-M.G., 2012. Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai, Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 8(3), pp.1–10.
- Goel, A., Dani, V. & Dhawan, D.K., 2005. Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos-induced toxicity. *Chemico-biological interactions*, 156(2-3), pp.131–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169541> [Accessed February 28, 2012].
- Gultekin, F. et al., 2001. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Archives of Toxicology*, 75(2), pp.88–96. Available at: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s002040100219> [Accessed April 17, 2012].
- Gupta, S.C. et al., 2010. Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in Drosophila through generation of reactive oxygen species. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(6), pp.1415–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627310> [Accessed November 27, 2011].
- Hallare, a V et al., 2005. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *The Science of the total environment*, 347(1-3), pp.254–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084981> [Accessed March 23, 2012].
- Hallare, A. et al., 2006. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(3), pp.378–88. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125774> [Accessed August 25, 2012].
- Hassan, H.M., 1988. Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free radical biology & medicine*, 5(5-6), pp.377–385. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2855738>.

- Hermes-lima, M., Willmore, W.G. & Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)Xylenol orange complex formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(3), pp.271–280.
- Hill, A.J. et al., 2005a. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 86(1), pp.6–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15703261> [Accessed March 23, 2012].
- Hill, A.J. et al., 2005b. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 86(1), pp.6–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15703261> [Accessed January 29, 2013].
- Huynh, H.P. V & Nugegoda, D., 2012. Effects of chlorpyrifos exposure on growth and food utilization in Australian catfish, *Tandanus tandanus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88(1), pp.25–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22011786> [Accessed March 12, 2012].
- INECC, I.N. de E. y C.C., 2012. Plaguicidas. *Plaguicidas*, p.3. Available at: www.inecc.gob.mx/sqre-temas/768-sqre-plaguicidas [Accessed January 16, 2014].
- INSHT, I. nacional de seguridad e higiene en el trabajo, 1994. Fichas Internacionales de Seguridad Química. , pp.5–6.
- Invitrogen, 2009. Quant-it™ RNA Assay Kit. , pp.1–8.
- Jacobson, S.M. et al., 2010. Subacute developmental exposure of zebrafish to the organophosphate pesticide metabolite , chlorpyrifos-oxon , results in defects in Rohon-Beard sensory neuron development. *Aquatic Toxicology*, 100, pp.101–111. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.015>.
- Jiang, Z.Y., Hunt, J. V & Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical biochemistry*, 202(2), pp.384–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1519766>.
- Jiang, Z.Y., Woollard, a C. & Wolff, S.P., 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, 26(10), pp.853–856. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1795606>.
- Johansson, L.H. & Hakan Borg, L.A., 1988. A Spectrophotometric Method for Determination Small Tissue Samples of Catalase Activity in. *Analytical Biochemistry*, 336(1), pp.331–336.
- Johnson, a, Carew, E. & Sloman, K. a, 2007. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 84(4), pp.431–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714802> [Accessed April 3, 2012].

- Julka, D., Pal, R. & Gill, K.D., 1992. Neurotoxicity of dichlorvos: effect on antioxidant defense system in the rat central nervous system. *Experimental and molecular pathology*, 56(2), pp.144–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1587340>.
- Kais, B. et al., 2013. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET). *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 140-141, pp.229–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831690> [Accessed January 9, 2014].
- Kale, M. et al., 1999. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicology letters*, 105(3), pp.197–205. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10355540>.
- Karen, D.J. et al., 1998. Bone Strength and Acetylcholinesterase Inhibition as Endpoints in Chlorpyrifos Toxicity to *Fundulus heteroclitus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 60, pp.167–175.
- Key, P.B. et al., 2003. Acetylcholinesterase Activity in Grass Shrimp and Aqueous Pesticide Levels from South Florida Drainage Canals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45(3), pp.371–377. Available at: <http://springerlink.metapress.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s00244-003-0173-7> [Accessed January 1, 2012].
- Kienle, C., Köhler, H.-R. & Gerhardt, A., 2009. Behavioural and developmental toxicity of chlorpyrifos and nickel chloride to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(6), pp.1740–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19477011> [Accessed March 1, 2012].
- Kimmel, C.B. et al., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 203(3), pp.253–310. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8589427>.
- Kulinsky, V.I. & Kolesnichenko, L.S., 2009. The Glutathione System. I. Synthesis , Transport , Glutathione. *Biochemistry (Moscow) Supplement series B: Biomedical Chemistry*, 3(2), pp.129–144.
- Küster, E., 2005. Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 75(1), pp.76–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112210> [Accessed March 12, 2012].
- Lawrence, C., 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1-4), pp.1–20. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848607004012> [Accessed March 1, 2012].
- Lehninger, A.L., 1995. *Principios de Bioquímica* Cuarta. D. L. Nelson & M. M. Cox, eds., EUA.

