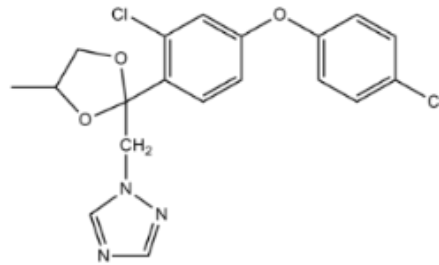
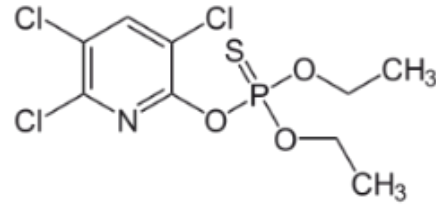
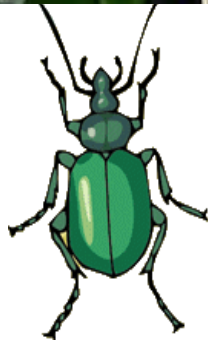


Metodología aplicada para la
evaluación de efectos tóxicos
tempranos en peces expuestos a
una mezcla de plaguicidas

Katherine Jiménez Quesada

Introducción



CPF 10% LC50

DFZ 10% LC50

MEZCLA

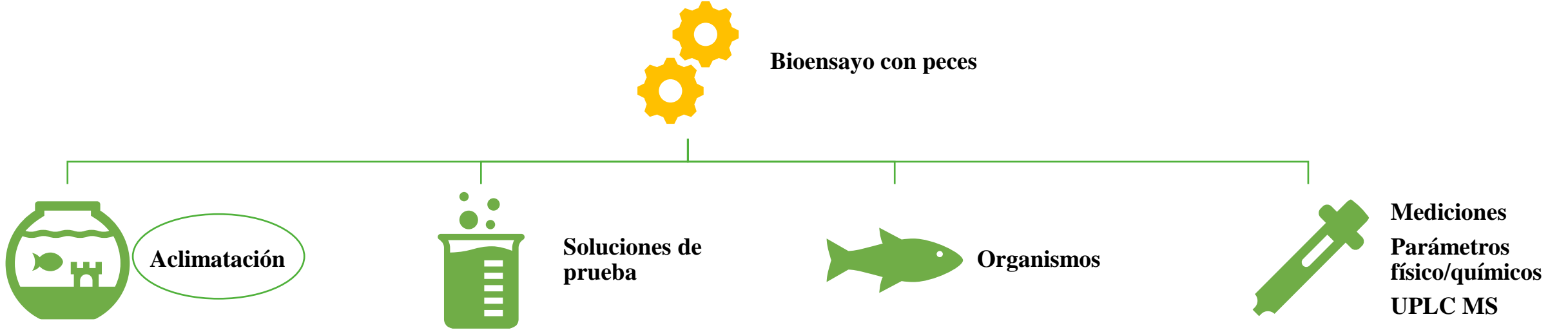


Respuestas
bioquímicas e
histopatológicas

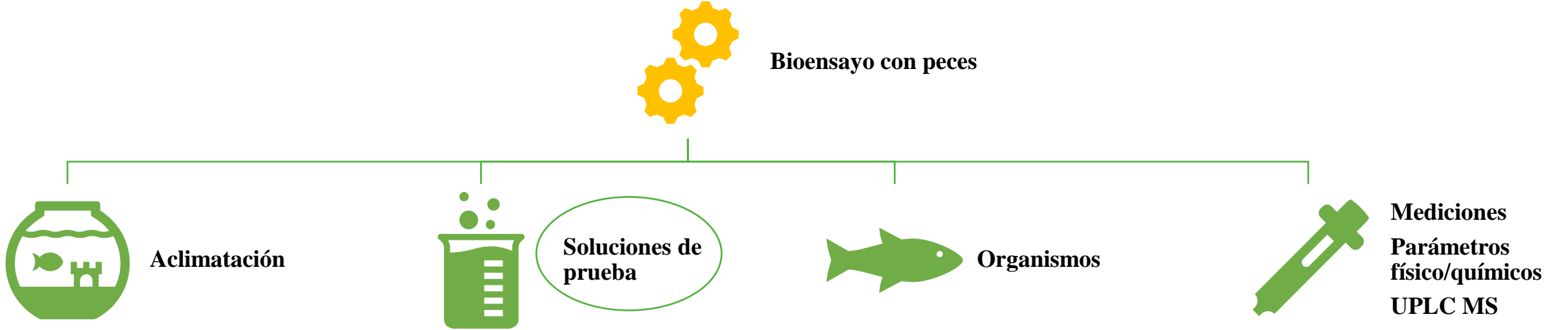
Metodología aplicada:

1. Bioensayo con peces

Determinar la toxicidad aguda del clorpirifos y el difenoconazol







Preparación de tratamientos

Stock de plaguicida



Agua

Cálculos de concentraciones que se quieran preparar



Llevar al volumen que se requiera





Aclimatación



Soluciones de prueba



Bioensayo con peces



Organismos



**Mediciones
Parámetros físico/químicos
UPLC MS**

Parachromis dovii

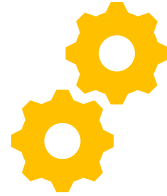




Aclimatación



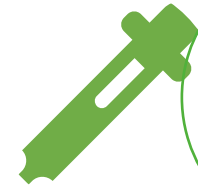
Soluciones de prueba



Bioensayo con peces

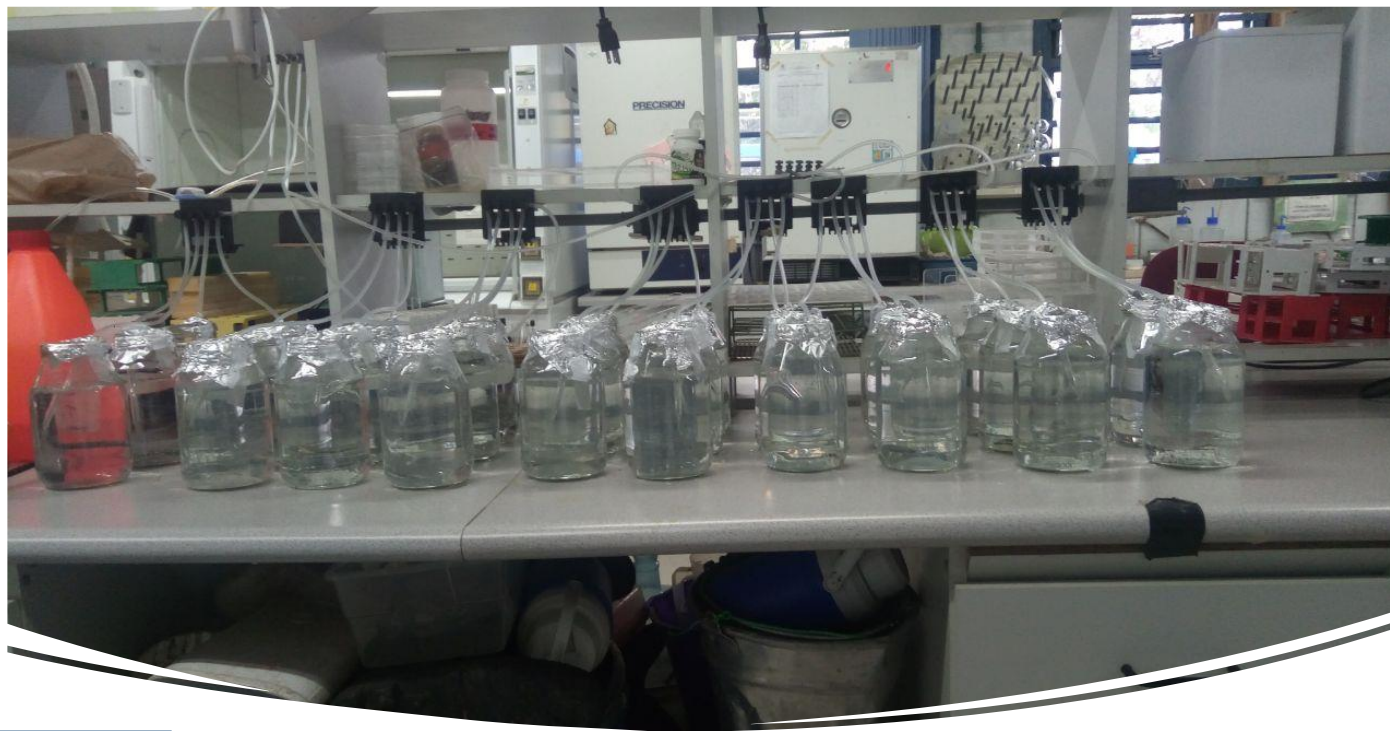


Organismos



Mediciones
Parámetros físico/químicos
UPLC MS





