



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
POSTGRADO DE BIOLOGÍA APLICADA

ATPASA MITOCONDRIAL, ÓXIDO NITRICO Y GLICOPROTEÍNA-P COMO
BIOMARCADORES ANTE LA EXPOSICIÓN AL PARAQUAT EN *Colossoma
macropomum* (Cuvier, 1818)

LCDA. ARIDAYS ESTHER OLIVEROS GUTIÉRREZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA
APLICADA, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA

TUTORA: Dra. Raquel Salazar

CUMANÁ, 2009

ATPASA MITOCONDRIAL, OXIDO NITRICO Y GLICOPROTEÍNA-P COMO
BIOMARCADORES ANTE LA EXPOSICIÓN AL PARAQUAT EN *Colossoma*
macropomum (Cuvier,1818)

APROBADO POR:

Dra. Raquel Salazar Lugo
Asesor

Dra. Mairin Lemus
Jurado Principal

Dr. Osmar Nusetti
Jurado Principal

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTAS DE APÉNDICES.....	vii
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	9
1.1.- GENERAL: _____	9
1.2.-ESPECÍFICOS: _____	9
METODOLOGÍA	10
1. Obtención y mantenimiento de los peces. _____	10
2. Determinación del LC50 96 horas para PQ. _____	10
3. Exposición a 10 mg.L ⁻¹ de PQ. _____	11
4. Obtención del tejido. _____	12
5. Aislamiento de la fracción mitocondrial. _____	12
6. Preparación de partículas submitocondriales (PSM) y/o vesículas de membrana interna invertida. _____	13
7. Cuantificación de proteínas _____	13
8. Determinación de la actividad ATPasa en las partículas submitocondriales. __	14
8.1 Ensayo enzimático. _____	14
8.2 Cuantificación de fósforo inorgánico _____	14

9. Determinación de Óxido Nítrico (ON)	16
9.1 Preparación de la muestra	16
9.2 Determinación de ON	16
10. Determinación de Glutati3n reducido (GSH).	17
11. Determinaci3n de Paraquat (PQ)	18
11.1 Preparaci3n de la muestra	18
12. Extracci3n de la glicoprote3na-P (gp-P)	19
13. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	19
14. Estimaci3n de la masa molecular aparente de la gp-P	20
15. An3lisis estad3sticos	20
RESULTADOS.....	22
1. LC ₅₀ para PQ en juveniles de <i>C. macropomum</i> .	22
2. Actividad ATPasa	22
3. Oxido N3trico (ON)	29
4. Glutati3n reducido (GSH)	34
5. Paraquat (PQ)	40
6. Glicoprote3na P (gp-P)	41
DISCUSI3N	52
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAF3A	65
AP3NDICES.....	72

DEDICATORIA

A Dios, por caminar a mi lado.

A mi amigo, compañero y esposo Elvis Villarroel, por su inmensa paciencia.

A mi familia, de forma especial a mi hermana Jeniffer y mis sobrinos:
Estephanie, Mariana,

Alexanny, Daniela, Alejandro, Richelys, Arnaldo, Richards Che y Marianna
Valentina; como ejemplo de que hay que luchar por conseguir las metas, espero lo
mejor para ustedes.

A todos mis alumnos, ustedes son parte de mis logros.

AGRADECIMENTOS

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) proyecto: *Colossoma macropomum* como bioindicador de contaminación (G-2005000775).

A los profesores: Raquel Salazar, Evelin Rojas, Mairín Lemus, Zhayda Durán, César Graziani, Luz Betina Villalobos, Mariolga Berrizbeitia, José Maldonado, Jesus Bastardo, Aracelis Arcia, Luz M. Rojas.

A M Sc. Elvis Villarroel, por su asesoría en el mantenimiento de los peces y en el análisis estadístico.

Al personal docente y de investigación que labora en la UDICTA de la facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia.

Al personal directivo del L.B. Br. Rafael Castro Machado, profesores: Asdrúbal Cedeño, Amada Sanoja y Migdalia Rodríguez; mis coordinadores Emilio Antón y María Boada.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Inmunotoxicidad y Proteínas del postgrado de Biología Aplicada, licenciadas: María Hernández, Ivis Blanco, Alida León, Roilda Pérez, América Vargas, América Estrella, Claunis Mata y la Br. Zuleika Ramos.

A mis amigos: Anahir, Enrique, Lelys, José Luis V., Richards, Edwards, Oswaldo Reyes, Virginia, Herlice, Rosmary, Marielyn, Aiza, Yusmar, América, Yessica, Sra. Luz, Diana, Yudetzi, Yacelis, Giovanni.

A todas aquellas personas que de una u otra forma hayan colaborado con la ejecución de esta investigación.

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1 Concentración de PQ presente en el tejido hepático de *C. macropomum* expuesta a 10 mg.L-1 PQ a 29 °C durante siete, catorce y veintiún días. _____ 40

LISTA DE FIGURAS

- Figura N° 1 Actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L-1 PQ a 29°C durante siete, catorce y veintium días. _____ 23
- Figura N° 2 Actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L-1 PQ a 29°C durante siete días. **: Diferencias muy significativas. _____ 24
- Figura N° 3 Actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L-1 PQ a 29°C durante catorce días. ns: diferencias no significativas _____ 24
- Figura N° 4 Actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante veintiún días. ns: diferencias no significativas. _____ 25
- Figura N° 5 Actividad de la ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintium días. **: diferencias muy significativas. _____ 25
- Figura N° 6 Actividad de la ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días. _____ 26
- Figura N° 7 Actividad de la ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete días. ns: diferencias no significativas. _____ 27
- Figura N° 8 Actividad de la ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante catorce días. ***: diferencias altamente significativas. _____ 27
- Figura N° 9 Actividad ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante veintiún días. ***: diferencias altamente

significativas. _____	28
Figura N° 10 Actividad ATPasa mitocondrial hepática de <i>C. macropomum</i> expuesta a 10 mgr.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días. *: diferencias significativas. _____	29
Figura N° 11 Concentración de Óxido Nítrico en el tejido muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mgr.L ⁻¹ PQ a temperatura de 29°C durante siete, catorce y veintiún días. _____	30
Figura N° 12 Concentración de Óxido Nítrico en el tejido muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mgr.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete días. *: diferencias significativas. _____	31
Figura N° 13 Concentración del Óxido Nítrico en el tejido muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mgr.L ⁻¹ PQ a 29°C. durante catorce días. ns: diferencias no significativas. _____	31
Figura N° 14 Concentración del Óxido Nítrico en el tejido muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mgr.L ⁻¹ PQ a 29°C durante veintiún días. **: diferencias muy significativas. _____	32
Figura N° 15 Concentración de Óxido Nítrico en el tejido muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta a 10 mgr.L ⁻¹ PQ a 29°C. durante siete, catorce y veintiún días. ns:diferencias no significativas. _____	33
Figura N° 16 Concentración de Óxido Nítrico en el tejido muscular de <i>C. macropomum</i> no expuesta a 10 mgr.L ⁻¹ PQ a 29°C. durante siete, catorce y veintiún días. ***: diferencias altamente significativas. _____	33
Figura 17 Concentración de GSH reducido hepático de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días. _____	34
Figura N° 18 Concentración de GSH reducido hepático de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete días. **: diferencias muy significativas. _____	35
Figura 19 Concentración de GSH reducido hepático de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante catorce días. ***: diferencias altamente	

significativas. _____	35
Figura 20. Concentración de GSH reducido hepático de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante veintiún días. *: diferencias significativas. _____	36
Figura 22 Concentración de GSH reducido muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días. _____	37
Figura 23 Concentración de GSH reducido muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta a 10mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete días. ns: no significativo. _____	38
Figura 24 Concentración de GSH reducido muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta a 10 mgL ⁻¹ PQ a temperatura de 29°C durante catorce días. ns: no significativo. _____	38
Figura 25 Concentración de GSH reducido muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete y catorce días. ns: no significativo. _____	39
Figura N° 26 Concentración de GSH reducido muscular de <i>C. macropomum</i> no expuesta a 10mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete y catorce días. **: diferencias muy significativas. _____	40
Figura N° 27 Eletroforesis de la fracción de membrana que contiene la gp-P provenientes de los hepatocitos de <i>C. macropomum</i> expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29 °C. Línea 1: marcadores de masa molecular; Línea 2: siete días de exposición; Línea 3: catorce días de exposición; Línea 4: veintiún días de exposición; Línea 5: no expuesto. _____	41

LISTAS DE APÉNDICES

Apéndice 1. Curva de calibración para proteínas _____	72
Apéndice 2. Curva de calibración para fósforo _____	72
Apéndice 3. Curva de calibración para óxido nítrico _____	73
Apéndice 4.- Curva de calibración para glutatión reducido _____	73
Apéndice 5. Curva de calibración para paraquat _____	74
Apéndice 6. Curva de calibración para estimar la masa molecular de la gp-P _____	74
Apéndice 7. Resumen del análisis de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete días. _____	75
Apéndice 8. Resumen del análisis de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg L ⁻¹ PQ a 29°C durante catorce días. _____	75
Apéndice 9. Resumen del análisis de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante veintiún días. _____	75
Apéndice 10. Resumen del análisis de Kruskal Wallis para la actividad ATPasa mitocondrial muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días _____	75
Apéndice 11. Resumen del análisis a posteriori de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días _____	76
Apéndice 12. Resumen del análisis de Kruskal Wallis para la actividad ATPasa mitocondrial muscular de <i>C. macropomum</i> no expuesta a 10 mg L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días. _____	76
Apéndice 13. Resumen del análisis de Mann Whitney para la actividad ATPasa	

mitocondrial hepática de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete días.	76
Apéndice 14. Resumen del análisis de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial hepática de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante catorce días.	76
Apéndice 15. Resumen del análisis de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial hepática de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante veintiún días.	77
Apéndice 16. Resumen del análisis de Kruskall Wallis para la actividad ATPasa mitocondrial hepática de <i>C. macropomum</i> , expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días.	77
Apéndice 17. Resumen del análisis a posteriori de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial hepática de <i>C. macropomum</i> expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días	77
Apéndice 18. Resumen del análisis de Kruskall Wallis para la actividad ATPasa mitocondrial hepática de <i>C. macropomum</i> , no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días.	77
Apéndice 19. Resumen del análisis de Mann Whitney para la concentración de óxido nítrico muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete días.	78
Apéndice 20. Resumen del análisis de Mann Whitney para la concentración de óxido nítrico muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante catorce días.	78
Apéndice 21. Resumen del análisis de Mann Whitney para la concentración de óxido nítrico muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante veintiún días.	78
Apéndice 22. Resumen del análisis de Kruskall Wallis para la concentración de óxido nítrico muscular de <i>C. macropomum</i> , expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días.	78

Apéndice 23. Resumen del análisis de Kruskal Wallis para concentración de óxido nítrico muscular de <i>C. macropomum</i> , no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días. _____	79
Apéndice 24. Resumen del análisis a posteriori de Mann Whitney para la concentración de óxido nítrico muscular de <i>C. macropomum</i> no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días. _____	79
Apéndice 25. Resumen del análisis de t-Student para la concentración de GSH reducido hepático de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete días. _____	79
Apéndice 26. Resumen del análisis de t-Student para la concentración de GSH reducido hepático de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante catorce días. _____	79
Apéndice 27. Resumen del análisis de t-Student para la concentración de GSH reducido hepático de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante veintún días. _____	79
Apéndice 28. Resumen del análisis de varianza y prueba a posteriori (Duncan) para la concentración de GSH reducido hepático de <i>C. macropomum</i> expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días. _____	80
Apéndice 30. Resumen del análisis de Mann Whitney para GSH reducido muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete días. _____	80
Apéndice 31. Resumen del análisis de Mann Whitney para GSH reducido muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta y no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante catorce días. _____	81
Apéndice 32. Resumen del análisis de Mann Whitney para GSH reducido muscular de <i>C. macropomum</i> expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete y catorce días. _____	81
Apéndice 33. Resumen del análisis de Mann Whitney para GSH reducido muscular de <i>C. macropomum</i> no expuesta a 10 mg.L ⁻¹ PQ a 29°C durante siete y catorce días. _____	81
Apéndice 34. Modelo explicativo de las reacciones redox del PQ en la mitocondria. _____	82

RESUMEN

Con el propósito de evaluar el efecto de la concentración subletal del herbicida Paraquat (PQ) sobre la actividad ATPasa mitocondrial (AATPM), la concentración de óxido nítrico (ON), glutatión reducido (GSH) y la expresión de la glicoproteína-P (gp-P) en el tejido hepático y muscular del pez *C. macropomum*; se procedió a determinar el LC₅₀ a 96 h de PQ en la especie, usando el método binomial y el método logit. Seguidamente se escogió un 20% del valor del LC₅₀ para establecer la concentración subletal de 10 mg.L⁻¹ PQ a la cual fueron expuestos 54 peces juveniles, con sus respectivos controles, a una temperatura promedio de 29°C ± 0,86 °C durante 7, 14, y 21 días. Finalizado el bioensayo se extrajo el tejido hepático y muscular de los peces estudiados. Se procedió a obtener las partículas submitocondriales (PSM) del tejido; mediante ciclos de sonicación y centrifugación para determinar, en estas, la AATPM hepática y muscular mediante la cuantificación del fósforo inorgánico liberado por la acción enzimática de la ATPasa mitocondrial. Se determinó la concentración de óxido nítrico (ON) presente en el tejido muscular por el método de Griess, la concentración de glutatión reducido (GSH) hepático y muscular mediante la técnica Beutler et al. (1963). Se obtuvo, la fracción de membrana que contiene a la gp-P, del tejido hepático, mediante ciclos de ultracentrifugaciones y fue resuelta por SDS-PAGE. El valor del LC₅₀ a 96 horas obtenido fue de 40mg.L⁻¹ y 48,05 mg.L⁻¹. La AATPM muscular de los peces expuestos a 10 mg.L⁻¹ PQ disminuyó a los siete días de exposición, recuperándose durante el tiempo de exposición. Sin embargo, la AATPM hepática, en los peces expuestos, disminuyó a partir del día catorce. La concentración de ON muscular, en los peces expuestos disminuyó. Los valores de la concentración de GSH hepático disminuyeron en los peces expuestos durante catorce días. La exposición al PQ induce la expresión de una proteína de masa molecular aparente de 170 kDa correspondiéndose con la masa molecular de la gp-P. Estos resultados indican que la exposición de *C. macropomum* a 10 mgL⁻¹ PQ inhibe la AATPM, debido a la posible interacción del tóxico con la cadena transportadora de electrones aumentando la producción de radicales superóxidos y la peroxidación lipídica, hecho que posiblemente este afectando el potencial de la membrana mitocondrial y la fosforilación oxidativa, siendo más evidente en el tejido hepático. Además, el herbicida inhibe la producción de ON muscular demostrando que el mayor efecto tóxico del PQ es producto del estrés oxidativo y no del nitrosativo. La disminución de la concentración del GSH en el tejido hepático sugiere la incapacidad de los peces expuestos para regenerarlo debido al agotamiento de su sistema redox. Por último induce la expresión de la gp-P, un mecanismo detoxificador, que le permite presentar ciertos niveles de resistencia ante el efecto tóxico del herbicida. Por lo que se concluye que el PQ parece inducir en *C. macropomum* cambios bioquímicos que alteran su sistema redox; sin embargo, la especie logra resistir estos efectos debido a la expresión de mecanismos detoxificadores, como la gp-P y probablemente a la disminución en la producción de energía, pudiendo ser la especie un potencial bioindicador de la contaminación acuática por el herbicida.

INTRODUCCIÓN

El herbicida Paraquat (PQ; 1-1' dimetil 4-4' bipyridilo dicloride) es señalado como el tercer herbicida más usado extensivamente a nivel mundial y fue considerado como uno de los más tóxicos en los pasados años sesenta (Dinis-Oliveira *et al.*, 2006). Este compuesto es un herbicida de amplio espectro, de contacto post emergente, reconocido por ser usado en el control de semillas terrestres y acuáticas, como desecante y defoliador de hierbas, no volátil e insoluble en grasas (Sáenz *et al.*, 1997). Este herbicida bipyridilo pasa a los cuerpos de aguas naturales, mediante la lluvia, donde es acumulado por diferentes organismos habitantes del agua, especialmente los peces (Parvez & Raisuddin, 2006).

El efecto tóxico del PQ se debe a que no es metabolizado rápidamente en el hígado, por lo que sus niveles sanguíneos se mantienen elevados por algunas horas luego de una exposición; aún cuando sus niveles sanguíneos disminuyen, típicamente se acumula en los pulmones. Esta acumulación selectiva intracelular se atribuye a que el herbicida es transportado activamente por el transportador de poliaminas (diaminas y oligoaminas) encontrado en células procariotas y en las células alveolares tipo I y II de los pulmones; el transporte ocurre debido a la semejanza estructural entre el PQ y las diaminas; entre ellas: los dos átomos cuaternarios de nitrógeno cargados positivamente, separados por un grupo no polar de distancia semejante; en el PQ esta representado por dos anillos aromáticos (7,0 Å) y en las poliaminas es una cadena alquílica (6,6 Å); lo que explica la afinidad del PQ por el transportador cuando el herbicida se encuentra en cantidades sustanciales (Boetslerli, 2007).

El ciclo redox del PQ es el mecanismo principal para producir daños oxidativos en muchos tipos celulares, incluyendo: cerebro, hígado, riñón y pulmones (Black *et*

al., 2008). Este ciclo ocurre cuando el dicatión PQ^{2+} , en solución acuosa activado por radiolisis, reacciona rápidamente con el oxígeno molecular produciendo el anión superóxido (O_2^-), el monocatión PQ^+ y la regeneración del dicatión (Bus & Gibson, 1984) lo cual se debe a que el potencial redox del PQ, $E_o=-0,45$ V, es en general más alto que el del oxígeno molecular, $E_o=-0,16$ V (Boetslerli, *op cit.*).

En los sistemas biológicos se cataliza esta reacción redox, pero en este caso intervienen las flavoproteínas; recientemente, Black *op cit.* demostraron que en células lisadas provenientes de cultivos primarios de keratinocitos tratados con 100 μ M de PQ ocurre la reducción del herbicida debido a la aparición del color azul violeta en la mezcla de reacción; además de la acumulación del O_2^- y el peróxido de oxígeno (H_2O_2), dicha acumulación fue inhibida por la adición a la mezcla de reacción de la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), respectivamente. Así mismo, encontraron que el NADPH fue metabolizado rápidamente a $NADP^+$; sin embargo, cuando agregaron, a la mezcla de reacción, 10 μ M difenileneiodonium (DPI) y 100 μ M de dicoumarol fue inhibida la producción de H_2O_2 indicando que el ciclo redox del PQ puede ser catalizado por las oxidasas NADPH dependientes de FAD y la oxidoreductasa-1 quinona NAD(P)H ((NQO1).

Por su parte, Bus & Gibson *op cit* recopilaron información que sugiere que el PQ en los sistemas biológicos no sólo permite la generación de O_2^- y H_2O_2 sino que, también puede originar la carencia del NADPH intracelular, siempre que preexista en el tejido, debido a que la exposición al herbicida estimula la ruta de las pentosas fosfato como una respuesta ante la disminución de la tasa $NADPH/NADP^+$ y de esta manera incrementar el recambio del par; hecho que no excluye la posibilidad de que la acumulación del PQ en los tejidos pueda causar citotoxicidad celular. Estas observaciones fueron demostradas por Akerman et al., 2003, quienes hallaron que la inyección intraperitoneal de PQ (30 nmol/g, del peso corporal del pez) en la especie *Oncorhynchus mykiss* incrementa la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

para mantener la concentración del NADPH celular lo que permite el aumento en la actividad de la glutatión reductasa y así aminorar los efectos oxidativos del herbicida.

Es probable que el efecto del PQ se multiplique al involucrarse con otros sistemas, entre estos el desarrollo del estrés nitrosativo debido al óxido nítrico generado durante la oxidación de la L-arginina a L-citrulina por la acción enzimática de la óxido nítrico sintetasa (NOS), tanto en el citosol como en la mitocondria (Sasaki *et al.*, 2000); el óxido nítrico es capaz de reaccionar con el superóxido de oxígeno, de una forma no enzimática a mayor velocidad que la reacción enzimática generada por la superóxido dismutasa (SOD) generando el radical peroxinitrilo (ONOO⁻) una especie reactiva de nitrógeno (RNS) (Boetslerli, *op cit*), considerado como un poderoso agente oxidante que ha sido asociado a daños tisulares y apoptosis celular (Ghafourifat *et al.*, 1999).

El peroxinitrilo produce estrés oxidativo de dos maneras; la primera debido a que puede ser descompuesto hasta el radical hidroxilo (·OH) y dióxido de nitrógeno (NO₂), siendo el primero un potente oxidante que puede dañar ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos; también puede formar peróxidos lipídicos que pueden ser reducidos enzimáticamente a alcoholes lipídicos por la glutatión peroxidasa y dañar los lípidos de las membranas celulares (Akerman *op cit*). La segunda, puede generar nitritos y nitratos capaces de producir la nitración de proteínas por la formación del compuesto 3-nitrotirosina (Boetslerli, *op cit*).

El PQ es extremadamente tóxico en humanos debido a que impulsa la deficiencia multiórganos y la falta de estrategias efectivas para manejar el envenenamiento por el mismo ha dejado altas tasas de mortalidad; en los casos de ingestión de PQ entre mujeres embarazadas ocurre la muerte fetal y el aumento en los niveles sanguíneos fetales en cuatro o siete veces más que en la sangre materna (Posecion *et al.*, 2008). Este herbicida bupiridilo ha sido señalado como una

neurotoxina dopaminérgica el cual penetra a través de las membranas de las células nerviosas del cerebro dañando específicamente las neuronas dopaminérgicas nigrostriatales las cuales cumplen un papel crucial en el mantenimiento de la función motora normal. Estudios sugieren que el contacto con PQ puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson debido a la estrecha correlación entre la incidencia de ésta enfermedad y la exposición al herbicida en ciertas poblaciones humanas. (Purisai *et al.*, 2007; Prasad *et al.*, 2007).