- Lessman, C. a, 2011. The developing zebrafish (*Danio rerio*): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 93(3), pp.268–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21932435> [Accessed March 1, 2012].
- Leticia, A.-G. & Gerardo, G.-B., 2008. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 71(3), pp.787–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18384877> [Accessed January 21, 2014].
- Levin, E.D. et al., 2003. Chlorpyrifos exposure of developing zebrafish: effects on survival and long-term effects on response latency and spatial discrimination. *Neurotoxicology and Teratology*, 25(1), pp.51–57. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0892036202003227> [Accessed April 17, 2012].
- Levin, E.D. et al., 2004. Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicology and teratology*, 26(6), pp.719–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15451035> [Accessed March 29, 2012].
- Limón-Pacheco, J. & Gonsebatt, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation research*, 674(1-2), pp.137–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955158> [Accessed February 13, 2013].
- Lionetto, M.G. et al., 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine pollution bulletin*, 46(3), pp.324–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12604066> [Accessed March 31, 2012].
- López, A.L., 2008. Mecanismos endógenos de generación de especies reactivas de oxígeno y respuesta celular antioxidante ante el estrés oxidativo. , pp.93–102.
- Luna González, C.R., 2008. *Actividad de acetilcolinesterasa como método de diagnóstico en intoxicaciones accidentales por compuestos organofosforados*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 101(1), pp.13–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21074869> [Accessed August 3, 2011].
- Mancilla Chávez, H.E., 2010. *Modificación del contenido de glutatión y su efecto en la expresión y función de los transportadores de vitamina c en células de sertoli*. Universidad Austral de Chile.
- Mayor Oxilia, R., 2010. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante Oxidative. *Revisiones del instituto de medicina tropical*, 5(2), pp.23–29.

- McCurley, A.T. & Callard, G. V., 2008. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC molecular biology*, 9, p.102. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2588455&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 14, 2013].
- Meyer, J.N., 2010. QPCR : a tool for analysis of mitochondrial and nuclear DNA damage in ecotoxicology. *Ecotoxicology (London, England)*, 19, pp.804–811.
- Murcia O, A.M. & Stashenko, E., 2008. Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia. *Agro Sur*, 36(2), pp.71–81.
- Murray, R.K. et al., 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry twntysixth.*, United states of America: McGraw-Hill.
- Nunes, B., 2011. The use of Cholinesterases in Ecotoxicology. In D. M. Whitacre, ed. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. New York, NY: Springer New York, pp. 29–59. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4419-8453-1> [Accessed November 2, 2011].
- Oñate Mardones, G.A., 2009. *Papel esencial del glutation en la defensa al estres oxidativo inducido por el humo de tabaco en celulas endoteliales humanas*. Universidad de Concepcion.
- Oropesa, A.-L. et al., 2013. Characterization of plasma cholinesterase from the White stork (*Ciconia ciconia*) and its in vitro inhibition by anticholinesterase pesticides. *Ecotoxicology and environmental safety*, 97, pp.131–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23962622> [Accessed January 21, 2014].
- Oropesa, A.L., Pérez-López, M. & Soler, F., 2014. Characterization of plasma cholinesterase in rabbit and evaluation of the inhibitory potential of diazinon. *Ecotoxicology and environmental safety*, 100, pp.39–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24433789> [Accessed January 21, 2014].
- Oruc, E., 2012. Oxidative Stress Responses and Recovery Patterns in the Liver of *Oreochromis niloticus* Exposed to Chlorpyrifos-Ethyl. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22310847> [Accessed March 12, 2012].
- Özcan Oruç, E., 2010. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96(3), pp.160–166. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048357509001527> [Accessed February 28, 2012].