x 7

Agua
UV

Control negativo



x 7

Agua UV +
solvente

Control de solvente

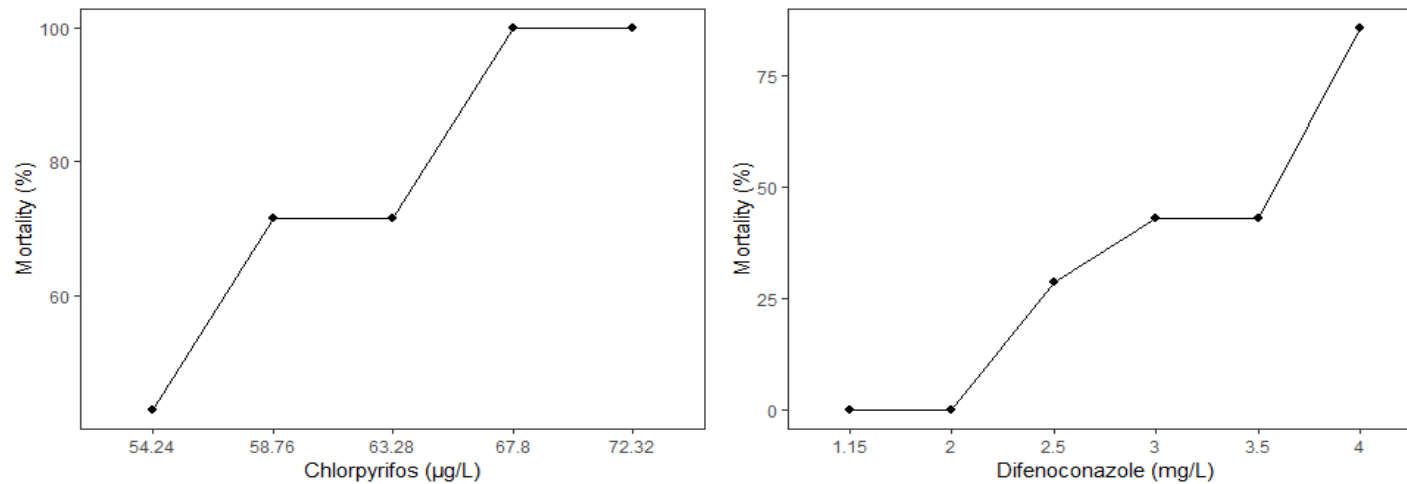


x 7

Agua UV + solución de
prueba

Estático
96 horas
Aireación constante
Mínimo 5 concentraciones

Análisis de datos



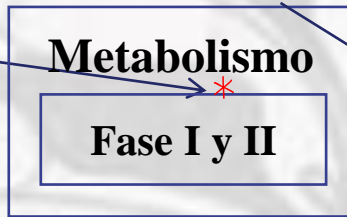
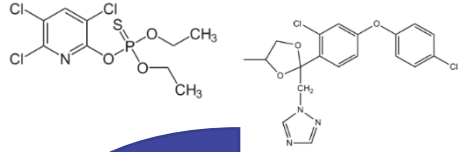
¿Qué datos obtengo?

Figura 1. Toxicidad del CPF y DFZ en *P. doyii* después de 96 horas.

Metodología aplicada:

2. Medición de biomarcadores bioquímicos

Caracterizar respuestas bioquímicas tempranas en *P. doyii* expuestos a concentraciones subletales de clorpirifos y difenoconazol, individualmente y en mezcla.