En peces, se ha señalado que la exposición al PQ produce el aumento de la actividad de la superóxido dismutasa en el hígado de tilapias expuestas a 0,5 mg.L⁻¹ de PQ durante cuarenta y cinco días (Figueredo-Fernandes, *et al.*, 2006); la disminución significativa de los niveles del glutatión reducido en el hígado y branquias del pez *Channa punctata* expuesto a 1 ppm de PQ durante 24 horas (Parvaez & Raisuddin, 2006). Pedrejas *et al.* (1995) inyectaron intraperitonealmente PQ (50 mg/Kg de peso corporal) al pez *Sparus aurata* y analizaron su efecto a los 2 y 7 días de la exposición encontrando el incremento en los niveles de ácidos tiobarbitúricos (TBARS) y la actividad de la superóxido dismutasa además de la inducción de metalotioneínas.

En la célula eucariota, la mitocondria juega un rol central en el metabolismo oxidativo y en la generación de energía; por lo que resulta un organelo blanco susceptible al estrés oxidativo. Es uno de los organelos afectados rápidamente debido a la producción de radicales libres por el efecto del metabolismo del PQ en la célula (Palmeira *et al.*, 1995). Hirai *et al.* (1992) demostraron que el PQ altera la ultraestructura de las mitocondrias, observando turgencia y desvanecimiento de la matriz mitocondrial de las células alveolares tipo I y II de mamíferos; también observaron en ratas, mayores alteraciones mitocondriales en los hepatocitos que en sus pulmones; por su parte Parvaez & Raisuddin, (2006) señalaron que en organismos no blancos, entre ellos peces, se encuentran alteraciones mitocondriales a nivel de las

células de riñones, hígado y branquias.

Palmeira *op cit* demostraron que el PQ altera las funciones mitocondriales básicas; observando cambios en la respiración mitocondrial y el potencial de membrana. El PQ desacopla la fosforilación oxidativa y este efecto es probablemente debido a la ligera permeabilización de la membrana mitocondrial relacionada con la peroxidación lipídica inducida por el herbicida. Por otra parte, el PQ induce el incremento de la permeabilidad dependiente de Ca^{+2} en la membrana mitocondrial interna permitiendo su despolarización, el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa y la turgencia de la matriz mitocondrial; debido a la inapropiada apertura del poro de transición de permeabilidad (MTP) el cual es afectado primariamente por el herbicida mediante el cambio del potencial de membrana a valores más negativos permitiendo la apertura del mismo por la oxidación de un ditiol clave en el sensor de voltaje del poro (Constantini *et al.*; 1995).

Así mismo, la célula es capaz de protegerse activando otros mecanismos de defensa que aminoren el estrés oxidativo generado por la presencia del tóxico, entre ellos, se encuentra el metabolismo de xenobióticos fase I, II y III. En la fase III, se menciona la sobreexpresión de la glicoproteína-P, gp-P, (Laine, 2001) razón por la cual muchos peces pueden ser capaces de adaptarse a vivir y reproducirse en aguas contaminadas (Kurelec *et al.*, 1992).

La gp-P una proteína transmembrana, de 170 KDa de masa molecular, perteneciente a la familia de proteínas transportadoras de la clase ABC, cassette dependientes de ATP, (Ferté, 2000); es la expresión de una de los sistemas de defensa conservado evolutivamente, el sistema de resistencia multixenobióticos, MXR, (Albertus & Laine, 2001). Una prueba de la existencia de este mecanismo de MXR en los peces, es que los niveles de contaminantes xenobióticos en los tejidos son más

bajos que los del ambiente que los circundan (Chang *et al.*, 1992).

La significativa expresión de la gp-P homóloga en teleósteos, en el tejido hepático del pez *Fundulus heteroclitus*, indica que esta proteína puede ser la primera línea de defensa en la desintoxicación, de este pez y que la actividad de este transportador es sensible a concentraciones bajas y variantes de tóxicos indicando que la gp-P tiene un potencial importante como biomarcador en ambientes estresores (Hemer *et al.*, 1995; Cooper *et al.*, 1999; Bard *et al.*, 2002 y Albertus & Laine, 2001). Mediante el cultivo de monocapas de hepatocitos primarios de la trucha Arcoiris *Oncorhynchus mykiss*, se demostró que compuestos como el procloraz, y el alquilofenólico Nonilfenol dietiloxilato inhiben la función destoxicadora de la gp-P por disminuir el eflujo de la rodamina 123 y no afectar los niveles aparentes de la gp-P en el inmunoblot; por lo que se asevera que estos compuestos no son sustratos de la glicoproteína y su presencia en el ambiente podría causar el deterioro del sistema de defensa contra xenobióticos en la especie (Strurm *et al.*, 2001).

En el pez intermareal *Anoplarchus purpurescens* se ha demostrado que el papel de desintoxicación celular de la gp-P viene dado por la sobreexpresión de la misma, para así proteger al organismo de la acumulación de xenobióticos moderadamente hidrofóbicos o tóxicos exógenos del metabolismo; indicando esto, que la gp-P puede ser un importante mecanismo de MXR en la especie, que comúnmente se encuentra expuesta a contaminantes antropogénicos y toxinas naturales del medio (Bard *et al.*, 2002).

Los estudios realizados en especies de ambientes naturales, indican que, las mismas, son susceptibles a la contaminación de las aguas por el herbicida PQ, esta situación pudiera estar causando desequilibrios en los ecosistemas acuáticos y se agudiza debido a que los agricultores utilizan cada vez más en el control químico, ya que la fuerza laboral y la tecnología es menos disponible. Además, el conocimiento

que manejan los agricultores sobre el uso racional de herbicidas es poco, particularmente en relación a la falta de información sobre las malezas, escogencia del producto correcto y las dosis adecuadas de este producto para un área determinada, el sistema de aplicación y las condiciones climáticas apropiadas (Procitropicos, 1996); lo que conlleva a la aplicación incorrecta de los herbicidas generando no solo problemas de salud y daños ambientales sino también daños en los cultivos y la pérdida en su rendimiento (Rubin, 1999).

En América Latina, el control químico de malezas es ampliamente utilizado por los agricultores. El herbicida más utilizado es el PQ (1,1'-dimetil-4, 4'-dipiridinium), que si bien actúa rápidamente sobre un buen número de malezas anuales en tratamientos de post-emergencia y no posee limitaciones con respecto al lapso de lluvia después de su aplicación, también ha ocasionado algunos problemas de intoxicación en familias de pequeños agricultores (Labrada, 1999).

En Venezuela, específicamente al sur del lago de Maracaibo y Portuguesa se logro el control eficaz de malezas anuales y perennes, en plantaciones de plátanos, usando 600g/ha PQ (Pinto, 1981). En la población de Barlovento, Girón (1995) reporto la secuencia de aplicaciones químicas en plantaciones de cacao, tanto para épocas secas como húmedas; encontrando que las mezclas de mayor efectividad en las épocas secas fueron PQ y 2,4-D (2 L/ha cada uno); Diuron y PQ (2 Kg/ha), así como Atrazina y PQ (1,8 L/ha); la mezcla de Diuron, PQ (2 Kg/ha) y Atrazina (1,8 L/ha) resulto más efectiva durante la época húmeda; a pesar de ello, el autor señala que en esta época los productos químicos de uso más popular en malezas de cacaotales fueron el GRAMOXONE (Diquat) y el DOBLETE 200 (DIQUAT + PQ), quizás por sus efectos inmediatos y por las campañas publicitarias que han experimentado estos herbicidas.

Según estos reportes se observa que el herbicida PQ es usado de una forma

continua e inadecuada; realidad que permite a las aguas de escorrentía, cargadas con el herbicida, contaminar consecuentemente los cuerpos de agua cercanos a su utilización; por lo que se presume el PQ este ejerciendo su efecto tóxico sobre los peces que habitan dichos cuerpos de agua originando un desequilibrio ecológico de las comunidades.

Tomando en consideración lo anteriormente expuesto en relación al papel tóxico del PQ en diferentes especies de peces y la escasez de estudios orientados en ese sentido, en nuestro país, se plantea en este trabajo evaluar el efecto de la concentración subletal del herbicida paraquat sobre la actividad ATPasa, la concentración de óxido nítrico y la posible expresión de la glicoproteína-P en el tejido muscular y hepático del pez *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818); especie dulceacuícola de gran importancia en acuicultura y pesquerías dulceacuícolas, distribuida ampliamente en Suramérica (Mago-Leccia, 1970). En Venezuela se puede localizar en los ríos: Guanare, Portuguesa, Meta, Apure, Carora y Orinoco (Machado, 1982) zona donde se desarrolla la actividad agrícola y presumiblemente estos cuerpos de agua contengan ciertos niveles de herbicidas que pudieran ser biomagnificados por la especie a estudiar debido a sus hábitos alimenticios. En la época de sequía, se alimentan de zooplancton camarón y moluscos; en la época de lluvia consume semillas y frutos propios de las zonas inundables (Goulding & Carvalho, 1982).

OBJETIVOS

1.1.- GENERAL:

Evaluar el efecto de la concentración subletal del herbicida paraquat sobre la actividad ATPasa, la concentración de óxido nítrico y la expresión de la glicoproteína-P en el tejido muscular y hepático del pez *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818).

1.2.-ESPECÍFICOS:

- Determinar la dosis letal media (LC50) del paraquat en *C. macropomum*.
- Cuantificar la actividad ATPasa mitocondrial muscular y hepática, la concentración muscular de óxido nítrico y la concentración muscular y hepática de glutatión y paraquat de *C. macropomum* expuesta durante siete catorce y veintiún días a la concentración subletal del herbicida Paraquat.
- Comparar la actividad ATPasa mitocondrial en tejido muscular y hepático de *C. macropomum* expuesto bajo las condiciones anteriores.
- Relacionar la concentración de óxido nítrico y la actividad ATPasa mitocondrial del músculo de *C. macropomum* expuesta bajo las condiciones anteriores.
- Analizar la concentración muscular y hepática de glutatión en *C. macropomum* expuesta bajo las condiciones anteriores.
- Describir la sobreexpresión de la gp-P en hepatocitos de *C. macropomum* expuesta durante siete, catorce y veintiún días a la concentración subletal del herbicida paraquat.

METODOLOGÍA

1. Obtención y mantenimiento de los peces.

Se utilizaron un total 148 ejemplares juveniles de *C. macropomum* (Cuvier, 1818) con índices biométricos de $17,87 \pm 7,88$ cm y $87,69 \pm 34,23$ g, los cuales fueron suministrados por la Piscícola ALMA C.A.; ubicada en el campo petrolero Campo Mata, vía Cantaura, estado Anzoátegui y trasladados en bolsas con agua aireada hasta el Laboratorio de Camarones Dulceacuícola, Departamento de Biología de la Universidad de Oriente Núcleo Sucre, donde fueron mantenidos durante un mes, lapso en el cual se alimentaron y se acondicionaron sus niveles de aire y temperatura, para ello se uso un tanque fijo de concreto con una capacidad de 3000 L de agua dulce reposada y aireada, a una temperatura entre 27°C y 29°C, y un fotoperíodo de 12/12 horas, alimentados con dos raciones diarias equivalentes al 40% de su peso.

2. Determinación del LC50 96 horas para PQ.

Se realizó una prueba de toxicidad por 96 horas - LC₅₀ (Concentración del herbicida que puede matar el 50% de los organismos experimentales a las 96 horas), para determinar la dosis subletal más adecuada y usarla en los bioensayos subletales.

La CL₅₀ 96 horas, para paraquat en *C. macropomum*, fue determinada siguiendo la metodología propuesta por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), de acuerdo a Peltier y Weber (1985) y el Manual de Protocolos Estándares para Bioensayos de Toxicidad de especies acuáticas de INTEVEP (Rodríguez y Escaplés, 1995).

Para la determinación de la dosis letal media a 96 horas se tomaron 40 peces para formar cinco grupos, de cuatro peces cada uno, con sus respectivas replicas; los grupos fueron nombrados como sigue A, B, C, D y E; contenían 0, 10, 20 30 y 40 mg.L⁻¹ de PQ, respectivamente, preparados a partir de una presentación comercial de 18,5% P/V. Los peces fueron expuestos durante 96 h para así determinar la dosis letal media (CL₅₀ 96horas) del paraquat en *C. macropomum*.; en acuarios con 16 L de agua de grifo, desclorinada y aireada por 24 h a una temperatura de 29,5 ±1°C; con un fotoperiodo de 12/12 horas y sin alimento; realizando diariamente el recambio total de agua, el herbicida y las observaciones acerca del comportamiento de los peces; se consideró muerto el pez que presentó hiperextensión de las aletas, rigidez corporal y falta de respuesta a la estimulación mecánica, generalmente estos peces se encontraban en el fondo del acuario.

3. Exposición a 10 mg.L⁻¹ de PQ.

Se tomaron 108 peces, de los cuales 54 fueron “expuestos” y el restante “no expuestos” a la concentración subletal de PQ (10 mg.L⁻¹), durante 7, 14, y 21 días. Para cada tratamiento a ensayar se montaron tres replicas, se colocaron seis peces de talla similar, en acuarios con 55 L de agua de grifo, desclorinada y aireada por 24 horas; con temperatura: 29,78±0,46°C, pH: 7,70±0,25°C, oxígeno: 3,8 mg.L⁻¹, dureza: 106 ppm. Estos parámetros físicos-químicos fueron monitoreados diariamente. La temperatura, pH y oxígeno fueron registrados con el uso de termómetro (YSI modelo 30), pHmetro (Hanna modelo HI9025.) y oxigenómetro (YSI modelo 55), respectivamente. La dureza del agua fue medida con el del Kit Lamotte.

Para mantener la calidad del agua, la misma fue recambiada diariamente reponiendo la concentración subletal del herbicida, en los organismos expuestos. Los

peces fueron alimentados diariamente con cachamarina 25 % proteína, a razón del 40% de su peso total.

4. Obtención del tejido.

Una vez concluido el tiempo de exposición de los peces a los tratamientos anteriores, fueron adormecidos en agua fría y disectados ventralmente para así extirpale el hígado y tomar de la región dorsal del cuerpo parte del músculo blanco. Estos tejidos fueron etiquetados, guardados y congelados, a -20 °C. Luego una parte fueron trasladados hasta La Unidad de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad del Zulia y otra al Laboratorio de Inmunotoxicidad y Proteínas de la Universidad de Oriente donde se realizaron los análisis bioquímicos respectivos.

5. Aislamiento de la fracción mitocondrial.

Para aislar la fracción mitocondrial del tejido muscular y hepático de las cachama expuestas a la concentración subletal de PQ durante siete, catorce y veintiun días se aplicó el método de centrifugación diferencial en sacarosa, según Saz & Lascure (1969); 0,5 g de tejido fueron cortados con una tijera hasta homogeneización. Se le agregaron 3 mL de medio mitocondrial (0,24m Sacarosa, 0,0005 EDTA y 0,15% BSA), pH 7,4 y se dejaron reposar unos minutos luego se adicionaron 7 mL del mismo medio y se homogeneizaron en frío con homogenizador de vidrio. El homogenizado fue centrifugado a 100 g durante 10 minutos. A 4 °C El sobrenadante fue filtrado a través de lana de vidrio y recogido en tubos de centrífuga. El sobrenadante filtrado fue centrifugado a 7800 g durante 30 minutos.

El sobrenadante fue descartado rápidamente y el sedimento resuspendido en

10mL de medio mitocondrial, usando el homogenizador de vidrio. Esta suspensión fue centrifugado a 7800 g durante 30 min. a 4 °C. Los sedimentos marrones que contenían la fracción mitocondrial fueron guardados a -20°C en el congelador, hasta su uso.

6. Preparación de partículas submitocondriales (PSM) y/o vesículas de membrana interna invertida.

La fracción mitocondrial obtenida anteriormente se resuspendió en una solución bufferada que contenía 10mM Tris/HCl; 0,25M sacarosa; 5mM NaCl; pH 7,6 y sonicada 3 veces en frío a 6 watts y una amplitud de 30 durante 15 segundos con intervalos de enfriamiento de 1 minuto, en sonicador Cole Parmer modelo CP130. El sonificado anterior fue centrifugado a 8700 g durante 120 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron descartados y los sedimentos que contenían las PSM, fueron resuspendidos en la solución bufferada usada anteriormente.

7. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada en una pequeña alícuota mediante el método de Bradford (1976); agregando 2 mL del reactivo Bradford en un tubo de ensayo con 100 µL de la suspensión de PSM; usando como estándar 2mg/mL albumina de suero bovino (Sigma), leyendo la absorbancia en un espectrofotómetro, marca BioRad modelo Smart Spec, a una longitud de onda de 595 nm, los resultados fueron expresados en µg de proteínas (Apéndice 1).

8. Determinación de la actividad ATPasa en las partículas submitocondriales.

8.1 Ensayo enzimático.

La actividad ATPasa fue determinada en la fase de velocidad máxima; para ello se preparó una mezcla de reacción, la cual contenía 1,5 M Tris/HCl pH 7.6; extracto de PSM; 3 mM MgCl₂; 3mM ATP (Sigma), el volumen total de la reacción fue de 1,1 ml completados con agua deionizada. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos, la reacción fue detenida por adición de 0,1 mL de ácido tricloroacético 50%. La proteína precipitada se eliminó por centrifugación a 2700 g durante 5 minutos.

Por cada extracto de PSM se incluyó un tubo control y uno experimental; a la mezcla de reacción de los tubos controles se le agregó 0,1 ml de ácido tricloroacético 50% antes de agregar el ATP 3mM; esto con la finalidad de eliminar la interferencia por fósforo endógeno. El tubo experimental fue una medida del fósforo inorgánico producto de la hidrólisis enzimática ATP.

8.2 Cuantificación de fósforo inorgánico

Para cuantificar la cantidad de fósforo inorgánico liberado por la acción enzimática de la ATPasa mitocondrial de los tejidos estudiados se tomó 1 ml del sobrenadante de la mezcla de reacción y se le agregó 1,75 mL de agua destilada 250 µL del Reactivo 1 (Molibdato de Amonio 2,5% en 5N de H₂SO₄) y 125µL del reactivo ANSA (Metabisulfito de Sodio15%; Ácido Aminonaftol Sulfónico 0,25% y Sulfito de Sodio 1%). Se mezcló e incubó durante 10 min a 37°C y se midió la absorbancia a 680 nm en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 680 nm contra blanco de reactivos (Fiske-Subbarow ,1925).

Para determinar la concentración de Pi liberada por la actividad enzimática de la ATPasa mitocondrial se elaboró una curva de calibración de Pi (0 -20 μmol), usando una solución madre de KH_2PO_4 2mM.

La ecuación de la recta obtenida de graficar los valores de absorbancias de los estándares (Y) contra sus concentraciones (X) permitió determinar los μmol de Pi libre presente en la mezcla de reacción (Apéndice 2). A partir de las concentraciones de fósforo se determinó la actividad ATPasa mitocondrial en $\mu\text{molPi}/\text{min}/\text{gTejido}$, como sigue:

Cálculos:

$$\text{Abs}_{(680\text{ nm})} \text{ N} = \text{Abs}_{(680\text{ nm})} \text{ E} - \text{Abs}_{(680\text{ nm})} \text{ C}$$

$$\text{U/mL} = \mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mL} = \mu\text{mol Pi} * \underline{\underline{1,1}}$$

$$\text{15min} * \text{vol muestra}$$

Donde:

U/mL = unidades por mililitro

5,5 = Factor de dividir volumen del ensayo/volumen de la alícuota

15 min = quince minutos de la reacción a 37 °C

$$\text{UT} = \text{U/mL} * \text{Volumen total de la muestra.}$$

$$\text{UT} = \text{Unidades}$$

totales

$$\text{Act. Espc.} = \text{UT}/\text{g Tej.}$$

$$\text{Act. Espc.} = \text{Actividad Específica } (\mu\text{mol}$$

Pi/min/gTej.)

$$\text{g Tej.} = \mu\text{g proteínas}/\text{g Tej.}$$

$$\text{g Tej.} = \text{gramos de}$$

tejido

9. Determinación de Óxido Nítrico (ON)

9.1 Preparación de la muestra

El ON se determinó en el tejido muscular blanco de *C. macropomum*, mediante el método de Griess descrito por la AOAC norma N° 973.31 (1990) para la determinación de nitritos en carnes curadas. Para ello fueron macerados 0,5 gr de tejido con un mazo de vidrio, seguidamente se agregaron al macerado 4 mL de agua destilada y calentada a 80°C, se mezcló bien a homogeneidad y se transfirió a un enlarmeyer de 50 mL, se lavó el recipiente y el mazo con un poco de agua destilada caliente y transferirá el agua del lavado a la enlarmeyer en la que se completó el volumen hasta aproximadamente 30 mL. El homogenado se incubó a 80 °C en un baño de maría con corriente de agua durante dos horas agitándose ocasionalmente. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, el homogenado se transfirió a un balón de 50 ml aforando hasta este volumen con agua destilada, se mezcló y filtró con papel whatman N° 1.

9.2 Determinación de ON

La formación de ON fue determinada de manera indirecta, por la acumulación de nitratos y nitritos, para ello: se tomaron 12,5 mL del filtrado anterior y se colocaron en tubos de folling con capacidad de 25 mL, se añadió 1,25 mL del reactivo sulfanilamida (0,5 gr en 150 ml de ácido acético 15% V/V) se mezcló y después de 5 minutos, se agregaron 1,25 mL del reactivo NED (0,2 gr de 1-naftiletildiamina 2.HCl en 150 ml de ácido acético 15% V/V) se mezcló nuevamente y aforó con agua destilada. Se dejó reposar 15 minutos y se leyó la absorbancia a 540 nm contra blanco de agua destilada y reactivos.

