



1972

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE

CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE

**Efectos de la interacción entre  
compuestos tóxicos en  
Trucha Arcoíris  
(*Oncorhynchus mykiss*)**

Trabajo de Tesis para optar al Título de  
Doctora en Biología

Lic. Julieta S. De Anna

Director: Dr. Carlos M. Luquet - Co-director: Dr. Andrés Venturino

2019



*“Qué triste paradoja, pensó  
Amalfitano. Ya ni los  
farmacéuticos ilustrados se  
atreven con las grandes obras,  
imperfectas, torrenciales, las que  
abren camino en lo desconocido.  
Escogen los ejercicios perfectos  
de los grandes maestros. O lo  
que es lo mismo: quieren ver a  
los grandes maestros en sesiones  
de esgrima de entrenamiento,  
pero no quieren saber nada de  
los combates de verdad, en  
donde los grandes maestros  
luchan contra aquello, ese  
aquello que nos atemoriza a  
todos, ese aquello que acoquina  
y encacha, y hay sangre y  
heridas mortales y fetidez.”*

---

—Roberto Bolaño, 2666.





# Agradecimientos

*Pasaron 5 largos viajes alrededor del sol desde que empezó esta Tesis. Cinco largos viajes en los que mi hija de solo saber tomar la teta, aprendió a caminar, a correr y a leer.*

*Pasaron 5 largos viajes alrededor del sol y siempre hubo alguien dándome la mano para que no me escape por la tangente de este astro azul que gira sin parar.*

¡Gracias a ellos!

**Carlos M. Luquet** (Dirección, charlas deportivas, domador de humores y piloto de estepa)

**Andrés Venturino** (Co-dirección, humor y mucho más que una casilla de mail)

**Juan Guillermo Cárcamo** (Superhéroe del otro lado de la cordillera, abastecimiento de insumos, mi papá Noel en este Doctorado)

**Luis Arias Darraz** (Compañero de pipeteo, compatriota y amigo. La madre hace los mejores calzones rotos de todo Chile).

**Alejandra Mansilla** (Logística de laboratorio y risas aseguradas)

**Walter Torres** (Abastecimiento de especímenes, predisposición máxima)

**Lara Haidel** (Abastecimiento de tachos para experimento, sponsor heladería “Charlot”)

**Pablo Cárdenas** (CNEA, Abastecimiento de Nitrógeno Líquido)

**Juan M. Castro** (El negro un tipo transparente, paradójicamente)

**Virginia Bianchi** (Compañera, sincera y confiable)

**Julio Painefilu** (Compañero y cebador de mates)

**Flavia Bieczynski** (Compañera, chica transporte MRPs, puede trabajar 12 horas sin comer)

**Mariela** (Compañera-CEAN, mezzosoprano)

**Jorge Kuroda** (Compañero-CEAN, un tipo alegre)

**Titi** (Las cartas siempre terminan llegando gracias a él)

**Mario Ricardo Díaz** (Amigo y soporte emocional, siempre)

**Raquel Miranda** (Amiga. Incrementadora de perspectiva, voladora de techos impuestos por uno mismo)

**Miriam Rodríguez** (Amiga. Ayuda en manejo de frustración, runner fondista)

**Miriam Rizzutti** (Amiga pacificadora y vegetariana, de esa que todos deberíamos tener)

**Tito Paz** (Abuelo, cómplice en toda esta locura, catador de Truchas).

**Yolanda Paz** (Madre y secretaria personal a 1700 km)

**Federico Elías** (Mi amor, Físico teórico, editor gráfico, niño, paseador de gatos, soporte emocional y el mejor cebador de mates de la galaxia)

**Amarú Olivia Leggieri** (El amor de mi vida, lo más significativo que usted encontrará en esta tesis, la compañera más fiel y más intensa, la despertadora de verdades).

# Resumen

En esta tesis se estudiaron los mecanismos de regulación molecular (a través de receptores nucleares) implicados en la biotransformación y excreción del clorpirifos (CLF) e hidrocarburos de petróleo; los efectos de la interacción entre ambos compuestos tóxicos sobre enzimas detoxificantes y la influencia de CLF sobre los transportadores ABCCs en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Se ha descrito que algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) inducen la expresión de la enzima citocromo P450 monooxigenasa 1A (CYP1A) a través de la activación del receptor de aril hidrocarburos (AhR). A su vez, la enzima CYP1A cataliza la conversión del pesticida CLF a su derivado más activo, CLF-oxón. De acuerdo a esto, la hipótesis I de esta tesis postula que hidrocarburos aromáticos, presentes en la fracción soluble de petróleo (WAF), activan la vía del receptor AhR en el hígado de la trucha arcoíris, induciendo la expresión y la actividad de la enzima CYP1A con el consiguiente aumento de la toxicidad de CLF. Para ponerla a prueba se expusieron juveniles de *O. mykiss* en acuarios individuales con y sin WAF *in vivo* por 48 h (pretratamiento y control) y luego se expusieron finas secciones de hígado de individuos de ambos grupos a CLF o control de solvente (acetona, SC). Los peces expuestos a WAF mostraron inducción en la expresión génica de AhR así como de CYP1A. Coherentemente la expresión proteica de CYP1A también se vió inducida, sin embargo no se observó aumento de actividad enzimática de CYP1A (medida como la actividad de 7-etoxi-resorufina-O-desetilasa (EROD)). Por otro lado, la expresión génica del translocador nuclear de AhR (ARNT) fue menor en los peces expuestos a WAF. Además, la exposición a CLF en los hígados inhibió las actividades

enzimáticas EROD, acetilcolinesterasa (AChE) y carboxilesterasas (CEs) y aumentó la actividad de la enzima detoxificante GST, independientemente del pretratamiento con WAF. El pretratamiento de WAF no afectó las actividades de EROD, AChE y GST. Solo la actividad de CEs se vio afectada por WAF, con un efecto inhibitorio y aditivo al efecto de CLF. En el mismo experimento, se analizó la expresión de genes relacionados con defensa antioxidante y detoxificante, sistema inmune, estrés y de receptores nucleares relacionados con hormonas sexuales y de regulación metabólica, a fin de explorar una posible interacción de la vía AhR con otras vías regulatorias. En este sentido, la exposición a WAF indujo la expresión génica de los receptores de progesterona, de andrógenos y del receptor X de hígado (*LXR*) pero no afectó a los receptores de estrógenos y mineralocorticoides. Además, la exposición a WAF indujo la expresión de varias interleucinas y afectó la vía de las caspasas. Se realizó también un estudio histopatológico del hígado el cuál mostró evidencias de esteatosis (acumulación de grasa), que podría asociarse a la inducción de *LXR*, ya que una de sus funciones es estimular la lipogénesis en hígado. La hipótesis II postula que CLF activa la vía del receptor de pregnano (PXR) en peces, aumentando la expresión de la batería de genes corriente abajo del elemento regulatorio. Se estudió el efecto de CLF como inductor de PXR y genes que, según la literatura, son activados por la vía de este receptor (*PXR*, *CYP3A27*, *GST*, *ABCB1/Pgp*, *UGT ABCC2/MRP2*) en intestino e hígado de juveniles de *O.mykiss* expuestos *in vivo* a CLF por 12, 24 y 48 h. En el mismo experimento, se estudió la respuesta de la expresión genica de otras enzimas de Fase I (*CYP2M1*, *CYP2K1* y *FMO*) y se analizó la expresión de genes de la vía AhR a fin de explorar una posible interacción de ambas vías regulatorias. El efecto a CLF sobre la vía de PXR resultó dependiente del órgano estudiado y del tiempo de exposición. En principio, la expresión de *PXR* se incrementó solo para el intestino, a las 12 h de exposición, acompañado por una disminución de la expresión de AhR y CYP1A y una inducción del ARNT. En intestino también a las 12 h, se observó disminución de la expresión de AhR y de CYP1A e inducción de ARNT. Por otro lado, en el hígado la exposición a CLF, a las 12 h, mostró una disminución en la expresión de los trasportadores ABCB1 y ABCC2 pero no

se observó modulada la expresión de ninguno de los receptores (PXR-AhR). Además a las 24 horas de exposición la expresión de ABCC2 continuó disminuida y también disminuyó la expresión de AhR. Mientras que la expresión de UGT (gen regulado por PXR) se observó aumentada, también a las 24 horas de exposición. Por último la hipótesis III postula que CLF afecta la función de proteínas de transporte responsables de la resistencia a múltiples xenobióticos (MXR), las ABCCs (proteínas asociadas a la resistencia multi-drogas), produciendo inhibición competitiva, sensibilización o activación del transporte de dichas proteínas. Para poner a prueba dicha hipótesis, se realizaron preparaciones *ex vivo* de intestino y se las expuso a tres concentraciones de CLF. En estas preparaciones se midió la tasa de transporte del sustrato 2,4-dinitrofenil-S-glutatión (DNP-SG, que refleja el de transporte de solutos orgánicos hacia afuera de la célula a través de proteínas de membrana de la familia ABCC). Si el CLF fuera sustrato de transporte por ABCC, la tasa de transporte de DNP-SG debería disminuir por competencia. Los resultados de este experimento no muestran inhibición del flujo de DNP-SG, por consiguiente, se considera que las proteínas ABCC no participan en el transporte celular de CLF en el intestino de *O. mykiss*. Por el contrario, se observó estimulación en el transporte de DNP-SG en el corto término y será interesante para trabajos futuros investigar los mecanismos involucrados en dicho efecto. Esta tesis permitió concluir que los hidrocarburos presentes en la WAF modulan la vía del receptor AhR, activando la expresión de dicho receptor y la de su gen blanco CYP1A en *O. mykiss*, sin embargo no hay incidencia clara de dicha inducción sobre la actividad de CYP1A ni sobre la toxicidad de CLF. Por otro lado, CLF induce débilmente la vía del receptor nuclear PXR y disminuye la expresión de genes de la vía de AhR en intestino y en hígado. Además, la expresión génica de ARNT disminuye cuando se encuentra activada la vía de AhR, tanto en hígado como en intestino, mostrando una posible forma de regulación de esta vía que no ha sido descrita hasta ahora. Por último, se puede concluir que CLF estimula la actividad de proteínas transportadoras de la familia ABCC en intestino.



# Abstract

In this thesis, I studied molecular regulation mechanisms (through nuclear receptors), involved in biotransformation and excretion of chlorpyrifos (CLF) and petroleum hydrocarbons; the effects of the interaction between both kinds of compounds over detoxifying enzymes and the influence of CLF on the activity of ABCB (proteins associated with resistance multidrug) transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). It has been described that some polycyclic aromatic hydrocarbons induce the expression of the enzyme cytochrome P450 monooxygenase 1A (CYP1A) through activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). In turn, CYP1A catalyzes the conversion of the pesticide CLF to its most active derivative, CLF-oxon. According to this, the hypothesis I of this thesis postulates that aromatic hydrocarbons, present in the soluble fraction of petroleum (WAF), induce the AhR pathway leading to increased expression and activity of CYP1A and, to the consequent increase in the toxicity of CLF. In order to test this hypothesis, *O. mykiss* juveniles were exposed in individual aquariums with and without WAF *in vivo* for 48 h (pretreatment and control) and then liver thin sections from both groups were exposed to CLF or solvent control (acetone, SC). Fish exposed to WAF showed induction in gene expression of AhR as well as CYP1A. Coherently, CYP1A protein expression was also induced, however no increase was observed in CYP1A activity (measured as 7-ethoxyresorufin O-deethylation activity (EROD)). On the other hand, the expression of the AhR nuclear translocator (ARNT) was reduced in fish exposed to WAF. Besides, the exposure to CLF inhibited liver EROD, acetylcholinesterase (AChE) and carboxylesterases (CEs) enzymatic activities and increased

the activity of the detoxifying enzyme GST independently of the pretreatment with WAF. The WAF pretreatment did not affect EROD, AChE, or GST activity. Only the CEs activity was affected by WAF, with an inhibitory effect, which was additive to that of CLF. In the same experiment, I studied the expression of genes related to the antioxidant and detoxifying defense, immune system, stress and nuclear receptors related to sex hormones and metabolic regulation, in order to explore a possible interaction of the AhR pathway with other regulatory ways. In this sense, exposure to WAF induced the gene expression of progesterone, androgen receptors and liver X receptor (LXR) but did not affect the estrogen and mineralocorticoid receptors. In addition, WAF exposure induced the expression of several interleukins and affected the caspases pathway. A histopathological study of the liver was also carried out showing evidence of steatosis (fat accumulation), which could be associated to the LXR induction, since one of its functions is stimulate lipogenesis in liver. Hypothesis II postulates that CLF activate the pregnane X receptor (PXR) pathway in fish, increases the expression of genes located downstream of the regulatory element. I studied the effect of CLF as a potential inducer of PXR and genes that, according to the literature, are activated by the PXR pathway (*PXR*, *CYP3A27*, *GST*, *ABCB1* / *Pgp* *UGT* and *ABCC2* / *MRP2*) in intestine and liver of *O. mykiss* exposed *in vivo* to CLF for 12, 24 and 48 h. In the same experiment, I studied the gene expression of other phase I enzymes (*CYP2M1*, *CYP2K1* and *FMO*) and genes of the AhR pathway, in order to analyze possible interactions between PXR and AhR pathways. The effect to CLF on the PXR pathway was dependent of the organ studied and the time of exposure. PXR expression was increased only in intestine, at 12 h of exposure, accompanied by a decrease of AhR and CYP1A expression and an induction of ARNT. On the other hand, in the liver, the exposure to CLF at 12 h, caused a decrease in the expression of transporters ABCB1 and ABCC2 but none of the receptors expression was modulated (PXR-AhR). In addition, after 24 h of exposure, the ABCC2 expression remained diminished and also the AhR expression was decreased while the expression of UGT (gene regulated by PXR) was increased. Finally hypothesis III postulates that CLF affects the function of transport proteins



responsible for the resistance to multiple xenobiotics (MXR), the ABCCs, producing competitive inhibition, sensitization or activation of the transport of these proteins. In order to test this hypothesis, *ex vivo* preparations at three concentrations of CLF was performed, measuring the substrate transport rate of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione (DNP-SG, which reflects the transport out of the cell through the basolateral and apical membranes mediated by multidrug resistance-associated proteins (MRPs/ABCCs) proteins). I expected that if CLF was exported by ABCC, the DNP-SG transport rate would be competitively inhibited. CLF did not inhibit DNP-SG transport and, therefore, it would not be excreted by these proteins. On the contrary, DNP-SG transport was stimulated, which deserves further attention in future studies. This thesis concluded that hydrocarbons present in the WAF modulate the route of the AhR receptor, activating its expression and that of its target gene CYP1A in *Oncorhynchus mykiss*, however there is no clear incidence of this induction on CYP1A activity and CLF toxicity. On the other hand, CLF weakly induces the pathway of the nuclear receptor PXR and decreases the gene expression of the AhR pathway in intestine and liver. Besides, the gene expression of ARNT decreases when the AhR pathway is activated, both in the liver and in the intestine, showing a possible regulation which was not reported beforehand. Finally, it can be concluded that CLF stimulates the activity of the ABCC transporters in intestine.



# Tabla de abreviaturas

ABC	ATP-binding cassette
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHR	Receptor de aril hidrocarburos
API	Instituto Americano del Petróleo
AR	Receptor de andrógenos
ARNm	Ácido adenosin ribonucleico mensajero
ARNT	Traslador nuclear de AhR
ATSDR	Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades
BCA	Ácido bicinconínico
BCF	Factor de bioconcentración
BChE	Butirilcolinesterasa
BSA	Albúmina sérica bovina
CAR	Receptor constitutivo de androstano
CAS	Caspasa
CB	Carbaril
CDNB	1-cloro-2,4 dinitrobenzoceno
CEAN	Centro de Ecología aplicada del Neuquén
CEs	Carboxil esterases
ChE	Colinesterasas
CITAAC	Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue
CLF	Clorpirifos
CONICET	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
CYP	Citocromos P450

---

CYP1A	Citocromo P450 monooxigenasa 1
DDE	dicloro difenil dicloroetileno
DDT	dicloro difenil tricloroetano
DMF	N,N-dimetilformamida
DNP-SG	2,4-dinitrofenil-S-glutati3n
DREs	Elementos de respuesta a dioxinas
DTNB	5,5-ditio-bis- (3cido 2-nitrobenzoico)
ER	Elementos de respuesta
RE	Receptor de estr3genos
EROD	7-etoxi-resorufina-O-desetilasa
EPA	Agencia de protecci3n ambiental
FA	Fosfatasa alcalina
FMO	Flavin monooxigenasa
GC-FID	Cromat3grafo gaseoso - detector de ionizaci3n de llama
GGT	Gamma glutamil transferasa
GPX	Glutati3n peroxidasa
GR	Glutati3n reductasa
GSH	Glutati3n (Glu-Cys-Gly) reducido
GST	Glutati3n-S-transferasa
HA	Hidrocarburos alif3ticos
HAP	Hidrocarburos arom3ticos polic3clicos
HSP90	Prote3na de choque t3rmico 90
IARC	Centro Internacional de Investigaciones sobre el C3ncer
IL	Interleucina
LC50	Dosis letal media
LIBIQUIMA	Investigaciones Bioqu3micas y Qu3micas del Medio Ambiente
LXR	Receptor X de h3gado
MAPEG	Prote3nas de membrana asociadas al metabolismo de eicosanoides y glutati3n
MDA	Malondialdehido
MDR	Resistencia a m3ltiples drogas
MR	Receptor de mineralocorticoides
MRP	Prote3nas asociadas a la resistencia a m3ltiples drogas
MXR	Resistencia a m3ltiples xenobi3ticos
NSO	Compuestos con nitr3geno, azufre, ox3geno y metales pesados

---

NR	Receptores Nucleares
OM	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
OP	Organofosforados
OK	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
Oligo DT	Secuencia corta de nucleótidos desoxi-timidina
PBS	Buffer fosfato salino
PCB	Bifenilos policlorinados
PCDFs	dibenzofuranos policlorinados
PCDDs	dibenzo-p-dioxinas policlorinadas
Pgp	Glicoproteína P
PHAH	Hidrocarburos aromáticos halogenados planos
p-NPB	p-nitro-fenil butirato
PR	Receptor de Progesterona
PSMF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PXR	Receptor de pregnano X
q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RX	Receptores de xenobióticos
RXR	Receptor de retinoide X
SC	Control de solvente
SD	Desvío estándar
SEM	Error estándar de la media
SOD	Superoxido dismutasa
SS	<i>Salmo salar</i>
SULT	Sulfotransferasa
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TPH	Hidrocarburos totales del petróleo
UGT	UDP-glucuronosil transferasa
USEPA	Agencia de protección ambiental de Estados Unidos
UV	Ultravioleta
WAF	Fracción soluble de petróleo
XREs	Elementos de respuesta a xenobióticos
YPF	Yacimientos Petrolíferos Fiscales
$\beta$ NF	Beta-naftoflavona



# Índice general

<b>1. Introducción general</b>	<b>1</b>
1.1. Trucha arcoiris . . . . .	7
1.2. Xenobióticos . . . . .	11
1.2.1. Insecticidas . . . . .	11
1.2.1.1. Clorpirifos . . . . .	13
1.2.1.2. Carbaril . . . . .	15
1.3. Petróleo . . . . .	16
1.4. Xenobióticos y petróleo en Patagonia . . . . .	19
1.5. Biomarcadores . . . . .	23
1.6. Mecanismos de detoxificación . . . . .	26
1.6.1. Biotransformación . . . . .	27
1.6.1.1. Enzimas del complejo Citocromo P450 en peces	28
1.6.1.2. Glutación S-transferasas . . . . .	30
1.6.1.3. $\beta$ -esterasas . . . . .	31
1.6.1.4. Resistencia a Múltiples Xenobióticos (MXR) - Proteínas ATP-binding . . . . .	32
1.6.2. Receptores Nucleares . . . . .	33
1.6.2.1. Receptor de pregnano X (PXR) . . . . .	34
1.6.2.2. Receptor de aril hidrocarburos (AhR) . . . . .	35
1.6.2.3. Otros Receptores Nucleares . . . . .	36
1.7. Objetivos . . . . .	37
1.8. Hipótesis . . . . .	38
1.9. Organización de la tesis . . . . .	39

---

<b>2. Materiales y Métodos</b>	<b>45</b>
2.1. Obtención de especímenes . . . . .	45
2.2. Diseño experimental hipótesis I . . . . .	46
2.3. Diseño experimental hipótesis II . . . . .	47
2.4. Diseño experimental hipótesis III . . . . .	48
2.4.1. Diseño para técnica de tasa de transporte de ABCC en intestino . . . . .	49
2.4.2. Diseño para medir efectos tóxicos en intestino . . . . .	51
2.5. Soluciones de tóxicos . . . . .	51
2.5.1. Solución madre de Clorpirifos . . . . .	51
2.5.2. Fracción acuosa de petróleo crudo (WAF) . . . . .	51
2.5.3. Hidrocarburos totales de petróleo en WAF . . . . .	52
2.6. Expresión genética . . . . .	53
2.6.1. Aislamiento y cuantificación de RNA total . . . . .	53
2.6.2. Síntesis de ADNc . . . . .	55
2.6.3. q-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) . . . . .	56
2.7. Expresión proteica . . . . .	58
2.7.1. Extracción de proteínas totales . . . . .	58
2.7.2. Cuantificación de proteínas por BCA . . . . .	58
2.7.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida, electrotransfe- rencia e inmunotinción . . . . .	59
2.8. Actividades enzimáticas . . . . .	60
2.8.1. Homogenatos . . . . .	61
2.8.2. Actividad de Carboxilesterasas . . . . .	61
2.8.3. Actividad de Acetilcolinesterasas . . . . .	62
2.8.4. Actividad de Glutación-S-transferasa . . . . .	63
2.8.5. Actividad de 7-etoxi-resorufina-O-desetilasa (EROD) . . . . .	63
2.8.6. Medición de proteínas por Bradford . . . . .	64
2.9. Transporte a través del epitelio intestinal . . . . .	65
2.10. Tinción hematoxilina-eosina . . . . .	68
2.11. Peroxidación lipídica . . . . .	68



---

2.12. Análisis de Datos . . . . .	69
<b>3. Resultados y discusión hipótesis I</b>	<b>73</b>
3.1. Resultados expresión de ARNm (q-PCR) . . . . .	73
3.1.1. Genes de la vía AhR . . . . .	74
3.1.2. Genes de otros receptores nucleares . . . . .	76
3.1.3. Genes de respuesta inmune . . . . .	78
3.1.4. Genes de respuesta a estrés . . . . .	80
3.1.5. Genes de otras enzimas de detoxificación y defensa . . . . .	82
3.1.6. Genes de proteínas estructurales . . . . .	85
3.2. Resultados de los análisis de actividad enzimática . . . . .	86
3.2.1. Actividad de O-deetilación de 7-etoxi-resorufina (EROD) . . . . .	86
3.2.2. Acetilcolinesterasa (AChE) . . . . .	86
3.2.3. Carboxilesterasas (CEs) . . . . .	87
3.2.4. Glutatión S-transferasa (GST) . . . . .	88
3.3. Resultados de expresión proteica . . . . .	88
3.3.1. Patología: Tinción hematoxilina-eosina . . . . .	88
3.4. Discusión y Conclusiones . . . . .	90
3.4.1. Vía AhR: Expresión de la proteína CYP1A y genes <i>AhR, ARNT, CYP1A</i> . . . . .	91
3.4.2. Otros receptores nucleares . . . . .	94
3.4.3. Genes de respuesta inmune . . . . .	98
3.4.4. Genes de respuesta a estrés . . . . .	100
3.4.5. Genes de enzimas de antioxidantes y de detoxificación . . . . .	101
3.4.6. Genes de proteínas estructurales . . . . .	102
3.4.7. Actividades enzimáticas . . . . .	103
3.4.7.1. Actividad O-deetilación de 7-etoxi-resorufina (EROD) . . . . .	103
3.4.7.2. Actividades enzimáticas, AChE, CE y GST . . . . .	104
3.4.8. Patología . . . . .	106
<b>4. Resultados y discusión hipótesis II</b>	<b>109</b>
4.1. Resultados de expresión de ARNm (q-PCR) . . . . .	109

---

4.2. Intestino . . . . .	110
4.2.1. Genes de la vía del receptor de PXR . . . . .	110
4.2.2. Genes de la vía del receptor de AhR . . . . .	110
4.2.3. Genes enzimas de Fase I (oxidación) . . . . .	110
4.3. Hígado . . . . .	114
4.3.1. Genes de la vía del receptor de PXR . . . . .	114
4.3.2. Genes de la vía del receptor de AhR . . . . .	114
4.3.3. Genes enzimas de Fase I (oxidación) . . . . .	114
4.4. Discusión . . . . .	119
<b>5. Resultados y discusión hipótesis III</b>	<b>123</b>
5.1. Transporte tiras de intestino expuestas a CLF . . . . .	124
5.2. Transporte en intestino no evertidos expuestos a CLF . . . . .	124
5.3. Transporte en intestinos evertidos expuestos a CLF . . . . .	126
5.4. Efectos tóxicos de CLF en tiras de intestino . . . . .	127
5.5. Discusión y Conclusiones . . . . .	131
5.5.1. Transporte de DNP-SG . . . . .	131
5.5.2. Efectos tóxicos de clorpirifos en tiras intestinales . . .	133
<b>6. Discusión y conclusiones finales</b>	<b>135</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>139</b>
<b>Artículo de respaldo</b>	<b>179</b>

# Capítulo 1

## Introducción general

Los ecosistemas acuáticos suelen verse afectados por contaminantes provenientes de diversas fuentes, entre ellos numerosos compuestos tóxicos incluyendo insecticidas y derivados del petróleo. Estos compuestos tóxicos pueden ingresar en la cadena alimentaria y causar toxicidad en los organismos acuáticos. Generalmente, el estudio de la toxicidad de contaminantes se lleva a cabo evaluando los efectos individuales de los compuestos tóxicos sobre los organismos. Sin embargo, dichos organismos se encuentran comunmente expuestos a más de un contaminante (simultánea o consecutivamente). El conocimiento sobre cómo monitorear los efectos de estas exposiciones complejas es escaso y reciente. A su vez se sabe que como resultado de las interacciones, los efectos combinados de dos o más compuestos tóxicos pueden diferir significativamente de aquellos producidos por los mismos en exposiciones individuales. Dichos efectos toxicológicos combinados pueden resultar: independientes, aditivos o de interacción. La evidencia muestra que las sustancias químicas pueden interactuar e incluso producir efectos sinérgicos (Silins et al., 2011), por ejemplo sí en la exposición a una mezcla se involucra a una sustancia que cambie la toxicocinética de otra, aumentando la toxicidad por biotransformación. Por consiguiente, la exposición a una mezcla de contaminantes (de naturaleza diferente, principalmente) puede producir efectos, difíciles de predecir, que se deben a las interacciones químicas y a sus implicancias sobre los mecanismos de detoxificación (Wassmur et al., 2012). Dentro de la gama de animales

acuáticos expuestos a contaminantes, los peces son organismos sensibles al impacto de mezclas complejas en un sistema acuático específico, integrando la carga ambiental a través del tiempo y el espacio. Los compuestos tóxicos pueden ser absorbidos por los peces en todas las células epiteliales que están en contacto con el agua y los alimentos, pero la absorción es mayor en los epitelios respiratorios y gastrointestinales, que están diseñados para una absorción rápida y eficiente (Tierney et al., 2013). Se conoce la importancia de la carga corporal relativa de los tóxicos en peces por captación branquial (del agua) y por la captación gastrointestinal (de los alimentos y del agua) (Clark et al., 1990). La captación por ambas vías se puede ver como una transferencia a través de una serie de compartimentos acuosos y lipídicos (Hansch, 1969; Opperhuizen, 1986). El compuesto químico ingresa al epitelio (en el agua o digerido) y luego se mueve a través de varias barreras de difusión, incluida la membrana celular, en la sangre. Los pasos que limitan la tasa de captación varían en función del logaritmo de los coeficientes de partición octanol/agua,  $K_{ow}$ . En el epitelio gastrointestinal la captación se da en compuestos tóxicos asociados con alimentos o en agua bebida y especialmente para compuestos muy hidrofóbicos disueltos en los lípidos de la dieta. Los compuestos hidrofóbicos, que se absorben por difusión pasiva también pueden sortear las barreras de difusión acuosa en el intestino al asociarse con gotitas de grasa o micelas de ácidos grasos durante la pinocitosis (Opperhuizen, 1986). Después de la absorción, la mayor parte de la translocación o distribución de compuestos tóxicos ocurre a través de los sistemas circulatorios de los peces. El componente acuoso de la sangre es el plasma y los compuestos tóxicos hidrófilos son transportados en esta matriz. Los compuestos hidrofóbicos suelen asociarse con otros constituyentes de la sangre del pez (colesterol, triglicéridos), incluidos los componentes macrocelulares (las membranas celulares) y con mayor frecuencia se asocian a las proteínas plasmáticas. Por ejemplo, bifenilos policlorinados (PCB) y PAHs se unen a las proteínas plasmáticas de los glóbulos rojos de trucha y pez sapo (McKim y Heath, 1983; Kennedy et al., 1991). Una vez que el compuesto tóxico ha ingresado al organismo y comienza su distribución causa un amplio espectro de efectos y respuestas, a nivel molecular, sub-celular y bioquímico hasta en

---

el comportamiento, crecimiento y reproducción. Frente a la exposición a niveles tóxicos bajos, los peces suelen responder a nivel molecular, sub-celular e inmunológico, pudiendo eventualmente compensar el efecto tóxico y su fisiología, *a priori*, no se vería seriamente afectada. Sin embargo, la exposición prolongada y/o severa puede provocar cambios estructurales y funcionales que deterioran las funciones vitales. El estrés permanente, aunque moderado, interfiere con los procesos metabólicos y hormonales, llevando a modificaciones en la dinámica metabólica, inmunosupresión, disturbios en la osmorregulación, daños tisulares y fracaso de la reproducción (Chovanec et al., 2003). La solubilidad en agua de los compuestos químicos es determinante para la posterior y efectiva excreción por las branquias, el tracto gastrointestinal y los riñones. La biotransformación se define como la conversión enzimática de un compuesto químico desde su forma original a un metabolito. La función general del proceso de biotransformación es sintetizar metabolitos hidrófilos polares que sean sustrato de las proteínas de transporte que participan en la excreción de compuestos tóxicos y el órgano con mayor capacidad para biotrasformar compuestos es el hígado. Dichas biotransformaciones consisten en hacer a la molécula más hidrófila mediante reacciones de funcionalización (fase I) o conjugación (fase II). Específicamente, las reacciones de la Fase I son en general oxidaciones, reducciones o procesos de hidrólisis, introducen o exponen un grupo funcional polar reactivo (por ejemplo, OH, SH, NH<sub>2</sub>, CO-OH) en la molécula principal. Las reacciones de fase II conjugan una molécula endógena, como el ácido glucurónico, el glutatión o el sulfato en el compuesto original o en metabolitos de fase I. Por lo tanto, la capacidad de biotransformación involucra transformaciones combinadas y refleja el hecho de que los compuestos químicos pueden sufrir múltiples transformaciones, pudiendo ser modificados en una serie de diversos pasos moleculares, resultando en una variedad de metabolitos. La bioconcentración del compuesto en el organismo será entonces el resultado neto de la absorción, transformación y eliminación como consecuencia de la exposición por vía acuática, dependiendo principalmente de las propiedades físico-químicas de los compuestos involucrados, la disposición fisiológica de cada organismo y las condiciones ambientales circundantes (Barron 1990). La bioconcentración se expresa cuantitativamente

en términos del factor de bioconcentración (BCF), que es la relación entre la concentración del producto químico en el organismo y su concentración en el ambiente. La capacidad de biotransformación determinará las tasas finales de acumulación y excreción de las sustancias químicas, que afectan las vidas medias biológicas, la persistencia y la carga corporal y que a su vez establecen la gravedad y la duración de una respuesta tóxica. Esto finalmente influirá en la disminución de las poblaciones de peces y generará cambios en la estructura comunitaria, por ejemplo a través de disminución en la abundancia de especies y la diversidad de la comunidad. Dichos cambios sobre la comunidad tienen una alta relevancia ecológica e involucran alteraciones substanciales en el ecosistema acuático. En consecuencia, entendemos que el estudio de los mecanismos de toxicidad en peces involucra, por lo menos, tres aspectos: uno relacionado con la ecología de los peces en los cuerpos de agua, su utilización como blancos de contaminantes ambientales y también como modelos en investigación toxicológica, con el objetivo de realizar extrapolaciones para responder interrogantes relacionados con los efectos de la exposición sobre vertebrados mamíferos (Hahn y Hestermann, 2008). En este sentido, varias características de los peces los convierten en valorables modelos en toxicología (Ballatori y Villalobos, 2002). Al ser vertebrados, se encuentran emparentados con los humanos, compartiendo homología genética y mecanismos metabólicos. Esta relación evolutiva se ha vuelto más evidente como resultado de los análisis genómicos (Hahn et al., 1997). Particularmente, la trucha arcoíris se ha utilizado como especie de investigación modelo durante más de un siglo y los estudios de la fisiología y la ecología pueden correlacionarse con la información genómica reciente, lo que hace que la trucha arcoíris sobresalga como organismo modelo fisiológico y genético (Thorgaard et al., 2002).

Los receptores de xenobióticos (RX) son factores de transcripción que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la expresión de genes que determinan la entrada, detoxificación y eliminación de xenobióticos. Los compuestos tóxicos, incluidos los productos de prácticas agropecuarias y petroleras, una vez introducidos en el sistema circulatorio del pez, pueden ser reconocidos por los RX que regularán la expresión de diversos genes de pro-

---

teínas involucradas en la detoxificación. La activación de dichos receptores se asocia directamente a su translocación desde el citoplasma hacia el núcleo, inducida por la unión a xenobióticos. Los RXs son capaces de regular la activación transcripcional de los genes que codifican enzimas metabolizantes de Fases I y II, y transportadores de salida de la célula (Fase III). Los principales RXs incluyen al “constitutive androstane receptor” (CAR, NR1I3), “pregnane receptor X” (PXR, NR1I2) y el receptor de aril hidrocarburos (AhR), los cuales son expresados predominantemente en hígado e intestino. Los receptores nucleares como CAR y PXR pueden ser activados o inhibidos por contaminantes ambientales diversos. El AhR es comúnmente activado por dioxinas, compuestos de tipo dioxina e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) causando alteración en la expresión génica y toxicidad.

En humanos, los receptores de xenobióticos CAR y PXR regulan una serie de proteínas de membrana denominadas de “resistencia a múltiples drogas” (MDR). Dichas proteínas MDR transportan sustratos endógenos (derivados de colesterol, sales biliares, etc.) y una gran variedad de sustancias exógenas. En mamíferos, en general, la expresión génica de varias proteínas MDR, como la ABCB1 (MDR1/ Pgp) y las ABCC (MRPs), es regulada positivamente por los receptores de xenobióticos CAR y PXR (Ihunnah, et al., 2011). Además, estos receptores regulan la expresión de numerosas enzimas detoxificantes de fase I y II como carboxil esterasas (CEs), citocromos P450 (CYPs) y glutatión-S-transferasas (GSTs) (Chen, et al., 2012).

En peces existe solo un receptor PXR que comparte características del receptor CAR de mamíferos y que muestra variaciones entre especies (Krasowski et al., 2011a; Krasowski et al., 2011b). Los ortólogos de las proteínas ABCC y ABCB1 en los organismos acuáticos (MRPs y MDR1/Pgp) y responsables de la llamada “resistencia a múltiples xenobióticos”, MXR (Bard, S., 2000) podrían ser modulados por el receptor PXR. En relación a esto, Agarwala et al., (2004) sugieren que el pesticida organofosforado clorpirifos tiene el potencial para modular la biodisponibilidad de fármacos a través de cambios en la expresión y la función de los transportadores ABC, como ABCB1. Es sabido que muchas especies acuáticas son capaces de sobrevivir en ambientes con altos niveles de contaminantes de origen antrópico. Por

ejemplo, se han descrito poblaciones de crustáceos y peces con resistencia a varios contaminantes (Anguiano et al., 2008). Delescluse et al., (2001) demuestran que en el killifish del Atlántico (*Fundulus heteroclitus*), un componente importante de la adaptación a la contaminación crónica por hidrocarburos aromáticos es la disminución drástica de la sensibilidad de la vía del receptor AhR. Lo que resulta en la imposibilidad de inducción de la enzima CYP1A. Los autores hipotetizan que esto aumentaría la resistencia a insecticidas como clorpirifos, que es bioactivado por CYP1A, pero aumentaría la susceptibilidad a permetrina y a carbaril, que son detoxificados por dicha enzima. Sorprendentemente, los mismos peces resistentes a hidrocarburos resultan resistentes a todos los compuestos tóxicos mencionados, por lo que los autores concluyen que debe haber otra vía regulatoria afectada, que se relacione con aumentos en la actividad de GST, ABCB1 y CEs, además de la no inducción de CYP1A ya mencionada. Las vías de los receptores AhR y PXR son dos de las más importantes vías de respuesta a xenobióticos y ambas pueden ser activadas por compuestos tóxicos potencialmente presentes en los cuerpos de agua de la región. El estudio de los mecanismos moleculares y celulares que involucran la tolerancia de los organismos a la contaminación es clave en la evaluación del riesgo ambiental acuático. La evidencia reciente indica que los mecanismos de resistencia a múltiples xenobióticos (MXR) representan una defensa biológica general de muchos organismos marinos y de agua dulce frente a sustancias tóxicas, y dichos mecanismos serían modulados, en parte, por las vías mencionadas y sus interacciones. De manera que, en un ambiente con múltiples contaminantes, la capacidad de metabolizar y eliminar xenobióticos es influida tanto por la naturaleza química de los mismos como por sus interacciones dentro del organismo. Por lo tanto, resulta apremiante realizar estudios toxicológicos que aborden los efectos de las interacciones a distintos niveles (moleculares, celulares, fisiológicos) entre xenobióticos potencialmente presentes en los cuerpos de agua regionales.

En esta tesis se abordó el estudio de la interacción de compuestos tóxicos y las vías de respuesta a los mismos, a nivel de genes y proteínas detoxificantes y transportadoras, reguladas por los receptores nucleares AhR y PXR en la trucha arcoíris.



## 1.1. *Trucha arcoíris*

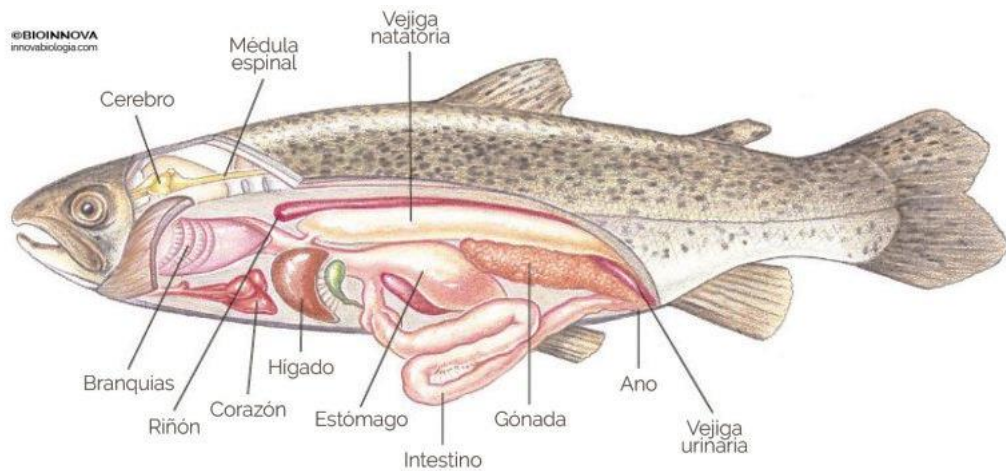
La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), orden Salmoniformes, familia Salmonidae, es un pez eurihalino nativo del Océano Pacífico de América del Norte, desde Alaska y el noroeste de Canadá hasta Baja California. Ha sido ampliamente introducido en aguas templadas-frías en el resto del mundo (Page y Burr, 1997). Durante los primeros años del siglo veinte, se introdujo en la Patagonia andina a través de su siembra junto con otras especies exóticas (Marini y Mastrarrigo, 1963). Actualmente *O. mykiss* tiene una amplia distribución en la Patagonia con presencia de poblaciones autosuficientes (Pascual et al., 2002). La trucha arcoíris tolera temperaturas desde 0 a 25 °C. Según la EPA su intervalo óptimo para experimentos toxicológicos es de  $12 \pm 2$  °C. Mientras que en acuicultura tiene un excelente crecimiento, en condiciones de buena calidad de agua, entre 15 y 20 °C (Gall y Crander, 1992). El ciclo de vida es muy variable en cuanto a sus patrones migratorios. Siempre desovan en ríos o arroyos y muchas completan su ciclo de vida en agua dulce. Sin embargo, algunas variedades, migran y pasan su vida adulta en el océano, y sólo vuelven al río donde nacieron para desovar. Eso último se conoce como reproducción anádroma y estos individuos migran al mar como juveniles y pueden viajar grandes distancias en el océano. Las formas de agua dulce (no anádromas) se mueven entre el afluente y el río principal, entre el río y el lago, o pasan toda su vida en un arroyo o río en particular (Groot, 1996). El crecimiento y maduración sexual de estos organismos puede ocurrir en agua dulce o agua de mar. El desove generalmente se produce en flujos de agua de ríos o afluentes del cauce principal, sobre lechos de grava o costas de lagos. La grava brinda protección a los huevos, hasta que emergen como alevines listos para comer y migrar (Groot, 1996). La trucha arcoíris es altamente adaptable a su entorno, razón por la cual ha logrado una amplia distribución. Según estudios realizados por otros autores, dos truchas nacidas de una misma progenie pueden adaptarse a hábitats totalmente distintos. Una puede crecer, reproducirse y vivir en un pequeño arroyo, con unos pocos centímetros de agua sobre su cuerpo y la otra viajar una gran cantidad de kilómetros hasta el océano para alimentarse y crecer mucho más que la

primera (Espinós, 1995). Es por esto que en un mismo curso de agua pueden encontrarse truchas residentes, migratorias de ríos y lagos, o anádromas (Espinós, 1995). Esta adaptabilidad a diversos hábitats y los efectos de la depredación y competencia sobre los peces e invertebrados nativos le permitió invadir diversos cuerpos de agua (Simon y Townsend, 2003). La combinación de las introducciones localizadas y su capacidad de invasión han contribuido a la amplia distribución de *O. mykiss* en la Patagonia argentina. Aun siendo una especie exótica en la región, *O. mykiss* tiene alta relevancia debido a su impacto económico consecuencia de la pesca deportiva, el desarrollo de la acuicultura local y el consumo humano. Además, es un modelo de investigación en el campo de la ecotoxicología. Los estudios de los efectos de los pesticidas carbamatos y organosfosforados sobre la trucha arcoíris como sujeto de contaminación comienzan durante la década del 70 (Statham et al., 1975; Klaverkamp et al., 1977) e involucran estudios sobre las enzimas blanco de los pesticidas, dosis letal media (LC50), desarrollo embrionario y comportamiento. A partir de allí la trucha arcoíris continuó siendo ampliamente utilizada para evaluar los efectos letales agudos (a corto plazo) sobre los peces salmónidos (y, por inferencia, sobre otros organismos acuáticos sensibles) asociados con la exposición o la exposición potencial a sustancias químicas o efluentes (Sprague, 1969; Pessah y Cornwall, 1980; Wells y Moyse, 1981; Dafoe et al., 1984). Actualmente en la base de datos de ecotoxicología, creada y mantenida por la EPA, para enero de 2019 se observa que el número de pruebas de toxicidad con especies de peces tiene el record para *O. mykiss* con un total de 37.859 datos de toxicidad en diferentes compuestos. Mientras que las 10 especies de peces principalmente estudiadas, encabezadas por la trucha arcoíris, cubren el 55 % de todas las pruebas realizadas en peces (un total de 965 especies). Esto refleja la importancia de *Oncorhynchus mykiss* como modelo en toxicología. Trabajos más recientes estudian como las vías de regulación génica podrían ser moduladas por contaminantes y su implicancia sobre los sistemas de detoxificación del pez (Hasselberg et al., 2008; Gräns et al., 2010; Wassmur et al., 2010; Liu et al., 2013).

*O. mykiss* fue definida como una especie carnívora, depredadora, con una dieta conformada por animales del plancton, necton y bentos (Compagnucci et

al., 1992). De su anatomía se puede decir que posee un esófago corto, que se continúa en un estómago musculoso bien desarrollado. Inmediatamente después del estómago, se encuentra la primera porción del intestino, que está conectada a numerosos ciegos pilóricos. Estos ciegos contribuyen al aumento de la superficie intestinal y en los mismos continúa la digestión enzimática y comienza la absorción de nutrientes (Rust, 2002). El intestino es corto en relación con el tamaño corporal, como es usual en peces carnívoros. El hígado se encuentra en posición ventral cerca del estómago, anclado a los miómeros y a la columna vertebral por tejido conectivo, se encuentra bien desarrollado y actúa como depósito de glucógeno, almacena grasa, asimila nutrientes y tiene un papel importante en la síntesis de proteínas (Figura 1.1). En general, el hígado en los peces realiza funciones tanto hepáticas como pancreáticas; es el órgano metabolizador por excelencia de todas las sustancias que le llegan por vía sanguínea, por lo cual, este órgano sirve como referente histológico para el análisis del daño tisular causado por sustancias contaminantes del medio ambiente como pesticidas, metales pesados y otros (Amaral et al., 2002). Además produce la bilis, que se almacena en la vesícula biliar para contribuir en la digestión de las grasas. Por último, el hígado es el mayor sitio para el metabolismo de biotransformación de compuestos de origen endógeno y exógeno, para la homeostasis de aminoácidos, la regulación de glucosa, el procesamiento de lípidos, el metabolismo hormonal, y la producción de numerosos constituyentes del plasma (Hinton y et al., 2001).

Los xenobióticos son absorbidos por los peces a través de las branquias, piel y tracto gastrointestinal. El camino que dichos compuestos recorren, luego de la absorción, puede ser descrito de manera general en una serie de pasos secuenciales: (1) transporte desde el epitelio a la sangre, (2) incorporación a la sangre, incluyendo unión a proteínas del plasma, (3) transporte a través de la circulación sistémica o disolución libre, y (4) transporte desde la sangre a los diferentes tejidos (Kleinow et al., 2008). Una vez que el compuesto químico fue distribuido, los procesos de biotransformación (que ocurren principalmente en hígado) aumentan su solubilidad y crean compuestos conjugados que actuarán como substratos de los sistemas de transporte activo de la secreción biliar. Dichos compuestos podrían ser recaptados junto con



**Figura 1.1:** Anatomía interna (*Oncorhynchus mykiss*). Extraído de Bioinnova.com

la reabsorción de ácidos biliares y llegar nuevamente al hígado a través de la circulación enterohepática. Si el sistema de detoxificación es eficiente para dicho compuesto, este (o su metabolito) no será reabsorbido y será eliminado por las heces. La circulación enterohepática de los ácidos biliares no solo juega un papel importante en la absorción y transporte de nutrientes, sino que también sirve como control de retroalimentación de la síntesis de ácidos biliares mediante la inhibición de la enzima colesterol-7 alfa-hidroxilasa (CYP7) implicada en el metabolismo del colesterol (Schultz et al., 2001; Chiang, 2009).

## 1.2. Xenobióticos

Se define xenobiótico al compuesto de origen industrial producido por el hombre a través de la síntesis química (ej., pesticidas organofosforados, carbamatos), pero de estructura química diferente a aquellos compuestos sintetizados por los seres vivos. A su vez, según el artículo 2° del Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas, se define a un plaguicidas como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga”, (vectores de enfermedades, especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o productos que pueden administrarse a los animales para combatir algún tipo de plaga en o sobre sus cuerpos). Los xenobióticos abarcan un amplio espectro de plaguicidas, sin embargo no todos los plaguicidas son xenobióticos ya que también existen plaguicidas de origen biológico, como los formulados con *Bacillus thuringiensis*, granulovirus, etc.

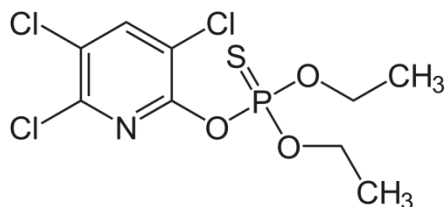
### 1.2.1. Insecticidas

Los insecticidas corresponden a un grupo particular de plaguicidas desarrollados con el objetivo de regular el crecimiento de las poblaciones de insectos plaga. Existe un grupo muy grande y variado de compuestos que presentan actividad insecticida. Una manera de clasificarlos es de acuerdo a su estructura química, de la que deriva su mecanismo de acción, en organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides, compuestos inorgánicos, entre otros. La mayoría ejercen su acción tóxica afectando el sistema nervioso de las especies blanco. Los insecticidas también afectan a organismos no diana y causan desequilibrios en los ecosistemas (Malins and Ostrander, 1991). Además, los organismos pueden bioacumularlos exponiéndose así a concentraciones superiores a las existentes en el ambiente (Montforts, 2006). La Organización Mundial de la Salud estima que  $\sim 3$  mi-

llones de personas sufren anualmente envenenamiento agudo por plaguicidas. En humanos, los insecticidas no sólo pueden resultar tóxicos en dosis altas, responsables de envenenamientos, también las mezclas de dosis bajas (crónicas o de un solo evento) correlacionan con neumonía obstructiva crónica, problemas en el sistema circulatorio periférico, arteritis, alergias, hemorroides, dermatitis alérgica, abortos involuntarios, hipertensión, estreñimiento crónico y diabetes (Tsatsakis et al., 2009; Zeliger, 2011). Asimismo, las exposiciones a largo plazo pueden conducir a una variedad de efectos sobre la salud, como cáncer y enfermedades relacionadas con la neurodegeneración (Bassil et al., 2007; Kanavouras et al., 2011), toxicidad reproductiva, del desarrollo (Hanke y Jurewicz, 2004) y efectos respiratorios (Hernández et al., 2011b). Los animales domésticos o silvestres son susceptibles también de sufrir intoxicaciones agudas y crónicas debido a la exposición a insecticidas, que varían según los mecanismos de acción del insecticida en cuestión y la sensibilidad de la especie “no blanco” frente al mismo. En este contexto, los sistemas acuáticos son altamente vulnerables debido a que son receptores de gran cantidad de sustancias químicas (Ferrari, 2006). El uso de tratamientos de protección contra plagas en cultivos representa uno de los problemas que afectan seriamente la integridad de los ecosistemas acuáticos. Los insecticidas alcanzan los cuerpos de agua como consecuencia de las actividades agrícolas, a través de fumigaciones aéreas, deposición o arrastre por la lluvia desde la atmósfera y escorrentía superficial del suelo, y filtraciones hacia las aguas subterráneas (Elezović et al., 1994). Los organismos acuáticos son altamente sensibles a la presencia de dichos compuestos por lo que se les utiliza como indicadores de contaminación para estos xenobióticos. En particular, los insecticidas neurotóxicos anticolinesterásicos, organofosforados y carbamatos, producen efectos agudos en animales de experimentación, que están vinculados a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). En numerosos ensayos de laboratorio, se ha observado en diferentes peces expuestos de manera aguda a organofosforados y carbamatos: pérdida de equilibrio, movimientos espasmódicos e hiperventilación branquial seguidos de contracción de todo el cuerpo e inmovilidad antes de la muerte, causada generalmente por asfixia (Ferrari et al., 2004).

### 1.2.1.1. Clorpirifos

El clorpirifos (CLF) (Figura 1.2), es un insecticida de amplio espectro, perteneciente a la familia de organofosforados. Ha sido comercializado desde los años sesenta y es uno de los más utilizados debido a su efectividad contra una amplia gama de insectos nocivos para los cultivos. Los nombres comerciales con los que se oferta el CLF son Dursban y Lorsban, entre otros. Fue registrado por primera vez en 1965 y comercializado por la empresa Dow Chemical Company (actualmente Dow Elanco) para uso doméstico. El CLF es utilizado en agricultura en más de cien cultivos diferentes, como cereales, maíz, arroz, tabaco, alfalfa, algodón, plantas ornamentales y numerosas frutas y también existe un amplio uso doméstico. Actúa como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (Van Der Well y Wellis, 1989) y fue clasificado como perteneciente a la clase II, moderadamente tóxico (Stephenson y Solomon, 2013), siendo en la actualidad uno de los insecticidas organofosforados más utilizados en agricultura.



**Figura 1.2:** Estructura química del clorpirifos

Estudios pioneros en Canadá, Estados Unidos y los Países Bajos han informado vidas medias en los ecosistemas acuáticos menores que 1 y 3 días (Racke et al., 1993). La corta persistencia del CLF en sistemas naturales se debe a su volatilidad, baja solubilidad en agua, fotosensibilidad y alta afinidad por los sedimentos y sólidos en suspensión (ATSDR 1997). Sin embargo, estudios reciente de Slotkin et al. (2009) observan que la fotodegradación del CLF no conduce necesariamente a la inactivación biológica de los efectos adversos dirigidos a las neuronas. La radiación UV característica tanto de las condiciones de campo como de la purificación de agua utilizada en estudios de biología molecular parece no afectar los principios activos del pesticida,

haciendo de CLF un compuesto más problemático que otros organofosforados que se han evaluado en estas condiciones. Los productos de fotodegradación de CLF incluyen su oxón y otras moléculas bioactivas (Bavcon Kralj et al., 2007). En la fase sedimento-agua se han descrito vidas medias de 1 a 34 días (Schimmel et al., 1983). El aumento de la vida media en dicha fase es debido a que los sedimentos actúan como un vehículo de transporte para contaminantes lipofílicos (es decir, chaperonas para contaminantes) (Wu et al., 2004). El contenido de materia orgánica, la porosidad, la capacidad de intercambio iónico del suelo y la transformación de los plaguicidas, influyen en la movilidad y transferencia de los mismos entre los compartimientos ambientales. Una interacción débil suelo-plaguicida, permite la migración de sustancias con altos valores del log Kow hacia cuerpos de agua a pesar de su carácter lipófilo (Narvaéz et al., 2012).

El Coeficiente de partición octanol/agua ( $\log K_{ow} = 3.31$  a  $5.27$ ) del clorpirifos indica afinidad por lípidos y, por lo tanto, un alto potencial de bioconcentración en organismos acuáticos. Racke et al., (1993) mencionan que organismos acuáticos expuestos a clorpirifos en ensayos *in situ* han mostrado un BCF de 100 a 4667, mientras que en aquellos expuestos en condiciones de laboratorio los BCFs fueron de 58 a 5100. Los factores que contribuyen a la bioconcentración incluyen la tasa metabólica, la velocidad de depuración, la biodisponibilidad de CLF y la disponibilidad de alimento para el organismo (Eisler, R. 2000). Los valores del BCF para este insecticida sugieren un potencial de moderada a muy alta tasa de bioconcentración en peces (Franke et al., 1994). El grado en que el CLF es bioacumulado varía según la especie, las condiciones bioquímicas y fisiológicas del organismo, la duración de la exposición y la dosis.

La información toxicológica indica que en el ser humano, CLF es neurotóxico y disruptor endócrino. Se lo ha asociado con problemas de asma y toxicidad reproductiva (Perry et al., 2007) y con efectos agudos que varían desde irritación ocular, en las vías respiratorias y piel hasta síntomas más severos por envenenamiento. Clorpirifos es bioactivado en peces por enzimas CYPs, específicamente CYP1A, que lo metaboliza a su forma más tóxica, el oxón (Clark y Di Giulio, 2012). Esta toxicidad incrementada se da debido a

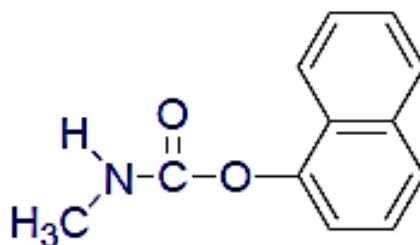


que el oxón posee una mayor afinidad y capacidad para fosforilar el grupo serina hidroxilo del sitio activo de la AChE que su precursor. La forma oxón inhibe las enzimas  $\beta$ -esterasas, como la AChE y las carboxilesterasas (CEs). AChE es el principal objetivo de los organofosforados y otros insecticidas, ya que su inhibición provoca la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en el espacio sináptico, lo que lleva a una neurotoxicidad grave (Fulton y Key, 2001; Kwong, 2002; Sanchez-Hernandez, 2007; Sogorb y Vilanova, 2002). En general, hay evidencias de que las enzimas CEs son más sensibles a los organofosforados que las AChE y protegen al organismo de los efectos de la anticolinesterasa (Jokanovic, 2001; Maxwell, 1992; Sánchez-Hernández, 2007; Tang y Chambers, 1999; Wheelock et al., 2005). Además, se ha informado que CLF y otros organofosforados aumentan el estrés oxidativo y las respuestas antioxidantes en diversos tejidos de peces (Ferrari et al., 2007; Guerreño et al., 2016).