- Citocromo P450
- EROD
- CAT
- GST
- LPO

EROD
Sensible
Reacciones oxidativas

CAT
Reducción
 H_2O_2 to H_2O

GST
Conjugación

LPO
Radicales libres y reacciones con lípidos de membrana

LDH
Metabolismo energético anaerobio

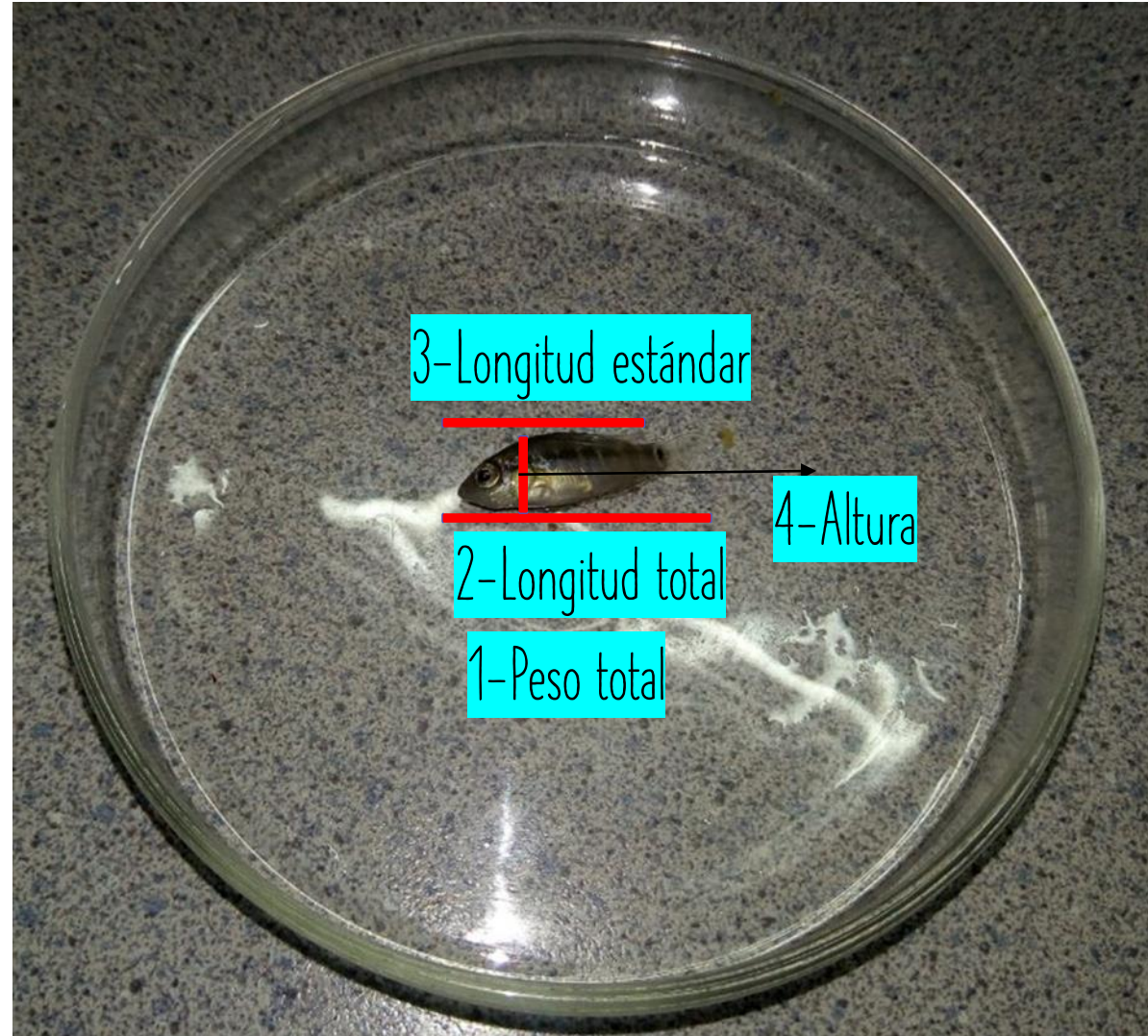
ChE
Neurotoxicidad