Para estimar la concentración de ON presente en el músculo blanco proveniente de los ejemplares de *C. macropomum* estudiados se elaboró una curva estándar, de ON ($0 - 8 \cdot 10^{-4}$ mg/ml) a partir de una solución madre de NaNO_2 $1 \cdot 10^{-3}$ mg/L. La ecuación de la recta obtenida de graficar los valores de absorbancias de los estándares (Y) contra sus concentraciones (X) permitió determinar las concentraciones de ON en mg/ml presentes en las muestras de tejido muscular blanco estudiadas (Apéndice 3).

10. Determinación de Glutación reducido (GSH).

La determinación de la concentración de GSH fue llevada a cabo de acuerdo a la técnica de Beutler et al. (1963), para lo cual se prepararon dos soluciones:

- a) Solución precipitante: 1,67 g de ácido metafosfórico glacial (mezcla de HPO_3 y NaPO_3); 0,2 gr de EDTA y 30 g de NaCl en 100 mL de agua destilada.
- b) Reactivo DTNB: 5,5' dithiodis (2-ácido nitrobenzoico) al 0,4% en buffer fosfato, pH 7,5.

Se homogeneizaron 0,2 g de tejido muscular y hepático en 1 mL de Tris HCl 20mmol/L a pH 8; fueron centrifugados a 4000 g durante 15 minutos a 4°C . Luego se mezclaron 0,2 ml del sobrenadante de la muestra con 0,9 mL de agua destilada, se adicionó 1,5 mL de solución precipitante, se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos a 4°C y se dejó en reposo por 5 minutos. Posteriormente a 0,25 mL del sobrenadante se le añadió 1 mL de reactivo DTNB y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 412, en un espectronic 21D (Milton Roy), contra blanco de agua destilada y reactivos. La curva de estandarización se realizó con 0,1 mmol/L glutatión reducido (GSH); la concentración de GSH fue expresada en nmol/mg de proteínas (Apéndice 4).

11. Determinación de Paraquat (PQ)

11.1 Preparación de la muestra

La concentración de PQ fue determinada en el tejido hepático y muscular de los peces bajo estudio mediante una combinación del método descritos por la AOAC norma N° 969.09 (1990) y Dinis-Oliveira et al. (2006). Se describe a continuación; 0,5 gr de tejido fueron homogeneizados en 5 mL de buffer fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) 50 mM, pH 7,4 y 0,1% TritonX, la mezcla fue agitada y centrifugada durante 3000g a 4°C por 15 minutos. Una alícuota del sobrenadante fue tomado para añadirle ácido 5-sulfosalicílico (5% como concentración final) y centrifugado a 13000g a 4°C por 10 minutos. Seguidamente fueron tomados 2 mL del sobrenadante, este fue alcalinizado a $\text{pH} > 9,5 < 10,0$ con NaOH 10N y mezclado suavemente por inversión con cristales de Ditionito de Sodio (0,1% como concentración final). Inmediatamente fue leída absorbancia a una longitud de onda de 600 nm contra blanco de agua buffer y reactivos. La absorbancia de las muestras se leyó una a una después de haber agregado el ditionito de sodio debido a que la coloración azul obtenida pierde su estabilidad muy rápido.

Para determinar la concentración de PQ presente en las muestras se elaboró una curva de calibración utilizando una solución madre de 0,25 mg/ml de PQ preparada a partir de PQ 98% de pureza (Metilviologen, 1,1'-dimetil-4,4'-bipyridylum dicloride; $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2$; Sigma-Aldrich) la cual se diluyó hasta 0,05 mg/mL y se obtuvieron estándares de 0 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PQ. La ecuación de la recta obtenida de graficar los valores de absorbancias de los estándares (Y) contra sus concentraciones (X) permitió determinar las concentraciones de PQ en $\mu\text{g}/\text{ml}$ presentes en las muestras de tejido muscular blanco estudiadas (Apéndice 5).

12. Extracción de la glicoproteína-P (gp-P)

La extracción de la gp-P en las muestras de tejido hepático de los organismos estudiados, se realizó a partir del procedimiento descrito por Laine *et al.*, 1991. Se tomó aproximadamente 0,15g del hígado de *C. macropomum* y se le añadió 3 mL de buffer lisis (10 mmol/L Pipes, 100mmol/L KCl, 3mmol/L NaCl, 3,5 mmol/L y 1mmol EGTA) y un cóctel de inhibidor de proteasas (SIGMA) a pH 7,2. Esta mezcla se homogeneizó y la suspensión resultante fue centrifugada a 800 g a 4°C, se tomó el sobrenadante para centrifugarlo nuevamente a 38000g durante 30 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspendió nuevamente en 3 mL de buffer lisis que contenía SDS 5%, se incubó por dos horas en frío y se centrifugó a 10000g durante 20 minutos a 4°C, se removió el material insoluble. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford (1976) descrito anteriormente.

13. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Se tomaron de 25 a 30 µg de proteína, de las preparaciones de la gp-P obtenidas de las diferentes muestras de hígado y 5 µL de un marcador de masa molecular de proteínas de alto rango preteñido (BioRad), y fueron resueltos por electroforesis unidimensional en un gel de poliacrilamida a 7% con SDS 1% en buffer Tris-glicina 1X bajo condiciones reductoras (Albertus & Laine, 2001), corrida a 120 v durante 1hora aproximadamente.

Para visualizar la migración de las bandas de proteínas en los geles, estos fueron teñidos mediante la tinción de plata, para ello fueron sometidos a agitación constante y suave en diferentes soluciones de la forma siguiente: toda la noche en una solución de Isopropanol, Ácido Acético y agua (25:7:68); al día siguiente se sumergieron en la solución fijadora de Metanol, Ácido Acético y agua (50:10:40)

durante 30 minutos; seguidamente se colocaron en solución desteñidora Ácido Acético, Metanol, agua (7:5:88) durante 1 hora; luego fueron sumergidos en una solución de glutaraldehído 10% por 30 minutos, lavados durante 2 horas en agua deionizada; se cubrieron durante 15 minutos con una solución amoniaca AgNO_3 ; fueron transferidos a otro envase plástico y fueron lavados 5 veces con agua deionizada, durante 1 minuto por cada lavado; se agregó la solución reveladora, se agitó vigorosamente hasta obtener la coloración deseada; se transfirió el gel a la solución de mantenimiento (Ácido Acético 1%), y fue escaneado para el registro permanente

14. Estimación de la masa molecular aparente de la gp-P

Para estimar la masa molecular aparente de la gp-P se realizó una curva que se obtuvo de graficar, el logaritmo de base 10 de la masa molecular conocida, de cada una de las proteínas del marcador de peso molecular (eje Y) versus la distancia, en cms., recorrida por la misma (eje X). La ecuación de la recta obtenida de graficar estos valores permitió estimar la masa molecular de la gp-P (Apéndice 6).

15. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos, en esta investigación, para la actividad ATPasa mitocondrial, la concentración de óxido nítrico y glutatión no cumplieron con los supuestos de homogeneidad y normalidad; por ello, se aplicaron para su análisis pruebas estadísticas no paramétricas. Para realizar comparaciones de tres medianas, se usó un Kruskal-Wallis (KW); como análisis a posteriori y comparación de dos medianas el estadístico de Mann Whitney (MW).

En algunos casos los datos obtenidos para el glutatión cumplieron con los

supuestos de homogeneidad y normalidad; por ello se aplicaron pruebas estadísticas paramétricas; para comparaciones de dos promedios se realizó la prueba del t-student, para comparar tres promedios el ANOVA y el análisis a posteriori de Duncan.

RESULTADOS

1. LC₅₀ para PQ en juveniles de *C. macropomum*.

Los valores de LC₅₀ a 96h del PQ para la cachama negra fueron de 40 mg.L⁻¹ (p>0,05) y 48,05 mg.L⁻¹ (Lim. Conf: 0 -∞; p>0,05). A partir de estos resultados se escogió como concentración subletal 10 mg.L⁻¹ de PQ, valor que representó el 20% y 25% de la concentración letal media obtenida.

Durante el desarrollo del ensayo letal y subletal se observaron algunos cambios en la pigmentación de la piel de los peces, esta se tornaba más intensa, así como también presentaron movimiento opercular más rápido y pérdida de las escamas, sin embargo, siempre se mantuvieron agrupados en el fondo de los acuarios.

2. Actividad ATPasa

Los organismos expuestos a 10 mg.L⁻¹ PQ durante siete días presentaron una fuerte disminución de la actividad ATPasa mitocondrial muscular (AATPMM) con respecto a los peces no expuestos (Figura N°1); sin embargo esta actividad presenta una recuperación para los catorce días de exposición, caracterizándose esta por presentar un ligero incremento con respecto a los peces no expuestos. La AATPMM de los peces expuestos al herbicida durante 21 días muestran un ligero descenso con respecto a la actividad de los peces controles.

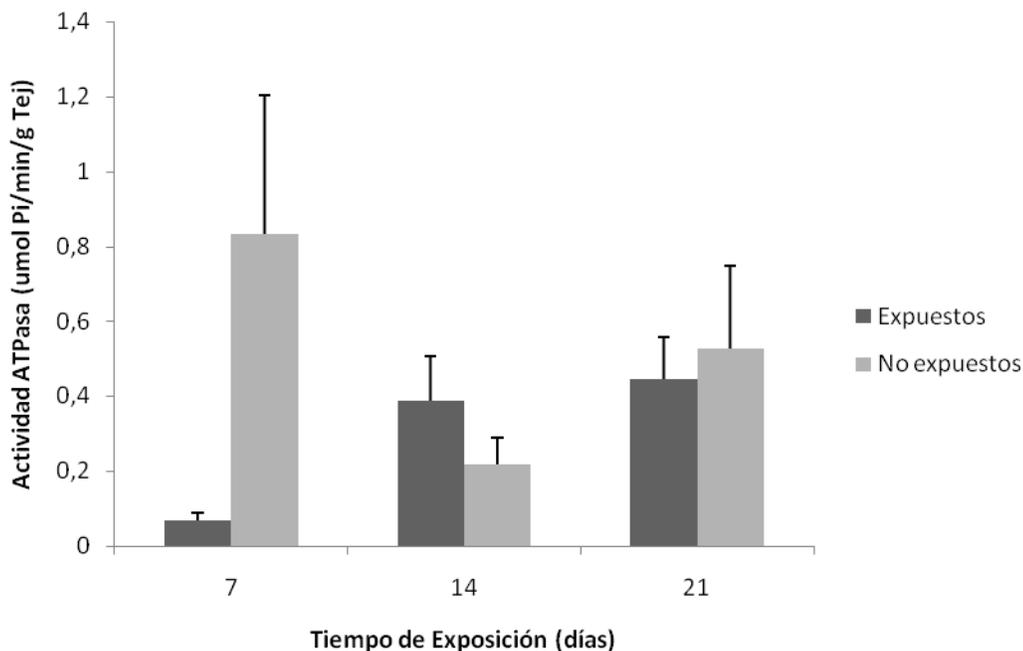


Figura N° 1 Actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L-1 PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiun días.

Cuando se analizó la AATPMM de los peces expuestos a PQ con respecto a los no expuestos se obtuvo que durante los siete días de exposición (Figura N° 2) dicha actividad disminuye muy significativamente ($W=50$; $p<0,01$); con un aumento no significativo ($W=13$; $p>0,05$) durante los catorce días (Figura N° 3) para luego disminuir no significativamente ($W=10$; $p>0,05$) a los veintiun días de exposición (Figura N° 4)

La AATPMM de los peces expuestos a 10 mg.L⁻¹ PQ fue evaluada durante el tiempo de exposición (Figura N° 5); obteniendo, que la misma fue menor para los siete días de exposición y presentó un aumento significativo a medida que transcurre el tiempo de la exposición ($KW=10,85677$; $p<0,05$). Estableciéndose que la actividad enzimática en el período de siete días de exposición fue diferente de catorce ($W=30$; $p<0,05$) y veintiun días ($MW=43$; $p<0,01$).

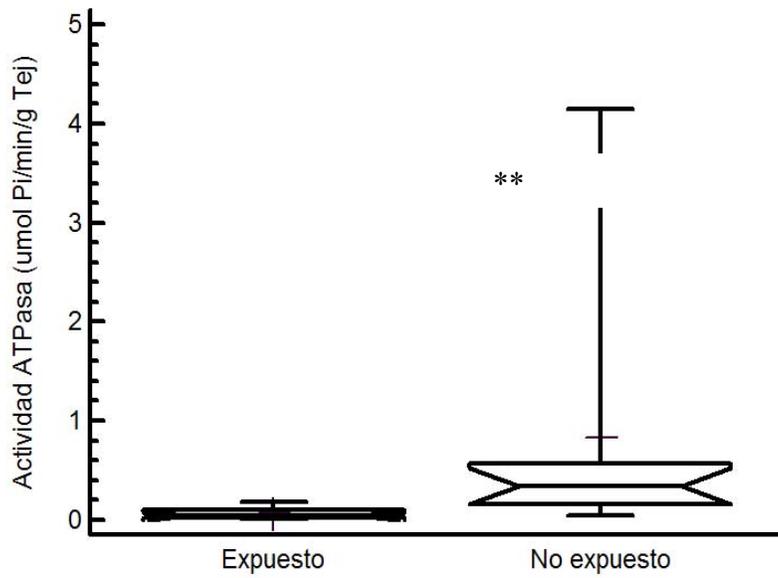


Figura N° 2 Actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L-1 PQ a 29°C durante siete días. **: Diferencias muy significativas.

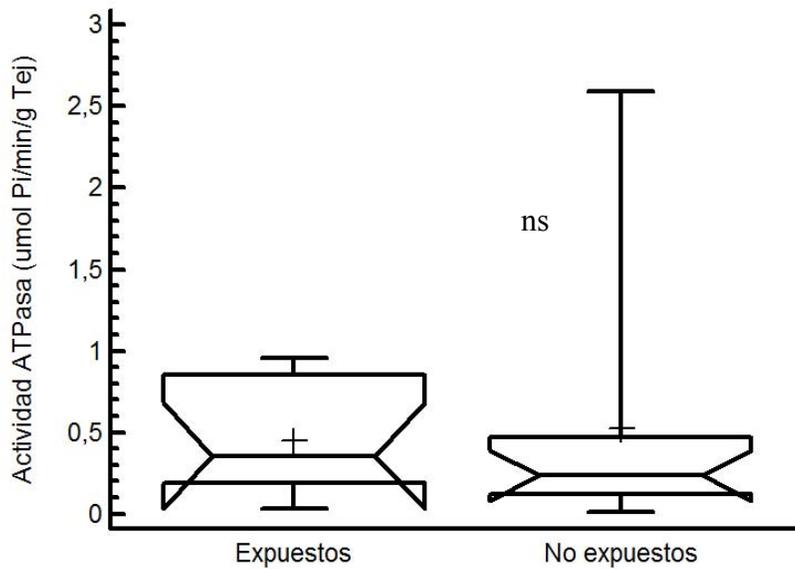


Figura N° 3 Actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L-1 PQ a 29°C durante catorce días. ns: diferencias no significativas

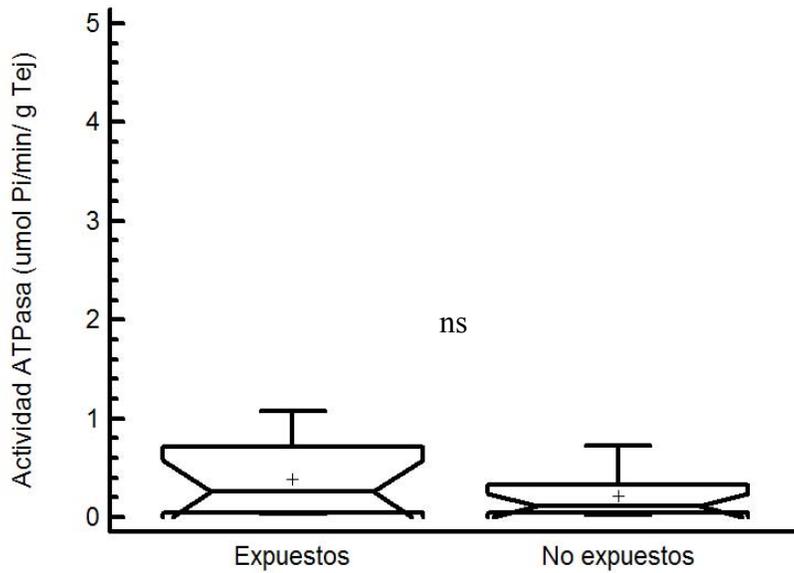


Figura N° 4 Actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante veintiún días. ns: diferencias no significativas.

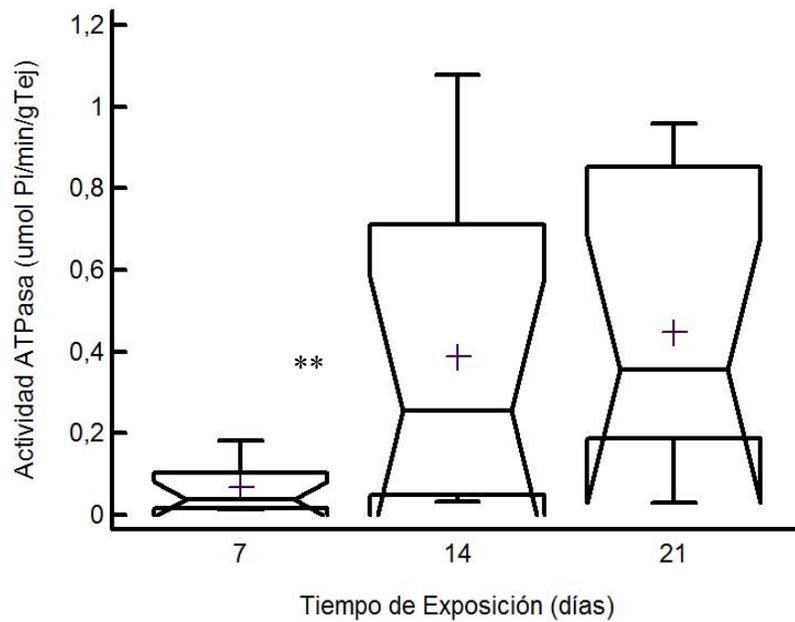


Figura N° 5 Actividad de la ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintium días. **: diferencias muy significativas.

Los resultados sugieren que la recuperación de la AATPMM de los peces expuestos a partir de los catorce días de exposición es debido a un aumento en la respuesta del sistema detoxificador presente en el músculo de los peces.

Un comportamiento diferente presentó la actividad ATPasa mitocondrial hepática (AATPMH) de los peces expuestos al herbicida; donde se observó que la disminución en los siete días de exposición fue muy marcada siendo más significativa a los catorce y veintiún días de exposición (Figura N°6).

El análisis estadístico de la AATPMH de los organismos expuestos a PQ en relación a los no expuestos, indicó que a los siete días de exposición (Figura N° 7) no se encontró diferencias significativas ($W=23$; $p>0,05$) entre la actividad enzimática de los controles y los expuestos; sin embargo, se halló una disminución altamente significativa de la actividad ATPasa (Figura N° 8 y 9) tanto para los catorce ($MW=60,5$ $p<0,001$); como para los veintiún ($W=50$; $p<0,001$) días de exposición.

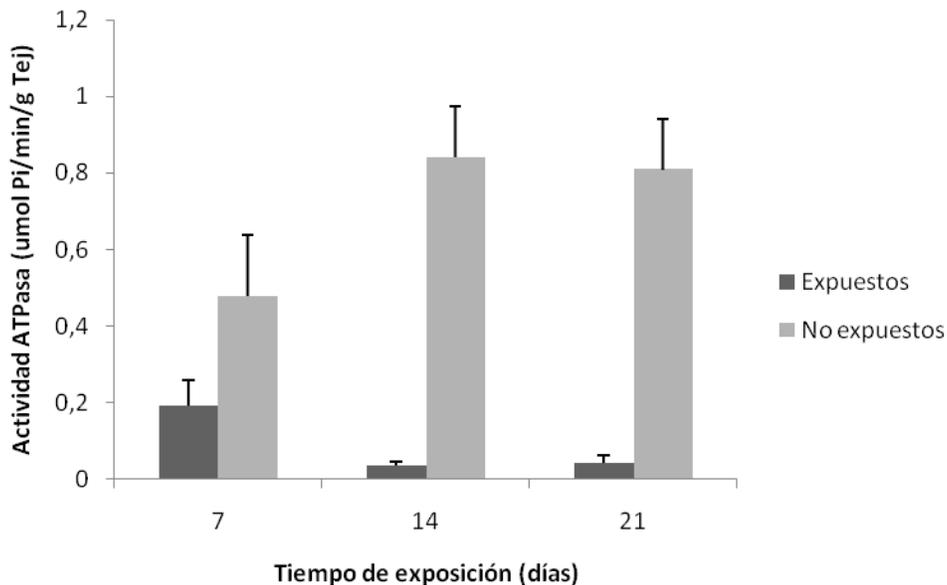


Figura N° 6 Actividad de la ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L^{-1} PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días.