- Peña, S. et al., 2000. Role of glutathione in Thiobencarb resistance in the European eel *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 46(1), pp.51–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10805993> [Accessed April 19, 2012].
- Peña-Llopis, S. et al., 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. *Chemosphere*, 45(4-5), pp.671–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11680763>.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D. & Peña, J.B., 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*, 65(4), pp.337–360. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X03001486> [Accessed March 12, 2012].
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), pp.2002–2007. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=55695&tool=pmcentrez&render_type=abstract.
- Reisner, A.H., Nemes, P. & Bucholtz, C., 1975. The Use of Coomassie Brilliant Blue G250 Perchloric Acid Solution for Staining in Electrophoresis and Isoelectric Focusing on Polyacrylamide Gels. *Analytical biochemistry*, 64(5), pp.509–516.
- Robles-Mendoza, C. et al., 2011. Esterases activity in the axolotl *Ambystoma mexicanum* exposed to chlorpyrifos and its implication to motor activity. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 105(3-4), pp.728–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21996259> [Accessed January 9, 2014].
- Rodríguez Fuentes, G., Gold-Bouchot, G. & Ceja-Moreno, V., 2008. *Caracterización de las colinesterasas en diferentes órganos de la tilapia nilótica (Oreochromis niloticus): Aplicación para Ecotoxicología*. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida.
- Rodríguez-Fuentes, G., Soto, M. & Luna-Ramírez, K., 2013. Characterization of cholinesterases in the damselfish Sergeant major (*Abudefduf saxatilis*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 96, pp.99–102. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23886799> [Accessed January 21, 2014].
- Roex, E.W.M., Keijzers, R. & van Gestel, C. a. M., 2003. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic Toxicology*, 64(4), pp.451–460. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X03001000> [Accessed March 12, 2012].
- Salyha, Y.T., 2013. Chlorpyrifos Leads to Oxidative Stress-Induced Death of Hippocampal Cells in Vitro. *Neurophysiology*, 45(3), pp.193–199. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11062-013-9356-7>.

- Sams, C., Mason, H.J. & Rawbone, R., 2000. Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. *Toxicology Letters*, 116(3), pp.217–221. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996483>.
- Sánchez-Chávez, G. & Salceda, R., 2008. Enzimas polifuncionales: el caso de la acetilcolinesterasa. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(2), pp.44–51.
- Sandahl, J.F. et al., 2005. Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in coho salmon exposed to chlorpyrifos. *Environmental toxicology and chemistry*, 24(1), pp.136–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15683177>.
- Scientific, T., 2007. How to use a protein assay standard curve. , 0747(815), pp.1–4.
- Seymour, R.B. & Carraher, C.E., 2002. *Introducción a la química de polimeros* 2th editio., New York, NY: Editorial Reverté S.A.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, a & Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 5(5), pp.415–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11256882>.
- Sohn, H. et al., 2004. Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. , 151, pp.357–365.
- Soto, M., 2011. *Efectos estrogénicos por bloqueadores solares en el pez sargento Abudedefduf saxatilis*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Spence, R. et al., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 83(1), pp.13–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18093234> [Accessed March 1, 2012].
- Thirugnanam, M. & Forgash, A.J., 1977. ENVIRONMENTAL IMPACT OF MOSQUITO PESTICIDES : TOXICITY AND ANTICHOLINESTERASE ACTIVITY OF CHLORPYRIFOS TO FISH IN A SALT MARSH HABITAT. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 5, pp.415–425.
- Tietze, F., 1969. Enzymic Method for Quantitative Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. *Analytical Biochemistry*, 27, pp.502–522.
- Timbrell, J.A., 1995. *Introduction to Toxicology* Second. J. A. Timbrell, ed., Taylor & Francis.
- UNPL, U.N. de la P., 2010. Plaguicidas. *Catedra de toxicología y química ambiental*, p.5. Available at: www.biol.unlp.edu.ar/toxicologia/seminarios/parte_2/plaguicidas.html [Accessed January 16, 2014].
- Uusi-Heikkilä, S. et al., 2010. Size-dependent reproductive success of wild zebrafish *Danio rerio* in the laboratory. *Journal of fish biology*, 77(3), pp.552–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20701640> [Accessed October 28, 2011].