Inmovilización



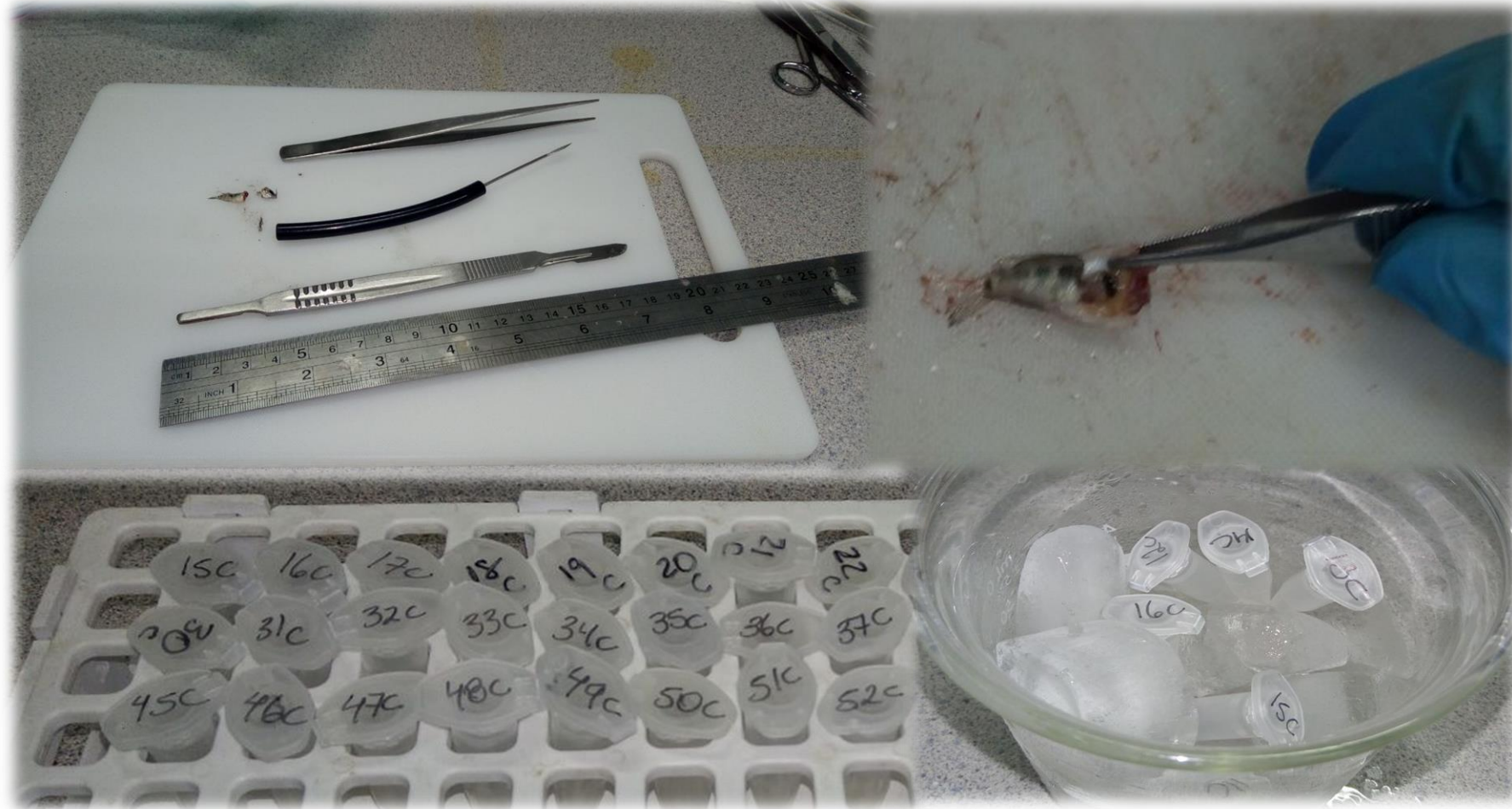
Buffer frío

Mediciones



Dissección

Rotular tubos eppendorf (código)







↑ EROD
Citocromo P450

(Peters et al. 1994)



↑ CAT, GST, LPO
Estrés oxidativo

Aebi et al., (1974), Habing et al., (1976), Ohkawa et al., (1979).