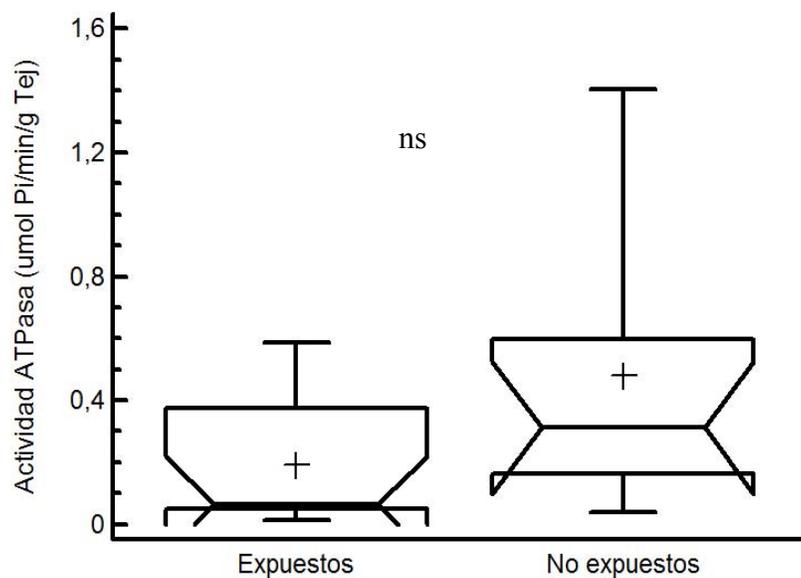


Figura N° 7 Actividad de la ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete días. ns: diferencias no significativas.

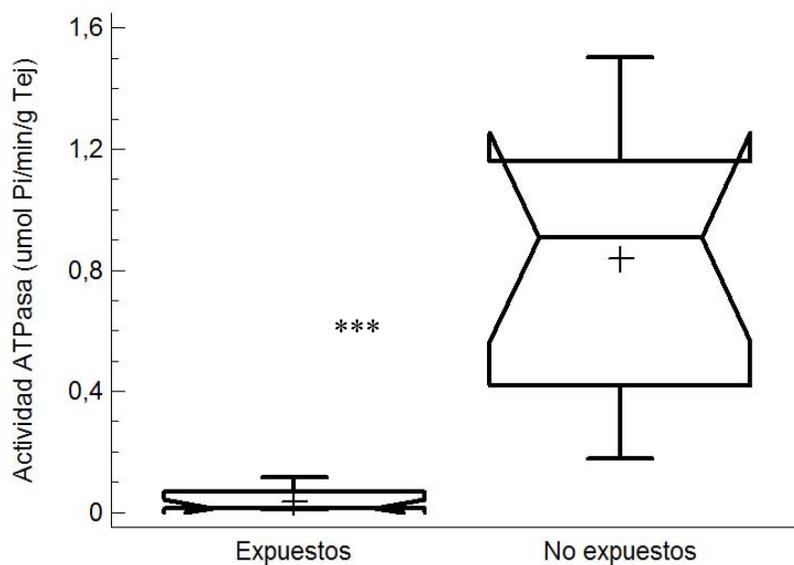


Figura N° 8 Actividad de la ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante catorce días. ***: diferencias altamente significativas.

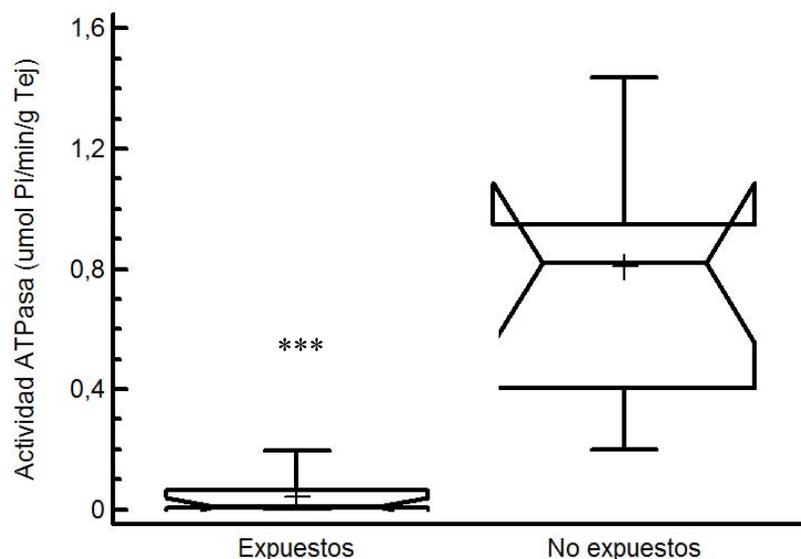


Figura N° 9 Actividad ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante veintiún días. ***: diferencias altamente significativas.

La AATPMH de los peces expuestos a 10 mg.L⁻¹ PQ fue evaluada durante el tiempo de exposición (Figura N° 10), la misma fue mayor para los siete días de exposición y se caracterizó por disminuir significativamente durante el desarrollo de la exposición (KW=8,20134; p<0,05). Estableciéndose que dicha actividad durante los siete días fue diferente de catorce (W=35,5; p<0,05) y veintiún (W=33; p<0,05) días de exposición al tóxico.

Los hallazgos obtenidos muestran que la exposición a 10 mg.L⁻¹ PQ afecta la AATPMH de los organismos después de los siete días de la exposición por lo que se sugiere que a partir de este periodo de exposición el efecto tóxico del herbicida comienza a afectar el hígado y por lo tanto pudiera estar ocurriendo un agotamiento del sistema detoxificador de este órgano.

A diferencia de lo observado en la AATPMM, la AATPMH disminuyó en los peces expuestos sin recuperación de la respuesta, durante el tiempo de exposición.

Inicialmente la AATPMH en los peces expuestos disminuye no significativamente en relación a los controles, se puede explicar debido a que en ese período de exposición el herbicida no está siendo movilizado en su totalidad hasta el hígado y este órgano es capaz de responder efectivamente con su maquinaria antioxidante ante los daños oxidativos que pudiera producir el PQ acumulado; es decir, en los siete días de exposición el organismo es capaz de defenderse del estrés oxidativo inducido por el tóxico, probablemente porque existe un equilibrio entre la función depuradora del hígado y el efecto oxidante causado por el PQ.

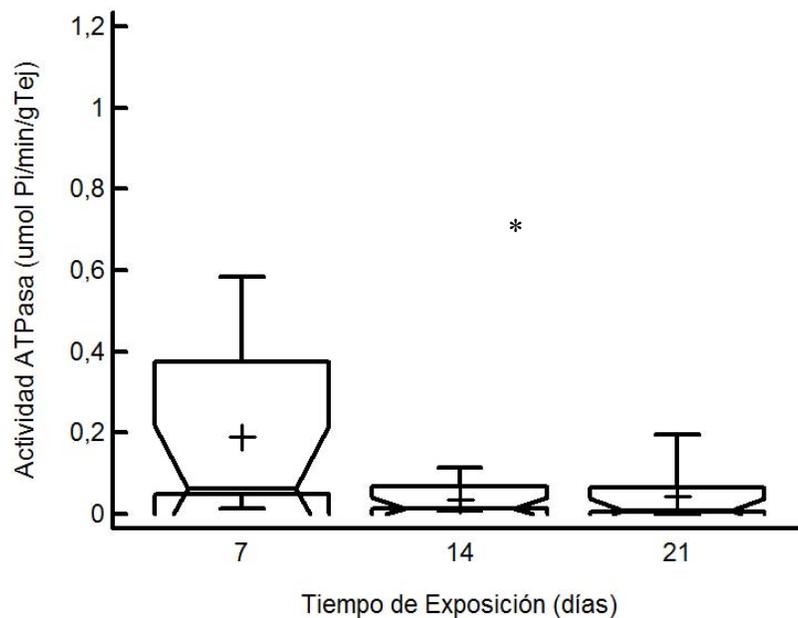


Figura N° 10 Actividad ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días. *: diferencias significativas.

3. Oxido Nítrico (ON)

La concentración de ON en el tejido muscular de los peces expuestos durante siete y catorce fue más alta en relación a los no expuestos no siendo así para los

veintiún días de exposición (Figura N° 11). La gráfica muestra una tendencia a la disminución en la producción de ON en los peces expuestos a PQ.

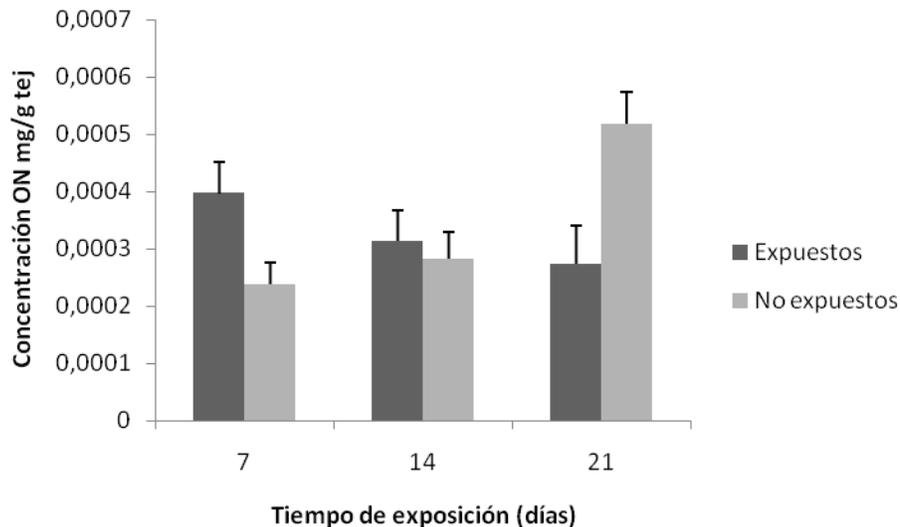


Figura N° 11 Concentración de Óxido Nítrico en el tejido muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L^{-1} PQ a temperatura de 29°C durante siete, catorce y veintiún días.

La concentración de ON muscular de los peces expuestos al PQ fue comparada con la concentración de los organismos no expuestos; hallando que en los siete días de exposición (Figura N° 12) dicha concentración aumento significativamente ($W=36,5$; $p<0,05$) en los organismos expuestos; para el tiempo de catorce días (Figura N° 13) se halló un aumento no significativo en la concentración de ON ($W=5,5$; $p>0,05$). Sin embargo en los veintiún días de exposición (Figura N°14) se observó una disminución muy significativa ($W=45,5$; $p<0,01$), en la concentración de ON muscular de los peces expuestos.

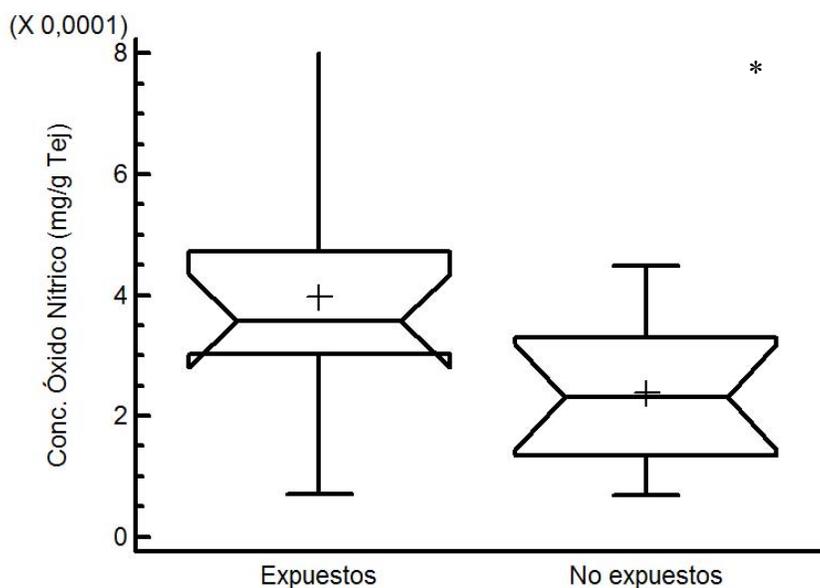


Figura N° 12 Concentración de Óxido Nítrico en el tejido muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L^{-1} PQ a 29°C durante siete días. *: diferencias significativas.

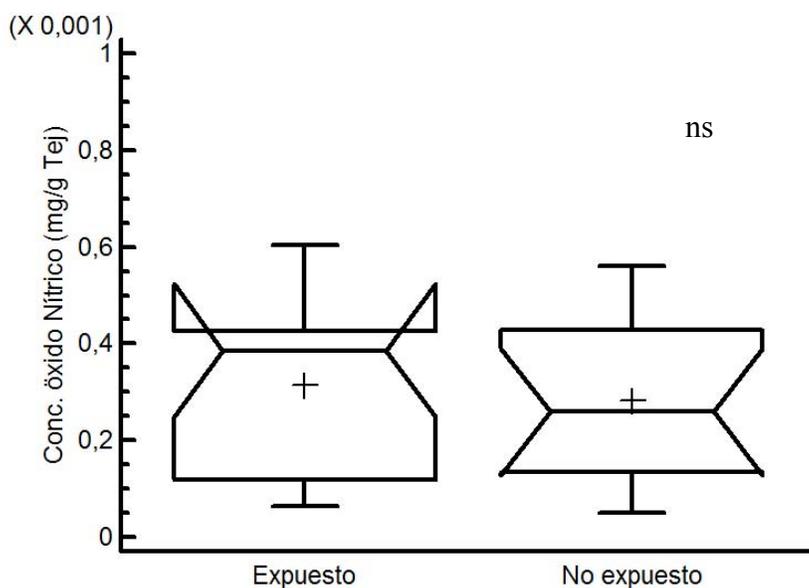


Figura N° 13 Concentración del Óxido Nítrico en el tejido muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L^{-1} PQ a 29°C . durante catorce días. ns: diferencias no significativas.

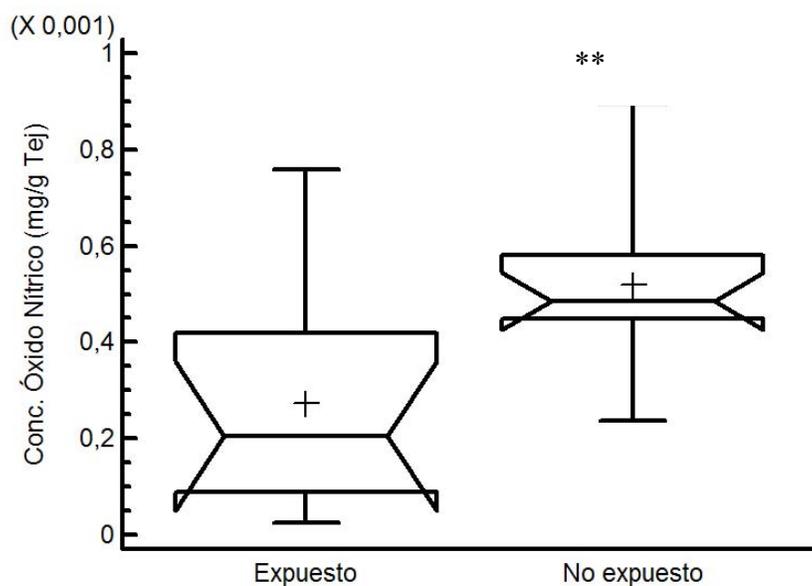


Figura N° 14 Concentración del Óxido Nítrico en el tejido muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mgr.L⁻¹ PQ a 29°C durante veintiún días. **: diferencias muy significativas.

Se realizó la evaluación de la concentración de ON muscular en los peces expuestos al PQ durante el tiempo de exposición (Figura N°15); obteniéndose una disminución no significativa de dicha concentración (KW=2,09191; p>0,05). A diferencia de esto se observó en los controles (Figura N°16) un aumento significativo (KW=14,4511; p<0,001) durante el desarrollo de la exposición; resultados que pudieran estar indicando una ligera inhibición en la producción del óxido nítrico en los peces expuestos al tóxico.

Por otro lado se encontró una relación significativa (Fs=4,87; p<0,05) entre la AATPMM y la concentración muscular de ON de los peces expuestos durante siete días hallando que la disminución de la AATPMM observada en los organismos expuestos puede ser explicada en un 42% ($r^2=0,4257$) por el aumento en la concentración de ON; esto hace presumir que parte de la disminución de la actividad ATPasa del musculo a los siete días de exposición al PQ puede ser causada por estrés

nitrosativo, no siendo así para los catorce (Fs: 0,73; $p>0,05$) y veintiún (Fs: 1,72; $p>0,05$) días de exposición.

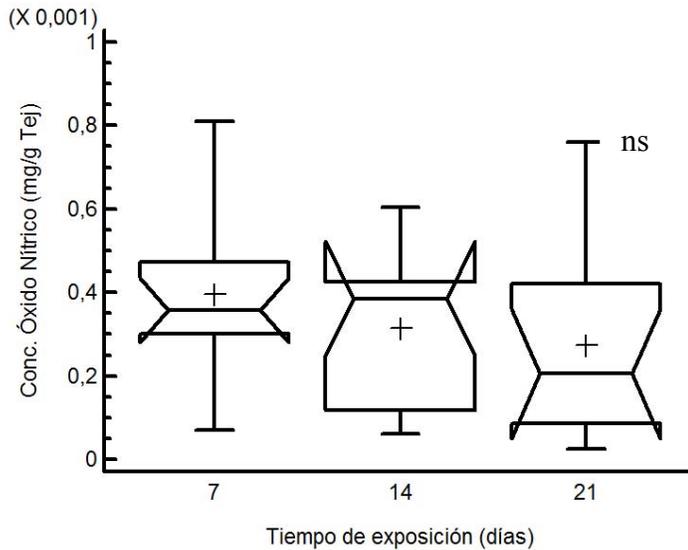


Figura N° 15 Concentración de Óxido Nítrico en el tejido muscular de *C. macropomum* expuesta a 10 mgr.L^{-1} PQ a 29°C . durante siete, catorce y veintiún días. ns:diferencias no significativas.

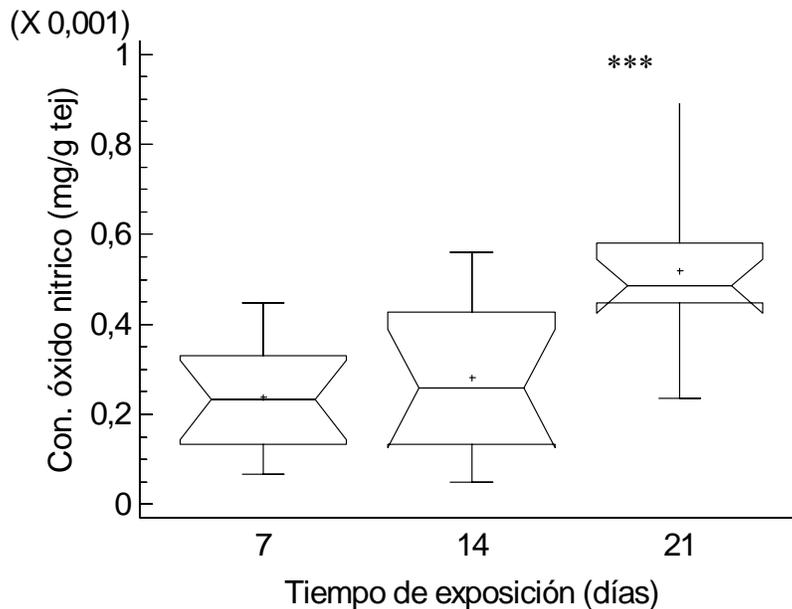


Figura N° 16 Concentración de Óxido Nítrico en el tejido muscular de *C. macropomum* no expuesta a 10 mgr.L^{-1} PQ a 29°C . durante siete, catorce y veintiún días. ***: diferencias altamente significativas.

4. Glutación reducido (GSH)

Los peces expuestos a 10 mg.L^{-1} PQ durante siete días presentaron un aumento considerable de la concentración de GSH en el tejido hepático con respecto a los peces no expuestos (Figura N° 17); sin embargo se observa que para los catorce días de exposición esta concentración disminuye, para aumentar nuevamente a los veintiún días por lo que se puede asumir una recuperación del sistema oxido-reductor de los peces expuestos al herbicida.

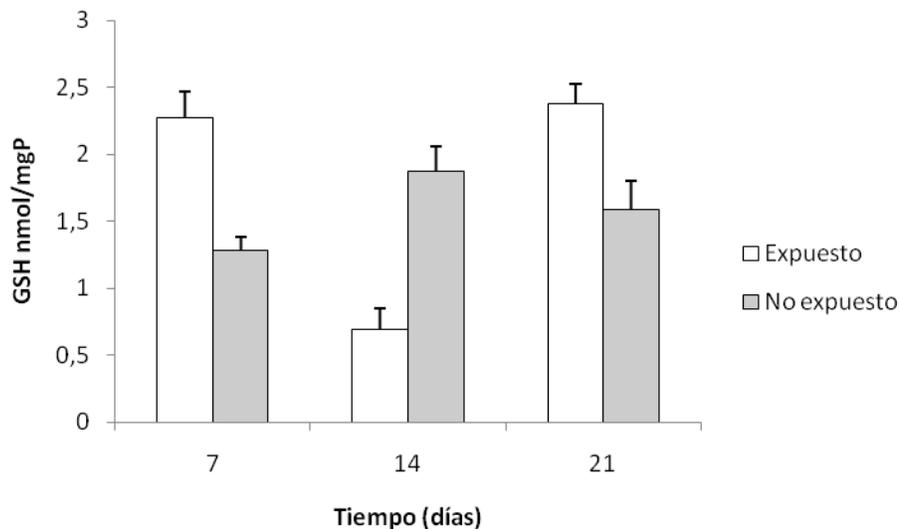


Figura 17 Concentración de GSH reducido hepático de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L^{-1} PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días.