- Velásquez, C.M., 2000. Papel de las especies reactivas del oxígeno en la arterioesclerosis. *IATREIA*, 13(3), pp.185–189.
- Vinueza-Burgos, C., 2009. PCR en Tiempo Real : la nueva era de la información genética celular (Real Time PCR : the new age of cellular genetic information). *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(2), pp.1–13.
- Vismara, C., Vailati, G. & Bacchetta, R., 2001. Reduction in paraquat embryotoxicity by ascorbic acid in *Xenopus laevis*. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 51(3), pp.293–303. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090891>.
- Voet, D. & Voet, J.G., 2011. *Biochemistry* 4th ed. K. Pace, P. Recta, & J. Kalkut, eds., Hoboken NJ, EUA.: John Wiley & Sons, Inc.
- Vuaden, F.C. et al., 2012. Long-term methionine exposure induces memory impairment on inhibitory avoidance task and alters acetylcholinesterase activity and expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurochemical research*, 37(7), pp.1545–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437435> [Accessed February 26, 2013].
- Widder, P.D. & Bidwell, J.R., 2008. Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 88(1), pp.9–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448174> [Accessed March 12, 2012].
- Xuereb, B. et al., 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 94(2), pp.114–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608286> [Accessed March 12, 2012].
- Yan, F. et al., 2008. A trifunctional enzyme with glutathione S-transferase , glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1780, pp.869–872.
- Zhu, K. & Strong, W., 1976. Protein Quantitation : A Comparative Analysis Using the Experion Automated Electrophoresis System, Bradford and Modified Lowry Assays, and SDS-PAGE. , p.6.

Anexos

Anexo 1. Actividad enzimática Acetilcolinesterasa

- Embriones de pez Cebra en tubos Eppendorf® de 1.5 ml, adición de 150 µl de Tris Buffer 8.0 de pH. Homogenizado con ayuda de un resuspensor de pellet por 90 seg en hielo.
- Centrifugar a 10000 g durante 10 min. Recoger el sobrenadante en tubo limpio.
- Colocar 20 µl de muestra en un pozo de microplaca, adicionar 170 µl de DTNB/Tris Buffer pH 7.5.
- Antes de la lectura, se adicionan 10 µl del sustrato Acetilcolina de manera rápida.
- La lectura se realiza en lector UV/Vis a 405 nm de longitud de onda, con cinética de 20 ciclos cada 17 seg.
- Obtención de proteína por el método de Bradford

$$\text{Calculo de actividad enzimática : } \frac{1}{10000} * \frac{\frac{\Delta\text{Abs}}{\text{min}}}{(\text{Vh}/\text{Vt}) * \text{CP}}$$

Donde $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ = Pendiente de la cinética obtenida directamente de la absorbancia.

Vh/Vt = Volumen de la muestra entre el volumen total de la reacción en microlitros

CP = Valor de proteína en mg / ml

Reactivos:

- Buffer Tris 8.0 de pH a 0.05M: Pesar 0.709g de reactivo Tris 8.0 en 100 ml de agua destilada.
- DTNB / Buffer Tris 7.5 de pH 0.05M: Pesar 0.758 g de reactivo disuelto en 10 ml de agua destilada. Pesar 0.0099 del reactivo DTNB y disolver en 100 ml de Buffer Tris 7.5 previamente preparado.
- Acetilcolina (ASChI): Pesar 0.0578 g de reactivo ASChI y disolver en 10 ml de agua destilada.

Anexo 2. Cálculo de proteína (Método de Bradford).

- Se calcula el contenido proteico a partir de una curva de calibración, basada en estándares de suero albumino en concentraciones diluidas que van desde los 0, hasta $2000 \mu\text{g ml}^{-1}$.
- A partir de la muestra ya homogenizada, se toman $10 \mu\text{l}$ (si es muy concentrada disolver con agua, ej. $2 \mu\text{l}$ muestra con $8 \mu\text{l}$ de agua).
- Se prepara la placa con $10 \mu\text{l}$ para los valores de la curva, y los $10 \mu\text{l}$ de muestra a calcular.
- Se adicionan $175 \mu\text{l}$ del reactivo de Bradford® a temperatura ambiente.
- Incubación durante 10 min en agitación leve para eliminar las burbujas, que causan interferencias.
- Lectura en el espectrofotómetro de luz UV/Visible en 595 nm de longitud de onda.
- En los valores obtenidos, se emplea la absorbancia promedio por muestra. A todos los promedios de absorbancia se les resta el valor promedio de la concentración estándar de $0 \mu\text{g ml}^{-1}$ de la curva, eliminando la coloración inicial del reactivo.
- De los valores promedio de los estándares se realiza un gráfico de calibración, estos valores en el eje X y se obtiene línea de tendencia polinomial en 2do grado, ecuación y R^2 .
- Sustitución de los valores x de la ecuación de la curva para la obtención de concentraciones en $\mu\text{g ml}^{-1}$.
- Obtención de los valores en mg ml^{-1} y corrección de los mismos por el factor de dilución, en caso de existir diluciones de la muestra.