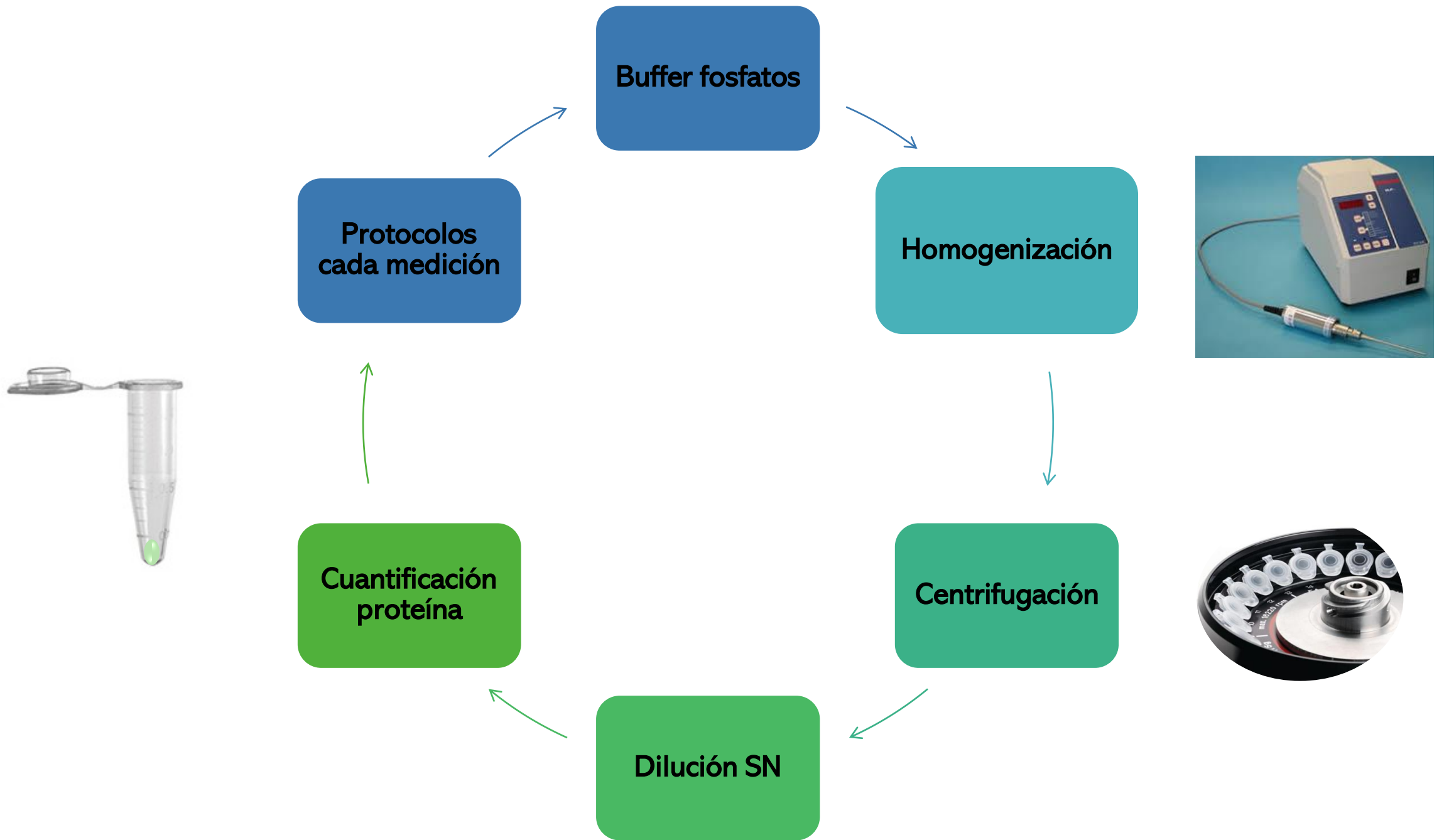
↓ ChE
Neurotoxicidad

Ellman (1961)



↑ LDH
Costo energético

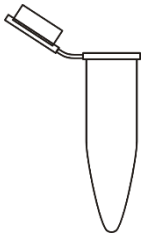
Vassault (1983)



Medición proteína

Bradford (1976)