#### 1.2.1.2. Carbaril

Los N-metilcarbamatos pertenecen a una familia amplia de plaguicidas, los carbamatos. Se empezaron a sintetizar a partir de 1957 (Haynes et al., 1957). Al igual que clorpirifos, sus propiedades están basadas en su capacidad para inhibir la enzima acetilcolinesterasa, que a su vez está implicada en la transmisión del impulso nervioso. Los plaguicidas N-metilcarbamatos suman aproximadamente una veintena, según aparece en la edición de “The Pesticide Manual” (Tomlin, 1997). Los sustituyentes sobre el anillo fenólico dan lugar a compuestos de diferentes características y, por lo tanto, con diferente capacidad para formar un complejo con la acetilcolinesterasa. La presencia del grupo metilo unido al átomo de nitrógeno es también determinante, puesto que su sustitución por un grupo alquílico de cadena más larga provoca una disminución de la actividad insecticida de estos compuestos. Al igual que los OP, los carbamatos causan toxicidad al inhibir las colinesterasas. En los carbamatos se produce una carbamilación reversible de la enzima AChE en las uniones parasimpáticas, en las uniones mioneurales del músculo esquelético, en los ganglios autónomos y en el cerebro. En contraste con la inhibición de

AChE por los organofosforados, la carbamilación es más reversible (es decir, la descarbamilación es rápida) que la fosforilación de los OP, pudiendo limitar el efecto que tienen en el pez los carbamatos. Esto se refleja en un mayor intervalo de tiempo entre los síntomas y una dosis letal (Reigart y Roberts, 1999). El carbaril (1-naftil N-metilcarbamato) (Figura 1.3), también denominado sevín, empezó a utilizarse en 1958 como insecticida de contacto y acción estomacal. Se usa en el control de lepidópteros, coleópteros y otros insectos sobre más de 120 cultivos diferentes. También actúa como regulador del crecimiento en las plantas. Su solubilidad en agua es 120 mg/L a 20°C. Es moderadamente soluble en disolventes orgánicos polares como la DMF (N,N-dimetilformamida), el dimetilsulfóxido y la acetona, y poco soluble en hexano, benceno y metanol. El carbaril es estable en condiciones normales, pero en medio básico se hidroliza rápidamente a 1-naftol. Además de los efectos sobre la acetilcolinesterasa, los carbamatos también pueden provocar disfunción del sistema reproductivo y endocrino, al afectar a las concentraciones en sangre de las hormonas implicadas en el metabolismo y en la reproducción (Baron, 1991; Rawlings et al., 1998).



**Figura 1.3:** Estructura química del carbaril

### 1.3. Petróleo

Aunque los hidrocarburos son compuestos que se producen de forma natural, pudiendo estar presentes en bajas concentraciones en diferentes matrices ambientales, las actividades antrópicas son las principales responsables de los altos niveles de concentración informados en los últimos años, tanto en

los sedimentos de los ríos como en las costas marinas (Shi et al., 2007, Guo et al., 2010, Viñas et al., 2010). La obtención del petróleo para la producción de energía, por métodos convencionales y no convencionales, incluyen la perforación y bombeo para la extracción del crudo de los yacimientos, el transporte y la refinación. Estos procedimientos son, en parte, responsables de la introducción de sustancias químicas tóxicas en el agua (Zeliger et al., 2011). Dichos procedimientos ocasionan invariablemente algunos derrames de petróleo y estos derrames resultan en la introducción de hidrocarburos alifáticos, monoaromáticos y aromáticos policíclicos (HAP) en aguas superficiales y subterráneas. Conjuntamente, la combustión de productos derivados del petróleo produce HAP, aldehídos, cetonas, metales y dióxido de azufre en el aire (además de hidrocarburos alifáticos) (Booher y Janke, 1997). Algunos de estos compuestos tóxicos del aire podrán ser precipitados por la lluvia sobre cuerpos de agua y el suelo. Conjuntamente, las sustancias presentes tanto en el aire como en el agua pueden ingresar a los sedimentos fluviales por adsorción y deposición y, al mismo tiempo, podrían re-ingresar al aire y el agua por circulación geoquímica, aumentando la contaminación secundaria (Michael et al., 2002). Las simultaneas contaminaciones primarias y secundarias generan un escenario complejo para el estudio de contaminación por petróleo y sus derivados. Específicamente, los HAP son una clase de contaminantes orgánicos que contienen dos o más anillos aromáticos fusionados compuestos de hidrógeno y carbono. También pueden tener grupos alquilo, como el metilo y/o etilo, sustituyendo uno o más de sus átomos de hidrógeno, y generalmente incluyen compuestos aromáticos heterocíclicos donde uno o más de los átomos de carbono de los anillos aromáticos son sustituidos con azufre, oxígeno o nitrógeno. Los HAP constituyen una parte sustancial de muchos combustibles fósiles, incluido el petróleo crudo, las lutitas de petróleo y las arenas de alquitrán. Los derivados del petróleo, o petrogénicos, suelen tener de dos a tres anillos fusionados, están altamente alquilados y también se conocen como HAP de bajo peso molecular. Sin embargo, cuando los productos derivados del petróleo y otros materiales orgánicos como la madera están sujetos a una combustión incompleta, los HAP de mayor peso molecular (generalmente tiene de cuatro a siete anillos fusionados) puede

formarse como un resultado de procesos de condensación. Estos compuestos no son sustituidos generalmente y se conocen como HAP pirogénicos. Dentro de los HAPs, el más simple es el naftaleno, que consiste en dos anillos de benceno aromáticos. Fenantreno y antraceno son compuestos de tres anillos y a medida que el número de anillos aumentan, el número de estructuras posibles se multiplica, por lo tanto, como clase, los HAP están compuestos literalmente por miles de estructuras, haciendo su clasificación, nomenclatura y análisis, así como estudios de su destino y efectos ambientales, extremadamente complejos (Tierney et al., 2013). Debido a su alta persistencia y naturaleza hidrofóbica, estos contaminantes constituyen un riesgo potencial para la biota y la salud humana (IARC 1983, Culbertson et al., 2008). De la lista de los 129 contaminantes prioritarios en agua para consumo, publicada en 1979 por la Agencia de protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, 1979), hay HAP como el Antraceno, Criseno, Benzopireno, Etilbenceno, Benzoantraceno, 3,4- Benzofluorantreno, 11-12-Benzofluoranteno, Pireno, Fenantreno, Dibenzo [a,h]antraceno e Indeno[1,2,3-cd]pireno, y compuestos monoaromáticos, como el Benceno. Speer et al., (2002) han mostrado una correlación entre una mayor incidencia de leucemia y residir en la proximidad a los botaderos de petróleo (donde ocurren filtraciones en las fuentes de agua potable). La mutagénesis y los efectos carcinogénicos de algunos HAPs de alto peso molecular han sido claramente reconocidos durante muchos años. Estos compuestos pueden estar presentes en el medio ambiente (además de por la contaminación por derrames de petróleo, refinación de petróleo y combustión de material orgánico) por aguas residuales y descargas industriales, gases de escape de vehículos y también debido a fuentes naturales, como incendios forestales, infiltración de petróleo natural y vulcanismo (Abdel-Shafy y Mansour, 2016). Los HAP pueden causar una variedad de efectos, como la interferencia con las funciones de membrana celular, teratogénesis, carcinogénesis, mutagénesis e inmunosupresión (White et al., 1985; White, 1986; Thurmond et al., 1987; Davila et al., 1995). Entre otras sustancias químicas, algunos HAP inducen la expresión de las oxidasas del citocromo P450 (Taysse et al., 1998; Ferraris et al., 2005; Yamauchi et al., 2005), que desempeñan un papel clave en la detoxificación de xenobióticos. Además, la

regulación de la inducción de la citocromo P450 mediada por el receptor de aril hidrocarburos (AhR) ha sido demostrada en peces (Ferraris et al., 2005) y desde entonces la inducción de P450 ha sido utilizada como biomarcador y bioindicador de exposición a HAP (Huggett, 2018).

## 1.4. Xenobióticos y petróleo en Patagonia

La Patagonia argentina, es una de las cuatro regiones integradas de la República Argentina, con 770000 km<sup>2</sup>, donde la cría ovina, el gas y el petróleo son las actividades principales. Debido a las características del suelo y el clima, la actividad agropecuaria es parte de la economía nacional y regional. La Provincia de Río Negro situada en el norte de la Patagonia posee una superficie de 203013 km<sup>2</sup> y una población de 633374 habitantes, donde los factores geográficos y climáticos (las lluvias anuales varían de este a oeste entre los 180 mm y los 3800 mm) definen la actividad económica y poblacional. La Provincia de Neuquén, ubicada en la región noroeste de la Patagonia, tiene una superficie de 94078 km<sup>2</sup> (2.5 % del total nacional) y una población de 550344 (Censo 2010, <http://www.censo2010.indec.gov.ar/>).

La actividad frutícola de la zona Nor-Patagónica se concentra en cuatro zonas distintas: el Alto Valle, el Valle Medio, Gral. Conesa y Río Colorado. El Alto Valle es una unidad económica productiva con una parte en la Provincia del Neuquén y otra en Río Negro, y se extiende a lo largo de 65 km junto al río Neuquén, 50 km a lo largo del Río Limay y 120 km aguas abajo de la confluencia del Río Negro. La región del Alto Valle de Río Negro y Neuquén produce el 80 y 90 % respectivamente de las manzanas y peras de Argentina, a lo que se ha incorporado en los últimos años la producción de fruta fina, olivos, frutos secos. La horticultura y las actividades agroindustriales se encuentran asociadas en un área de 700 km<sup>2</sup>, donde la producción y procesamiento de productos frutihortícolas requiere diversas estrategias para combatir las plagas. Entre ellas, la aplicación de múltiples familias de plaguicidas durante un período que se extiende de septiembre a febrero todos los años. Los más utilizados en la actualidad son los provenientes de las familias

de los organofosforados (OP) carbamatos, piretroides y los neonicotinoides. La mayor carga de agroquímicos aplicados en las últimas décadas en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén ha sido para combatir la principal plaga de la fruticultura: la Carpocapsa (*Cydia pomonella*), estimándose en alrededor de 900 toneladas anuales de plaguicidas aplicados en la región desde el año 2000 (Anguiano y Pechen, 2007). Por ejemplo, en el período 2006-2012, el pesticida clorpirifos tuvo una frecuencia de aparición (porcentaje de muestras positivas, por encima del límite de detección, respecto al total de muestras analizadas) en el río Neuquén de 12.39 %, en concentraciones que variaron desde niveles traza hasta 0.032  $\mu\text{g/L}$  (monitoreo de agroquímicos en la cuenca, 2016). El carbaril se encontró en un valor máximo de 0.12  $\mu\text{g/L}$ , con una frecuencia final de aparición de 2.76 % (Figura 1.4a).

También el mismo monitoreo dio relevancia ecotoxicológica a la frecuencia de detección del clorpirifos en las aguas superficiales del río Negro, siendo este el agroquímico con la mayor frecuencia de aparición (7.7 %) (monitoreo de agroquímicos en la cuenca, 2016). Sin embargo, se resalta en que no existen al presente, tanto a nivel nacional como internacional, niveles guía de clorpirifos para el agua destinada a consumo humano con tratamiento. El valor guía que se conoce para CLF es  $\leq 0.006 \mu\text{g/L}$  y corresponden a un valor guía para la protección de la vida acuática en agua dulce (Secretaría de Recursos Hídricos de la Nación, 2005).

Los drenajes de los sistemas de riego de las cuencas suelen presentar residuos de plaguicidas en mayor número y concentración que los ríos, debido a que transportan los excedentes de riego de las áreas cultivadas. Esto se observó en el monitoreo realizado al drenaje del río Neuquén, aquí el pesticida metil azinfos tuvo la mayor frecuencia de detección un 30.7 %, seguido del clorpirifos con un 21.9 %, en un intervalo de concentraciones que varió entre valores trazas y un máximo de 4.2  $\mu\text{g/L}$  para el metil azinfos y hasta 0.06  $\mu\text{g/L}$  para el clorpirifos. En el mismo drenaje, carbaril tuvo una frecuencia de aparición de 13.1 % (Figura 1.4b).

En los drenajes del río Negro el metilazinfos y el clorpirifos fueron los compuestos detectados con mayor frecuencia, 30.4 % y 28.6 %, respectivamente. El carbaril, fue detectado con una frecuencia 12.4 %, aunque nunca

se lo encontró en una concentración superior a la del valor guía propuesto ( $0.95 \mu\text{g/L}$ ) (Figura 1.4c).

Otras investigaciones que abarcaron el uso de indicadores ambientales para la evaluación de las prácticas agrícolas en una microcuenca de la región, demostraron además la existencia de migración fuera del sitio de aplicación de agroquímicos, detectando la presencia de residuos de plaguicidas en suelo, agua superficial y agua subterránea. Las mayores frecuencias de detección en agua (superficial y subterránea) fueron para metilazinfos y clorpirifos (70 %). En términos de concentración los mayores niveles encontrados fueron para metilazinfos ( $22.5 \mu\text{g/L}$ ) y carbaril ( $45.7 \mu\text{g/L}$ ) (LIBIQUIMA-CITAAC, 2016). En el suelo, aún antes del período de aplicación, se detectaron residuos acumulados de períodos anteriores, que aumentaron las concentraciones durante la aplicación. Loewy et al., (2011) confirmaron que la deriva es una vía significativa de entrada de plaguicidas al agua superficial mientras que la percolación y los flujos preferenciales constituyen las principales vías de transporte que contribuyen a la contaminación sub-superficial.

Los monitoreos ambientales realizados LIBIQUIMA-CITAAC, Universidad Nacional del Comahue-CONICET (2016) indican, además, la presencia de algunos hidrocarburos alifáticos (HA) y aromáticos (HAP) en la misma región.

La historia del petróleo en la República Argentina se remonta a 1907, con el primer descubrimiento de un pozo petrolero en la zona de Comodoro Rivadavia. Posteriormente, se creó la Dirección General de Explotación del Petróleo, con el objetivo de regular la actividad de las compañías extranjeras que comenzaban a establecerse en el país con este fin.

Entre 1916 y 1922, durante la primera presidencia de Hipólito Yrigoyen, se realizaron varias obras para fomentar la extracción de petróleo. En el último año de este gobierno, fue fundada Yacimientos Petrolíferos Fiscales (YPF), empresa encargada de la extracción y tratamiento del petróleo.

Si bien la explotación hidrocarburífera y gasífera de las provincias de Río Negro y Neuquén es de larga data, ha sido notorio en años más recientes el avance que la misma ha tenido en superposición con el valle irrigado e incluso con áreas periurbanas. A partir del año 2010, el Poder Ejecutivo neuquino

anunció la búsqueda y explotación de gas en yacimientos denominados “no convencionales” de dos tipos: en arenas compactas (Tight Gas) y en capas de arcillas (Shale Gas y Shale Oil), entrampados principalmente en las formaciones Vaca Muerta y Los Molles, en la Cuenca Neuquina. Esto produjo como consecuencia una expansión en la explotación de recursos petroleros y un impacto ambiental no dimensionado adecuadamente.

Estudios llevados a cabo en el período 2007-2008, que abarcan la cuenca del Río Neuquén y la ribera urbana del Río Limay hasta la zona de confluencia, presentan valores de Hidrocarburos alifáticos totales de entre 0.41 y 125  $\mu\text{g/g}$  de peso seco (Monza et al., 2013) en los sedimentos de ambos ríos. En cercanías de la confluencia de ambos ríos que dan origen al río Negro, se detectó la presencia de HAPs en sedimentos, naftaleno (40 ng/g) y pireno (50 ng/g).

En la provincia del Neuquén existen 2.940 pozos petroleros terminados y 14.842 en perforación (exploración, expansión y servicios). Mientras que en la provincia de Río Negro son 297 los pozos petroleros en perforación y 731 pozos terminados (Censo del Ministerio de Energía y Minería de la Nación 1999-2009). La perforación de un pozo petrolero no siempre puede garantizar la productividad del mismo, quedando a veces trunca por diversos motivos, por ejemplo los estratos evaluados no aportan la cantidad de fluidos estimados o la calidad del crudo no es la esperada. Esto sucedió con un pozo antiguo de crudo (explotado desde 1900 hasta la década de 1940), que actualmente se encuentra abandonado, en la cuenca del río Ñirihuau en zonas aledañas de la ciudad de San Carlos de Bariloche. Luego de ser desmantelado y suspendida su explotación, continuó brotando petróleo permanentemente (Mancini y Serna, 1989). Estudios históricos relatan la existencia de manaderos de crudo en la cuenca del Ñirihuau desde la colonia y sus primeros usos como brea para la reparación de embarcaciones o como aceite para iluminación se remontan a aquella época. Sin embargo, luego del descubrimiento de petróleo en Comodoro Rivadavia, se redoblaron los esfuerzos exploratorios en la Patagonia. Así, en Ñirihuau se realizaron cateos en 1911 y 1918; entre esos años, también hubo intentos de explotación privados, que no resultaron económicamente viables. Entre 1933 y 1934, YPF retomó los trabajos en la zona con



un considerable despliegue de personal y equipos. En esos años se realizaron siete pozos, que hallaron impregnaciones de petróleo en el subsuelo, pero que no lograron encontrar la veta madre ni acceder al mayor reservorio. Al no producirse los descubrimientos esperados, YPF postergó indefinidamente sus actividades en la cuenca (Salas, 2007; Arrigoni, 2007; Nasser, 2011). El mal sellado de estas perforaciones dejó una huella indeleble en el paisaje, y fue motivo de conflicto con los pobladores del paraje. Este derrame se establece en el Arroyo La Mina, un arroyo de bajo orden ubicado en un área de estepa de transición de las montañas subandinas dentro del sistema e cuencas del río Ñirihuau, que luego desemboca en el Lago Nahuel Huapi (Mancini y Serna 1989, Cazau et al., 2005)(Figura 1.5).

Como se indico más arriba, los contaminantes químicos, tanto pesticidas como derivados del petróleo, llegan a los ecosistemas acuáticos desde fuentes puntuales o no puntuales, con características del paisaje y condiciones meteorológicas que modifican sus rutas de entrada. Por ejemplo, estudios con *Oncorhynchus mykiss* en el Río Negro encontraron pesticidas organoclorados (DDT, Endosulfan) en tejidos de trucha después de un episodio de inundación, a pesar de que la presencia de los pesticidas resultará de prácticas agrícolas pasadas (Ondarza et al., 2012). En lo que concierne a la contaminación por petróleo en la región, estudios recientes de Leggieri et al., (2017) en el arroyo la Mina mostraron que los niveles de un biomarcador de exposición a petróleo, como lo es CYP1A, fueron mayores en hígado y branquias de truchas obtenidas aguas abajo del sitio de derrame en relación a las truchas del control (aguas arriba del derrame). Dada la multitud de fuentes, y especialmente nuestra continua dependencia global al petróleo como fuente de energía, los hidrocarburos aromáticos policíclicos continuarán siendo contaminantes químicos de preocupación en las próximas décadas (Tierney et al., 2013).

## 1.5. Biomarcadores

La Región Norpatagónica cuenta con un recurso hidrológico de altísima

calidad, cuya preservación merece una atención especial. Los contaminantes presentes en el agua afectan de manera muy sensible a diversos organismos acuáticos. Antes de visualizarse las alteraciones a nivel poblacional y ecológico, se producen impactos en distintos blancos moleculares y bioquímicos de los organismos. Dado que la presencia de residuos suele no ser ni estable ni constante, sino que está sometida a factores periódicos o estacionales relativos a su descarga, movilización a través de aire-suelo-agua, velocidad de dilución, bioabsorción y/o degradación, es fundamental contar con otras herramientas complementarias al análisis químico de aguas para evaluar su riesgo. Los biomarcadores, definidos como las respuestas bioquímicas, fisiológicas y/o moleculares producidas en los organismos expuestos a contaminantes integran, en una matriz espacio-temporal, distintos episodios de exposición a uno o múltiples compuestos tóxicos. Los biomarcadores a nivel bioquímico y molecular son los de respuesta más sensible y temprana, mostrando en general un efecto a concentraciones muy por debajo de las que provocan alteraciones fisiológicas y letales (LIBIQUIMA-CITAAC, 2016). Por ejemplo, el aumento de la enzima CYP450-1A ocurre debido a una regulación de su síntesis *de novo* tras la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos y otros compuestos. Se considera que dicha inducción ocurre después que el hidrocarburo se une al receptor de aril hidrocarburo (AhR) citosólico formando un complejo agonista que, al ingresar al núcleo, causa la transducción de señales en cascada y la síntesis de proteínas. Por lo que se considera la inducción de las enzimas CYP450 como un biomarcador biológico de respuesta a la exposición de compuestos que se unen a AhR (Lee y Anderson, 2005; Brown et al., 2008). Las enzimas CYP450 se puede medir por métodos de expresión génica, medición proteica con anticuerpos monoclonales, y por medición de la actividad enzimática utilizando sustratos específicos. Los insecticidas organofosforados (OP) y N-metilcarbamatos son dos de los pesticidas más utilizados y como se mencionó anteriormente actúan por un mecanismo de acción similar, la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE). Por lo tanto, la inhibición de AChE todavía se considera uno de los biomarcadores más sensibles y fiables de la exposición a insecticidas OP y carbamatos (Gupta, 2014). Los biomarcadores tienen el poder de ser herramientas indispensables para

prevenir enfermedades inducidas por compuestos presentes en el medio ambiente de manera temprana (Suk y Wilson, 2002). Interesantemente una clase de biomarcadores de proteínas incluye a las citoquinas. Las citoquinas suelen estar generalmente asociadas con inflamación, reactividad inmunitaria, lesión o reparación de tejidos, y disfunción orgánica e incluyen interleucinas, factores de crecimiento, interferones, factores de necrosis tumoral y quimiocinas. Todas las células del hígado son capaces de producir citocinas y los niveles plasmáticos pueden ser indicativos de respuesta celular. Su producción puede estar relacionada con una lesión tóxica temprana que activa las células de Kupffer (principal fuente de producción de citoquinas en el hígado). Se ha demostrado que las redes de citoquinas pueden mediar la respuesta hepática a diversos xenobióticos (Lacour et al., 2005). Sin embargo, el aumento de citoquinas es transitorio y disminuye rápidamente, por lo que es necesario establecer claramente los tiempos de evaluación post dosis o exposición (Lacour et al., 2005). La IL-1 es un biomarcador de este tipo utilizado con frecuencia para detectar toxicidad hepática (Akbay et al., 1999; Lacour et al., 2005).

Dado que los organismos acuáticos generalmente están expuestos a diferentes compuestos tóxicos al mismo tiempo, la posibilidad de efectos combinados de mezclas deben ser abordados en los estudios de riesgo ambiental. Sin embargo, la complejidad y variabilidad de las mezclas químicas y la escasez de datos sobre las acciones combinadas de mezclas, transforma en un desafío el enfoque para una evaluación de riesgo ambiental realista. En muchos experimentos y observaciones ecotoxicológicas no hay enfoque sistemático para hacer frente a los diversos niveles de interacciones que pueden distinguirse en el contexto de un ambiente contaminado (Gupta, 2014). Por lo tanto, entendemos que los biomarcadores moleculares (incluyendo respuestas bioquímicas y genéticas) son una importante herramienta en estudios sobre los efectos de exposiciones a mezclas complejas.

## 1.6. Mecanismos de detoxificación

La toxicocinética abarca cuatro procesos dependientes del tiempo: la absorción química del compuesto, la distribución en el organismo, la biotransformación (metabolismo) y la excreción. Estos procesos dictan los niveles circulantes y celulares de compuestos, tanto endógenos como exógenos, y sus efectos fisiológicos y toxicológicos. Los xenobióticos pueden ser absorbidos por los peces, potencialmente, en todas las células epiteliales que están en contacto con el agua y los alimentos, pero la absorción suele ser mayor en los epitelios respiratorios y gastrointestinales, ya que los mismos están diseñados para una absorción rápida y eficiente. Varias características del tejido epitelial mejoran las tasas de absorción: una gran área de superficie, una corta distancia de difusión y un alto nivel de perfusión sanguínea. Sin embargo estas características varían mucho entre las especies de peces y los xenobióticos cruzan los epitelios por diversos mecanismos que incluyen: difusión pasiva simple, difusión facilitada, filtración por canales de membrana, transporte activo y endocitosis. El tipo de mecanismo seleccionado dependerá, en gran parte, del coeficiente de partición octanol/agua del compuesto. Por ejemplo, los PCBs, las dioxinas y pesticidas organoclorados como el DDT son hidrofóbicos, lipofílicos y con altos coeficientes de partición octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ), lo que determina que se transporten a través de las membranas por difusión pasiva, un proceso de primer orden que depende de los gradientes de presión. La mayor parte de la distribución de xenobióticos ocurre, luego de la absorción, a través de los sistemas circulatorios. Los peces tienen dos sistemas circulatorios. Los xenobióticos hidrofílicos se solubilizan en el plasma y se transportan en esta matriz, mientras que los compuestos hidrofobos suelen asociarse con otros constituyentes de la sangre como el colesterol y los triglicéridos, componentes macrocelulares (por ejemplo, las membranas celulares) y más frecuentemente unidos a proteínas plasmáticas. Las proteínas plasmáticas incluyen albúminas, globulinas y otros componentes del sistema inmunológico, proteínas reguladoras, factores de coagulación, proteínas de transporte, etc. Las características fisicoquímicas de los xenobióticos determinan la unión a proteínas individuales, generalmente a través de interac-

ciones hidrófobas. Sin embargo, las interacciones hidrófobas son rápidamente reversibles y cuando la afinidad de otra biomolécula o componente tisular es mayor que el de la proteína plasmática se produce la liberación del compuesto químico. Una vez sin unir, el compuesto químico puede difundir fácilmente entre las células endoteliales de los capilares o a través de ellas. En general, la distribución tisular depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas del compuesto, del flujo de sangre a un tejido en particular y de la afinidad del compuesto químico a los constituyentes de los tejidos. En cualquier caso, se distribuye ampliamente en todo el cuerpo, principalmente acorde con el contenido de lípidos del tejido determinado (Clark et al., 1990). Luego de la distribución tisular, dichos compuestos químicos pueden ser reconocidos por receptores que regulan la producción de proteínas de desintoxicación. Las acciones concertadas de estas proteínas aumentan la capacidad de excretar los xenobióticos y así evitar la acumulación dañina en el cuerpo. El órgano más importante para la desintoxicación es el hígado, que metaboliza los xenobióticos y los compuestos endógenos, como las hormonas esteroideas (Waxman et al., 1988, Parkinson, 1996). Los mecanismos de desintoxicación consisten en una batería de proteínas que se pueden dividir en enzimas de biotransformación, que son activas en la fase I y II, y bombas de eflujo que están activas en la fase 0 o III, de excreción (Xu et al., 2005). Esta tesis se centra en la regulación y la función de estas proteínas de desintoxicación en peces expuestos a pesticidas y fracciones solubles de petróleo.

### **1.6.1. Biotransformación**

La transformación de un compuesto químico en un organismo se define como biotransformación (Parkinson, 1996). Es una reacción esencial en el metabolismo de compuestos, tanto endógenos como exógenos, con el fin de convertir sustancias liposolubles a metabolitos hidrosolubles que puedan ser excretados de manera efectiva por las branquias, el tracto gastrointestinal y los riñones. Los procesos fisiológicos de absorción, distribución, biotransformación y excreción de compuestos exógenos (contaminantes ambientales y/o xenobióticos diversos) requieren que estas sustancias atraviesen diver-

Los compuestos del organismo para llegar a su sitio de acción, para ello deben cumplir determinadas características de solubilidad y permeabilidad (Parkinson et al., 2011). Dichas reacciones metabólicas pueden conllevar a cuatro situaciones: 1) la activación del compuesto químico, volviéndolo más reactivo, 2) la generación de un metabolito inactivo, el cual se eliminará del organismo, 3) la formación de un metabolito activo con la misma acción biológica del compuesto químico original, aumentando la vida media del mismo, o 4) la formación de un intermediario tóxico. Las reacciones llevadas a cabo para cualquiera de estos destinos se pueden agrupar en la fase I o de funcionalización, la cual consiste en modificar el compuesto formando un grupo funcional para aumentar la polaridad del mismo, para ello se realizan oxidaciones, reducciones e hidrólisis, entre otras. La fase II, o de conjugación es donde ocurren los enlaces covalentes a sulfatos, ácido glucurónico, aminoácidos, glutatión, entre otros, de esta forma se aumenta el tamaño del metabolito y se aumenta su hidrosolubilidad para facilitar la excreción (Nebert y Dalton, 2006; Miksys y Tyndale, 2002; Kleinow et al., 1987) (Tabla 1.1).

Para que un compuesto sea modificado por una reacción de fase II no necesariamente tiene que haber pasado por la fase I, ya que esto dependerá de la naturaleza de sus grupos funcionales y como estos interactúen con las enzimas de cada fase. Finalmente, los compuestos biotransformados salen de la célula a través de transportadores de membrana (fase III). Cuando no hay biotransformación previa, este transporte se denomina fase 0 (Steinberg, 2012; Omiecinski et al., 2011) o fase de transporte, es una manera más general de denominar al transporte hacia fuera de la célula, haya o no modificación estructural de los compuestos (Parkinson et al., 2011; Greim y Snyder, 2008; Awasthi, 1997).

#### 1.6.1.1. Enzimas del complejo Citocromo P450 en peces

Considerando todas las especies de peces, hay en total 137 genes codificantes de Citocromo P450 (CYPs) identificadas. Estos genes están clasificados en 18 familias: CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP5, CYP7, CYP8, CYP11,

**Tabla 1.1:** Familias de enzimas agrupadas por Fase (Adaptada de: Smith et al., 2012)

Citocromo P450 monooxigenasa	<b>Fase I</b>
Azo y Nitro-reductasas	
Aldehído deshidrogenasa	
Alcohol deshidrogenasa	
Epóxido hidrolasa	
Monoamino oxidasa	
Flavina monoamino oxidasa	
Carbonil reductasa	
Esterasas no específicas	
N- y O-metiltransferasas no específicas	<b>Fase II</b>
Ácido D-glucurónico transferasa	
Catecol-O-metiltransferasa	
Glutación transferasa	
Sulfato transferasa	
Amino ácido transferasa	

CYP17, CYP19, CYP20, CYP21, CYP24, CYP26, CYP27, CYP39, CYP46 y CYP51. En peces, la familia CYP1 se divide en cuatro subfamilias, CYP1A, CYP1B, CYP1C y CYP1D (Uno et al., 2012). La subfamilia CYP1A es la más estudiada de las isoformas, en general, y ha sido ampliamente utilizada como biomarcador en toxicología de peces, por su alta susceptibilidad a contaminantes (Jönsson et al., 2003; Rees et al., 2003; Goksøyr, 1995). Su expresión es normalmente baja pero resulta fuertemente inducida en peces expuestos a varios tipos de HAPs (Goksøyr et al., 1991; Di Giulio and Clark, 2015),  $\beta$ -naftoflavona, dibenzo-p-dioxinas policlorinadas (PCDDs), dibenzofuranos policlorinados (PCDFs) y bifenilos policlorinados (PCBs) (Browne et al., 2010; Olsvik et al., 2007). Estas enzimas metabolizan xenobióticos, como los HAPs, a epóxidos, los cuáles son intermediarios altamente tóxicos, que pueden ser posteriormente detoxificados por enzimas de fase II y excretados por transportadores de fase III (Baird et al., 2005). La expresión de los genes CYP1A está regulada por el receptor de aril hidrocarburos (AhR), el cual es activado por diversos ligandos incluyendo a los HAP.

### 1.6.1.2. Glutación S-transferasas

Las glutación S-transferasas (GSTs) son una familia de enzimas de fase II que conjugan glutación ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) reducido (GSH) con diferentes moléculas electrofílicas hidrofóbicas, disminuyendo la toxicidad celular de numerosos compuestos químicos endógenos y ambientales (Nebert y Vasiliou, 2004). La especificidad de sustratos de estas enzimas es muy amplia, incluyendo los pesticidas. En mamíferos se clasifican en tres superfamilias, GSTs citosólicas, GSTs mitocondriales y GSTs microsomales o MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) (McIlwain et al., 2006; Hayes et al., 2005; Jakobsson et al., 1999). Los compuestos tóxicos ambientales detoxificados por GST incluyen HAPs, pesticidas, compuestos naturales como la cianotoxina microcistina-LR (Pflugmacher et al., 1998) e intermedios reactivos producidos por la biotransformación de fase I y otras reacciones bioquímicas. En términos generales, hay abundantes informes sobre el aumento de la actividad GST en organismos acuáticos en respuesta a una gama de xenobióticos (Ferrari et al., 2007; Guerreño et al., 2016; Hayes et al., 2005), lo que indica una respuesta evolutivamente conservada. GST desintoxica activamente plaguicidas OP así como sus metabolitos oxón (Testai et al., 2010). El principal papel de GST es el de conjugar xenobióticos con glutación para su eliminación. Además metaboliza sustancias endógenas en la detoxificación de productos del estrés oxidativo derivados de la oxidación de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Así, además de su función de protección contra compuestos electrofílicos, ciertas isoenzimas de GST pueden catalizar la reducción de peróxidos celulares a sus correspondientes alcoholes, así como conjugar aldehídos insaturados genotóxicos endógenos formados durante la peroxidación de lípidos de membrana. GST cumple un papel crítico en la defensa contra el daño oxidativo y los productos oxidativos de ADN y lípidos (van der Oost et al., 2003). La toxicidad de muchos compuestos exógenos puede estar modulada por la inducción de GST. Efectos inductores de GST en hígado han sido observados en diversas especies de peces. Por ejemplo, un aumento significativo de la actividad de GST fue observado en peces expuestos a dioxinas, pesticidas o HAP (Arnold et al., 1995, Huuskonen et al.,



1996; Machala et al., 1998; Egaas et al., 1999).

### 1.6.1.3. $\beta$ -esterasas

La Unión Internacional de Bioquímica aplica el término “esterasas” a las hidrolasas que actúan sobre el enlace éster. Se dividen, a su vez, en subclases de acuerdo con el tipo de enlace éster que se hidroliza. En los mamíferos, hay dos tipos de  $\beta$ -esterasas: colinesterasas (ChE) y carboxilesterasas (CEs). El primero comprende acetilcolinesterasas (AChE) y butirilcolinesterasas (BChE, EC 3.1.1.8), mientras que las CEs de mamíferos incluyen un número de isoenzimas de características fisicoquímicas e inmunológicas similares y con una baja especificidad de sustrato (Sato y Hosokawa, 1998).

La inhibición de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) por los pesticidas organofosforados y carbamatos ha sido uno de los fenómenos más demostrados en toxicología. Esta enzima es responsable del funcionamiento normal de las sinapsis de los sistemas nerviosos central y autónomo, así como en las uniones neuromusculares. La inhibición de estas enzimas resulta en la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en el espacio sináptico, lo que lleva a neurotoxicidad severa (Fulton y Key, 2001; Kwong, 2002; Sánchez-Hernández, 2007; Sogorb y Vilanova, 2002). Durante décadas, la inhibición de AChE ha sido la principal respuesta biológica medida en organismos expuestos a pesticidas anti-ChE. Uno de los desafíos en la ecotoxicología de las  $\beta$ -esterasas ha sido el establecimiento de una relación entre el grado de inhibición de la AChE cerebral y la mortalidad. Por lo tanto, Fulton y Key (2001) propusieron sobre la base de los datos disponibles en la bibliografía que la inhibición de la AChE de los peces superior al 70% está relacionada con la mortalidad debida a los plaguicidas OP.

Las carboxilesterasas participan en la desintoxicación de pesticidas de dos maneras: i) hidrólisis de enlaces éster (carbamatos, piretroides y aquellos OP que contienen este tipo de enlace) y ii) unión de OP y carbamatos a un residuo de serina en su sitio activo (inhibición). La CE carbamilada se reactiva espontáneamente, mientras que la fosforilación de CEs implica su inhibición irreversible. La inhibición de CE por los pesticidas anti-ChE también se con-

sidera un mecanismo de desintoxicación debido a la disminución del pesticida circulante y, en consecuencia, la reducción del impacto en la actividad AChE del cerebro (objetivo de toxicidad aguda) (Sanchez- Hernandez, 2007). Estudios en peces, mostraron que las carboxilesterasas (CEs) son más sensibles a la inhibición, al unirse a los OP con mayor afinidad que la enzima AChE. De esta forma, protegen al organismo de los efectos agudos anticolinesterásicos al eliminar OP a través de la hidrólisis de enlaces éster (Jokanovic, 2001; Maxwell, 1992; Sánchez-Hernández, 2007; Tang y Chambers, 1999; Wheelock et al., 2005). La CEs es una enzima fundamentalmente involucrada el metabolismo de fármacos, lípidos y esteroides en mamíferos, sin embargo existen funciones fisiológicas aún inciertas (Satoh, 2005; Satoh y Hosokawa, 1998).

#### **1.6.1.4. Resistencia a Múltiples Xenobióticos (MXR) - Proteínas ATP-binding**

La resistencia a múltiples drogas se define como la extrusión de una gran variedad de metabolitos y xenobióticos desde las células por un único transportador de proteínas de membrana y está presente en bacterias, hongos y mamíferos (Alvarez et al., 2006). Este fenómeno se debe a la actividad de varios miembros de la superfamilia de proteínas ABC (ATP-binding cassette), que están presentes en las membranas de todas las células de todos los organismos. Las proteínas ABC son bombas de eflujo que transportan activamente xenobióticos o sus metabolitos fuera de la célula con gasto de ATP (Leslie et al., 2005; Luckenbach et al., 2014). Los genes ABC se dividen en familias (por ejemplo, ABCA, ABCB, ABCC y ABCG). El gen ABCB1 codifica para la glicoproteína P (Pgp) y los genes ABCC codifican a proteínas asociadas a la resistencia a múltiples drogas (MRP). Las MRPs y Pgp tienen un rol clave en la defensa contra xenobióticos en vertebrados. En las reacciones de detoxificación, los xenobióticos no metabolizados son transportados principalmente por Pgp, en lo que generalmente se denomina reacciones de fase 0. Los metabolitos de las reacciones de las fases I y II se exportan principalmente fuera de las células mediante MRP (reacciones de fase III) en la vía de desintoxicación (Leslie et al., 2005). La presencia de Pgp (Sturm et al.,

2001; Cooper et al., 1999; Hemmer et al., 1995), así como MRPs (Luckenbach et al., 2014) se ha demostrado en muchas especies acuáticas y, en particular, en varias especies de peces y se ha señalado que tienen un papel en la defensa y detoxificación de xenobióticos (Luckenbach et al., 2014). Se observó una menor acumulación de xenobióticos en organismos que viven en áreas altamente contaminadas, un fenómeno descrito como resistencia multixenobiótica o multirresistente (Kurelec, 1992). Por el contrario, muchos productos químicos pueden inhibir las bombas de flujo y, por lo tanto, perjudicar las funciones de detoxificación. Estos productos químicos se denominan quimio-sensibilizadores, ya que pueden conducir a una mayor acumulación de otros productos químicos, que pueden causar efectos adversos aun cuando se encuentren en el ambiente a bajas concentraciones (Smital y Kurelec, 1998). Sin embargo, el conocimiento sobre la ocurrencia, la función y la regulación de las ABCC y ABCB1 en los peces es limitado en comparación con el de los mamíferos. Estudios en hepatocitos primarios y líneas celulares de *O. mykiss* observaron que la expresión y actividad de proteínas ABCC es más pronunciada que la de ABCB1 (Zaja et al., 2008; Fischer et al., 2011). Sin embargo, los transportadores ABCC han sido menos estudiados que ABCB1 y, en general, ambos tipos de transportadores han sido poco estudiados en intestino de peces y en cuanto al papel que cumplen frente a compuestos tóxicos.

### 1.6.2. Receptores Nucleares

Existe evidencia de que todas las fases del metabolismo xenobiótico en peces y mamíferos pueden estar reguladas de manera coordinada por receptores nucleares específicos como el receptor de pregnano (PXR) y el receptor constitutivo de androstano (CAR), y un repertorio cada vez más amplio de otros receptores nucleares huérfanos (Maglich et al., 2002; Rae et al., 2001; Xie y Evans, 2001; Xie et al., 2003). Muchos compuestos tóxicos provocan cambios en la expresión génica a través de la activación de factores de transcripción. Esta expresión génica alterada puede ser adaptativa (por ejemplo, inducción de enzimas metabolizadoras de xenobióticos) o pueden conducir a toxicidad.

Dos familias de factores de transcripción desempeñan un papel importante en la mediación de respuestas a xenobióticos en mamíferos: proteínas básicas-hélice-bucle-hélice / Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) y los receptores nucleares (NR). La superfamilia bHLH-PAS incluye el receptor de aril hidrocarburos (AHR), a través del cual las dioxinas y los compuestos de tipo dioxina causan alteración de la expresión génica y toxicidad. Los receptores de xenobióticos de la superfamilia de NR incluyen a CAR, que no está presente en los peces, PXR y varios otros que pueden ser activados o inhibidos por contaminantes ambientales.

#### 1.6.2.1. Receptor de pregnano X (PXR)

PXR es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares (NR), factores de transcripción activados por ligando y se activa por una gran variedad de compuestos endógenos y xenobióticos, incluidos muchos medicamentos. Se asocia principalmente con la respuesta celular a xenobióticos, como la inducción de enzimas involucradas en la oxidación y conjugación de drogas, así como la inducción de transportadores de xenobióticos y endobióticos (fase III) (Rosenfeld et al., 2003). Por lo que PXR tiene un papel clave como xenosensor en la regulación de enzimas de fase I y II y de transportadores de fase III (Smutny et al., 2013). El mecanismo de acción, ocurre después de la unión del ligando. PXR forma un heterodímero con el receptor de retinoide X (RXR) que se une a los elementos de respuesta, ubicados en las regiones 5' flanqueantes de los genes blanco de PXR, lo que resulta en su activación transcripcional (Figura 1.6). Como miembros importantes de los genes blanco de la vía PXR hay genes de la superfamilia del citocromo P450 (CYP) que toman parte en el metabolismo de una gran variedad de compuestos estructural y funcionalmente diversos. Entre ellos, CYP3A, que interviene en el metabolismo de más del 30 % de los productos farmacéuticos en humanos (Gräns et al., 2015; Zanger et al., 2008). La vía PXR-CYP3A tiene relevantes efectos sobre la absorción, la biotransformación y la excreción de productos farmacéuticos en peces (Gräns et al., 2015; Pavlikova et al., 2010; Meucci y Arukwe, 2006).

Las enzimas metabolizadoras de Fase II, cuya expresión es regulada por PXR, incluyen a UDP-glucuronosil transferasa (UGT), sulfotransferasa (SULT) y GST (Xu et al., 2005). Entre los principales transportadores de fase III sujetos a regulación génica por PXR, se destacan ABCB1 y los genes ABCC para las proteínas asociadas a la resistencia a múltiples drogas (MRP2, MRP3, MRP4 y MRP5) (Schrenk et al., 2001; Jigorel E, et al., 2006; Assem M, et al., 2004). En hepatocitos de trucha arcoíris, aumentaron los niveles de ARNm de CYP3A y ABCB1 después de la exposición a agonistas de PXR prototípicos. No obstante, en un estudio con un gen reportero para PXR en trucha arcoíris se observó menos sensibilidad de dicho receptor para con los agonistas de PXR utilizados en mamíferos (Wassmur et al., 2010). La mayoría de los productos químicos evaluados como agonistas de CAR y PXR fueron estudiados *in vitro*, por lo que su capacidad para activar el CAR y PXR *in vivo* no se conoce (Hernandez et al., 2009). Por ejemplo, clorpirifos es un potente activador de CAR en ratones (Baldwin y Roling, 2009) y en líneas celulares de humanos es activador de PXR (Lemaire et al., 2004).

#### 1.6.2.2. Receptor de aril hidrocarburos (AhR)

El AhR es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la familia de proteínas de hélice-bucle-hélice básica. La expresión de una gran batería de genes, como CYP1A y ABCG2, está controlada por AhR y regula una amplia gama de respuestas biológicas (Schmidt y Bradfield, 1996; Denison et al., 2011; Halwachs et al., 2014). Una característica común de los compuestos inductores de AhR es la estructura plana y aromática que resulta en la unión a AhR (Goksøyr, 1995). Los ligandos de AhR de alta afinidad mejor caracterizados son los HAP (Hidrocarburos aromáticos policíclicos) y los hidrocarburos aromáticos halogenados planos (PHAH). Sin embargo, una amplia gama de productos químicos estructuralmente diversos puede unirse a AhR y activar su vía de respuesta (Stegeman y Hahn, 1994; Denison et al., 2011). El mecanismo de inducción de AhR ha sido ampliamente estudiado en sistemas de mamíferos. El modelo mecanicista clásico de la acción AhR indica que en ausencia de un ligando el AhR se encuentra en el citosol,

asociado a un complejo de chaperonas HSP90 (Proteína de choque térmico 90) y otras co-chaperonas. Una vez acoplado al ligando se libera del complejo y es translocado al núcleo, donde dimeriza con una proteína llamada ARNT (Traslador nuclear de AhR). Este nuevo complejo AhR/ARNT se une con alta afinidad a secuencias específicas del DNA llamadas “Elementos de respuesta a Dioxinas” (DREs) o también “Elementos de respuesta a xenobióticos” (XREs) localizadas en regiones regulatorias de los genes blanco, activando su expresión (transcripción) (Figura 1.7) (Puga et al., 2009; Bemanian et al., 2004).

### 1.6.2.3. Otros Receptores Nucleares

Existen además otros receptores nucleares involucrados en los mecanismos de detoxificación endógenos y exógenos. Los miembros adicionales de la superfamilia del receptor nuclear, como los receptores de esteroides (estrógenos, ER, andrógenos, AR y mineralocorticoides, MR), también están involucrados en la respuesta a xenobióticos o son blanco de productos químicos ambientales. Por ejemplo, Gräns et al., (2010) informaron una regulación cruzada de AhR con el Receptor de Estrógeno (RE), que es inducido tanto por estrógenos naturales como por xenoestrógenos, en hepatocitos de trucha arcoíris expuestos a agonistas de ambas vías. Concluyendo que la exposición mixta a los agonistas AhR y RE puede provocar una subestimación de respuestas de biomarcadores comúnmente utilizados, como inducción de la actividad EROD e inducción de la síntesis de vitelogenina.

El receptor de andrógenos (AR), también es un receptor nuclear de unión a ligando. Homodimeriza con la testosterona y regula la expresión de genes que contienen elementos reguladores *cis* denominados “Elementos de respuesta a andrógenos”. La capacidad de las células somáticas testiculares para promover y mantener la diferenciación de las células germinales está regulada por esteroides sexuales, en gran parte, a través de este receptor. Rolland et al., (2013) realizan un estudio de expresión génica con microrrays en *O. mykiss* y detectan 418 genes que exhiben cambios de expresión luego de dosis fisiológicas de testosterona o 11-Cetotestosterona. De los genes somáticos, el

estudio identifica elementos de respuesta androgénicos putativos dentro de las regiones promotoras proximales de 42 posibles genes diana del AR. También observan efecto en la expresión de genes de las células germinales. Esto indica que, además de regular la expresión génica en células somáticas de soporte, el tratamiento con andrógenos daría lugar a un cambio en los perfiles de expresión de las células germinales. Las funciones asociadas con estos genes se relacionan con los mecanismos a través de los cuales los andrógenos ejercen sus acciones reguladoras en la formación de túbulos, la diferenciación de células germinales, la secreción de espermatozoides y la producción de esteroides. Por lo que, bajo este escenario complejo, aún no se comprende por completo el mecanismo por el cuál la testosterona regula la espermatogénesis en *Oncorhynchus mykiss*.

Muchos productos químicos son ligandos potenciales del AR y el ER, pudiendo desencadenar respuestas complejas en los organismos expuestos. El diclorodifenildicloroetileno (DDE) es un ejemplo de un producto químico que actúa a través de este mecanismo. El DDE es un metabolito del dicloro difenil tricloroetano (DDT) que está muy extendido en el ambiente. Es un antiandrógeno, lo que significa que altera la expresión de genes regulados por andrógenos específicos, a través de la unión al receptor. El AR queda inactivado y no puede unirse al elemento de respuesta androgénica en el ADN. Esto inhibe la transcripción de genes que responden a los andrógenos, lo que pueden tener consecuencias graves para la vida silvestre expuesta (Boelsterli et al., 2007).

## 1.7. Objetivos

- Estudiar mecanismos de detoxificación en peces, incluyendo vías de regulación e interacción entre distintos compuestos tóxicos.
- Contribuir al desarrollo de biomarcadores moleculares como herramienta para la evaluación de riesgo ambiental y monitoreo de la calidad de aguas.

Los objetivos específicos planteados fueron:

1. Estudiar mecanismos de regulación molecular (receptores nucleares) involucrados en la biotransformación y excreción de clorpirifos e hidrocarburos de petróleo.
2. Determinar posibles mecanismos de interacción entre los efectos de clorpirifos (organofosforado) y petróleo a nivel de enzimas detoxificantes.
3. Estudiar el efecto de clorpirifos, sobre los transportadores MXR: ABCC en *Oncorhynchus mykiss*.

## 1.8. Hipótesis

El efecto de la interacción entre contaminantes sobre los peces está determinado por varios factores (no excluyentes):

- Activación/inhibición de vías regulatorias, que afectan la expresión de genes involucrados en la resistencia/susceptibilidad del organismo a distintos contaminantes.
- Inhibición/activación cruzada de enzimas detoxificantes y transportadores (de compuestos tóxicos y sus metabolitos).

Hay compuestos químicos que activan al receptor AhR, como los HAP, induciendo la expresión de CYP1A, y sabiendo, que esta enzima transforma al CLF a su forma oxón (bioactivación), se postula que:

- I. “Hidrocarburos aromáticos, presentes en la fracción soluble de petróleo (WAF), activan la vía del receptor AHR en el hígado de la trucha arcoíris, induciendo la expresión y la actividad de la enzima CYP1A con el consiguiente aumento de la toxicidad de CLF”.

Considerando que CLF es un agonista débil de los receptores nucleares, PXR y CAR en mamíferos, se postula que:

- II. “CLF activa la vía del receptor PXR en peces, aumentando la expresión de la batería de genes detoxificantes aguas abajo”.

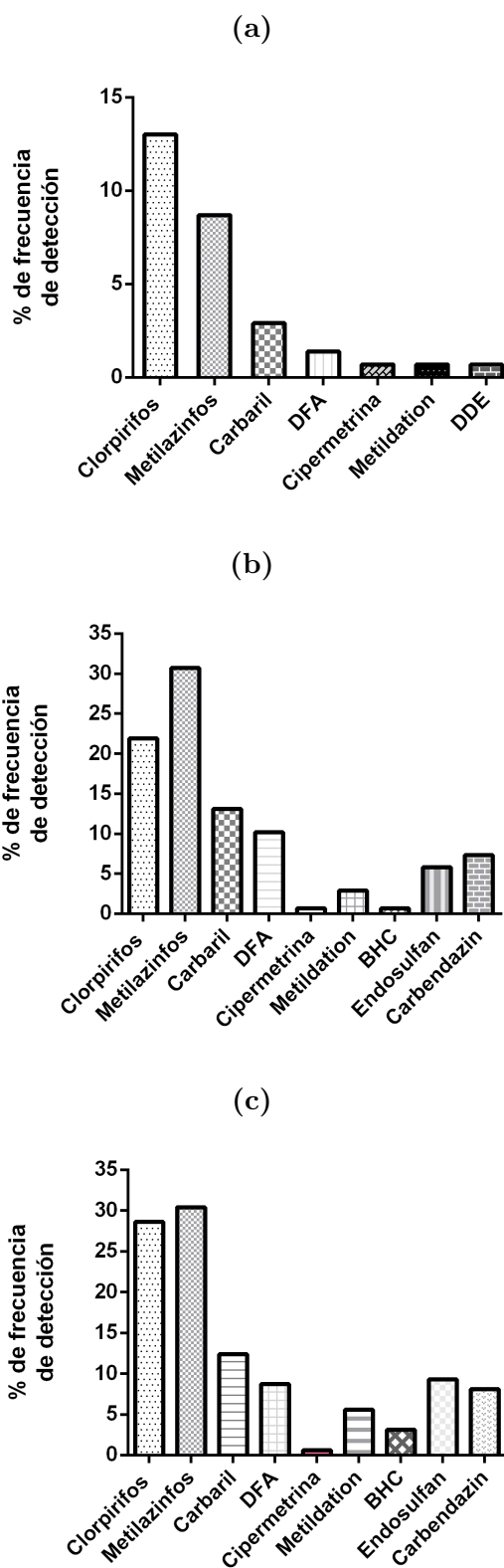


Considerando que numerosos insecticidas o sus metabolitos pueden ser inhibidores competitivos (sustratos) o sensibilizadores (inhiben pero no son sustratos) de los transportadores MXR; y que, también, podrían estimular la actividad MXR por fosforilación o expresión en membrana, se postula que:

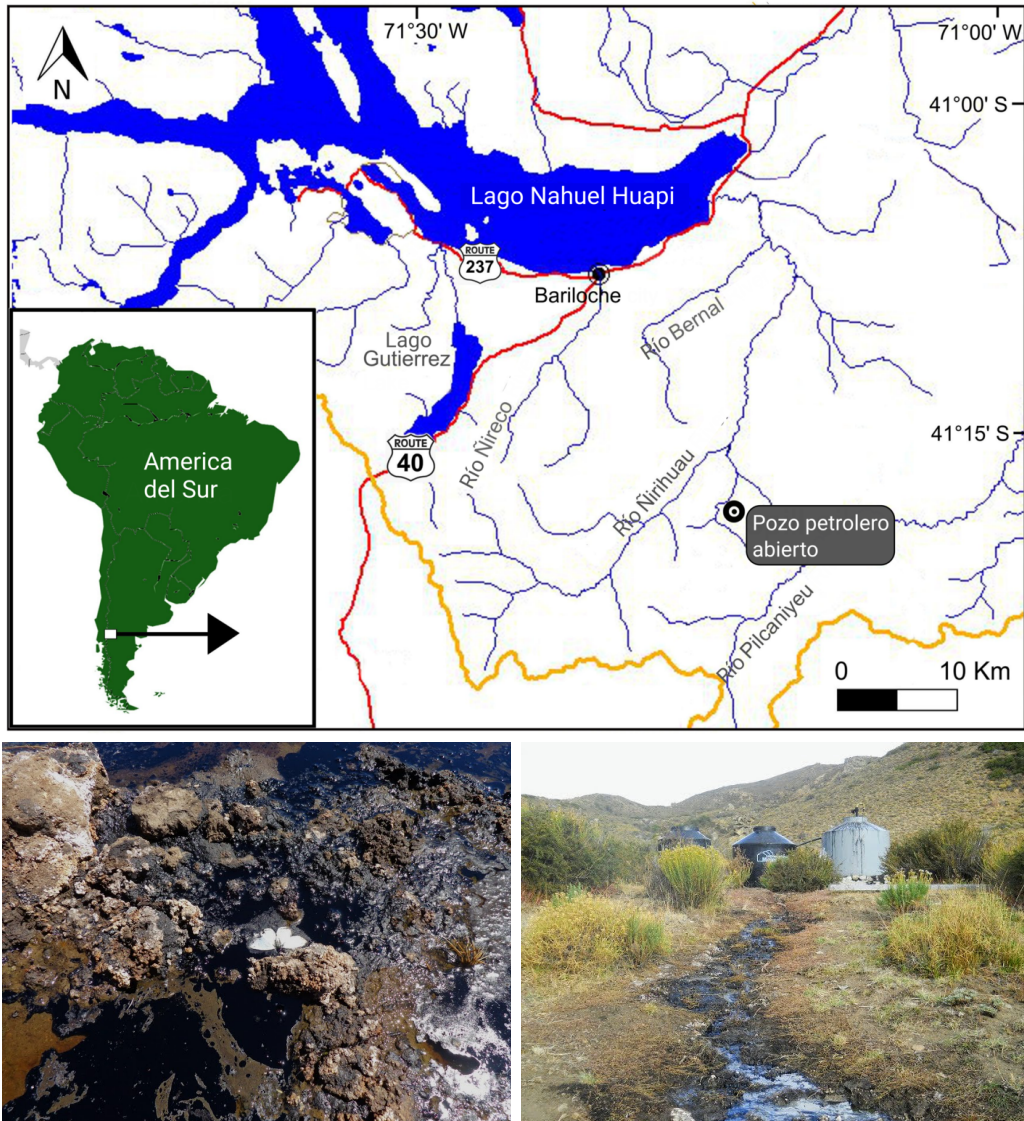
- III. “CLF afecta la función de un tipo de proteínas de transporte responsables de la MXR, las ABCC, produciendo inhibición competitiva, sensibilización o activación de dichas proteínas”.

