

**Validación de porfirinas hepáticas como biomarcador molecular de exposición subcrónica a una formulación de glifosato en *Jenynsia multidentata* (Cyprinodontiformes; Anablepidae)**



**Tesina de Grado  
Licenciatura en Bioquímica  
Ecología y Rehabilitación de Sistemas Acuáticos  
Departamento de Ecología Teórica y Aplicada  
Centro Universitario Regional Este-Facultad de Ciencias  
Universidad de la República  
2015**

Autora: Valentina Ocampo  
Orientador: Dr. Franco Teixeira de Mello  
Co-orientador: MSc. Guillermo Goyenola

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo extender mis agradecimientos a:

Mis tutores: Franco y Guillermo, por su disposición, intercambio constante y sus invaluable aportes que enriquecieron este trabajo.

Al equipo de Fisicoquímica Biológica por su especial apoyo en las tareas de laboratorio: Ana Denicola, Matías Möller y Leonardo Santos.

A todos los integrantes del grupo de investigación Ecología y Rehabilitación de Ecosistemas Acuáticos que brindaron su apoyo en diferentes etapas de este proceso.

Al programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil que hizo posible la financiación de este proyecto.

A mis padres por su apoyo constante e incondicional

A mi hermana Florencia por su valioso aporte en este proyecto.

Además a todas las personas que de una forma u otra hicieron presente su apoyo y me alentaron en el desarrollo y culminación de esta etapa.

	Página
ÍNDICE	01
Resumen	02
1. Introducción	03
1.1 El enfoque ecotoxicológico	05
1.2 Porfirinas hepáticas de peces como biomarcadores	06
1.3 Enfoque experimental	07
2. Objetivo general	08
2.1 Objetivos específicos	09
3. Hipótesis y predicciones	09
3.1 Hipótesis general	09
3.2 Hipótesis de trabajo	09
3.3 Predicción	09
4. Materiales y métodos	09
5. Resultados	13
6. Discusión	19
7. Conclusiones	21
8. Perspectivas	21
9. Referencias	22
10. Anexo	28

## Resumen

El glifosato ha pasado a ser el plaguicida más utilizado en la actualidad tanto a nivel global como nacional. Se trata de un herbicida de tipo no selectivo, de post-emergencia y de amplio espectro, incluyendo surfactantes en sus formulaciones comerciales. Por escorrentía superficial u otros mecanismos, puede ser movilizado y transportado hasta los cursos de agua, pasando a formar parte del pool de contaminantes en dichos sistemas. Resulta de particular interés generar conocimiento del efecto del glifosato sobre organismos que pueden ser usados como centinelas. Los peces son indicadores sensibles de la salud de los ecosistemas acuáticos y de los usos del suelo de la cuenca, reflejando el significado ecológico de la degradación ambiental. El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso del perfil porfirínico hepático de *Jenynsia multidentata* (Cyprinodontiformes, Anablepidae), como biomarcador de exposición a una formulación comercial de glifosato. Hembras de una única cohorte fueron capturadas en un sistema léntico sin influencia de uso de glifosato y aclimatadas en cautiverio por una semana. Una vez transcurrido el período de aclimatación, fueron colocados en 5 tratamientos con diferentes concentraciones de la formulación: desde 0,0 (control), hasta 10,8 mg L<sup>-1</sup> del principio activo, cada uno con 5 réplicas. El experimento se corrió durante 7 días en condiciones controladas. Al finalizar, los ejemplares fueron sometidos a eutanasia por sobredosis de anestésico y disectados. Se determinaron copro, proto y uroporfina hepáticas por fluorimetría, y proteínas totales por espectrofotometría utilizando el método de Bradford. El haber logrado poner a punto el método, permite aplicar el análisis de porfirinas a otros modelos biológicos y xenobióticos, lo que permitirá darle continuidad a la línea de investigación.

## 1. Introducción

El Uruguay se encuentra frente a una fuerte intensificación en el uso del suelo con predominancia del modelo sojero, el que habría alcanzado en 2014 una extensión record de casi 1,32 millones de hectáreas sembradas (DIEA 2014). Las características del paquete tecnológico asociado derivan de la utilización de una variedad transgénica denominada soya RR (Roundup Ready) o evento 40-3-2, que presenta resistencia al herbicida glifosato y se asocia a la utilización intensiva de otros fitosanitarios (como insecticidas, fungicidas, etc.; Ríos, Zaldúa et al. 2010). Como consecuencia de la aplicación de este modelo productivo, el glifosato ha pasado a ser el plaguicida más utilizado en la actualidad (Guyton, Loomis et al. 2015). En Uruguay se aplicaron 6,8 millones de litros en 2010 (Narbondó and Oyhançabal 2011) y volúmenes mayores con posterioridad (DIEA 2014).

El glifosato (N-fosfometilglicina) es un herbicida de tipo no selectivo, de post-emergencia y de amplio espectro. Actúa inhibiendo la enzima 3-enolpiruvil-siquimato-5-fosfato sintetasa (EPSPS), localizada en el cloroplasto, perteneciente a la ruta del ácido siquímico (Della-Cioppa, Bauer et al. 1986). La inhibición de la enzima EPSPS impide la síntesis del ácido corísmico, el cual se requiere para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano). Estos aminoácidos esenciales son utilizados para la síntesis de proteínas y de algunos productos secundarios como son: promotores e inhibidores del crecimiento, compuestos fenólicos y lignina (Franz, Mao et al. 1997).

Las diferentes marcas comerciales están compuestas por el principio activo, bajo diferentes formulaciones como sal isopropilamina, sales de potasio o de amonio, siendo la primer opción más frecuente en el mercado (Martino 1995, SATA 2009). Las formulaciones cuentan además con surfactantes como coadyuvantes, que proporcionan al herbicida mayor capacidad de cubrimiento, penetración, traslocación, solubilidad, adherencia y estabilidad, reduciendo las dosis necesarias de herbicidas (Fuentes de Pedrahíta and de Román 1980). En particular las formulaciones de Glifosato líquidas como sal

isopropilamina de glifosato, contienen una mezcla de surfactantes no iónicos de tipo alquilpoliglucósidos y amina grasa etoxilada, siendo el vehículo agua (Laborde, com. pers.).

Especialmente para organismos acuáticos existen evidencias de que los productos formulados que contienen el principio activo junto con surfactantes son más tóxicos que aquellos conteniendo sólo el principio activo (de Amarante Junior, Dos Santos et al. 2002). Adicionalmente, varias investigaciones sugieren que los efectos tóxicos vinculados a las formulaciones comerciales de glifosato derivan mayormente de sus surfactantes (Burger and Fernandez 2004, Brausch, Beall et al. 2007).

Una vez aplicado el glifosato, éste es fuertemente adsorbido por los componentes del suelo, tales como arcillas (Miles and Moye 1988), óxidos de hierro y aluminio (Piccolo, Celano et al. 1994, Prata, Cardinali et al. 2003) y ácidos húmicos (Piccolo, Celano et al. 1996). Además sufre una importante degradación, principalmente de tipo biológico, siendo su producto mayoritario el ácido aminometilfosfónico (AMPA; Lorenzatti, Lenardon et al. 2007). A pesar de que dicho herbicida presenta una vida media relativamente baja en comparación con otros agroquímicos, existe evidencia de presencia en suelo de glifosato y su producto de degradación AMPA, entre 190 y 249 días luego de su aplicación (Penaloza-Vaquez, Mena et al. 1995). Adicionalmente debe considerarse que el AMPA presenta una vida media mayor en el suelo que la correspondiente al glifosato, habiéndose reportado registros en un rango entre 119 y 958 días (EPA 1993a).