El análisis de la concentración de GSH hepático de los peces expuestos a PQ con respecto a los no expuesto indicó un aumento significativo ($t=4,7606$; $p<0,01$) para los siete días de exposición (Figura N° 18); no obstante, disminuyó significativamente ($t=-4,8227$; $p<0,001$) durante los catorce días (Figura N°19),

aumentando significativamente ($t=3,0935$; $p<0,05$) para los veintiún días (Figura N° 20)

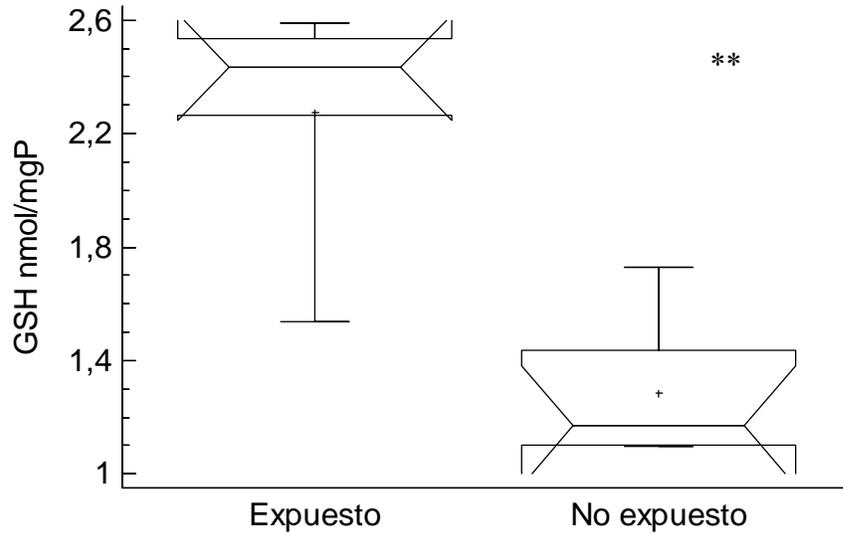


Figura N° 18 Concentración de GSH reducido hepático de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L^{-1} PQ a 29°C durante siete días. **: diferencias muy significativas.

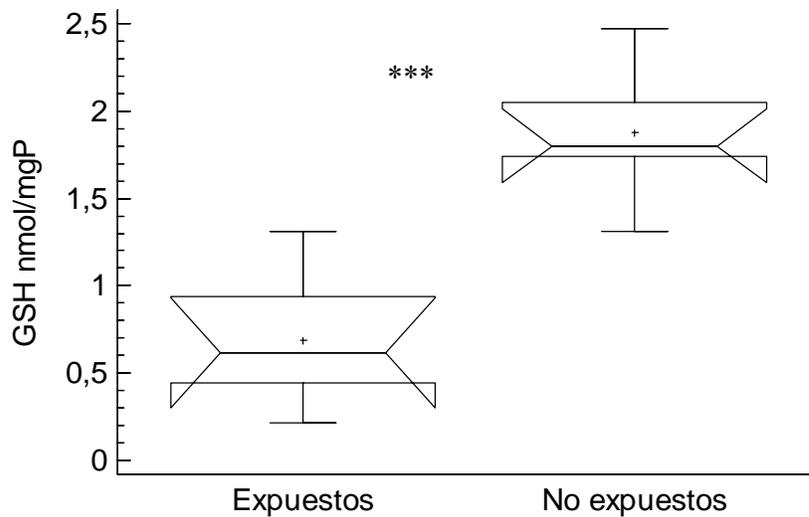


Figura 19 Concentración de GSH reducido hepático de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L^{-1} PQ a 29°C durante catorce días. ***: diferencias altamente significativas.

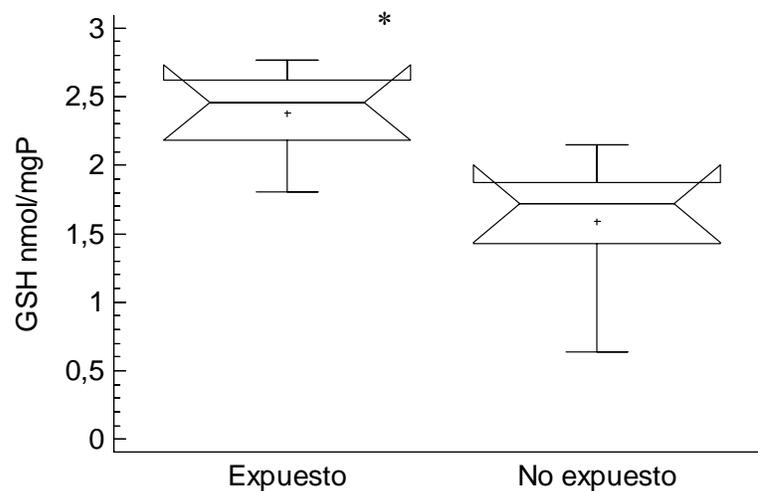


Figura 20. Concentración de GSH reducido hepático de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L^{-1} PQ a 29°C durante veintiún días. *: diferencias significativas.

La concentración de GSH hepático de los peces expuestos a la concentración subletal del herbicida fue evaluada durante el tiempo de exposición (Figura N° 21); obteniendo una disminución altamente significativa ($F_s=34,83$; $p<0,001$) para los catorce días de exposición y además esta disminución se diferencia del contenido de GSH hepático encontrado en los siete y veintiún días de exposición, periodos en los que las concentraciones de GSH fueron semejantes. Estos hallazgos indican que el sistema redox de los hepatocitos presenta una activación durante los siete días de exposición, luego un agotamiento durante los catorce días y al final se evidencia una recuperación del mismo.

La concentración de GSH muscular encontrada en los peces expuestos a PQ presentó un comportamiento diferente; ya que, durante los siete y catorce días de la exposición se observó una leve disminución en los niveles de GSH con respecto a los peces no expuestos (Figura N° 22). Los datos obtenidos para el tiempo de exposición de veintiún días no fueron reportados debido a que resultaron ser valores tan bajos que arrojaron absorbancias negativas.

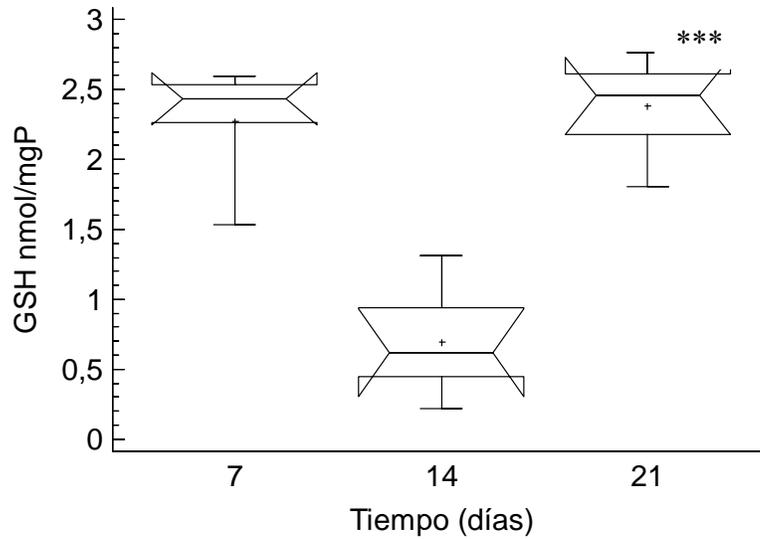


Figura 21 Concentración de GSH hepático de *C. macropomum* expuesta a 10 mg.L^{-1} PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días. ***: diferencias altamente significativas.

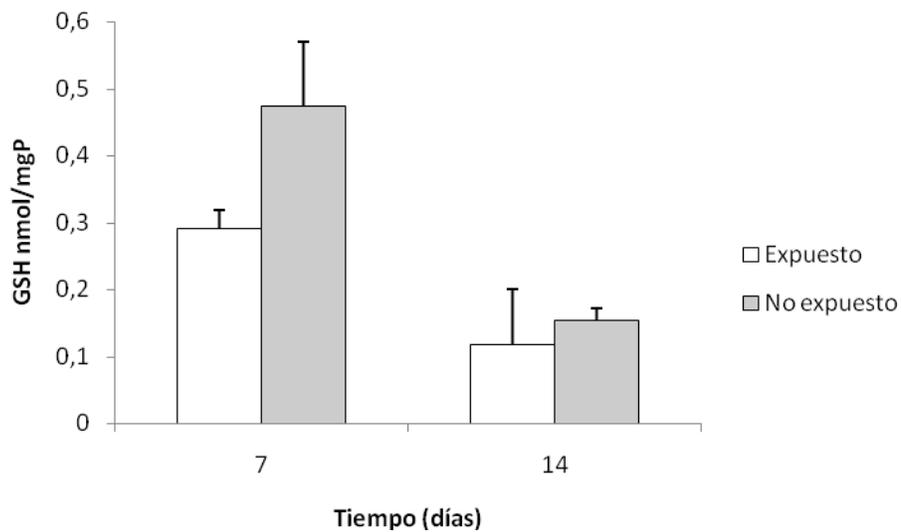


Figura 22 Concentración de GSH reducido muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L^{-1} PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días.

La evaluación de la concentración de GSH muscular de los peces expuestos al herbicida en relación a los no expuestos evidenció que para los siete (Figura N° 23) y catorce (Figura N° 24) días de exposición presentaron una disminución no significativa (MW= 9,5; $p>0,05$ y MW= 0,0; $p>0,05$; respectivamente).

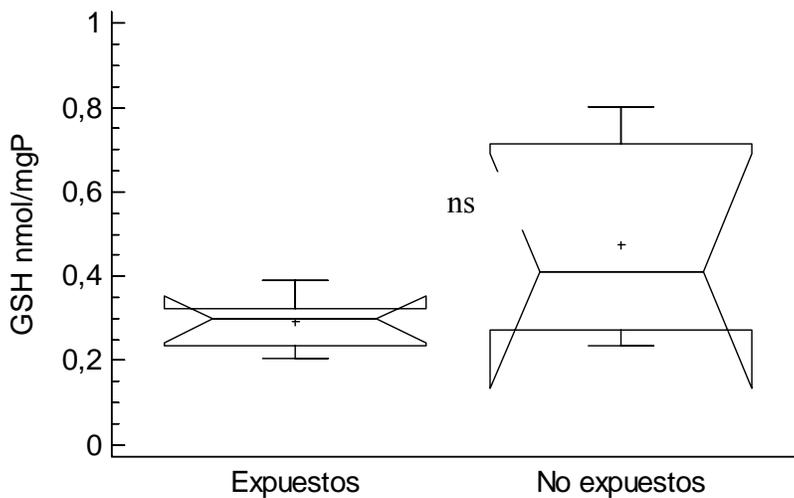


Figura 23 Concentración de GSH reducido muscular de *C. macropomum* expuesta a 10mg.L-1 PQ a 29°C durante siete días. ns: no significativo.

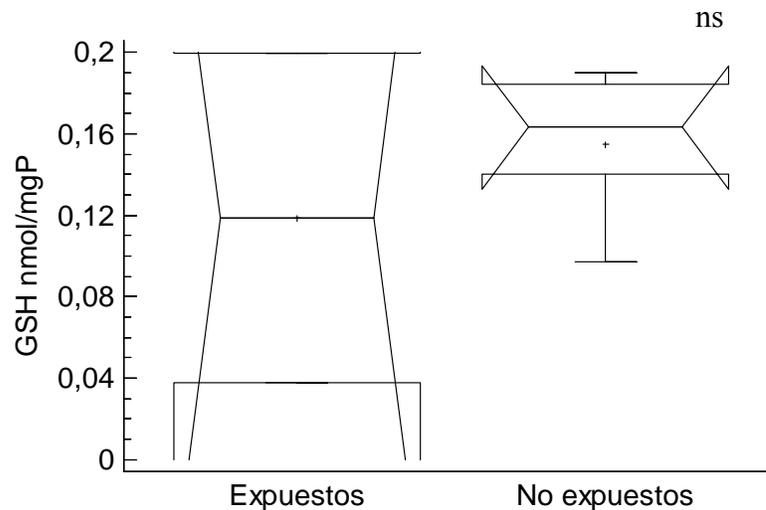


Figura 24 Concentración de GSH reducido muscular de *C. macropomum* expuesta a 10 mgL⁻¹ PQ a temperatura de 29°C durante catorce días. ns: no significativo.

La concentración de GSH muscular de los peces expuestos fue evaluada durante el tiempo de exposición (Figura N° 25), la misma presentó una disminución no significativa durante los catorce días de exposición (MW=-6,0; $p>0,05$); sin embargo, la concentración de GSH muscular de los peces no expuestos (Figura N° 26) disminuyó muy significativamente (MW=-15; $p<0,01$) durante el mismo lapso de exposición: Por lo que se puede decir que el sistema redox muscular presenta un ligero aumento de su actividad ante la exposición al tóxico. Los resultados de la concentración de GSH sugieren que el órgano más afectado por el estrés oxidativo producido en *C. macropomum* ante la exposición al PQ es el hígado; debido a que en este órgano es donde el sistema redox se observa mayormente afectado.

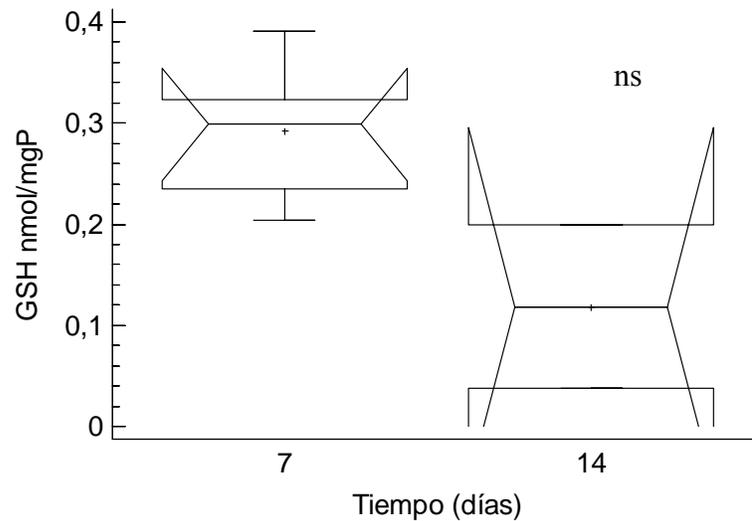


Figura 25 Concentración de GSH reducido muscular de *C. macropomum* expuesta a 10 mg.L^{-1} PQ a 29°C durante siete y catorce días. ns: no significativo.

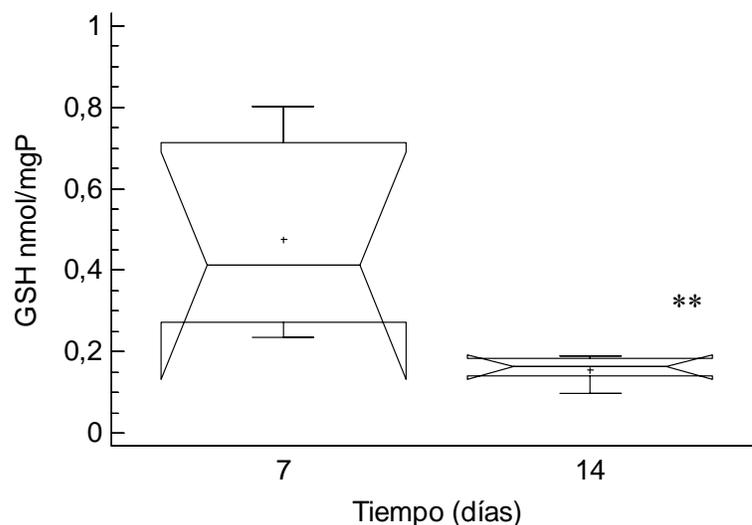


Figura N° 26 Concentración de GSH reducido muscular de *C. macropomum* no expuesta a 10mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete y catorce días. **: diferencias muy significativas.

5. Paraquat (PQ)

En el tejido muscular no se evidenció la presencia del herbicida a diferencia del tejido hepático donde se encontraron concentraciones de PQ (TABLA N° 2). Estos resultados soportan las deficiencias obtenidas para la AATPMH y los efectos del PQ sobre las concentraciones de GSH hepático.

Tabla N° 1 Concentración de PQ presente en el tejido hepático de *C. macropomum* expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29 °C durante siete, catorce y veintiún días.

Tiempo Exposición (días)	µg/gr de PQ	Desv. Est.
7	1,68469	0,34596
14	1,68612	0,43040
21	1,59789	0,32682

6. Glicoproteína P (gp-P)

La corrida electroforética (Figura N° 27) realizada a la fracción de membrana de los hepatocitos de *C macropomum* expuestos al herbicida PQ muestra el posible enriquecimiento de una banda de proteína con una masa molecular de aproximadamente 170.000 KDa observándose más claramente a los siete y veintiún días de la exposición lo que concuerda con el aumento de la concentración de GSH en el tejido hepático para este tiempo de exposición. Se presume que esta banda pudiera ser la gp-P.

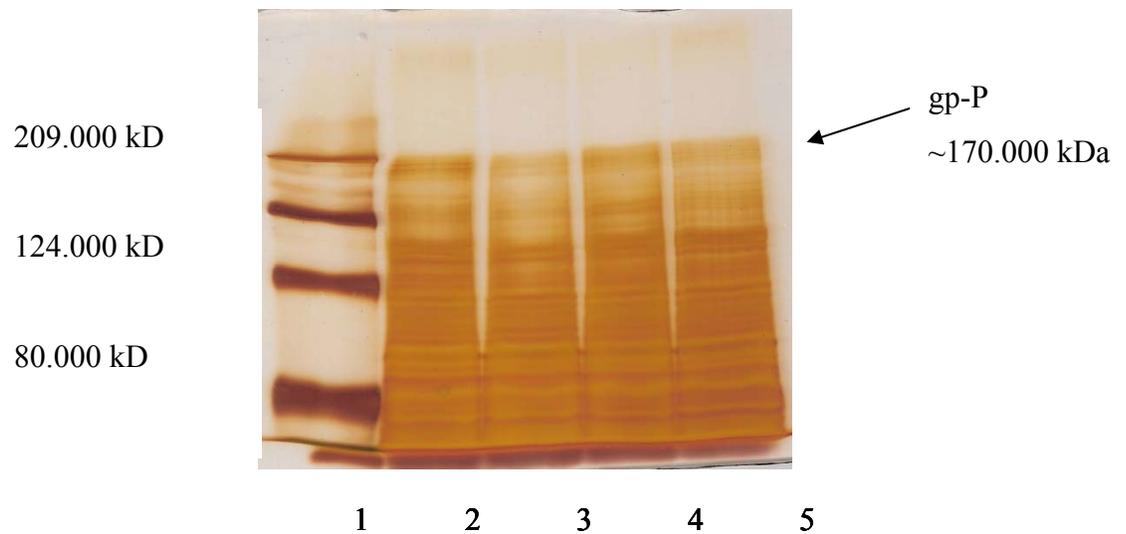


Figura N° 27 Eletroforesis de la fracción de membrana que contiene la gp-P provenientes de los hepatocitos de *C. macropomum* expuesta a 10 mg.L^{-1} PQ a 29°C . Línea 1: marcadores de masa molecular; Línea 2: siete días de exposición; Línea 3: catorce días de exposición; Línea 4: veintiún días de exposición; Línea 5: no expuesto.

DISCUSIÓN

Este trabajo evidencia el efecto oxidativo de una concentración subletal de PQ en peces juveniles de *C. macropomum* demostrado por la disminución de la actividad ATPasa mitocondrial la disminución en la concentración de ON y GSH; además, la concentración usada aquí induce la expresión de la gp-P y probablemente induce un mecanismo homeostático en estos peces.

La disminución de la actividad enzimática de la ATPasa mitocondrial muscular y hepática, de los peces expuestos al PQ, fue observada de manera general, sugiriendo la alteración bioenergética mitocondrial por la interacción con el tóxico. Esta alteración energética es producida una vez que el dicatión PQ^{2+} tiene contacto con la mitocondria para ser reducido vía enzimática, principalmente la oxido reductasa ubiquinona NADH, Complejo I, (Dinis-Oliveira *et al.*, 2006) para formar el monocatión radical (PQ^+) que reacciona rápidamente con el oxígeno (O_2) para producir el anión superóxido (O_2^-) y regenerar el PQ^{2+} (Cochemé & Murphy, 2008).

Las reacciones cíclicas de oxido reducción del PQ con algunos elementos del metabolismo oxidativo, como el citocromo P-450 y la cadena transportadora de electrones genera especies reactivas de oxígeno (ROS): el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical Oxidrilo (OH^-) (Jing-Fen *et al.*, 2006); compuestos que pudieron haberse generado en el tejido muscular y hepático de los peces expuestos, en este estudio, causando la disminución de la actividad ATPasa debido a la posible peroxidación lipídica que producen los mismos en la membranas mitocondriales.

Esto fue demostrado en otras investigaciones mediante el incremento significativo de las sustancias reactivas ácidas tiobarbituricas (TBARS) en

mitocondrias de hepatocitos del pez *Sparus aurata*, expuesto a 50 mg/Kg (Pedrajas, 1995) y en mitocondrias de pulmones de ratas expuestos a 10mM de PQ (Palmeira *op cit.*).

Por su parte Castello *et al.* (2007), reportaron que el PQ^{2+} es reducido por los complejos II y III, de la cadena transportadora de electrones, generando O_2^- , por lo que produce un aumento significativo en la generación de H_2O_2 en la fracciones mitocondriales del cerebro de ratas; esto depende de la presencia de sustratos respiratorios que proporcionen un flujo constante de electrones a través de la cadena transportadora y un potencial de membrana mitocondrial estable. Así mismo los experimentos realizados por Cochemé & Murphy *op cit.* en mitocondrias de hepatocitos de ratas, demostraron que la producción de superóxidos en la mitocondria pareciera depender del complejo I por la acumulación de PQ^{2+} en la matriz mitocondrial lo que viene dado por una proteína transportadora activada por el potencial de membrana; una vez que el dicatión se encuentra dentro de la matriz, puede reducir el complejo I interactuando directamente con el NADH, o manejar un transporte reverso de electrones desde el pool de la coenzima Q reducida hacía el complejo I por electrones provenientes del succinato (Apéndice N°34).