## **1.9. Organización de la tesis**

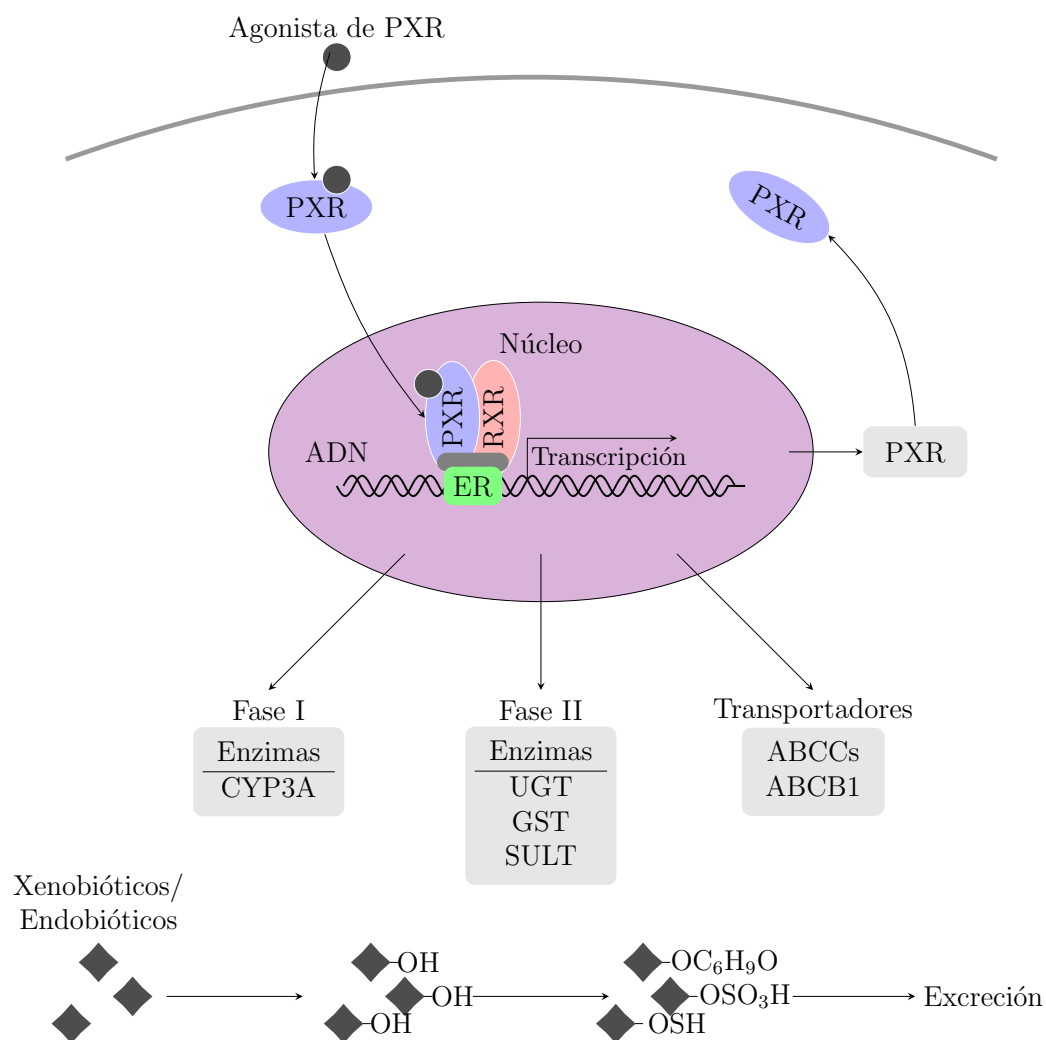
La tesis se encuentra dividida en 6 capítulos. El primero de ellos pertenece a la introducción o marco teórico correspondiente, además de detallar objetivos e hipótesis. El capítulo 2 desarrolla la metodología utilizada durante el proceso de investigación, con las técnicas en detalles y el posterior análisis de datos. Debido a que esta tesis tiene tres hipótesis fundamentales, los capítulos consiguientes abordan los resultados de los experimentos realizados para poner a prueba cada una de dichas hipótesis. El capítulo 3 aborda la hipótesis I, con sus resultados, discusión y conclusiones. El capítulo 4 corresponde a la hipótesis II y el capítulo 5 a la hipótesis III, todos ellos con sus resultados, discusiones y conclusiones correspondientes. Por último, en el capítulo 6 se hace una conclusión final que da cierre a los estudios llevados a cabo.



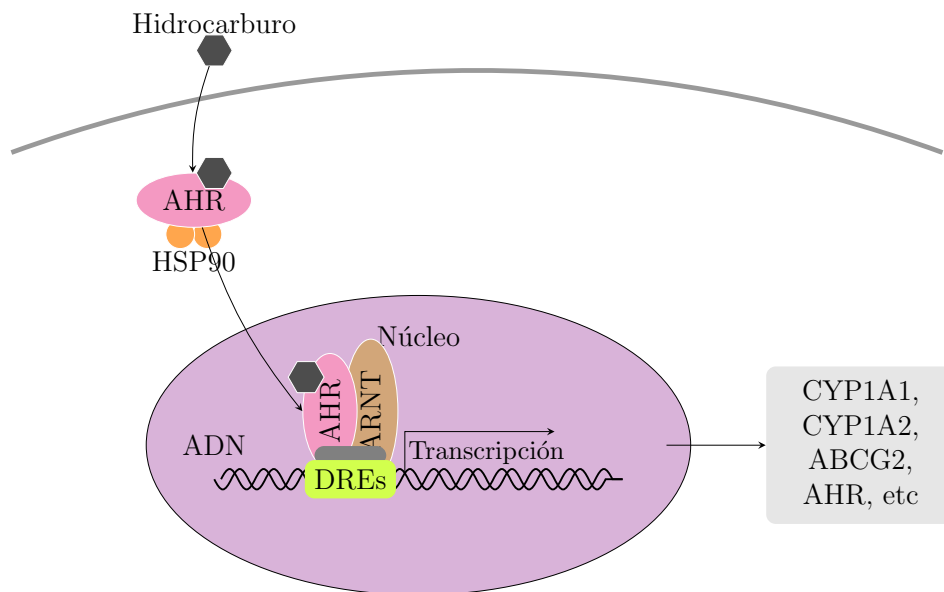
**Figura 1.4:** Frecuencia de detección de agroquímicos en (a) aguas superficiales del río Neuquén, (b) aguas de drenajes que desaguan en el río Neuquén (c) Frecuencia de detección de agroquímicos en aguas de drenajes que desaguan en el río Negro. (Adaptado de: monitoreo de agroquímicos en la cuenca, 2016)



**Figura 1.5:** Ubicación del arroyo La Mina, afluente del río Niriuhau, a 30 km de la ciudad de San Carlos de Bariloche, pozo petrolero abierto (Adaptado de: Leggieri et al., 2017).



**Figura 1.6:** Regulación de enzimas detoxificantes y transportadores mediada por el receptor nuclear PXR. El agonista de PXR se une directamente al receptor y traslocan al núcleo donde heterodimerizan con el receptor x de retinoides (RXR). El complejo PXR-RXR da inicio a la transcripción de genes corriente abajo, luego de reconocer su elemento de respuesta (ER). La activación de PXR da como resultado una regulación concertada del mismo PXR, de enzimas de Fase I, de Fase II y transportadores de membrana involucrados en la metabolización de xenobióticos y otros compuestos tóxicos.



**Figura 1.7:** Vía del receptor AHR. El ligando, por ejemplo un HAP, se une directamente al receptor en citosol y se asocia con HSP90 y otras co-chaperonas. Una vez acoplado al ligando, AHR se libera del complejo y transloca al núcleo, donde dimeriza con el traslocador ARNT. El complejo AHR-ARNT da inicio a la transcripción de genes corriente abajo, luego de reconocer su elemento de respuesta a dioxinas (DREs). La activación de AHR da como resultado una regulación concertada de las enzimas CYP1A1/2, el transportador ABCG2 y el mismo AHR entre otros genes involucrados en la metabolización de compuestos.



# Capítulo 2

## Materiales y Métodos

### 2.1. Obtención de especímenes

Se obtuvieron juveniles y adultos de *Oncorhynchus mykiss* ( $17.88 \pm 0.87$  g;  $12.19 \pm 0.29$  cm;  $70.32 \pm 13.99$  g;  $23.6 \pm 1.06$  cm Media  $\pm$  DE, respectivamente) en la instalación acuícola del CEAN. Antes de los experimentos, los peces se mantuvieron en un sistema de flujo continuo con agua del río Chimehuin. Este río puede considerarse libre de contaminación ya que es el efluente del Lago Huechulafquen, un profundo lago glacial (superficie de 70 km<sup>2</sup>) en el Parque Nacional Lanín, donde no se permiten actividades agrícolas ni otras actividades económicas contaminantes (Ley Federal 22351, Argentina). Entre el lago y la instalación de CEAN (Centro de Ecología aplicada del Neuquén), el río fluye a lo largo de 20 km a través de un área semidesértica con casi ninguna población humana. Los peces recibieron alimento comercial para trucha en una proporción del 1 % de su masa corporal por día. Todos los protocolos experimentales que siguen a continuación fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina (6060/116).

## 2.2. Diseño experimental hipótesis I

“Hidrocarburos aromáticos, presentes en la fracción soluble de petróleo (WAF), activan la vía del receptor AHR en el hígado de la trucha arcoíris, induciendo la expresión y la actividad de la enzima CYP1A con el consiguiente aumento de la toxicidad de CLF.”

Luego de la obtención de los especímenes juveniles de las instalaciones del CEAN, con las condiciones previamente explicadas, los peces se aclimataron individualmente en el laboratorio durante 48 h en recipientes cilíndricos de 10 L con agua continuamente aireada del río Chimehuin en un sistema estático (USEPA, 1996), a una temperatura de 16-18 °C, pH 7.4-7.6 y 12 h luz: 12 h oscuridad de fotoperíodo. Cada grupo experimental comprendió seis peces alojados en contenedores individuales ( $n = 6$ ). Se realizó un experimento de diseño factorial (2 factores  $\times$  2 niveles) en 24 tanques individuales para investigar los efectos del pretratamiento *in vivo* con WAF (62  $\mu\text{g/L}$  de hidrocarburos totales de petróleo, TPH) durante 48 h. La concentración de la WAF es similar a las concentraciones registradas por Leggieri et al., (2017) en el tramo de 0 a 1600 metros aguas abajo del derrame de petróleo en el arroyo La Mina. Luego del pretratamiento con WAF, finas secciones de hígado fueron expuestas *ex vivo* a 20  $\mu\text{g/L}$  de CLF durante 1 h (Tabla 2.1). Esta concentración es aproximadamente el doble de la concentración letal media de CLF (LC50 96 h) para trucha arcoíris, la cuál oscila entre 6-9.4  $\mu\text{g/L}$  (Macek et al., 1969; Holcombe et al., 1982). Sin embargo, las especificaciones y evaluaciones para Clorpirifos por la FAO en 2004 reportan un LC50 96 h de 24  $\mu\text{g/L}$ . La concentración de 20  $\mu\text{g/L}$  de CLF, se eligió con el fin de garantizar una concentración intracelular de CLF lo suficientemente alta para producir efectos bioquímicos en una exposición *ex vivo* de corta duración (1 h). Por lo que, al final del período de pretratamiento con WAF o su correspondiente control, los peces fueron sacrificados por un golpe en el cabeza, para ruptura del centro nervioso, seguido de decapitación. El hígado de cada pez se extrajo rápidamente y se enjuagó con solución salina de Cortland con hielo (pH 7.4, 5 mmol/L) de  $\text{NaHCO}_3$ , 5.55 mmol/L de gluco-



sa); una porción de aproximadamente 200 mg se cortó en finas secciones y se mantuvo en pequeños recipientes de vidrio con 6 mL de la misma solución con aireación constante. Se trataron las secciones de hígados, provenientes de 6 peces expuestos previamente a WAF y de 6 peces expuestos al pretratamiento control, con 20  $\mu\text{g/L}$  de CLF. Las secciones de hígado de los peces restantes (6 pre tratados con WAF y 6 del control de pretratamiento) se trataron con acetona al 0.1 % (control de solvente). Después de 1 h, las secciones de hígado se separaron en sub-muestras para posterior análisis de expresión génica, expresión de proteínas y actividad enzimática. Las sub-muestras para análisis de expresión génica se conservaron en RNAlater a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para análisis de expresión de proteínas, el tejido se almacenó en nitrógeno líquido con PBS-Triton X-100 (KCl 30 mmol/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 mmol/L, 1.4 mol/L NaCl, 80 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 % Triton X-100, pH 7.4) hasta su análisis (en 2 semanas). Las sub-muestras para estudios de actividad enzimática se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se procesaron en el término de tres días. Este experimento permitió la exposición directa del tejido hepático a una concentración controlada de CLF, evitando la posible metabolización previa de este compuesto en otros órganos. Por lo tanto, el efecto sobre la actividad de CYP1A debido a la exposición de WAF *in vivo* y la consiguiente modulación de la toxicidad de CLF se reflejaría en los marcadores bioquímicos.

**Tabla 2.1:** *Diseño experimental hipótesis I, cuatro grupos con 6 peces (en tanques individuales).*

N=6		Tratamiento 1hr <i>ex vivo</i>	
		Control (Acetona 0.1 %)	CLF (0.20 $\mu\text{g/L}$ )
Pretratamiento 48 hr <i>in vivo</i>	control (solo agua)	C-SC	C-CLF
	WAF 5%	WAF-SC	WAF-CLF

### 2.3. Diseño experimental hipótesis II

“CLF activa la vía del receptor PXR en peces, aumentando la expresión de la batería de genes detoxificantes corriente abajo del elemento de respuesta a PXR”.

Para los experimentos de las hipótesis II se utilizaron truchas de  $3.58 \pm 0.98$  g;  $7 \pm 0.65$  cm (Media  $\pm$  DE). También obtenidas de las instalaciones del CEAN y que se encontraban bajo las mismas condiciones de acondicionamiento que las truchas utilizadas para los estudios de la hipótesis I. Los peces se aclimataron individualmente en el laboratorio durante 48 h en recipientes cilíndricos de 3 L con agua del río Chimehuin continuamente aireada en un sistema estático (USEPA, 1996), a una temperatura de 16-18 ° C, pH 7.4-7.6 y 12 h luz: 12 h oscuridad de fotoperíodo. Cada grupo experimental comprendió tres peces alojados en contenedores individuales ( $n = 3$ ). El diseño experimental consistió en tres grupos expuestos *in vivo* a una concentración de CLF de 1.4  $\mu\text{g/L}$  ( $\sim 1/5$  de la CL50) a tres tiempos, 12 h, 24 h y 48 h (Tabla 2.2). Luego de finalizadas las exposiciones se procedió a sacrificar los peces. El hígado y el intestino de cada pez se extrajeron rápidamente y se colocaron en tubos de microcentrífuga con RNAlater (*LifeTechnologies*), volumen final de 0.3 mL y se los conservó a -20 °C para posterior análisis de expresión génica por q-PCR de 12 genes de interés ( $\beta$ -actina, *CYP1A*, *CYP2M1*, *UDPGT*, *CYP2K1*, *MRP2*, *CYP3A27*, *FMO1*, *PXR*, *GST*, *PGP*, *AhR* y *ARNT*).

**Tabla 2.2:** *Diseño experimental hipótesis II.*

N=3		<i>Tratamiento in vivo</i>	
Tiempo	12 h	Control (0.007 % cetona)	CLF (1.4 $\mu\text{g/L}$ )
	24 h		
	48 h		

## 2.4. Diseño experimental hipótesis III

“CLF afecta la función de un tipo de proteínas de transporte responsables de la MXR, las ABCC, produciendo inhibición competitiva, sensibilización o activación de dichas proteínas.”

El diseño se basó en tres tipos de preparaciones intestinales, que varían en la disposición y corte del intestino, según Bieczynski et al., (2014), ti-

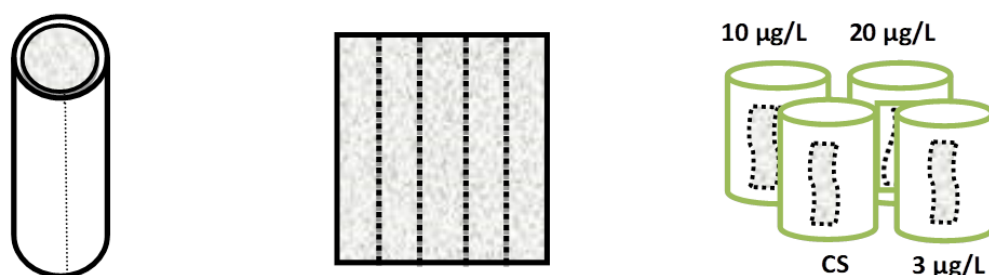
ras intestinales, segmentos evertidos y segmentos no evertidos. La técnica de transporte llevada a cabo, brinda información sobre la posible participación de proteínas ABCC en la excreción de los insecticidas a los que fueron expuestos los tejidos, procedentes de los peces sin tratamiento previo, y sobre los posibles efectos de estos insecticidas sobre dichas proteínas.

### **2.4.1. Diseño para técnica de tasa de transporte de ABCC en intestino**

Luego de la obtención de los especímenes adultos de las instalaciones del CEAN, con un ayuno previo de 48 h, para garantizar la limpieza del intestino, los peces adultos ( $N = 8$ ) fueron trasladados al laboratorio donde se los sacrificó inmediatamente. Luego, mientras se los mantenía en un recipiente con hielo, se extrajo el intestino, descartando la sección de ciegos pilóricos. Las secciones media y posterior del intestino fueron seleccionadas para los experimentos de transporte, por ser las secciones más adecuadas al diseño experimental. Cada sección de intestino se colocó inmediatamente en solución salina Cortland en frío y se eliminó cuidadosamente el contenido intestinal.

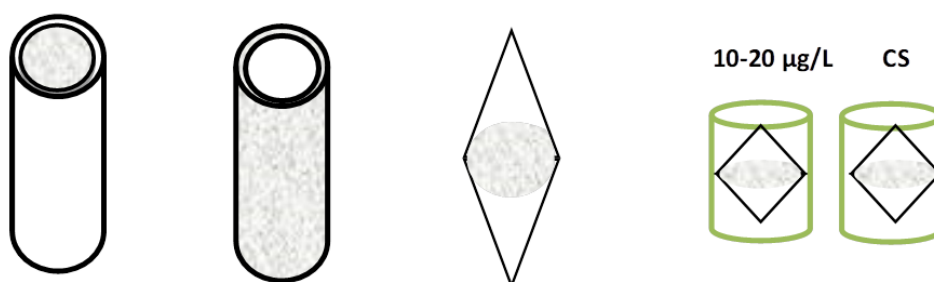
En el caso de las tiras, se procedió a cortar un tramo de intestino longitudinalmente para abrirlo y luego el rectángulo obtenido se fraccionó en cuatro o cinco tiras longitudinales del aproximadamente 10 mm de ancho. Cada tira se pesó y colocó al azar en un tubo de vidrio con 6 mL de solución Cortland. Los resultados obtenidos con tiras intestinales reflejaron la suma de los flujos basolateral (seroso) y apical (luminal o mucoso). Luego se expusieron las tiras a tres concentraciones de CLF, de 3, 10 y 20  $\mu\text{g}/\text{L}$  y una de ellas a un control con acetona, durante 1 hora (Figura 2.1).

Para los segmentos evertidos se procedió a introducir una aguja de crochet en la porción de intestino a utilizar, se sujetó con hilo por el extremo superior de la aguja y, con suave presión desde el extremo libre hacia el extremo atado, se deslizó la porción de intestino sobre sí misma, dejando de esta forma la mucosa intestinal expuesta. Una vez evertido, el segmento se pesó y se cerró sujetando con hilo por ambos extremos, insertando una cánula de teflón en uno de ellos para poder aplicar solución salina en el interior (control) o la



**Figura 2.1:** Esquema de experimento de tiras intestinales.

concentración de CLF de 10-20  $\mu\text{g/L}$ . Los volúmenes agregados con una jeringa Hamilton dentro de los segmentos cerrados fueron  $63 \pm 4.6 \mu\text{L}$  (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** Esquema de experimento de sacos intestinales evertidos.

Por último, los segmentos no-evertidos, se ataron de la misma forma pero con la mucosa intestinal hacia adentro y se llenaron directamente con solución salina para el control o 10-20  $\mu\text{g/L}$  de CLF para los tratados. En todos los casos, se realizó un control de tejido (sin 1-cloro-2,4 dinitrobenceno, CDNB) y un control de la solución de CDNB (sin tejido) y el volumen final de la solución siempre fue de 5 ml (ver Sección 2.9 de este capítulo, técnica de transporte a través del epitelio intestinal). Estas preparaciones fueron usadas para medir los flujos de transporte desde el espacio intracelular hacia el lumen intestinal (transporte apical) y desde el espacio intracelular hacia el lado serosal de la pared intestinal (transporte basolateral), respectivamente.

## 2.4.2. Diseño para medir efectos tóxicos en intestino

Se procedió igual que en la extracción de los intestinos y preparación de tiras. Las tiras longitudinales de intestino se expusieron a las mismas concentraciones de CLF utilizadas en los experimentos de transporte, 3  $\mu\text{g/L}$ , 10  $\mu\text{g/L}$  y 20  $\mu\text{g/L}$ . Luego de 1h de exposición con aireación constante y a temperatura ambiente, se procedió a enjuagar los tejidos con el buffer de homogenización y se les realizó el análisis para actividades enzimáticas de CE, AChE, GST (Sección 2.8) y peroxidación lipídica (Sección 2.11).

## 2.5. Soluciones de tóxicos

### 2.5.1. Solución madre de Clorpirifos

La solución estándar madre de Clorpirifos de 20 mg/L en acetona se preparó disolviendo 1 mg de Clorpirifos (O, O-dietil O-[3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato], 99% de pureza, Chem Service, West Chester, Pennsylvania, EE. UU.) en 50 mL de acetona de calidad cromatográfica (Cicarrelli, Argentina). La solución madre se conservó en heladera (4 °C) durante un máximo de 5 días para garantizar la calidad de la misma. La concentración exacta se verificó por cromatografía de gases (Agilent 6890 series, Wilmington, EE. UU.). A partir de la concentración madre fueron realizadas las diluciones necesarias para cada experimento.

### 2.5.2. Fracción acuosa de petróleo crudo (WAF)

El petróleo crudo se obtuvo de un derrame de petróleo que fluye continuamente hacia el arroyo La Mina, provincia de Río Negro, Argentina (41°17'21" S - 71°10'58" O). El petróleo muestreado se caracterizó como crudo pesado inmaduro (Ro = 0.44 - 0.53 %, American Petroleum Institute (API) = 18 ° y azufre = 0.45 %; Cazau et al., 2005), compuesto de 33.7% de hidrocarburos saturados, 17.8% de hidrocarburos aromáticos, 5.9% de asfaltenos y 42.6% de NSO (compuestos con nitrógeno, azufre, oxígeno y metales pesados) (datos proporcionados por YPF SA Argentina). Las muestras fueron

transportadas en hielo al laboratorio y se mantuvieron a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en botellas de vidrio, como se recomienda para muestras de HAP antes del análisis. La WAF se preparó inmediatamente antes de cada experimento, de acuerdo con Singer et al., (2000), utilizando 4.75 g de petróleo crudo por L de agua del Río Chimehuin (alcalinidad 34 mg/L, conductividad  $36\ \mu\text{S}/\text{cm}$ , pH 7.6, 8.37 mg/L de oxígeno disuelto a una temperatura de  $10\text{-}12\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Se colocó primero el agua para que el petróleo no precipitara y quedara adherido a la superficie del frasco, luego se colocó el agitador magnético. Se eligió un frasco plano en la base para que la agitación fuera eficiente y se lo mantuvo cerrado para evitar la salida de compuestos volátiles y la modificación de las presiones parciales en la mezcla. El nivel de energía del agitador magnético debía tener una potencia que garantizara un vórtice de profundidad de  $20 \pm 25\%$  en el recipiente de mezcla. Se lo mantuvo en agitación constante por 24 h (Figura 2.3). La temperatura del proceso fue de  $15 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante la agitación y se mantuvo al frasco en oscuridad (frasco de color caramelo y envuelto en aluminio) para evitar cualquier proceso de fotooxidación. Según análisis de cromatografía, a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la WAF preserva sus propiedades durante aproximadamente 24 h (Singer et al., 2000), antes de que comiencen los procesos de degradación. La WAF utilizada en los experimentos se analizó por el método de la Agencia de Protección Ambiental (USEPA) 3510C-8015D GC-FID.

### 2.5.3. Hidrocarburos totales de petróleo en WAF

Se realizó un análisis para determinar hidrocarburos totales del petróleo utilizado para hacer la fracción soluble (WAF), y un perfil cromatográfico de la misma WAF con la que se expuso a los peces en los experimentos de la hipótesis I en el Laboratorio de Cromatografía, Departamento de Química, Facultad de Ingeniería Universidad Nacional del Comahue realizó los análisis. Según metodología de la USEPA, se realizó una extracción líquido-líquido de compuestos orgánicos en serie a partir de 1 L de muestra, utilizando cloruro de metileno y un embudo de decantación. Se cuantificaron los TPH como el valor conjunto de todos los hidrocarburos desde C6 hasta C36, incluyendo los 16 HAPs prioritarios de USEPA (sin discriminar). Método EPA 3510C



**Figura 2.3:** Representación gráfica de preparación de WAF.

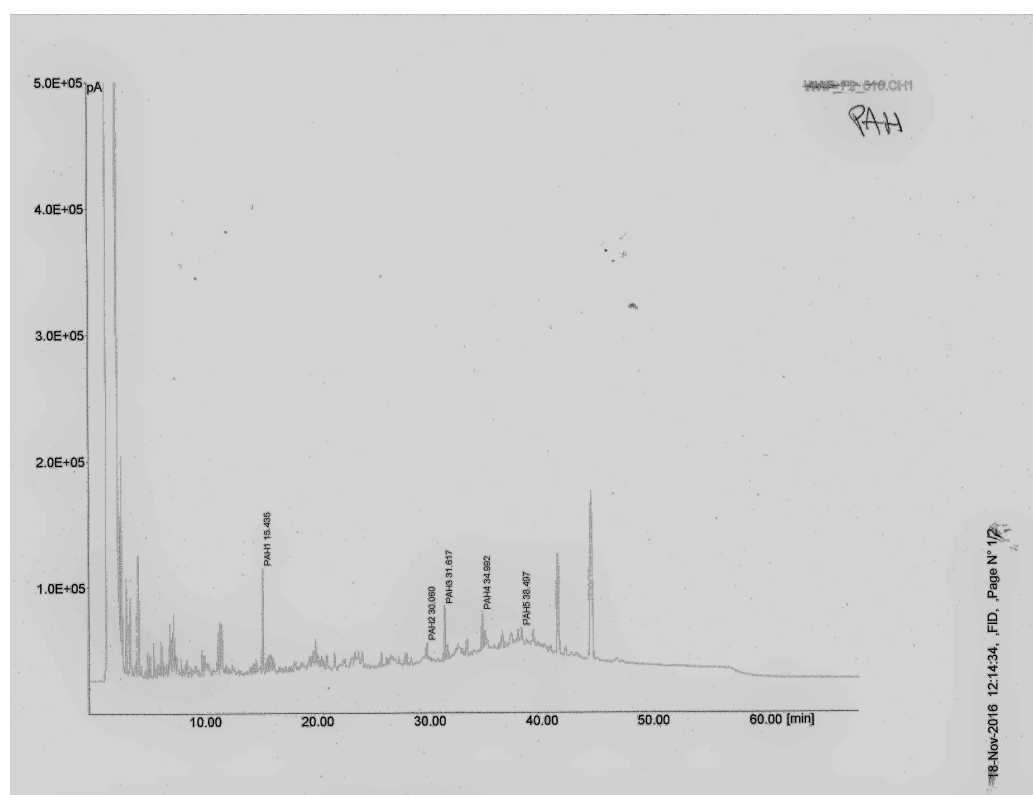
– 8015D – CG-FID. El límite de detección fue de 0.002 mg/L y el límite de cuantificación fue 0.010 mg/L

La concentración de TPH (C6-C36) en WAF fue de 1.24 mg/L (CV <7%). Para el experimento, el agua del acuario se preparó diluyendo WAF al 5% en agua del río Chimehuin, con el fin de obtener una concentración nominal de TPH de 62  $\mu\text{g/L}$ . Esta concentración es similar a las concentraciones registradas por Leggieri et al., (2017) de 0 a 1600 m aguas abajo del derrame de petróleo en el arroyo La Mina, donde se observan abundantes juveniles de trucha arcoíris. En la Figura 2.4 se muestra el cromatograma y los picos corresponden a hidrocarburos poliaromáticos que no pudieron ser discriminados.

## 2.6. Expresión genética

### 2.6.1. Aislamiento y cuantificación de RNA total

Se extrajo el ARN total de las muestras de hígados e intestino de *O. mykiss* (100 mg) con el reactivo Trizol (Ambion) siguiendo los pasos de las instrucciones del fabricante. Se agregó 1 mL cada 50-100 mg de tejido y se



**Figura 2.4:** Análisis de cromatografía de gases de la fracción acuosa del arroyo La Mina. Los picos corresponden a hidrocarburos poliaromáticos.

procedió a homogenizar manualmente con un pistilo, luego se agregó el resto del Trizol para completar 1 mL. A continuación las muestras homogenizadas fueron mantenidas por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación del complejo de nucleoproteína. Se agregaron 0.2 mL de cloroformo por cada mL de Trizol utilizado durante la homogenización. Luego se agitó vigorosamente a mano por 15 segundos y se incubó 2-3 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. Se procedió a remover la fase acuosa colocando el tubo a 45 °C y pipeteando en la solución. Se colocó la fase acuosa en un nuevo tubo y se procedió a aislar el ARN. Para la precipitación del mismo se agregaron 0.5 mL de isopropanol al 100 % a la fase acuosa por cada mL de Trizol usado para la homogenización. Se incubó a -20 °C por 1 h y luego se centrifugó a 12000 x g por 10 min a 4 °C. El ARN se encontraba invisible antes de la centrifugación

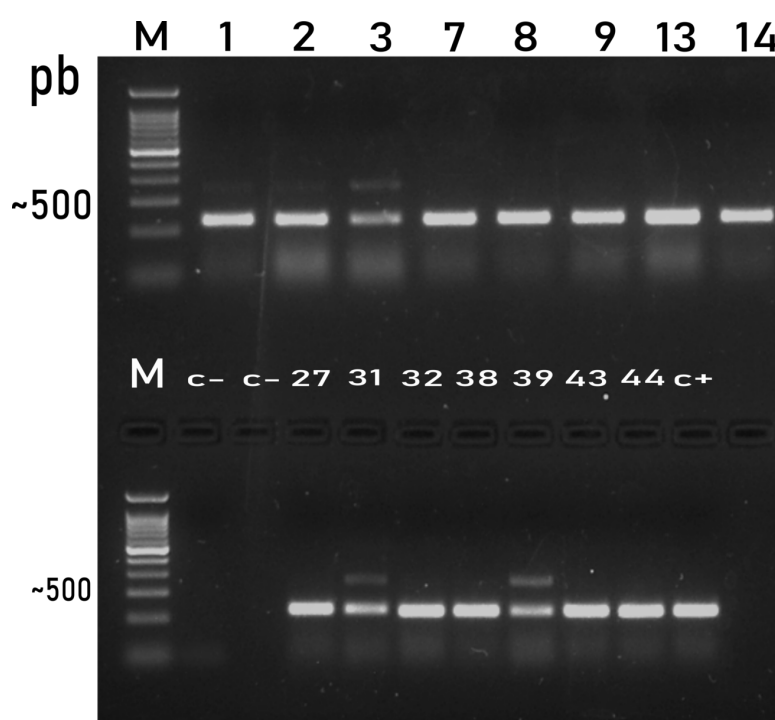


y luego se formó un pellet tipo gel blancuzco. Luego se procedió a lavar el ARN; removiendo el sobrenadante del tubo y dejando sólo el pellet. Se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 0.75 % por cada mL de Trizol usado en la homogenización. Se agitó en vortex brevemente y luego se centrifugó el tubo a 7500 x g por 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se dejó sacar el pellet por 5-10 minutos. Luego se procedió a re-suspender el ARN en 50  $\mu$ L de agua libre de ARNasa varias veces a través de la pipeta. Se incubó en un bloque calefactor a 55 °C por 15 minutos. El rendimiento y la pureza del ARN total extraído se determinaron mediante espectrofotometría UV (relación A260/A230 y A260/A280).

### 2.6.2. Síntesis de ADNc

Se usaron 2  $\mu$ g de ARN total por muestra para sintetizar ADNc mediante una enzima M-MuLV modificada genéticamente (virus de la leucemia murina de Moloney), la transcriptasa inversa Revert Aid (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Después de su descongelación, se mezcló y centrifugó brevemente todos los componentes de la reacción y se los mantuvo en hielo. Se añadieron, en un tubo estéril, las siguientes concentraciones por muestra: 2  $\mu$ g de ARN molde, 0.5  $\mu$ g de Oligo DT y agua tratada con Dietilpirocarbonato hasta llegar a 12.5  $\mu$ L. Luego se agregó 4  $\mu$ L del buffer de reacción 5X (Tris-HCL 250mM, pH 8.3 a 25 °C, KCl 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, DTT 50 mM, 0.5  $\mu$ L (20 U) de Thermo Scientific<sup>TM</sup> RiboLock RNase Inhibitor, 2  $\mu$ L de la mezcla de dNTP (10 mM de cada uno) (1 mM concentración final) y 1  $\mu$ L (200 U) de la transcriptasa reversa Revert Aid, finalizando con un volumen total de 20  $\mu$ L. Luego, se procedió a mezclar suavemente y centrifugar brevemente. A continuación, se incubó a 42 °C por 60 min, la temperatura de annealing fue de 60°C y para terminar la reacción se inactivó la enzima a 70 ° C durante 15 min. Al finalizar, se realizó una reacción de PCR convencional para asegurar la integridad del ADNc, utilizando como cebadores la  $\beta$ -actina de 466 pb (Forward: GCCGGGTTTCGCTGGAGATGA. Reverse: GCGTGGGCAGAGCGTACCD) de *O. mykiss* que ya estaba estandarizada. Para dicha PCR convencional se utilizó la mezcla de SYGB Green (10  $\mu$ L),

agua destilada milli-Q (8  $\mu\text{L}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  de cada primer (0.1 nM/ $\mu\text{L}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  de ADNc. Las muestras se incubaron por 3 min. a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C, 30 segundos a 72°C y extensión final a 72 °C por 10 minutos. Luego se resolvió en un gel TAE al 1% de agarosa. La electroforesis se realizó a 80V, durante 35 minutos. Se examinó el gel bajo la lámpara de luz ultravioleta para determinar la presencia y posición de las bandas en el mismo (Figura 2.5).

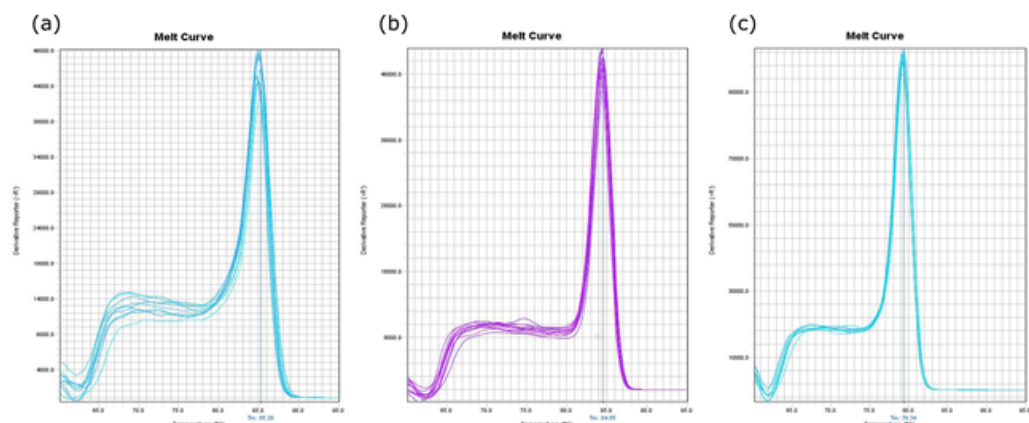


**Figura 2.5:** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR con cebadores específicos para el gen  $\beta$ -actina de trucha. (466 pb). M corresponde al marcador de peso de 100 pb, C- al control negativo y C+ al control positivo. Los números corresponden a muestras de hígado de trucha de la primera hipótesis.

### 2.6.3. q-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)

A partir de muestras de hígado de *O. mykiss*, diluidas en un factor de 2, se generaron 6 diluciones seriadas 1:5, y se establecieron 6 temperaturas para

determinar la eficiencia de los cebadores (60, 61, 62, 63, 64 y 65 °C), tres curvas de fusión representativas (gen de *AHR* (a), *ARNT* (b) y *CYP1A1* (c)) de todos los cebadores se muestran en la Figura 2.6. Para Q-PCR, cada mezcla de reacción contenía 1  $\mu\text{L}$  de molde de cDNA, 0.5  $\mu\text{mol/L}$  de cada cebador, 8  $\mu\text{L}$  de agua, y 10  $\mu\text{L}$  de  $2 \times$  SYBR Green q-PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.). Las reacciones se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems). El programa de ciclado térmico consistió en 3 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 10 s, hibridación de 60 - 65 °C durante 30 s (dependiendo de la temperatura de hibridación de los cebadores) y extensión de 72 °C durante 20 s. El gen de  $\beta$ -actina fue usado como gen constitutivo. Los pares de cebadores usados para realizar las q-PCR en las muestras de hígado de la hipótesis I y los utilizados en las muestras de hígado e intestino de la hipótesis II se muestran en la Tabla 2.3 (parte a y b). La expresión de los genes se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (Livak y Schmittgen, 2001).



**Figura 2.6:** Curvas de fusión de los genes (a) *AHR*, (b) *ARNT* y (c) *CYP1A1* para hígado de trucha arcoíris.

## 2.7. Expresión proteica

### 2.7.1. Extracción de proteínas totales

Las muestras para expresión proteica fueron conservadas en PBS Triton X-100 y en Nitrógeno líquido hasta su análisis. Luego, se procedió a lavar dichas muestras con Buffer Ripa (1mL de Buffer + 10 $\mu$ L de PMSF 200 mM +10 $\mu$ L de Cocktail Inhibidor Proteasa, Sigma) antes de comenzar.

Se colocó a las muestras (80 – 300 mg) en un tubo de 1.5 mL con Buffer RIPA preparado. Luego se homogenizó con pistilo y se sonicó en hielo (5 min). A continuación se volvió a congelar en nitrógeno líquido y sonicar en hielo. Se centrifugó a 21500 x g durante 30 minutos, se separó el sobrenadante en un tubo de 0.6 mL (aproximadamente 500  $\mu$ L, evitando la grasa superficial) y se guardó a -20 °C. Los pellets se guardaron a -80 °C.

### 2.7.2. Cuantificación de proteínas por BCA

Utilizamos el Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). El principio del ensayo del ácido bicinconínico (BCA) es similar al procedimiento de Lowry, en que ambos se basan en la formación de un complejo de  $\text{Cu}^{2+}$  proteína bajo condiciones alcalinas, seguido por reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ . La cantidad de reducción es proporcional a la proteína presente. Se ha demostrado que cisteína, cistina, triptófano, tirosina y el enlace peptídico son capaces de reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ . BCA forma un complejo de color púrpura-azul con  $\text{Cu}^+$  en ambientes alcalinos, proporcionando así una base para supervisar la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  por las proteínas en absorbancia máxima a 562 nm.

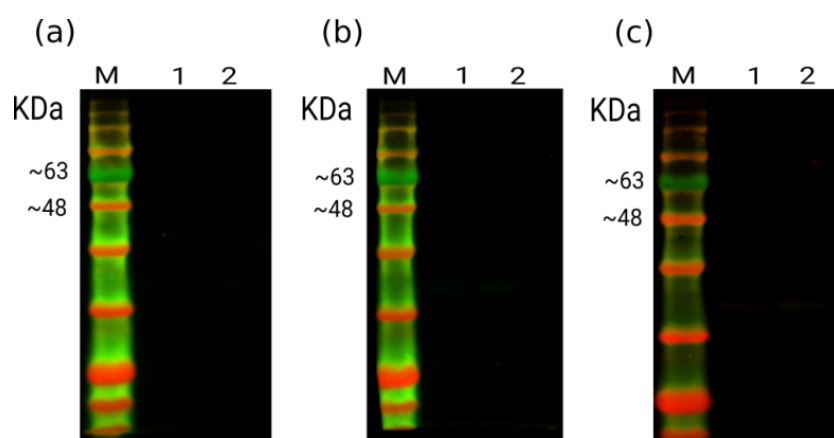
Utilizamos una placa de 96 pocillos y preparamos la recta patrón de BSA (albúmina sérica bovina), por duplicado. Esto se usa para generar una muestra patrón con mg de BSA en abscisas, y  $A_{562}$  en ordenadas. La recta fue considerada “confiable” si  $0.98 < R^2 < 1$ . La preparación de las muestras a cuantificar, también fue por duplicado. Las diluciones fueron de 1:20 para hígado y de 1:10 para intestino, usando buffer de lisis para no cambiar la composición. A continuación se colocaron 25  $\mu$ L de muestra o estándar +

200  $\mu\text{L}$  de BCA por pocillo. Luego se incubó 30 minutos a 37 °C, en estufa. Se dejó enfriar y se realizó la lectura de absorbancia en espectrofotómetro a 562 nm. Luego interpolamos los valores obtenidos en la recta patrón. Una vez conocida la concentración de proteínas en las muestras, se diluyó cada una para que quedara 2 mg de proteínas / mL, considerando que se coloca también 5 mL de buffer de carga 4 x.

### **2.7.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida, electrotransferencia e inmunotinción**

Se preparó el gel al 8 % de poliacrilamida y se cargaron 50-100  $\mu\text{g}$  de proteínas totales en tejido por carril. Luego se corrió el gel en Buffer de Corrida 1X durante 30 min a 70 V y 90 min a 120 V. Además, se cargó el standard de proteínas de 170 kDa. A continuación se transfirió a membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (9 cm x 6 cm) utilizando el equipo Trans Blot Turbo (BioRad) a 1.5 A constante durante 21 min. Y se bloqueó la membrana en solución de Bloqueo (Caseína 1 $\times$  en PBS 0.1 %) por un mínimo 3 h. Luego se incubó con los anticuerpos primarios: conejo anti-Actina (Sigma), dilución 1:3000 y ratón anti- cyp1a (Abcam), dilución 1:3000. Durante la noche a 4 °C con agitación suave. Se realizaron tres lavados con solución de lavado: primer lavado de 10 minutos, segundo y tercer lavado de 5 minutos. Acto seguido, se incubó simultáneamente con anticuerpos secundarios cabra anti-conejo IRDye 700DX Rockland (611-130-122) para ver Actina (Rojo) y burro anti-ratón IRDye 800 CW Rockland (610-731-124) para CYP1A (Verde), dilución 1:10000 en solución de anticuerpo, durante 40 min a temperatura ambiente con agitación suave. Por último se realizaron tres lavados con solución de lavado: primer lavado de 10 min, segundo y tercer lavado de 5 min y se reveló con Clarity<sup>TM</sup> Western ECL Blotting Substrate. Pesos moleculares esperados: Actina  $\sim$  42 kDa y CYP1A  $\sim$  55 kDa. Previamente, se realizaron los controles para determinar si tanto el anticuerpo primario como el secundario daban una banda inespecífica cuando se incuban bajo las condiciones estandarizadas. Para ello, se llevaron a cabo electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 %, en los que se sembraron 50  $\mu\text{g}$  de muestra, también por

duplicado. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a través de una electrotransferencia, utilizando el Trans-Blot Turbo device (BioRad), bajo las mismas condiciones indicadas arriba en el texto. Las membranas fueron bloqueadas en caseína 0.1 % en PBS 1X por 3 horas. Una membrana fue incubada con el anticuerpo primario overnight a 4°C, y otra membrana con el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente. Después de las incubaciones las membranas se lavaron con PBS Tween 0.1 % (Figura 2.7).



**Figura 2.7:** Escaneo de membranas Western blot para proteínas en muestras de hígado de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (dos réplicas). M indica la calle donde se sembró el marcador de peso molecular y en las calles 1 y 2 se sembraron réplicas de muestras. En las figuras a y b se observan los controles de anticuerpos secundarios. Los controles no se trataron con anticuerpo primario para demostrar la falta de reactividad cruzada del anticuerpo secundario. Solo Cabra anti-conejo IRDye 700DX Rockland para Actina (rojo) (a) y burro anti-ratón IRDye 800 CW Rockland para CYP1A (Verde) (b). En el c se observa el control del anticuerpo primario. Las transferencias de control no se trataron con anticuerpo secundario para mostrar la especificidad de la unión del anticuerpo primario al antígeno anticuerpo monoclonal de ratón anti-CYP1A (C10-7, Abcam) (c).

## 2.8. Actividades enzimáticas

En la siguiente sección se detallan los procedimientos realizados para llevar a cabo las mediciones enzimáticas de la Carboxilesterasas, Acetilcolinesterasa, Glutatión- S-transferasas y la Citocromo P450 1A.

### 2.8.1. Homogenatos

Para preparar los homogenatos a partir de los tejidos de hígado e intestino se procedió de la siguiente manera. Se pesó el tejido (aproximadamente 80-150 mg), se agregó 1 mL de buffer de homogenización (Tris/HCl 20 mM, EDTA 0.5 mM, pH 7.5) por cada 0.5 g de tejido y PSMF (concentración final 2 mM) como inhibidor de proteasas. Se utilizó un homogeneizador de teflón estéril o un homogeneizador eléctrico Omni 1000, a 20000 rpm. Se centrifugó a 12000 x g por 15 min, a 4 °C y se colectó el sobrenadante de cada muestra, luego se conservó en freezer a -20°C hasta las mediciones bioquímicas. Los homogenatos utilizados para medir la actividad de EROD fueron preparados con otro protocolo (se detalla en la sección 2.8.5) ya que las muestras se midieron en el laboratorio del Dr. Juan Guillermo Cárcamo Matus, del Instituto de Bioquímica y Microbiología, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

### 2.8.2. Actividad de Carboxilesterasas

La actividad de CE se determinó por duplicado utilizando p-nitro-fenil butirato (p-NPB) como sustrato, de acuerdo a Ferrari et al., (2007). Las reacciones se realizaron en buffer fosfato 100 mmol/L, pH 8.0, que contenía 5% de acetona y 1 mmol/L de p-NPB. La absorbancia se midió a 400 nm durante 1 min cada 10 s a 25 °C.

Se descongelaron las fracciones de sobrenadante de los homogenatos y se las mantuvo en hielo durante las mediciones. En cubeta de cuarzo, se agregaron 2.25 mL del buffer de determinación, 250  $\mu$ L de sustrato y 150  $\mu$ L de sobrenadante.

*Nota:* El volumen de sobrenadante se probó empíricamente de modo tal que la absorbancia inicial fuese menor que 0.850.

Se calculó la actividad CEs de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Act\ CE_s [nmol\ min^{-1}\ mg_{prot}^{-1}] = 1000 \times \frac{Abs}{min} \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{V_{total}}{V_{sob}} \times \frac{1}{[prot]}$$

Donde  $Abs/min$  es la pendiente de la curva,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar =  $18.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $V_{total}$  es el volumen total en la cubeta en mL ( $2.25 + 0.25 + 0.15$ ),  $V_{sob.}$  es el volumen de sobrenadante en la cubeta en mL ( $0.15 \text{ mL}$ ) y  $[prot]$  es la concentración de proteínas (en mg/mL), determinada por la técnica de Bradford. La multiplicación por 1000 es para para que las unidades finales sean nmol.

### 2.8.3. Actividad de Acetilcolinesterasas

La actividad AChE se midió por duplicado, de acuerdo con el método de Ellman et al., (1961), en Buffer fosfato 100 mM, pH 8. Se utilizó el cromóforo ácido 5,5-ditio-bis- (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) 0.2 mmol/L y el sustrato yoduro de acetil-tiocolina (ytac) 1.5 mmol/L. Se descongelaron las fracciones de sobrenadante del homogenato y se las mantuvo siempre en hielo durante las mediciones. En cubeta de cuarzo, se agregaron  $250 \mu\text{L}$  de DTNB,  $100 \mu\text{L}$  de ytac y  $150 \mu\text{L}$  de sobrenadante. Luego se procedió a medir a 412 nm durante 90 s, anotando las absorbancias cada 10 s. A continuación se graficó absorbancia en función del tiempo, se obtuvo la pendiente y se calculó la actividad AChE de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Act \ AChE_s [nmol \ min^{-1} \ mg_{prot}^{-1}] = 1000 \times \frac{Abs}{min} \frac{1}{\epsilon} \frac{V_{total}}{V_{sob}} \frac{1}{[prot]}$$

Donde  $Abs/min$  es la pendiente de la curva,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar =  $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $V_{total}$  es el volumen total en la cubeta en mL ( $2.25 + 0.25 + 0.1 + V_{sob}$ ),  $V_{sob.}$  es el volumen de sobrenadante en la cubeta en mL ( $0.1-0.2 \text{ mL}$ ) y  $[prot]$  es la concentración de proteínas (en mg/mL), determinada por la técnica de Bradford. La multiplicación por 1000 es para para que las unidades finales sean nmol.

*Nota:* El volumen de sobrenadante debe probarse empíricamente de modo tal que la absorbancia inicial sea menor que 0.850.



#### 2.8.4. Actividad de Glutación-S-transferasa

Fue medida con el método Habig et al., (1974) con algunas modificaciones. En cubetas UV, se mezclaron 970  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 100 mM a pH 6.5, 5  $\mu\text{L}$  de solución de GSH (100 mM en buffer fosfato a pH 6.5) y 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de la muestra. Luego de mezclar suavemente, se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de 1-cloro-2,4 dinitrobenceno (CDNB) (100 mM disuelto en etanol) para iniciar la reacción, se volvió a mezclar e inmediatamente se registró la absorbancia a 340 nm, cada 30 segundos, durante 5 min a 25 °C. A esta longitud de onda se detecta el producto de la conjugación del CDBN con GSH (2,4-dinitrofenil-S-glutación; DNP-SG). Cada muestra se evaluó por duplicado. Se calculó la pendiente de absorbancia en función del tiempo y la actividad enzimática específica de GST se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$Act\ GST [nmol\ min^{-1}\ mg_{prot}^{-1}] = 1000 \times \frac{Abs}{min} \frac{1}{\epsilon} \frac{V_{total}}{V_{sob}} \frac{1}{[prot]}$$

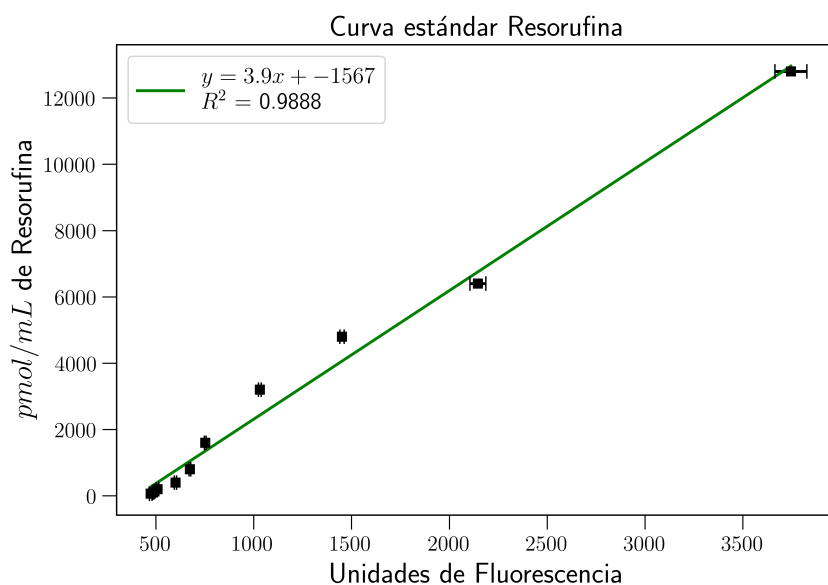
Donde  $Abs/min$  es la pendiente de la curva,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar =  $9.6\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ ,  $V_{total}$  es el volumen total en la cubeta en mL (0.970 + 0.05 + 0.05 + 0.20),  $V_{sob.}$  es el volumen de sobrenadante en la cubeta en mL (0.20 mL) y  $[prot]$  es la concentración de proteínas (en mg/mL), determinada por la técnica de Bradford. La multiplicación por 1000 es para que las unidades finales sean nmol.

#### 2.8.5. Actividad de 7-etoxi-resorufina-O-desetilasa (EROD)

Las muestras para actividad EROD fueron conservadas en PBS Triton X-100 y en Nitrógeno líquido hasta su análisis. La actividad de EROD se midió de acuerdo con Kennedy y Jones (1994). Este método se basa en el aumento de la fluorescencia en el medio de reacción debido a la transformación de 7-etoxi-resorufina (7-ER, sustrato estándar) en resorufina. Se homogeneizaron 150 mg de tejido hepático o intestinal con un homogeneizador de teflón estéril en CaHBSS (solución salina equilibrada de Hank con calcio; Gibco®) pH 7.8, se sonicó dos veces durante 15-30 s en hielo y luego se centrifugó a 14.000

x g durante 5 min a 4 °C. La solución de ensayo (Volumen final de 150  $\mu\text{L}$ ) contenía 30  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, 6.25  $\mu\text{mol/L}$  7-ER (Sigma), 10  $\mu\text{mol/L}$  dicumarol (Sigma) y 1 mmol/L NADPH (Sigma) en CaHBSS pH 7.8. La reacción se realizó a 30 °C en una microplaca de 96 pocillos con fondo plano negro. Cada muestra se analizó por triplicado. La fluorescencia se leyó cada 42 s durante 6 min con un espectrofotómetro de fluorescencia (BioTek Synergy <sup>TM</sup> HT Multi-Mode Microplate Reader), a longitudes de onda de excitación y emisión de 530 y 620 nm, respectivamente. La actividad de EROD se expresó como pmol de resorufina mg proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, usando patrones de resorufina para calibración. La curva de calibración se hizo con nueve replicas que luego fueron promediadas (Figura 2.8).

El contenido de proteína total se determinó usando el kit de ensayo de proteína BCA Pierce <sup>TM</sup> (ídem ensayo de expresión de proteínas).



**Figura 2.8:** Curva de calibración de resorufina a concentraciones conocidas. Nueve réplicas por medida.

### 2.8.6. Medición de proteínas por Bradford

La proteína total para los ensayos GST, AChE y CE se midió por el

método de Bradford (1976). El mismo está basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interactúa con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Experimentalmente se mide la absorbancia a 595 nm.

El colorante Azul Brillante de Coomasie G-250 (100mg) fue disuelto en 50 mL de etanol 95 %. A esta disolución se le añadieron 100 mL de ácido fosfórico 85 % p/v. La solución resultante se diluyó llevándola hasta un litro de volumen final. La concentración final fue 0.01 % p/v de azul, 4.7 % p/v de etanol y 8.5 % p/v de ácido fosfórico. Además, se preparó una solución estándar de seroalbúmina bovina (BSA) de 0.1 mg/mL para realizar la correspondiente recta de calibración de 0-0.1 mg BSA (Figura 2.9).

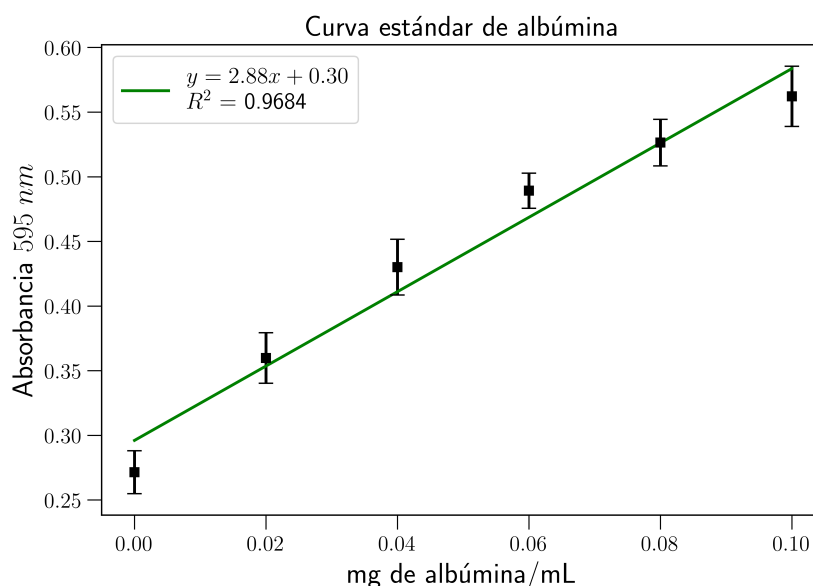
En cada cubeta, se agregaron 3  $\mu$ L de los sobrenadantes de hígado y 5  $\mu$ L en el caso de los sobrenadantes de intestino, y 1 mL de reactivo Bradford. Luego de mezclar e incubar 10 minutos, se tomó una lectura de absorbancia a 595 nm. Los resultados se expresaron como mg de proteína mL<sup>-1</sup> y fueron calculados como:

$$\frac{mg\ proteina}{mL} = [(Abs_m - Abs_b) \cdot A \pm B] \cdot \frac{V_{tot}}{V_{alícuota}}$$

Donde  $A$  es la pendiente de la recta de calibración,  $B$  la ordenada al origen,  $Abs_m$  la absorbancia de la muestra,  $Abs_b$  es la absorbancia del blanco,  $V_{tot}$  es el volumen total en la cubeta y  $V_{alícuota}$  es el volumen de la alícuota de sobrenadante de la muestra.