Anexo 3. Actividad enzimática Catalasa (CAT, Cayman kit 707002)

Preparación de la muestra:

- Homogenizado de embriones en 150 µl de Buffer de fosfatos.
- Centrifugado a 10000 g durante 15 min a 4 °C de temperatura.
- Sobrenadante, almacenado a -20 °C estable al menos un mes.

Análisis actividad

- Se llena la placa con 20 µl de los estándares, pozo control y muestras.
- Adición de 100 µl de Buffer de prueba a todos los pozos.
- Se colocan 30 µl de Metanol.
- Inicio de la reacción con 20 µl de peróxido de hidrógeno a todos los pozos, incubación durante 20 min a temperatura ambiente.
- Finalización de la reacción con 30 µl de hidróxido de potasio a cada pozo.
- Formación del complejo con el cromógeno, adicionando 30 µl de reactivo Purpald.
- Oxidación con 10 µl de Periodato de potasio, se lee en UV/Vis a 540 nm de longitud de onda.

Cálculo de actividad.

- Obtención del promedio de absorbancias por muestra, al cuál se le resta el promedio del estándar A, incluido el mismo estándar.
- Graficar la absorbancia de los estándares en función de la concentración final de formaldehído. Se obtiene la R² y la ecuación de dicha curva.
- Cálculo de concentración: Formaldehído (µM) = $\frac{\text{Abs muestra} - (y - \text{intercepto})}{\text{pendiente}} * \frac{0.17 \text{ ml}}{0.02 \text{ ml}}$
- Actividad CAT nmol/min = $\frac{\mu\text{M de muestra}}{20 \text{ min}} * \text{dilución muestra}$
- Normalización con el contenido proteico, calculado con Bradford.

Estándares de Catalasa.

Tubo	µl de formaldehído	µl de Buffer muestra	µM de formaldehído
A	0	1000	0
B	10	990	5
C	30	970	15
D	60	940	30
E	90	910	45
F	120	880	60
G	150	850	75

Anexo 4. Actividad enzimática Superoxido Dismutasa (SOD, Cayman kit 706002)

Preparación de la muestra.

- Homogenizado de los embriones con 150 µl de Buffer HEPES.
- Centrifugar muestras a 1500 g a 4 °C por 5 minutos, sobrenadante en -80°C hasta un mes de preservación.

Análisis de actividad

- Llenado de microplaca con 10 µl del estándar y de las muestras.
- Detección de radicales libres, adicionando 200 µl del reactivo Radical Detector de manera veloz. Formación de coloración.
- Adicionar 20 µl por pozo de Xantina Oxidasa, para la producción de radicales
- Incubación de 20 minutos a temperatura ambiente.
- Lectura de un punto final a longitud de onda de 440-460 nm en espectro UV/Vis

Calculo de actividad

- Obtención de las Abs promedio por muestra y de los estándares, dividir la absorbancia del estándar A por el mismo y por todos los demás para obtener la velocidad de linealización de la muestra (LR).

$$\text{Ej. LR Std A} = \text{abs "std A"} / \text{abs "std A"}$$

$$\text{LR Std B} = \text{abs "std A"} / \text{abs "std B"} \quad \text{etc.}$$

- Creación de grafica de las velocidades de linealización en función de la actividad de SOD (U/ml). Obtención de R² y ecuación de la recta.
- Calculo de la actividad enzimática empleando la ecuación:

$$\text{SOD (U/ml)} = \left(\left(\frac{\text{LRmuestra} - (\text{y-intercepto})}{\text{Pendiente}} \right) * \frac{0.23 \text{ ml}}{0.01 \text{ ml}} \right) * \text{Factor Dilusión}$$

Estándares de Superoxido Dismutasa

Tubo	µl SOD stock	µl de Buffer muestra	U/ml Actividad final
A	0	1000	0
B	20	980	0.025
C	40	960	0.05