Por escorrentía superficial u otros mecanismos, los fitosanitarios presentes en los suelos pueden ser movilizados y transportados hasta los cursos de agua (Brady and Weil 1996), pasando a formar parte del pool de contaminantes en dichos sistemas. Esto último resulta un efecto colateral, no inherente al objetivo de la aplicación. El tiempo de degradación del glifosato en los ecosistemas acuáticos es muy variable dependiendo del ambiente estudiado (Cheng, Chiang et al. 1989, Goldsbororough and Beck 1989, Pérez, Torremorell et al. 2007, Crowe, Leclerc et al. 2011, Coupe, S. J. Kalkoff et al.

2012) y de la composición de cada formulación, que en muchos casos es desconocida (Tsui and Chu 2003, Puglis and Boone 2011).

En el ambiente acuático el glifosato puede causar cambios en el metabolismo así como en diferentes perfiles enzimáticos de los peces, como es la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), aumento de peroxidación de lípidos y catabolismo de proteínas, siendo estos dos últimos indicadores de estrés oxidativo (Gluszczak, Dos Santos et al. 2007). Existe además evidencia de carcinogenicidad inducida por glifosato tanto en humanos como en animales (Guyton, Loomis et al. 2015). Sin embargo, la información sobre los efectos ecosistémicos de los plaguicidas es escasa y de pobre circulación pública, lo que fomenta el desconocimiento y magnifica los riesgos (Ríos, Zaldúa et al. 2010).

## **1.1 El enfoque ecotoxicológico**

La Ecotoxicología utiliza estrategias que abarcan todo el espectro de organización biológica, para evaluar las respuestas al estrés químico haciendo foco en el análisis a nivel poblacional, comunitario y ecosistémico (Truhaut 1969). Debe entenderse por estrés cualquier condición que pueda alterar el estado normal u homeostasis (Newman 2013). Para estas evaluaciones es que la Ecotoxicología se nutre del desarrollo y análisis de herramientas denominadas bioindicadores y biomarcadores.

Desde los años 60 se ha producido un amplio desarrollo y aplicación de bioindicadores (Holt and Miller 2011). Así son llamados las especies biológicas o grupo de especies cuya función, población o estatus puede ser utilizado para determinar la integridad de los ecosistemas o del medio ambiente (Martí 2007, Holt and Miller 2011). No todos los procesos biológicos, poblaciones o comunidades pueden ser utilizados como bioindicadores, los mismos deben presentar una tolerancia moderada a la variabilidad ambiental en comparación con las especies raras (demasiado sensibles o difíciles de encontrar) o ubicuas (generalmente con amplio rango de tolerancia; Holt and Miller 2011). La capacidad de respuesta de los bioindicadores cambia

de acuerdo a varios factores, por ejemplo las características genéticas de los organismos, su estado de desarrollo, y de las propias condiciones ambientales, mientras los estímulos pueden ser muy variados y no en todos los casos son aditivos, sino que puede haber efectos sinérgicos (Martí 2007).

Por otra parte un biomarcador es una respuesta biológica a nivel de individuo o inferior que demuestra una desviación del estado normal en función del estrés (Peakall and Walker 1994). En este sentido, los biomarcadores son mediciones de las características del individuo que indican la exposición de una población a un peligro, como ser por ejemplo una sustancia tóxica (FAO 2003). Los biomarcadores analizados en el ambiente nos permiten evaluar el efecto de diferentes contaminantes con relevancia biológica, a su vez integran los efectos de múltiples estresores (contaminantes), permitiendo detectar sinergias entre los mismos, en caso de que estas existan. Sin embargo, cuando se realizan estudios en condiciones controladas nos permiten evaluar los efectos de un contaminante aislado, en algunos casos elucidar mecanismos de acción y efectos a diferentes concentraciones y escalas temporales. Poder aumentar el número de réplicas que se pueden examinar, y trabajar con dosis subletales conocidas son importantes ventajas de la experimentación en laboratorio. Además, los ensayos tienen el potencial de predecir un efecto ecológicamente relevante (e.g. mortalidad e impedimento reproductivo) antes que los efectos se manifiesten a niveles de organización jerárquica superiores. De esta manera pueden ser utilizados para determinar la susceptibilidad de diferentes poblaciones o bien para evaluar la respuesta diferenciada en distintos subgrupos de población (FAO 2003).

## **1.2 Porfirinas hepáticas de peces como biomarcadores**

Las porfirinas son intermediarios metabólicos en la formación del grupo hemo (protoporfirinas) y co-productos oxidativos de los metabolitos intermediarios (coproporfirinas y uroporfirinas). Están formadas por cuatro anillos pirrol unidos por puentes meteno, formando una estructura anular de gran tamaño (anillo tetrapirrólico). Son producidas en tejidos eritropoyéticos e hígado y excretadas por vía urinaria o fecas (Lim 1991).



Presentan ventajas frente a otros biomarcadores como su fácil detección en materiales biológicos (sangre, hígado, fecas y riñón), debido a sus características fluorescentes, la existencia de correlación entre la clase de contaminante y la inducción de un tipo específico de porfirina (Marks 1985) y por ser su determinación un método de bajo costo (De Matteis and Lim 1994).

En estudios previos realizados en vertebrados se determinó la relación entre la exposición a determinados compuestos y su efecto en el perfil de porfirinas. Así compuestos aromáticos polialogenados como PCBs y dioxinas conducen a la acumulación de uroporfirina (Miranda, Henderson et al. 1992, Van Birgelen, De Vito et al. 1996); la contaminación por herbicidas de difenil éter, oxadiazoles e imidas cíclicas promueve la acumulación de protoporfirina (Duke, Lydon et al. 1991, Jacobs and Jacobs 1993); heptaclor, lindano, arsénico y mercurio, resultan en la acumulación de coproporfirina (Taira and San Martín de Viale 1980, Martinez, Cebrian et al. 1983, Woods and Southern 1989, Woods, Boers et al. 1991, Bowers, Aicher et al. 1992, Ng, Qi et al. 2002); mientras que el plomo promueve la acumulación de protoporfirina y coproporfirina (Hichiba and Tomokuni 1987, O Halloran and Duggan 1988, Pain 1989, De Matteis and Lim 1994). En Uruguay un estudio realizado en el pez *Astyanax fasciatus* (Characiformes) en condiciones de campo, mostró una respuesta diferencial de las porfirinas hepáticas en localidades con diferentes usos del suelo, donde los peces probablemente estuviesen expuestos a diferentes contaminantes (Carrasco-Letelier, Eguren et al. 2006).

### **1.3 Enfoque experimental**

Los peces son indicadores sensibles de la salud de los ecosistemas acuáticos y de los usos del suelo de la cuenca, reflejando el significado ecológico de la degradación ambiental (Karr 1981, Fausch, Lyons et al. 1990, Karr 1991, Hued and Bistoni 2005, Park, Grenouillet et al. 2006). Este hecho es la base de la utilización de los peces en programas de monitoreo de calidad ambiental de los sistemas acuáticos. Considerando el amplio uso del

glifosato en nuestro país, resulta de particular interés generar conocimiento del efecto del glifosato sobre peces autóctonos que pueda ser utilizado en programas de biomonitoreo. Para ello es vital generar información que relacione la respuesta de un biomarcador, en este caso porfirinas hepáticas, con características de la exposición (e.g. concentraciones y tiempo). En este marco, en el presente trabajo se realizaron bioensayos de exposición subcrónica (Patiño 2008).

Para la realización de los bioensayos se seleccionó *J. multidentata* (Jenyns 1842) (Cyprinodontiformes; Anablepidae) en función de que resulta una especie con características favorables para ser utilizada en biomonitoreo. Se encuentra ampliamente distribuida en la región subtropical de América del Sur, es omnívora, de pequeño tamaño, con dimorfismo sexual, rápido crecimiento, presenta un hígado relativamente grande (favorable para la medición de porfirinas hepáticas) y fácil reproducción en cautiverio (Goyenola, Iglesias et al. 2011) (lo que facilitaría su cría en laboratorio). Por otra parte, ha sido previamente utilizada en diferentes bioensayos de exposición a xenobióticos (Cazenave, Wunderlin et al. 2005, Alvarez, Gimenez et al. 2012) lo que facilitaría la obtención y comparación de información.