## 2.9. Transporte a través del epitelio intestinal

Para medir la actividad de transportadores tipo ABCC, se utilizó 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), compuesto descrito como sustrato específico de dichos transportadores en mamíferos (Evers et al., 2000; Gotoh et al., 2000, Mottino et al., 2001), y una técnica puesta a punto en nuestro laboratorio



**Figura 2.9:** Curva estándar de albúmina a concentraciones conocidas. Cinco réplicas por medida.

para medir el transporte de microcistina-LR en intestino de Trucha arcoíris y pejerrey patagónico (Bieczynski et al., 2014). El CDNB es permeable a la membrana celular y una vez dentro de la célula es conjugado con GSH, en una reacción catalizada por GST. El producto resultante de la conjugación, 2,4-dinitrofenil-S-glutatión (DNP-SG), es transportado activamente fuera de la célula por proteínas ABCC. Se utilizaron las tres preparaciones intestinales descritas en la sección 2.4.1. En las preparaciones de intestino evertido se expone hacia el baño la cara apical (luminal) del epitelio intestinal, donde se encuentra la proteína ABCC2, En este sistema se estudia la excreción de compuestos hacia la luz del intestino. Los segmentos no-evertidos permiten observar el transporte desde el espacio intracelular hacia el lado serosal del epitelio intestinal (transporte basolateral, hacia el medio interno). Y las tiras intestinales permiten realizar muchas determinaciones utilizando el mismo segmento de intestino pero sin discriminar entre transporte apical y basolateral.

En primer lugar se procedió a preparar la Solución fisiológica Cortland

( $\text{NaHCO}_3$  5 mmol/L, glucosa 5.55 mmol/L, pH 7.4) (Daborn et al., 2001). Además, se preparó la solución de CDNB, a partir de una solución madre de 200 mmol/L (8.1 mg en 200  $\mu\text{L}$  de DMSO o etanol), 100  $\mu\text{L}$  de solución madre fueron disueltos en 100 mL de solución Cortland, obteniendo una solución de trabajo de 200  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). Por último se preparó una solución madre de Clorpirifos de 0.02 mg /mL en acetona. De dicha solución se tomaron 30  $\mu\text{L}$  y se añadieron a 30 mL de la solución de trabajo CDNB/Cortland, formando una solución de 20  $\mu\text{g}/\text{L}$  de Clorpirifos en CDNB /Cortland con el 0.1 % del solvente (acetona). A partir de esta última solución, se obtuvieron diluciones de 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  y 3  $\mu\text{g}/\text{L}$ . Se colocaron las preparaciones intestinales, previamente pesadas, en tubos de vidrio con un volumen final de 5 mL de la solución de exposición correspondiente. Se mantuvo una aireación suave y constante (preservando la integridad de los tejidos) y se incubó durante 10 min, antes de las mediciones. Cada 10 min (en el caso de las tiras) y cada 5 min (en el caso de los segmentos evertidos y no evertidos), se recogieron alícuotas de 1.5 mL de solución del baño y se determinó la absorbancia a 340 nm con espectrofotómetro. Después de la medición, las alícuotas se devolvieron al baño para mantener el volumen constante. A partir de los datos obtenidos se procedió a graficar Absorbancia en función del tiempo y de dichos gráficos se obtuvo una pendiente. De la misma forma se registró la absorbancia de las soluciones empleadas pero sin preparados de intestino (blanco de soluciones) y de sacos intestinales en solución salina sin CDNB (blanco de tejido). Se hicieron controles de acetona y agua para verificar un posible efecto del solvente. La tasa de transporte de DNP-SG, de cada preparación, se calculó a partir de la pendiente de absorbancia acumulativa en función del tiempo, un coeficiente de extinción de  $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y 1 cm de paso de luz, y se refirió a la masa de tejido. La fórmula utilizada para calcular los nmol DNPSG  $\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$  fue la siguiente:

$$\text{nmol DNPSGg}^{-1}\text{min}^{-1} = \frac{((\text{Abs}_m/\text{min}) - (\text{Abs}_b/\text{min})) \cdot V_{\text{baño}}}{9.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ co } g}$$

Donde  $g$  son los gramos de tejido,  $(\text{Abs}_m/\text{min})$  es la pendiente de absor-

bancia en función del tiempo, Blanco es la pendiente ( $Abs_b/min$ ) del control con solución CDNB, sin tejido,  $V_{baño}$  es el volumen del baño del tejido (5000  $\mu$ L) y  $co$  es el camino óptico (1 cm).

## 2.10. Tinción hematoxilina-eosina

A las muestras de hígado de la hipótesis I conservadas en RNAlater (*Life-Technologies*), se las fijó en una solución de formol al 10%. Se confeccionaron preparados histológicos mediante la técnica de inclusión en parafina y tinción con azul de toluidina y hematoxilina eosina. Los análisis fueron realizados por el Dr. María José Naverrete, en el Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

Los cortes, de un espesor de 3-5  $\mu$ m, se colorearon durante 12-15 minutos con hematoxilina ácida de Ehrlich. Se colocaron en agua destilada con unas gotas de una solución acuosa de carbonato de litio (solución saturada) durante 5-10 minutos y se contracoloraron en una solución acuosa de eosina al 0.2% durante 1 minuto. Después de deshidratar y tratar con xilol, los cortes se montaron en un bálsamo de Canadá neutro para su examen microscópico. Los núcleos se colorean azul oscuro y el citoplasma se colorea rojo rosado. El criterio para los cambios histopatológicos fue semi-cuantitativo tomado de Topal et al. (2015) con modificaciones. Después del examen general para los aumentos de 4x, 20x y 40x se eligieron diez campos microscópicos al azar. Los puntajes se derivaron de forma semicuantitativa de acuerdo con la severidad y la extensión, informándose de la siguiente manera: ninguno: - (sin lesión), leve: + (de 1-3 campos con lesiones), moderado: ++ (de 4-7 campos con lesiones), +++ severo: (de 8-10 campos con lesiones).

## 2.11. Peroxidación lipídica

La cuantificación de los peróxidos lipídicos, a través de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de Beuge y Aust (1978), con ligeras modificaciones. En esta técnica,

los productos de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, tales como peróxidos lipídicos, entre los que se encuentra el malondialdehído (MDA), reaccionan con el ácido tiobarbitúrico en medio ácido, a alta temperatura, para dar un compuesto MDA-TBA de color rosado, que puede medirse en espectrofotómetro a 532 nm.

Para esta técnica se preparó la siguiente solución de reacción: TCA 15 % m/v, TBA 0.375 % m/v, HCl 2 % v/v, BHT 6.8 mmol/L disuelto en etanol. Cada muestra se mezcló con dicha solución de reacción y se incubó a 95 °C, durante 15 min en baño maría. Luego de dejar enfriar se centrifugó a 12000 x g durante 10 min y la absorbancia del sobrenadante se leyó a 532 nm. Los resultados se expresaron como nmol MDA mg proteína<sup>-1</sup>. Cada muestra se midió por triplicado. La concentración de MDA se estimó como:

$$\text{nmol MDA}(\text{mg proteina})^{-1} = \frac{(Abs_m - Abs_b) 1}{co} \frac{V_{tot}}{\epsilon V_{\text{alícuota}}} \frac{1}{[prot]}$$

Donde  $Abs_m$  es la absorbancia de la muestra,  $Abs_b$  es la absorbancia del blanco.  $V_{tot}$  es el volumen total en la cubeta y  $V_{\text{alícuota}}$  es el volumen de la alícuota de sobrenadante de la muestra,  $[prot]$  es la concentración de proteínas en la otra fracción de sobrenadante (en mg/mL<sup>-1</sup>),  $co$  es camino óptico = 1 cm,  $\epsilon$  = Coeficiente de extinción molar del complejo MDA-TBA: 156 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## 2.12. Análisis de Datos

Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS 11.5 (Inc., Chicago, Illinois, EE. UU.), bajo la licencia de la Universidad Nacional de Luján, Argentina. Todos los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza utilizando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Los datos de expresión de proteínas se normalizaron mediante la transformación logarítmica de  $(x + 1)$ . Las actividades enzimáticas, expresión de ARNm y los datos de expresión de proteína CYP1A (CYP1A/ $\beta$ -actina) se analizaron

por ANOVA de dos vías. Las variables explicativas en el ANOVA de dos vías fueron la exposición a WAF *in vivo* (control del pre-tratamiento vs. WAF) y la exposición a CLF *ex vivo* (control solvente vs. CLF). Los datos de actividad enzimática también fueron analizados por contrastes ortogonales ad hoc. Cuando la interacción entre factores dio significativa para el ANOVA, se realizaron comparaciones con el test de Tukey HSD.



**Tabla 2.3:** Detalle de los pares de cebadores y sus amplicones usados en el estudio de la hipótesis I y en la hipótesis II (parte b).

	Descripción	Gen	Secuencia 5' → 3'	Amplicon (pb)	Especie	Referencia
1	$\beta$ -actina	FW	TGAAGTGTGACGTGGACATCCGTA	108	OM/OK/SS	Cárcamo et al., 2011
		RV	AGGTGATCTCCTTTCATCTCTGT			
2	Glutatio peroxidasa	FW	GAACCTGGCACTGAAGCTCAGAT	157	SS/OK	XM.014148735.1
		RV	TGCCATTTCCAGTAAGCCTTTCC			
3	Superóxido dismutasa	FW	AGACCAATGGTGAATCCATGAGAAG	115	OM/OK/SS	NM.001123587.1
		RV	GGCAATGCCAATAACTCCACA			
4	Interleucina 1 $\beta$	FW	CAAGTGCCTCAGGGTCT	101	OM/OK/SS	XM.020475860.1
		RV	CGCCACCCTTTAAACCTCTCC			
5	Interleucina 4	FW	CAACCCAAACAAAGATGAAGACGG	135	OM/OK/SS	NM.001246341.1
		RV	GCAGGCAGAGTTCAGAGTCAAAT			
6	Interleucina 6	FW	GGAGGAGTTTCAGAAAGCCCG	101	OM/OK/SS	XM.014143031.1
		RV	TGTTGGTGGAGCAAAAGTCT			
7	Interleucina 8	FW	TGAGAGGGAAAGCAGAGCAA	135	OM/OK/SS	XM.020486762.1
		RV	GCGCTGACATCCAGAGAAAT			
8	Interleucina 10	FW	CGTATGGACAGCATCCTGAAAGTT	119	OM/OK/SS	XM.014186180.1
		RV	CGTGAAGATGTTCCGATGGAGT			
9	Interleucina 12	FW	TCTACCTACAGACATGTCAGCC	62	OM/OK/SS	XM.021592479.1
		RV	ATCCATCACCTGGCACTTCATCC			
10	Factor de necrosis tumoral	FW	GGGAGGATACCACTCTCT	125	OM/OK/SS	NM.001124357.1
		RV	TCGGACTCAGCATCACCGTA			
11	Receptor de progesterona LOC 100846969	FW	CTCCCGTAGTGGTAGTTTTGGAA	144	SS/OK	NM.001252363.1
		RV	GGTCAGAGCGGTCATAAACGGTT			
12	Glutatio reductasa	FW	TCCCAGCTCCTTATGATGAGTCA	138	OM/OK/SS	XM.014198060.1
		RV	TGTGAGGGTGCAGGTGCTATFG			
13	Glumatil trasferasasa Gamma5, variante de transcripción X1	FW	CCT GGT GAA AGC AAC ATC ACT C	128	SS	XM.014128667.1
		RV	CTG CTC CTT GTT CTG CAA TGG T			
14	Caspasa9	FW	TGG GGC GTT CCC AGC TTT AAT A	147	SS/OM	NM.001124647.1
		RV	GAG TAA ACT GGC AAA GGC CTA ACG			
15	Liver X receptor, grupo II, miembro 3 (nr1h3), Variante de transcripción X8	FW	AGT GCC CAG TAT TCG TGC AAG AAC	122	SS	XM.014174759.1
		RV	AGA ACG CAT TGC TCC AGC AT			

OS-*Oncorhynchus mykiss*, SS-*Salmo salar*, OK-*Oncorhynchus kisutch*

**Tabla 2.3:** Detalle de los pares de cebadores y sus amplicones usados en el estudio de la hipótesis I y en la hipótesis II (parte b).

	Descripción	Gen	Secuencia 5' → 3'	Amplicon (pb)	Especie	Referencia
16	Caspasa3	CAS 3	FW TGC AAC GTT TGG GGT ACA ACG TGA RV TGA CTG GCT GTG GTT GTC TTG A	101	SS/OM	NM.001246335.1
17	Colágeno alfa 2 (I)chain LOC 106570450	Colageno	FW CCG GTT CAC TTT CAA CGT TCT GGA RV CCA AAG GTG CAA TGT CGA GGA T	125	SS	XM.014142824.1
18	Receptor de aril hidrocarburos beta (LOC100135875)	Ahr	FW GGA TGC CAC TGA GTT CCA AAC CAA RV AAT GCC TGG TCT ATG GGT ACC TGA	147	OM/SS	NM.001124252.1
19	Receptor de andrógenos beta (Ar-beta)	AR	FW TAA TGC GGG ACA TGA CCA TTG C RV CCT TTG GCC CAC TTG ACC ACT TT	108	OM	NM.001124185.1
20	Receptor de Mineralocorticoides (LOC 106610215)	MR	FW AGA GGA CCA AAT CAC CCT GAT CCA RV TAG AGC ATC TGT CCG TTGTTG T	99	OM/SS	XM.014209420.1
21	Receptor de Estrógenos	RE	FW ACT CTG GTG CCT TCT CCT TCT GTT RV ACA GAG GCT CCT GAA TGG CTG AT	127	OM/SS	NM.001123592.1
22	Citocromo P450 1A	CYP1A	FW CCC ATG CCG AAT ACG AGC ACT TT RV GAGAGCTGTGCTATCCAATGCCAGT	134	SS	NM.001123687.1
23	Multidrug resistance-associated protein 2	ABCC2/ MRP2	FW ATGCTGGGAAGATCGTGAGTTTG RV GAGAGCTGTGCTATCCAATGCCAGT	142	OM/OK	XM.021604527.1
24	Fosfatasa Alcalina	FA	FW TAITTCATCCGTCCTCTCGACCTA RV AGTGCCTCCGGGAAGTATGTACAA	195	SS	XM.014166577.1
25	Caspasa 1	CAS 1	FW AGATGCCGACCAAAACACAGA RV ATATGGGCTCCCTTATTTCCTC	124	OM/SS/OK	XM.021582336.1
26	Caspasa 8	CAS 8	FW TTCACGAGGCAATCCTGTAAGAC RV CCACTTTAAACCCCAACCTGGAGA	188	OM/OK	XM.021588594.1
27	Traslocador del receptor nuclear de aril hidrocarburos	ARNT	FW ACCTGAATGCAGAGCAATCCCA RV AGGTTGATTGAGGAAGAGCTGACA	113	OM	NM.001124710.1
28	Citocromo P450 2M1	CYP2M1	FW GCTTATATACACTACCTGCTTTG RV CCGCTAAGTCCTTTGCATGTATAGAT	194	OM	OMU16657/ Matsuo et al., 2008
29	UDP-glucuronosil transferasa	UGT	FW ATAAGGACCGTCCCATCGAG RV ATCCAGTTGAGGTCGTGAGC	113	SS	Mortensen and Arikwe 2007
30	Citocromo P450 2K1	CYP2K1	FW CTCACACCACAGCCGAGAT RV CTTGACAAAATCCCTCCCTGCTCAT	164	OM	AF0455053/ Matsuo et al., 2008
31	Citocromo P450 3A27	CYP3A27	FW TCTGCTGATGCCAAAGGA RV CGTTTGGACTTTCAGAGTGGTA	110	OK	Matsuo et al., 2008
32	Flavina mono-oxigenasa 1	FMO1	FW GGAAGTTCAAGGAAGTTTCTGAGCC RV CCGCACACTGCTTGGAAAGTGGAT	212	OK	Lavado et al., 2013
33	Receptor de pregnano X	PXR	FW GGGCATCTGGGAGTGTGGTC RV GTAGGTTCTCAGGTGTAGTGG	116	OM	Wassmur et al., 2010
34	Glutatión S-transferasa	GST	FW AGCTGCTCCCAGCTGATCC RV CAAACCCAGCCACATCATTAATC	246	OM	Cárcano et al., 2014
35	Glicoproteína P	ABC11/Ppg	FW ACGTGGCTCCCTGAAAGTIG RV GCGTTGGCTCCCTTAGCAGC	151	OM	Carcamo et al., 2011

# Capítulo 3

## Resultados y discusión hipótesis I

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos de los experimentos realizados para poner a prueba la hipótesis I.

“Hidrocarburos aromáticos, presentes en la fracción soluble de petróleo (WAF), activan la vía del receptor AHR en el hígado de la trucha arcoíris, induciendo la expresión y la actividad de la enzima CYP1A con el consiguiente aumento de la toxicidad de CLF”.

### 3.1. Resultados expresión de ARNm (q-PCR)

En esta sección se muestran los resultados de la expresión génica de los 27 genes analizados bajo los cuatro grupos experimentales descritos anteriormente (Sección 2.2): Pretratamiento de exposición a WAF *in vivo* (y su control correspondiente) y un tratamiento posterior del hígado expuesto a Clorpirifos *ex vivo* (y su control correspondiente). A continuación se agrupa a los genes analizados según su funcionalidad en el estudio, genes de la vía AhR (Sección 3.1.1), genes de otros receptores nucleares (Sección 3.1.2), genes de respuesta inmune (Sección 3.1.3), genes de respuesta a estrés (Sección 3.1.4), genes de otras enzimas de detoxificación y defensa (Sección 3.1.5 y

genes de proteínas estructurales (Sección 3.1.6). En la tabla 3.1 se muestran los resultados resumidos.

### 3.1.1. Genes de la vía AhR

#### ■ Receptor de aril hidrocarburos (*AhR*)

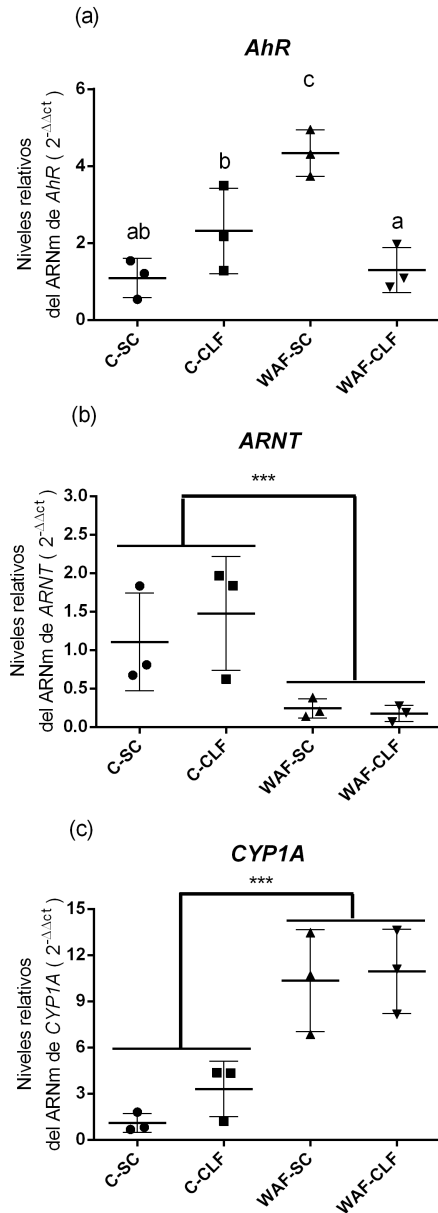
La expresión del *AhR* tuvo un incremento significativo en el hígado de los peces pretratados con WAF. Aunque no se observó efecto de la exposición individual a CLF, se observó un efecto de interacción significativa de las exposiciones consecutivas de WAF y CLF para la expresión génica del receptor (ANOVA de dos vías:  $F = 6.896$ ;  $P < 0.05$  para el efecto WAF;  $F = 24.7$ ;  $P < 0.001$  para interacción). Las comparaciones múltiples de Tukey mostraron que solo para los peces del grupo WAF-C, la expresión del ARNm de *AhR* se indujo significativamente (aproximadamente 4 veces con respecto a C-SC,  $P < 0.01$ ). No se observó incremento en la expresión en los peces del grupo WAF-CLF, que mostró una expresión de *AhR* incluso inferior a la de C-CLF ( $P < 0.05$ ) (Figura 3.1b).

#### ■ Traslocador del Receptor Nuclear de aril hidrocarburos (*ARNT*)

La expresión de *ARNT* en los hígados de peces pretratados con WAF se redujo, drásticamente, 5 veces respecto a los peces control (ANOVA de dos vías:  $F = 14.34$ ;  $P < 0.001$  para el efecto WAF). No hubo efecto de la exposición a CLF ni efecto de interacción a las exposiciones consecutivas de ambos compuestos tóxicos (Figura 3.1c).

#### ■ Citocromo P450 subfamilia 1A (*CYP1A*)

La expresión de *CYP1A* se incrementó en los hígados de peces pretratados con WAF en comparación con peces no pretratados (ANOVA de dos vías:  $F = 38.69$ ;  $P < 0.001$  para el efecto WAF). Por otro lado, no hubo efectos de la exposición a CLF ni tampoco interacción. Los hígados de los peces pre-tratados con WAF y posteriormente expuestos al control de solvente (WAF-SC) o a CLF (WAF-CLF) mostraron incrementos similares (aproximadamente 10 veces) en la expresión de *CYP1A* con respecto a C-SC. (Figura 3.1a).



**Figura 3.1:** Expresión ARNm de los genes involucrados en la vía directa de AhR, en peces expuestos a diferentes compuestos tóxicos. (a) AhR (b) ARNT y (c) CYP1A. Efecto de WAF para Anova de dos vías, \*\*\* $P < 0.001$ . Las letras minúsculas indican diferencias entre las medias de los grupos (comparaciones múltiples de Tukey). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

### 3.1.2. Genes de otros receptores nucleares

#### ■ Receptor de andrógeno (*AR*)

Se observó una interacción significativa de las exposiciones consecutivas de WAF y CLF para la expresión génica del AR ( $F= 172.6$ ;  $P < 0.0001$ ). Las comparaciones múltiples de Tukey mostraron que en los peces del grupo WAF-SC la expresión de AR se incremento significativamente (aproximadamente 8 veces con respecto al grupo C-SC,  $P < 0.0001$  y también respecto al otro grupo de pretratado WAF-CLF,  $P < 0.001$ ) (Figura 3.2a).

#### ■ Receptor de Progesterona (*PR*)

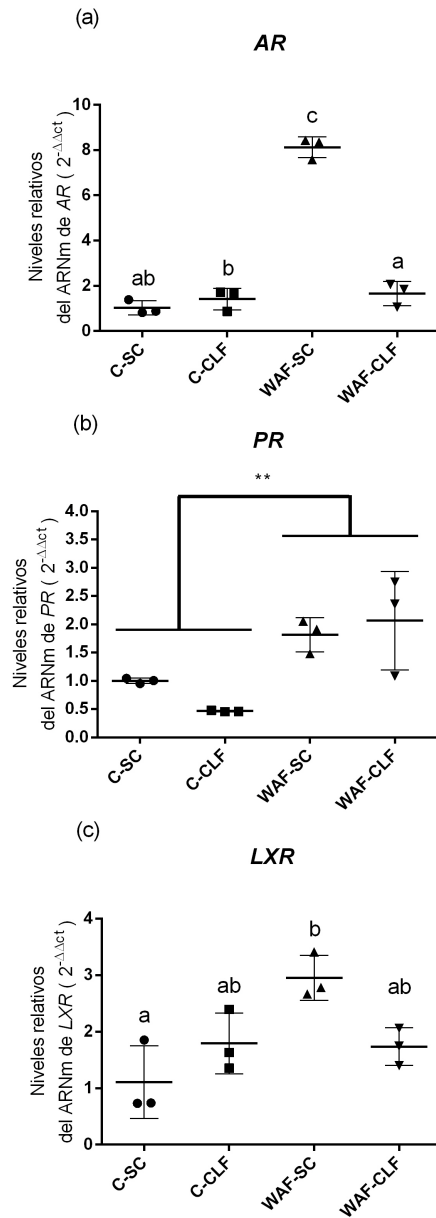
La expresión del *PR* tuvo un incremento significativo en los peces pretratados con WAF (ANOVA:  $F = 20.61$ ;  $P < 0.01$ ). Por otro lado, no hubo efecto de su expresión por el tratamiento de CLF y tampoco efecto de interacción a las exposiciones consecutivas de WAF y CLF (Figura 3.2b).

#### ■ Receptores de estrógeno (*RE*) y Mineralocorticoides (*MR*)

La expresión de estos receptores no mostró efecto significativo con ningún tratamiento, teniendo valores similares a los controles. Ni la exposición a WAF *in vivo* ni la posterior exposición *ex vivo* de secciones de hígado a CLF causaron algún efecto sobre la expresión.

#### ■ Receptor X de hígado (*LXR*)

La expresión de *LXR* (Liver X receptor) tuvo un efecto de interacción significativa ( $F = 11.16$ ;  $P < 0.01$ ) a las exposiciones consecutivas de ambos compuestos tóxicos. Las comparaciones múltiples de Tukey mostraron que solo para los peces del grupo WAF-SC, la expresión de ARNm de *LXR* se indujo significativamente (aproximadamente 3 veces con respecto a C-SC,  $P < 0.01$ ) (Figura 3.2c).



**Figura 3.2:** Expresión de ARNm de genes de receptores nucleares en peces expuestos a diferentes compuestos tóxicos (a) Receptor de Andrógenos (AR) (b) Receptor de progesterona (PR) y (c) Receptor X de hígado (LXR). Efecto de WAF para Anova de dos vías,  $**P < 0.01$ . Las letras minúsculas indican diferencias entre las medias de los grupos (comparaciones múltiples de Tukey). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

### 3.1.3. Genes de respuesta inmune

- ***TNF- $\alpha$***

La expresión génica del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  tuvo un incremento significativo en los hígados expuestos a factor CLF (Anova:  $F= 7.066$ ;  $P < 0.05$ ). No hubo efecto de interacción entre ambos compuestos tóxicos ni efecto al pretratamiento con WAF (Figura 3.3 a).

- ***IL-4 e IL-1 $\beta$***

La expresión génica de las interleucinas *IL-4* e *IL-1 $\beta$*  no tuvo efecto significativo para ninguno de los compuesto tóxico estudiados (Figura 3.3 b y c respectivamente).

- ***IL-6***

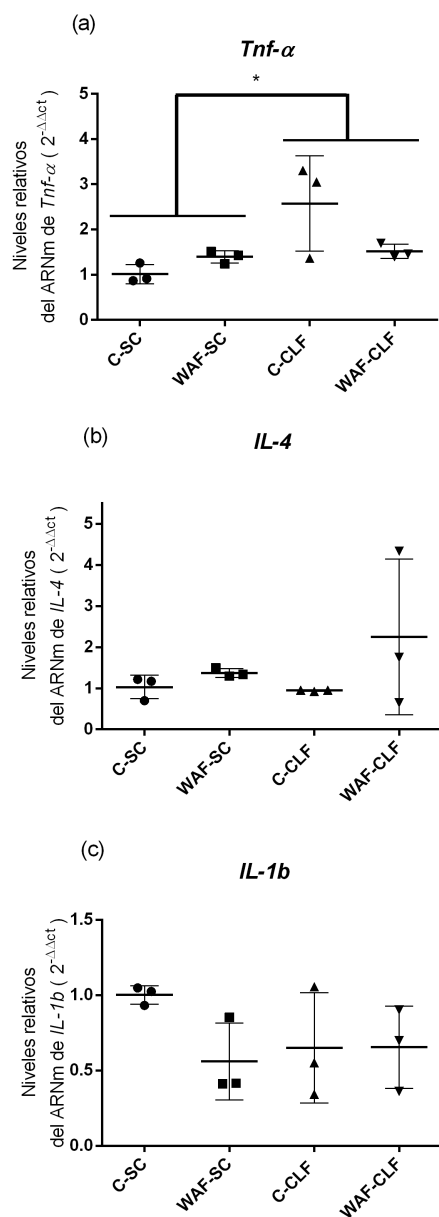
La expresión génica de *IL-6* se incrementó significativamente en los peces expuestos a WAF (Anova:  $F = 47.83$ ;  $P < 0.0001$ ), y también en los hígados expuestos a CLF (Anova de dos vías:  $F = 12.16$ ;  $P < 0.01$ ). Sin embargo, no hubo efecto de interacción de ambos compuestos tóxicos, solo aditividad (Figura 3.4a).

- ***IL-8 e IL-10***

La expresión génica de las interleucinas *IL-8* e *IL-10* tuvo un efecto significativo para los peces expuestos a WAF (Anova:  $F= 12.35$ ;  $P < 0.01$  y  $F= 6.303$ ;  $P < 0.05$ , respectivamente). *IL-8* tuvo un incremento en su expresión de entre 1 y 3 veces en los peces que fueron pretratados con WAF en relación a los que no. *IL-10* tuvo un incremento más moderado de su expresión, en los peces pretratados con WAF, de entre 0.8 a 1.5 veces, aunque también significativo. (Figura 3.4b,c).

- ***IL-12***





**Figura 3.3:** Expresión de ARNm de genes en peces expuestos a diferentes compuestos tóxicos (a) Factor de necrosis tumoral alfa (b) Interleucina 4 y (c) Interleucina 1 $\beta$ . Efecto de CLF, \* $P < 0.05$ . Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

La expresión génica de *IL-12* no tuvo efectos individuales de las exposiciones a WAF y CLF, sin embargo se observó un efecto de interacción significativa de las exposiciones consecutivas de WAF y CLF (Anova:  $F = 13.27$ ;  $P < 0.01$ ). Las comparaciones múltiples de Tukey mostraron que en los peces del grupo WAF-CLF la expresión del ARNm de *IL-12* se indujo aprox. 8 veces con respecto a los peces del otro grupo pre-tratado con WAF (WAF-SC). Por otro lado, las expresiones génicas en los peces del grupo WAF-CLF no tuvieron diferencias significativas con los dos grupos de peces no pre-tratados, mientras que los peces del grupo WAF-SC tuvieron una reducción de 4.5 veces con respecto a los del grupo control C-SC, pero no resultó significativa (Figura 3.4d).

### 3.1.4. Genes de respuesta a estrés

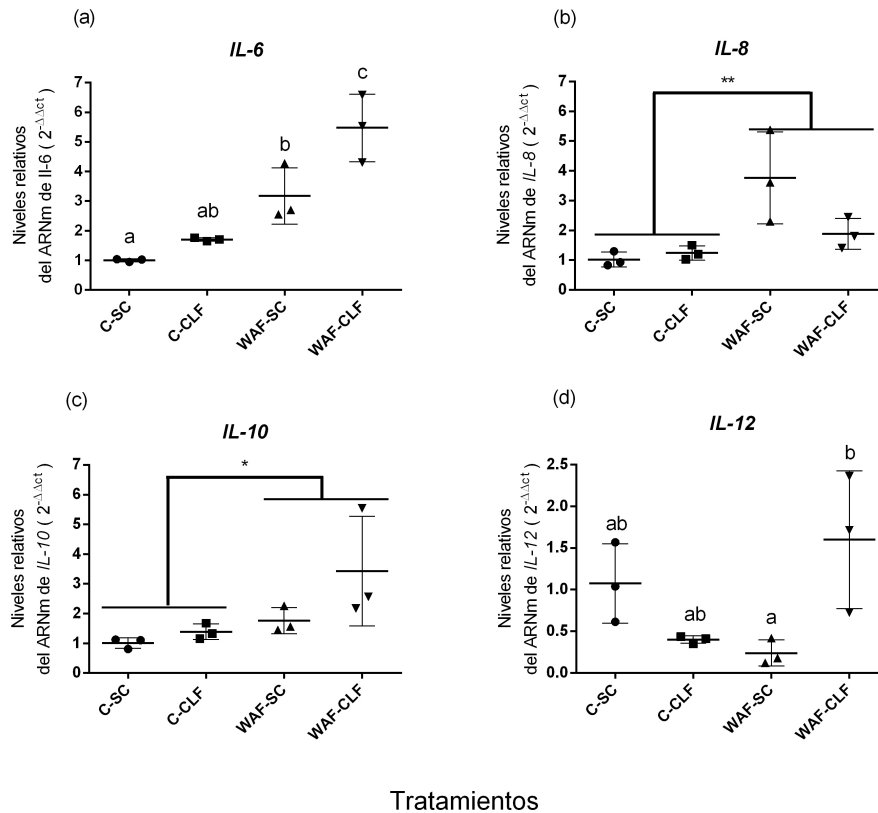
#### ■ *Caspasa 1*

La expresión génica de la *Caspasa 1* no tuvo efectos individuales de las exposiciones a los compuestos tóxicos. Sin embargo, hubo efecto de interacción de las exposiciones consecutivas de WAF y CLF (Anova:  $F = 18.45$ ;  $P < 0.01$ ). Las comparaciones múltiples de Tukey mostraron que en los peces del grupo C-CLF la expresión de la Caspasa 1 se redujo a la mitad significativamente con respecto a los peces del grupo C-SC. Sin embargo, los peces de los grupos pretratados con WAF no tuvieron diferencias significativas con el grupo C-SC o entre ellos (Figura 3.5a).

#### ■ *Caspasa 3*

La expresión génica de la *caspasa 3* tuvo un incremento significativo para los efectos de la exposición a CLF (Anova:  $F = 7.869$ ;  $P < 0.05$ ). Por otro lado, no se observó efecto de la exposición a WAF ni tampoco interacción (Figura 3.5b).

#### ■ *Caspasa 9*



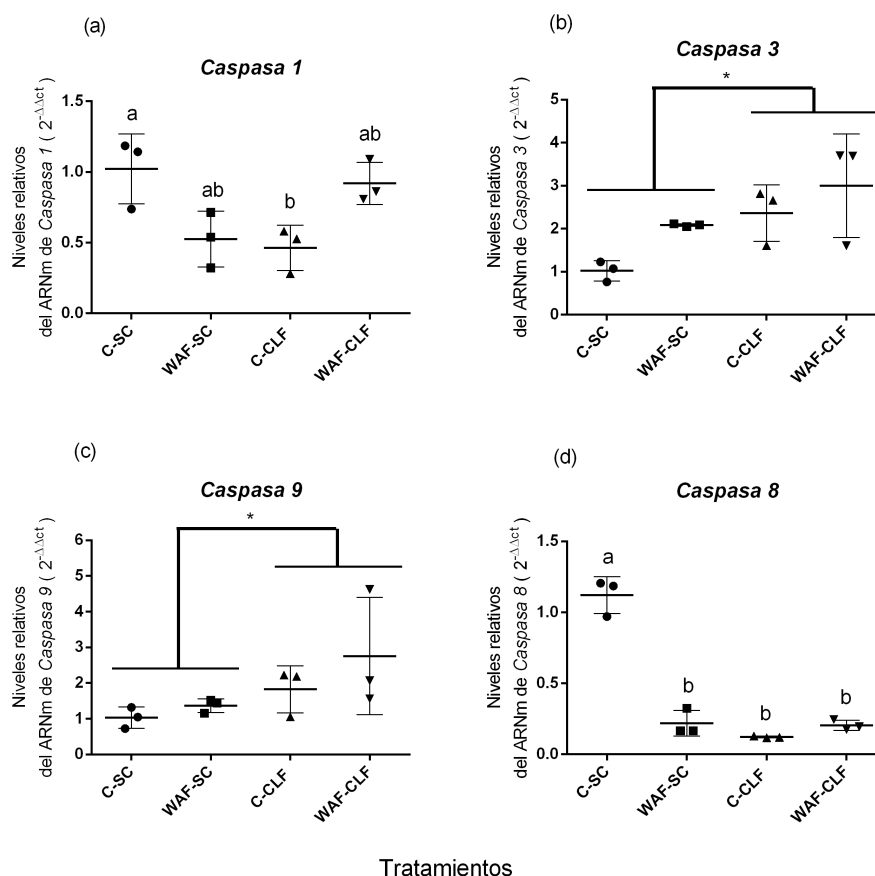
**Figura 3.4:** Expresión de ARNm de genes de interleucinas en peces expuestos a diferentes compuestos tóxicos (a) Interleucina 6 (b) Interleucina 8, (c) Interleucina 10 y (d) Interleucina 12. Efecto de WAF,  $**P < 0.01$  y  $*P < 0.05$ . Las letras minúsculas indican diferencias entre las medias de los grupos. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

La expresión génica de la *caspasa 9* tuvo un incremento significativo en los hígados expuestos a CLF (Anova:  $F = 4.199$ ;  $P < 0.05$ ). No se observó efecto de su expresión en peces expuestos a WAF y tampoco efecto de interacción en las exposiciones consecutivas a ambos compuestos (Figura 3.5c).

#### ■ *Caspasa 8*

La expresión de la *Caspasa 8* mostró un efecto de interacción significativa ( $F = 108.6$ ;  $P < 0.0001$ ) a las exposiciones consecutivas de ambos compuestos tóxicos. Las comparaciones múltiples de Tukey mostraron que los grupos de peces con pretratamiento y/o tratamiento *ex vivo* (WAF-SC, WAF-CLF y

C-CLF) redujeron significativamente la expresión de caspasa 8 (entre 6 y 10 veces) con respecto a los peces del grupo control C-SC,  $P < 0.001$  (Figura 3.5d).



**Figura 3.5:** Expresión de ARNm de genes de respuesta a estrés en peces expuestos a diferentes compuestos tóxicos (a) Caspasa 1 (b) Caspasa 3 (c) Caspasa 9 (d) Caspasa 8. Efecto de WAF,  $**P < 0.01$  y  $*P < 0.05$ . Las letras minúsculas indican diferencias entre las medias de los grupos en comparaciones múltiples de Tukey. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

### 3.1.5. Genes de otras enzimas de detoxificación y defensa

- Gamma glutamil transferasa (*GGT*)

La expresión de GGT tuvo incremento significativo en los peces pretratados con WAF (Anova:  $F = 6.912$ ;  $P < 0.05$ ). No hubo efecto por la exposición a CLF ni interacción a las exposiciones consecutivas de ambos compuestos tóxicos (Figura 3.6a).

#### ■ Glutación peroxidasa (*GPX*)

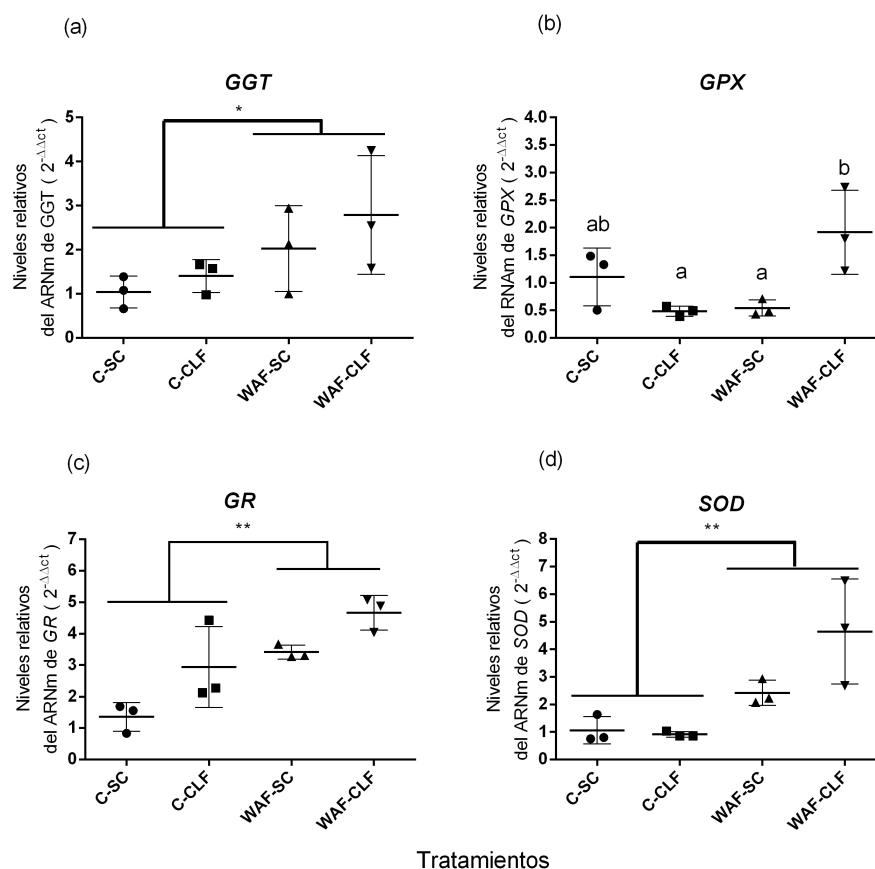
La expresión génica de la GPX no tuvo efectos individuales de las exposiciones a WAF y CLF, sin embargo se observó interacción significativa a las exposiciones consecutivas de ambos compuestos tóxicos en los peces (Anova de dos vías:  $F = 13.43$ ;  $P < 0.01$ ). Las comparaciones múltiples de Tukey mostraron que en los peces del grupo WAF-CLF la expresión de *GPX* se vio aumentada en aproximadamente 4 veces con respecto a los peces del grupos C-CLF y WAF-SC ( $P < 0.05$ )(Figura 3.6b).

#### ■ Glutación reductasa (*GR*)

La expresión génica de GR se incremento significativamente tanto en los peces expuestos a WAF como en los hígados expuestos a CLF (Anova WAF:  $F = 19.36$ ,  $P < 0.01$ , CLF:  $F = 10.86$ ,  $P < 0.05$ ). Sin embargo no hubo efectos de interacción a dichas exposiciones consecutivas, por lo que estos efectos fueron aditivos. Los peces pretratados con WAF (WAF-SC y WAF-CLF), tuvieron una inducción de la expresión del ARNm de GR en aproximadamente 2 veces con respecto a los no pretratados. Mientras que la exposición a CLF produjo una inducción de 1.7 veces la expresión de GR con respecto al control del tratamiento (Figura 3.6c).

#### ■ Superóxido dismutasa (*SOD*)

La expresión génica de *SOD* se incrementó significativamente en los peces expuestos a WAF (Anova:  $F = 18,95$ ;  $P < 0.01$ ) aproximadamente 3 veces más que en los peces sin exposición a WAF. No se observó efecto a la exposición a CLF ni efecto de interacción a las exposiciones consecutivas a ambos compuestos tóxicos (Figura 3.6d).



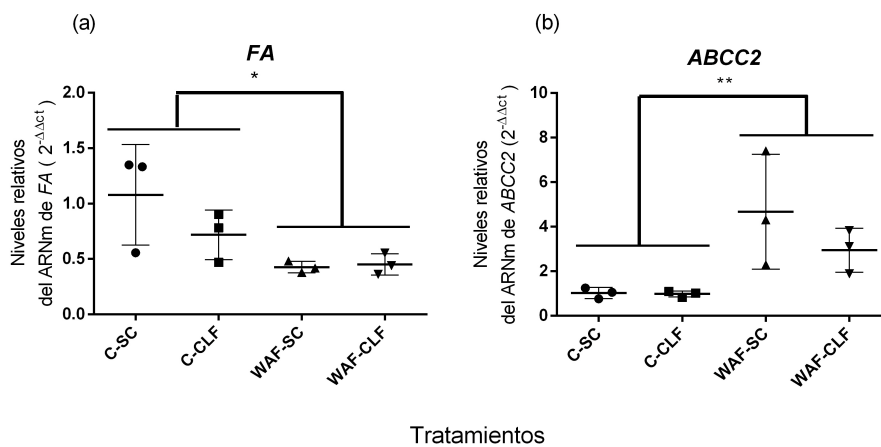
**Figura 3.6:** Expresión ARNm de genes de enzimas de defensa antioxidante en peces expuestos a diferentes compuestos tóxicos (a) Gamma Glutamyl transferasa (GGT), (b) Glutación peroxidasa (GPX), (c) Glutathion reductasa (GR), (d) Superóxido Dismutasa (SOD). Efecto de WAF, \*\* $P < 0.01$  y \* $P < 0.05$ . Efecto de CLF • $P < 0.05$ . Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

#### ■ Fosfatasa Alcalina (FA)

La expresión génica de FA mostró efecto significativo en los peces expuestos a WAF, reduciéndose a la mitad con respecto al control (Anova de dos vías:  $F = 9.502$ ;  $P < 0.05$ ). No se observó efecto a la exposición a CLF ni efecto de interacción a las exposiciones consecutivas a ambos compuestos tóxicos. (Figura 3.7a).

#### ■ ABCC2/MRP2

La expresión génica del gen de la proteína transportadora *ABCC2/MRP2* tuvo un incremento significativo en los peces expuestos a WAF en relación a los controles (Anova de dos vías:  $F= 12,31$ ;  $P < 0.05$ ). En los hígados expuestos a CLF no se observó efecto sobre la expresión, así como tampoco se observó efecto de interacción a las exposiciones consecutivas a ambos compuestos tóxicos (Figura 3.7b).

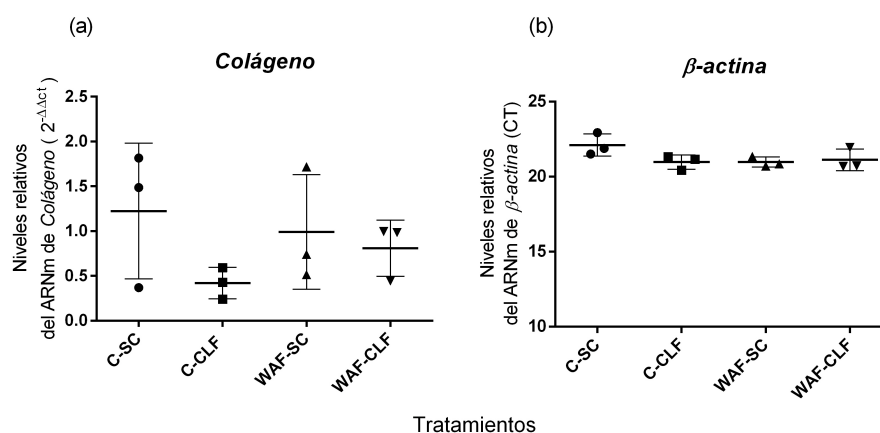


**Figura 3.7:** Expresión ARNm de genes de enzimas de detoxificación en peces expuestos a diferentes compuestos tóxicos (a) Fosfatasa alcalina (FA). (b) Proteína asociada a la resistencia a multidrogas 2 (*ABCC2/Mrp2*). Efecto de WAF,  $**P < 0.01$  y  $*P < 0.05$ . Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

### 3.1.6. Genes de proteínas estructurales

#### ■ COLÁGENO y $\beta$ -ACTINA

La expresión del ARNm de estas proteínas no tuvo efecto significativo en los grupos de peces expuestos a WAF ni para los hígados expuestos a CLF (Figura 3.8a,b). Tampoco hubo interacción significativa. *B-actina* se utilizó como gen de referencia (housekeeping).



**Figura 3.8:** Expresión ARNm de genes de proteínas estructurales en peces expuestos a diferentes compuestos tóxicos a) Colágeno, (b)  $\beta$ -actina (utilizada como housekeeping). Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

## 3.2. Resultados de los análisis de actividad enzimática

### 3.2.1. Actividad de O-deetilación de 7-etoxi-resorufina (EROD)

La actividad de EROD tuvo un efecto significativo en los hígados expuestos a CLF, con una reducción promedio de 53% en relación a los no expuestos (ANOVA:  $F = 21.51$ ,  $P < 0.001$  para el efecto de CLF). No se observó efecto a la exposición a WAF ni tampoco efectos de interacción entre ambos compuestos tóxicos (Figura 3.9a).

### 3.2.2. Acetilcolinesterasa (AChE)

La actividad de la acetilcolinesterasa fue inhibida en los hígados expuestos a CLF ( $F = 6.45$ ,  $P < 0.05$ ), independientemente de la exposición a WAF. Con una reducción del 37% menor en los hígados expuestos a CLF en relación a los no expuestos. No se detectaron efectos de interacción entre ambos compuestos tóxicos (Figura 3.9b).



**Tabla 3.1:** Resultados de los análisis de expresión génica por q-PCR de distintos genes clasificados según la funcionalidad en el estudio.

	Gen	Efecto			
		CLF	WAF	Interacción	
vía AhR	CYP1A	-	***	-	-
	AhR	-	*	***	C-SC vs. WAF-SC **
					C-CLF vs. WAF-SC *
					WAF-SC vs. WAF-CLF **
ARNT	-	***	-	-	
Receptores nucleares	RE	-	-	-	-
	AR	***	***	***	C-SC vs. WAF-SC ***
					C-CLF vs. WAF-SC ***
					WAF-SC vs. WAF-CLF ***
	MR	-	-	-	-
PR	-	**	-	-	
LXR	-	*	**	C-SC vs. WAF-SC **	
Respuesta inmune	IL-1b	-	-	-	-
	IL-4	-	-	-	-
	IL-6	**	***	-	-
	IL-8	-	**	-	-
	IL-10	-	*	-	-
	IL-12	-	-	**	WAF-SC vs. WAF-CLF *
	TNF- $\alpha$	*	-	-	-
Estrés	CAS 1	-	-	**	C-SC vs. C-CLF **
	CAS 3	*	-	-	-
	CAS 8	***	***	***	C-SC vs. C-CLF ****
					C-SC vs. WAF-SC ***
					C-SC vs. WAF-CLF ***
CAS 9	*	-	-	-	
Detoxificación y defensa	GGT	-	*	-	-
	GPX	-	-	**	C-CLF vs. WAF-CLF *
					WAF-SC vs. WAF-CLF *
	GR	*	**	-	-
	SOD	-	**	-	-
	ABCC2/MRP2	-	*	-	-
FA	-	*	-	-	
Proteínas estructurales	Colágeno	-	-	-	-
	$\beta$ -actina	-	-	-	-

Para Anova de dos vías: \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ ; - no efecto.

### 3.2.3. Carboxilesterasas (CEs)

La actividad de CEs se vio afectada tanto por la exposición a WAF como a CLF. Se redujo significativamente en peces pretratados por WAF (42 % en

promedio, ANOVA de dos vías:  $F = 55.25$ ,  $P < 10^{-6}$ ) como en los hígados expuestos a CLF (19% en promedio, ANOVA:  $F = 8.74$ ,  $P < 0.01$ ). No hubo efecto de interacción significativa de las exposiciones consecutivas, sino que los efectos de ambos tratamientos fueron aditivos, lo que resultó en un 55% menos de actividad de CE en el grupo WAF-CLF que en el grupo C-SC (Figura 3.9c).

#### 3.2.4. Glutación S-transferasa (GST)

La actividad de glutatión S-transferasa se incrementó de en los hígados expuestos a CLF, independiente de la exposición a WAF (42%, ANOVA  $F = 8.14$ ,  $P < 0.01$ ). No hubo efecto de la exposición a WAF ni efecto de interacción a ambos compuestos tóxicos (Figura 3.9d).

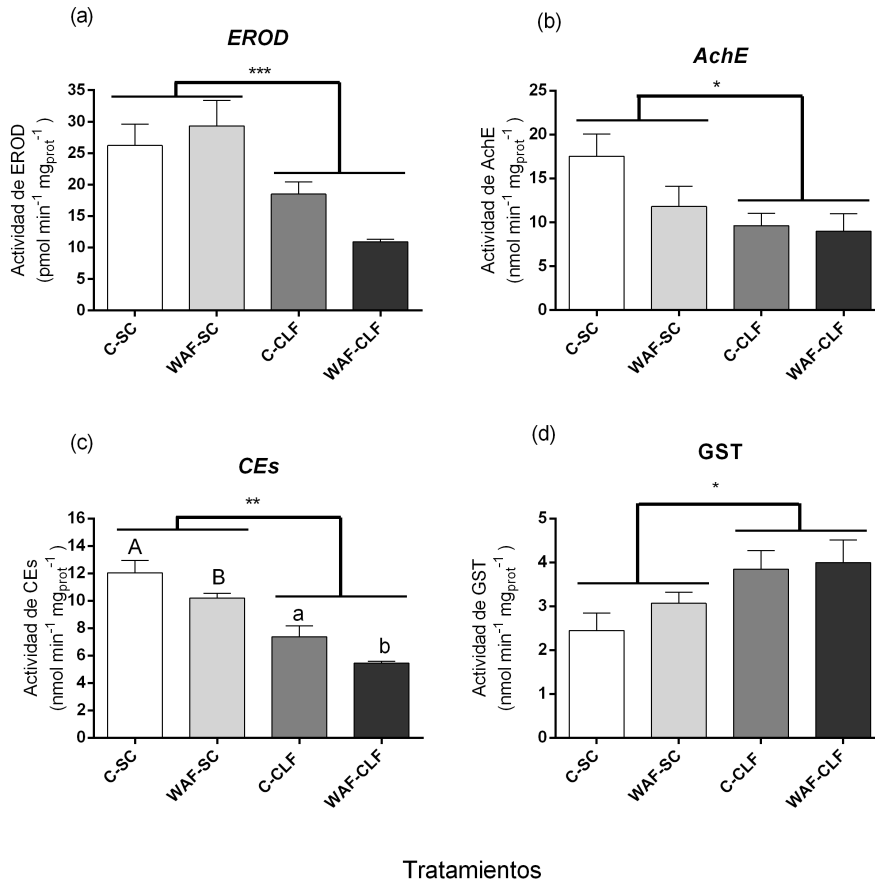
### 3.3. Resultados de expresión proteica

Los niveles de proteína CYP1A en hígado de peces pretratados *in vivo* con WAF fueron significativamente más altos que en los de peces control (ANOVA:  $F = 12.4$ ,  $P < 0.001$ ). Los hígados de los grupos WAF-SC y WAF-CLF mostraron niveles de proteína CYP1A 5.4 veces, en promedio, mayores que sus respectivos controles (C-SC y C-CLF). Por otro lado no se detectaron efectos significativos de la exposición posterior *ex vivo* a CLF o de interacción (ANOVA:  $F = 2.62$ ,  $P = 0.125$ , para CLF, y  $F = 3.77$ ,  $P = 0.070$  para la interacción) (Figura 3.10a,b).

#### 3.3.1. Patología: Tinción hematoxilina-eosina

De las muestras pertenecientes al grupo C-SC, las cuales no estuvieron bajo el efecto de ningún compuesto tóxico, se observó atrofia moderada en una de las seis muestras, lo que corresponde al 16.7%, mientras que en el 83.3% de las muestras se observó atrofia leve.

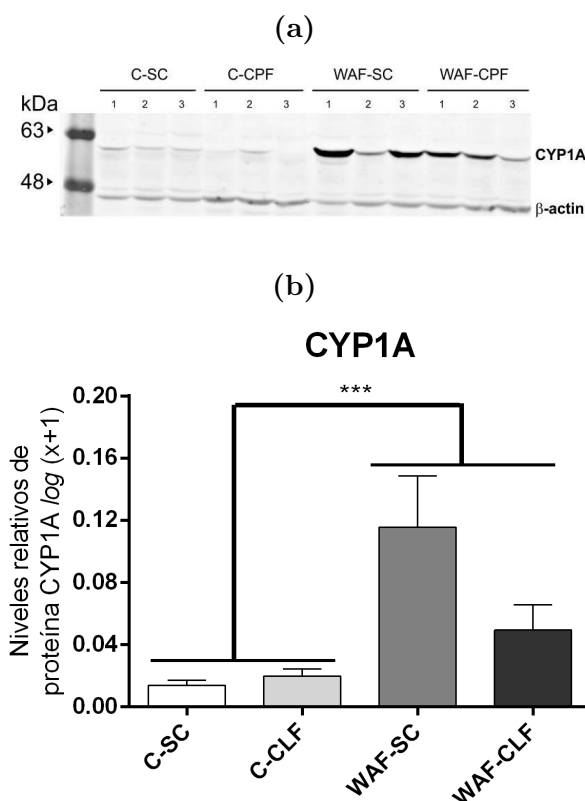
En el grupo C-CLF donde los hígados fueron expuestos a clorpirifos, se observó atrofia moderada en el 60% de las muestras, mientras que en el 40%



**Figura 3.9:** Actividades enzimática en peces expuestos a diferentes compuestos tóxicos. La actividad EROD (a), Acetilcolinesterasa (b), Carboxilesterasa (c) y Glutatió-S-transferasa (d). Efecto para CLF para Anova de dos vías: \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$  y \* $P < 0.05$ . En (c), diferentes letras mayúsculas y minúsculas indican efectos significativos de WAF en los contrastes ortogonales C-SC vs. WAF-SC y C-CLF vs. WAF-CLF, respectivamente. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ).

restante la atrofia fue leve.

En los grupos pretratados con WAF la atrofia fue predominantemente moderada. Y además se evidenció esteatosis micro vesicular difusa leve (40 % de las muestras del grupo WAF-SC y un 20 % en las muestras del grupo WAF-CLF), congestión moderada (20 % de las muestras en ambos grupos) y en una muestra (Cod.19 del grupo WAF-CLF) se observaron dos focos pequeños de



**Figura 3.10:** (a) Escaneo de una membrana de Western blot representativa (mostrando tres de seis réplicas) para la proteína CYP1A (b) Expresión relativa de la proteína CYP1A (CYP1A /  $\beta$ -actina). Efecto para WAF por Anova de dos vías:  $***P < 0.001$ . Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ).

hemorragia leve. (Tabla 3.2).

### 3.4. Discusión y Conclusiones

Los resultados expuestos arriba informan los efectos de las exposiciones consecutivas de juveniles de trucha arcoíris a WAF (*in vivo* durante 48 h) y a CLF (preparaciones de hígado *ex vivo*) sobre la vía de señalización de AhR, receptores nucleares que podrían ser regulados o interactuar de alguna manera con dicha vía, genes de respuesta inmune, genes de respuesta a estrés. Además de los efectos sobre enzimas hepáticas claves implicadas en la detoxificación, en la respuesta antioxidante y en la toxicidad de HAPs

**Tabla 3.2:** Descripción histopatológica de los hígados analizados, según su correspondiente grupo de tratamiento.

Grupo (pre-tratamiento/ tratamiento)	Descripción histopatológica	Código de muestra
C-SC	Atrofia +	1
	Atrofia +	2
	Atrofia +	3
	Atrofia ++	25
	Atrofia +	26
	Atrofia +	27
C-CLF	Atrofia +	7
	Atrofia +	8
	Atrofia ++	9
	Atrofia ++	31
	Atrofia ++	32
WAF-SC	Atrofia ++	14
	Atrofia + Esteatosis +	15
	Atrofia ++	37
	Atrofia + Esteatosis + Congestión ++	38
	Atrofia ++	39
WAF-CLF	Atrofia ++ Hemorragia focal +	19
	Atrofia ++	20
	Atrofia ++	21
	Atrofia + Congestión ++	43
	Atrofia ++ Esteatosis +	45

+ es leve, ++ moderado, +++ severo.

y CLF, tanto a nivel génico como de actividad. Por último, se realizó un estudio de patología clásico (Tinción hematoxilina-eosina) para observar el estado fisiológico de los hígados expuestos.