D	80	920	0.1
E	120	880	0.15
F	160	840	0.2
G	200	800	0.25

Anexo 5. Determinación del total de Glutación (GSH / GSSG, Cayman 703002)

Preparación de la muestra

- Preparación de organismos con 150 µl de Buffer de fosfatos y centrifugar por 15 minutos a 10000g con temperatura de 4 °C.
- Separación de 10µl para cálculo de proteína.
- Desproteínizar adicionando un volumen similar al de la muestra, de reactivo MPA.
- Centrifugar por arriba de los 2000g más de 2 minutos a temperatura ambiente.
- Almacenado a -20 °C hasta por 6 meses.

Análisis de contenido total

- Adicionar 50 µl de reactivo TEAM por ml de muestra.
- Adicionar 50 µl de muestra y de los estándares en las placas. Preparación de reactivos a emplear, descritos en el kit.
- Preparación del reactivo mezcla, y adicional 150 µl de dicho reactivo a cada uno de los pozos.
- Obtención de absorbancias en cinética para cada 300 segundos, con un espectro UV/Vis a una longitud de onda de 405 nm, al final 8 intervalos.

Calculo de contenido total

- Graficar absorbancias promedio de cada estándar y muestra, en función del tiempo.
- Determinar pendiente de cada una, denominarla i-pendiente (i-slope).
- Graficar i-slope de los estándares en función de la concentración total de Glutación, obtener ecuación lineal y r², denominarla f-pendiente (f-slope).
- Calcular los valores de i-slope de cada muestra, en la ecuación de f-slope.

$$\text{Total Glutación} = \left(\frac{(i - \text{slope muestra}) - (Y - \text{intercepto})}{f - \text{slope}} \right) * 2 * \text{Factor dilución}$$

- Normalización de valores con cálculo de proteína con Bradford.

Estándares del contenido total de Glutación.

Tubo	µl GSSG estándar	µl MES Buffer	Equivalente total (µM)
A	0	500	0
B	5	495	0.5

C	10	490	1.0
D	20	480	2.0
E	40	460	4.0
F	80	420	8.0
G	120	380	12.0
H	160	340	16.0

Anexo 6. Determinación de Hidroperóxidos lipídicos. Complejo naranja de Fe(III)-Xilenol, FOX (Hermes-lima et al. 1995)

Preparación de la muestra.

- Embriones de Pez cebra, tomar una alícuota para determinación de Proteína Bradford.
- Inmersión en nitrógeno líquido, seguido de ajuste a volumen 1:5 con metanol.
- Homogenizar durante 60 segundos, centrifugar a 10000 g durante 10 min a °T ambiente.
- Sobrenadante a analizar.

Primer arte del análisis.

- Adición de reactivos en tubos Eppendorf® de 1.5 ml, adicional 250 µl de Sulfato ferroso 1M, 100 µl de H₂SO₄ 0.25M, adición de 100 µl de naranja de Xilenol 1 mM, 450 µl de Agua destilada.
- 10 µl de la muestra por tubo preparado.
- Ajustar a 1 ml por cada tubo con agua destilada, incluir una muestra blanco con solo agua destilada.
- Incluir un control Positivo de mezcla Cloroformo:metanol (19:1). Incubar todos los tubos por 120 min a temperatura ambiente.
- Emplear 100 µl de cada tubo, por placa y leer absorbancia a 580 nm de longitud de onda, punto final.

Segunda parte del análisis.

- Agregar a cada pozo 2 µl de Peroxido de hidrógeno (H₂O₂) en solución 0.8 mM.
- Incubar la placa por 60 minutos a temperatura ambiente.
- Lectura de punto final, en longitud de onda de 580 nm.

Cálculo del número de equivalentes.

$$\text{Equivalentes FOX} = \left(\left(\left(\frac{\text{Abs1}}{\text{Abs 2}} \right) * \text{CHP} \right) * \left(\frac{\text{Vtotal}}{\text{Vmuestra}} \right) \right) * \text{Fpv}$$

Donde:

Abs1: Absorbancia primera a 580 nm de longitud de onda punto final.

Abs2: Absorbancia segunda a 580 nm de longitud de onda punto final.

CHP: Concentración final del Peróxido de hidrógeno (0.8 mMol).

Vtotal: Volumen del total en μl del preparado.