En los estudios previos, *J. multidentata* ha mostrado una sensibilidad moderada a la exposición a glifosato (formulación Roundup), registrándose un valor de LC<sub>50</sub> 96-h (concentración a la cual se espera observar letalidad en el 50% de los individuos tras 96 hrs de exposición) de 19,02 mg L<sup>-1</sup> para ambos sexos (Hued, Oberhofer et al. 2011). Así mismo, se han observado daños a nivel histológico en órganos como branquias e hígado y alteración de la actividad sexual masculina (Hued, Oberhofer et al. 2011).

## **2. Objetivo General**

Validar las porfirinas hepáticas como biomarcador molecular de exposición subcrónica a una formulación comercial de glifosato en *J. multidentata* (Cyprinodontiformes; Anablepidae).

## **2.1 Objetivos específicos:**

1. Poner a punto la técnica de bioensayos y de determinación de porfirinas hepáticas por método fluorimétrico.
2. Evaluar los efectos de la exposición subcrónica a una formulación comercial de glifosato sobre el perfil de porfirinas hepáticas de *J. multidentata* y su potencial uso como herramienta de monitoreo ambiental.

## **3. Hipótesis y predicciones:**

**3.1 Hipótesis general:** el metabolismo porfirínico hepático de *J. multidentata* es modificado por la exposición subcrónica a formulaciones comerciales de glifosato.

**3.2 Hipótesis de trabajo:** el perfil porfirínico hepático de *J. multidentata* puede ser utilizado como biomarcador molecular de exposición subcrónica a una formulación comercial de glifosato.

**3.3 Predicción:** habrá un cambio en la concentración de alguna de las tres porfirinas estudiadas, frente a la exposición subcrónica a una formulación comercial en estudio.

## **4. Materiales y métodos**

En el presente trabajo se analizó, bajo condiciones controladas, la respuesta en el perfil de porfirinas hepáticas de *J. multidentata* a la exposición subcrónica a un rango de concentraciones conocidas de una formulación comercial de glifosato. Se realizaron una serie de ensayos piloto con el fin de poner a punto la técnica (anexo).

La captura se realizó utilizando red de arrastre costero en un sistema léntico con baja proporción de uso agrícola en su cuenca (Laguna José Ignacio, Maldonado). Se seleccionaron para los experimentos ejemplares hembras de

una única cohorte de entre 3,3 y 5,5 cm de longitud estándar (Goyenola, Iglesias et al. 2011). Los peces fueron aclimatados en cautiverio por un período equivalente a la duración del ensayo.

Los tratamientos involucraron exposición a concentraciones por debajo de  $LC_{50}$  96-h, en un gradiente desde 0,0 (control), hasta  $10,8 \text{ mg L}^{-1}$  del principio activo. Las mismas fueron obtenidas a partir de la formulación comercial IMPROSATE (Tafirel<sup>®</sup>), conteniendo  $360 \text{ g L}^{-1}$  de glifosato isopropilamina. Cada tratamiento involucró una exposición subcrónica de 7 días, realizada en 5 peceras de 3 litros con 2 ejemplares en cada una. El fotoperíodo se fijó en 12/12 y las condiciones de temperatura fueron controladas. Los peces fueron alimentados a diario (con escamas para peces de la marca Denucio). Las soluciones fueron repuestas al alcanzar el 50% del tiempo de exposición. Durante los bioensayos murieron 4 ejemplares de los 50 expuestos (1 en  $3,6 \text{ mg L}^{-1}$ , 2 en  $7,2 \text{ mg L}^{-1}$  y 1 en  $10,8 \text{ mg L}^{-1}$  de glifosato). A los 7 días los ejemplares sobrevivientes fueron sometidos a eutanasia por sobredosis de anestésico 2- fenoxietanol ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y se determinó peso corporal y largo estándar para cada ejemplar. Posteriormente fueron disectados y los hígados fueron pesados y conservados en freezer a  $-80^{\circ} \text{ C}$ .

En el laboratorio, los hígados fueron homogenizados individualmente en agua destilada en una relación de 10 mL de agua destilada por gramo de tejido, siguiendo el protocolo planteado por (Carrasco-Letelier, Eguren et al. 2006). De cada muestra se obtuvo una alícuota para cuantificación de porfirinas y otra para cuantificación de proteínas. Para lo primero, muestras iguales del homogenizado fueron transferidas a tubos de ensayo individuales conteniendo una mezcla de metanol/ácido perclórico 1 N (1:1 v/v), en una relación 1:8. Después de mezclar por vórtex cada muestra se mantuvo en oscuridad durante 10 min y se centrifugó por 3 min a 15000 rpm, según lo propuesto por Carrasco (2006). Para la determinación cuantitativa de porfirinas se utilizó la técnica propuesta por Grandchamp (1980), empleando el método fluorimétrico. Se prepararon las curvas de calibración a partir de estándares de copro (Aldrich, CAS: 69477-27-6), uro (Aldrich, CAS: 10170-03-3) y protoporfirina (Fluka, CAS: 5522-66-7). Para la preparación de los estándares de proto y

uroporfirina, las mismas fueron sometidas a hidrólisis por tratamiento con ácido clorhídrico 6 M *overnight* y luego diluidas con agua hasta ácido clorhídrico 1 M. Las soluciones madre fueron preparadas diluyendo coproporfirina en hidróxido de sodio 1 M, uroporfirina en ácido clorhídrico 0,5 M y protoporfirina en ácido clorhídrico 6 M. Soluciones estándar (1-100 nM) se prepararon diluyendo las soluciones concentradas en solución mezcla metanol/ácido perclórico 1 N (1:1 v/v). Las medidas fueron realizadas con el equipo Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific Inc.) en el laboratorio de Físicoquímica Biológica de la Facultad de Ciencias, en condiciones de excitación-emisión correspondientes al máximo para cada porfirina (400-595 nm para coproporfirina, 405-595 nm para uroporfirina y 410-605 nm para protoporfirina), según Grandchamp (1980).

La fluorescencia medida en cada una de las condiciones fue el resultado de la combinación lineal de los aportes de cada una de las porfirinas presentes en la mezcla. Para la determinación de cada porfirina se estableció un sistema de tres ecuaciones donde las concentraciones de las porfirinas fueron las incógnitas (Grandchamp 1980). Sin embargo, debido a que en las muestras analizadas no se obtuvieron valores detectables de uroporfirina, ésta se omitió en el análisis, por lo que debió desarrollarse un nuevo sistema de dos ecuaciones y dos incógnitas (concentraciones de copro y protoporfirina):

$$\text{RFU (a)} = \text{pend copro (a)} [\text{copro}] + \text{pend proto (a)} [\text{proto}]$$

$$\text{RFU (b)} = \text{pend copro (b)} [\text{copro}] + \text{pend proto (b)} [\text{proto}],$$

donde (a) y (b) son las condiciones de excitación-emisión en las que se realizaron las medidas (400-595 nm y 410-605 nm respectivamente), RFU es la señal de fluorescencia correspondiente a cada muestra, *pend copro* y *pend proto* y [copro] y [proto] son las pendientes obtenidas de las curvas de calibración y las concentraciones de copro y protoporfirina respectivamente.

El contenido de proteína (de la alícuota correspondiente de los homogeneizados), fue determinado a partir del método de Bradford.

Los resultados del análisis de las porfirinas se presentan como nmoles de porfirina  $\text{mg}^{-1}$  de proteína, nmoles de porfirina  $\text{g}^{-1}$  de tejido y unidades relativas de fluorescencia para diluciones equivalentes (10 mL de agua destilada por g de tejido), correspondientes a cada tratamiento ( $\text{mg L}^{-1}$  de glifosato). En cuanto a la determinación de proteínas los resultados se presentaron como cantidad de proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) y cantidad de proteína  $\text{g}^{-1}$  de tejido correspondientes a cada tratamiento ( $\text{mg L}^{-1}$  de glifosato). En cada caso se siguió la propuesta de (Zar 2010) para la identificación y eliminación de outliers.