### 3.4.1. Vía AhR: Expresión de la proteína CYP1A y genes *AhR*, *ARNT*, *CYP1A*

La WAF preparada a partir del derrame de petróleo del arroyo La Mina incrementó la expresión génica de *CYP1A* y también su expresión proteica en hígado de trucha en una proporción de 9 y 3-8 veces, respectivamente. Estos resultados son de una magnitud comparable a los observados en hepatocitos primarios de trucha arcoíris tratados con  $\beta$ -naftoflavona ( $\beta$ NF) durante 24 horas (inducción de 3.5 y 5 veces del ARNm de *CYP1A* y expresión de la

proteína CYP1A, respectivamente, Wiseman y Vijayan, 2007). Sin embargo, esta es una inducción modesta comparada con las obtenidas en el hígado de trucha arcoíris y otras especies de peces expuestas a otros agonistas fuertes de AhR, incluyendo un aumento de 110-200 veces en la expresión de ARNm de *CYP1A* de la trucha arcoíris después de la exposición a 3,3', 4,4', 5-pentaclorobifenilo (PCB126) durante 24 h (Jönsson et al., 2010) y un incremento de 63 veces en trucha arcoíris inyectada con Benzopireno (Woźny et al., 2010). Esto podría deberse que la concentración de TPH de la WAF es relativamente baja en comparación con las concentraciones de agonistas fuertes utilizadas en estos estudios, y además en el caso de Woźny et al., (2010) la vía de aplicación del compuesto sería más directa. Interessantemente, los estudios de Leggieri et al., (2017) en truchas del arroyo la Mina, aguas abajo del pozo de petróleo, muestran una inducción de las CYP1A de 1.34 veces en hígado y de 1.24 en branquias, respecto a sus respectivos controles, evidenciando la diferencia en el grado de inducción de este biomarcador entre los experimentos a campo y los experimentos en *in vivo* en laboratorio.

La expresión del ARNm de *AhR* también se indujo (4 veces) por la exposición a WAF. La inducción de *AhR* tras el tratamiento con agonistas de dicha vía se ha informado para varias especies de peces, incluida la trucha arcoíris (Abnet et al., 1999; Andreasen et al., 2002; Hanno et al., 2010; Tanguay et al., 1999; Wiseman y Vijayan, 2007; Woźny et al., 2010). Mientras que otras especies de peces tienen dos genes *AhR* (*AhR1* y *AhR2*), la trucha arcoíris carece de *AhR1* pero posee tres formas de *AhR2* (*AhR2 $\alpha$* , *AhR2 $\beta$*  y *AhR2 $\delta$* ). Las dos primeras formas han sido bien caracterizadas y muestran inducción por diferentes agonistas de *AhR* clásicos (Abnet et al., 1999; Wiseman y Vijayan, 2007; Woźny et al., 2010). En particular, Woźny et al., (2010), han informado la inducción del ARNm de *Ahr2 $\alpha$*  y *Ahr2 $\beta$*  por Benzopireno en el mismo orden de magnitud que el obtenido en nuestro experimento (5.9 y 6.9 veces, respectivamente vs. 4 veces). Recientemente, Bak et al., (2017) identificaron tres posibles elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) en la región del promotor de los genes *rsAhR1* y *rsAhR2* del pez la dorada (*Pagrus major*). Además, estos autores demostraron que, una vez activado por unión al agonista TCDD, el AhR de esta especie podía unirse a los XRE

encontrados en la secuencia del gen *rsAhR2* y así mediar la transcripción de *AhR2*. Sugieren que la autoinducción de *AhR* podría amplificar la señal para regular los genes corriente abajo del elemento de respuesta DRE. De acuerdo con esto, nuestros resultados indican que los HAP presentes en la WAF promueven la autoinducción del *AhR*, lo que derivaría en una mayor expresión de CYP1A, sin embargo la falta de inducción de *AhR* en peces tratados con WAF-CLF resulta difícil de explicar. Sería interesante realizar el experimento de exposición a un tiempo más (por ejemplo 72 hr) para observar si la expresión de CYP1A es incrementada posteriormente al incremento de AhR para contestar a la hipótesis propuesta por Bak et al., (2017).

Por otro lado, la regulación negativa del ARNm de *ARNT* (20% menos que el control) reduciría la formación del heterodímero AhR-ARNT, lo que a su vez reduciría la inducción de genes corriente abajo del DRE como *CYP1A*, si la abundancia de *ARNT* fuera un factor limitante. Esta sería otra hipótesis posible para explicar porque pese a que la WAF induce la expresión de *AhR* en una proporción similar a la obtenida en trabajos con agonistas puros de este receptor, la inducción del gen *CYP1A* es mucho más modesta que la obtenida en esos trabajos. La regulación negativa de *ARNT* limitaría la extensión de la respuesta de la vía AhR.

Esta regulación negativa de *ARNT* también podría afectar la interacción y/o acoplamiento de la vía de AhR con otras vías tales como la del factor inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), que también depende de la dimerización con ARNT (Fleming et al., 2009; Mandl et al., 2016). En un estudio realizado con muestras de hígado de focas silvestres del lago Baikal expuestas crónicamente a dibenzo-p-dioxinas policloradas, dibenzofuranos y PCB, Kim et al., (2005) informaron la correlación positiva y negativa de la expresión del ARNm de *AhR* y *ARNT*, respectivamente, con la expresión de las proteínas CYP1A y CYP1B. Estos autores sugirieron que los metabolitos de CYP1A/B podrían regular el descenso del *ARNT*.

Aunque se ha descrito ARNT para varios peces, incluida la trucha arcoíris (Powell et al., 1999; Tanguay et al., 1999), se sabe poco sobre los efectos de los agonistas de AhR sobre su expresión. Nosotros hemos detectado una hipo-regulación del ARNm de *ARNT* en los mismos grupos experimentales

en los que se activó la vía *AhR*. Dado que no detectamos ninguna inducción de la actividad de EROD, la regulación negativa de *ARNT* por los metabolitos de CYP1A parece poco probable. *ARNT* ha sido considerado como de expresión constitutiva, aunque esta noción ha sido revisada recientemente para líneas celulares de cáncer (revisado por Mandl y Depping, 2014). Estos autores han demostrado posteriormente que el heterodímero HIF-1 $\alpha$ -ARNT se une a sitios específicos en la región promotora de *ARNT* induciendo su transcripción, en células Hep3B de carcinoma hepatocelular humano (Mandl y Depping, 2017). Por el contrario, hay poca o ninguna información sobre la regulación de la transcripción de *ARNT* en peces. Calò et al., (2014) han informado que la exposición *in vivo* a PCB126 induce la expresión de la proteína de AhR y ARNT en el hígado de la dorada (*Spaurus aurata*). Esto contrasta con la disminución del ARNm de *ARNT* observada en esta tesis. Sin embargo, estos estudios no son totalmente comparables ya que el aumento de la transcripción no implica necesariamente un aumento a nivel de proteína.

En lo que concierne a la hipótesis I de esta tesis : “Hidrocarburos aromáticos, presentes en la fracción soluble de petróleo (WAF), activan la vía del receptor AHR en el hígado de la trucha arcoíris, induciendo la expresión y la actividad de la enzima CYP1A con el consiguiente aumento de la toxicidad de CLF ”, podemos afirmar que los hidrocarburos aromáticos presentes en la WAF inducen la vía de AhR al incrementar la expresión de *AhR* (génica) y de CYP1A (tanto génica como proteica), sin embargo dicha inducción no se vio reflejada en la actividad de CYP1A. Por último, la toxicidad de Clorpirifos no estaría siendo aumentada por una previa exposición a hidrocarburos aromáticos, según estos resultados.

### 3.4.2. Otros receptores nucleares

Es sabido que contaminantes antropogénicos en ambientes acuáticos pueden causar disturbios reproductivos, tanto en vertebrados como en invertebrados, por interferencia con el sistema endócrino (Arukwe, 2001). De estos contaminantes ambientales algunos exhiben actividad estrogénica y otros



androgénica, pudiendo modular estas vías endócrinas. Se ha reportado como contaminantes estrogénicos a los PCBs, HAPs y Dioxinas entre otros. Los HAPs ejercen efectos disruptores endocrinos a través de diversos mecanismos. Al igual que las dioxinas, pueden influir en la producción y en el metabolismo de esteroides, a través de su interacción con el receptor AhR y otros elementos que responden a las dioxinas (Navas y Segner, 2001; Ville-neuve et al., 2002), y también se ha demostrado que interactúan con otros receptores y elementos de respuesta, que desempeñan papeles regulatorios en procesos endócrinos (Cheshenko et al., 2008; Bilbao et al., 2010). Por ejemplo, la exposición de peces juveniles de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) a una mezcla de efluentes de una refinería produjo un aumento significativo de la síntesis de las proteínas *zona radiata* y *Vitelogenina*, ambas reguladas por el Receptor de estrógenos (ER) (Arukwe et al., 1997). Sin embargo, estudios con WAF de petróleo crudo en zebra fish (*Danio rerio*), mostraron que los niveles de ARNm de ambas isoformas de ER (*ERa* y *ERb*) o de alguna de ellas, disminuían al aumentar la concentración de la WAF durante el tiempo de exposición (Arukwe et al., 2008 y Salaverria et al., 2014), sugiriendo algún tipo de interacción entre el receptor ER y el AhR. Acorde a esto, agonistas de AhR disminuyen la inducción de los niveles de ARNm de vitelogenina en hepatocitos de trucha arcoíris y salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Navas y Segner, 2000; Bemanian et al., 2004; Mortensen et al., 2006). Por otro lado, Gräns et al., (2010) observan que la co-exposición de hepatocitos de trucha con agonistas de ambos receptores reducen la inducción de la actividad EROD en relación con la exposición sola al agonista de AhR. En esta tesis la expresión del ARNm del *RE* no mostró cambios significativos en el hígado de trucha bajo la exposición *in vivo* a WAF 5% (0.062 mg/L) a pesar de que el receptor AhR si se vio incrementado. Son escasos los estudios que abordan esta vía, y la composición del crudo podría estar determinando el efecto sobre el receptor de estrógeno, sería interesante modificar las concentraciones y tiempos de exposición a WAF o a sus componentes en nuevos estudios.

Han sido muchos menos los efectos androgénicos y los mecanismos propuestos para los mismos documentados en peces, en comparación con los efectos estrogénicos (Arukwe et al., 2001). Parks et al., (2001) observaron

efectos androgénicos en *Gambusia affinis holbrooki* aguas abajo de fábricas de papel Kraft en Florida, las hembras mostraron rasgos de masculinización de la aleta anal, un rasgo andrógeno-dependiente. En este estudio se resalta la importancia de determinar los compuestos químicos en el medio ambiente con actividad androgénica, lo que permitirá plantearse preguntas sobre el potencial de estas sustancias para bioacumularse y moverse a través de la cadena alimentaria. Las hormonas androgénicas son importantes para la reproducción en todos los vertebrados dado que los mecanismos bioquímicos y moleculares de la acción de la hormona están muy conservados (Norris, 1996), la exposición a niveles significativos de sustancias androgénicas podría afectar negativamente a la reproducción en todas las especies, incluidos los humanos. De hecho, los efectos adversos de los fármacos androgénicos, consumidos durante el embarazo humano están bien establecidos y deben ser evitados (Schardein, 2000). Concretamente, nosotros hemos observado una inducción de 8 veces del receptor de andrógenos (*AR*) en el grupo WAF-SC, sin embargo la adición del tratamiento CLF antagoniza este efecto, por lo que la interacción entre los efectos de ambos contaminantes fue significativa. Sería de suma importancia continuar y profundizar la investigación sobre los efectos androgénicos de los compuestos presentes en la WAF del arroyo La Mina.

Los estudios que abordan la expresión génica del receptor nuclear de progesterona (PR) en peces son escasos. Particularmente Chen et al.,(2010) caracterizan al receptor PR y su funcionalidad en zebrafish, observando que se puede activar la transcripción de los genes diana dependiente de la progesterona, como ligando específico. No encontramos bibliografía referente a este receptor en trucha arcoíris, menos aún en relación con toxicidad asociada. En particular nosotros observamos un aumento de la expresión de este receptor en los peces pretratados con WAF, del doble en relación con el control. Este resultado, junto con la inducción de la expresión de AR discutida arriba sugiere efectos complejos de la mezcla de hidrocarburos de la WAF sobre la regulación de la reproducción en peces y posiblemente en otros vertebrados. Sería interesante investigar la posible injerencia por parte de la vía de AhR en esta inducción de los receptores endócrinos.

El factor de transcripción Liver x receptor (LXR) juega un papel clave en la activación de la lipogénesis en mamíferos (Schultz et al., 2000) y hasta 2009 no se conocía su presencia en Salmónidos. Cruz-García et al., (2009) determinaron la distribución tisular de *LXR* en trucha arcoíris y en salmón del Atlántico. Simultáneamente, estudiaron la regulación de la expresión de *LXR* en el hígado de peces expuestos a distintas dietas y reportaron una expresión mayor en peces alimentados con aceite de pescado en comparación con peces alimentados con aceite vegetal. Por otro lado, la expresión del ARNm de *LXR* se incrementó en los peces mantenidos en agua de mar que en aquellos mantenidos en agua dulce, por lo que existen indicios de una influencia de los cambios ambientales sobre dicho receptor. En mamíferos se sabe que *LXR* posee agonistas endógenos que incluyen una variedad de derivados oxidados de colesterol conocidos como oxisteroles. Además, en los últimos años se ha caracterizado a *LXR* como regulador transcripcional clave del metabolismo de lípidos e hidratos de carbono. Se demostró que los *LXR* funcionan como sensores de esterol y protegen a las células de la sobrecarga de colesterol, estimulando el transporte reverso del mismo (desde los tejidos hacia el hígado) y activando su conversión a ácidos biliares en el hígado. Estudios en mamíferos sobre la expresión de *LXR* y sus genes blanco (Zhou et al., 2008) sugieren que, además de la estimulación de la síntesis de ácidos grasos en el hígado, el aumento de la absorción de ácidos grasos libres también puede contribuir a la esteatosis hepática inducida por la activación de LXR. Asimismo, se ha reportado en ratón que la lipogénesis inducida por agonistas farmacológicos fuertes de LXR converge en una esteatosis hepática grave (Miao et al., 2004). Concretamente, nosotros observamos un incremento de la expresión génica de *LXR* (3 veces) en los peces pretratados con WAF (WAF-SC) con respecto al control (C-SC) y una interacción con el tratamiento de exposición a CLF, que previene el incremento inducido por WAF. Acorde a esto, los hígados que mostraron un incremento en la expresión génica de *LXR* también mostraron esteatosis micro vesicular difusa leve (40 % de las muestras del grupo WAF-SC y un 20 % en las muestras del grupo WAF-CLF), ambos efectos podrían estar correlacionados. La acumulación de grasa es un tipo de respuesta celular muy común a los tóxicos, pero que normalmente es reversible. Usualmente

son los triglicéridos los que se acumulan, aunque también lo pueden hacer los fosfolípidos. La esteatosis hepática se desarrolla como resultado del desequilibrio entre el aporte y la degradación de los lípidos. La grasa puede aparecer en la célula como pequeñas gotas o en forma de una gran gota. La activación de LXR observada en esta tesis, podría incrementar la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos, como se ha visto en mamíferos, dando lugar al aumento de los depósitos de grasa que junto a los ácidos grasos libres plasmáticos circulantes captados por el hígado desencadenarían la esteatosis observada en las muestras de histopatología.

### 3.4.3. Genes de respuesta inmune

Un sistema inmunológico que funcione correctamente es un rasgo importante de una óptima condición física, que resulta crítica tanto para la supervivencia individual como para la productividad de una población (Segner et al., 2012). Un sistema inmunológico alterado por la exposición a contaminantes, ya sea solo (Arkoosh et al., 2010), o en conjunto con otros factores de estrés (Jacobson et al., 2003) puede resultar en un aumento de la susceptibilidad a las enfermedades. Estudios sobre la regulación de la respuesta inmune de los peces ayudará a nuestra capacidad para determinar y modular las vías que conducen a la inmunidad protectora, para mejorar la salud de los peces en la acuicultura (Zou y Secombes, 2016). En particular, nosotros observamos una inducción significativa de la expresión génica en respuesta al pretratamiento con WAF en tres de las interleucinas analizadas, *IL-6*, *IL-8* y *IL-10*. La expresión de estas interleucinas ya se ha visto aumentada en trucha arcoíris por exposición a lipopolisacáridos, por la administración de inmunostimulantes en el baño de alevinos y por infección bacteriana (Zhang et al., 2009).

Dentro de las interleucinas consideradas pro-inflamatorias, y que se liberan durante la cascada de citocinas que sigue a una infección bacteriana, una de las más estudiadas es la *IL-6*. La interleucina 6 es una proteína secretada por las células T y los macrófagos y juega un papel importante en la res-

puesta inmune. Es interesante destacar que la expresión de *IL-6* también se vio afectada (incrementó) por el tratamiento *ex vivo* con CLF, lo que podría estar indicando una regulación rápida.

*IL-1 $\beta$*  es un quimioattractor para leucocitos en peces. La quimiotaxis de los leucocitos está coordinada por un gradiente de quimiocinas y la activación de los receptores acoplados a la proteína G. *In vitro* la estimulación de leucocitos de trucha arcoíris recién aislados con la proteína *IL-1 $\beta$*  tienen una mejora en la migración celular (Peddie et al., 2001). Además de sus funciones en la respuesta inmune, *IL-1 $\beta$*  participa en la regulación de otros mecanismos fisiológicos. Estudios recientes demuestran que el metabolismo del músculo de los peces se ve afectado por la *IL-1 $\beta$* . En cultivo celular primario muscular de *Salmo salar*, las células incubadas con *IL-1 $\beta$*  exhiben una mayor expresión de genes relacionados con procesos inflamatorios del crecimiento muscular y el metabolismo (Pooley et al., 2013), por lo que nos resultaba relevante investigar como estaría afectada esta vía con la exposición a los compuestos tóxicos. En esta tesis el gen de la interleucina *IL-1 $\beta$*  no mostró efectos en su expresión.

Los estudios funcionales de la interleucina *IL-4* se han realizado tanto en trucha arcoíris como en pez cebra. Por ejemplo, la inyección de r*IL-4* incrementa la expresión de DC-SIGN (CD209, marcador de células dendríticas) (Lin et al., 2009). En presencia de r*IL-4* se han registrado aumentos en el porcentaje de células IgZ+ en sangre periférica de pez cebra (Hu et al., 2010). En trucha arcoíris r*IL-4* ha mostrado modular la expresión de numerosos genes *in vitro*, sin embargo el efecto sobre las isoformas de las inmunoglobulinas aún no está claro (Wang y Secombes, 2013). Todas estas funciones son semejantes a las descritas para *IL-4* en vertebrados superiores. En esta tesis la expresión de *IL-4* no mostró efecto significativo frente ninguno de los dos factores (WAF/CLF).

Por último, como una citocina pro-inflamatoria, *TNF- $\alpha$*  es uno de los primeros genes inmunes expresados en la etapa temprana de infección en peces y tiene un papel clave en la regulación de la inflamación. El árbol filogenético sugiere que existen dos tipos de *TNF $\alpha$*  en peces teleósteos (Wang y Secombes, 2013). Estudios hechos en trucha arcoíris y pez dorado mostraron

que tanto rTNF $\alpha$ 1 como la isoforma 2 mostraron ser activas en macrófagos (Zou et al., 2003; Grayfer et al., 2008). Además, el efecto estimulante de TNF- $\alpha$  implica a la vía de señalización de NF- $\kappa$ B (Hong et al., 2013; Kono et al., 2006; Zhang et al., 2012). En particular nosotros observamos aumento de la expresión de TNF- $\alpha$  en hígados tratados con CLF, lo que podría deberse a una respuesta rápida, esta respuesta debe ser investigada en más profundidad.

#### **3.4.4. Genes de respuesta a estrés**

La apoptosis tiene un impacto vital en el desarrollo y la homeostasis de todos los organismos multicelulares. Los principales factores apoptóticos son una cascada de cisteína proteasas conocidas como caspasas. Las caspasas (proteasas específicas de aspartil dependientes de cisteína) son esenciales para el inicio y la ejecución de la apoptosis y para el procesamiento y la maduración de las citocinas inflamatorias (Nicholson, 1999). Hay dos subgrupos de caspasas, caracterizados como grupo iniciador (caspasa -2, -8, -9 y -10) y grupo efector (caspasa-3, -6 y -7) de la vía de señalización apoptótica. De los cuatro genes de caspasas estudiados, la caspasa 8 fue la única afectada (inhibida aproximadamente unas 5 veces) por el pretratamiento con WAF y por el tratamiento con CLF, además de mostrar interacción de ambos efectos. La ruta extrínseca de la apoptosis, representada por la activación de caspasa 8, también se identificó como inductora de la apoptosis en una línea celular de epitelio hepático con una infección del virus de necrosis pancreática en pez cebra (Hong et al., 2005). Del mismo modo, la activación de caspasa 8 juega un papel importante en la apoptosis inducida por VIH-1 en células HeLa (Stewart et al., 2000) o virus de la influenza (Takizawa et al., 1999), sugiriendo que la vía iniciada por la caspasa 8 puede ser central en la apoptosis inducida por estos virus. En este contexto, la inhibición de la caspasa 8 podría inhibir la vía de señalización apoptótica y de esta manera, inhibir la eliminación de células con ADN dañado, favoreciendo la tumorigénesis.

Conjuntamente, las caspasas 3 y 9 fueron afectadas sólo por el tratamiento corto con CLF y mostraron aumento en ambos casos. En relación a esto, en estudios con Cadmio en hepatocitos de trucha se desencadena la cascada

apoptótica, que incluye la activación de caspasa 3 y 9 de manera dependiente de la dosis (Risso-de Faverney et al., 2004). Los estresores ambientales han demostrado inducir deformidades en una amplia gama de peces (Koo y Johnston, 1978; Wang y Tsai, 2000; Hansen & Falk-Pedersen, 2001; Takle et al., 2005), y se cree que la apoptosis inducida por el estrés contribuye al desarrollo anormal durante la embriogénesis (Edwards et al., 2003; Yamashita, 2003). Los factores de estrés tales como el choque térmico y las radiaciones gamma y ultravioleta produjeron un incremento de la actividad de la caspasa 3 y apoptosis en el prosencéfalo, el mesencéfalo, la médula espinal, el saco vitelino y la aleta larval de embriones de pez cebra al completar la somitogenesis (Yabu et al., 2001). En conclusión, estaríamos observando una inhibición de la vía apoptótica extrínseca al tener disminuida la expresión de la *caspasa 8*, pero por otro lado la activación de la expresión de las *caspasa 3* y *9* podrían estar compensando la activación de la vía apoptótica. Es necesario explorar más en estos estudios.

### 3.4.5. Genes de enzimas de antioxidantes y de detoxificación

Dentro de los organismos, los hidrocarburos aromáticos, como el Benzopireno, se descomponen en metabolitos mediante la acción de diversas enzimas y del complejo citocromo P450. Luego mediante una serie de procesos redox se crean quininas, fenoles y especies reactivas del oxígeno (ROS) (Canova et al., 1998). Además las ROS se producen naturalmente durante el metabolismo del oxígeno. El estrés oxidativo por ROS tiene diversos efectos, puede aumentar la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y el daño al ADN, y también puede afectar la viabilidad celular al dañar las membranas y suprimir las actividades enzimáticas antioxidantes, acelerando así el proceso de senescencia celular y apoptosis (Oldham y Bowen, 1998). Para protegerse contra los compuestos tóxicos, y sus metabolitos, que generan estrés oxidativo, los organismos aeróbicos han desarrollado complejos sistemas de defensa antioxidantes (McFarland et al., 1999). Las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa

(GPX), la glutatión-S-transferasa (GST) y la glutatión reductasa (GR) entre otras, actúan en la defensa antioxidante. Por ejemplo, en un estudio con el pez *Paralichthys olivaceus* expuesto a Benzopireno por 12 horas, se observó un incremento en la expresión génica de la enzima SOD (An et al., 2008). Conjuntamente, Olsvik et al., (2005) observan un incremento del ARNm de las enzimas SOD, CAT y GPX en el hígado del salmón del Atlántico expuesto a 130% de saturación de O<sub>2</sub>. Ambos estudios proponen la expresión génica de dichas enzimas como biomarcadores de respuesta a hidrocarburos y de respuesta a hiperoxia, respectivamente. Además se ha informado la elevación de la expresión génica de transportadores de xenobióticos, enzimas de fase I y enzimas de fase II en organismos acuáticos que viven en ambientes contaminados con HAP o PCB. Por ejemplo, Paetzold et al., (2009) observan en hígado de *Fundulus heteroclitus* un incremento en la regulación génica de *ABCC2*, además de en *CYP1A*, *GST* y *ABCG2* en peces de estanques contaminados con HAP, PCBs y metales pesados. Por otro lado, algunos estudios han sugerido una actividad sinérgica de transportadores ABC y de enzimas de fase I y II (Bard, 2000; Liu et al., 2002; Leslie et al., 2005; Xu et al., 2005). De los genes de enzimas de detoxificación evaluados, todos mostraron algún efecto del pretratamiento con WAF, con excepción de GPX que sólo mostró interacción entre el CLF y WAF, pero no efectos independientes. Este efecto homogéneo de WAF sobre 5 enzimas antioxidantes y de detoxificación (*GGT*, *SOD*, *GPX*, *GR* y *ABCC2*) muestra una importante modulación de la fracción soluble de petróleo sobre la expresión génica. Además, en todos los casos el efecto fue un incremento de la expresión, lo que muestra que el sistema de detoxificación celular se encuentra activado. Conjuntamente estos resultados sugieren que al SOD, GGT y GR desempeñar un papel importante en la desintoxicación de ROS y que podrían ser indicadores de respuesta a estrés oxidativo causado por la exposición a la WAF.

### 3.4.6. Genes de proteínas estructurales

Los colágenos son componentes principales de la matriz extracelular de todos los metazoos (Kramer, 1994). Los tipos I y II de colágeno fibrilar son



las proteínas más abundantes de la MEC (Wess, 2005) y, al igual que otros colágenos formadores de fibrillas (tipos III, V, XI, XXIV y XXVII), pueden formar dominios continuos de triple hélice (Heino et al., 2009). Además de su función estructural, los colágenos pueden modular la respuesta inflamatoria celular, según el microambiente y los procesos fisiológicos involucrados. El reconocimiento celular de los colágenos está mediado por una variedad de receptores de superficie, como las integrinas, los receptores del dominio de la discoidina y los receptores inmunes relacionados. Tras la unión del colágeno, estos receptores pueden activar otras moléculas relacionadas con procesos de remodelación, inflamación y cicatrización de heridas, como metaloproteasas de matriz, citoquinas y factores de crecimiento (Vogel, 2001, Tran et al., 2004, Lee et al., 2007, Heino et. al., 2009, Schultz y Wysocki, 2009). Por ejemplo, en el pez *Sparus aurata* el colágeno puede actuar como un patrón molecular asociado al daño aumentando el estallido respiratorio en leucocitos y los niveles de ARNm del gen que codifica IL-1 $\beta$  y otras moléculas proinflamatorias en fagocitos (Castillo-Briceño et al., 2009). En esta tesis no se vio afecta la expresión del *colageno* y como era esperado tampoco la de la  *$\beta$ -actina* (utilizada como gen constitutivo) bajo los tratamientos de WAF y/o CLF.

### 3.4.7. Actividades enzimáticas

#### 3.4.7.1. Actividad O-deetilación de 7-etoxi-resorrufina (EROD)

Se esperaba que la expresión aumentada de la proteína CYP1A descrita arriba estuviera asociada con un aumento en la actividad de la enzima. Sin embargo, la actividad de EROD no aumentó significativamente por la exposición a WAF.

Según el proveedor, el anticuerpo utilizado en esta tesis (Abcam 10-7) detecta proteínas de ratón CYP1A1 y CYP1A2 y también reacciona con la CYP1A de trucha arcoíris. En mamíferos, la actividad de la isoforma CYP1A2 se mide con el método de O-desmetilación de 7-metoxi-resorrufina (MROD) en lugar de con el método EROD. Por lo que el aumento de la expresión proteica registrada en esta tesis podría explicarse por la inducción de una proteína CYP1A de trucha arcoíris con poca o ninguna actividad

EROD, ya que no se observó un aumento en la actividad.

En este sentido, Gooneratne et al., (1997) han caracterizado dos genes de trucha arcoíris (*CYP1A1* y *CYP1A3*) y Jönsson et al., (2010) informaron la inducción de *CYP1A3* pero no de *CYP1A1* en la trucha arcoíris de un sitio contaminado. Además, Liu et al., (2013) han informado que la *CYP1A3* de trucha arcoíris es aproximadamente 10 veces más sensible a TCDD que *CYP1A1*. Sin embargo, desde Gooneratne et al., (1997) han demostrado que las proteínas producto de los genes *CYP1A1* y *CYP1A3* de trucha arcoíris muestran similares actividades EROD y MROD. Por consiguiente, la falta de inducción de la actividad EROD en nuestro experimento no puede ser explicada por la expresión diferencial de un gen *CYP1A* particular. La explicación más probable para este resultado, entonces, sería que, además de los HAP, que inducen la expresión de *CYP1A* mediada por la vía de AhR, la WAF utilizada también podría contener otros compuestos, como HAPs y alquilfenoles, que pueden inhibir la actividad EROD (Melbye et al., 2009).

Un aumento en la actividad de *CYP1A* resultaría en una mayor tasa de conversión de CLF a su forma activa, CLF-oxon (Tang et al., 2001), como ya fue reportado para humanos (Croom et al., 2010; Sams et al., 2004). A su vez, el ion de azufre liberado en la activación de CLF es altamente reactivo y se cree que se une inmediatamente al hierro del hemo de la molécula de CYP, inhibiendo su actividad (Neal, 1980; Flammarion et al., 1998; Tang et al., 2002). En el hígado de trucha arcoíris expuesto por 1 hora a Clorpirifos hemos visto inhibida la actividad EROD en preparaciones tanto de individuos pre-tratados como no pre-tratados con WAF. Aunque se observa una tendencia a un mayor porcentaje de inhibición de la actividad EROD por CLF en preparaciones de hígado de los peces pre-tratados con WAF (63 % y 29 % para WAF-CLF y C-CLF, respectivamente), este efecto no es estadísticamente significativo.

#### 3.4.7.2. Actividades enzimáticas, AchE, CE y GST

Las acetilcolinesterasas son los blancos específicos de los pesticidas OP y otros agentes anticolinesterásicos (Sánchez-Hernández, 2007). Para CLF y

otros OPs, este efecto se ve reforzado por la formación de OP-oxon catalizado por CYP1A (Chambers y Carr, 1996). Los hígados de trucha expuestos *ex vivo* a CLF durante 1 h mostraron una actividad de AChE significativamente reducida con respecto a las fetas de hígado expuestas al control del solvente. Este efecto fue similar en preparaciones obtenidas de animales pretratados y no pretratados con WAF y no se observaron efectos de interacción. Así, no hay evidencia en esta tesis sobre los efectos aditivos o sinérgicos de CLF y WAF sobre la actividad AChE. Estos resultados coinciden con la falta de cambio registrado en la actividad EROD en respuesta a WAF y nos permiten especular que la proteína CYP1A inducida en nuestros experimentos tiene una actividad EROD baja o nula, por lo que no se induciría la formación de CLF-oxon.

En muchas especies, las CEs tienen mayor afinidad por los OPs que AChE. Por lo tanto, se inhibirían de manera preferencial con respecto a AChE como resultado de la exposición a un OP (Wogram et al., 2001; Wheelock et al., 2005). En el caso de AChE fue clara la no interacción entre efectos, y esto podría ser explicado por la falta de inducción de la actividad EROD. Sin embargo, WAF y CLF muestran efectos inhibitorios aditivos sobre la actividad de CEs, reflejados en la menor actividad de CEs en el grupo WAF-CLF con respecto a C-CLF. Estos efectos están probablemente mediados por diferentes mecanismos, teniendo en cuenta las diferencias en tiempo y modo de exposición entre los dos tratamientos. Por otra parte, el efecto aditivo de WAF y CLF en la inhibición de CEs destaca la aptitud de la actividad de CEs como biomarcador, reflejando en este caso una reducción en la capacidad de detoxificación causada por la exposición a una mezcla de contaminantes.

Los compuestos tóxicos ambientales detoxificados por GST incluyen HAPs, pesticidas, y productos intermedios reactivos producidos por biotransformación de fase I y otras reacciones bioquímicas. En términos generales, hay abundantes informes sobre el aumento de la actividad de GST en organismos acuáticos en respuesta a una amplia gama de xenobióticos (Ferrari et al., 2007; Guerreño et al., 2016; Hayes et al., 2005), lo que indica una respuesta evolutivamente conservada. GST detoxifica activamente pesticidas organofosforados así como sus metabolitos oxon (Testai et al., 2010). Nuestros

resultados indican que la actividad de GST en el hígado de *O. mykiss* no se ve afectada por las 48 h de exposición *in vivo* a WAF, pero sí es inducida por 1 h de exposición a CLF independientemente del pre-tratamiento, lo que sugiere una respuesta detoxificante rápida contra este compuesto tóxico.

### 3.4.8. Patología

En las muestras de hígado de los cuatro grupos, se evidenció atrofia. Según la clasificación de Bernet et al., (1999) la atrofia es un tipo de cambio regresivo, que involucra la pérdida de funcionalidad parcial o total del órgano. La atrofia detectada en los hígados sin exposición a WAF, debido a su magnitud y distribución, es leve y podría atribuirse a períodos de estrés leves o a breves períodos de inanición que corresponden con los tratamientos. En comparación con los mamíferos, los hepatocitos de los peces tienden a estar más vacuolados, lo que corresponde a un contenido relativamente alto de glucógeno y / o lípidos (Ferguson, 1989). Dicha vacuolización, que tiende a distribuirse uniformemente, es a menudo especialmente evidente en los hígados de peces de cautiverio; esto se debe presumiblemente a desequilibrios en la ingesta y el gasto de energía causado por la alimentación artificial y las condiciones del habitat (Wolf y Wolfe, 2005).

En los hígados de los peces expuestos solo a WAF se observa un 40 % de esteatosis (aumento en la acumulación de grasa). Mientras que en los hígados expuestos a ambos tóxicos la esteatosis apareció en un 20 % de las muestras (grupo WAF-CLF). La inducción del receptor LXR también se observa en los peces expuestos a WAF. Debido al papel de LXR en la activación de la biosíntesis de ácidos grasos hepáticos su inducción podría explicar la esteatosis observada (Como se discute en la sección 3.4.2). Se han descrito varias especies de peces silvestres y cultivados que acumulan lípidos en el hígado, haciendo difícil la interpretación patológica. Entre las causas asociadas a esta condición se encuentran la peroxidación lipídica y la exposición a tóxicos (Wolf y Wolfe, 2005). Las correlaciones y asociaciones entre la prevalencia de lesiones en hígado con parámetros de exposición a HAP fueron discutidas en muchos estudios. Por ejemplo, un monitoreo de una década del lenguado

inglés en la Bahía del estrecho de Puget, ha demostrado una correlación entre las neoplasias hepáticas y otros daños en el hígado con la concentración de HAP en sedimentos (Puget Sound Partnership, 2010). Acorde a los resultados de esta tesis, un estudio de Agamy, E., (2012) en el que se expone al pez conejo (*Siganus canaliculatus*) a fracciones solubles de petróleo se observa acumulación lipídica y congestión en los hígados. En este estudio, el período de exposición influyó en el grado de cambio histológico en la mayoría de las lesiones hepáticas, y dichos cambios fueron más visibles después de la exposición de 12 y 15 días. Este autor reporta que los cambios histopatológicos subletales en el hígado son sumamente útiles para comprender mejor la respuesta de una especie a la contaminación con petróleo crudo y las técnicas de remediación a los derrames de petróleo que derivan de ellas. Por último, la disminución en la expresión de la Fosfatasa alcalina en peces expuestos a WAF también podría estar asociada con el daño hepático observado.



# Capítulo 4

## Resultados y discusión hipótesis II

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en los experimentos realizados para poner a prueba la hipótesis II.

“CLF activa la vía del receptor PXR en peces, aumentando la expresión de la batería de genes detoxificantes aguas abajo”.

### 4.1. Resultados de expresión de ARNm (q-PCR)

En esta sección se muestran los resultados de la expresión de 6 genes de la vía de PXR analizados a partir de muestras de intestino e hígado de truchas expuestas *in vivo* a una dosis única de CLF de 1.4  $\mu\text{g/L}$  ( $\sim 1/5$  de la CL50) a tres tiempos: 12, 24 y 48 horas. Además para ampliar el estudio se midieron las expresiones de genes de la vía de AHR y de enzimas de oxidación de Fase I.

## 4.2. Intestino

### 4.2.1. Genes de la vía del receptor de PXR

La expresión génica del receptor PXR se incrementó significativamente en los peces expuestos a CLF por 12 h (test de Student,  $P < 0.05$ ). A las 48 horas de exposición también se observó un incremento en la expresión de PXR, pero dicho incremento no resultó significativo (Figura 4.1a). Dentro de los genes regulados por el receptor PXR, el citocromo *CYP3A27* y *UGT* no mostraron efecto en ninguno de los tiempos de exposición (Figura 4.1b,d respectivamente). *GST* se incrementó al doble en los peces expuestos por 12 h a CLF en comparación con los peces del control, sin embargo dicho efecto tampoco llegó a ser significativo ( $p = 0.0527$ ) (Figura 4.1c). Por último las expresiones de los dos enzimas de Fase III, transportadores de membrana, *ABCC2* y *ABCB1/Pgp* también reguladas por la vía PXR tampoco tuvieron efectos significativos a la exposición de CLF a ninguno de los tiempos analizados. *ABCC2* mostró un incremento del 50 % en los peces que fueron expuestos a CLF por 12 h, sin embargo dicho incremento no resultó significativo ( $P = 0.0642$ ) (Figura 4.2).

### 4.2.2. Genes de la vía del receptor de AhR

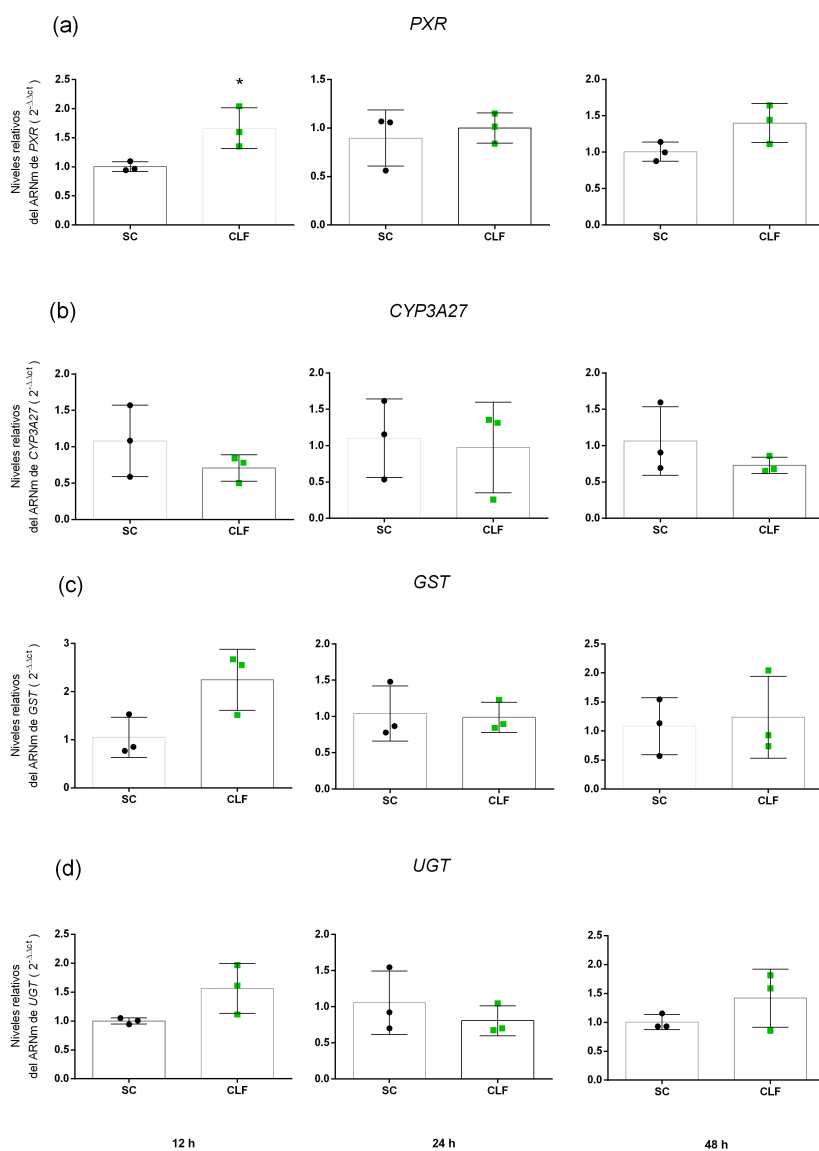
En relación a la vía de AhR, la expresión del receptor *AhR* fue inhibida (3 veces en relación al control) y del citocromo *CYP1A* (25 % en relación al control) a las 12 h de exposición a CLF. Conjuntamente, la expresión del gen *ARNT*, también relacionado con la vía de AhR, aumentó del 75 % en relación con el control, al mismo tiempo de exposición, 12 h. (Figura 4.4). Las correlaciones entre los efectos de CLF sobre genes de la vía de AhR en los tres tiempos analizados se exponen en la Figura 4.5.

### 4.2.3. Genes enzimas de Fase I (oxidación)

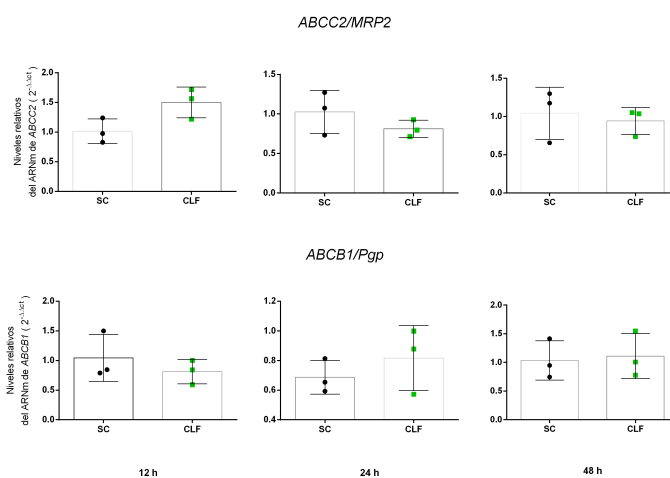
Las expresiones de los genes de las enzimas de Fase I, *FMO1* y los Citocromo P450 *CYP2M1* y *CYP2K1* no mostraron efectos debidos a la exposición



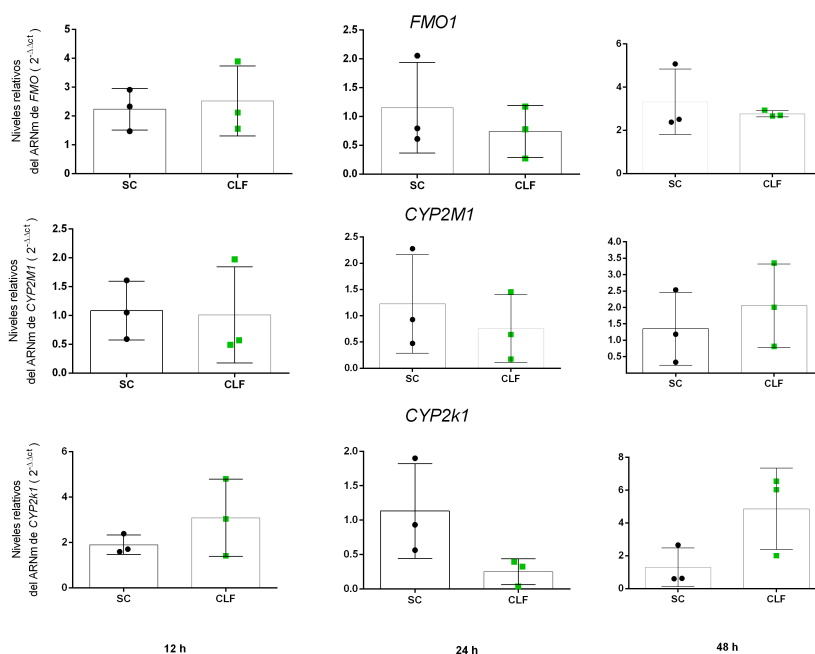
de CLF a ninguno de los tres tiempos analizados (Figura 4.3).



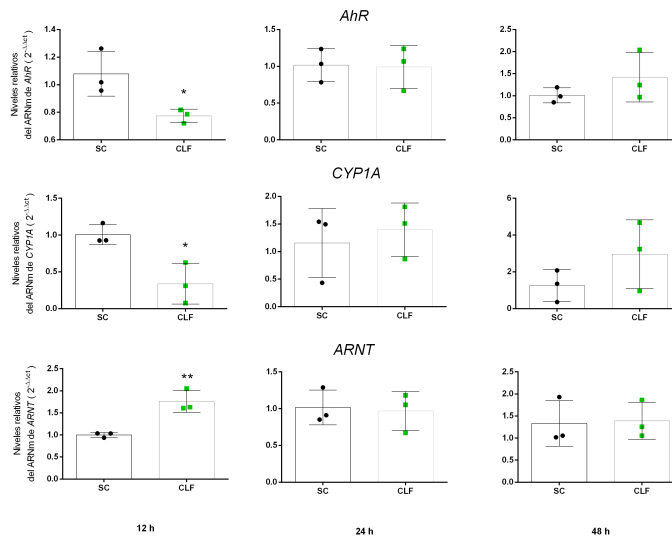
**Figura 4.1:** Expresión de los genes de (a) PXR, (b) CYP3A27, (c) GST (d) UGT en intestino de peces expuestos in vivo a CLF a tres tiempos con sus respectivos controles (SC). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Test de Student, \*  $P < 0.05$ .



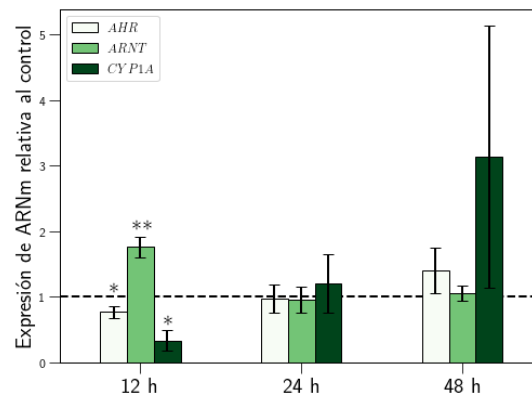
**Figura 4.2:** Expresión de los genes de *ABCC2/MRP2* y *ABCB1/Pgp* en intestino de peces expuestos in vivo a CLF a tres tiempos (12, 24 y 48 horas) con sus respectivos controles (SC). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).



**Figura 4.3:** Expresión del gen de *FMO1*, *CYP2M1* y *CYP2K1* en intestino de peces expuestos in vivo a CLF a tres tiempos (12, 24 y 48 horas) con sus respectivos controles (SC). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).



**Figura 4.4:** Expresión de los genes de, AhR, CYP1A y ARNT en intestino de peces expuestos in vivo a CLF a tres tiempos (12, 24 y 48 horas) con sus respectivos controles (SC). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Test de Student, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$ .



**Figura 4.5:** Expresión del gen de los genes AHR, ARNT y CYP1A1 para intestino de exposiciones in vivo a CLF a tres tiempos distintos (12, 24 y 48 horas) relativos a sus correspondientes controles (Tratado con CLF/Control). La línea punteada marca los valores que corresponden a cuando la exposición a CLF es igual a su control. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Test de Student, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$ .

## 4.3. Hígado

### 4.3.1. Genes de la vía del receptor de PXR

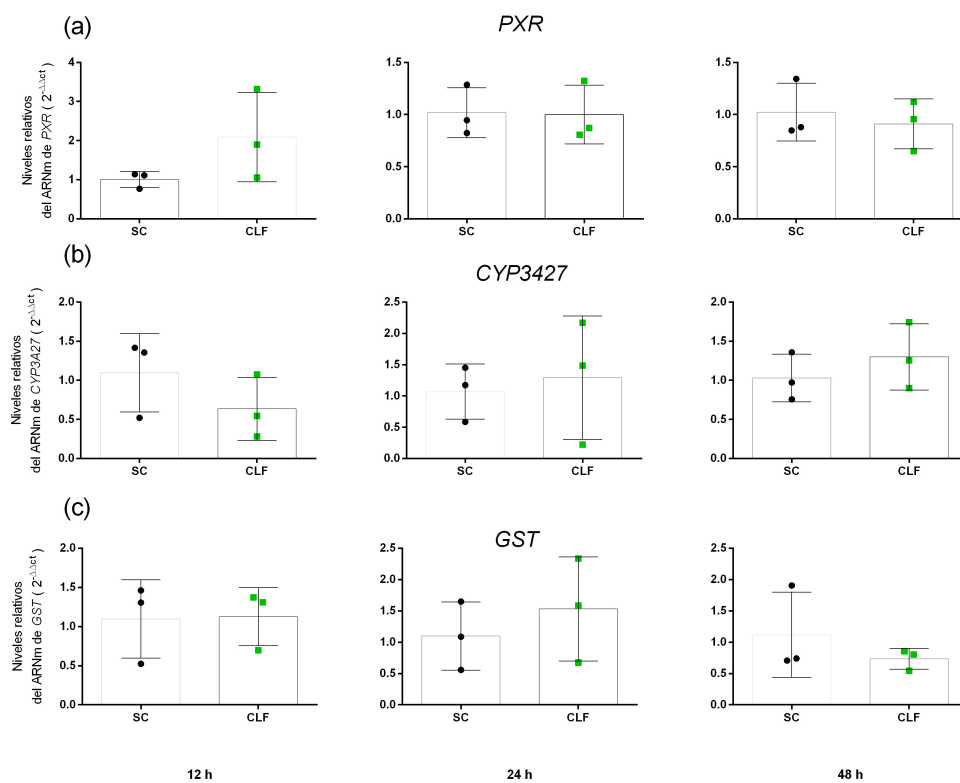
La expresión génica del receptor *PXR* en hígado no mostró efecto significativo en los peces expuestos a CLF en ninguno de los tiempos analizados (Figura 4.6.a). De los genes regulados por el receptor PXR, el citocromo *CYP3A27* y *GST* no mostraron efecto en ninguno de los tiempos de exposición (Figura 4.6.b/c respectivamente). *UGT* se incrementó un 25 % en los peces expuestos por 24 h a CLF en comparación con los peces del control (test de Student,  $P < 0.05$ ), en los otros tiempos no tuvo efectos (Figura 4.7.a). Por último, las expresiones de los dos enzimas de Fase III, transportadores de membrana, *ABCB1/Pgp* y *ABCC2/MRP2* tuvieron efectos inhibitorios significativos a la exposición de CLF. *ABCB1* disminuyó su expresión un 75 % a las 12 h de exposición en relación al control ( $P < 0.001$ ). Y *ABCC2* tuvo una disminución de aproximadamente el 75 % en los peces que fueron expuestos a CLF por 12 h, ( $P < 0.001$ ) y del 50 % en los expuestos a 24 horas,  $P < 0.05$  (Figura 4.7.b.c).

### 4.3.2. Genes de la vía del receptor de AhR

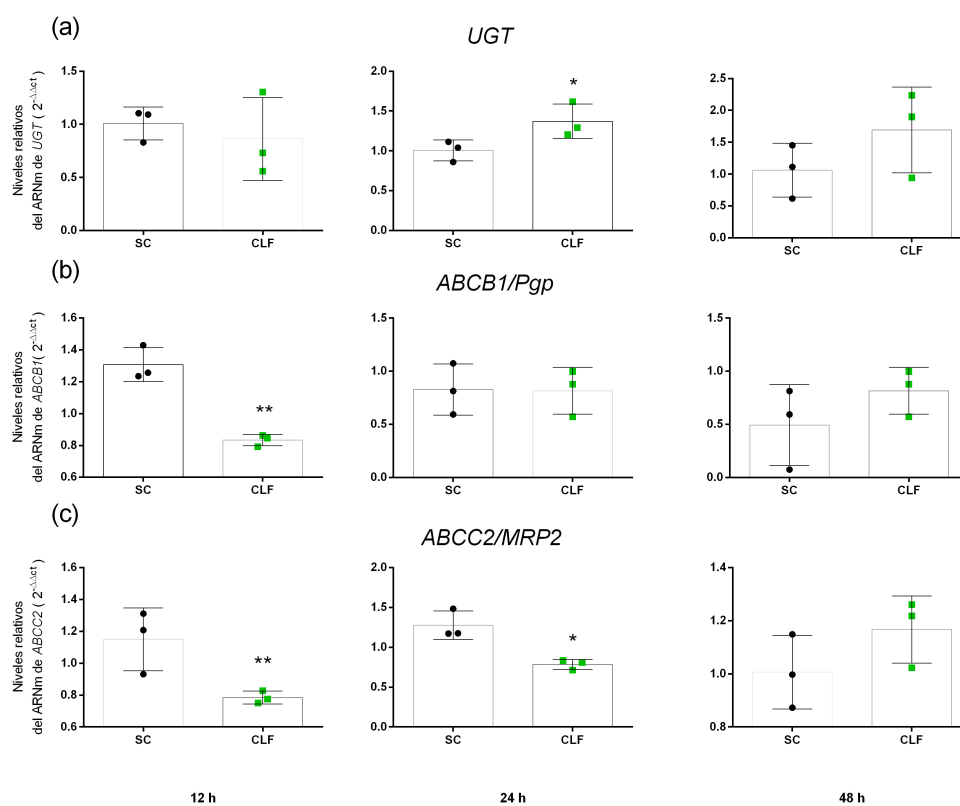
En relación a la vía de AhR en hígado, la expresión del receptor *AhR* fue inhibida un 66 % en relación al control a las 24 h de exposición, test de Student,  $P < 0.05$  (Figura 4.9.a). Sin embargo, la expresión del citocromo *CYP1A* no tuvo efectos significativos a la exposición de CLF en ningún tiempo (Figura 4.9.b). Conjuntamente, la expresión del gen *ARNT* tampoco se vio afectada por la exposición a CLF en hígado (Figura 4.9c).