BSA Patrón 2 mg/ml



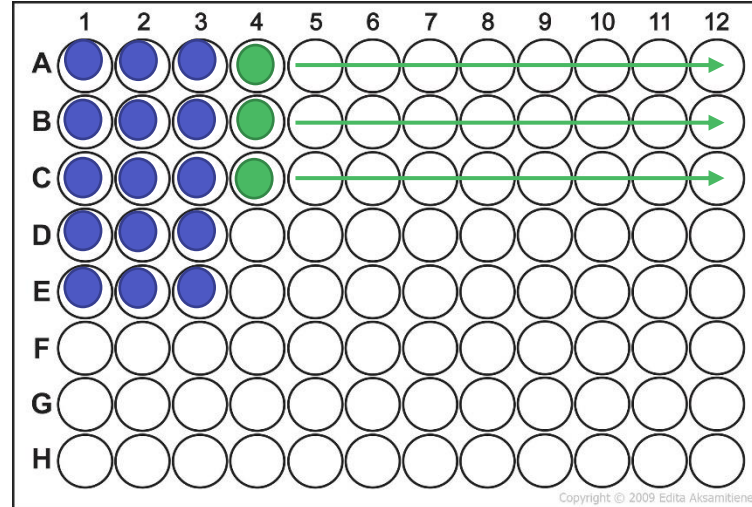
Diluciones
2 a 0.125



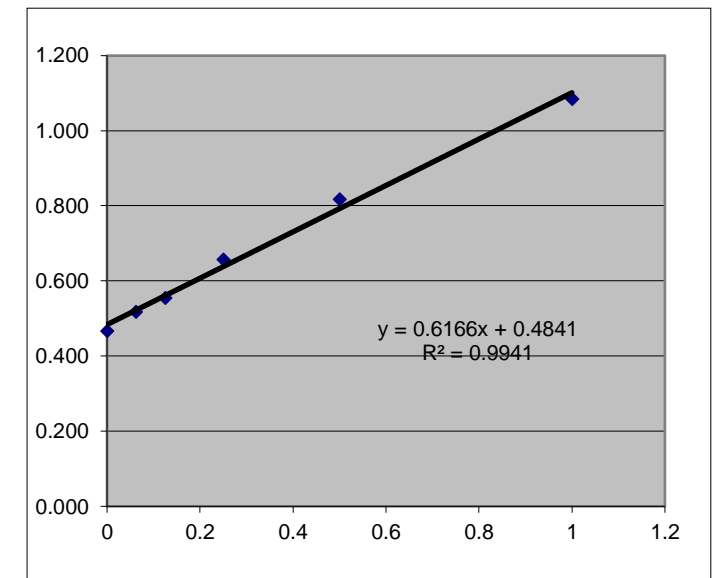
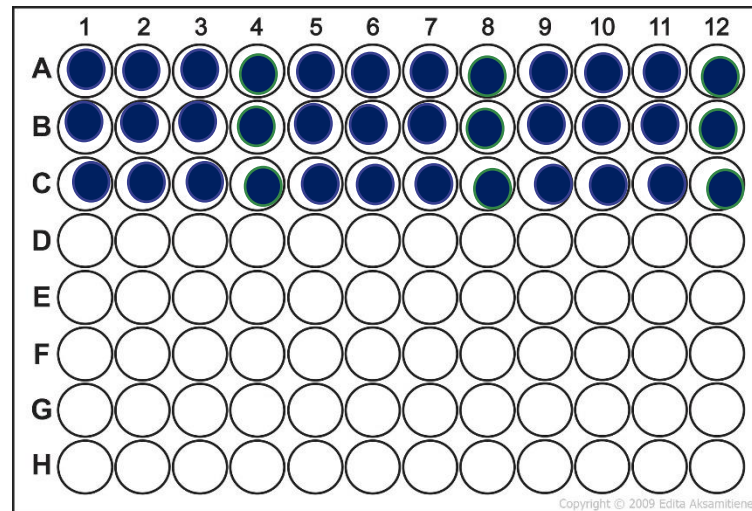
5 µl X3

300 µl Reactivo Bradford

Leer placa a 595 nm 5
min después de
mezclar



5 µl muestra x3



Hígados y branquias

EROD

Fluorimetría

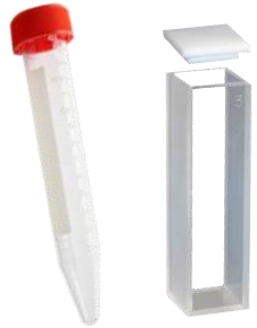
Buffer pH=7.4 +
NADPH + 7-ER
530 nm (excitation)
and 580
nm(emission).



Antes de centrifugar: 250 μ l
muestra+ 5 μ l BHT

LPO

Tris-HCl 60 pH 7.4 + DTPA + TBA
Baño maria 100 °C, 1 hora.
535 nm



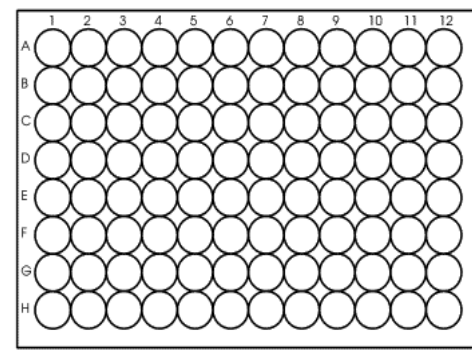
CAT

240 nm por 20s
Consumo sustrato H₂O₂



GST

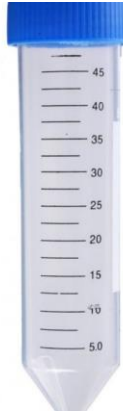
Buffer pH 6.5 +
CDNB + GSH
Absorbancia a
340nm