Se determinó índice hepatosomático (masa de hígado/masa corporal del pez x 100) con el fin de evaluar la existencia de efectos diferenciales en los distintos tratamientos.

La variación de cada una de estas variables entre tratamientos es presentada gráficamente como diagramas de cajas (box-plot). Como los supuestos de los tests paramétricos generalmente no se cumplieron, aún con datos transformados, las comparaciones estadísticas fueron hechas usando test de Kruskal-Wallis (Zar 2010). Cuando las diferencias en las medianas entre los grupos de tratamientos fueron mayores a lo esperado por azar, un procedimiento post hoc de comparación múltiple de a pares se aplicó para aislar el grupo o grupos diferentes de los otros (Dunn 1964). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de  $p \leq 0.05$ .

## 5. Resultados

Se presentan las curvas de calibración obtenidas para coproporfirina para las tres condiciones de medida (excitación-emisión) empleadas (Fig. 1, tabla 1).

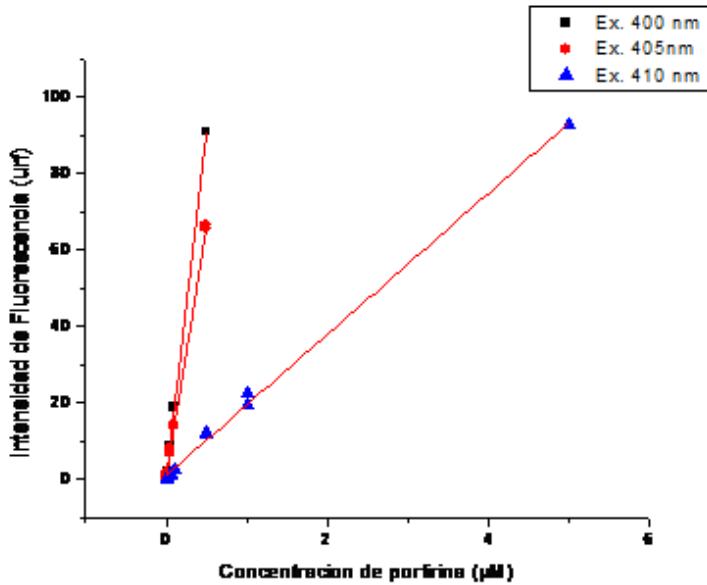


Fig. 1. Curvas de calibración de coproporfirina para las tres condiciones de medida de excitación-emisión (400-595, 405-595 y 410-605 nm).

Tabla 1

Ajuste de las curvas de calibración de coproporfirina

Ecuación	$y = a + b \cdot x$		
Ajuste $R^2$	0,99986	0,99953	0,99834
		Valor	Error Estándar
Fluorescencia	Intercepto	0,08454	0,16273
Fluorescencia	Pendiente	182,11078	0,71006
Fluorescencia	Intercepto	0,63063	0,21795
Fluorescencia	Pendiente	130,98623	0,95096
Fluorescencia	Intercepto	1,08967	0,4047
Fluorescencia	Pendiente	18,45017	0,20893

Fig. 2. Curva de calibración de protoporfirina para las tres condiciones de medida de excitación-emisión (400-595, 405-595 y 410-605 nm).

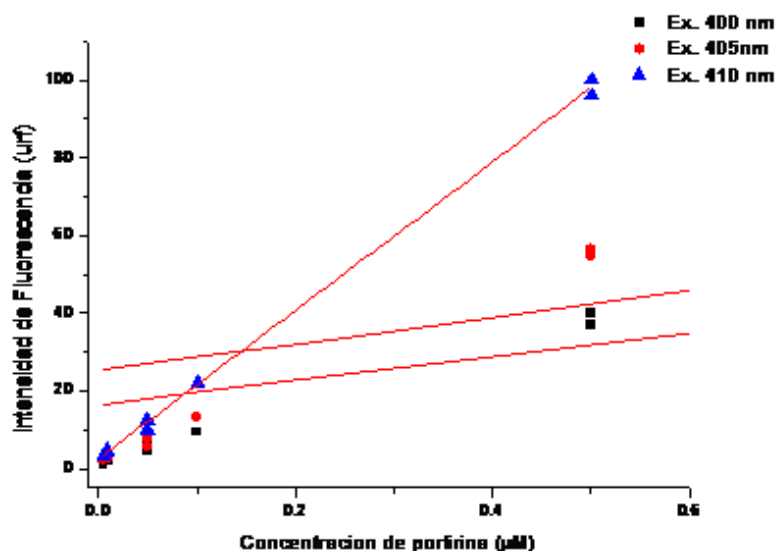


Tabla 2

Ajuste de las curvas de calibración de protoporfirina

Ecuación	$y = a + bx$		
Ajuste $R^2$	0,99881	0,93341	0,89151
		Valor	Error Estándar
Fluorescencia	Intercepto	2,51903	0,50462
Fluorescencia	Pendiente	191,13616	2,20183
Fluorescencia	Intercepto	16,48628	8,33864
Fluorescencia	Pendiente	30,50819	2,09895
Fluorescencia	Intercepto	25,27883	12,2035
Fluorescencia	Pendiente	34,24243	3,07179

La cantidad de porfirinas hepáticas cuantificadas en las muestras fue considerablemente baja, con una gran variabilidad entre ejemplares del mismo tratamiento (Fig. 3 y 4). Los valores máximos fueron de  $4,7e^{-05}$  y  $8,1e^{-05}$  nmoles de porfirina  $mg^{-1}$  de proteína (Fig. 3) y  $111,0e^{-05}$  y  $73,5e^{-05}$  nmoles de porfirina  $g^{-1}$  de tejido (Fig. 4), para copro y protoporfirina respectivamente.



Para la variable nmoles porfirina  $\text{mg}^{-1}$  proteína no se encontraron diferencias significativas entre medianas para cada tratamiento, tanto para coproporfirina (K-W,  $H_{4,22} = 4,258$ ,  $p = 0,372$ ) como para protoporfirina (K-W,  $H_{4,22} = 3,554$ ,  $p = 0,47$ ), sin embargo se observa una tendencia al aumento al aumentar la concentración de glifosato, especialmente para protoporfirina (Fig. 3, Tabla 3).

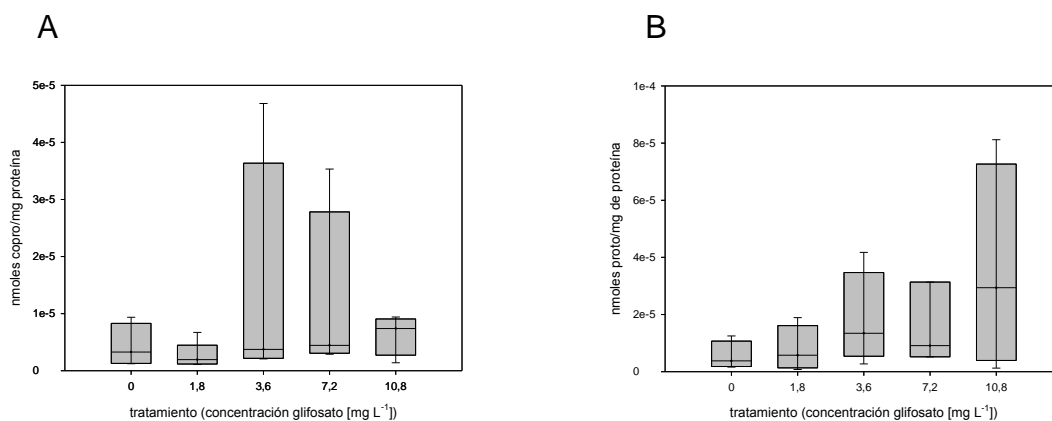
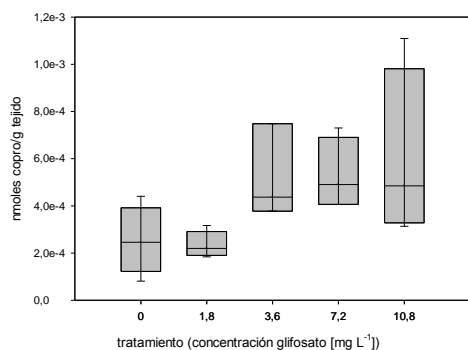


Fig. 3. Concentración de coproporfirina (copro, A) y protoporfirina (proto, B) nmoles  $\text{mg}^{-1}$  de proteína para cada tratamiento (el límite de las cajas cercano a 0 indica el percentil 25, la línea dentro de las cajas indica la mediana y el límite de las cajas más alejado a 0 indica el percentil 75. Las barras indican máximo y mínimo).