### 4.3.3. Genes enzimas de Fase I (oxidación)

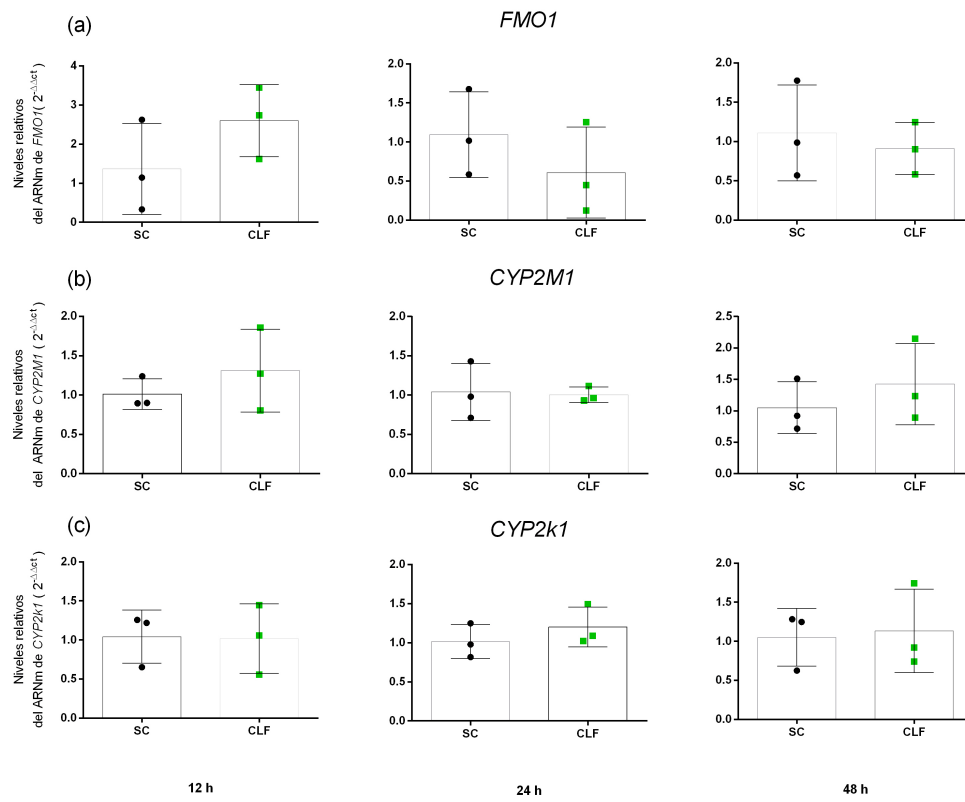
Las expresiones de los genes de las enzimas de Fase I, *FMO1* y los Citocromo P450 *CYP2M1* y *CYP2K1* en muestras de hígado no mostraron efectos debidos a la exposición de CLF a ninguno de los tres tiempos analizados (Figura 4.8)



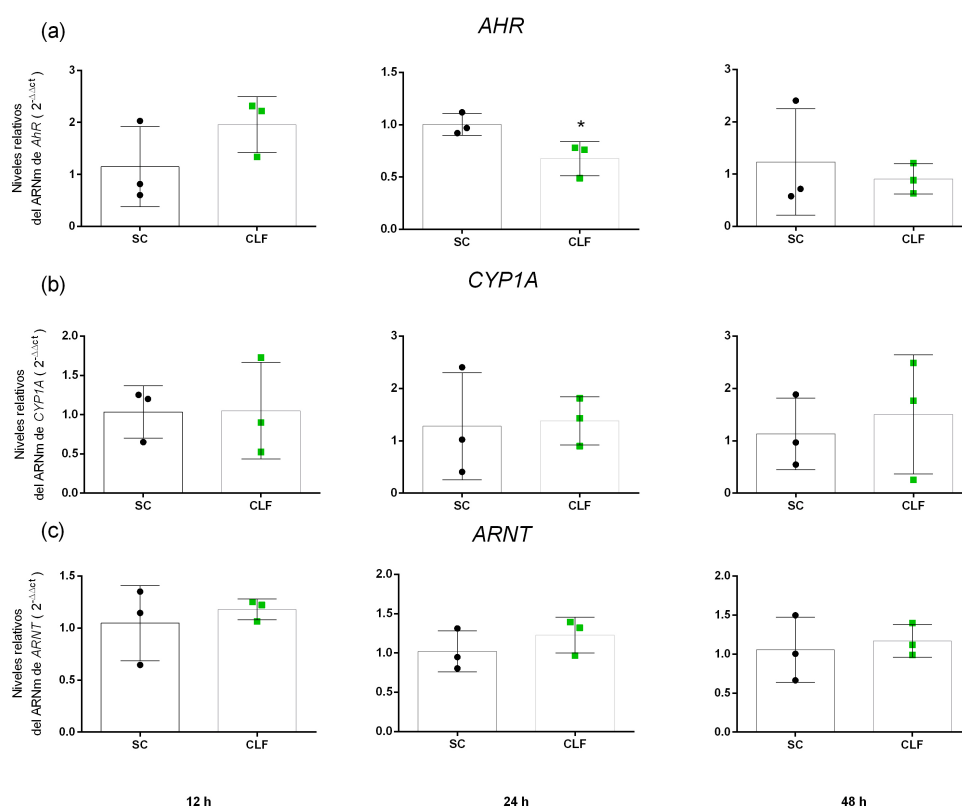
**Figura 4.6:** Expresión de los genes de (a) *PXR*, (b) *CYP3A27*, (c) *GST* en hígado de peces expuestos in vivo a *CLF* a tres tiempos con sus respectivos controles (*SC*). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SD (n = 3).



**Figura 4.7:** Expresión de los genes de (a) UGT, (b) ABCB1 (c) ABCC2 en hígado de peces expuestos in vivo a CLF a tres tiempos con sus respectivos controles (SC). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Test de Student, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$ .



**Figura 4.8:** Expresión de los genes (a) *FMO1*, (b) *CYP2M1*, (c) *CYP2K1* en hígado de peces expuestos in vivo a CLF a tres tiempos (12, 24 y 48 horas) con sus respectivos controles (SC). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).



**Figura 4.9:** Expresión de los genes de (a) AHR (b) CYP1A (c) ARNT en hígado de peces expuestos in vivo a CLF a tres tiempos (12, 24 y 48 horas) con sus respectivos controles (SC). Los resultados se muestran como media  $\pm$  SD (n = 3). Test de Student, \*  $P < 0.05$ .



## 4.4. Discusión

En este capítulo de la tesis se explora la modulación de la expresión génica de los receptores nucleares PXR y AhR y de un conjunto de genes corriente abajo de los elementos regulatorios de dichos receptores en intestino e hígado de juveniles de *O. mykiss* expuestos a una única dosis de clorpirifos (1,4  $\mu\text{g/L}$ ,  $\sim 1/5$  de la CL50) a lo largo del tiempo de exposición (12, 24 y 48 horas).

La unión de PXR con moléculas exógenas y endógenas regula varias rutas metabólicas y de señalización asociadas con homeostasis energética, metabolismo de los ácidos biliares, ciclo celular, proliferación e inflamación (Konno et al., 2008; Hernandez et al., 2009; Kodama y Negishi. 2013). Los cambios en la expresión de PXR y su genes diana están asociados con la biotransformación de xenobióticos y su eliminación del organismo (Lehmann et al., 1998). En mamíferos, una función fundamental de PXR es detectar la presencia de xenobióticos y regular la expresión de *CYP3A4*, *CYP2B*, *ABCC2*, *ABCC3*, *NF-k $\beta$* , enzimas de fase II como *GST*, *UGT*, *SULTs*, Aldo-ceto reductasa, entre otras. (Fan et al., 2011; Wagner et al., 2005, Qiu et al., 2016; Kliewer et al., 2002; Shelby y Klaassen, 2006).

Lemaire et al., (2004) observaron que CLF es un agonista de la vía PXR en líneas celulares de hepatocitos humanos. Kojima et al., (2011) también observaron inducción de la actividad de PXR humano y de ratón por CLF. Por otro lado, la investigación de las respuestas de la vía PXR en organismos acuáticos frente a la exposición a pesticidas es aún muy limitada. Algunos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* en peces han demostrado que PXR, ABCB1 y CYP3A están involucrados en el metabolismo y la detoxificación de contaminantes ambientales (Lange et al., 2017; Gräns et al., 2015; Wassmur et al., 2010). Sin embargo, la función de PXR y sus genes blanco en la detoxificación del CLF en peces, no ha sido dilucidada aún. Como antecedente más relevante para este trabajo, se puede citar a Wassmur et al., (2010), quienes reportaron que algunos inductores prototípicos de PXR de mamíferos activaban débilmente a PXR de trucha arcoíris.

En esta tesis no se observó un efecto significativo de clorpirifos sobre la expresión del receptor PXR en tejido hepático de trucha arcoíris. Notablemente,

dentro de la familia de genes que serían modulados por PXR, los transportadores de Fase 0/III *ABCB1* y *ABCC2* tuvieron niveles de expresión menores que los del control a las 12 h y a las 12 y 24 h de exposición, respectivamente. Además, la expresión de las enzimas *CYP3A27* y *GST* (ambas reguladas vía PXR en mamíferos) no mostraron efecto de CLF para ningún tiempo de exposición, al igual que el resto de las enzimas de Fase I analizadas, como *CYP2M1*, *CYP2K1*, *CYP1A* y *FMO1* en el mismo tejido. En relación con esto Wassmur et al., (2010) han reportado que un inductor clásico de PXR de mamíferos, dexametasona, disminuye los niveles de ARNm de *PXR* en trucha arcoíris, pero sin afectar los niveles de *CYP3A*, lo que estaría indicando una modulación aparte de la vía de PXR para dicho gen. Algo similar podría estar sucediendo en estos ensayos no solo con la *CYP3A* sino también con los genes de los transportadores *ABCC2* y *ABCB1*. Sin embargo, la expresión de la enzima de Fase II, *UGT*, regulada por PXR en mamíferos, fue inducida en hígado a las 24 horas de exposición a CLF, lo que podría estar indicando una activación débil de la vía. Es importante destacar que la expresión de *AhR* se ha visto reducida en la exposición por 24 h. Cui et al., (2017) han observado en células Hep62 que PCN, un agonista clásico de la vía de PXR, inhibe la expresión de los genes blanco de la vía de activación de AhR, pudiendo existir una modulación cruzada entre ambos receptores. Sería necesario aumentar el número de muestras y utilizar más concentraciones de CLF para poder constatar si *PXR* está o no activado en tejido hepático de trucha arcoíris y cómo su papel sobre los genes blanco podría estar siendo modulado por la expresión de *AhR* y viceversa.

En los análisis de tejido intestinal, la expresión génica de PXR sí mostró un incremento a las 12 h de exposición, sin embargo en hígado la expresión del receptor no se vio afectada. En este sentido, estudios de la expresión diferencial por tejido de PXR en trucha (Wassmur et al., 2010) mostraron que la expresión de este receptor es mayor en hígado que en intestino. Esto apunta a que PXR podría ser más abundante pero menos sensible en hígado que en intestino. En relación con esta discrepancia entre el incremento en la expresión del intestino con la del hígado, serían necesarios nuevos estudios en ambos órganos para confirmar o determinar los resultados. Por otro lado,

el hecho de que solo algunos genes de estudios previos (solo en mamíferos y líneas celulares) se indican como blancos de *PXR* mostrando inducción (Tablas 4.2 y 4.1) sugiere que CLF sería un agonista débil y que sería necesario profundizar este estudio con concentraciones más altas. Los cambios en la expresión de genes de la vía de AhR (*AhR*, *ARNT* y *CYP1A*) en intestino y en menor medida en hígado y la disminución en la expresión de *ABCB1* y *ABCC2* en hígado sugieren una modulación cruzada (cross talk) entre distintas vías de regulación, que será discutida en el capítulo 6.

**Tabla 4.1:** Efectos de CLF en la expresión génica de diversos genes a tres tiempos.

Hígado				
Vía	Gen	Tiempo(h)		
		12	24	48
AhR	<i>CYP1A1</i>	-	-	-
	<i>AHR</i>	-	↓	-
	<i>ARNT</i>	-	-	-
PXR	<i>PXR</i>	-	-	-
	<i>CYP3A27</i>	-	-	-
	<i>GST</i>	-	-	-
	<i>UGT</i>	-	↑	-
	<i>ABCC2</i>	↓	↓	-
	<i>ABCB1</i>	↓	-	-
Enzimas de Fase I (oxidación)	<i>FMO1</i>	-	-	-
	<i>CYP2M1</i>	-	-	-
	<i>CYP2K1</i>	-	-	-

↑ se usa para efecto de inducción, ↓ para efecto de inhibición y - para no

efecto.

**Tabla 4.2:** Efectos de CLF en la expresión génica de diversos genes a tres tiempos.

Intestino				
Vía	Gen	Tiempo(h)		
		12	24	48
AhR	CYP1A1	↓	-	-
	AHR	↓	-	-
	ARNT	↑	-	-
PXR	PXR	↑	-	-
	<i>CYP3A27</i>	-	-	-
	GST	-	-	-
	<i>UGT</i>	-	-	-
	ABCC2/MRP2	-	-	-
	ABCB1/Pgp	-	-	-
Enzimas de Fase I (oxidación)	<i>FMO1</i>	-	-	-
	<i>CYP2M1</i>	-	-	-
	<i>CYP2K1</i>	-	-	-

↑ se usa para efecto de inducción, ↓ para efecto de inhibición y - para no efecto.

## Capítulo 5

# Resultados y discusión hipótesis III

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos en los experimentos realizados para poner a prueba la hipótesis III.

“CLF afecta la función de un tipo de proteínas de transporte responsables de la MXR, las ABCC, produciendo inhibición competitiva, sensibilización o activación de dichas proteínas”

Debido a los antecedentes, en nuestro laboratorio, de estudios que involucran el transporte de tóxicos a través de proteínas ABCC, el interés fue evaluar si clorpirifos era sustrato de las proteínas ABCC, como se había determinado con Microcistina LR. Para ello se midió la tasa de transporte de DNP-SG como sustrato modelo de las proteínas ABCC (responsables de la MXR) en intestino de trucha arcoíris expuesto *ex vivo* a clorpirifos. Además se realizaron estudios de los efectos de dicha exposición a clorpirifos sobre las actividades de enzimas de detoxificación y de un indicador de peroxidación lipídica como lo es el MDA.

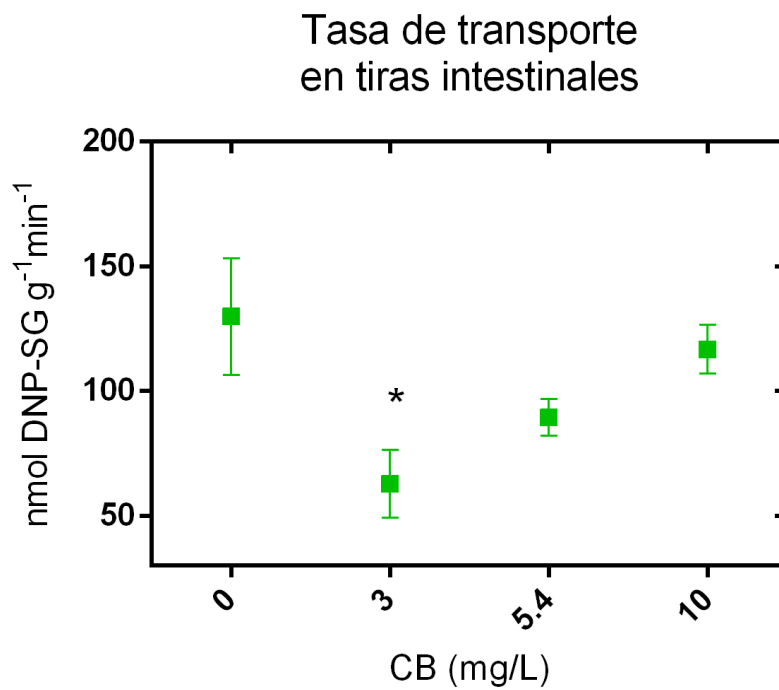
## 5.1. Transporte tiras de intestino expuestas a CLF

Originalmente, se realizó un ensayo de transporte de DNP-SG en tiras de intestino de trucha arcoíris expuestas a tres concentraciones del pesticida Carbaril (3, 5.4 y 10 mg/L), observándose una disminución de la tasa de transporte solo para la concentración de 3 mg/L (ANOVA:  $F = 4.059$ ,  $P < 0.05$  y análisis de comparaciones múltiples de Tukey) (Figura 5.1). Sin embargo los datos son solo informativos ya que en dichos experimentos no se logró una óptima disolución del pesticida en la solución fisiológica de Cortland, notándose interferencia en la lectura. Por lo tanto, decidimos no continuar los experimentos con este pesticida y continuar utilizando como compuesto tóxico y posible agonista de PXR al pesticida clorpirifos y como agonista de la vía AhR a la fracción soluble de petróleo (WAF) en reemplazo de Carbaril.

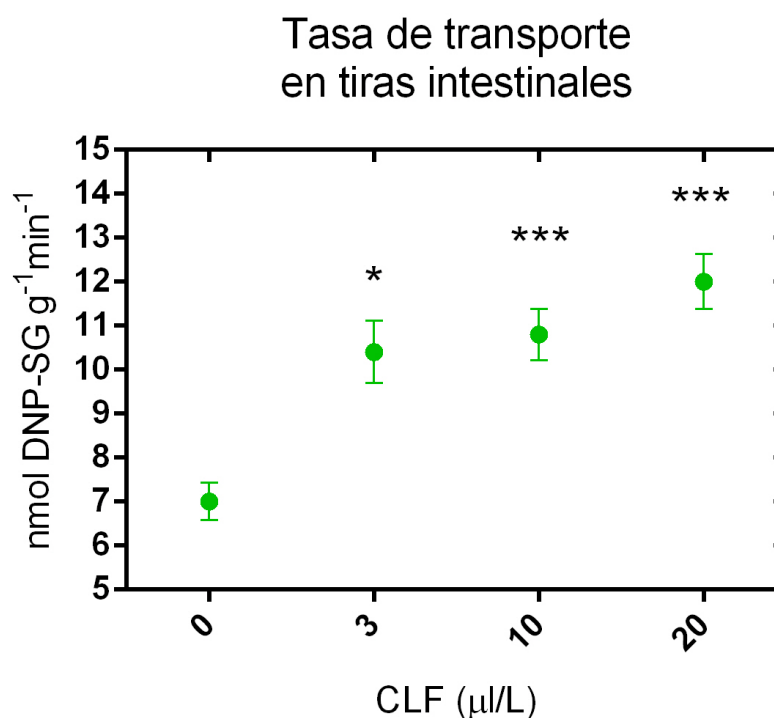
La tasa de transporte de DNP-SG en tiras de intestino de trucha arcoíris, que reflejan la suma de los flujos de transporte basolateral y apical, expuestas a tres concentraciones de CLF (3, 10 y 20  $\mu\text{g/L}$ ) mostró un incremento significativo, que fue dependiente de la concentración (ANOVA:  $F = 13.07$ ,  $P < 0.001$  y comparaciones múltiples de Tukey) (Figura 5.2). Además se realizaron mediciones para concentraciones de 0.1 y 1  $\mu\text{g/L}$  que no mostraron resultados significativos.

## 5.2. Transporte en intestino no evertidos expuestos a CLF

El transporte de DNP-SG en fragmentos intestinales no evertidos permite estudiar el transporte a través de la membrana basolateral de los enterocitos, desde el espacio intracelular hacia el lado serosal de la pared intestinal. La comparación entre el control de solvente y CLF a dos concentraciones, 10 y 20  $\mu\text{g/L}$  no arrojó diferencias significativas (Figura 5.3).



**Figura 5.1:** Transporte de DNP-SG en intestinos de trucha expuestos *ex vivo* a carbaril (0 (control de solvente), 3, 5.4 y 10 mg/L). Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). Anova, seguido de Análisis de Tukey,  $*P < 0.05$ .

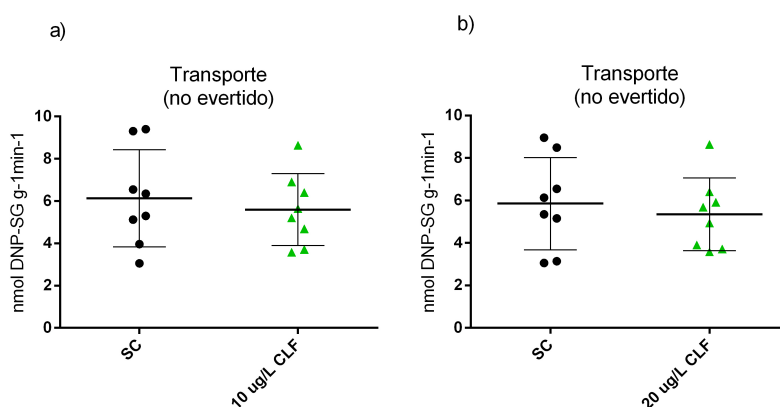


**Figura 5.2:** Transporte de DNP-SG en tiras de intestino de trucha arcoíris expuestas *ex vivo* a clorpirifos (0 (control de solvente), 3, 10 y 20  $\mu\text{g/L}$ ). Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). Anova de una vía para efecto de CLF, seguido de comparaciones múltiples de Tukey, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

### 5.3. Transporte en intestinos evertidos expuestos a CLF

En los segmentos intestinales evertidos, que permiten estudiar el transporte apical, (desde el espacio intracelular hacia el lumen intestinal), el transporte de DNP-SG en tratados *ex vivo* con 10  $\mu\text{g/L}$  de CLF no mostró diferencias con respecto al control (Figura 5.4). Sin embargo, cuando se realizó la exposición con una concentración de 20  $\mu\text{g/L}$ , sí, se observaron diferencias significativas con respecto al control. Esta última concentración de CLF produjo un incremento del 40% en la tasa de transporte de DNP-SG con respecto al control (Test para muestras pareadas,  $P < 0.05$ )

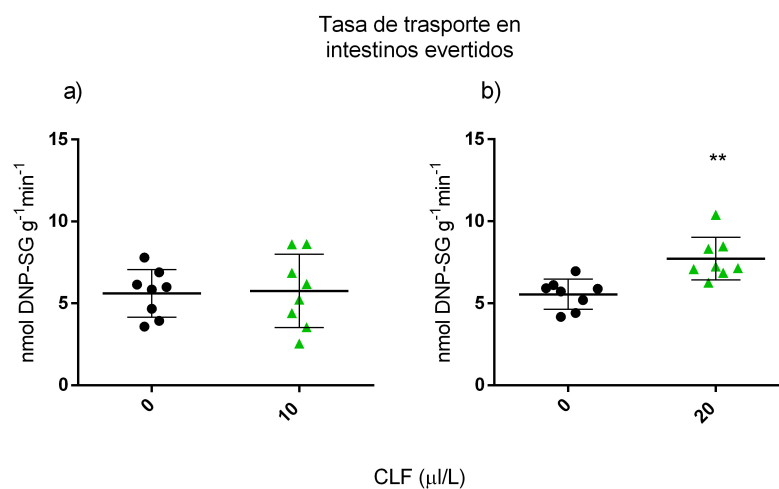




**Figura 5.3:** Transporte de DNP-SG en segmentos de intestino de trucha arcoíris no evertidos expuestos *ex vivo* a clorpirifos. Las muestras son pareadas (a) Tratados con 10 µg/L de CLF (b) Tratados con 20 µg/L de CLF vs. 0 µg/L (control de solvente). Los valores se expresan como media  $\pm$  SD ( $n = 8$ ).

## 5.4. Efectos tóxicos de CLF en tiras de intestino

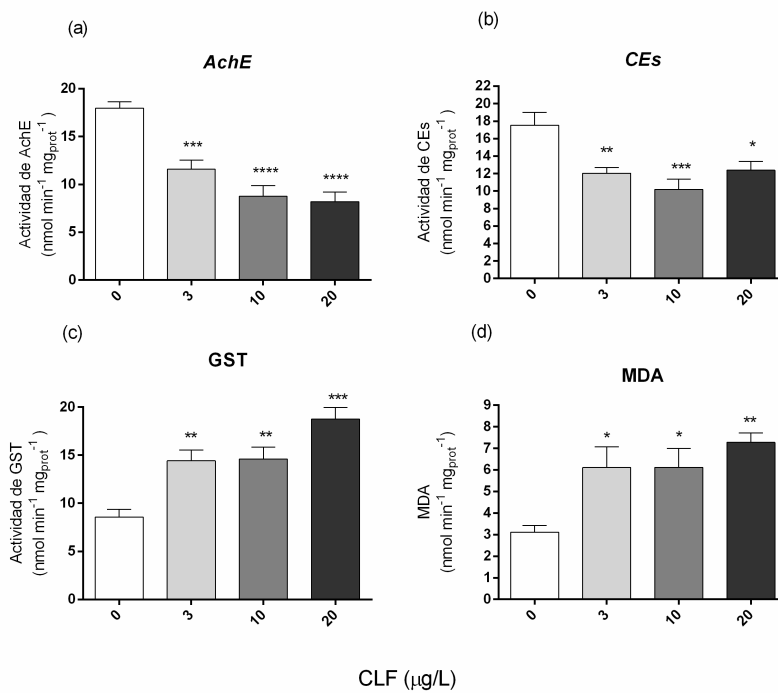
Se estudió el efecto de CLF en preparaciones *ex vivo* de intestino (tiras) expuestas por 1 hora con el fin de conocer cómo se afectan las enzimas relevantes. La actividad de AChE resultó inhibida por CLF (ANOVA  $F = 22.63$ ,  $P < 0.0001$ ,  $N = 6$  y posterior análisis de comparaciones múltiples de Tukey). Las tres concentraciones de CLF utilizadas en los ensayos redujeron la actividad de AChE significativamente, 3 µg/L en un 35.6%, 10 µg/L en un 51.4% y 20 µg/L en un 54.5% con respecto control (Figura 5.5a). La actividad de CE también resultó ser inhibida por CLF (ANOVA:  $F = 7.817$ ,  $P < 0.001$ ,  $N = 6$  y posterior análisis de comparaciones múltiples de Tukey), la concentración de 3 µg/L la inhibió en un 31.5%, la de 10 µg/L en un 41.7% y la de 20 µg/L en un 29.2% en relación al control (Figura 5.5b). La actividad de GST también resultó afectada por las tres concentraciones de CLF a las que fueron expuestas las preparaciones intestinales, evidenciando una inducción significativa (ANOVA  $F = 14.44$   $P < 0.0001$  y posterior el análisis de comparaciones múltiples de Tukey). Las concentraciones de 3 y 10 µg/L



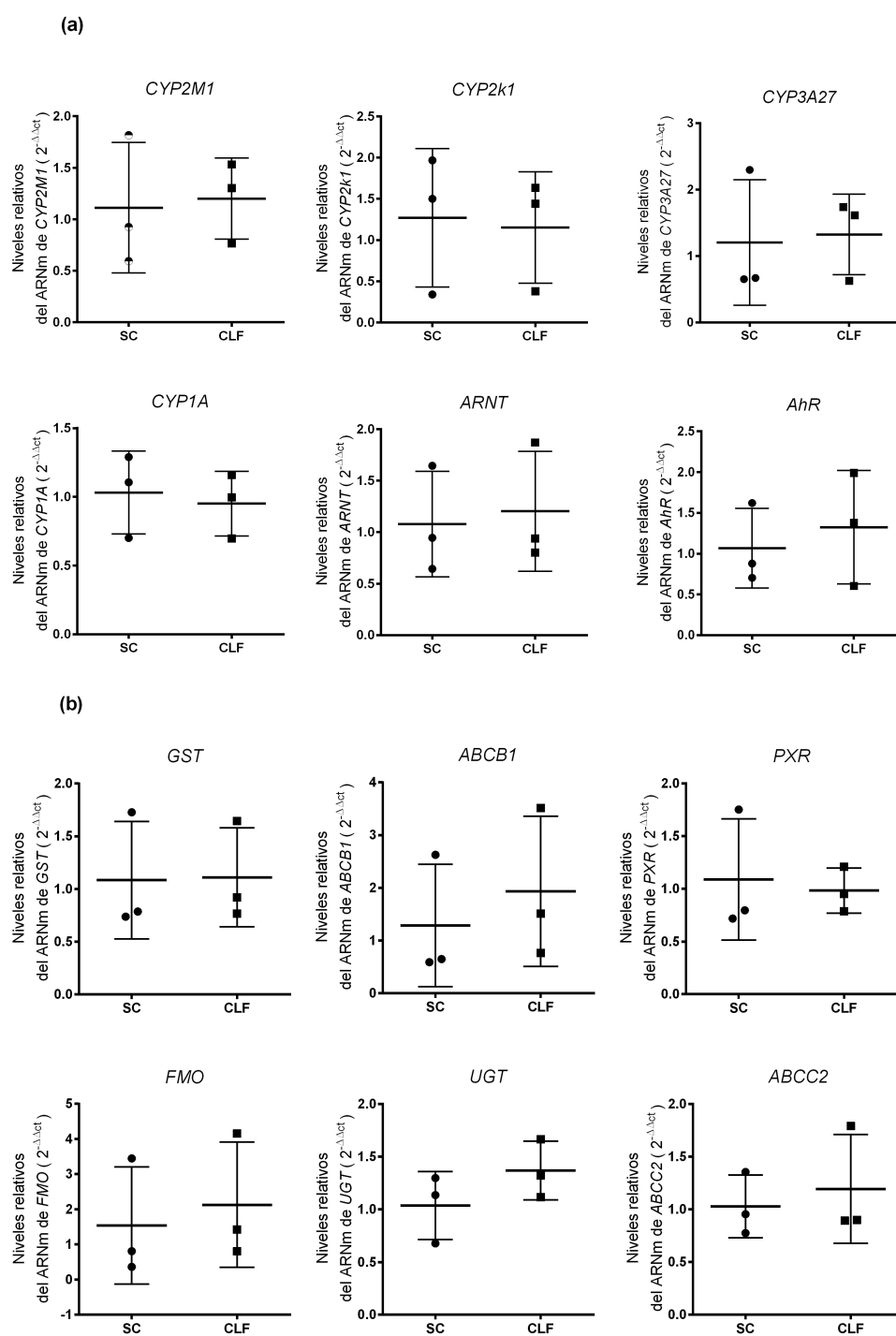
**Figura 5.4:** Transporte de DNP-SG en segmentos de intestinos evertidos tratados *ex vivo* a clorpirifos. Las muestras son pareadas (a) Tratados con 10 µg/L de CLF (b) Tratados con 20 µg/L de CLF vs 0 µg/L (control de solvente). Los valores se expresan como media ± SD ( $n = 8$ ). \*\* $P < 0.01$ .

indujeron un incremento aproximado del 70 % mientras que con 20 µg/L el aumento fue del 119 % con respecto al control (Figura 5.5c). Además, se detectó un incremento significativo de TBARS (índice de daño oxidativo a lípidos) con las tres concentraciones de CLF utilizadas, 100 % de aumento con las concentraciones de 3 y 10 µg/L y un 131 % con la de 20 µg/L de CLF (Figura 5.5d).

Por último, las tiras intestinales expuestas por 1 h a 20 µg/L de CLF durante 1 h ( $N = 3$ ) fueron procesadas para un análisis de expresión de 12 genes de interés de las vías PXR y AhR y de enzimas detoxificantes (*CYP1A*, *CYP2M1*, *UDPGT*, *CYP2K1*, *ABCC2/MRP2*, *CYP3A27*, *FMO1*, *PXR*, *GST*, *ABCB1/Pgp*, *AhR* y *ARNT*), utilizando como gen de referencia constitutivo (housekeeping) la *β-actina*. Este estudio se realizó con el fin de conocer si se producen respuestas de expresión génica a CLF en el término de las exposiciones *ex vivo* realizadas en esta tesis. Ninguno de los genes analizados mostró efectos significativos de CLF. En la Figura 5.6a,b se muestra la expresión de ARNm de los genes analizados en tratados y controles.



**Figura 5.5:** Efectos en tiras intestinales tratadas *ex vivo* a CLF a cuatro concentraciones 0 (control de solvente), 3, 10 y 20 µg/L (a) Actividad enzimática de acetilcolinesterasa (b) Actividad enzimática de Carboxilesterasas (c) Actividad enzimática de Glutathión-S-transferasa (d) Concentración de MDA. Los resultados se muestran como media  $\pm$  SEM ( $N = 6$ ). Anova de una vía para efecto de CLF, seguido de comparaciones múltiples de Tukey, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .



**Figura 5.6:** Expresión de ARNm de genes de (a) citocromo p450 (*CYP2M1*, *CYP2K1*, *CYP3A27* y *CYP1A*), *ARNT* y *AhR*. (b) *GST*, *ABCB1*, *PXR*, *FMO*, *UGT* y *ABCC2*. Control Solvente (SC) versus CLF a 20 µg/L. Los resultados se muestran como media ± SD ( $n = 3$ ). Test *t* de Student para muestras pareadas, sin efectos significativos.

## 5.5. Discusión y Conclusiones

### 5.5.1. Transporte de DNP-SG

Considerando los escasos antecedentes en cuanto al transporte de CLF a través de la membrana celular, este capítulo se basó en determinar la participación de transportadores ABCC en la excreción y/o absorción de CLF, en el intestino de *O. mykiss* o si alguno de estos pesticidas afecta la capacidad de transporte de estas proteínas sin ser sustrato de las mismas. La actividad de estos transportadores se evaluó en preparaciones *ex vivo*, utilizando el sustrato DNP-SG.

Por otro lado, el transporte de DNP-SG en tiras intestinales expuestas *ex vivo* a tres concentraciones de CLF tuvo un incremento significativo con respecto al control, que fue concentración-dependiente. Esto sugiere que CLF estimula la actividad de un transportador ABCC, probablemente a través de regulación postraduccional. Desafortunadamente, casi no existen en la literatura trabajos que analicen el efecto de pesticidas sobre las funciones de transporte de xenobióticos en preparaciones *ex vivo* ni tampoco en estudios *in vivo* con exposiciones por una o pocas horas. De manera que no se pueden comparar los resultados de este experimento en forma directa. El primer estudio que vincula un transportador de membrana de la familia ABC con el pesticida CLF es Lanning et al., (1996), que muestra un incremento en la expresión de ABCB1/Pgp en tejido adrenal, riñón, hígado, yeyuno y estómago de ratas Fisher 344 tratadas *in vivo* durante 2 días con CLF. Además, estos autores informaron que CLF-oxón estimula la actividad ATPasa mediada por ABCB1 *in vitro* 20 min, en células Sf9 que sobre-expresaban ABCB1, mientras que la forma parental (CLF) no tenía efecto. Agarwala y Cook (2004) también observaron un incremento en la función de ABCB1. Al tratar células intestinales humanas (Caco-2) con CLF durante 8 h notaron un aumento en la tasa de eflujo de Verapamilo (Sustrato de ABCB1) con respecto a las células control, sugiriendo una acción inductiva de CLF sobre la función del transportador. Además de una inducción en la expresión génica de ABCB1. Por último, dichos autores sugieren que CLF tiene el potencial de modular la

biodisponibilidad de xenobióticos a través de la función de transporte de salida de membrana. Siguiendo en esta línea, Zaja et al., (2011) realizaron un ensayo de la actividad ATPasa específica de Pgp en líneas celulares PLHC-1/dox expuestas a CLF y observaron un aumento de dicha actividad ATPasa con respecto a las células control. Sin embargo, no observan acumulación de Calceína AM (sustrato de ABCB1 y ABCC). Un estudio más reciente, Halwachs et al., (2016) ha mostrado que la actividad del transportador ABCG2/BCRP medida por el eflujo del fluoróforo Hoechst 33342 interactúa con el pesticida CLF. Mostrando una inhibición dependiente de la concentración en la excreción de H33342 en células polarizadas MDCKII que expresaban ABCG2. Asimismo, con microscopía confocal confirmaron la presencia de BCRP en la membrana apical y observaron un transporte preferencial de CLF marcado con  $^{14}\text{C}$  de basolateral a apical. Estos autores plantean que, en general, un papel significativo de ABCB1 en el transporte de CLF parece poco probable, pero no descartan la participación de otros transportadores ABC expresados endógenamente (Kneuer et al., 2007), como los ABCC.

Los estudios de transportadores en relación con el flujo de CLF, no sólo son raros sino que también son heterogéneos. Ninguno de los estudios expuestos arriba pudo dilucidar íntegramente por cual transportador/es estaría siendo expulsado CLF. A nuestro entender, no existen estudios que exploren la relación entre los transportadores ABCC y el pesticida CLF en peces. El incremento del flujo de transporte de DNP-SG en intestino de trucha arcoíris bajo la exposición a CLF observado en esta tesis se condice con el incremento de la actividad de ATPasas observada para otros transportadores como ABCB1 en el estudio de Agarwala y Cook (2004). Particularmente, el experimento de segmentos evertidos mostró un incremento en la tasa de transporte apical de DNP-SG inducido por CLF, al igual que en las tiras intestinales, mientras que el transporte basolateral (en segmentos no evertidos) no cambió frente a la exposición a CLF. Esto sugiere que solo las ABCC apicales (típicamente ABCC2) serían estimuladas por el pesticida. La activación del transporte por ABCC2 sugiere que CLF no es sustrato de esta proteína, ya que si lo fuera, competiría con DNP-SG por los sitios de transporte, resultando en la inhibición concentración-dependiente del transporte de DNP-SG,

como se ha probado para microcistina-LR y para AsIII en trabajos de nuestro laboratorio (Bieczynski et al., 2014 y 2016). Los resultados de esta tesis permiten proponer que CLF modula positivamente la actividad del transportador ABCC2, probablemente por fosforilación. Esto podría aumentar la tasa de excreción de otros contaminantes que se encuentren en el agua junto con CLF. Hacen falta nuevos estudios, con otros sustratos marcadores para identificar la vía de excreción de CLF en el intestino, el hígado y en otros órganos de los peces.

### 5.5.2. Efectos tóxicos de clorpirifos en tiras intestinales

En lo que concierne a las actividades enzimáticas, las acetilcolinesterasas y carboxilesterasas se consideran objetivos específicos de los pesticidas organofosforados, por lo que la inhibición de AChE, tanto como la de CEs a las tres concentraciones de exposición a CLF, nos estaría indicando que el sistema de detoxificación se encuentra activo y responde específicamente a dicho pesticida. La actividad de la enzima GST aumentó a las tres concentraciones de CLF que fueron expuestas las tiras. La GST, entre muchas otras reacciones, cataliza la conjugación con GSH de compuestos que serán luego sustratos de ABCC. Por ejemplo, CDNB es permeable a la membrana celular y una vez dentro de la célula es conjugado con GSH para luego ser exportado como DNP-SG. Por lo tanto, un incremento de la actividad de GST sería indicador de que el sistema de conjugación con GSH y probablemente el transporte por ABCC se encuentra activado. Lo que también podría explicar el aumento del transporte de DNP-SG observado en tiras y en segmentos evertidos intestinales. Simultáneamente, el incremento de MDA muestra un daño oxidativo a lípidos también en las tres concentraciones de CLF a las que fueron expuestas las tiras intestinales. Dicho incremento se condice con el efecto sobre las enzimas AChE y CEs, por lo que además de inactivar esterasas hay un efecto pro-oxidante de CLF. En el trabajo de Sharbidre et al., (2011), se muestra que en peces (*Poecilia reticulata*) expuestos CLF se induce la peroxidación lipídica medida como TBARS. La peroxidación lipídica puede considerarse como el primer paso del daño a las membranas de la célula por OPs (Avellini

et al., 1993) que podría continuar con daño a proteínas y a ADN.

Por último, los niveles de ARNm para los doce genes analizados en las tiras intestinales expuestas a la máxima concentración de CLF utilizada (20  $\mu\text{g/L}$ ) no tuvieron efectos de inducción y/o inhibición. La exposición *ex vivo* por una hora al pesticida parece no ser suficiente para modificar la expresión de los genes analizados. A nuestro entender, son pocos los trabajos que involucran estímulos tan cortos de exposición a pesticidas. La interacción de los procesos transcripcionales y post-transcripcionales en la regulación de la expresión génica ha sido ampliamente estudiada en mamíferos, pero hasta ahora se conoce poco en otros vertebrados. Estudios de expresión génica en exposiciones de tan corto tiempo son raros, Götting et al., (2017) realizan un estudio, en células de globulos rojos de peces, sobre cambios del ARNm y su estabilidad en relación a la velocidad de transcripción y observan un incremento en la transcripción de HIF1a después de 4 horas de estimulación  $\beta$ -adrenérgica, lo que estaría indicando una regulación relativamente rápida, pero en un tiempo 3 veces por encima del utilizado en esta tesis. La mayoría de los vertebrados no mamíferos se enfrentan a señales ambientales y estresores distintos tipos y, por lo tanto, es probable que las estrategias de expresión génica difieran entre grupos.



## Capítulo 6

# Discusión y conclusiones finales

En esta tesis, se han abordado los efectos de exposiciones a WAF (fracción soluble de petróleo) y al pesticida clorpirifos (CLF), sobre mecanismos de detoxificación en la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss*, incluyendo actividades de enzimas de detoxificación y expresión génica de receptores nucleares, de genes de respuesta a estrés, de respuesta inmune y de enzimas de detoxificación y antioxidante. La mayoría de los estudios de compuestos tóxicos se basan en experimentos de exposición única, pero en el ambiente, los contaminantes aparecen más frecuentemente formando parte de mezclas. Por lo tanto, es relevante estudiar las interacciones toxicológicas que pueden surgir de la exposición a distintos compuestos tóxicos presentes en el medio acuático en forma simultánea o secuencial.

Muchas enzimas claves en los mecanismos de detoxificación, comunes a todos los vertebrados, están reguladas por los receptores nucleares PXR y AhR. Utilizamos peces de la especie *O. mykiss* como modelo para detectar los efectos de compuestos tóxicos comunes en la región, como el pesticida organofosforado clorpirifos y WAF realizada a partir de petróleo crudo obtenido del Arroyo La Mina, ubicado cerca de San Carlos de Bariloche. La exposición *in vivo* de los peces a WAF evidenció una clara activación de la vía del receptor nuclear AhR, reflejada en el aumento de la expresión de dicho receptor y de su gen blanco clave *CYP1A*. Esto coincide con muchos estudios realizados con ligandos de alta afinidad (Por ejemplo, 2,3,7,8- tetraclorodibenzo-p-dioxina

(TCDD, dioxina), dibenzofuranos y bifenilos, numerosos HAP y productos químicos similares a los HAP, como la beta-naftoflavona. Por ejemplo, en peces como la dorada de Japón (*Pagrus major*) se demostró que AhR, al ser activado por un ligando, induce la transcripción de ARNm de *AhR* (auto-inducción), amplificando la transducción de señal de sus genes blanco aguas abajo (Bak et al., 2017). A diferencia de trabajos previos, que demostraron la autoinducción de *AhR* de peces, incluyendo a *O. mykiss*, Bak et al., (2017) mostraron la existencia de un elemento de respuesta a xenobióticos (XRE) funcional en la secuencia de *AhR*. En esta tesis, además de registrar una fuerte inducción de la expresión de *AhR* y de su blanco característico *CYP1A* en hígado de *O. mykiss* expuestas a WAF, registramos una disminución de la expresión de ARNm del translocador de AHR (*ARNT*). Cabe destacar que una regulación negativa de *ARNT* junto a la inducción de la vía de AhR no ha sido descrita hasta ahora para ninguna especie. Esta hipo-regulación de la expresión del ARNT, que se ha visto en los experimentos de la hipótesis I en hígado, podría ocurrir como un efecto específico de la activación de esta vía por HAPs o, alternativamente, por efecto directo de algún compuesto presente en la WAF sobre *ARNT*. En los experimentos de la hipótesis II para intestino se ha observado que la inhibición de la vía de AhR por exposición a CLF, se asociaba a una inducción de la expresión de *ARNT*, sin embargo para hígado la expresión del ARNT no se afectó a ningún tiempo de exposición a CLF. Es probable que la vía de AhR sea regulada negativamente a través de *ARNT*, que a su vez es fundamental para la activación de la misma vía. Esto constituiría un mecanismo de retroalimentación negativa que limita la amplitud de respuesta a esta mezcla de compuestos tóxicos. Considerando que este mecanismo no ha sido descrito hasta ahora para ninguna especie, es de suma importancia profundizar estos estudios.

Vogel et al., (2014) observan una interacción, “crosstalk”, entre las vías NK-K $\beta$  y AhR, específicamente observan que un estímulo inflamatorio por LPS (lipopolisacáridos) inducen la expresión de *AhR* y de *CYP1A*. Sin embargo cuando además utilizan un inhibidor de NF-K $\beta$  la expresión de *AhR* y *CYP1A* no se estimula. Se sabe que la vía de señalización de NF-k $\beta$  se puede inducir por el efecto estimulante de la citoquina TNF- $\alpha$  (Hong et al., 2013;

---

Kono et al., 2006; Zhang et al., 2012). En esta tesis se observó un aumento de la expresión de TNF- $\alpha$ , debida al factor clorpirifos, lo que podría sugerir una activación de la vía NF-K $\beta$ . Esta activación de la vía NF-K $\beta$  como posible moduladora de *AhR* nos permitiría explicar las diferencias significativas entre los tratamientos WAF-SC vs WAF-CLF en la expresión de *AhR* y las diferencias entre los mismos tratamientos para la expresión proteica de CYP1A. Por otro lado, es importante considerar que las células con respuesta inmune activada serían más sensibles a la modulación por ligandos de AhR.

En lo que concierne a la activación de la vía de PXR por CLF abordada en la hipótesis II, capítulo 4 de esta tesis, hemos podido detectar una inducción significativa de PXR sólo en tejido intestinal, sin embargo ninguno de los genes blanco de dicho receptor se vio inducido en intestino, por lo que podría sugerirse que CLF es un inductor débil de dicha vía. Recientemente, se han llevado a cabo estudios de interacción de las vías de AhR y PXR, por ejemplo Cui et al., (2017) observan en células HepG2 que PXR inhibe el daño a ADN inducido por Benzopireno (agonista de AhR). Específicamente observan que un agonista de la vía PXR inhibe la expresión de *AhR* y sus genes blanco, como *CYP1A*. La expresión de PXR incrementada en intestino podría estar también relacionada con la disminución de la expresión de *AHR* y de *CYP1A* en el mismo tejido y bajo el mismo tratamiento. En simultáneo, sería interesante para estudios futuros, conocer qué papel juega ARNT, incrementado en este experimento, en este “cross talk” entre AhR y PXR. En el hígado, la expresión del PXR no tuvo efectos significativos. En esta tesis, no hemos podido determinar si clorpirifos es agonista de la vía PXR en este tejido debido a la magnitud de la variación individual, consideramos que los experimentos de la hipótesis II deberían continuarse con mayor número de réplicas y con varias concentraciones de CLF. Sin embargo, nos parece relevante destacar que a las 24 h de exposición uno de los genes blanco de PXR, *UGT*, se vio incrementado en su expresión. Por otro lado, la expresión de los genes de los transportadores de xenobióticos *ABCC2* y *ABCB1*, que han sido propuestos como blancos de PXR, fue hipo-regulada en hígado de individuos expuestos a CLF, al igual que la expresión de *AHR* a por lo menos uno de los tiempos de exposición. De manera similar, Bao et al., (2018) observaron

en peces una discrepancia entre la expresión del ARNm de *PXR* y sus genes blanco *CYP3A* y *ABCC2* dependiendo del tiempo de exposición a una droga hipocolesterolémica. Curiosamente, la expresión de *ABCC2* se mostró incrementada en hígados expuestos a WAF (hipótesis I), por lo que existiría un indicio de que la regulación de dicho transportador estaría relacionada con AhR. Diao et al., (2010) observan en células humanas y en hepatocitos de ratas que *TNF- $\alpha$* , *IL-6* y *IL-8* modulan la expresión de *ABCC2*. En esta tesis los hígados que mostraron una inducción del transportador *ABCC2* tenían también incrementados los niveles de ARNm de *TNF- $\alpha$* , *IL-6* y *IL-8* por lo que esta modulación podría estar ocurriendo. Conjuntamente, hay trabajos que proponen que la expresión de *ABCC2* es inducida por el factor de transcripción Nrf2 (Maher et al., 2007; Malhotra, et al., 2010; Agyeman, et al., 2012) que a su vez, puede ser activado por AhR (Miao et al., 2005).

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se puede concluir que:

- Los hidrocarburos presentes en la WAF inducen la vía del receptor AhR, activando la expresión de dicho receptor y la de su gen blanco característico *CYP1A*. Sin embargo dicha activación no tiene incidencia sobre la toxicidad de clorpirifos en hígado de *O. mykiss*.
- La expresión del ARNm del translocador del receptor AhR, *ARNT*, disminuye cuando se activa la vía de AhR en hígado e intestino de *O. mykiss*.
- Clorpirifos estimula la actividad de proteínas transportadoras de la familia ABCC en intestino de *O. mykiss*.
- Clorpirifos induce la vía del receptor nuclear PXR débilmente y disminuye la expresión de genes de la vía de AhR en intestino y en hígado de *O. mykiss*.

# Bibliografía

Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107-123.

Abnet, C. C., Tanguay, R. L., Hahn, M. E., Heideman, W., & Peterson, R. E. (1999). Two forms of aryl hydrocarbon receptor type 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) evidence for differential expression and enhancer specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), 15159-15166.

Agarwala, S., Chen, W., & Cook, T. J. (2004). Effect of chlorpyrifos on efflux transporter gene expression and function in Caco-2 cells. *Toxicology in vitro*, 18(4), 403-409.

Agamy, E. (2012). Histopathological changes in the livers of rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) following exposure to crude oil and dispersed oil. *Toxicologic pathology*, 40(8), 1128-1140.

Agyeman, A. S., Chaerkady, R., Shaw, P. G., Davidson, N. E., Visvanathan, K., Pandey, A., & Kensler, T. W. (2012). Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast epithelial cells reveals common expression profiles. *Breast cancer research and treatment*, 132(1), 175-187.

Akbay, A., Cinar, K., Uzunalimoglu, O., Eranil, S., Yurdaydin, C., Bozkaya, H., & Bozdayi, M. (1999). Serum cytotoxin and oxidant stress markers in N-acetylcysteine treated thioacetamide hepatotoxicity of rats. *Human & experimental toxicology*, 18(11), 669-676.

Alvarez, A. I., Merino, G., Molina, A. J., Pulido, M. M., McKellar, Q. A., & Prieto, J. G. (2006). Role of ABC transporters in veterinary drug research and parasite resistance. *Current drug delivery*, 3(2), 199-206.

An, K. W., Shin, H. S., & Choi, C. Y. (2008). Physiological responses and expression of metallothionein (MT) and superoxide dismutase (SOD) mRNAs in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to benzo a pyrene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(3), 534-539.

Andreasen, E. A., Hahn, M. E., Heideman, W., Peterson, R. E., & Tanguay, R. L. (2002). The zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor type 1 is a novel vertebrate receptor. *Molecular pharmacology*, 62(2), 234-249.

Anguiano, O. L., & de D'Angelo, A. P. (2007). Provincia de Río Negro y Provincia de Neuquén. *La problemática de los agroquímicos y sus envases, la incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente*, 181-201.

Anguiano, O. L., Ferrari, A., Soleno, J., Martinez, M. C., Venturino, A., De D'Angelo, A. M. P., & Montagna, C. M. (2008). Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(10), 2117-2123.

Arkoosh, M. R., Boylen, D., Dietrich, J., Anulacion, B. F., Ylitalo, G. M., Bravo, C. F., Johnson, L. L., Loge, F. J. & Collier, T. K. (2010). Disease susceptibility of salmon exposed to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Aquatic Toxicology* 98, 51â59.

Arnold, H., Pluta, H. J., & Braunbeck, T. (1995). Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton *in vivo*: ultrastructural, stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 33(1), 17-43.

---

Arukwe, A., Knudsen, F. R., & Goksoyr, A. (1997). Fish zona radiata (eggshell) protein: a sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environmental Health Perspectives* 105(4), 418.

Arukwe, A., Nordtug, T., Kortner, T. M., Mortensen, A. S., & Brakstad, O. G. (2008). Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. *Environmental research*, 107(3), 362-370.

Assem, M., Schuetz, E. G., Leggas, M., Sun, D., Yasuda, K., Reid, G., & Moore, D. D. (2004). Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *Journal of Biological Chemistry*.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)., (1997). Toxicological Profile for Chlorpyrifos. US Department of Health and Public Services, Atlanta, GA.

Avellini, L., Spaterna, A., Reboldi, G. P., & Gaiti, A. (1993). Defence mechanisms against free radical-induced damage in sheep, cattle and dog erythrocytes. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 106(2), 391-394.

Awasthi, Y. C., Awasthi, S., & Zimniak, P. (1997). Multiple transport proteins involved in the detoxification of endo- and xenobiotics. *Frontiers Biosci*, 2, 427-d437.

Baird, W. M., Hooven, L. A., & Mahadevan, B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and molecular mutagenesis*, 45(2-3), 106-114.

Bak, S. M., Iida, M., Soshilov, A. A., Denison, M. S., Iwata, H., & Kim, E. Y. (2017). Auto-induction mechanism of aryl hydrocarbon receptor 2 (AHR2) gene by TCDD-activated AHR1 and AHR2 in the red seabream (*Pagrus major*). *Archives of toxicology*, 91(1), 301-312.

Baldwin, W. S., & Roling, J. A. (2008). A concentration addition model for the activation of the constitutive androstane receptor by xenobiotic mixtures. *Toxicological sciences*, *107*(1), 93-105.

Ballatori, N., & Villalobos, A. R. (2002). Defining the molecular and cellular basis of toxicity using comparative models. *Toxicology and applied pharmacology*, *183*(3), 207-220.

Bao, S., Nie, X., Liu, Y., Wang, C., & Liu, S. (2018). Response of PXR signaling pathway to simvastatin exposure in mosquitofish (*Gambusia affinis*) and its histological changes. *Ecotoxicology and environmental safety*, *154*, 228-236.

Bard, S. M. (2000). Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, *48*(4), 357-389.

Barron, M. G. (1990). Bioconcentration. Will water-borne organic chemicals accumulate in aquatic animals?. *Environmental science & technology*, *24*(11), 1612-1618.

Baron, R. L. (1991). Carbamate Insecticides en Handbook of Pesticide Toxicology, Volume 3, Classes of Pesticides. *Academic Press, Inc. New York*.

Bassil, K. L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D. C., Kaur, J. S., & Kerr, K. J. (2007). Cancer health effects of pesticides: systematic review. *Canadian Family Physician*, *53*(10), 1704-1711.

Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in enzymology* (Vol. 52, pp. 302-310). *Academic Press*.

Bemanian, V., Male, R., & Goksoyr, A. (2004). The aryl hydrocarbon receptor-mediated disruption of vitellogenin synthesis in the fish liver: Cross-talk between AHR-and ER $\alpha$  -signalling pathways. *Comparative hepatology*, *3*(1), 2.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of fish diseases*, *22*(1), 25-34.



---

Bieczynski, F., Torres, W. D., Paineofilu, J. C., Castro, J. M., Bianchi, V. A., Frontera, J. L., & Luquet, C. M. (2016). Alterations in the intestine of Patagonian silverside (*Odontesthes hatcheri*) exposed to microcystin-LR: Changes in the glycosylation pattern of the intestinal wall and inhibition of multidrug resistance proteins efflux activity. *Aquatic Toxicology*, 178, 106-117.

Bieczynski, F., De Anna, J. S., Pirez, M., Brena, B. M., Villanueva, S. S., & Luquet, C. M. (2014). Cellular transport of microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across the intestinal wall: Possible involvement of multidrug resistance-associated proteins. *Aquatic toxicology*, 154, 97-106.

Bilbao, E., Raingeard, D., De Cerio, O. D., Ortiz-Zarragoitia, M., Ruiz, P., Izagirre, U., ... & Cancio, I. (2010). Effects of exposure to Prestige-like heavy fuel oil and to perfluorooctane sulfonate on conventional biomarkers and target gene transcription in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus*. *Aquatic Toxicology*, 98(3), 282-296.

Boelsterli, U. A. (2007). Mechanistic toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. CRC Press.

Booher, L. E., & Janke, B. (1997). Air emissions from petroleum hydrocarbon fires during controlled burning. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 58(5), 359-365.

Brown, C. M., Reisfeld, B., & Mayeno, A. N. (2008). Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug metabolism reviews*, 40(1), 1-100.

Browne, E., Kelley, M., Zhou, G. D., He, L. Y., McDonald, T., Wang, S., & Gallagher, E. (2010). In situ biomonitoring of juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) using biomarkers of chemical exposures and effects in a partially remediated urbanized waterway of the Puget Sound, WA. *Environmental research*, 110(7), 675-683.

Calò, M., Licata, P., Bitto, A., Cascio, P. L., Interdonato, M., & Altavilla, D. (2014). Role of AHR, AHRR and ARNT in response to dioxin-like PCBs in *Spaurus aurata*. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(24), 14226-14231.

Canova, S., Degan, P., Peters, L. D., Livingstone, D. R., Voltan, R., & Venier, P. (1998). Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo a pyrene. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *399*(1), 17-30.

Carr, R. L., & Chambers, J. E. (1996). Kinetic Analysis of the *in Vitro* Inhibition, Aging, and Reactivation of Brain Acetylcholinesterase from Rat and Channel Catfish by Paraoxon and Chlorpyrifos-oxon. *Toxicology and applied pharmacology*, *139*(2), 365-373.

Castillo-Briceño, P., Sepulcre, M. P., Chaves-Pozo, E., Meseguer, J., García-Ayala, A., & Mulero, V. (2009). Collagen regulates the activation of professional phagocytes of the teleost fish gilthead seabream. *Molecular immunology*, *46*(7), 1409-1415.

Cazau, L., Cortiñas, J., Reinante, S., Asensio, M., Bechis, F. Apreda, D., 2005. Cuenca de Ñirihuau, in: Chebli, G.A., Cortiñas, J., Spalletti, L.A., Legarreta, L. y Vallejo, E.L. (Eds.), Frontera Exploratoria de la Argentina. 6° Congreso de Exploración y Desarrollo de Hidrocarburos Actas, Mar del Plata, pp. 251-273.

Celander, M. C. (2011). Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquatic toxicology*, *105*(3-4), 72-77.

Chen, S. X., Bogerd, J., García-López, Á., de Jonge, H., de Waal, P. P., Hong, W. S., & Schulz, R. W. (2010). Molecular cloning and functional characterization of a zebrafish nuclear progesterone receptor. *Biology of reproduction*, *82*(1), 171-181.

- 
- Chen, Y., Tang, Y., Guo, C., Wang, J., Boral, D., & Nie, D. (2012). Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochemical pharmacology*, *83*(8), 1112-1126.
- Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., & Eggen, R. I. (2008). Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and comparative endocrinology*, *155*(1), 31-62.
- Chiang, J. Y. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of lipid research*, *50*(10), 1955-1966.-551.
- Chovanec, A.; Hofer, R. y Schiemer, F. (2003) Fish as bioindicators. En: Bioindications and Biomonitoring. Principles: Concepts and Applications (Eds. Markert, B.A.; Breure, A.M. y Zechmeister, H.G) Elsevier, Oxford, p. 639 - 676.
- Clark, B. W., & Di Giulio, R. T. (2012). *Fundulus heteroclitus* adapted to PAHs are cross-resistant to multiple insecticides. *Ecotoxicology*, *21*(2), 465-474.
- Clark, K. E., Gobas, F. A., & Mackay, D. (1990). Model of organic chemical uptake and clearance by fish from food and water. *Environmental science & technology*, *24*(8), 1203-1213.
- Cok, I., Wang-Buhler, J. L., Kedzierski, M. M., Miranda, C. L., Yang, Y. H., & Buhler, D. R. (1998). Expression of CYP2M1, CYP2K1, and CYP3A27 in brain, blood, small intestine, and other tissues of rainbow trout. *Biochemical and biophysical research communications*, *244*(3), 790-795.
- Compagnuccu, L., Semenas, L. G., & Ubeda, C. A. (1992). Nutrición v alimentación en pisciculturas rurales. *Rev. Arg. Prod. Anim*, *12*(1), 95-113.
- Cooper, P. S. (1999). Altered expression of the xenobiotic transporter P-glycoprotein in liver and liver tumours of mummichog *Fundulus heteroclitus* from a creosote-contaminated environment. *Biomarkers*, *4*(1), 48-58.