Vmuestra: Volumen en μl de la muestra empleada para el análisis.

Fpv: Factor de relación peso/volumen del extracto metanólico, constante en 6.

Anexo 7. Extracción de RNA (kit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep, Sigma-Aldrich).

Preparación de muestra.

- Los embriones para extracción, se introducen unos segundos en nitrógeno líquido.
- Adición de 500 μl de Solución lisis® con Mercaptol, mezclar hasta obtener una capa de consistencia constante y bien homogeneizada.
- Transferir homogeneizado a tubos GenElute Filtration® (color azul).
- Centrifugar a 11000 g por dos minutos o hasta que se transfiera todo el líquido.
- Agregar 500 μl de Etanol (grado Molecular) al 70% y agitar con Vortex® vigorosamente.
- Transferir a Columna GenElute Binding Column® (roja) 700 μl , centrifugar a 11000 g durante 15 segundos, transferir a tubo colector. De ser necesario repetir.
- Adicionar 500 μl de Wash Solution I®, centrifugar a velocidad máxima por 15 segundos, eliminación del líquido preservando la columna.
- Adicionar 500 μl de Wash Solution II® y centrifugar a máxima velocidad durante 15 segundos, eliminar líquido y repetir éste paso, centrifugando por dos minutos.
- Transferir a nueva columna, el tubo colector, concentrar durante cuatro minutos a 30°C, o a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Agregar 40 μl de solución Elute®, centrifugación de muestra a 11000 g por dos minutos.
- Extracción de RNA, se preservara en -80°C hasta por dos meses.

Anexo 8. Cuantificación de RNA (Quant-iT™ RNA Assay Kit, Invitrogen™).

- Utilización de estándares del kit y Buffers de dilución.
- Preparación de la solución de trabajo del kit (working solution®). Ej. 100 pruebas adicionan 100 μl de Quant-iT™ RNA reagent en 20 ml de Quant-iT™ RNA Buffer en contenedor plástico; realizar ajuste dependiendo del número de pruebas a realizar.

- 200 μl por pozo de la solución de trabajo, 10 μl del estándar y de 1 a 20 μl de muestra, considerando el factor de dilución en caso de existir (en este caso se adicionaron 4 μl de muestra).
- Medición con equipo de emisión-excitación de fluorescencia a 673/644 nm de longitud de onda.
- Obtener la curva de los estándares de absorbancia en función de la concentración de estándar, calculando la ecuación de la recta y valor de r^2 . Sustituir en ecuación para obtener concentración de RNA por muestra.

Anexo 9. Síntesis de ADN-complementario (iScript™ cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad).

Preparación de reactivos

- Se prepara la mezcla de trabajo de acuerdo a los reactivos proporcionados por el kit.

Para 1 muestra:

5x iScript reacción Mix	4 μl
iScript reverse trans.	1 μl
H ₂ O libre de Nucleasas	X μl
RNA muestra	X μl
TOTAL	20 μl

- Reacción de incubación
5 minutos a 25° C
30 minutos a 42° C
5 minutos a 85° C
Permanece estable a 4° C

Adición de suficiente RNA

- Una vez cuantificado el contenido de RNA, se adiciona suficiente cantidad para transcribir 500 ng de ADN-complementario. Se ajusta el volumen de H₂O libre de nucleasas para conseguir un total de 15 μl de contenido.

Anexo 10. Protocolo real-time PCR.

Preparación de curvas de eficiencia.

- Se realiza una cadena de diluciones (1:5) a volumen final de 20 μl .
- Las concentraciones van desde 79 ng μl^{-1} , 15.8 ng μl^{-1} , 3.16 ng μl^{-1} , 0.632 ng μl^{-1} , 0.1264 ng μl^{-1} y 0 ng μl^{-1} por cada gen que se trabaja.

Preparación de muestras previo a la reacción en cadena.

- Se procedió a llenar la placa de 25 μ l de muestra con la siguiente formula.

iQSupermix [®]	12.5 μ l
Primer F	1 μ l
Primer R	1 μ l
H ₂ O	8.5 μ l
Muestra	2 μ l
Total de la reacción	25 μl

- Se empleó el mismo protocolo de soluciones a todas las muestras, en una microplaca de lectura óptica.
- Se ajustó el protocolo de acuerdo a las instrucciones del Software IQ5 Optical System V1.0.