Para la variable nmoles porfirina  $\text{g}^{-1}$  tejido se encontraron diferencias significativas entre medianas para coproporfirina (K-W,  $H_{4,22} = 10,688$ ,  $p = 0,030$ ), sin embargo estas no fueron confirmadas en el análisis *post hoc*. Las diferencias entre medianas para protoporfirina no fueron significativas (K-W,  $H_{4,22} = 10,688$ ,  $p = 0,030$ ; Fig. 4, Tabla 3).

A



B

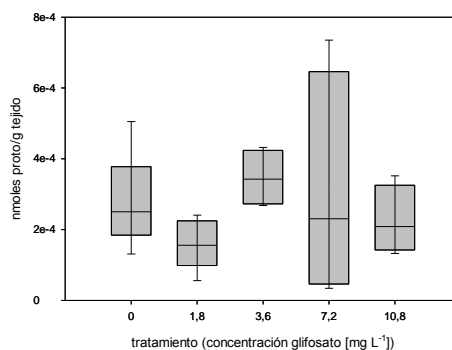
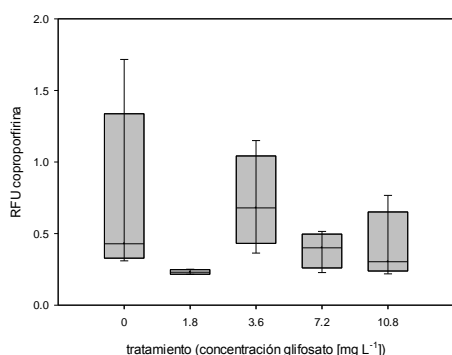


Fig. 4. Concentración de coproporfirina (copro, A) y protoporfirina (proto, B) en nmoles  $g^{-1}$  tejido para cada tratamiento (el límite de las cajas cercano a 0 indica el percentil 25, la línea dentro de las cajas indica la mediana y el límite de las cajas más alejado a 0 indica el percentil 75. Las barras indican máximo y mínimo).

Para la variable RFU Se encontraron diferencias significativas entre las medianas de coproporfirina (K-W,  $H_{4,22} = 11,55$ ,  $p = 0,021$ ). Mediante test de Dunn se constató diferencia entre los tratamientos 1,8 y 3,6  $mg L^{-1}$  de glifosato. Las diferencias entre las medianas de protoporfirina no fueron significativas (K-W,  $H_{4,22} = 9,523$ ,  $p = 0,049$ ; Fig. 5, Tabla 3).

A



B

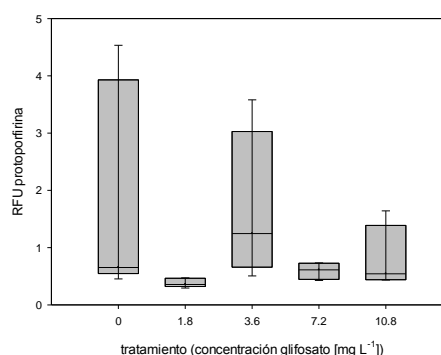


Fig. 5. Unidades relativas de fluorescencia (RFU) para coproporfirina (A) y protoporfirina (B), para cada tratamiento (el límite de las cajas cercano a 0 indica el percentil 25, la línea dentro de las cajas indica la mediana y el límite de las cajas más alejado a 0 indica el percentil 75).

Las barras indican máximo y mínimo).

No se encontraron diferencias significativas entre las medianas de proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) para los diferentes tratamientos (K-W,  $H_{4,39} = 3,714$ ,  $p = 0,446$ ; Fig. 6, Tabla 3).

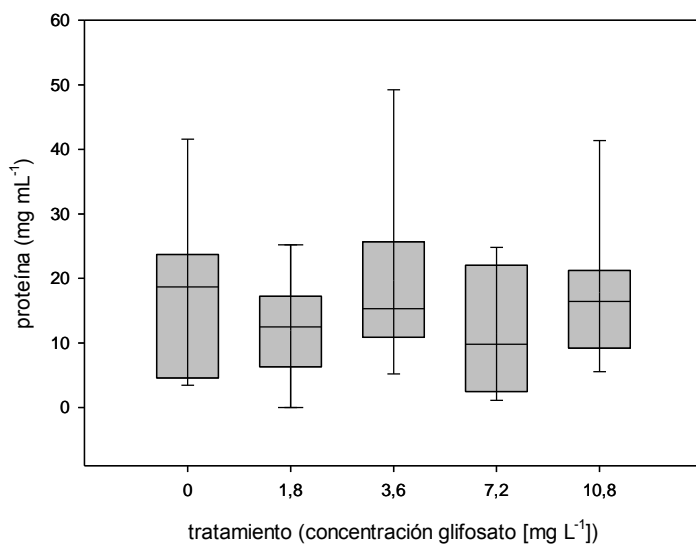


Fig. 4. Variación del contenido proteico ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) entre tratamientos (el límite de las cajas cercano a 0 indica el percentil 25, la línea dentro de las cajas indica la mediana y el límite de las cajas más alejado a 0 indica el percentil 75. Las barras indican máximo y mínimo).

No se encontraron diferencias significativas entre las medianas de proteína  $\text{g}^{-1}$  de tejido para los diferentes tratamientos (K-W,  $H_{4,38} = 1,859$ ,  $p = 0,762$ ; Fig. 5, Tabla 3).

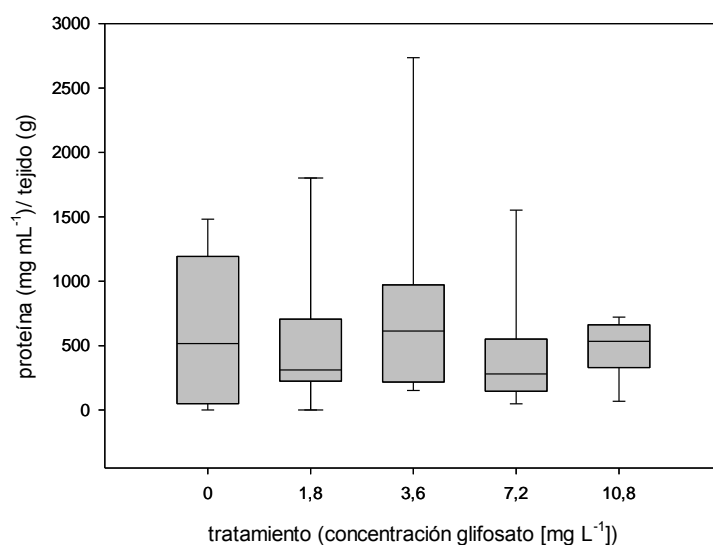


Fig. 6. Variación de proteína g<sup>-1</sup> de tejido entre tratamientos (el límite de las cajas cercano a 0 indica el percentil 25, la línea dentro de las cajas indica la mediana y el límite de las cajas más alejado a 0 indica el percentil 75. Las barras indican máximo y mínimo).