A diferencia de los resultados obtenidos en esta investigación en relación a la disminución de la actividad de la ATPasa mitocondrial en *C. macropomum*, Palmeira *op cit* reportaron la estimulación de la ATPasa mitocondrial y la inhibición del complejo III de la cadena transportadora de electrones, en mitocondrias de hígado de ratas, expuestas a PQ; sostienen que este desacoplamiento entre la fosforilación oxidativa y la cadena transportadora de electrones se debe a la ligera permeabilización de la membrana mitocondrial interna al paso de H^+ , relativo a la peroxidación lipídica causada por el herbicida.

La diferencia entre los resultados de esta investigación y los de Palmera *op cit*

en relación a la actividad de la atpasa mitocondrial pudiese ser explicado por las condiciones experimentales de este experimento y el desarrollado por ellos. En este trabajo, los organismos fueron expuestos a una dosis subletal de PQ durante 21 días después de esto, se analizó la actividad mitocondrial de las células de músculo e hígado; Palmeira *et al.*, utilizaron mitocondrias aisladas de hígado de ratas y las expuso directamente durante 10 minutos al PQ. Posiblemente, la entrada directa del herbicida a la mitocondria (en el experimento de Palmeira *op cit*) logra estimular la fosforilación oxidativa debido a la capacidad oxido reductora del PQ que permite un aumento en el potencial de membranas, atribuido al aumento en el gradiente de protones transmembrana que estimulan la síntesis de ATP; este efecto puede ser observado durante ese corto periodo de tiempo; no obstante, la exposición del organismo completo por un tiempo prolongado al PQ quizás permite que este compuesto se acumule y magnifique el daño en la mitocondria puesto que esa misma capacidad oxidoreductora produce ROS que pueden generar la desorganización y el deterioro de la membrana mitocondrial interna originando que el potencial de protones disminuya y esto afecta la actividad ATPasa tal, como se observó en este estudio.

Por otro lado, el radical OH^\cdot generado por la cadena transportadora de electrones puede aumentar considerablemente sus niveles y además de ser el precursor de la peroxidación lipídica presenta una ruta alternativa para causar daños por estrés oxidativo a la membrana mitocondrial. Esta ruta alternativa se origina cuando en presencia de un aumento de Calcio el OH^\cdot oxida el grupo tiol de las proteínas de la membrana interna mitocondrial, resultando en un cambio conformacional que, de algún modo, forma un gran poro no selectivo conocido con el nombre de poro de transición de permeabilidad de la mitocondria (MPT) que permite la salida de los componentes de la matriz mitocondrial (Kolwallowski *et al.*, 2001). La apertura del poro MPT ha sido reportada como uno de los daños oxidativos que produce la intoxicación por PQ en mitocondrias de hígados y pulmones de ratas

(Hirai *op cit.*; Beriska *et al.*, 1994; Costantini *op cit.*).

De acuerdo a eso la exposición de *C. macropomum* 10 mg.L⁻¹ de PQ durante 21 días posiblemente logra la permeabilización de la membrana mitocondrial, cambia los potenciales de membranas y desacopla el transporte de electrones de la fosforilación oxidativa. Siendo más evidente en las mitocondrias de los hepatocitos. Los hallazgos de este estudio corroboran las evidencias que señalan que el PQ produce un efecto tóxico sobre el metabolismo energético mitocondrial caracterizado por el desacoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa; lo que sugiere que el daño oxidativo del herbicida sobre la actividad ATPasa de las mitocondrias de hígado de *C. macropomum* es directo y no selectivo al desacoplar la síntesis de ATP del transporte de electrones; observación soportada por la presencia del herbicida en este tejido y la pérdida de la citoarquitectura normal de los hepatocitos de estos peces reportada por Mata (2008).

El descenso de la concentración de ON observado en el músculo de los organismo expuestos a PQ puede ser explicado, en parte, por el restablecimiento de la AATPMM sugiriendo una reversibilidad del daño nitrosativo en el tejido muscular. Ya que el ON en cantidades elevadas reacciona rápidamente con el O₂⁻ produciendo el peroxinitrito (ONOO⁻) causando toxicidad, debido al estrés nitrosativo generado; lo que se ha evidenciado por el aumento de los niveles de TBARS y ROS (Song *et al.*, 2006).

La producción de ON muscular fue disminuida en más de un 50%, en los peces expuestos a PQ sugiriendo la inhibición en la síntesis de ON como un mecanismo para evitar el estrés nitrosativo, causado por el ONOO⁻ y sus productos más estables nitratos y nitritos. Esto hace presumir que la toxicidad causada por el PQ en el tejido muscular de los peces se debe más al estrés oxidativo que al nitrosativo; es decir existe mayor producción de ROS que especies reactivas de nitrógeno.

Estos resultados son semejantes a los reportados por Day *et al.* (1999) quienes, luego de ensayar con la enzima NOS neuronal a diferentes concentraciones de PQ hallaron que la formación de ON fue inhibida, a medida que se incrementaba la concentración de PQ y además, se produjo mayor oxidación del NADPH; concluyendo que la NOS neuronal muestra una actividad diaforasa PQ muy semejante a la diaforasa del citocromo reductasa P450. El PQ puede aceptar los electrones producto de la actividad oxidasa NADPH intrínseca en la NOS, para transformarse en PQ^+ , el cual reacciona directamente con el oxígeno, forma O_2^- y como consecuencia se inhibe la producción de ON; afectando este evento el papel fisiológico del ON como molécula señalizadora que, a concentraciones fisiológicas, actúa en muchos tejidos para regular diversos procesos fisiológicos (Yoffe *et al.*, 2007), funciona como un neurotransmisor implicado en el control cardiovascular y la osmorregulación, juega un papel importante en la regulación de catecolaminas en peces (McNeill & Perry, 2006).

La observación de Salazar-Lugo *et al.* (2009) en relación a la actividad macrofágica, la cual no fue afectada en los peces, unida a la disminución observada en la concentración del ON muscular hacen presumir que las NOS afectadas en los peces de este estudio fueron la endotelial y la neuronal; por lo que se supone la afección de la presión sanguínea y el sistema nervioso de los peces expuestos a PQ. Observaciones reforzadas por los hallazgos histopatológicos observados en dichos peces a nivel del tejido endotelial (Mata, 2008).

Song *et al.* (2006) en carpas comunes (*Cyprinus carpio*) expuestas a concentraciones de 2, 10, 50, 100 y 200 $\mu g.L^{-1}$ hexaclorobenceno reportaron mayor daño oxidativo en el tejido cerebral que en el tejido hepático, con aumentos muy significativos en la actividad de la NOS neuronal con respecto a los peces controles; atribuyendo este hecho a que el cerebro puede ser más susceptible al daño oxidativo debido a la gran cantidad de ácidos grasos polinsaturados presentes en el mismo y

que en este órgano se consume el 20% del oxígeno total del cuerpo.

Adicionalmente, los hallazgos realizados por Ghafourifar *et al.* (1999), demostraron que un aumento en la concentración de Ca^{2+} mitocondrial induce la NOS mitocondrial que se encuentra unida al grupo hemo de la citocromo C oxidasa, la enzima terminal de la cadena respiratoria, generando la formación de ONOO^- , peroxidación lipídica, y paralelamente causa la liberación de la citocromo C oxidasa y disfunción mitocondrial; pudiendo ser prevenido por la inhibición de la NOS mitocondrial evitando la apoptosis celular la cual es mediada por el aumento del Ca^{2+} mitocondrial y no por la permeabilidad transitoria mitocondrial.

El papel tóxico que ejerce el PQ sobre la NOS no esta muy claro ya que el trabajo realizado por Berisha *op cit* en pulmones aislados de cerdos expuestos a 100 mg/Kg PQ, reportan que el daño tisular causado proviene de la activación de la NOS la cual fue estimada por el aumento en los niveles de GMP cíclico; no obstante, esta asociación puede no ser la más ideal debido a que niveles elevados del GMP cíclico pudieran activar la NOS y esta a su vez mostrar la actividad diaforasa sobre el PQ y no la producción de ON.

Adicionalmente, el efecto oxidativo del PQ en *C. macropomum* también se evidenció por la disminución en las concentraciones de GSH reducido; observándose que el tiempo más crítico de exposición fue diferente para los tejidos estudiados. En el tejido muscular la concentración de GSH reducido se observó mayormente disminuida, en un 38%, con respecto a los peces no expuestos en la primera semana de exposición (7 días). No obstante, en el tejido hepático se halló una disminución altamente significativa, en la segunda semana de la exposición (14 días), representando este descenso un 68% en relación a los organismos no expuestos. Estos hallazgos son similares a los obtenidos por Parvaez & Raisuddin, (*op cit*) quienes encontraron la disminución en la concentración de GSH reducido en diferentes tejidos

del pez de agua dulce *Channa punctata*, expuesto a $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PQ durante 24 horas, reportando el mayor efecto tóxico del PQ sobre las branquias, seguido el hígado y por último los riñones; sugiriendo estos resultados que la toxicidad inducida por el PQ fue tejida específica y depende del rol fisiológico de cada órgano.

La disminución del GSH también fue señalada por Dinis-Oliveira *op cit* en pulmones de ratas inyectadas intraperitonealmente con 25 mg/Kg PQ; paralelamente los niveles de GSSG incrementaron significativamente y esto intensificó la peroxidación lipídica y predispuso el daño oxidativo en las células. EL GSH juega un papel central en el sistema antioxidante considerándose como un importante biomarcador de estrés oxidativo causado por contaminantes (Song *op cit*).

Según los estudios de Rojas et al., (2004) el agotamiento en el suministro de GSH es debido, parcialmente, a un reciclaje insuficiente del mismo; esto podría producir la disminución de algunos factores y enzimas que ayudan a controlar el estrés oxidativo causado por este tóxico. El efecto reductor del NADPH sobre el GSH y el Tioiredoxin (TSH), los cuales son sustratos de la glutatión peroxidasa (GPx) y la tioiredoxin peroxidasa (TPx), es mantener principalmente la funcionabilidad enzimática para remover el peróxido de hidrógeno en los organelos celulares (Kowaltowski *op cit*); sin embargo, este efecto pareciera estar afectado en los organismos estudiados aquí, específicamente para los peces expuestos al PQ durante dos semanas.

Sin embargo pareciera que *C. macropomum* es capaz de activar otras respuestas que pudiesen contribuir a disminuir el efecto del tóxico; una de estas respuestas es la inducción en la expresión de la gp-P, mostrada en la corrida electroforética como una banda de aproximadamente 170 kDa ; masa molecular que concuerda con la detección inmunoquímica realizada en fracciones de membranas provenientes de hígado, riñones, branquias, cerebro e intestino de los peces *Anoplarchus purpureus* (Bard

et al.; 2002) y *Fundulus heteroclitus* (Albertus & Laine, 2001) expuestos a contaminantes ambientales y toxinas quimioterapéuticas, respectivamente.

Investigaciones previas han demostrado la expresión de la gp-P en organismos acuáticos y han indicado que este evento se debe a una respuesta ante la contaminación ambiental, entre ellas, se nombran: la realizada por Smital *et al.* (2003) quienes observaron la inducción en la expresión y actividad de la gp-P en el músculo de los bivalvos *Dreissena polymorpha* (dulceacuícola) y *Mytilus galloprovincialis* (marino) expuestos en agua con extracto de Diesel-2oil (2D) y que dicha inducción depende de los niveles de contaminación. Achard *et al.* (2004) reportaron la inducción en la expresión de la gp-P en las branquias de la almeja *Corbicula fluminea* expuestas a concentraciones de Cadmio similares a la de los ambientes naturales (15 – 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Por otro lado Dinis-Oliveira *op cit* demostraron que la inducción de la gp-P en pulmones de ratas expuestas a PQ disminuye el efecto tóxico del herbicida y señalan que esta inducción se debe a la estimulación de la síntesis de *ново* de la gp-P.

Por otra parte, los resultados obtenidos en esta investigación también sugieren que juveniles de *C. macropomum* logran activar mecanismos compensatorios que le permiten tolerar la exposición prolongada a PQ. Esta suposición se basa en las siguientes observaciones; de los dos órganos estudiados, el músculo fue el más afectado durante los primeros siete días de la exposición, observándose en este una disminución de la actividad ATPasa y la concentración de GSH; mientras que simultáneamente los niveles de ON aumentaron considerablemente lo que supone que en este periodo de exposición la maquinaria antioxidante muscular no es tan efectiva como en el hígado. Sin embargo, en este tiempo de exposición, no fue afectada la actividad ATPasa en el hígado, tal y como lo evidencia el aumento significativo en las concentraciones de GSH y el aumento en la expresión de la gp-P; hechos que suponen una remoción eficiente de las ROS y una excreción efectiva del PQ.

A pesar de la respuesta tan eficaz del hígado durante los primeros días de exposición, las condiciones antioxidantes del pez cambian en los catorce días de exposición. Se observó que en el músculo la actividad ATPasa se sobrepone, disminuye la concentración de ON y de GSH, dichas disminuciones podrían asociarse con el aumento de la actividad ATPasa muscular; esto hace suponer, que la producción de RNS y ROS en el músculo disminuyeron produciendo el restablecimiento de la actividad ATPasa muscular. No obstante, en el hígado, disminuye la actividad ATPasa en la misma medida que decrecen las concentraciones de GSH y disminuye el enriquecimiento de la banda que representa la gp-P por lo que se podría sugerir que el período de exposición de 14 días es el punto crítico de la exposición para los juveniles de *C. macropomum*.

Ahora bien, se podrían manejar varias hipótesis que ayudarían a interpretar las razones por las cuales el hígado deja de responder eficientemente ante la toxicidad del paraquat. 1. Es posible que el ciclo redox del herbicida produjo la disminución de la disponibilidad del NADPH; tal y como lo señalan Akerman *op cit*; sin embargo, estos autores asumen que la carencia es compensada por la activación de la glucosa-6-fosfato, ruta metabólica que permite la regeneración del NADPH, a pesar de este señalamiento, en la presente investigación, se observó un comportamiento en los peces expuestos que puede explicar la disminución del NADPH. Los peces expuestos, durante los primeros días de la exposición no consumían el alimento suministrado, esto como una manera de no aumentar el nivel de la exposición a través del consumo de alimento. Posiblemente, estos peces al no tener una fuente de glucosa y al llevar al límite sus reservas de glucógeno pudieron disminuir la activación de la ruta glucosa-6-fosfato y por lo tanto la regeneración del NADPH y del GSH.

Al respecto, Simon *et al.*, (1983) determinaron el incremento en la actividad de la glucosa-6-fosfato y la glucogeno fosforilasa en microsomas de hígado provenientes de *Cyprinus Carpio L.* inyectadas intraperitonealmente con PQ (0,5 – 10 ppm)

observando que este incremento fue más significativo durante el tercero y sexto día de exposición; asegurando que dicho incremento se explica por el doble papel de la glucosa que envuelve la movilización del glucógeno desde el hígado hasta el torrente sanguíneo así como su fosforilación para la gluconeogénesis y además, señalan que el incremento de la glucosa-6-fosfato puede ser debido al daño que causa el herbicida sobre las membranas del retículo endoplasmático por la formación de radicales superóxidos.

La segunda hipótesis propone que el ciclo redox del PQ produjo una cantidad elevada de O_2^- , lo que pudo originar su remoción inadecuada; este acontecimiento se explica debido a la incapacidad del GSSG para reducirse hasta GSH por la carencia del NADPH o por la inhibición de las enzimas que promueven la síntesis *de novo* del GSH (glutación sintetasa y la γ -glutamylcisteina sintetasa); hecho que es señalado por Stephensen *et al.*, 2002 quienes sugieren que un decrecimiento inicial en la concentración del GSH es seguido por la regulación (activación) de las enzimas que participan en dicha síntesis; dicho comportamiento es observado en esta investigación.

Sin embargo, en este periodo de exposición hay una disminución en la producción de energía lo que ocurre posiblemente por el deterioro de las membranas mitocondriales, debido a la peroxidación lipídica, hecho que es indicado por Mohammadi-Bardbori & Ghazi-Khansari (2008); un evento lógico como defensa antioxidante sería aumentar la expresión de la gp-P para así liberar el tóxico hacia el torrente sanguíneo y que sea excretado al exterior celular; pero, el hecho observado es la disminución del enriquecimiento de la banda de 170 KDa, a pesar que los resultados obtenidos reportan niveles intracelulares de PQ similares para los tres periodos de exposición.

Por otro lado, los resultados obtenidos para los veintiún días de exposición

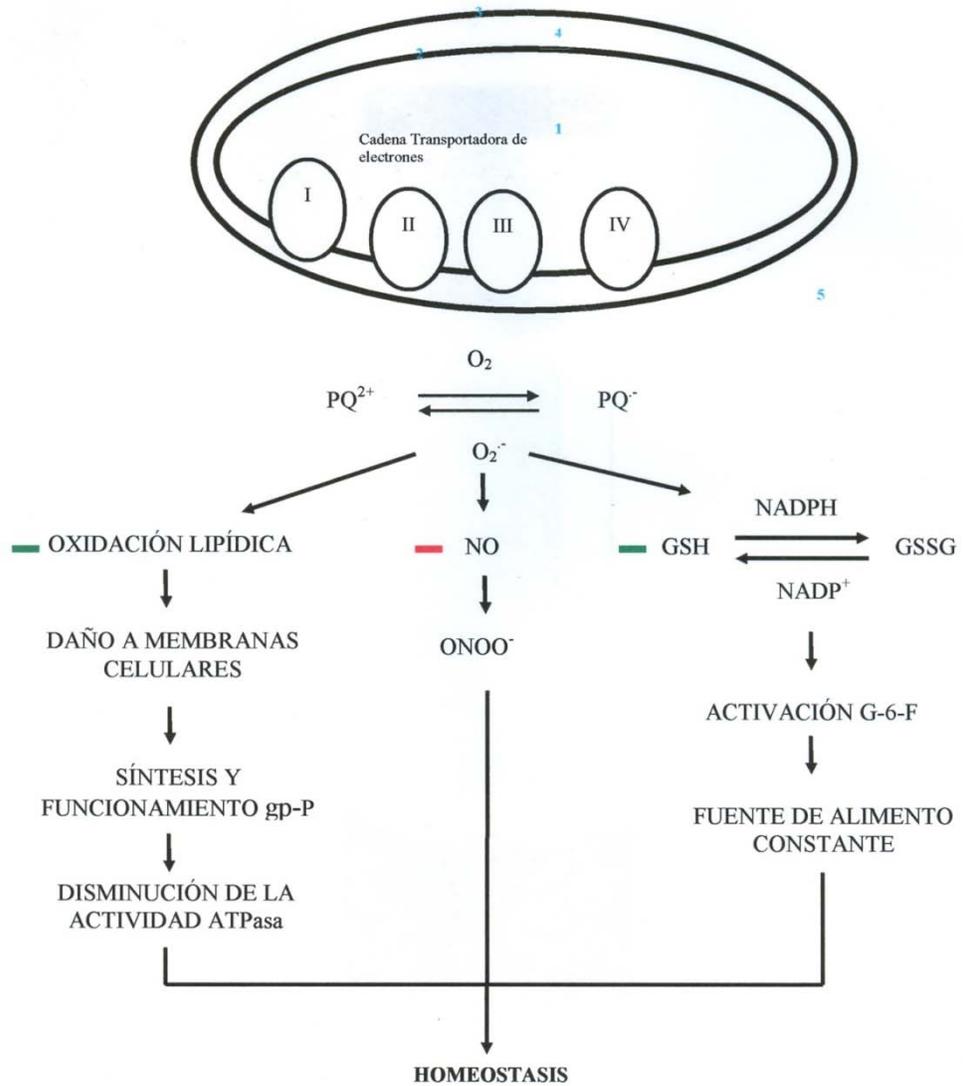
muestran que la actividad ATPasa muscular continua restablecida, los niveles de ON disminuyeron aún más; lo que podría traducirse, en parte, como la desintoxicación del tejido muscular. En el tejido hepático, aún no se observa el restablecimiento de la actividad ATPasa; sin embargo, la concentración de GSH empieza a aumentar y la banda de 170 KDa que representa la gp-P vuelve a enriquecerse

Posiblemente, la síntesis aumenta y no la producción de energía, a pesar de observarse el restablecimiento de las condiciones antioxidantes, como una forma de ahorrar energía que será empleada para la activación de la síntesis del GSH y la gp-P; además que la energía conservada por la ATPasa pudiera estar siendo empleada para realizar la expulsión del PQ al medio extracelular y de esta forma se produce el restablecimiento de las condiciones antioxidantes y por ende el equilibrio homeostático de los peces expuestos al herbicida.

Una evidencia de que los peces estudiados logran desarrollar un mecanismo compensatorio que los ayudan a sobrellevar el efecto oxidativo del PQ es su alta resistencia al herbicida que viene dada por el valor del LC_{50} a 96 h obtenido aquí y la comparación con el de otras especies como: la trucha marrón, 13 mg.L^{-1} (Extoxnet, 1996), el pez armadillo $19,2 \text{ mg.L}^{-1}$ (Barroso, 1996) y el pez *Oreochromis hornorum* $31,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (Martínez *et al.*, 1990).

Estos resultados evidenciaron que el PQ en una dosis de 10 mg.L^{-1} es capaz de inducir cambios bioquímicos en juveniles de *C. macropomum*. Principalmente, disminuye la actividad ATPasa mitocondrial lo que se atribuye mayormente al estrés oxidativo y no al nitrosativo, unido a la alteración en la concentración de GSH hepático y muscular y la inducción de la expresión de la gp-P, como una forma de mantener un ahorro de energía y alcanzar el equilibrio homeostático que permitió la supervivencia de los peces durante la exposición prolongada. Todo esto con lleva a sugerir a *C. macropomum* como un organismo bioindicador capaz de expresar

respuestas bioquímicas que pueden ser consideradas como biomarcadores ante la exposición al PQ. De estas suposiciones se puede derivar un mecanismo de toxicidad del herbicida sobre la mitocondria de los juveniles de *C. macropomum*.