Croom, E. L., Wallace, A. D., & Hodgson, E. (2010). Human variation in CYP-specific chlorpyrifos metabolism. *Toxicology*, *276*(3), 184-191.

Culbertson, J. B., Valiela, I., Olsen, Y. S., & Reddy, C. M. (2008). Effect of field exposure to 38-year-old residual petroleum hydrocarbons on growth, condition index, and filtration rate of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*. *Environmental Pollution*, *154*(2), 312-319.

Daborn, K., Cozzi, R. R. F., & Marshall, W. S. (2001). Dynamics of pavement cell-chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Biology*, *204*(11), 1889-1899.

Dafoe, T., J.H. Carey, S.H. McCrindle, Wells, P.G. & Wilson, R.C.H. (1984). "Relationships Between the Biological Testing of Industrial Effluents and the Quality of Receiving Waters, Canadian Approaches and Examples". In: Proc. Internat. Workshop on Biological Testing of Effluents (and related receiving waters), Duluth, MN, Sept. 10-14, 1984, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, p. 245-287 .

Davila, D. R., Davis, D. P., Campbell, K., Cambier, J. C., Zigmond, L. A., & Burchiel, S. W. (1995). Role of alterations in  $Ca^{2+}$  associated signaling pathways in the immunotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, *45*(2), 101-126.

De Montellano, P. R. O. (Ed.). (2005). *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. Springer Science & Business Media.

Delescluse, C., Ledirac, N., Li, R., Piechocki, M. P., Hines, R. N., Gidrol, X., & Rahmani, R. (2001). Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. *Biochemical pharmacology*, *61*(4), 399-407.

---

Denison, M. S., Soshilov, A. A., He, G., DeGroot, D. E., & Zhao, B. (2011). Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicological sciences*, *124*(1), 1-22.

Diao, L., Li, N., Brayman, T. G., Hotz, K. J., & Lai, Y. (2010). Regulation of MRP2/ABCC2 and BSEP/ABCB11 expression in sandwich cultured human and rat hepatocytes exposed to inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry*, *285*(41), 31185-31192.

Edwards, M. J., Saunders, R. D. & Shiota, K. (2003). Effects of heat on embryos and fetuses. *International Journal of Hyperthermia*, *19*, 295-324.

Egaas, E., Sandvik, M., Fjeld, E., Källqvist, T., Goksoyr, A., & Svensen, A. (1999). Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, *122*(3), 337-344.

Eisler, R. (2000). *Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazards to Humans, Plants, and Animals, Three Volume Set*. CRC press.

Elezovic, M. Budimir, M. Karan, V. & Neskovic, N.K. (1994) Herbicides in water. Subacute toxic effects on fish. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. (Eds. Muller, R. y Lloyd, R.) Fishing News Books, p. 30 - 38.

Escher, B. I., & Hermens, J. L. (2002). Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environmental Science & Technology*, *36*(20), 4201-4217.

Espinós A., (1995). El alimento - presa que encontraron las truchas en la Argentina Irene Wais. Boletín mosquero AAPM invierno de 1995. Los salmónidos (enfoque científico) APMN Cornell University - Department of Natural Resources Novascotia - Canada - Agriculture and Fisheries

Fan, J., Maeng, H. J., Du, Y., Kwan, D., & Pang, K. S. (2011). Transport of 5, 5-diphenylbarbituric acid and its precursors and their effect on P-gp, MRP2 and CYP3A4 in Caco-2 and LS180 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(1-2), 19-29.

Ferguson, H. W. (1989). Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Iowa State University Press

#### FAO.SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR CHLORPYRIFOS (2004)

Ferrari, A., Anguiano, O. L., Soleño, J., Venturino, A., & de D'Angelo, A. M. P. (2004). Different susceptibility of two aquatic vertebrates (*Oncorhynchus mykiss* and *Bufo arenarum*) to azinphos methyl and carbaryl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 139(4), 239-243.

Ferrari, A., Venturino, A., & de D'Angelo, A. M. P. (2007). Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(2), 134-142.

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

Ferraris, M., Flora, A., Chiesara, E., Fornasari, D., Lucchetti, H., Marabini, L., & Radice, S. (2005). Molecular mechanism of the aryl hydrocarbon receptor activation by the fungicide iprodione in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic toxicology*, 72(3), 209-220.

Fischer, S., Loncar, J., Zaja, R., Schnell, S., Schirmer, K., Smital, T., & Luckenbach, T. (2011). Constitutive mRNA expression and protein activity levels of nine ABC efflux transporters in seven permanent cell lines derived from different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, 101(2), 438-446.

---

Flammarion, P. (1999). Cytochrome P450 1A induction in gudgeon *Gobio gobio*: laboratory and field studies. *Biomarkers*, 4(1), 59-71.

Fleming, C. R., Billiard, S. M., & Di Giulio, R. T. (2009). Hypoxia inhibits induction of aryl hydrocarbon receptor activity in topminnow hepatocarcinoma cells in an ARNT-dependent manner. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(3), 383-389.

Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D., & Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere*, 29(7), 1501-1514.

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: An International Journal*, 20(1), 37-45.

Galafassi, G., & Roig, D. P. (2014). Ñirihuau: explotación de hidrocarburos y conflicto social en las inmediaciones de Bariloche (Patagonia, Argentina). *territorios*, (30), 147-170.

Gall, G., & Crandell, P. (1992) The rainbow trout. *Aquaculture* 100, 1-10.

Ghorashi, S., Shajeei, H., Vaezi, G., Shamoushaki, M. M. N., & Babakhani, A. (2013). Histopathological studies on kidneys and gills of *Onchorhynchus mykiss* exposed to sublethal concentration of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). *Global Veterinaria*, 10, 121-7.

Goksoyr, A. (1995). Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. In *Toxicology in Transition* (pp. 80-95). Springer, Berlin, Heidelberg.

Gooneratne, R., Miranda, C. L., Henderson, M. C., & BUHLER, D. R. (1997).  $\beta$ -Naphthoflavone induced CYP1A1 and 1A3 proteins in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, 27(2), 175-187.

Götting, M., & Nikinmaa, M. (2017). *In vitro* study on the regulation of cellular mRNA levels by changes in transcription rate and transcript stability in fish red blood cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 213, 35-44.

Gotoh, Y., Suzuki, H., Kinoshita, S., Hirohashi, T., Kato, Y., & Sugiyama, Y. (2000). Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292(1), 433-439.

Gräns, J., Wassmur, B., & Celander, M. C. (2010). One-way inhibiting cross-talk between arylhydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) signaling in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Aquatic toxicology*, 100(3), 263-270.

Gräns, J., Wassmur, B., Fernández-Santoscoy, M., Zanette, J., Woodin, B. R., Karchner, S. I., & Stegeman, J. J. (2015). Regulation of pregnane-X-receptor, CYP3A and P-glycoprotein genes in the PCB-resistant killifish (*Fundulus heteroclitus*) population from New Bedford Harbor. *Aquatic Toxicology*, 159, 198-207.

Gräns, J., Wassmur, B., Fernández-Santoscoy, M., Zanette, J., Woodin, B. R., Karchner, S. I., & Stegeman, J. J. (2015). Regulation of pregnane-X-receptor, CYP3A and P-glycoprotein genes in the PCB-resistant killifish (*Fundulus heteroclitus*) population from New Bedford Harbor. *Aquatic Toxicology*, 159, 198-207.

Grayfer, L., Walsh, J. G., & Belosevic, M. (2008). Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus L.*) tumor necrosis factor-alpha. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(5), 532-543.

Greim, H. and Snyder, R. (2008) Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction. John Wiley, 698 páginas.



---

Groot, C. (1996) Chapter 3. Salmonid life histories. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* 29, 97-230.

Guerreño, M., Armengol, M. F. L., Luquet, C. M., & Venturino, A. (2016). Comparative study of toxicity and biochemical responses induced by sublethal levels of the pesticide azinphosmethyl in two fish species from North-Patagonia, Argentina. *Aquatic Toxicology*, 177, 365-372.

Guo, J., Wu, F., Luo, X., Liang, Z., Liao, H., Zhang, R., & Mai, B. (2010). Anthropogenic input of polycyclic aromatic hydrocarbons into five lakes in Western China. *Environmental Pollution*, 158(6), 2175-2180.

Gupta, R. C. (Ed.). (2014). *Biomarkers in toxicology*. Academic Press.

Hahn, M. E., Karchner, S. I., Shapiro, M. A., & Perera, S. A. (1997). Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13743-13748.

Halwachs, S., Wassermann, L., & Honscha, W. (2014). A novel MDCKII *in vitro* model for assessing ABCG2-drug interactions and regulation of ABCG2 transport activity in the caprine mammary gland by environmental pollutants and pesticides. *Toxicology In Vitro*, 28(3), 432-441.

Hanke, W. O. J. C. I. E. C. H., & Jurewicz, J. (2004). The risk of adverse reproductive and developmental disorders due to occupational pesticide exposure: an overview of current epidemiological evidence. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 17(2), 223-243.

Hanno, K., Oda, S., & Mitani, H. (2010). Effects of dioxin isomers on induction of AhRs and CYP1A1 in early developmental stage embryos of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 78(7), 830-839.

Hansch, C. (1969). Quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. *Accounts of Chemical Research* 2, 232-239.

Hansen, T. K. & Falk-Pedersen, I. B. (2001). The influence of rearing temperature on early development and growth of spotted wolffish *Anarhichas minor* (Olafsen). *Aquaculture Research*, 32, 369-378.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51-88.

Haynes, H. L., Lambrech, J. A., & Moorefield, H. H. (1957). Insecticidal Properties and Characteristics of 1-Naphthyl N-Methylcarbamate. *Contributions. Boyce Thompson Institute for Plant Research*, 18(11).

Heino, J., Huhtala, M., Käpylä, J., & Johnson, M. S. (2009). Evolution of collagen-based adhesion systems. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(2), 341-348.

Hemmer, M. J., Courtney, L. A., & Ortego, L. S. (1995). Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in teleost tissues using mammalian polyclonal and monoclonal antibodies. *Journal of Experimental Zoology*, 272(1), 69-77.

Hernández, A. F., Parrón, T., & Alarcón, R. (2011). Pesticides and asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 11(2), 90-96.

Hernandez, J. P., Mota, L. C., & Baldwin, W. S. (2009). Activation of CAR and PXR by dietary, environmental and occupational chemicals alters drug metabolism, intermediary metabolism, and cell proliferation. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine (Formerly Current Pharmacogenomics)*, 7(2), 81-105.

Hinton, D. E., Segner, H., & Braunbeck, T. (2001). Toxic responses of the liver. *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts*, 1, 224-268.

Holcombe, G. W., Phipps, G. L., & Tanner, D. K. (1982). The acute toxicity of kelthane, dursban, disulfoton, pydrin, and permethrin to fathead minnows *Pimephales promelas* and rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 29(3), 167-178.

---

Hong, S., Li, R., Xu, Q., Secombes, C. J., & Wang, T. (2013). Two types of TNF- $\alpha$  exist in teleost fish: phylogeny, expression, and bioactivity analysis of type-II TNF- $\alpha$  3 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Immunology*, 1301584.

Hong, J. R., Huang, L. J. & Wu, J. L. (2005). Aquatic birnavirus induces apoptosis through activated caspase-8 and -3 in a zebrafish cell line. *Journal of Fish Diseases*, 28, 133-140.

Hu, Y. L., Xiang, L. X., & Shao, J. Z. (2010). Identification and characterization of a novel immunoglobulin Z isotype in zebrafish: implications for a distinct B cell receptor in lower vertebrates. *Molecular immunology*, 47(4), 738-746.

Huggett, R. J. (2018). Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. CRC Press.

Huuskonen, S., Lindström-Seppä, P., Koponen, K., & Roy, S. (1996). Effects of non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls (congeners 77 and 126) on cytochrome p4501a and conjugation activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 113(2), 205-213.

Ihunnah, C. A., Jiang, M., & Xie, W. (2011). Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(8), 956-963.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Polynuclear Aromatic Compounds, Part I, Chemical, Environmental and Experimental Data. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 32. International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1983.

Jacobson, K. C., Arkoosh, M. R., Kagley, A. N., Clemons, E. R., Collier, T. K., & Casillas, E. (2003). Cumulative effects of natural and anthropogenic stress on immune function and disease resistance in juvenile *Chinook salmon*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15(1), 1-12.

Jakobsson, P. J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., & Persson, B. (1999). Common structural features of MAPEG-a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Science*, 8(3), 689-692.

Jigorel, E., Le Vee, M., Boursier-Neyret, C., Parmentier, Y., & Fardel, O. (2006). Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*.

Jokanović, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166(3), 139-160.

Jönsson, M. E., Gao, K., Olsson, J. A., Goldstone, J. V., & Brandt, I. (2010). Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout. *Aquatic toxicology*, 98(4), 311-321.

Jönsson, M., Abrahamson, A., Brunström, B., Brandt, I., Ingebrigtsen, K., & Jørgensen, E. H. (2003). EROD activity in gill filaments of anadromous and marine fish as a biomarker of dioxin-like pollutants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 136(3), 235-243.

Kapoor, I. P., Metcalf, R. L., Hirwe, A. S., Coats, J. R., & Khalsa, M. S. (1973). Structure activity correlations of biodegradability of DDT analogs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21, 310-315.

Kalnas, J., & Teitelbaum, D. T. (2000). Dermal absorption of benzene: implications for work practices and regulations. *International journal of occupational and environmental health*, 6(2), 114-121.

Kanavouras, K., Tzatzarakis, M. N., Mastorodemos, V., Plaitakis, A., & Tsatsakis, A. M. (2011). A case report of motor neuron disease in a patient showing significant level of DDTs, HCHs and organophosphate metabolites in hair as well as levels of hexane and toluene in blood. *Toxicology and applied pharmacology*, 256(3), 399-404.

---

Kennedy, C. J., Gill, K. A. & Walsh, P. J. (1991). *In-vitro* metabolism of benzo(a)pyrene in the blood of the gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Marine Environmental Research* 31, 37-53.

Kim, E. Y., Iwata, H., Suda, T., Tanabe, S., Amano, M., Miyazaki, N., & Petrov, E. A. (2005). Aryl hydrocarbon receptor (AHR) and AHR nuclear translocator (ARNT) expression in Baikal seal (*Pusa sibirica*) and association with 2, 3, 7, 8-TCDD toxic equivalents and CYP1 expression levels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(3), 281-291.

Klaassen, C. D., & Watkins, J. B. (Eds.). (1996). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons* (Vol. 5). New York: McGraw-Hill.

Klaverkamp, J. F., Duangsawasdi, M., Macdonald, W. A., & Majewski, H. S. (1977). An evaluation of fenitrothion toxicity in four life stages of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. In *Aquatic toxicology and hazard evaluation*. ASTM International.

Kralj, M. B., Franko, M., & Trebse, P. (2007). Photodegradation of organophosphorus insecticides—investigations of products and their toxicity using gas chromatography—mass spectrometry and AChE-thermal lens spectrometric bioassay. *Chemosphere*, 67(1), 99-107.

Kleinow, K. M., Melancon, M. J., & Lech, J. J. (1987). Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environmental Health Perspectives*, 71, 105.

Kleinow, K. M., Nichols, J. W., Hayton, W. L., McKim, J. M., & Barron, M. G. (2008). Toxicokinetics in fishes. *The toxicology of fishes*, 55-152.

Kliwer, S. A., Goodwin, B., & Willson, T. M. (2002). The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocrine reviews*, 23(5), 687-702.

Kneuer, C., Honscha, W., Gäbel, G., Honscha, K.U., 2007. Adaptive response to increased bile acids: induction of MDR1 gene expression and P-glycoprotein activity in renal epithelial cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 454(4), 587-594.

Kodama, S., & Negishi, M. (2013). PXR cross-talks with internal and external signals in physiological and pathophysiological responses. *Drug metabolism reviews*, 45(3), 300-310.

Kono, T., Zou, J., Bird, S., Savan, R., Sakai, M., & Secombes, C. J. (2006). Identification and expression analysis of lymphotoxin-beta like homologues in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Molecular immunology*, 43(9), 1390-1401.

Konno, Y., Negishi, M., & Kodama, S. (2008). The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 23(1), 8-13.

Koo, T. S. Y. & Johnston, M. L. (1978). Larva deformity in striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), and blueback herring, *Alosa aestivalis* (Mitchell), due to heat shock treatment of developing eggs. *Environmental Pollution*, 16, 137-149.

Kramer, J. M. (1994). Structures and functions of collagens in *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB Journal*, 8(3), 329-336.

Krasowski, M. D., Ai, N., Hagey, L. R., Kollitz, E. M., Kullman, S. W., Reschly, E. J., & Ekins, S. (2011). The evolution of farnesoid X, vitamin D, and pregnane X receptors: insights from the green-spotted pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*) and other non-mammalian species. *BMC biochemistry*, 12(1), 5.

Krasowski, M. D., Ni, A., Hagey, L. R., & Ekins, S. (2011). Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR. *Molecular and cellular endocrinology*, 334(1-2), 39-48.

---

Kurelec, B. (1992). The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical reviews in toxicology*, 22(1), 23-43.

Kwong, T. C. (2002). Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic drug monitoring*, 24(1), 144-149.

Lacour, S., Gautier, J. C., Pallardy, M., & Roberts, R. (2005). Cytokines as potential biomarkers of liver toxicity. *Cancer Biomarkers*, 1(1), 29-39.

Lange, A., Corcoran, J., Miyagawa, S., Iguchi, T., Winter, M. J., & Tyler, C. R. (2017). Development of a common carp (*Cyprinus carpio*) pregnane X receptor (cPXR) transactivation reporter assay and its activation by azole fungicides and pharmaceutical chemicals. *Toxicology in Vitro*, 41, 114-122.

Lanning, C. L. (1996). Chlorpyrifos oxon interacts with the mammalian multidrug resistance protein, P-glycoprotein. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 47(4), 395-407.

Lee, R. F., & Anderson, J. W. (2005). Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 50(7), 705-723.

Lee, J. E., Kang, C. S., Guan, X. Y., Kim, B. T., Kim, S. H., Lee, Y. M., & Kim, D. K. (2007). Discoidin domain receptor 2 is involved in the activation of bone marrow-derived dendritic cells caused by type I collagen. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(1), 244-250.

Lehmann, J. M., McKee, D. D., Watson, M. A., Willson, T. M., Moore, J. T., & Kliewer, S. A. (1998). The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *The Journal of clinical investigation*, 102(5), 1016-1023.

Lemaire, G., de Sousa, G., & Rahmani, R. (2004). A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides. *Biochemical pharmacology*, 68(12), 2347-2358.

- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology*, 204(3), 216-237.
- Li, H., & Wang, H. (2010). Activation of xenobiotic receptors: driving into the nucleus. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 6(4), 409-426.
- Lin, A. F., Xiang, L. X., Wang, Q. L., Dong, W. R., Gong, Y. F., & Shao, J. Z. (2009). The DC-SIGN of zebrafish: insights into the existence of a CD209 homologue in a lower vertebrate and its involvement in adaptive immunity. *The Journal of Immunology*, jimmunol-0803955.
- Liu, Q., Rise, M. L., Spitsbergen, J. M., Hori, T. S., Mieritz, M., Geis, S., & Carvan III, M. J. (2013). Gene expression and pathologic alterations in juvenile rainbow trout due to chronic dietary TCDD exposure. *Aquatic toxicology*, 140, 356-368.
- Liu, J., Liu, Y., Powell, D.A., Waalkes, M.P., Klaassen, C.D., 2002. Multidrug-resistance mdr1a/1b double knockout mice are more sensitive than wild type mice to acute arsenic toxicity, with higher arsenic accumulation in tissues. *Toxicology*, 170, 55-62.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta \Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Loewy, R. M., Monza, L. B., Kirs, V. E., & Savini, M. C. (2011). Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46(8), 662-670.
- Luckenbach, T., Fischer, S., & Sturm, A. (2014). Current advances on ABC drug transporters in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 165, 28-52.
- Macek, K. J., Hutchinson, C., & Cope, O. B. (1969). The effects of temperature on the susceptibility of bluegills and rainbow trout to selected pesticides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 4(3), 174-183.



---

Machala, M., Drzбек, P., Neča, J., Kolzovz, J., & Svobodovz, Z. (1998). Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, or 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in trout liver. *Ecotoxicology and environmental safety*, 41(1), 107-111.

Maher, J. M., Dieter, M. Z., Aleksunes, L. M., Slitt, A. L., Guo, G., Tanaka, Y., & Dalton, T. P. (2007). Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway. *Hepatology*, 46(5), 1597-1610.

Malins, D. C., & Ostrander, G. K. (1991). Perspectives in aquatic toxicology. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 31(1), 371-399.

Malhotra, D., Portales-Casamar, E., Singh, A., Srivastava, S., Arenillas, D., Happel, C., & Biswal, S. (2010). Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic acids research*, 38(17), 5718-5734.

Mancini, C. D., & Serna, M. J. (1988). Evaluación Petrolera de la Cuenca de Ñirihuau Sudoeste de Argentina. In *3rd Simposio Bolivariano-Exploracion Petrolera en las Cuencas Subandinas*.

Mandl, M., & Depping, R. (2014). Hypoxia-inducible aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)(HIF-1 $\beta$ ): is it a rare exception?. *Molecular Medicine*, 20(1), 215.

Mandl, M., Lieberum, M. K., & Depping, R. (2016). A HIF-1 $\alpha$  -driven feed-forward loop augments HIF signalling in Hep3B cells by upregulation of ARNT. *Cell death & disease*, 7(6), e2284.

Marini, T. L. y V. Mastrarrigo. 1963. Recursos acuáticos vivos. II. Piscicultura. En: *Evaluación de los recursos naturales de la Argentina*, VII. C. F.I., Buenos Aires, 266 pp

Matsuo, A. Y., Gallagher, E. P., Trute, M., Stapleton, P. L., Levado, R., & Schlenk, D. (2008). Characterization of Phase I biotransformation enzymes in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147(1), 78-84.

Maxwell, D. M. (1992). The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicology and applied pharmacology*, 114(2), 306-312.

McFarland, V. A., Inouye, L. S., Lutz, C. H., Jarvis, A. S., Clarke, J. U., & McCant, D. D. (1999). Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(2), 236-241.

McIlwain, C. C., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2006). Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*, 25(11), 1639.

McLachlan, M. S., Czub, G., & Wania, F. (2002). The influence of vertical sorbed phase transport on the fate of organic chemicals in surface soils. *Environmental science & technology*, 36(22), 4860-4867.

McKim, J. M., & Heath, E. M. (1983). Dose determinations for waterborne 2,5,2u,5u-[14C] tetrachlorobiphenyl and related pharmacokinetics in two species of trout (*Salmo gairdneri* and *Salvelinus fontinalis*): A mass-balance approach. *Toxicology and Applied Pharmacology* 68, 177â187.

Melbye, A. G., Brakstad, O. G., Hokstad, J. N., Gregersen, I. K., Hansen, B. H., Booth, A. M., & Tollefsen, K. E. (2009). Chemical and toxicological characterization of an unresolved complex mixture-rich biodegraded crude oil. *Environmental toxicology and chemistry*, 28(9), 1815-1824.

Meucci, V., & Arukwe, A. (2006). The xenoestrogen 4-nonylphenol modulates hepatic gene expression of pregnane X receptor, aryl hydrocarbon receptor, CYP3A and CYP1A1 in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142(1-2), 142-150.

---

Miao, B., Zondlo, S., Gibbs, S., Cromley, D., Hosagrahara, V. P., Kirchgessner, T. G., & Mukherjee, R. (2004). Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *Journal of lipid research*, 45(8), 1410-1417.

Miao, W., Hu, L., Scrivens, P. J., & Batist, G. (2005). Transcriptional Regulation of NF-E2 p45-related Factor(NRF2) Expression by the Aryl Hydrocarbon Receptor-Xenobiotic Response Element Signaling Pathway DIRECT CROSS-TALK BETWEEN PHASE I AND II DRUG-METABOLIZING ENZYMES. *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20340-20348.

Miksys, S. and Tyndale, R.. (2002) Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain. *J Psychiatry Neurosci.*, 27(6), 406-15.

Miksys, S. L., & Tyndale, R. F. (2002). Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 27(6), 406.

MONITOREO DE AGROQUÍMICOS EN LA CUENCA, 2016. Ciclo productivo 2006 - 2012 Unidad de Gestión de Calidad del Agua Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los Ríos Limay, Neuquén y Negro (AIC) Secretaría de Gestión Ambiental (SGA), Provincia del Neuquén, Subsecretaría de Medio Ambiente (SSMA), Dirección Provincial de Recursos Hídricos (DPRH), Provincia de Río Negro, Departamento Provincial Unidad de Gestión de Calidad del Agua)

Montforts, M. H. (2006). Assessment of persistency and bioaccumulation in pesticide registration frameworks within the Organization for Economic Cooperation and Development. *Integrated environmental assessment and management*, 2(1), 13-21.

Monza, L. B., Loewy, R. M., Savini, M. C., & Pechen de d'Angelo, A. M. (2013). Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments from the Neuquen River, Argentine Patagonia. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48(4), 370-379.

Mortensen, A.S, Tolfen, C. C., & Arukwe, A. (2006). Gene expression patterns in estrogen (nonylphenol) and aryl hydrocarbon receptor agonists (PCB-77) interaction using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary hepatocyte culture. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 69(1-2), 1-19.

Mottino, A. D., Hoffman, T., Jennes, L., Cao, J., & Vore, M. (2001). Expression of multidrug resistance-associated protein 2 in small intestine from pregnant and postpartum rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(6), G1261-G1273.

Narváez Valderrama, J. F., Palacio Baena, J. A., & Molina Pérez, F. J. (2012). Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad: Una revisión de los procesos de degradación natural.

Nassar, A. F. (Ed.). (2011). *Biotransformation and metabolite elucidation of xenobiotics: characterization and identification*. John Wiley & Sons.

Nasser, K. (26 de marzo, 2011). El crudo rionegrino nació en Ñirihuaú. *Río Negro*. Recuperado de [http://www.rionegro.com.ar/diario/el-crudo-rionegrinonacio-en-nirihuaui-587155-0948-notas\\_energia.aspx](http://www.rionegro.com.ar/diario/el-crudo-rionegrinonacio-en-nirihuaui-587155-0948-notas_energia.aspx)

Navas, J. M., & Segner, H. (2000). Antiestrogenicity of  $\beta$ -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquatic Toxicology*, 51(1), 79-92.

Navas, J. M., & Segner, H. (2001). Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor. *Chemico-Biological Interactions*, 138(3), 285-298.

Neal, R. A. (1980). Microsomal metabolism of thiono-sulfur compounds: mechanisms and toxicological significance. *Reviews in biochemical toxicology*, 2, 131-171.

- 
- Nebert, D. W., & Dalton, T. P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 6(12), 947.
- Nebert, D. W., & Vasiliou, V. (2004). Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human genomics*, 1(6), 460.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation*, 6(11), 1028.
- Norris, D. O. (1996). Vertebrate Endocrinology. *Academic Press*, San Diego, CA.
- Oldham, K. M., & Bowen, P. E. (1998). Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial?. *Journal of the American Dietetic Association*, 98(9), 1001-1008.
- Olsvik, P. A., Kristensen, T., Waagbø, R., Rosseland, B. O., Tollefsen, K. E., Baeverfjord, G., & Berntssen, M. H. G. (2005). mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(3), 314-323.
- Olsvik, P. A., Lie, K. K., Sæle, Ø., & Sanden, M. (2007). Spatial transcription of CYP1A in fish liver. *BMC physiology*, 7(1), 12.
- Omicinski, C. J., Vanden Heuvel, J. P., Perdew, G. H., & Peters, J. M. (2010). Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicological Sciences*, 120(suppl\_1), S49-S75.
- Ondarza, P. M., Gonzalez, M., Fillmann, G., & Miglioranza, K. S. (2012). Increasing levels of persistent organic pollutants in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following a mega-flooding episode in the Negro River basin, Argentinean Patagonia. *Science of the Total Environment*, 419, 233-239.

Opperhuizen, A. (1986). Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish. *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, vol. 9. Baltimore, MD: American Society for Testing and Materials, (pp. 304-315).

Paetzold, S. C., Ross, N. W., Richards, R. C., Jones, M., Hellou, J., & Bard, S. M. (2009). Up-regulation of hepatic ABCC2, ABCG2, CYP1A1 and GST in multixenobiotic-resistant killifish (*Fundulus heteroclitus*) from the Sydney Tar Ponds, Nova Scotia, Canada. *Marine environmental research*, 68(1), 37-47.

Page, L. M., & Burr, B. M. (1997). *A field guide to freshwater fishes: North America north of Mexico*. Houghton Mifflin Harcourt.

Parks, L. G., Lambright, C. S., Orlando, E. F., Guillette Jr, L. J., Ankley, G. T., & Gray Jr, L. E. (2001). Masculinization of female mosquitofish in kraft mill effluent-contaminated Fenholloway River water is associated with androgen receptor agonist activity. *Toxicological Sciences*, 62(2), 257-267.

Pascual, M., Macchi, P., Urbanski, J., Marcos, F., Rossi, C. R., Novara, M., & Dell'Arciprete, P. (2002). Evaluating potential effects of exotic freshwater fish from incomplete species presence-absence data. *Biological invasions*, 4(1-2), 101-113.

Pavlikova, N., Kortner, T. M., & Arukwe, A. (2010). Modulation of acute steroidogenesis, peroxisome proliferator-activated receptors and CYP3A/PXR in salmon interrenal tissues by tributyltin and the second messenger activator, forskolin. *Chemico-biological interactions*, 185(2), 119-127.

Peddie, S., Zou, J., Cunningham, C., & Secombes, C. J. (2001). Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) recombinant IL-1 $\beta$  and derived peptides induce migration of head-kidney leucocytes *in vitro*. *Fish & shellfish immunology*, 11(8), 697-709.

Perry, M. J., Venners, S. A., Barr, D. B., & Xu, X. (2007). Environmental pyrethroid and organophosphorus insecticide exposures and sperm concentration. *Reproductive Toxicology*, 23(1), 113-118.

Pessah, E., & Cornwall, G. M. (1980). Use of toxicity tests in regulating the quality of industrial wastes in Canada. In *Aquatic Toxicology*. ASTM International.

Petrick, J. S., & Klaassen, C. D. (2007). Importance of hepatic induction of constitutive androstane receptor (CAR) and other transcription factors that regulate xenobiotic metabolism and transport. *Drug Metabolism and Disposition*.

Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K. A., Krause, E., Codd, G. A., & Steinberg, C. E. (1998). Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1425(3), 527-533.

Pooley, N. J., Tacchi, L., Secombes, C. J., & Martin, S. A. (2013). Inflammatory responses in primary muscle cell cultures in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC genomics*, 14(1), 747.

Pope, C. N. (1999). Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*, 2(2), 161-181.

Powell, W. H., Karchner, S. I., Bright, R., & Hahn, M. E. (1999). Functional diversity of vertebrate ARNT proteins: identification of ARNT2 as the predominant form of ARNT in the marine teleost, *Fundulus heteroclitus*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 361(1), 156-163.

Puga, A., Ma, C., & Marlowe, J. L. (2009). The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochemical pharmacology*, 77(4), 713-722.

Puget Sound Partnership (2010). 2009 State of the Sound. Puget Sound Partnership, Olympia, WA. Publication No. PSP 09-08.

Qiu, Z., Cervantes, J. L., Cicek, B. B., Mukherjee, S., Venkatesh, M., Maher, L. A., & Khanna, K. M. (2016). Pregnane x receptor regulates pathogen-induced inflammation and host defense against an intracellular bacterial infection through Toll-like receptor 4. *Scientific reports*, *6*, 31936.

Racke, K. D. (1993). Environmental fate of chlorpyrifos. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 1-150). Springer, New York, NY.

Rees, C. B., McCormick, S. D., Heuvel, J. P. V., & Li, W. (2003). Quantitative PCR analysis of CYP1A induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, *62*(1), 67-78.

Reigart, J. R., & Roberts, J. R. (1999). Reconocimiento y manejo de los envenenamientos por pesticidas. US Environmental Protection Agency.

Risso-de Faverney, C., Orsini, N., de Sousa, G. & Rahmani, R. (2004). Cadmium induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, *69*, 247-258.

Rolland, A. D., Lardenois, A., Goupil, A. S., Lareyre, J. J., Houlgatte, R., Chalmel, F., & Le Gac, F. (2013). Profiling of androgen response in rainbow trout pubertal testis: relevance to male gonad development and spermatogenesis. *PLoS One*, *8*(1), e53302.

Rosenfeld, J. M., Vargas Jr, R., Xie, W., & Evans, R. M. (2003). Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor. *Molecular endocrinology*, *17*(7), 1268-1282.

Rosenthal, S., Sandoval, N., Gavidia, C., & Tabacchi, L. (2013). Frecuencia de lipidosis hepática en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de fase juvenil en una piscigranja de la sierra central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *24*(1), 118-124.



---

Russom, C. L., Bradbury, S. P., Broderius, S. J., Hammermeister, D. E., & Drummond, R. A. (1997). Predicting modes of toxic action from chemical structure: acute toxicity in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental toxicology and chemistry*, 16(5), 948-967.

Rust, M.B. (2002). Chapter 7: Nutritional Physiology. In: *Fish Nutrition*, Rust M.B. (Ed.) third edition, Elsevier Science, USA, 807 pp.

Salaberria, I., Brakstad, O. G., Olsen, A. J., Nordtug, T., & Hansen, B. H. (2014). Endocrine and AhR-CYP1A pathway responses to the water-soluble fraction of oil in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 77(9-11), 506-515.

Sams, C., Cocker, J., & Lennard, M. S. (2004). Biotransformation of chlorpyrifos and diazinon by human liver microsomes and recombinant human cytochrome P450s (CYP). *Xenobiotica*, 34(10), 861-873.

Sanchez-Hernandez, J. C. (2007). Ecotoxicological perspectives of b-esterases in the assessment. *Environmental pollution: New research*, 1-45.

Sanden, M., & Olsvik, P. A. (2009). Intestinal cellular localization of PCNA protein and CYP1A mRNA in Atlantic salmon *Salmo salar* L. exposed to a model toxicant. *BMC physiology*, 9(1), 3.

Sarasquete, C., & Segner, H. (2000). Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Science of the Total Environment*, 247(2-3), 313-332.

Satoh, T. (2005). Toxicological implications of esterases - From molecular structures to functions. *Toxicology and applied pharmacology*, 207(2), 11-18.

Satoh, T., & Hosokawa, M. (1998). The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 38(1), 257-288.

Schardein, J. (2000). *Chemically induced birth defects*. CRC Press.

Schimmel, S. C., Garnas, R. L., Patrick Jr, J. M., & Moore, J. C. (1983). Acute toxicity, bioconcentration, and persistence of AC 222,705, benthocarb, chlorpyrifos, fenvalerate, methyl parathion, and permethrin in the estuarine environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *31*(1), 104-113.

Schlenk, D., Yeung, C., & Rettie, A. (2004). Unique monooxygenation pattern indicates novel flavin-containing monooxygenase in liver of rainbow trout. *Marine environmental research*, *58*(2-5), 499-503.

Schmidt, J. V., & Bradfield, C. A. (1996). Ah receptor signaling pathways. *Annual review of cell and developmental biology*, *12*(1), 55-89.

Schrenk, D., Baus, P. R., Ermel, N., Klein, C., Vorderstemann, B., & Kauffmann, H. M. (2001). Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. *Toxicology letters*, *120*(1-3), 51-57.

Schultz, I. R., Orner, G., Merdink, J. L., & Skillman, A. (2001). Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascular administration of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol. *Aquatic toxicology*, *51*(3), 305-318.

Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., ... & Lustig, K. D. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & development*, *14*(22), 2831-2838.

Schultz, G. S., & Wysocki, A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound repair and regeneration*, *17*(2), 153-162.

Secombes, C. J., Wang, T., & Bird, S. (2016). Vertebrate cytokines and their evolution. In *The Evolution of the Immune System* (pp. 87-150).

Segner, H., MÖLLER, A. M., Wenger, M., & Casanova-Nakayama, A. (2012). Fish immunotoxicology: research at the crossroads of immunology, ecology and toxicology.

- 
- Sharbidre, A. A., Metkari, V., & Patode, P. (2011). Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101(2), 132-141
- Shelby, M. K., & Klaassen, C. D. (2006). Induction of rat UDP-glucuronosyltransferases in liver and duodenum by microsomal enzyme inducers that activate various transcriptional pathways. *Drug metabolism and disposition*.
- Shi, Z., Tao, S., Pan, B., Liu, W. X., & Shen, W. R. (2007). Partitioning and source diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbons in rivers in Tianjin, China. *Environmental Pollution*, 146(2), 492-500.
- Silins, I., & Högberg, J. (2011). Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *International journal of environmental research and public health*, 8(3), 629-647.
- Simon, K. S., & Townsend, C. R. (2003). Impacts of freshwater invaders at different levels of ecological organisation, with emphasis on salmonids and ecosystem consequences. *Freshwater biology*, 48(6), 982-994.
- Singer, M. M., Aurand, D., Bragin, G. E., Clark, J. R., Coelho, G. M., Sowby, M. L., & Tjeerdema, R. S. (2000). Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. *Marine Pollution Bulletin*, 40(11), 1007-1016.
- Slotkin, T. A., Seidler, F. J., Wu, C., MacKillop, E. A., & Linden, K. G. (2008). Ultraviolet photolysis of chlorpyrifos: developmental neurotoxicity modeled in PC12 cells. *Environmental health perspectives*, 117(3), 338-343
- Smital, T., & Kurelec, B. (1998). The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 399(1), 43-53.
- Smutny, T., Mani, S., & Pavek, P. (2013). Post-translational and post-transcriptional modifications of pregnane X receptor (PXR) in regulation of the cytochrome P450 superfamily. *Current drug metabolism*, 14(10), 1059-1069.

Sogorb, M. A., & Vilanova, E. (2002). Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology letters*, 128(1-3), 215-228.

Speer, S. A., Semenza, J. C., Kurosaki, T., & Anton-Culver, H. (2002). Risk factors for acute myeloid leukemia and multiple myeloma: a combination of GIS and case-control studies. *Journal of environmental health*, 64(7).

Sprague, J. B. (1969). Measurement of pollutant toxicity to fish I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Research*, 3(11), 793-821.

STATHAM, C. N., PEPPLER, S. K., & LECH, J. J. (1975). Biliary excretion products of 1-[1-14C] naphthyl-N-methylcarbamate (carbaryl) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Drug Metabolism and Disposition*, 3(5), 400-406.

Stegeman, J. J., & Hahn, M. E. (1994). Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. *Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives*, 87, 206.

Steinberg, C. E. (2012). *Stress ecology: environmental stress as ecological driving force and key player in evolution*. Springer Science & Business Media.

Stephenson, G. R. (2013). *Plaguicidas y ambiente* (No. 363.7384 S836p). Edit. UCR.

Stewart, S. A., Poon, B., Song, J. Y. & Chen, I. S. (2000). Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis through caspase activation. *Journal of Virology*, 74, 3105-3111.

Sturm, A., Cravedi, J. P., Perdu, E., Baradat, M., & Segner, H. (2001). Effects of prochloraz and nonylphenol diethoxylate on hepatic biotransformation enzymes in trout: a comparative *in vitro/in vivo*-assessment using cultured hepatocytes. *Aquatic toxicology*, 53(3-4), 229-245.

---

Suk, W. A., & Wilson, S. H. (2002). Overview and future of molecular biomarkers of exposure and early disease in environmental health. In *Biomarkers of environmentally associated disease* (pp. 27-40). CRC Press.

Takizawa, T., Tatematsu, C., Ohashi, K. & Nakanishi, Y. (1999). Recruitment of apoptotic cysteine protease (caspases) in influenza virus-induced cell death. *Microbiology of Immunology*, 43, 245-252.

Takle, H., Baeverfjord, G., Lunde, M., Kolstad, K. & Andersen, O. (2005). The effect of heat and cold exposure on HSP70 expression and development of deformities during embryogenesis of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 249, 515-524.

Tang, J., & Chambers, J. E. (1999). Detoxication of paraoxon by rat liver homogenate and serum carboxylesterases and A-esterases. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 13(5), 261-268.

Tang, J., Cao, Y., Rose, R. L., & Hodgson, E. (2002). *In vitro* metabolism of carbaryl by human cytochrome P450 and its inhibition by chlorpyrifos. *Chemico-biological interactions*, 141(3), 229-241.

Tang, J., Cao, Y., Rose, R. L., Brimfield, A. A., Dai, D., Goldstein, J. A., & Hodgson, E. (2001). Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. *Drug metabolism and disposition*, 29(9), 1201-1204.

Tanguay, R. L., Abnet, C. C., Heideman, W., & Peterson, R. E. (1999). Cloning and characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1444(1), 35-48.

Taysse, L., Chambras, C., Marionnet, D., Bosgiraud, C., & Deschaux, P. (1998). Basal level and induction of cytochrome P450, EROD, UDPGT, and GST activities in carp (*Cyprinus carpio*) immune organs (spleen and head kidney). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 60(2), 300-305

Testai, E., Buratti, F.M., & Di Consiglio, E. (2010). Chlorpyrifos, in: Krieger, R. (Ed.), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*. Third ed. Elsevier Inc. London, pp. 1505-1526.

Thorgaard, G. H., Bailey, G. S., Williams, D., Buhler, D. R., Kaattari, S. L., Ristow, S. S., & Walsh, P. J. (2002). Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 133(4), 609-646.

Thurmond, L. M., Lauer, L. D., House, R. V., Cook, J. C., & Dean, J. H. (1987). Immunosuppression following exposure to 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) in Ah-responsive and Ah-nonresponsive mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 91(3), 450-460.

Tomlin, C. D. S. (1997). *The pesticide manual. A world compendium. The British Crop Protection Council, Farnham, Surrey GU9 7PH, UK*. isbn 1-901396-11-8.

Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E. M., Sulukan, E., & Ceyhun, S. B. (2015). Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. *Ecotoxicology and environmental safety*, 111, 206-214.

Tran, K. T., Griffith, L., & Wells, A. (2004). Extracellular matrix signaling through growth factor receptors during wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 12(3), 262-268.

Tsatsakis, A. M., Zafiroopoulos, A., Tzatzarakis, M. N., Tzanakakis, G. N., & Kafatos, A. (2009). Relation of PON1 and CYP1A1 genetic polymorphisms to clinical findings in a cross-sectional study of a Greek rural population professionally exposed to pesticides. *Toxicology letters*, 186(1), 66-72.

Tierney, K. B., Farrell, A. P., & Brauner, C. J. (Eds.). (2013). *Fish Physiology: Organic Chemical Toxicology of Fishes (Vol. 33)*. Academic Press.

---

U.S. Environmental Protection Agency, Environmental fate of 129 priority pollutants. EPA-440/4-79-029, 1979.

Uno, T., Ishizuka, M., & Itakura, T. (2012). Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental toxicology and pharmacology*, *34*(1), 1-13.

Villeneuve, D. L., Khim, J. S., Kannan, K., & Giesy, J. P. (2002). Relative potencies of individual polycyclic aromatic hydrocarbons to induce dioxinlike and estrogenic responses in three cell lines. *Environmental Toxicology: An International Journal*, *17*(2), 128-137.

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, *13*(2), 57-149.

Van der Wel, H., & Welling, W. (1989). Inhibition of acetylcholinesterase in guppies (*Poecilia reticulata*) by chlorpyrifos at sublethal concentrations: methodological aspects. *Ecotoxicology and environmental safety*, *17*(2), 205-215.

Viñas, L., Franco, M. A., Soriano, J. A., González, J. J., Pon, J., & Albaigés, J. (2010). Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Spanish northern continental shelf. Assessment of spatial and temporal trends. *Environmental pollution*, *158*(5), 1551-1560.

Vogel, W. F. (2001). Collagen-receptor signaling in health and disease. *European journal of dermatology: EJD*, *11*(6), 506-514.

Vogel, C. F., Khan, E. M., Leung, P. S., Gershwin, M. E., Chang, W. W., Wu, D. & Denison, M. S. (2014). Cross-talk between Aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response a role for nuclear factor- $\kappa$  B. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(3), 1866-1875.

Wada, T., Gao, J., & Xie, W. (2009). PXR and CAR in energy metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *20*(6), 273-279.

Waldbillig, N. R. S. C. D. (1998). Effects of the pesticides carbofuran, chlorpyrifos, dimethoate, lindane, triallate, trifluralin, 2, 4-D, and pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 54(1), 21-36.

Wang, L. H. & Tsai, C. L. (2000). Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Biology*, 286, 534

Wang, T., & Secombes, C. J. (2013). The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1703-1718.

Wang, Y. M., Ong, S. S., Chai, S. C., & Chen, T. (2012). Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 8(7), 803-817.

Wagner, M., Halilbasic, E., Marschall, H. U., Zollner, G., Fickert, P., Langner, C., & Trauner, M. (2005). CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology*, 42(2), 420-430.

Wassmur, B., Gräns, J., Kling, P., & Celander, M. C. (2010). Interactions of pharmaceuticals and other xenobiotics on hepatic pregnane X receptor and cytochrome P450 3A signaling pathway in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, 100(1), 91-100.

Waxman, D. J., Attisano, C., Guengerich, F. P., & Lapenson, D. P. (1988). Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 $\beta$ -hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Archives of biochemistry and biophysics*, 263(2), 424-436.

Wells, P.G. & C. Moyse. (1981). A Selected Bibliography on the Biology of *Salmo gairdneri* Richardson (rainbow, steelhead, Kamloops trout), with particular Reference to studies with Aquatic Toxicants. 2nd ed., Environment Canada, Environment Protection Service, Ottawa, Ontario, Economic and Technical Review Report EPS 3-AR-81-1, 90 p.



---

Wess, T. J. (2005). Collagen fibril form and function. In *Advances in protein chemistry* (Vol. 70, pp. 341-374). *Academic Press*.

Wheeler W.B. (2002). *Pesticides in Agriculture and the Environment*. Ed. Dekker. New York. 337 pp

Wheelock, C. E., Eder, K. J., Werner, I., Huang, H., Jones, P. D., Brammell, B. F., & Hammock, B. D. (2005). Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*, 74(2), 172-192.

White Jr, K. L. (1986). An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Environmental Science & Health Part C*, 4(2), 163-202.

White Jr, K. L., Lysy, H. H., & Holsapple, M. P. (1985). Immunosuppression by polycyclic aromatic hydrocarbons: a structure-activity relationship in B6C3F1 and DBA/2 mice. *Immunopharmacology*, 9(3), 155-164.

Wiseman, S. B., & Vijayan, M. M. (2007). Aryl hydrocarbon receptor signaling in rainbow trout hepatocytes: role of hsp90 and the proteasome. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(4), 484-491.

Wogram, J., Sturm, A., Segner, H., & Liess, M. (2001). Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environmental toxicology and chemistry*, 20(7), 1528-1531.

Wolf, J. C., & Wolfe, M. J. (2005). A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology*, 33(1), 75-85

Woźny, M., Brzuzan, P., Wolińska, L., Góra, M., & Łuczyński, M. K. (2010). Preliminary evaluation of ER-and AhR-mediated gene expression patterns in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver after short-term exposure to zearalenone in binary mixtures. *Environmental Biotechnology*, 6, 16-23.

- Wu, Q., Riise, G., Lundekvam, H., Mulder, J., & Haugen, L. E. (2004). Influences of suspended particles on the runoff of pesticides from an agricultural field at Askim, SE-Norway. *Environmental geochemistry and health*, 26(2), 295-302.
- Xu, C., Li, C. Y. T., & Kong, A. N. T. (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research*, 28(3), 249.
- Yamashita, M. (2003). Apoptosis in zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 136, 731-742.
- Yabu, T., Todoriki, S. & Yamashita, M. (2001). Stress-induced apoptosis by heat shock, UV and g-ray irradiation in zebrafish embryos detected by increased caspase activity and whole-mount TUNEL staining. *Fisheries Science*, 67, 333-340.
- Yamauchi, M., Kim, E. Y., Iwata, H., & Tanabe, S. (2005). Molecular characterization of the aryl hydrocarbon receptors (AHR1 and AHR2) from red seabream (*Pagrus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(2), 177-187.
- Zaja, R., Munić, V., Klobucar, R. S., Ambriović-Ristov, A., & Smital, T. (2008). Cloning and molecular characterization of apical efflux transporters (ABCB1, ABCB11 and ABCC2) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic toxicology*, 90(4), 322-332.
- Zanger, U. M., Turpeinen, M., Klein, K., & Schwab, M. (2008). Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392(6), 1093-1108.
- Zeliger, H. (2011). *Human toxicology of chemical mixtures*. William Andrew.
- Zhang, A., Chen, D., Wei, H., Du, L., Zhao, T., Wang, X., & Zhou, H. (2012). Functional characterization of TNF- $\alpha$  in grass carp head kidney leukocytes: induction and involvement in the regulation of NF- $\kappa$  B signaling. *Fish & shellfish immunology*, 33(5), 1123-1132.

Zhang, Z., Swain, T., Bøgwald, J., Dalmo, R. A., & Kumari, J. (2009). Bath immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induce no changes. *Fish & shellfish immunology*, 26(5), 677-684.

Zhou J, Febbraio M, Wada T, et al. (2008) Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology* 134: 556-567

Zou, J., Peddie, S., Scapigliati, G., Zhang, Y., Bols, N. C., Ellis, A. E., & Secombes, C. J. (2003). Functional characterisation of the recombinant tumor necrosis factors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental & Comparative Immunology*, 27(9), 813-822.

Zou, J., & Secombes, C. (2016). The function of fish cytokines. *Biology*, 5(2), 23.



# Artículo de respaldo

De Anna, J. S., Leggieri, L. R., Darraz, L. A., Cárcamo, J. G., Venturino, A., & Luquet, C. M. (2018).

Effects of sequential exposure to water accommodated fraction of crude oil and chlorpyrifos on molecular and biochemical biomarkers in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 212, 47-55. Doi: 10.1016/j.cbpc.2018.07.003.





## Effects of sequential exposure to water accommodated fraction of crude oil and chlorpyrifos on molecular and biochemical biomarkers in rainbow trout

Julieta S. De Anna<sup>a,\*</sup>, Leonardo R. Leggieri<sup>a</sup>, Luis Arias Darraz<sup>b</sup>, Juan G. Cárcamo<sup>b,c</sup>, Andrés Venturino<sup>d</sup>, Carlos M. Luquet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Ecotoxicología Acuática, INIBIOMA– CONICET– CEAN, Ruta provincial 61, km 3, 8371 Junín de los Andes, Neuquén, Argentina

<sup>b</sup> Instituto de Bioquímica y Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Campus Isla Teja, Valdivia, Chile

<sup>c</sup> Centro FONDAF, Interdisciplinary Center for Aquaculture Research (INCAR), Chile

<sup>d</sup> Centro de Investigaciones en Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue, CITAAC, UNCo-CONICET, Instituto de Biotecnología Agropecuaria del Comahue, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Ruta 151, km 12, 8303 Cinco Saltos, Río Negro, Argentina

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Acetylcholinesterase  
Carboxylesterases  
CYP1A  
*Oncorhynchus mykiss*  
Water-soluble fraction  
*AhR*  
*ARNT*  
Chlorpyrifos

### ABSTRACT

Fish can be simultaneously or sequentially exposed to various kinds of pollutants, resulting in combined effects. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce cytochrome P450 monooxygenase 1A (CYP1A) expression, which catalyzes the conversion of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos (CPF) into its most active derivative, CPF-oxon. CPF-oxon inhibits CYP1A and other enzymes, including carboxylesterases (CEs) and acetylcholinesterase (AChE). We studied the effects of an *in vivo* exposure to crude oil water accommodated fraction (WAF) followed by an *ex vivo* exposure of liver tissue to CPF on the expression of *Cyp1a*, *AhR* and *ARNT* mRNA, CYP1A protein and on the activity of biomarker enzymes in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Juvenile rainbow trout were exposed to WAF (62 µg L<sup>-1</sup> TPH) for 48 h. Then, liver was dissected out, sliced and exposed to 20 µg L<sup>-1</sup> CPF *ex vivo* for 1 h. Liver tissue was analyzed for mRNA and protein expression and for CEs, AChE, glutathione S-transferase (GST) and CYP1A (EROD) activity. WAF induced *Cyp1a* mRNA and CYP1A protein expression by 10-fold and 2.5–8.3-fold, respectively, with no effect of CPF. WAF induced *AhR* expression significantly (4-fold) in control but not in CPF treated liver tissue. *ARNT* mRNA expression was significantly lowered (5-fold) by WAF. CPF significantly reduced liver EROD activity, independently of WAF pre-treatment. CEs activity was significantly inhibited in an additive manner following *in vivo* exposure to WAF (42%) and *ex vivo* exposure to CPF (19%). CPF exposure inhibited AChE activity (37%) and increased GST activity (42%).

### 1. Introduction

In agricultural areas with growing oil extraction and industry such as those in North Patagonia, Argentina, exposure of aquatic organisms to hydrocarbons can be expected to occur throughout the year, while pesticides may reach dangerous concentrations mainly during the application season (Loewy et al., 2011; Monza et al., 2013). Exposure to a mix of different pollutants can produce combined effects which are challenging to predict due to chemical interactions and effects on detoxification mechanisms (Wassmur et al., 2012).

The North Patagonian region accounts for an important proportion of the Argentine gas and oil production (Monza et al., 2013). Conventional and nonconventional hydrocarbon production activities coincide with the Neuquén River basin (32,450 km<sup>2</sup>), which in the lower basin locale includes irrigated areas with fruit production and the main cities

of the region. Besides irrigation, the Neuquén River supplies water for nearly 400,000 inhabitants (Monza et al., 2013). Sampled sediments from 17 stations along the Neuquén River, including areas impacted by oil and gas production, agriculture and urban discharges between 2007 and 08 showed low levels of aliphatic hydrocarbons at several stations and almost no polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) with the exception of naphthalene and pyrene (40 ng/g dw and 50 ng/g dw, respectively) at one site only. However, potentially contaminating activities related to hydrocarbon extraction, transport and processing have been greatly increased since 2010, when a large non-conventional oil and gas reserve (Vaca muerta) was discovered.

PAHs have been extensively studied as contaminants which can affect human and environmental health. These compounds can be present in the environment as a result of oil pollution, petroleum refining, organic material combustion, sewage and industrial discharges,

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [julideanna@gmail.com](mailto:julideanna@gmail.com) (J.S. De Anna), [luquet@comahue-conicet.gob.ar](mailto:luquet@comahue-conicet.gob.ar) (C.M. Luquet).

vehicle exhaust and also from natural sources, such as forest fires, natural petroleum seepage and volcanism (reviewed by Abdel-Shafy and Mansour, 2016). PAHs can cause a variety of effects including interference with cell membrane functions, teratogenesis, carcinogenesis, mutagenesis and immunosuppression (Davila et al., 1996; Pelkonen and Nebert, 1982; Peluso et al., 2008; Uno et al., 2004). Among other chemicals, some PAHs induce the expression of cytochrome P450 oxidases, particularly those of the cytochrome P450 1A subfamily (CYP1A), which play an important role in the Phase I oxidative biotransformation of xenobiotics. These enzymes metabolize PAHs to epoxides which are highly toxic intermediates but can be detoxified by phase II enzymes such as Glutathione S-transferase (GST) and other transferases, and then excreted by phase III transporters (Baird et al., 2005). In fish ecotoxicology, the subfamily CYP1A is by far the most studied CYP isoform and one of the most studied detoxifying enzymes. CYP1A expression is normally low but is highly induced in fish exposed to several PAHs (Goksøyr et al., 1991; Di Giulio and Clark, 2015). Induction of CYP1A is mediated by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) which resides in the cytoplasm linked to chaperone proteins. When AhR is activated by a ligand, it is released from the chaperones and translocated into the nucleus, where it dimerizes with aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT). The AhR-ARNT heterodimer binds to xenobiotic response elements in the promoter of *Cyp1a* (and many other genes), inducing transcription and protein expression (Denison and Nagy, 2003). Increased levels of CYP1A induce phase I biotransformation of PAHs and other xenobiotics (Whyte et al., 2000). In relation to the effects of the exposure to crude oil hydrocarbons on the AhR pathway, a transcriptomic study by Whitehead et al. (2011) reported up-regulated transcription of *Ahr* and several *Ahr* targets (e.g. *Cyp1a*, UDP-glucuronosyltransferase; *UGT*) in Gulf killifish (*Fundulus grandis*) from a site impacted by the Deep Water Horizon oil spill.