El análisis del índice hepatosomático no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (K-W,  $H_{4,42} = 3,202$ ,  $p = 0.525$ ; Fig. 7, tabla 3).

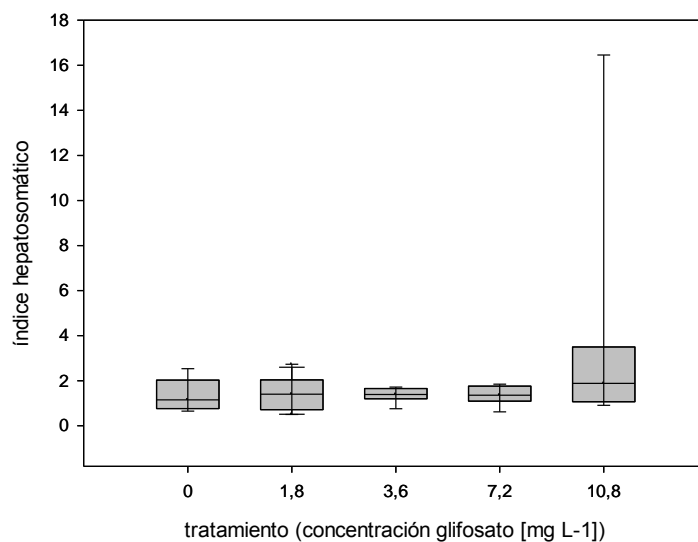


Fig. 7. Índice hepatosomático para cada tratamiento (el límite de las cajas cercano a 0 indica el percentil 25, la línea dentro de las cajas indica la mediana y el límite de las cajas más alejado a 0 indica el percentil 75. Las barras indican máximo y mínimo).

Tabla 3

Resultados de test Kruskal-Wallis y test post-hoc Dunn. H: estadístico de Kruskal-Wallis, gl: grados de libertad, N: número total de muestras, p: probabilidad error tipo I, na: no aplica, ns: no significativo. Nivel de significancia  $p \leq 0.05$ . Se observan diferencias significativas sólo para RFU de coproporfirina entre los tratamientos 1,8 y 3,6  $\text{mg L}^{-1}$  (ver figura 3 A).

	Kruskal-Wallis		Dunn
	H (gl, N)	p	
	<b>COPROPORFIRINA</b>		
nmoles porfirina/mg proteína	4,258 (4, 22)	0,372	na
nmoles porfirina/g tejido	10,688 (4, 22)	0,030*	ns
RFU	11,555 (4, 22)	0,021*	1,8≠3,6
	<b>PROTOPORFIRINA</b>		
nmoles porfirina/mg proteína	3,554 (4, 22)	0,47	na
nmoles porfirina/g tejido	6,031 (4, 22)	0,197	na
RFU	9,523 (4, 22)	0,049*	ns
	<b>PROTEÍNA</b>		
proteína $\text{mg mL}^{-1}$	3,714 (4, 39)	0,446	na
proteína $\text{mg mL}^{-1}/\text{g tejido}$	1,859 (4,38)	0,672	na
	<b>ÍNDICE HEPATOSOMÁTICO</b>		
masa de hígado/masa corporal del pez x 100	3,202(4, 42)	0,525	na

## 6. Discusión

Las curvas de calibración mostraron una respuesta lineal de la intensidad de fluorescencia para las diferentes porfirinas en un amplio rango de concentraciones.

No se observó un patrón definido en el perfil porfirínico hepático de *J. multidentata* sometida a los diferentes tratamientos, sin embargo para la variable porfirina  $\text{mg}^{-1}$  proteína se observa una tendencia al aumento al aumentar la concentración de glifosato. Un estudio con un mayor número de muestras permitiría un análisis más exhaustivo de la respuesta de esta variable.

Si bien varios estudios de laboratorio reportan efectos a nivel bioquímico tras exposición subcrónica a glifosato, dichos efectos son evaluados en otras especies y otros biomarcadores (Nešković, Poleksić et al. 1996, Jiraungkoorskul, Upatham et al. 2003). En este sentido no se encontró información previa sobre los tiempos necesarios de exposición a glifosato en *J. multidentata*, para inducir una respuesta al nivel bioquímico y menos aún en el perfil porfirínico hepático. Cabe resaltar, que según lo reportado por Hued et al. (2011), la exposición subcrónica de *J. multidentata* durante 7 días, a la formulación de glifosato de la marca Roundup, produjo daños a nivel histológico y comportamental, por lo que cabría esperar alteraciones a un nivel inferior como el bioquímico. Por otra parte en un estudio de campo Carrasco et al. (2006) reportó valores de porfirinas hepáticas de ejemplares de la especie *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) correspondientes a un sitio con mayor exposición a poluentes y otro con menor exposición. En ambos casos los valores fueron muy superiores a los reportados en el presente estudio, lo cual podría atribuirse a una respuesta diferencial entre las especies *J. multidentata* y *Astyanax fasciatus* y/o a un efecto mayor en *Astyanax fasciatus* derivado de la exposición a una mezcla de poluentes.

La falta de efectos observados en el presente trabajo ponen en duda el uso de porfirinas hepáticas de *J. multidentata* como herramienta para la evaluación de las consecuencias ambientales del uso de glifosato. Por otra parte, la exposición a un mayor número de días provocó una importante mortandad de individuos (anexo), lo que no permitió evaluar dichas diferencias. Si bien el presente estudio tomó como referencia el valor de LC<sub>50</sub>-96hs reportado por Hued (2011), la presentación de glifosato utilizada en dicho trabajo no se encontró disponible en el mercado local, por lo que se recurrió a una formulación de la marca IMPROSATE con elevada presencia en el mercado. La falta de respuesta podría estar asociada a las diferencias en las formulaciones. La ausencia de respuesta no es extrapolable a otras formulaciones comerciales de glifosato, u otras concentraciones y tiempos de exposición.

Por otro lado los valores de porfirinas presentaron una gran variabilidad entre

ejemplares del mismo tratamiento, lo cual puede ser atribuido a la variación natural entre ejemplares. Cabe considerar algunas fuentes posibles de variación en patrones metabólicos como presencia o ausencia de parasitismo (Booth, Clayton et al. 1993) y actividad hormonal ligada al ciclo sexual de las hembras (Dickhoff, Yan et al. 1989). Dado que el estudio se realizó sólo para hembras, no es posible asegurar una respuesta similar en machos.

## **7. Conclusiones**

No se detectaron patrones en los perfiles de copro o protoporfirina que indiquen la validez de la utilización de las porfirinas hepáticas de *J. multidentata* como biomarcador molecular de exposición subcrónica a la formulación de glifosato en las concentraciones y plazos implicados en el presente trabajo. El haber logrado poner a punto el método, permite aplicar el análisis de porfirinas a otros modelos biológicos y xenobióticos, lo que permitirá darle continuidad a la línea de investigación.

## **8. Perspectivas**

Como complemento al presente trabajo cabe resaltar la importancia de la realización de futuros ensayos que puedan aportar a la evaluación de los efectos de exposición a glifosato bajo diferentes condiciones (e.g.: la determinación de  $LC_{50}$  en *J. multidentata* y otras especies nativas para la exposición a diferentes formulaciones, determinación de las relaciones existentes entre porfirinas tras exposición a tales formulaciones, comparación con la respuesta en machos, estudio de posibles efectos derivados de coadyuvantes, etc). Adicionalmente, podrían considerarse alternativas de ensayos con otro tipo de organismos como ser invertebrados (ej *Daphnia*) o macroinvertebrados. En todos los casos sería de gran importancia la incorporación de controles positivos.

## 9. Referencias

Alvarez, M., et al. (2012). "Toxicidad en peces de herbicidas formulados con glifosato." Acta Toxicológica Argentina **20**(1): 5-13.

Booth, D., et al. (1993). "Experimental demonstration of the energetic cost of parasitism in free-ranging hosts." Proceedings: Biological Sciences **253**(1334).