1: Matriz; 2: Membrana mitocondrial interna; 3: Espacio intermembrana; 4: Membrana mitocondrial externa; 5: Citosol; — Ruta activada; — Ruta inactivada.

CONCLUSIONES

Luego de haber evaluado el efecto de la concentración subletal de PQ sobre el pez dulceacuícola *C. macropomum* se plantearon las siguientes conclusiones:

- La actividad ATPasa mitocondrial muscular y hepática disminuyen de forma general ante la exposición al tóxico.
- La concentración de óxido nítrico muscular es inhibido por la exposición al herbicida
- El efecto tóxico del herbicida es producto del estrés oxidativo y no del estrés nitrosativo.
- La concentración de glutatión reducido hepático disminuye
- El PQ se acumula en el tejido hepático.
- Induce una proteína de 170.000 kDa que posiblemente es la gp-P.

RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten tomar en cuenta las siguientes consideraciones para futuras investigaciones en *C. macropomum* expuesta a PQ:

- Determinar los niveles de TBARS, NADPH y GSSG.
- Medir la actividad de la óxido nítrico sintetasa y glucosa-6-fosfato.
- Cuantificar los niveles sanguíneos del tóxico y de glucosa.
- Identificar la especificidad de la inducción de la expresión gp-P por inmunoblot.
- Cuantificar los niveles de expresión de la gp-P mediante el uso del densitómetro.
- Estudiar el efecto del herbicida en otros órganos como las branquias, riñón cerebro.

BIBLIOGRAFÍA

- Achard, M.; Baudrimont, A.; Boudou, A. & Bourdineaud, J. 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67: 347 – 357.
- Akerman G., Amcoff P., Tjärnlund U., Fogelberg K., Torrissen O. & Balk L. 2003. Paraquat and menadione exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Estudios of effects on the pentose-phosphate shunt and thiamine levels in liver and kidney. *REVISTA*142:269-283.
- Albertus, J. & Laine R. 2001. Enhanced xenobiotic transporter expresión in normal teleost hepatocytes: to enviromenal and chemotherapeutic toxins. *The J. Exp. Biology.* 204: 217-227.
- AOAC N° 969.09. 1968. Paraquat in pesticide formulations. Spectrophotometric method. *JAOAC.* 51:1304-1306.
- AOAC N° 973.31. 1973. Nitrites in cured meat. Colorimetric methods. *JAOAC.* 56:922.
- Bard, S.; Woodin, B. & Stegeman J. 2002. Expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpureus*) exposed to environmental contaminants. *Aquat. Toxicol.* 60:17-32.
- Barroso M., FedericoA., 1996. Parametros hematológicos e inmunológicos, en *Hypostomus watwata* con síndrome inflamatorio inducido por la exposición a xenobióticos. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Magister Scientarium en biología aplicada, mención ecofisiología. Universidad de Oriente. Núcleo Sucre. Escuela de ciencias. Postgrado en BiologíaAplicada.
- Berisha, H.; Hedayatollah, P.; Absood, A. & Said, S. 1994. Nitric oxide as a mediator of oxidant lung injury due to paraquat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*

91: 7445-7449.

- Beutler, E.; Duron, O. & Mikus, B. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61: 882-888.
- Black, A.; Gray, J.; Shakarjian, M. & Laskin, D. 2008. Increased oxidative stress and antioxidant expression in mouse keratinocytes following exposure to paraquat. *Toxicology. Applied Pharmacology*. 231: 384-392.
- Boetslerli, A. 2007. *Mechanistic Toxicology.: Cellular transport and selective accumulation of potentially toxic xenobiotics & Xenobiotic-induced oxidative stress: cell injury, signaling and gene regulation*. Segunda edición. CRS Press. Taylor & Francis group. 39-61p; 117-171p.
- Bradford, 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.
- Bus, J. & Gibson, J. 1984. Paraquat: Model for oxidant-initiated toxicity. *Environmental. Health Perspectives*. 55: 37-47.
- Castello, P.; Dreschel, D. & Patel, M. 2007. Mitochondria are mayor source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. *J. Biol. Chem.* 282(19):14186-14193.
- Chan, K.; Davies, P.; Childs, S.; Veniot, L. & Ling, V. 1992. P-glycoprotein genes in the flounder, *Pleuronectes americanus*: Isolation of two types of genomic clones carrying 3' terminal exon. *Biochim. Biophys. Acta*. 1171: 65-72.
- Cochemé, H. & Murphy, M. 2008. Complex is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J. Biol. Chem.* 283(4): 1786-1798.
- Cooper, P.; Vogeldein, W. & Van Veld, P. A. 1999. Altered expression of the xenobiotic transporter p-glycoproteins in liver tumours of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) from a creosote-contaminated environmental. *Biomarkers*. 4:48-58.
- Costantini, P., Petronilli V., Colonna R. & Bernardi P. 1995. On the effects of

- paraquat on isolated mitochondria. Evidence that paraquat causes opening of the ciclosporin A-sensitive permeability transition pore synergistically with nitric oxide. *Toxicology* 99(1-2):77-78.
- Day, B.; Patel, M.; Calavetta, L.; Chang, L. & Stamler, J. 1999. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Environmental PNAS*. 96 (22): 12760-12765.
- Dere, E.; & Polat, F. 2001. The effect of paraquat on the activity of some enzymes in different tissues of mice (*Mus musculus*- Swiss albino). *Turk J. Biol.* 25: 323-332.
- Dinis-Oliveira, R.; Remião, F.; Duarte, J.; Ferreira, R.; Sánchez Navarro, B. & Carvalho F. 2006. P-glycoprotein induction: an antidotal pathway for paraquat-induced lung toxicity. *Free Radical Biology & Medicine*. 41:1213-1224.
- Exttoxnet.1996. Paraquat. 12 de marzo 2004.
<http://www.exttoxnet.orst.edu/pips/paraquat.html>
- Ferté, J. 2000. Analysis of the tangled relation between P-glycoprotein mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur. J. Biochem.* 267: 277-294.
- Figueiredo- Fernandes, A.; Fontáinhas- Fernandes, A.; Peixoto, F.; Rocha, E. & Reis-Henriques, M.; 2006. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 85(2):97-103.
- Fiske, C. & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.* 66. (2): 375-400.
- Ghafourifar, P.; Schenk, U.; D. Klein, S. & Richter, C. 1999. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolate mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(44): 31185-31188.
- Goulding, M. & Carvalho M. 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomun* Characidae) an important Amazonian food fish. *Rev. Bras. Zool. S. Paulo*. 1(2):107-133.

- Hemmer, M.; Courtney, L. & Ortego, L. 1995. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in teleost tissues using mammalian polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Exp. Zool.* 272: 69-77.
- Hirai, K.; Ikeda K. & Wang Guo-Ying. 1992. Paraquat damage of rat liver mitochondria by superoxide production depends on extramitochondrial NADH. *Toxicol.* 72(1):1-16.
- Jing-Fen, H.; Shou-Lin, W.; Xiao-Yang, H.; Chun-Yong, L. & Jun-Yan, H. 2006. Effect of Genetic Variation on Human Cytochrome P450 Reductase-Mediated Paraquat Cytotoxicity. *Toxicol. Sciences* 91(1):42-48.
- Kowaltowski, A.; Castilho, R. & Vercesi, A. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters.* 495: 12-15.
- Kurelec, B. 1992. The resistance multixenobiotic mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 22: 23-43.
- Labrada, R., 1999. Manejo de maleza en bananos y plátanos. Informe sobre el Taller Regional del Manejo Integrado de Plagas en Banano y Plátano. El Vigía, Venezuela, pags. 61-64.
- Laine, R.; Laipis, P.; Shay, N. & Killberg, M. 1991. Identification of an amino acid-regulated mRNA from rat liver as the mammalian equivalent of bacterial ribosomal protein L22. *J. Biol. Chem.* 266: 16969-16972.
- Machado-Allinson, A. 1982. Estudio sobre la sistemática de la subfamilia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte I. Estudio comparado de los juveniles de las cachamas de Venezuela (genero: *Colossoma* y *Piaractus*). *Acta Biol. Ven.* 11(3):1-102.
- Mago-Leccia, F. 1970. Lista de peces de Venezuela. Incluyendo un estudio preliminar sobre la ictiogeografía del país. Min. Agricultura y Cría O. N. P. Caracas, Venezuela. 283p.
- Martínez, L.; Arias, G.; Sánchez, E. & Galar, C. Toxic effects of paraquat and lead on fish liver (*Oreochromis hornorum*). *European Journal of Pharrmacology.* 4(183):1534-1535.

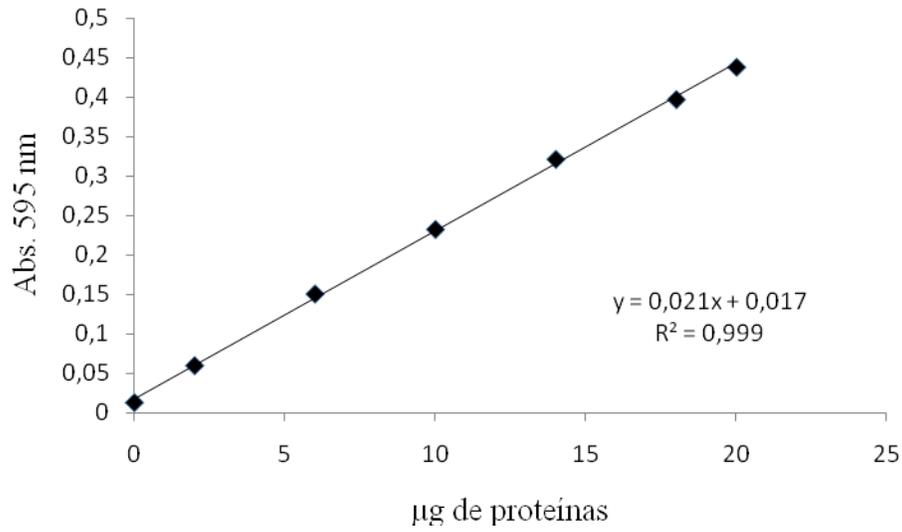
- Mata, Claunis. 2008. Efecto del herbicida paraquat y la temperatura sobre algunos órganos de *Colossoma maropomum* (Cuvier, 1818) Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciado en bioanálisis Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre.
- McNeill, B. & Perry, S. (2006). The interactive effects of hypoxia and nitric oxide on catecholamine secretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)** *Journal of Experimental Biology*.209, 4214-4223.
- Mohammadi-Bardbori, A. & Ghazi-Khansari, M. 2008. Alternative electron acceptors: Proposed mechanism of paraquat mitochondrial toxicity. *Enviromental Toxicology and Pharmacology*. 26: 1-5.
- Palmeira, C.; Moreno, A. & Madeira, V. 1995. Mitochondrial bioenergetics is affected by the herbicide paraquat. *Biochimica et Biophysica Acta*.1229:187-192.
- Parvez, S. & Raisuddin, S. 2006. Effects of paraquat on the freshwater fish *Canna punctata* (Bloch): Non-Enzymatic antioxidants as biomarkers of exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 50:392-397.
- Pedrajas, J.; Peinado, J. & López-Barea, J. 1995. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms de Cu, Zn-superoxide dismutase as potencial biomarkers. *Chemico-Biological Interactions*. 98(3):267-282.
- Peltier, W. & Weber, C. 1985. Methods for measuring the acute toxicity OE Effluent to fresh water and marine organism. *Envi. Moni. Translab. USA.*, 60: 484-638.
- Pinto, H. 1981. Evaluación del glifosato para el control de malezas en plátanos y cambures (*Musa spp.*). Primeras Jornadas Técnicas de la Sociedad Venezolana para el Combate de Malezas. Maracay, Venezuela, p. 17.
- Posecion, N; Ostrea, E. & Bieawski. 2008. Quantitative determination of paraquat in meconium by sodium borohydride-nickel chloride chemical reduction and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *J. Chromatogr. B. Analyt Technol Biomed Life Sci*. 862(1-2): 93-99.

- Prasad, K.; Winnik, B.; Thiruchelvam, M.; Buckley, B.; Mirochnitchenko, O & Richfield, E. 2007. Prolonged toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat in mouse brain. *Environmental Health Perspectives*. 115(10): 1448-1453.
- Procitropicos. Programa corporativo de investigación y transferencia de tecnología para los trópicos suramericanos. 1996. Propuesta de proyecto multinacional de investigación y desarrollo agropecuario. 13 de febrero 2004. <http://www.procitropicos.org.br/pdf/Granos.pdf>.
- Purisai, M.; McCormack, A.; Cumine, S.; Li, J; Isla, M. & Di Monte, D. 2007. Microglial activation as a priming event leading to paraquat induced dopaminergic cell degeneration. *Nuerol. Dis.* 25(2): 392-400.
- Rodríguez-Grau, J. & Escaplés, M. 1995. Manual de protocolos estándares para bioensayos de toxicidad de especies acuáticas. INTEVEP. 20 pp.
- Rojas, L; Suárez, S.; Lemus, M.; Benítez, K.; Ramírez, I.; Mitchell, M. y Boada-Sucre, A. Estrés oxidativo como posible causante de retinopatía en ratas en desarrollo sometidas a hiperoxia. *Interciencia*. 29(10): 556-561.
- Rubin, B.1999. Uso de herbicidas y cultivos transgénicos resistentes a los herbicidas.02 de marzo 2004. <http://www.fao.org/ag/AGp/agpp/IPM/Weeds/Download/Ecosp3a.PDF>.
- Sáenz, M.; Alberdi, J.; Di Marzio D.; Accorinti, J. & Tortorelli, M. 1997. Paraquat toxicity to different green algae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58: 992-928.
- Salazar-Lugo, R.; Estrella, A.; Oliveros, A.; Rojas-Villaruel, E.; Villalobos de B., L. & Lemus, M. 2009. Paraquat and temperatura affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*. *Environmental Toxicol. and Farmacol.* 27: 321-326.
- Salguero, M.; Martínez, M.; Soria; M.; García, S. & Repetto, G. 2005. Estudio histopatológico de las lesiones hepáticas inducidas por paraquat. *Cuad. Med. Forense*. 11(40):113-117.
- Sasaki, N.; Sato, T.; Ohler, A.; O'Rourke, B. & Marbán, E. 2000. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation*.

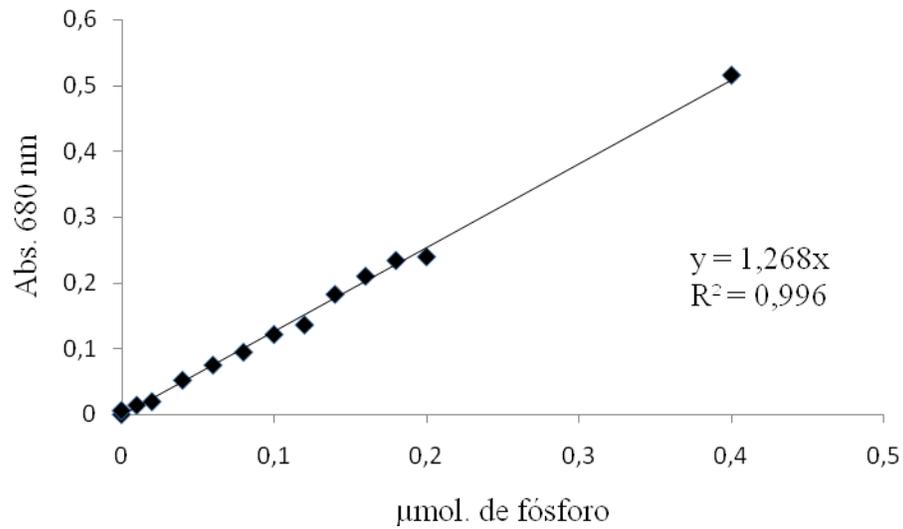
101:439-445.

- Saz, H. & Lascure, O. (1969). The functions of phosphoenol pyruvate carboxykinase and malic enzyme in the anaerobic formation of succinate by *Ascaris lumbricoides*.
- Simon, L.; Nemcsók, J. & Boross, L. 1983. Studies on the effect of paraquat on glycogen mobilization in liver of Common Carp (*Cyprinus Carpio L.*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1(75C): 167-169.
- Song S. B., Xu Y. and Zhou B. S. 2006. Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 65: 699-706.
- Stephensen, E.; Struve, J. & Förlin, L. 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp. Biochem. and Physiol.* 133C: 435-442.
- Stimal, T.; Sauerborn, R. & Hackenberger, B. 2003. Inducibility of the P-glicoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquat. Toxicol.* 65: 443 – 465.
- Strum, A.; Cravedi, J. & Segner H. 2001. Prochloraz and nonylphenol diethoxylate inhibit an mdr 1-like activity in vitro, but do not alter hepatic levels of P-glycoprotein in trout exposed in vivo. *Aquat. Toxicol.* 53: 215-2.
- Yoffe, B.; Eng, B.; Ben-Alon, D.; Baruchin, O. & Baruchin, A. 2007. Intra-arterial infusion of oxide nitric (NO). First animal trial. *Vascul. Pharmacol.* 47(1): 57-62.

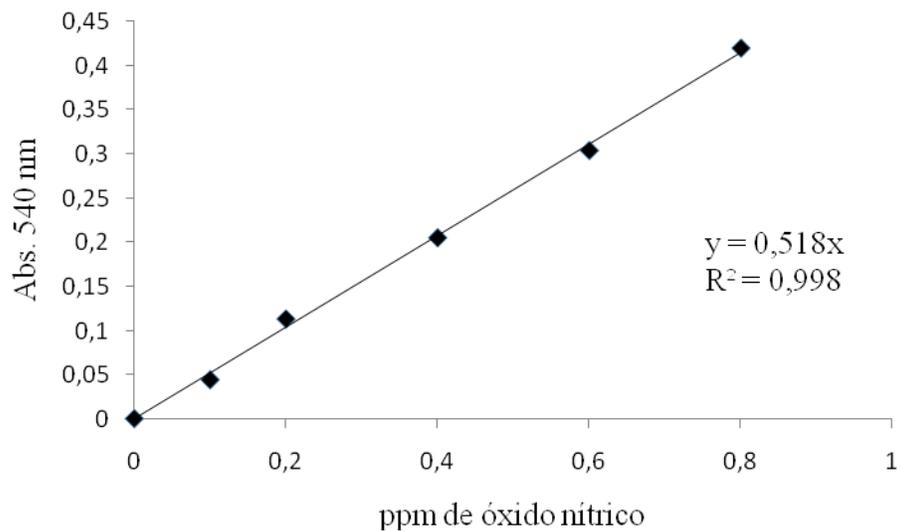
APÉNDICES



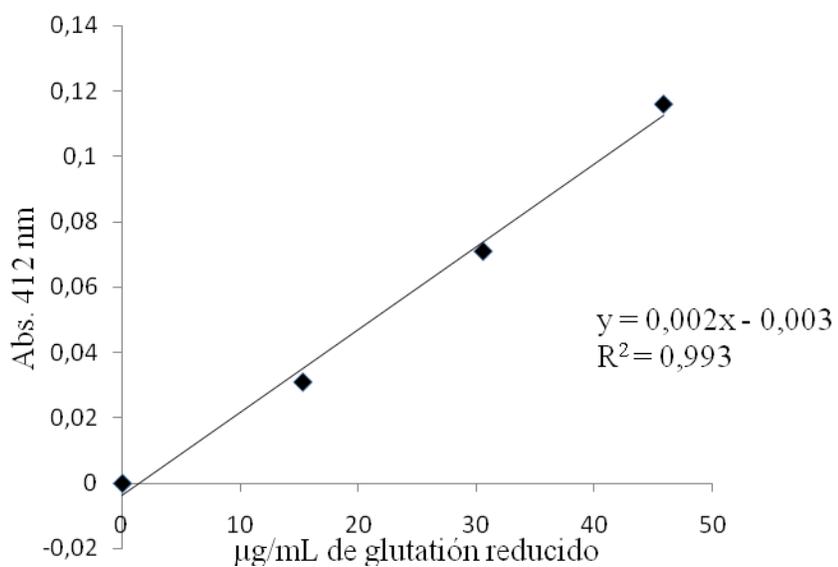
Apéndice 1. Curva de calibración para proteínas



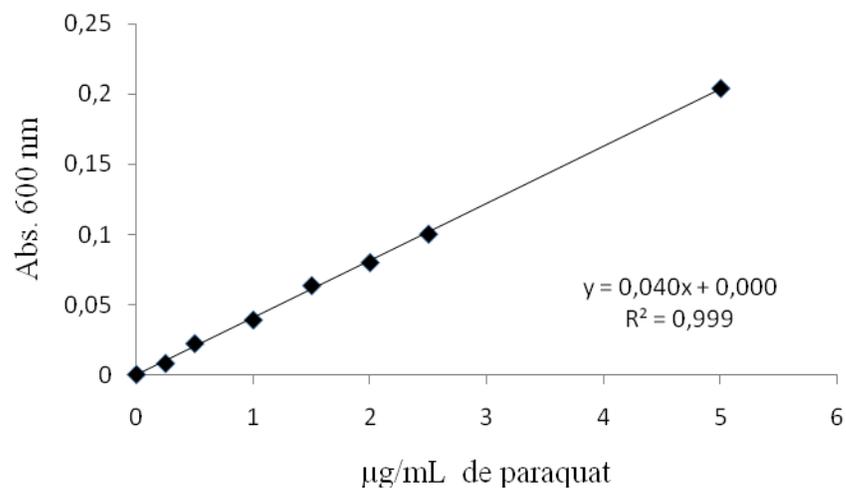
Apéndice 2. Curva de calibración para fósforo



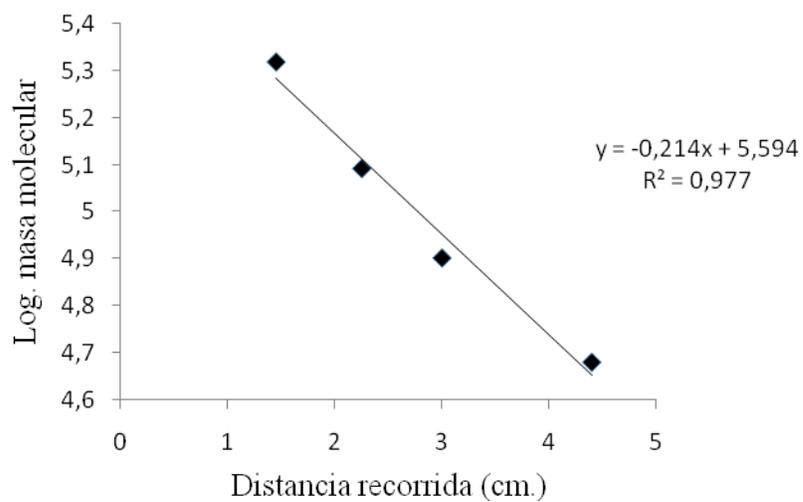
Apéndice 3. Curva de calibración para óxido nítrico



Apéndice 4.- Curva de calibración para glutatión reducido



Apéndice 5. Curva de calibración para paraquat



Apéndice 6. Curva de calibración para estimar la masa molecular de la gp-P

Apéndice 7. Resumen del análisis de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete días.