Besides PAHs, CYP1A can transform xenobiotics, such as organophosphate insecticides (OPs) into more toxic derivatives. For example, in OPs with a thione group (P=S) like Chlorpyrifos (O, O-diethyl-O-3, 5, 6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate; CPF), CYP1A oxidizes the P=S group to the corresponding oxon (P=O); a derivative which is more active and less stable than the parent OP (Fukuto, 1990). Created CPF-oxons inhibit CYP1A activity (Neal, 1980), possibly affecting the metabolism of PAHs and other CYP1A substrates. CPF is a broad spectrum OP, which has caused unintended effects on aquatic organisms by aerial overspray or run-off (Somnuek et al., 2009) and is one of the most widely used insecticides in Argentina (Salgado Costa et al., 2018). CPF is more persistent than other OPs, with a half-life in water ranging from 29 to 74 days (Rivadeneira et al., 2013), which increases the risk of prolonged exposure of aquatic animals. CPF-oxon inhibits  $\beta$ -esterase enzymes, such as acetylcholinesterase and carboxylesterases (AChE, CEs) mostly by stoichiometric binding. AChE is the main target of OPs and other insecticides since its inhibition results in the accumulation of the neurotransmitter acetylcholine in the synaptic space, leading to severe neurotoxicity (Fulton and Key, 2001; Kwong, 2002; Sanchez-Hernandez, 2007; Sogorb and Vilanova, 2002). In general, CEs are more sensitive to OPs than AChE, and protect the organism from anticholinesterase effects by removing OPs through the hydrolysis of ester bonds and by binding to the OP with higher affinity than AChE (Jokanovic, 2001; Maxwell, 1992; Sanchez-Hernandez, 2007; Tang and Chambers, 1999; Wheelock et al., 2005). In addition, CPF and other OPs have been reported to increase oxidative stress and antioxidant responses in various fish tissues (e.g. Faria et al., 2015; Ferrari et al., 2007; Guerreño et al., 2016).

There is little information about how previous exposures to PAHs may affect the toxicity of CPF on fish. Clark and Di Giulio (2012) have reported that populations of the Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) chronically exposed to PAH down-regulate the AhR pathway and have lower susceptibility to CPF toxicity than reference populations. These authors suggest that, in resistant fish populations, the lack of induction of CYP1A expression reduces the CPF activation exerted by AhR

agonists, as observed in the control population. In addition, Clark and Di Giulio (2012) have observed that PAH adapted killifish are more resistant to CPF in the absence of AhR agonists and to other chemicals which are detoxified by CYP1A. Related works reviewed by Di Giulio and Clark (2015) show that, in addition to a recalcitrant AhR, these fish have increased antioxidant capacity and phase II enzyme activity (including GST), and higher expression of the multixenobiotic resistance transporter P glycoprotein (Pgp, ABCB1), which may explain in part the resistance to many unrelated xenobiotics.

The rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, has been introduced worldwide and is abundant in North Patagonian rivers and lakes where it can be exposed both simultaneously or subsequently to PAHs, inducing CYP1A expression, and to pesticides (such as CPF) which may be activated by CYP1A. The objective of this study is to investigate whether previous exposures to WAFs of crude oil affect *O. mykiss* liver *Cyp1a*, *AhR*, and *ARNT* mRNA expression, and CYP1A protein expression and activity. We also analyze whether the expected augment in CYP1A activity enhances the effects of a subsequent short-term exposure to CPF on CE, AChE, and GST activities in *ex vivo* liver preparations.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Water-accommodated fraction of crude oil

The WAF was prepared immediately before each experiment, according to Singer et al. (2000), using 4.75 g of crude oil per L of Chimehuin River water (alkalinity 34 mg L<sup>-1</sup>, conductivity 36  $\mu$ S cm<sup>-1</sup>, pH 7.6, 8.37 mg L<sup>-1</sup> dissolved oxygen at a temperature of 10–12 °C). Crude oil was obtained from the oil spill of an abandoned exploitation, which has not been stopped and continues flowing at present into the La Mina stream, Río Negro Province, Argentina (41°17'21" S - 71°10'58" W). The oil sampled from surface seepage was characterized as immature heavy crude oil (Ro = 0.44–0.53%, American Petroleum Institute (API) = 18° and sulfur = 0.45%; Cazau et al., 2005), composed of 33.7% saturated hydrocarbons, 17.8% aromatic hydrocarbons, 5.9% asphaltenes and 42.6% NSOs (compounds with nitrogen, sulfur, oxygen and heavy metals; data provided by YPF S.A. Argentina). Samples were transported on ice to the laboratory of Aquatic Ecotoxicology, Centro de Ecología Aplicada del Neuquén (CEAN, Junín de Los Andes, Argentina) and kept at 4 °C in glass bottles, as recommended for PAH samples before analysis. The obtained WAF was analyzed by the method of the Environmental Protection Agency (USEPA) 3510C- 8015D GC-FID. After liquid-liquid extraction from 1 L, total petroleum hydrocarbons (TPH, C6 to C36, including 16 priority PAHs USEPA, without discrimination, (Supplementary File 1). were determined with a detection limit of 0.002 mg L<sup>-1</sup>, and a quantitation limit of 0.010 mg L<sup>-1</sup>. TPH (C6-C36) in WAF were 1.24 mg L<sup>-1</sup> (CV < 7%). The experimental aquarium water was prepared by diluting WAF at 5% in Chimehuin river water, in order to obtain a nominal TPH concentration of 62  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. This concentration is similar to the concentrations recorded by Leggieri et al. (2017) from 0 to 1600 m downstream from the oil spill in the La Mina stream, where abundant juvenile rainbow trout can be observed.

### 2.2. Chlorpyrifos

A standard CPF solution of 20 mg L<sup>-1</sup> in acetone was prepared by dissolving 1 mg of CPF (O,O-diethyl O-[3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate], 99% purity, Chem Service, West Chester, Pennsylvania, USA) in 50 mL of chromatographic quality grade acetone (Cicarrelli Reagents S.A, Argentina). The exact concentration of the standard solution was verified by gas chromatography (Agilent 6890 series, Wilmington, USA).



### 2.3. Animal preparation and experiments

Juvenile diploid *Oncorhynchus mykiss* ( $17.88 \pm 0.87$  g;  $12.19 \pm 0.29$  cm; Mean  $\pm$  SD) were obtained from the CEAN aquaculture facility. Before experimentation, fish were kept in a continuous flow system with Chimehuin river water. The Chimehuin river can be considered pollution free since it is the effluent of the Lake Huechulafquen, a deep glacial lake (surface area 70 km<sup>2</sup>) in the Lanín National Park, where agricultural and other economic activities are not allowed (Federal Law 22351, Argentina). Between the lake and the CEAN facility, the river flows along 20 km through a semi-desert area with almost no human population and no agriculture or industrial activity. Fish received 1% body mass ratio of commercial trout feed per day. In the laboratory, fish were individually acclimated for 48 h in cylindrical 10 L containers with continuously aerated water from Chimehuin River in a static system (USEPA, 1996), at a temperature of 16–18 °C, pH 7.4–7.6 and 12 h light: 12 h dark photoperiod. Each experimental group comprised six fish housed in individual containers (n = 6). A factorial design experiment (2 factors  $\times$  2 levels) was conducted in 24 individual tanks in order to investigate the effects of *in vivo* pre-treatment with WAF (62  $\mu$ g L<sup>-1</sup> TPH concentration) for 48 h and subsequent *ex vivo* exposure of liver slices to 20  $\mu$ g L<sup>-1</sup> CPF for 1 h. This concentration, which is about twice the CPF lethal concentration 50 (LC50 96 h) for rainbow trout (9  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, U. S. Environmental Protection Agency, 1996), was chosen for the *ex vivo* exposure in order to ensure an intracellular CPF concentration high enough to produce biochemical effects upon a short time exposure (1 h).

At the end of the pre-treatment period, fish were sacrificed by a blow to the head followed by decapitation. The liver of each fish was rapidly removed and rinsed in ice-cold Cortland saline (pH 7.4, 5 mmol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 5.55 mmol L<sup>-1</sup> glucose); a portion of about 200 mg was cut into thin slices and kept in small glass vessels with 6 mL of the same solution and constant aeration. Liver slices from 6 WAF exposed and 6 pre-treatment control fish were treated with 20  $\mu$ g CPF L<sup>-1</sup>. Liver slices from the remaining fish (6 from the WAF exposure and 6 from the pre-treatment control) were treated with 0.1% acetone (solvent control). After 1 h, the liver slices were removed, separated into sub-samples for mRNA expression, protein expression and enzyme activity analysis. Sub-samples were stored in RNA later (Ambion) at -30 °C or in liquid nitrogen with PBS-Triton X-100 (phosphate buffered saline; pH to 7.4, 30 mmol L<sup>-1</sup> KCl, 15 mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4 mol L<sup>-1</sup> NaCl, 80 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100) until analysis (within 2 weeks). This experiment allowed the direct exposure of liver tissue from control and WAF exposed individuals to a controlled CPF concentration, in order to analyze possible interactions between both pollutants, avoiding possible CPF metabolization in other organs. Preliminary experiments showed no differences in GST and CEs activity between rainbow trout liver slices treated with either 0.1% acetone in Cortland saline or the Cortland saline control. All the experimental protocols were approved by the Bioethics Committee, Faculty of Biochemical and Pharmaceutical Sciences, National University of Rosario, Argentina (6060/116).

### 2.4. *Cyp1a*, *AhR* and *ARNT* mRNA expression by real time PCR (q-PCR)

Total RNA was extracted from liver tissue (100 mg) from three individuals randomly selected from each experimental group (n = 3) using Trizol reagent (Ambion), following the manufacturer's instructions. The yield and purity of the extracted total RNA was determined by UV spectrophotometry (A260/A280 and A260/A230 ratio). cDNA was synthesized using 2  $\mu$ g of total RNA and RevertAid reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.). For qPCR, each reaction mixture contained 1  $\mu$ L cDNA template, 0.5  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> of each primer, 8  $\mu$ L of water, and 10 L  $2 \times$  SYBR green q-PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.). The primer pairs used for Real-Time qPCR are shown in Table 1. Reactions were performed in

a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The thermal cycling program consisted of a denaturing step (95 °C, 3 min) followed by 40 cycles of denaturation (95 °C for 10 s), annealing (60 °C for 30 s), and extension (72 °C for 20 s). High resolution melting analysis was performed by collecting data between 60 and 95 °C with a temperature interval of 0.3% (Supplementary File 2). B-actin was used as housekeeping gene. The target gene expression was calculated by 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method (Livak and Schmittgen, 2001).

### 2.5. *CYP1A* protein expression

Protein extraction was performed as described by Hasselberg et al. (2008). Liver tissue samples (c.a. 50 mg each) from six individuals per treatment (n = 6) were homogenized with a pestle and then sonicated for 5–10 s on ice in 1 mL of RIPA buffer (50 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.4; 150 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, 1 mmol L<sup>-1</sup> EGTA) supplemented with Protease Inhibitor Cocktail Set I (Calbiochem, MERCK, Germany) and 200 mmol L<sup>-1</sup> phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Samples were frozen in liquid nitrogen, sonicated again and centrifuged at 21,500  $\times$ g for 30 min at 4 °C. The supernatants were collected and stored at -20 °C. Protein concentration was measured using a bicinchoninic acid (BCA) kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Protein samples from 50  $\mu$ g of liver were separated by 8% SDS-PAGE for 30 min at 70 V and 90 min at 120 V. Electrophoresis was followed by blotting at 1.5 A for 21 min onto a nitrocellulose membrane, using a Trans-Blot Turbo device (BioRad). Non-specific binding sites were blocked for 3 h with 0.1% casein in 1X PBS. Anti-CYP1A mouse monoclonal antibody (C10-7, Abcam Inc., Cambridge, USA) and anti- $\beta$ -actin rabbit antibody (Sigma-Aldrich) were diluted 1:3000 in antibody dilution buffer (0.1% Tween 20 and 0.1% casein in PBS). The nitrocellulose membrane was incubated with primary antibodies overnight at 4 °C with slow agitation. The membrane was then washed three times with PBS, 0.1% Tween 20 and incubated in the dark with IRDye 800CW labeled donkey anti-mouse and IRDye 700DX labeled goat anti-rabbit secondary antibodies (Rockland Immunochemical, Gilbertsville, PA, USA) diluted 1:10,000 in antibody buffer, for 40 min at room temperature. Membranes were rinsed with washing buffer and the signal was detected by infrared emission at 800 and 700 nm using ODYSSEY® CLx Imager (LI-COR Biotechnology, USA). Images were analyzed with Image Studio LiteVer 5.0 software (LI-COR Biotechnology, USA). AccuRuler RGB Prestained protein ladder (Maestrogen) was used as a molecular mass marker. The controls were performed by omitting either the primary or the secondary antibodies (Supplementary File 3). B-actin was used as housekeeping protein and loading control. The presence of a single product of 55 kDa was considered a positive result for CYP1A protein and a single product of 42 kDa was considered a positive result for  $\beta$ -actin. Relative CYP1A expression was calculated as the CYP1A signal/ $\beta$ -actin signal ratio.

### 2.6. Enzyme activity

#### 2.6.1. EROD

7-ethoxy-resorufin O-deethylation (EROD) activity was measured according to Kennedy and Jones (1994). This method is based on the increase of the fluorescence in the reaction medium due to the transformation of 7-ethoxyresorufin (7-ER, standard substrate) into resorufin. Briefly, liver tissue samples (c.a. 150 mg each) from six individuals per treatment were homogenized in CaHBSS (Hank's Balanced Salt Solution with Calcium; Gibco®) pH 7.8, sonicated twice for 15–30 s on ice, and then centrifuged at 14,000  $\times$ g for 5 min at 4 °C. The assay solution (150  $\mu$ L) contained 30  $\mu$ L of supernatant, 6.25  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> 7-ER (Sigma), 10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> dicoumarol (Sigma) and 1 mmol L<sup>-1</sup> NADPH (Sigma) in CaHBSS pH 7.8. The reaction was performed at 30 °C in a 96-well microplate with a black flat bottom. Each sample (n = 6) was analyzed in triplicate. Fluorescence was read every 42 s for 6 min with a fluorescence spectrophotometer (BioTek Synergy™ HT Multi-Mode

**Table 1**  
Details of primer pairs and their amplicons used in the study.

Gene	Primer pair sequence (5'-3')	Amplicon length (pb)	Reference
<i>AhR</i>	FW ggatgccactgagttccaaccaa	147	NM_001124252.1
	RV aatgctgctgtatgggtagctga		
<i>ARNT</i>	FW acctgaatgcagagcaatccca	113	NM_001124710.1
	RV aggggtgattgaggaagagctgaga		
<i>Cyp1a</i>	FW aaccagtgccaggtcaacctgat	134	NM_001123687.1
	RV cccatgccgaatacagacacttt		
<i>B-actina</i>	FW tgaagtgtgacgtggacatccgta	108	Cárcamo et al., 2011
	RV aggtgatctccttctgcatcctgt		

Microplate Reader), at excitation and emission wavelengths of 530 and 620 nm, respectively. EROD activity was expressed as pmol of resorufin mg protein<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, using resorufin standards for calibration. Total protein content was determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit for EROD activity.

### 2.6.2. Glutathione S-transferase

For measuring glutathione S-transferase (GST) activity, 0.5 g of liver tissues were homogenized in 1 mL of homogenization buffer (20 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mmol L<sup>-1</sup> EDTA and PMSF) and then centrifuged at 11,000 × g for 15 min at 4 °C. Supernatants were stored at -20 °C and enzyme activity was measured within 24 h. GST activity was measured at 340 nm following the methodology described by Habig et al. (1974). Each sample was measured in triplicate, using 15 µL of supernatant per tube, at 25 °C, using 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) 100 mmol L<sup>-1</sup> dissolved in ethanol as the substrate. Specific GST activity was calculated using a molar extinction coefficient of 9.6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> and referred to total protein, which was measured by Bradford's method (1976).

### 2.6.3. Acetylcholinesterase

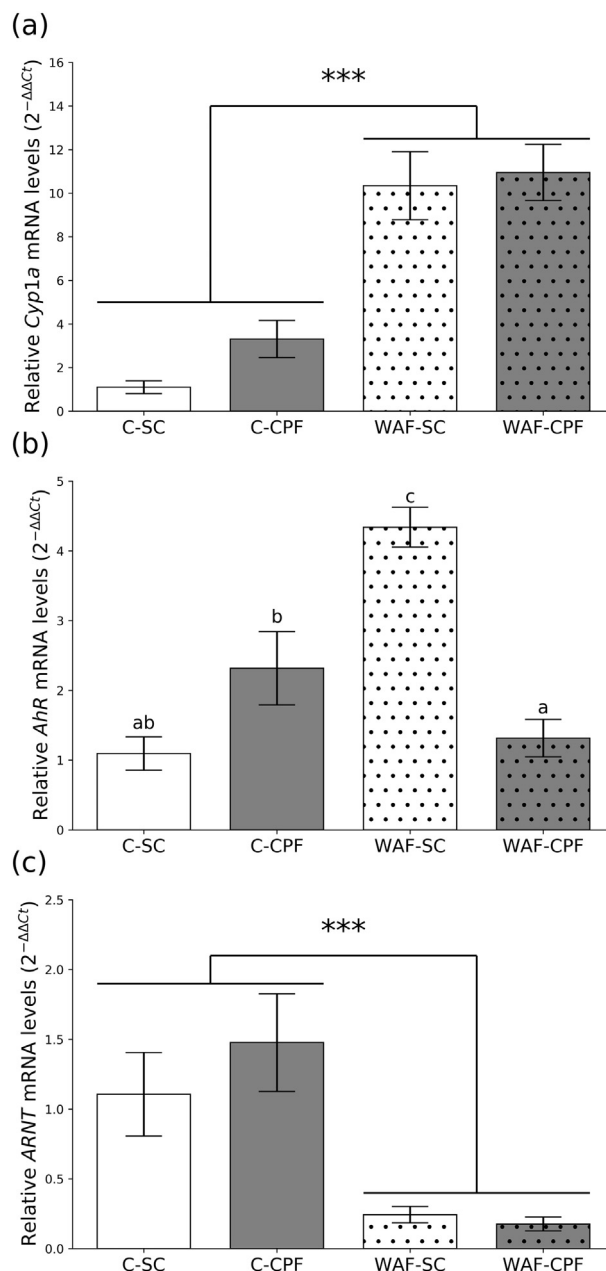
Acetylcholinesterase (AChE) activity was measured in duplicate, using 200 µL of liver supernatant, 100 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 8.0, with 0.2 mmol L<sup>-1</sup> 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) and 1.5 mmol L<sup>-1</sup> acetylthiocholine iodide as the substrate, according to Ellman et al. (1961). Absorbance at 412 nm was recorded for 1 min every 10 s at 25 °C. Results were referred to total protein, which was measured by Bradford's method (1976).

### 2.6.4. Carboxylesterase

CE activity was determined in duplicate using p-nitro-phenyl butyrate (p-NPB) as the substrate, according to Ferrari et al. (2007). Reactions were performed in 2.5 mL of 100 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 8.0, containing 5% acetone and 1 mmol L<sup>-1</sup> p-NPB (molar extinction coefficient, 18.6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Absorbance was measured at 400 nm for 1 min every 10 s at 25 °C. Results were referred to total protein, measured by Bradford's method (1976).

### 2.7. Data analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 11.5 (Inc., Chicago, Illinois, USA), under the License from National University of Luján, Argentina. All data were expressed as the mean ± standard deviation. Experimental data were checked for normality and homogeneity of variance using the Kolmogorov–Smirnov one-sample test and Levene's test, respectively. Protein expression data were normalized by log (x + 1) transformation. Enzyme activities, mRNA expression and CYP1A protein expression (CYP1A/β-actin) data were analyzed by two-way ANOVA. The explanatory variables in the two-way ANOVA were WAF *in vivo* exposure (pre-treatment control vs. WAF) and CPF *ex vivo* exposure (Solvent control vs. CPF). Enzyme activity data were also analyzed by *ad hoc* orthogonal contrasts. When the interaction term of



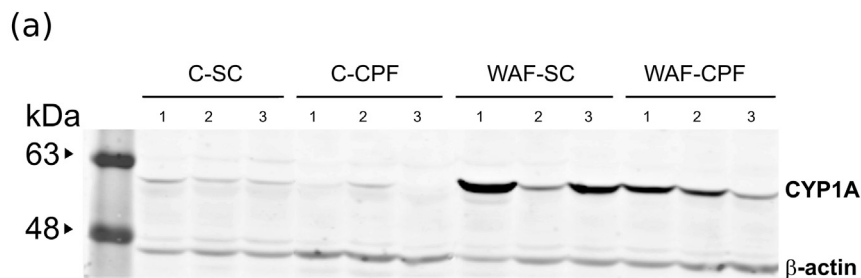
**Fig. 1.** Relative mRNA levels. (2<sup>ΔΔCt</sup>) of *Cyp1a* (a), *AhR* (b) and *ARNT* (c) in liver samples from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to 62 µg L<sup>-1</sup> water accommodated fraction (WAF) or to control medium (C) and subsequently exposed *ex vivo* (liver slices) to chlorpyrifos (CPF) or to solvent control (acetone, SC) Two-way ANOVA, \*\*\*P < 0.001 for WAF effects. Different letters indicate significant differences between group means (*post hoc* Tukey's multiple comparisons). Values are expressed as mean ± SEM (n = 3).

the ANOVA was significant; Tukey HSD posttest comparisons were performed.

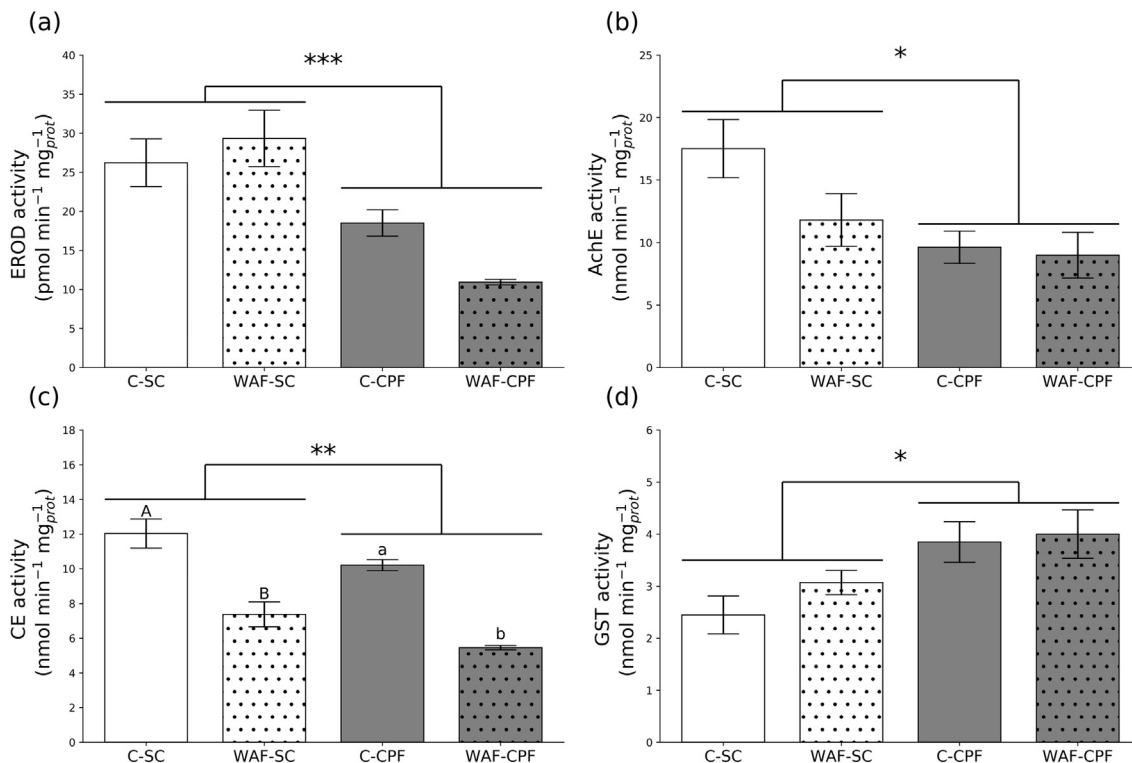
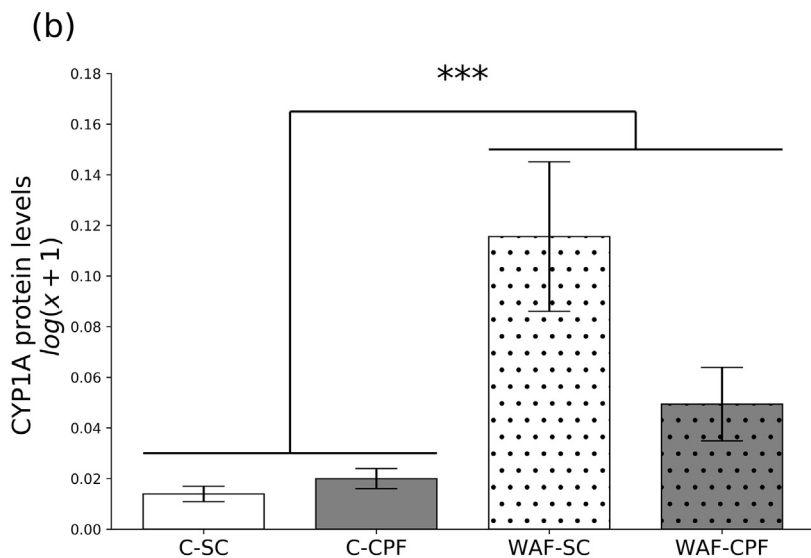
## 3. Results

### 3.1. *Cyp1a*, *AhR* and *ARNT* mRNA expression

*Cyp1a* mRNA expression was significantly induced in liver slices from fish pre-treated with WAF *in vivo* compared with non-pre-treated fish (control, C) (two-way ANOVA P < 0.001, F = 38.69 for WAF effect). There were no significant interaction or CPF effects. Liver slices from WAF pre-treated fish and subsequently exposed to solvent control



**Fig. 2.** (a) Scan of a representative Western blot membrane (showing three out of six replicates) for CYP1A protein in liver samples from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to  $62 \mu\text{g L}^{-1}$  water accommodated fraction (WAF) or to control medium (C) and subsequently exposed *ex vivo* (liver slices) to chlorpyrifos (CPF) or to solvent control (acetone, SC) (b) Relative expression of CYP1A protein (CYP1A/ $\beta$ -actin ratio). Two-way ANOVA: \*\*\*P < 0.001 for WAF effects. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 6).



**Fig. 3.** Effects of water accommodated fraction (WAF) and Chlorpyrifos (CPF) on liver EROD activity (a), AchE (b), CEs (c) and GST (d). The experimental groups include control fish (C) and fish pre-treated with  $62 \mu\text{g L}^{-1}$  WAF for 48 h (WAF), which were then sacrificed and their livers sliced and exposed *ex vivo* to a solvent control of treatment (C-SC and WAF-SC) or to  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  Chlorpyrifos (C-CPF and WAF-CPF). Two-way ANOVA: \*\*\*P < 0.001; \*\*P < 0.01 and \*P < 0.05 for CPF effects. In (c), different uppercase and lowercase letters indicate significant effects of WAF in the orthogonal contrasts C-SC vs. WAF-SC and C-CPF vs. WAF-CPF, respectively. Results are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 6).

(WAF-SC) or to CPF (WAF-CPF) showed similar increments (about 10-fold) in *Cyp1a* mRNA expression with respect to C-SC (Fig. 1a). Liver slices from WAF pre-treated fish showed significantly higher *AhR* mRNA expression than those from control fish (two-way ANOVA  $P < 0.05$ ,  $F = 6.896$  for WAF effect). Interaction was also significant ( $F = 24.7$ ,  $P < 0.005$ ) and there was no significant effect of CPF. Tukey's multiple comparisons showed that only in the WAF-SC group, *AhR* mRNA expression was significantly induced (about 4-fold with respect to C-SC,  $P < 0.01$ ) (Fig. 1b). There was no induction by WAF in the WAF-CPF group, which showed an *AhR* expression even lower than that of C-CPF ( $P < 0.05$ ). In contrast, mRNA expression of *ARNT* in liver slices from fish pre-treated with WAF was reduced to  $< 20\%$  of those from control fish (two-way ANOVA  $P < 0.001$ ,  $F = 14.34$  for WAF effect). There were no significant interaction or CPF effects (Fig. 1c).

### 3.2. CYP1A protein expression

CYP1A protein levels in liver slices from fish pre-treated with WAF *in vivo* were significantly higher than in those from control fish. Liver slices from WAF-SC and WAF-CPF showed 8.3-fold and 2.5-fold higher CYP1A protein levels than their respective controls (C-SC and C-CPF) (Fig. 2b). No significant effects of subsequent *ex vivo* exposure to CPF or interaction were detected (Two-way ANOVA:  $F = 12.4$ ,  $P < 0.001$ , for WAF effects;  $F = 2.62$ ,  $P = 0.125$ , for CPF; and  $F = 3.77$ ,  $P = 0.070$  for interaction).

### 3.3. Enzyme activity

#### 3.3.1. EROD

EROD activity was lower in liver slices exposed to CPF than in solvent control ones, with an average reduction of 47% (ANOVA  $F = 21.51$ ,  $P < 0.001$  for CPF effect). There were no significant effects of WAF pre-treatment or interaction between treatments (Fig. 3a).

#### 3.3.2. Acetylcholinesterase

Liver acetylcholinesterase activity was inhibited by CPF ( $F = 6.45$ ,  $P < 0.05$ ), irrespective of the pre-treatment (control or WAF). AChE activity was 37% lower in liver slices treated with CPF than in solvent controls. No statistically significant effects of WAF or interaction between treatments were detected (Fig. 3b).

#### 3.3.3. Carboxylesterase

Liver CE activity was significantly reduced by WAF as well as by CPF, without significant interaction effects. This enzyme's activity was reduced by CPF (19% in average,  $F = 8.74$ ,  $P < 0.01$ ). In addition WAF inhibited CE activity by 42% in average ( $F = 55.25$ ,  $P < 10^{-6}$ , different small letter indicate significant effect of WAF according to two-way ANOVA, Fig. 3c). The effects of both treatments were additive, resulting in 55% lower liver CE activity in WAF-CPF than in C-SC (Fig. 3c).

#### 3.3.4. Glutathione S-transferase

Glutathione S-transferase activity was similarly increased by CPF in liver slices from WAF-pre-treated and control groups (42%, ANOVA  $F = 8.14$ ,  $P < 0.01$ ). There were no significant effects of WAF or interaction between WAF and CPF (Fig. 3d).

## 4. Discussion

This paper reports the effects of sequential exposure of juvenile rainbow trout to WAF (*in vivo* for 48 h) and CPF (*ex vivo* liver preparations) on key hepatic enzymes involved in xenobiotic detoxification and/or in PAH and CPF toxicity in the rainbow trout. The activation of AHR signaling pathway by WAF exposure was analyzed by qPCR.

### 4.1. *Cyp1a*, *AhR* and *ARNT* mRNA and CYP1A protein expression

WAF prepared from the La Mina stream oil spill induced expression of *Cyp1a*/CYP1A mRNA and protein in rainbow trout liver by 9- and 3–8-fold, respectively. These results are of comparable magnitude as those seen in primary cultured rainbow trout hepatocytes treated with  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) for 24 h (3.5- and 5-fold induction of *Cyp1a* mRNA and CYP1A protein expression, respectively, Wiseman and Vijayan, 2007). However this is a modest induction compared to those obtained in the liver of rainbow trout and other fish species exposed to other AhR agonists, including a 110–200-fold increase in rainbow trout *Cyp1a* mRNA expression after exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) for 24 h (Jönsson et al., 2010); a 62.5-fold increase in rainbow trout injected with the PAH B[a]Pyrene (B[a]P) (Woźny et al., 2010) and a 418-fold increase in CYP1A protein expression in Atlantic killifish injected with the PAH 3-methylcholanthrene (Van Veld and Westbrook, 1995).

*AhR* mRNA expression was also induced (4-fold) by WAF exposure while *ARNT* expression was reduced to  $< 20\%$  of the control. Induction of *AhR* upon treatment with AhR agonists has been reported for several fish species including rainbow trout (Abnet et al., 1999; Andreassen et al., 2002; Hanno et al., 2010; Tanguay et al., 1999; Wiseman and Vijayan, 2007; Woźny et al., 2010). While other fish species have two *AhR* genes (*AhR1* and *AhR2*), the rainbow trout lacks *AhR1* but possess three *AhR2* forms (*AhR2 $\alpha$* , *AhR2 $\beta$*  and *AhR2 $\delta$* ). The former two have been well characterized and show induction by different AhR agonists (Abnet et al., 1999; Wiseman and Vijayan, 2007; Woźny et al., 2010). The latter authors have reported induction of *Ahr2 $\alpha$*  and *Ahr2 $\beta$*  mRNA by B[a]P in the same order as the obtained in our experiment (5.9- and 6.9-fold, respectively vs. 4-fold). Recently, Bak et al. (2017) have identified three potential xenobiotic responsive elements (XREs) in the red seabream (*Pagrus major*) *rsAhR1* and *rsAhR2* genes. Besides, these authors showed that the XREs found in the *rsAhR2* gene sequence were able to mediate TCDD-induced *Ahr2* transcription and suggested that AhR auto-induction could amplify the signal for regulating downstream genes. Our results suggest that the PAHs present in WAF promote rainbow trout *Ahr2* auto-induction, which results in increased CYP1A expression although the lack of *AhR* induction in WAF-CPF treated fish is difficult to explain. The down-regulation of *ARNT* mRNA would reduce the formation of the AhR-ARNT heterodimer, which would reduce the induction of downstream genes, if the abundance of ARNT were a limiting factor. This ARNT down-regulation could also affect the crosstalk of the AhR pathway with other pathways such as the hypoxia induced factor (HIF-1 $\alpha$ ), which also depend on dimerization with ARNT (Fleming et al., 2009; Mandl et al., 2016). In a study performed with liver samples from wild Baikal seals chronically exposed to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and PCBs pollution, Kim et al. (2005) reported positive and negative correlation of *AhR* and *ARNT* mRNA expression, respectively, with CYP1A and CYP1B protein expression. These authors suggested that CYP1A/B metabolites could downregulate ARNT. Although ARNT has been described for several fishes including the rainbow trout (Powell et al., 1999; Tanguay et al., 1999), little is known about the effects of AHR agonists on its expression. We have detected a clear down-regulation of *ARNT* mRNA in the same experimental groups in which the AHR pathway was activated. Since we did not detect any induction of EROD activity, the down-regulation of *ARNT* by CYP1A metabolites seems unlikely. *ARNT* has been considered as constitutively expressed although this notion has recently been revised for cancer cell lines (reviewed by Mandl and Depping, 2014). These authors have posteriorly demonstrated that the HIF-1 $\alpha$ -ARNT heterodimer binds to specific sites in the *ARNT* promoter region inducing its transcription, in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells (Mandl and Depping, 2017). In contrast, there is little or no information about the regulation of fish *ARNT* transcription. Calò et al. (2014) have reported that *in vivo* exposure to PCB126 induces both, AhR and ARNT protein expression in liver of the seabream (*Spaurus*



*aurata*). This is contrasting with the downregulation of *ARNT* mRNA observed in the present work. However, these studies are not totally comparable since increased protein level does not necessarily imply increased transcription. Based on our results and on the literature on cancer cell lines (e.g. Mandl and Depping, 2014, 2017), we can speculate that rainbow trout *ARNT* transcription could be downregulated by WAF exposure, either through the AhR signaling pathway or through other pathways which involve *ARNT* interactions. Additionally, changes in RNA stability cannot be disregarded.

#### 4.2. EROD activity

It was expected that the increased CYP1A protein expression described above would be associated with an increase in enzyme activity. However, EROD activity was not significantly increased by WAF exposure. According to the supplier, the antibody used in this work (Abcam 10-7) detects both CYP1A1 and CYP1A2 mouse proteins and also reacts with rainbow trout CYP1A. Since mammalian CYP1A2 displays 7-methoxy-resorufin *O*-demethylation (MROD) rather than EROD activity, the induction of protein expression by WAF with no increase in EROD activity recorded in this work could be explained by the induction of a rainbow trout CYP1A protein with little or no EROD activity. In this sense, Gooneratne et al. (1997) have characterized two rainbow trout *Cyp1* genes (*Cyp1a1* and *Cyp1a3*) and Jönsson et al. (2010) have reported *Cyp1a3* but not *Cyp1a1* induction in rainbow trout caged at a polluted site. In addition, Liu et al. (2013) have reported that rainbow trout CYP1A3 is about 10-fold more sensitive to TCDD than CYP1A1. However, since Gooneratne et al. (1997) have shown that the protein products of rainbow trout *Cyp1a1* and *Cyp1a3* genes display similar EROD and MROD activities, the lack of EROD activity induction in our experiment cannot be explained by differential expression of a particular *Cyp1a* gene. Thus, the most likely explanation for this result is that, besides PAHs, which induce AHR-mediated CYP1A expression, the utilized WAF could also contain other compounds, such as high molecular weight PAHs and alkylphenols, which can inhibit EROD activity (Melbye et al., 2009).

An increase in CYP1A activity would result in higher rate of conversion of CPF into its active form, CPF-oxon (Tang et al., 2001), as it was reported for humans (Croom et al., 2010; Sams et al., 2004). In turn, the sulfur ion released in CPF activation is highly reactive and is believed to bind immediately to the heme iron of CYP molecule, inhibiting its activity (Neal, 1980; Flammarion et al., 1998; Tang et al., 2002). In rainbow trout liver slices, we have found that 1 h of *ex vivo* exposure to CPF inhibits EROD activity in preparations from both control and WAF pre-treated individuals. Although there is a tendency to a higher percentage inhibition of EROD activity by CPF in liver preparations from WAF pretreated fish (63% and 29% for WAF-CPF and C-CPF, respectively), although this effect is not statistically significant.

#### 4.3. AChE, CE, and GST activity

Acetylcholinesterases are considered as the specific targets of OPs and other anticholinesterase agents (Sanchez-Hernandez, 2007). For CPF and other OPs, this effect is enhanced by the formation of OP-oxon catalyzed by CYP1A (Chambers and Carr, 1996). *O. mykiss* liver slices exposed *ex vivo* to CPF for 1 h showed significantly reduced AChE activity with respect to liver slices exposed to the solvent control. This effect was similar in preparations obtained from control and WAF pre-treated individuals and the ANOVA showed no interaction effects. Thus, there is no evidence in this work about additive or synergistic effects of CPF and WAF on AChE activity. These results agree with the lack of change recorded in EROD activity and allow us to speculate that the CYP1A protein induced in our experiments displays low or no EROD or CPF-oxon formation activity.

In many species CEs have higher affinity for OPs than AChEs. Therefore CEs would be preferentially inhibited over AChE following

exposure to OPs (Gupta and Dettbarn, 1993; Wogram et al., 2001; Wheelock et al., 2005). The lack of interaction effects between WAF and CPF indicates no synergistic or antagonistic effects of both toxicants. This agrees with the lack of induction of EROD activity and coincides with the results observed for AChE. However, WAF and CPF have shown additive inhibitory actions on CEs activity, as evidenced by the significant effects of both treatments and by the significantly lower CEs activity recorded in the WAF-CPF group with respect to C-CPF. These effects are probably mediated by different mechanisms, taking into account the differential time and modes of exposure to both toxicants. Moreover, the additive effect of WAF and CPF on CEs inhibition highlights the fitness of CEs activity as a biomarker, reflecting in this case reduced detoxification capacity upon exposure to a mixture of contaminants.

Environmental toxicants detoxified by GST include PAH, pesticides, and reactive intermediates produced by phase I biotransformation and other biochemical reactions. In general terms, there are abundant reports on increased GST activity in aquatic organisms in response to a range of xenobiotics (Ferrari et al., 2007; Guerreño et al., 2016; Hayes et al., 2005), indicating an evolutionarily conserved response. GST actively detoxifies OP pesticides as well as their oxon metabolites (Testai et al., 2010). However, reports on CPF effects on fish GST activity are scarce and show mostly no significant effects in short-term studies (6 to 96 h) (Botté et al., 2012; Bonifacio et al., 2017; Kavitha and Rao, 2008), and induction of GST in *Cyprinus carpio* liver after 40 d CPF exposure (Xing et al., 2012). Our results indicate that liver GST activity in *O. mykiss* is not affected by 48 h *in vivo* exposure to WAF but is induced by 1 h CPF exposure independently of the pre-treatment, which suggests a rapid detoxifying response against this toxicant.

We have performed a sequential exposure design in order to study the possible interaction effects of WAF and CPF on crucial detoxifying and target enzymes. Clark and Di Giulio (2012) have found that a PAH-adapted population of the killifish *F. heteroclitus* which shows no induction of CYP1A by AHR agonists, has increased resistance to CPF, probably due to reduced rate of CPF-oxon formation. Additionally, they suggested that other defense molecules, namely other CYPs, phase II enzymes such as GST, and ATP-binding cassette proteins, would be involved in the resistance against a variety of pesticides and other xenobiotics. In contrast, our results show an induction of the AHR pathway in *O. mykiss* liver by 48 h-exposure to WAF does neither increase EROD activity nor the sensitivity to CPF.

In conclusion, exposure to WAF activates the AHR-CYP1A pathway by inducing the transcription of *Ahr* and *Cyp1a* and the expression of CYP1A protein in *O. mykiss* liver but also reducing the expression of *ARNT*. This activation is not accompanied by an increase in EROD activity; and therefore CPF effects on acetylcholinesterase or carboxylesterases are not reinforced by WAF exposure. On the other hand, WAF and CPF produce additive inhibitory effects on carboxylesterase activity.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.07.003>.

#### Acknowledgements

We acknowledge material support from CEAN (Neuquén Province, Argentina), and thank Walter Torres for his kind help with fish and aquaria. In addition, we would like to thanks to Federico Elias of Instituto Balseiro for performing graphics. We appreciate the strong support from the staff of the Institute of Biochemistry and Microbiology, Austral University of Chile (Valdivia, Chile), especially to Alejandra Mancilla Nova and Tamara Vera for their kind help in the laboratory work. We also acknowledge the detailed and constructive comments by two anonymous reviewers. This work was supported by CONICET, Argentina [PIP 11220130100529 CO]; ANPCYT, Argentina [PICT 2013-1415]; FONDAP, Chile [15110027] and FONDECYT, Chile [1150934].

## References

- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25, 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- Abnet, C.C., Tanguay, R.L., Hahn, M.E., Heideman, W., Peterson, R.E., 1999. Two forms of aryl hydrocarbon receptor type 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Evidence for differential expression and enhancer specificity. *J. Biol. Chem.* 274, 15159–15166.
- Andreasen, E.A., Hahn, M.E., Heideman, W., Peterson, R.E., Tanguay, R.L., 2002. The zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor type 1 is a novel vertebrate receptor. *Mol. Pharmacol.* 62, 234–249. <https://doi.org/10.1124/mol.62.2.234>.
- Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B., 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 106–114. <https://doi.org/10.1002/em.20095>.
- Bak, S.M., Iida, M., Soshilov, A.A., Denison, M.S., Iwata, H., Kim, E.Y., 2017. Auto-induction mechanism of aryl hydrocarbon receptor 2 (AHR2) gene by TCDD-activated AHR1 and AHR2 in the red seabream (*Pagrus major*). *Arch. Toxicol.* 91 (1), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1732-9>.
- Bonifacio, A.F., Ballesteros, M.L., Bonansea, R.I., Filippi, I., Amé, V.M., Hued, A.C., 2017. Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere* 188, 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.156>.
- Botté, E.S., Jerry, D.R., Codi King, S., Smith-Keune, C., Negri, A.P., 2012. Effects of chlorpyrifos on cholinesterase activity and stress markers in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*. *Mar. Pollut. Bull.* 65, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.08.020>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Caló, M., Licata, P., Bitto, A., Lo Cascio, P., Interdonato, M., Altavilla, D., 2014. Role of AHR, AHRR and ARNT in response to dioxin-like PCBs in *Spaurus aurata*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 14226–14231. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3321-x>.
- Cárcamo, J.G., Aguilar, M.N., Barrientos, C.A., Carreño, C.F., Quezada, C.A., Bustos, C., Manríquez, R.A., Avendaño-Herrera, R., Yañez, A.J., 2011. Effect of emamectin benzoate on transcriptional expression of cytochromes P450 and the multidrug transporters (Pgp and MRP1) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the sea lice *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture* 321, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.012>.
- Cazau, L., Cortiñas, J., Reinante, S., Asensio, M., Bechis, F., Apreta, D., 2005. Cuenca de Niriuhau. In: Chebli, G.A., Cortiñas, J., Spalletti, L.A., Legarreta, L., Vallejo y, E.L. (Eds.), *Frontera Exploratoria de la Argentina. 6° Congreso de Exploración y Desarrollo de Hidrocarburos Actas, Mar del Plata*, pp. 251–273.
- Chambers, R.L., Carr, J.E., 1996. Kinetic analysis of the in vitro inhibition, aging, and reactivation of brain acetylcholinesterase from rat and channel catfish by paraoxon and chlorpyrifos-oxon. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139, 365–373. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0177>.
- Clark, B.W., Di Giulio, R.T., 2012. *Fundulus heteroclitus* adapted to PAHs are cross-resistant to multiple insecticides. *Ecotoxicology* 21, 465–474. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0807-x>.
- Croom, E.L., Wallace, A.D., Hodgson, E., 2010. Human variation in CYP-specific chlorpyrifos metabolism. *Toxicology* 276, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.08.005>.
- Davila, D.R., Romero, D.L., Burchiel, S.W., 1996. Human T cells are highly sensitive to suppression of mitogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and this effect is differentially reversed by alpha-naphthoflavone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139, 333–341. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0173>.
- Denison, M.S., Nagy, S.R., 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828>.
- Di Giulio, R.T., Clark, B.W., 2015. The Elizabeth river story: a case study in evolutionary toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 18 (6), 259–298. <https://doi.org/10.1080/15320383.2015.1074841>.
- Ellman, L., Courtney, K.D., Andreas Jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new rapid colorimetric determination of cholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
- Faria, M., Garcia-Reyero, N., Padrós, F., Babin, P.J., Sebastián, D., Cachot, J., Prats, E., Arick Ii, M., Rial, E., Knoll-Gellida, A., Mathieu, G., Le Bihanic, F., Escalon, B.L., Zorzano, A., Soares, A.M., Raldúa, D., 2015. Zebrafish models for human acute organophosphorus poisoning. *Sci. Rep.* 5, 1559. <https://doi.org/10.1038/srep15591>.
- Ferrari, A., Venturino, A., Pechén De Angelo, A.M., 2007. Effects of carbaryl and azinphos methyl juveniles rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.10.005>.
- Flammarión, P., Migeon, B., Urios, S.B., Morfin, P., Garric, J., 1998. Effect of methidathion on the cytochrome P-450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquat. Toxicol.* 42, 93–102. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00046-0).
- Fleming, C.R., Billiard, S.M., Di Giulio, R.T., 2009. Hypoxia inhibits induction of aryl hydrocarbon receptor activity in topminnow hepatocarcinoma cells in an ARNT-dependent manner. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 150 (3), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.06.003>.
- Fukuto, T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.* 87, 245–254. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087245>.
- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 37–45. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200104>.
- Goksoyr, A., Andersson, T., Buhler, D.R., Stegeman, J.J., Williams, D.E., Forlin, L., 1991. Immunochemical cross-reactivity of i-naphthoflavone-inducible cytochrome P450 (P4501A) in liver microsomes from different fish species and rat. *Fish Physiol. Biochem.* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1007/BF01987606>.
- Gooneratne, R., Miranda, C.L., Henderson, M.C., Buhler, D.R., 1997.  $\beta$ -Naphthoflavone induced CYP1A1 and 1A3 proteins in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* 27, 175–187. <https://doi.org/10.1080/004982597240677>.
- Guerrero, M., López Armengol, M.F., Luquet, C.M., Venturino, A., 2016. Comparative study of toxicity and biochemical responses induced by sublethal levels of the pesticide azinphosmethyl in two fish species from North-Patagonia, Argentina. *Aquat. Toxicol.* 177, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.015>.
- Gupta, R.C., Dettbarn, W.D., 1993. Role of carboxylesterases in the prevention and potentiation of N-methylcarbamate toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 87, 295–303. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(93\)90057-6](https://doi.org/10.1016/0009-2797(93)90057-6).
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hanno, K., Oda, S., Mitani, H., 2010. Effects of dioxin isomers on induction of AhRs and CYP1A1 in early developmental stage embryos of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 78 (7), 830–839. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.043>.
- Hasselberg, L., Westerberg, S., Wassmurr, B., Celander, M.C., 2008. Ketoconazole, an antifungal imidazole, increases the sensitivity of rainbow trout to 17 alpha-ethynyl estradiol exposure. *Aquat. Toxicol.* 86, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.12.007>.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
- Jokanovic, M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166, 139–160. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00463-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2).
- Jönsson, E.M., Gao, K., Olsson, J.A., Goldstone, J.V., Brandt, I., 2010. Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 98, 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.03.003>.
- Kavitha, P., Rao, J.V., 2008. Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.03.010>.
- Kennedy, S.W., Jones, S.P., 1994. Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. *Anal. Biochem.* 222, 217–223. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1476>.
- Kim, E.Y., Iwata, H., Suda, T., Tanabe, S., Amano, M., Miyazaki, N., Petrov, E.A., 2005. Aryl hydrocarbon receptor (AHR) and AHR nuclear translocator (ARNT) expression in Baikal seal (*Pusa sibirica*) and association with 2, 3, 7, 8-TCDD toxic equivalents and cyp1 expression levels. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 141, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.07.007>.
- Kwong, T.C., 2002. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther. Drug Monit.* 24, 144–149. <https://doi.org/10.1097/00007691-200202000-00022>.
- Leggieri, L.R., De Anna, J.S., Cerón, G.A., Arias Darraz, L., Fuentes Monasterio, D., Cárcamo, J.G., 2017. CYPs molecular biomarkers in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to assess oil contamination in a Patagonian stream. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 33 (4), 681–690. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.04.11>.
- Liu, Q., Rise, M.L., Spitsbergend, J.M., Hori, T.S., Mieritz, M., Geise, S., McGrawf, J.E., Goetzg, G., Larson, J., Reinhold, J.H., Carvan, J.M., 2013. Gene expression and pathologic alterations in juvenile rainbow trout due to chronic dietary TCDD exposure. *Aquat. Toxicol.* 0, 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.06.018>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta$ ct method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Loewy, R.M., Monza, L.B., Kirs, V.E., Savini, M.C., 2011. Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *J. Environ. Sci. Health B* 46, 662–670. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.592051>.
- Mandl, M., Depping, R., 2014. Hypoxia-inducible Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) (HIF-1beta): is it a rare exception? *Mol. Med.* 20, 215–220.
- Mandl, M., Depping, R., 2017. ARNT is a potential direct HIF-1 target gene in human Hep3B hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Cell Int.* 17 (77). <https://doi.org/10.1186/s12935-017-0446-2>.
- Mandl, M., Lieberum, M.K., Depping, R., 2016. A HIF-1 $\alpha$ -driven feed-forward loop augments HIF signalling in Hep3B cells by upregulation of ARNT. *Cell Death Dis.* 7, e2284. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.187>.
- Maxwell, D.M., 1992. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphate compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114, 306–312. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(92\)90082-4](https://doi.org/10.1016/0041-008X(92)90082-4).
- Melbye, A.G., Brakstad, O.G., Hokstad, J.N., Gregersen, I.K., Hansen, B.H., Booth, A.M., Rowland, S.J., Tollefsen, K.E., 2009. Chemical and toxicological characterization of an unresolved complex mixture-rich biodegraded crude oil. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1815–1824. <https://doi.org/10.1897/08-545.1>.
- Monza, L.B., Loewy, R.M., Savini, M.C., Pechén de Angelo, A.M., 2013. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments from the Neuquén River, Argentine Patagonia. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 48 (4), 370–379. <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.728097>.
- Neal, R.A., 1980. Microsomal metabolism of thiono-sulfur compounds: mechanisms and toxicological significance. *Rev. Biochem. Toxicol.* 2, 131–171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-87702-6.50035-9>.

- Pelkonen, O., Nebert, D.W., 1982. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 34, 189–222.
- Peluso, M., Srivatanakul, P., Munnia, A., Jedpiyawongse, A., Meunier, A., Sangrajrang, S., Piro, S., Ceppi, M., Boffetta, P., 2008. DNA adduct formation among workers in a Thai industrial estate and nearby residents. *Sci. Total Environ.* 389, 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.09.012>.
- Powell, W.H., Karchner, S.I., Bright, R., Hahn, M.E., 1999. Functional diversity of vertebrate ARNT proteins: identification of ARNT2 as the predominant form of ARNT in the marine teleost, *Fundulus heteroclitus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 361, 156–163. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0992>.
- Rivadeneira, P.R., Agrelo, M., Otero, S., Kristoff, G., 2013. Different effects of subchronic exposure to low concentrations of the organophosphate insecticide chlorpyrifos in a freshwater gastropod. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 90, 82–88.
- Salgado Costa, C., Ronco, A.E., Trudeau, V.L., Marino, D., Natale, G.S., 2018. Tadpoles of the horned frog *Ceratophrys ornata* exhibit high sensitivity to chlorpyrifos for conventional ecotoxicological and novel bioacoustics variables. *Environ. Pollut.* 235, 938–947. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.096>.
- Sams, C., Cocker, J., Lennard, M.S., 2004. Biotransformation of chlorpyrifos and diazinon by human liver microsomes and recombinant human cytochrome P450s (CYP). *Xenobiotica* 34, 861–873. <https://doi.org/10.1080/00498250400017273>.
- Sanchez-Hernandez, J.C., 2007. Ecotoxicological perspectives of B-esterases in the assessment of pesticide contamination. In: Plattenberg, R.H. (Ed.), *Environmental Pollution: New Research*. Nova Science Publishers, New York, USA, pp. 1–45.
- Singer, M.M., Aurand, D., Bragin, G.E., Clark, J.R., Coelho, G.M., Sowby, M.L., Tjeerdema, R.S., 2000. Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 1007–1016. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00045-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00045-X).
- Sogorb, M.A., Vilanova, E., 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* 128, 215–228. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00543-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00543-4).
- Somnuek, C., Boonphakdee, C., Cheevaporn, V., Tanaka, K., 2009. Gene expression of acetylcholinesterase in hybrid catfish (*Clarias gariepinus* X *Clarias macrocephalus*) exposed to chlorpyrifos and carbaryl. *J. Environ. Biol.* 30, 83–88. <https://doi.org/10.14456/ea.2012.14>.
- Tang, J., Chambers, J.E., 1999. Detoxication of paraoxon by rat liver homogenate and serum carboxylesterases and A-esterases. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 13, 261–268. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-046](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-046).
- Tang, J., Cao, Y., Rose, R.L., Brimfield, A.A., Dai, D., Goldstein, J.A., Hodgson, E., 2001. Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse and rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 29, 1201–1204.
- Tang, J., Cao, Y., Rose, R.L., Hodgson, E., 2002. In vitro metabolism of carbaryl by human cytochrome P450 and its inhibition by chlorpyrifos. *Chem. Biol. Interact.* 141, 229–241. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00074-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00074-1).
- Tanguay, R.L., Abnet, C.C., Heideman, W., Peterson, R.E., 1999. Cloning and characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1444 (1), 35–48.
- Testai, E., Buratti, F.M., Di Consiglio, E., 2010. Chlorpyrifos. In: Krieger, R. (Ed.), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, Third ed. Elsevier Inc, London, pp. 1505–1526.
- U. S. Environmental Protection Agency, 1996. *Ecological Effects Test Guidelines: OPPTS 850.1075 Fish Acute Toxicity Test*, Freshwater and Marine. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. US (EPA 712-C-96-118).
- Uno, S., Dalton, T.P., Derkenne, S., Curran, C.P., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., 2004. Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol. Pharmacol.* 65, 1225–1237. <https://doi.org/10.1124/mol.65.5.1225>.
- Van Veld, P.A., Westbrook, D.J., 1995. Evidence for depression of cytochrome P4501A in a population of chemically resistant mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ. Sci. Technol.* 29, 221–234.
- Wassmur, B., Gräns, J., Norström, E., Wallin, M., Celander, M.C., 2012. Interactions of pharmaceuticals and other xenobiotics on key detoxification mechanisms and cytoskeleton in *Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma, PLHC-1 cell line. *Toxicol. in Vitro* 27, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.002>.
- Wheelock, C.E., Eder, K.J., Werner, I., Huang, H., Jones, P.D., Brammell, B.F., Elskus, A.A., Hammock, B.D., 2005. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquat. Toxicol.* 74, 172–192. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.009>.
- Whitehead, A., Dubansky, B., Bodinier, C., Garcia, T.I., Miles, S., Pilley, C., Raghunathan, V., Roach, J.L., Walker, N., Walter, R.B., Rice, C.D., 2011. Genomic and physiological footprint of the Deepwater horizon oil spill on resident marsh fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 20298–20302. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109545108>.
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30 (4), 347–570. <https://doi.org/10.1080/10408440091159239>.
- Wiseman, S.B., Vijayan, M.M., 2007. Aryl hydrocarbon receptor signaling in rainbow trout hepatocytes: role of hsp90 and the proteasome. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146 (4), 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.05.006>.
- Wogram, J., Sturm, A., Segner, H., Liess, M., 2001. Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1528–1531. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200716>.
- Woźny, M., Brzuzan, P., Wolińska, L., Góra, M., Łuczyński, M.K., 2010. Preliminary evaluation of ER- and AhR-mediated gene expression patterns in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver after short-term exposure to zearalenone in binary mixtures. *Environ. Biotechnol.* 6, 16–23.
- Xing, H., Wang, X., Sun, G., Gao, X., Xu, S., Wang, X., 2012. Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.014>.