Bowers, M. A., et al. (1992). "Quantitative determination of porphyrins in rat human urine and evaluation of urinary porphyrin profiles during mercury and lead exposure." Journal of Laboratory and Clinical Medicine **120**: 272–281.

Brady, N. C. y R. R. Weil (1996). The Nature and properties of soils. Soils and Chemical Pollution, Prentiss Hall Inc.

Brausch, J. M., et al. (2007). "Acute and Sub-Lethal Toxicity of Three POEA Surfactant Formulations to *Daphnia magna*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **78**(6): 510-514.

Burger, M. y S. Fernandez (2004). "Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos." Revista Médica del Uruguay **20**: 202-207.

Carrasco-Letelier, L., et al. (2006). "Preliminary field study of hepatic porphyrin profiles of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) to define anthropogenic pollution." Chemosphere **62**: 1245-1252.

Cazenave, J., et al. (2005). "Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in *Corydoras paleatus*, *Jenynsia multidentata* and *Odontesthes bonariensis*: A field and laboratory study." Aquatic Toxicology, **75**(2): 178-190.

Coupe, R. H., et al. (2012). "Fate and Transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface Waters of agricultural basins." Pest Management Science **68**(16–30).

Crowe, A. S., et al. (2011). "Application of glyphosate-based herbicide to *Phragmites australis*. Impact on groundwater and near shore lake water at a beach on Gregorian Bay." Journal of Great Lakes Research **37**: 616–624



Cheng, Y. L., et al. (1989). "Residues of Glyphosate in an aquatic environment after control of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*)."  
Journal of Weed Science and Technology **34** (2): 117–122.

de Amarante Junior, O. P., et al. (2002). "Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação."  
Química Nova **25**(4): 589–593.

De Matteis, F. y C. K. Lim (1994). Porphyrins as “nondestructive” indicators of exposure to environmental pollutants.  
Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. Boca Raton, Lewis Publishers: 93-128.

Dickhoff, W. W., et al. (1989). "Relationship between metabolic and reproductive hormones in salmonid fish."  
Fish physiology and biochemistry **7**(1-6): 147-155.

DIEA (2014). Encuesta Agrícola Invierno 2014. Montevideo, MGAP. **323**: 17.

Duke, S. O., et al. (1991). "Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides."  
Weed Science: 465-473.

Dunn, O. J. (1964). "Multiple comparisons using rank sums."  
Technometrics **6** (3): 241-252.

EPA (1993a). Reregistration Eligibility Decision (RED) Glyphosate. Washington, DC, US EPA, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.

FAO (2003). Caracterización de peligros de patógenos en los alimentos y el agua: directrices.

Fausch, K., et al. (1990). "Fish communities as indicators of environmental degradation."  
American fisheries society symposium **8**: 123-144.

Fuentes de Pedrahíta, C. y A. L. de Román (1980). Los surfactantes: clases, propiedades y uso con herbicidas. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Gluszczak, L., et al. (2007). "Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*)."  
Comparative Biochemistry and Physiology Part C **146**: 519–524.

Goldsborough, L. y A. Beck (1989). "Rapid Dissipation of Glyphosate in Small Forest Ponds."  
Archives of Environmental Contamination and Toxicology **18** (4): 537–544.

Goyenola, G., et al. (2011). "Analysis of the reproductive strategy of *Jenynsia multidentata* (Cyprinodontiformes, Anablepidae) with focus on sexual differences in growth, size, and abundance."  
Hydrobiologia **673**(1): 245-257.

Guyton, K. Z., et al. (2015). "Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate." The Lancet Oncology Online First.

Hichiba, M. y K. Tomokuni (1987). "Urinary excretion of 5hydroxyindoleacetic acid, -aminolevulinic acid and coproporphyrin isomers in rats and men exposed to lead." Toxicology Letters **38**: 91–96.

Holt, E. A. y S. W. Miller (2011). "Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts." Nature Education Knowledge **3**(10).

Hued, A. y M. Bistoni (2005). "Development and validation of a Biotic Index for evaluation of environmental quality in the central region of Argentina." Hydrobiologia **543**: 279-298.

Hued, A. C., et al. (2011). "Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup) Alters Normal Gill and Liver Histology and Affects Male Sexual Activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes)." Archives of Environmental Contamination Toxicology **62**: 107–117.

Jacobs, J. M. y N. J. Jacobs (1993). "Porphyrin accumulation and export by isolated barley (*Hordeum vulgare*) plastids (effect of diphenyl ether herbicides)." Plant physiology **101**(4): 1181-1187

Jiraungkoorskul, W., et al. (2003). "Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)." Environmental Toxicology and Pharmacology **18**(4): 260-267.

Karr, J. R. (1981). "Assessment of biotic integrity using fish communities." Fisheries **6**: 21-27.

Karr, J. R. (1991). "Biological integrity: a long-neglected aspect of water resource management." Ecological Applications **1**: 66-84.

Lim, C. K. (1991). Porphyrins Liquid Chromatography in Biomedical Analysis. T. Hanai, Elsevier. **80**: 209-229.

Lorenzatti, E. A., et al. (2007). "Análisis de Residuos de Glifosato en Muestras Ambientales y Alimentos. Aspectos Ambientales del Uso de Glifosato." Documentos Técnicos.

Marks, G. S. (1985). "Exposure to toxic agents: the heme biosynthetic pathway and hemoprotein as indicator." Critical Reviews in Toxicology **15**: 151–179.

Martí, M. A. C. (2007). Principios de Ecotoxicología: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente, Tebar.

Martinez, G., et al. (1983). "Urinary uroporphyrin as bioindicator of arsenic exposure in rats." Proceedings of the Western Pharmacology Society **26**.

Martino, D. (1995). El Herbicida Glifosato: su manejo más allá de la dosis por hectarea, INIA.

Miles, C. J. y H. A. Moyer (1988). "Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils." Journal of Agricultural and Food Chemistry **36**(3): 486-491.

Miranda, C. L., et al. (1992). "Comparative effects of the polychlorinated biphenyls mixture, Aroclor 1242, on porphyrin and xenobiotic metabolism in kidney of Japanese quail and rat." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology **103**: 149-152.

Narbondo, I. y G. Oyhançabal (2011). Radiografía del agronegocio sojero: descripción de los principales actores y de los impactos socio-económicos en Uruguay, REDES-AT.

Nešković, N. K., et al. (1996). "Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **56**(2): 295-302.

Newman, M. C. (2013). *Quantitative Ecotoxicology*. CRC Press. Boca Raton, Taylor & Francis Group.

Ng, J. C., et al. (2002). "Porphyrin profiles in blood and urine as a biomarker for exposure to various arsenic species." Cellular and Molecular Biology **48**: 111-123.

O Halloran, J. y P. F. Duggan (1988). "Blood lead levels and free red blood cell protoporphyrin as measure of lead exposure in mute swans." Environmental Pollution **51**: 19-38.

Pain, D. J. (1989). "Hematological parameters as predictors of blood lead and indicators of lead poisoning in the black duck (*Anas rubripes*)." Environmental Pollution **60**: 67- 81.

Park, Y., et al. (2006). "Stream fish assemblages and basin land cover in a river network." Science of the Total Environment **365**: 140-153.

Patiño, N. M. (2008). Farmacología medica/Medical Pharmacology, Ed. Médica Panamericana.

Peakall, D. y C. Walker (1994). "Vertebrados. El rol de los biomacadores en el asesoramiento de riesgo ambiental " Principios **3**: 173-179

Penaloza-Vaquez, A., et al. (1995). "Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by *Pseudomonas pseudomallei*." Applied Environmental Microbiology **61**(2): 538-543.

Pérez, G. L., et al. (2007). "Effects of the Herbicide Roundup on Freshwater microbial communities: A Mesocosm Study." Ecological Applications **17**(8): 2310–2322.

Piccolo, A., et al. (1994). "Adsorption and desorption of glyphosate in some European soils." Journal of Environmental Science & Health Part B **29**(6): 1105-1115.