Tipo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	W
Exposición							
Expuesto	10	0,06917	0,06461	0,01303-0,18297	0,03774	6,5	50**
No expuesto	12	0,83403	1,28341	0,04000-4,15174	0,33955	15,6667	P=0,0011

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; W: Prueba de Mann Whitney; P: probabilidad; **: muy significativo P<0,01.

Apéndice 8. Resumen del análisis de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg L-1 PQ a 29°C durante catorce días.

Tipo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	W
Exposición							
Expuesto	10	0,38719	0,38008	0,03408-1,07626	0,25619	12,8	13ns
No expuesto	12	0,21811	0,25023	0,02374-0,72970	0,11296	10,4167	P=0,40981

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; W: Prueba de Mann Whitney; P: probabilidad; ns: no significativo P>0,05.

Apéndice 9. Resumen del análisis de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L-1 PQ a 29°C durante veintiún días.

Tipo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	W
Exposición							
Expuesto	10	0,44671	0,34613	0,03097-0,95816	0,35544	12,5	10ns
No expuesto	12	0,52637	0,77157	0,01027-2,59261	0,23439	10,6667	P=0,53104

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; W: Prueba de Mann Whitney; P: probabilidad; ns: no significativo P>0,05.

Apéndice 10. Resumen del análisis de Kruskal Wallis para la actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días

Tiempo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	K-W
7	10	0,06917	0,06461	0,01303-0,18297	0,03774	8,2	10,85677**
14	10	0,38719	0,38008	0,03408-1,07626	0,25619	17,7	P=0,0044
21	10	0,44671	0,34613	0,03097-0,95816	0,35544	20,6	

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; KW: Prueba de Kruskal Wallis; P: probabilidad; **: muy significativo P<0,01.

Apéndice 11. Resumen del análisis a posteriori de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días

Contraste Tiempo	W	Probabilidad	Orden	Grupos
7/14	30*	0,02575	7	X
7/21	43**	0,00135	14	X
14/21	8 ns	0,57075	21	X

W: Mann Whitey; *: diferencias significativas p<0,05; ** diferencias muy significativas p<0,01; ns: no significativo p>0,05.

Apéndice 12. Resumen del análisis de Kruskal Wallis para la actividad ATPasa mitocondrial muscular de *C. macropomum* no expuesta a 10 mg L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días.

Tiempo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	K-W
7	12	0,83403	1,28341	0,04000-4,15174	0,33955	22,58333	4,19369 ns
14	12	0,21811	0,25023	0,02374-0,72970	0,11296	13,83333	P=0,1228
21	12	0,52637	0,77157	0,01027-2,59261	0,23439	19,08333	

N: tamaño de la muestra; \bar{X} : promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; KW: Prueba de Kruskal Wallis; P: probabilidad; ns: no significativo P>0,05.

Apéndice 13. Resumen del análisis de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete días.

Tipo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	W
Exposición							
Expuesto	11	0,19123	0,21907	0,01359-0,5848	0,06352	8,90909	23ns
No expuesto	10	0,47949	0,50011	0,03748-1,40481	0,31173	13,3	P=0,11310

N: tamaño de la muestra; \bar{X} : promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; W: Prueba de Mann Whitney; P: probabilidad; ns: no significativo P>0,05.

Apéndice 14. Resumen del análisis de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante catorce días.

Tipo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	W
Exposición							
Expuesto	11	0,03566	0,0352	0,00880-0,11513	0,01494	6,0	60,5***
No expuesto	11	0,83957	0,44151	0,17901-1,50092	0,90918	17,0	P=0,00008

N: tamaño de la muestra; \bar{X} : promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; W: Prueba de Mann Whitney; P: probabilidad; ***: diferencias altamente significativas P<0,001.

Apéndice 15. Resumen del análisis de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante veintiún días.

Tipo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	W
Exposición							
Expuesto	11	0,04314	0,06547	0,00131-0,19481	0,00832	5,5	50***
No expuesto	10	0,8095	0,41611	0,20126-1,43728	0,81973	15,5	P=0,00018

N: tamaño de la muestra; \bar{X} : promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; W: Prueba de Mann Whitney; P: probabilidad; ***: diferencias altamente significativas P<0,001.

Apéndice 16. Resumen del análisis de Kruskal Wallis para la actividad ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum*, expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días.

Tiempo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	K-W
7	11	0,19123	0,21907	0,01359-0,5848	0,06352	22,73	8,20134*
14	11	0,03566	0,0352	0,00880-0,11513	0,01494	15	P=0,0166
21	11	0,04314	0,06547	0,00131-0,19481	0,00831	11,3	

N: tamaño de la muestra; \bar{X} : promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; KW: Prueba de Kruskal Wallis; P: probabilidad; *: diferencias significativas P<0,05.

Apéndice 17. Resumen del análisis a posteriori de Mann Whitney para la actividad ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum* expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días

Contraste Tiempo	W	Probabilidad	Orden	Grupos
7/14	35,5*	0,02155	21	X
7/21	-33*	0,02210	14	X
14/21	-19ns	0,19267	7	X

W: Mann Whitey; *: diferencias significativas p<0,05; ns: no significativo p>0,05.

Apéndice 18. Resumen del análisis de Kruskal Wallis para la actividad ATPasa mitocondrial hepática de *C. macropomum*, no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días.

Tiempo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	K-W
7	10	0,47949	0,50011	0,03748-1,4048	0,31173	10,7	5,05755 ns
14	11	0,83957	0,44158	0,17901-1,50092	0,90918	18,909	P=0,07975
21	10	0,8095	0,4161	0,20126-1,43728	0,81973	18,1	

N: tamaño de la muestra; \bar{X} : promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; KW: Prueba de Kruskal Wallis; P: probabilidad; ns: no hay diferencias significativas P>0,05.

Apéndice 19. Resumen del análisis de Mann Whitney para la concentración de óxido nítrico muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L-1 PQ a 29°C durante siete días.

Tipo	N	\bar{x}	S	Ámbito	Mediana	R.P	W
Exposición							
Expuesto	12	0,0004	0,00019	0,00007-0,00081	0,00036	15,5417	36,5*
No expuesto	12	0,00024	0,00013	0,00007 - 0,00045	0,00023	9,45833	P=0,03758

N: tamaño de la muestra; \bar{x} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; W: Prueba de Mann Whitney; P: probabilidad; *: diferencias significativas P<0,05.

Apéndice 20. Resumen del análisis de Mann Whitney para la concentración de óxido nítrico muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L-1 PQ a 29°C durante catorce días.

Tipo	N	\bar{x}	S	Ámbito	Mediana	R.P	W
Exposición							
Expuesto	12	0,00031	0,00018	0,00006-0,00060	0,00039	12,9583	-5,5ns
No expuesto	12	0,00028	0,00016	0,00005 - 0,00056	0,00026	12,0417	P=0,77278

N: tamaño de la muestra; \bar{x} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; W: Prueba de Mann Whitney; P: probabilidad; ns: no existen diferencias significativas P>0,05.

Apéndice 21. Resumen del análisis de Mann Whitney para la concentración de óxido nítrico muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante veintiún días.

Tipo	N	\bar{x}	S	Ámbito	Mediana	R.P	W
Exposición							
Expuesto	11	0,00027	0,00022	0,00002-0,00076	0,00021	7,86364	45,5**
No expuesto	12	0,00052	0,00019	0,00024 - 0,0009	0,00049	15,7917	P=0,00559

N: tamaño de la muestra; \bar{x} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; W: Prueba de Mann Whitney; P: probabilidad; **: diferencias muy significativas P<0,01.

Apéndice 22. Resumen del análisis de Kruskal Wallis para la concentración de óxido nítrico muscular de *C. macropomum*, expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días.

Tiempo	N	\bar{x}	S	Ámbito	Mediana	R. promedio	K-W
7	12	0,0004	0,00016	0,00007-0,00081	0,00036	20,9583	2,0919ns
14	12	0,00031	0,00018	0,00006-0,00060	0,00039	18	P=0,3514
21	11	0,00027	0,00022	0,00002-0,00076	0,00021	14,7727	

N: tamaño de la muestra; \bar{x} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; KW: Prueba de Kruskal Wallis; P: probabilidad; ns: no hay diferencias significativas P>0,05.

Apéndice 23. Resumen del análisis de Kruskal Wallis para concentración de óxido nítrico muscular de *C. macropomum*, no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días.

Tiempo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R. promedio	K-W
7	12	0,00024	0,00013	0,00007 - 0,00045	0,00023	12,625	14,4511***
14	12	0,00028	0,00016	0,00005- 0,00056	0,00026	15,0417	P=0,0007
21	12	0,00052	0,00019	0,00024 - 0,0009	0,00049	27,8333	

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; KW: Prueba de Kruskal Wallis; P: probabilidad; ***: hay diferencias altamente significativa P<0,001.

Apéndice 24. Resumen del análisis a posteriori de Mann Whitney para la concentración de óxido nítrico muscular de *C. macropomum* no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete, catorce y veintiún días.

Tiempo de exposición	W	Probabilidad	Orden	Grupos
7/14	9,5ns	0,60317	7	X
7/21	61***	0,00048	14	X
14/21	51**	0,00353	21	X

W: Mann Whitney. ***: existen diferencias altamente significativas p<0,001 ;** existen diferencias muy significativas p<0,01

Apéndice 25. Resumen del análisis de t-Student para la concentración de GSH reducido hepático de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete días.

Tipo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	Student
Exposición						
Expuesto	5	2,27217	0,42978	1,53675-2,59171	2,43378	4,76062**
No expuesto	6	1,283	0,25333	1,096-1,728	1,169	P=0,00103

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; P: probabilidad; **: diferencias muy significativas P<0,01.

Apéndice 26. Resumen del análisis de t-Student para la concentración de GSH reducido hepático de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante catorce días.

Tipo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	Student
Exposición						
Expuesto	6	0,69168	0,38832	0,21714-1,3139	0,61676	-4,8227***
No expuesto	5	1,8731	0,42397	1,31263-2,46697	1,80013	P=0,00094

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; P: probabilidad; ***: diferencias altamente significativas P<0,001.

Apéndice 27. Resumen del análisis de t-Student para la concentración de GSH reducido

hepático de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L-1 PQ a 29°C durante veintún días.

Tipo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	Student
Exposición						
Expuesto	6	2,38156	0,35002	1,80714-2,76804	2,45881	3,09356 *
No expuesto	6	1,58853	0,52132	0,641071-2,14855	1,71913	P=0,01137

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; P: probabilidad; *: diferencias significativas P<0,01.

Apéndice 28. Resumen del análisis de varianza y prueba a posteriori (Duncan) para la concentración de GSH reducido hepático de *C. macropomum* expuesta a 10 mg.L-1 PQ a 29°C durante siete, catorce y veintún días.

Tiempo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	Anova	Orden	Duncan
7	5	2,27217	0,429776	1,53675-2,59171	2,43378	F=34,83***	14	X
14	6	0,69168	0,388322	0,217136-1,3139	0,616759	P=0,0000	7	X
21	6	2,38156	0,350022	1,80714-2,76804	2,45881		21	X

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; F: valor de Fisher; P: probabilidad; ***: diferencias altamente significativas P<0,001.

Apéndice 29. Resumen del análisis de varianza para la concentración de GSH reducido hepático de *C. macropomum* no expuesta a 10 mg.L-1 PQ a 29°C durante siete, catorce y veintún días.

Tiempo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	Anova
7	6	1,283	0,25333	1,096-1,728	1,169	F=2,79ns
14	5	1,8731	0,42397	1,31263-2,46697	1,80013	
21	6	1,58853	0,52132	0,64107-2,14855	1,71913	P=0,0957

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; F: valor de Fisher; P: probabilidad; ns: diferencias no significativas P>0,05.

Apéndice 30. Resumen del análisis de Mann Whitney para GSH reducido muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete días.

Tipo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	Mann-Whitney
Exposición							
Expuesto	6	0,29171	0,06617	0,20389-0,39115	0,29854	4,91667	9,5ns
No expuesto	6	0,47441	0,23260	0,09698-0,19023	0,16313	8,08333	P=0,14883

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; P: probabilidad; ns: diferencias no significativas P>0,05.

Apéndice 31. Resumen del análisis de Mann Whitney para GSH reducido muscular de *C. macropomum* expuesta y no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante catorce días.

Tipo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	Mann-Whitney
Exposición							
Expuesto	2	0,11868	0,11437	0,03781-0,19956	0,11868	4	0,0ns
No expuesto	5	0,15504	0,03793	0,09698-0,19023	0,16313	4	P=0,84645

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; P: probabilidad; ns: diferencias no significativas P>0,05.

Apéndice 32. Resumen del análisis de Mann Whitney para GSH reducido muscular de *C. macropomum* expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete y catorce días.

Tiempo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	Mann-Whitney
7	6	0,29171	0,06617	0,20389-0,39115	0,29854	5,5	-6,0 ns
14	2	0,11868	0,11437	0,03781-0,19956	0,11868	1,5	P = 0,06675

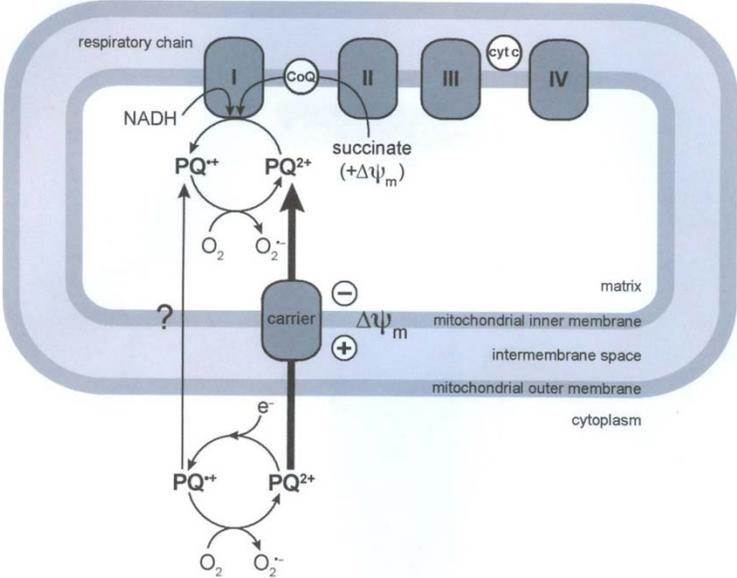
N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; P: probabilidad; ns: no hay diferencias significativas P>0,05.

Apéndice 33. Resumen del análisis de Mann Whitney para GSH reducido muscular de *C. macropomum* no expuesta a 10 mg.L⁻¹ PQ a 29°C durante siete y catorce días.

Tiempo	N	\bar{X}	S	Ámbito	Mediana	R.P	MannWhitney
7	6	0,47441	0,23260	0,23507-0,80166	0,41188	8,5	W=-15**
14	5	0,15504	0,03793	0,09698-0,19023	0,16313	3	P=0,0081

N: tamaño de la muestra; \bar{X} =promedio; S: desviación estándar; RP: rango promedio; P: probabilidad; **: hay diferencias muy significativas P<0,01.

Apéndice 34. Modelo explicativo de las reacciones redox del PQ en la mitocondria.



Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	ATPASA MITOCONDRIAL, ÓXIDO NÍTRICO, Y GLICOPROTEÍNA-P COMO BIOMARCADORES ANTE LA EXPOSICIÓN AL PARAQUAT EN <i>COLOSSOMA MACROPOMUM</i> (CUVIER, 1818)
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Oliveros G., Aridays E	CVLAC	11142711
	e-mail	aridayses@yahoo.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

ATPasa
Óxido Nítrico
Glicoproteína-P
<i>Colossoma</i>
Glutación

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	BIOLOGÍA
	ECOTOXICOLOGÍA
	BIOQUÍMICA

Resumen (abstract):

Con el propósito de evaluar el efecto de la concentración subletal del herbicida Paraquat (PQ) sobre la actividad ATPasa mitocondrial (AATPM), la concentración de óxido nítrico (ON), glutatión reducido (GSH) y la expresión de la glicoproteína-P (gp-P) en el tejido hepático y muscular del pez *C. macropomum*; se procedió a determinar el LC₅₀ a 96 h de PQ en la especie, usando el método binomial y el método logit, a partir de este valor, se estableció la concentración subletal de 10 mg.L⁻¹ PQ a la cual fueron expuestos 54 peces juveniles, con sus respectivos controles, a una temperatura promedio de 29°C ± 0,86 °C durante 7, 14, y 21 días. Finalizado el bioensayo se extrajo el tejido hepático y muscular de los peces estudiados. Se procedió a obtener las partículas submitocondriales (PSM) del tejido; mediante ciclos de sonicación y centrifugación para determinar, en estas, la AATPM hepática y muscular mediante la cuantificación del fósforo inorgánico liberado por la acción enzimática de la ATPasa mitocondrial. Se determinó la concentración de óxido nítrico (ON) presente en el tejido muscular por el método de Griess, la concentración de glutatión reducido (GSH) hepático y muscular mediante la técnica Beutler et al. (1963). Se obtuvo, la fracción de membrana que contiene a la gp-P, del tejido hepático, mediante ciclos de ultracentrifugaciones y fue resuelta por SDS-PAGE. El valor del LC₅₀ a 96 horas obtenido fue de 40mg.L⁻¹ y 48,05 mg.L⁻¹. La AATPM muscular de los peces expuestos a 10 mg.L⁻¹ PQ disminuyó a los siete días de exposición, recuperándose durante el tiempo de exposición. Sin embargo, la AATPM hepática, en los peces expuestos, disminuyó a partir del día catorce. La concentración de ON muscular, en los peces expuestos disminuyó. Los valores de la concentración de GSH hepático disminuyeron en los peces expuestos durante catorce días. La exposición al PQ induce la expresión de una proteína de masa molecular aparente de 170 kDa correspondiéndose con la masa molecular de la gp-P. Estos resultados indican que la exposición de *C. macropomum* a 10 mgL⁻¹ PQ inhibe la AATPM, debido a la posible interacción del tóxico con la cadena transportadora de electrones aumentando la producción de radicales superóxidos y la peroxidación lipídica, hecho que posiblemente este afectando el potencial de la membrana mitocondrial y la fosforilación oxidativa, siendo más evidente en el tejido hepático. Además, el herbicida inhibe la producción de ON muscular demostrando que el mayor efecto tóxico del PQ es producto del estrés oxidativo y no del nitrosativo. La disminución de la concentración del GSH en el tejido hepático sugiere la incapacidad de los peces expuestos para regenerarlo debido al agotamiento de su sistema redox. Por último induce la expresión de la gp-P, un mecanismo detoxificador, que le permite presentar ciertos niveles de resistencia ante el efecto tóxico del herbicida. Por lo que se concluye que el PQ parece inducir en *C. macropomum* cambios bioquímicos que alteran su sistema redox; sin embargo, la especie logra resistir estos efectos debido a la expresión de mecanismos detoxificadores, como la gp-P y probablemente a la disminución en la producción de energía, pudiendo ser la especie un potencial bioindicador de la contaminación acuática por el herbicida.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Salazar L., Raquel	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input checked="" type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	raquelugove@yahoo.com
	e-mail	
Lemus, Mairin	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	mlemus@sucre.udo.edu.ve
	e-mail	
Rojas V., Evelin	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	evelinro@yahoo.com
	e-mail	
Nusetti, Osmar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	onusetti@yahoo.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2009	04	17

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
PG-aridaysoliveros.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial : Universal (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA APLICADA

Nivel Asociado con el Trabajo: MAESTRIA

Área de Estudio:

BIOLOGÍA APLICADA: ECOTOXICOLOGÍA

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE-NÚCLEO DE SUCRE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Se garantiza a la Universidad de Oriente Núcleo de Sucre, el derecho de archivar y difundir sólo el título y resumen de esta tesis; dicha difusión será con fines estrictamente científicos y educativos citando adecuadamente al autor.



Lcda. Aridays E. Oliveros G.



Dra. Raquel Salazar



Dra. Mairin Lemus



Dr. Osmar Nusetti

Coordinación de Postgrado



Coordinación de Postgrado
BIOLOGIA APPLICADA