Piccolo, A., et al. (1996). "Adsorption of glyphosate by humic substances." Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**(8): 2442-2446.

Prata, F., et al. (2003). "Glyphosate sorption and desorption in soils with distinct phosphorus levels." Scientia Agricola **60**(1): 175-180.

Puglis, H. J. y M. D. Boone (2011). "Effects of Technical-Grade Active Ingredient vs. Commercial Formulation of Seven Pesticides in the Presence or Absence of UV Radiation on Survival of Green Frog Tadpoles." Archives of Environmental Contamination Toxicology **60** 145-155.

Ríos, M., et al. (2010). Evaluación participativa de plaguicidas en el sitio RAMSAR, Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay.

SATA (2009). "Glifosato-glyphosate." Accedido 27/02/2015, 2015, from [http://www.laguiasata.com/joomla/index.php?option=com\\_content&view=article&id=308:glifosato-&catid=45:principios-activos&Itemid=57](http://www.laguiasata.com/joomla/index.php?option=com_content&view=article&id=308:glifosato-&catid=45:principios-activos&Itemid=57).

Taira, M. C. y L. C. San Martín de Viale (1980). "Porphyrinogen carboxylase from chick embryo liver-in vivo effect of heptachlor and lindane." International Journal of Biochemistry **12**: 1033–1038.

Truhaut, R. (1969). "Peligros de la era química." Química Pura y Aplicada **18**(1-2): 111–128.

Tsui, M. T. K. y L. M. Chu (2003). "Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors." Chemosphere **52**: 1189–1197.

Van Birgelen, A. P. J. M., et al. (1996). "Relative potencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls derived from hepatic porphyrin accumulation in mice." Toxicology and Applied Pharmacology **138**: 98–109.

Woods, J. S., et al. (1991). "Urinary porphyrin profiles as biomarkers of trace metal exposure and toxicity: studies on urinary porphyrin excretion patterns in rats during prolonged exposure to methyl mercury." Toxicology Applied Pharmacology **110**: 464–476.

Woods, J. S. y M. R. Southern (1989). "Studies on the etiology of trace metal-induced porphyria: effects of porphyrinogenic metals on coproporphyrinogen oxidase in rat liver and kidney." Toxicology Applied Pharmacology **97**: 183-190.

Zar, J. (2010). Biostatistical Analysis (5th Ed.). New Jersey, Pearson Prentice Hall.

## **10. Anexo**

Puesta a punto de la técnica: relatorio de ensayos piloto

### **Fundamentos del diseño experimental**

Previo a la realización de los bioensayos finales, se realizaron un set de pruebas piloto con el objetivo de estandarizar la metodología a seguir.

#### **1er piloto**

Una primer prueba fue realizada (consistiendo sólo en captura de ejemplares) para determinar proporción de sexos y distribución de tallas, de forma de garantizar la obtención del número de individuos necesarios para realizar los bioensayos así como la obtención de muestras de hígado de volumen considerable. Los ejemplares fueron capturados mediante pesca con red de arrastre en la Laguna de José Ignacio (Maldonado). Posteriormente fueron sometidos a eutanasia por sobredosis de anestésico 2- fenoxietanol (1 mg/l), disectados y sus hígados extraídos.

A partir de esta prueba se determinó conveniente la selección de ejemplares hembras con tallas correspondientes a la misma cohorte (Goyenola 2008). La elección de hembras se debió a su mayor abundancia y tamaño en relación a los machos, reduciendo así el esfuerzo de captura y asegurando la obtención de muestras de hígado de mayor volumen.

#### **2° piloto**

Siguiendo los resultados obtenidos en el primer muestreo, se realizó una nueva captura. Los ejemplares fueron aclimatados en cautiverio durante un período de 20 días habiéndose registrado una mortandad elevada. La

reducción significativa de la mortandad se logró trabajando en condiciones controladas: salinidad ( $0,13 \text{ g L}^{-1}$ ), pH (7,5) y % de  $\text{O}_2$  disuelto ( $>80\%$ ). Posteriormente se llevó a cabo un bioensayo de 20 días. En este ensayo piloto se trabajó con 3 tratamientos: 0,18, 1,8 y  $3,6 \text{ mg L}^{-1}$  de glifosato asegurando condiciones de subletalidad según (Hued, Oberhofer et al. 2011). Para cada tratamiento se utilizaron peceras de 3 litros con 2 ejemplares en cada una, 1 para 0,0, 2 para 0,18 y 1,8  $\text{mg L}^{-1}$  y 4 para  $3,6 \text{ mg L}^{-1}$ . Se alimentó a diario (con escamas para peces de la marca Denucio) y se realizó cambio total de agua semanalmente, considerando tiempo de vida media para glifosato de 49 días (Lewis and Green 2011), de manera de disminuir la variación en la concentración de formulado durante el experimento. A pesar de trabajar con valores por debajo de  $\text{LC}_{50}$  96-h, se produjo una alta mortandad de individuos (en el entorno del 50%). No se observó una diferencia significativa de la sobrevivencia para los diferentes tratamientos respecto a los blancos, ni entre tratamientos (Fig. 6).

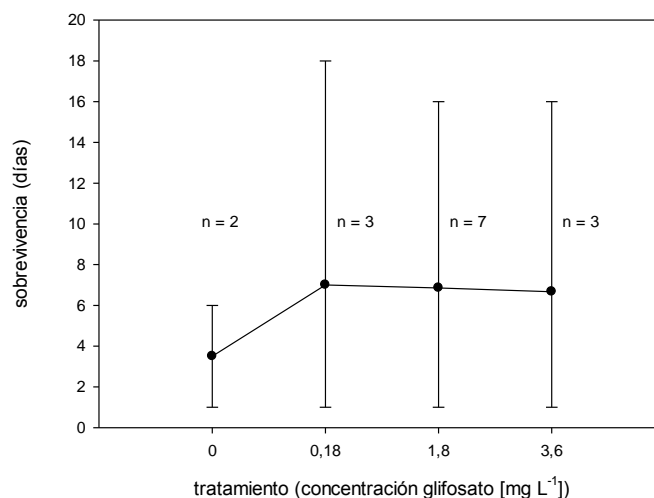


Fig. 6. Tiempo de sobrevivencia (días) de los ejemplares por tratamiento (medias y desvío estándar).

Los ejemplares muertos se retiraron y fueron guardados en freezer a  $-80^\circ \text{C}$  para el posterior análisis de porfirinas. La mortandad durante el ensayo piloto podría asegurar un número de individuos con diferente tiempo de exposición en las diferentes concentraciones, por lo que los individuos muertos fueron reemplazados por nuevos cada vez que se vaciaba una pecera. Una vez

transcurrido los 20 días de exposición los ejemplares sobrevivientes fueron sometidos a eutanasia por sobredosis de anestésico.

Las dificultades encontradas en mantener individuos durante 20 días hicieron que se considerara para el ensayo final una exposición a un menor número de días, en este caso 7 días (usando el mismo tiempo de aclimatación). Por otra parte, observamos que los individuos que no eran sacrificados por nosotros, presentaron hígados de muy mala calidad para el análisis.

## **Conclusiones**

Se concluyó reducir el tiempo de aclimatación y exposición a 7 días cada uno.

Los hígados deben ser obtenidos sólo de ejemplares sacrificados en el momento.

## **Referencias**

Goyenola, G. (2008). Historia de vida, rol trófico y uso del espacio de *Jenynsia multidentata* (Pisces): implicancias sobre la calidad de agua en un sistema léntico somero eutrófico sin peces piscívoros, UdelaR.

Hued, A. C., et al. (2011). "Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup) Alters Normal Gill and Liver Histology and Affects Male Sexual Activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes)." Archives of Environmental Contamination Toxicology **62**: 107–117.

Lewis, K. A. y A. Green (2011). The Pesticide Properties Database, IUPAC.