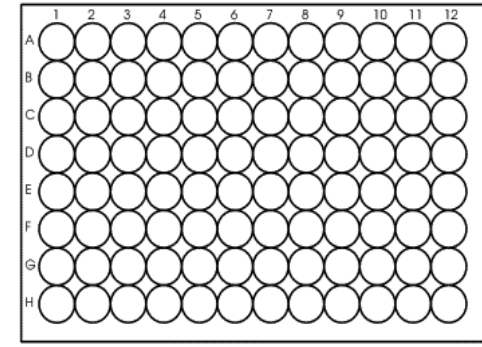
Cerebro



ChE

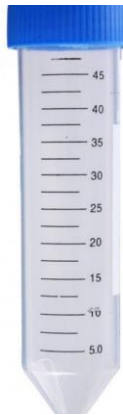


Acetilcolina + DTNB + buffer fosfatos pH 7.2
Absorbancia 415 nm por 10 min

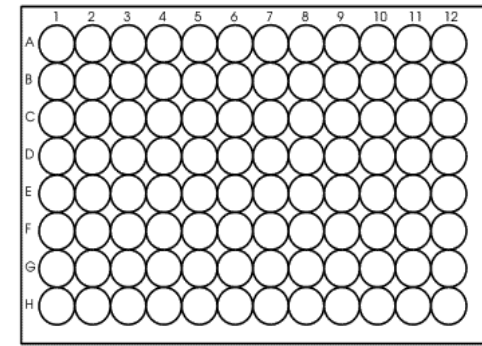


Músculo

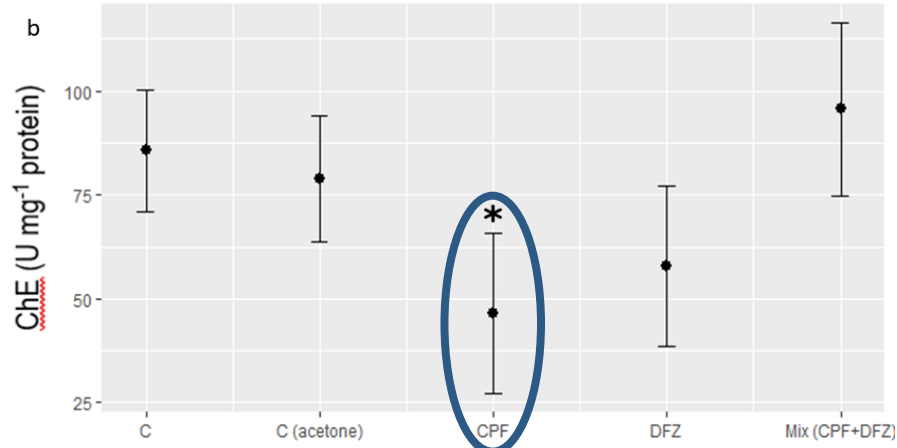
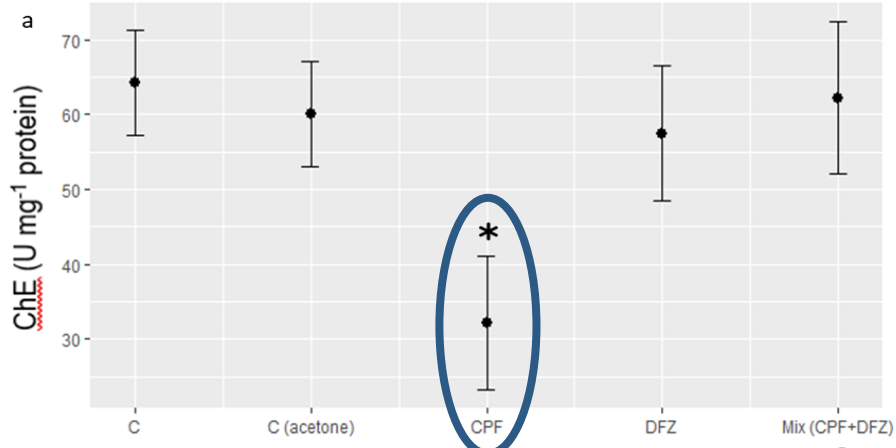
LDH



Piruvato + NADH + Tris-NaCl buffer, pH: 7.2
Medición cada 2s, por 3 min
340 nm en espectrofotómetro



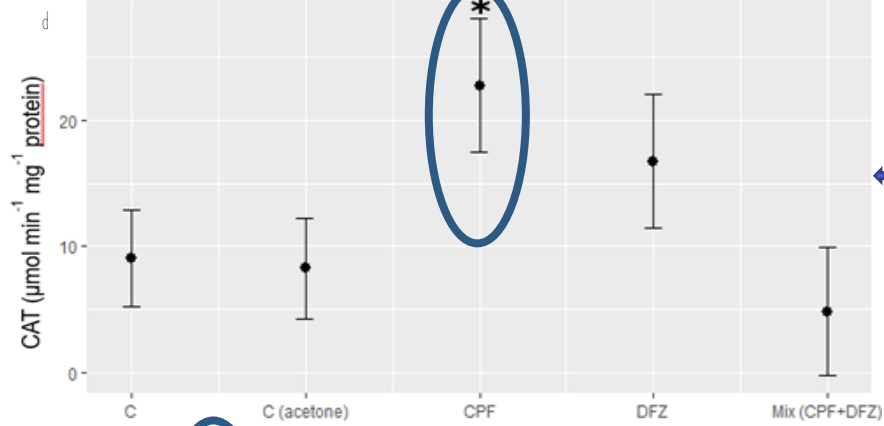
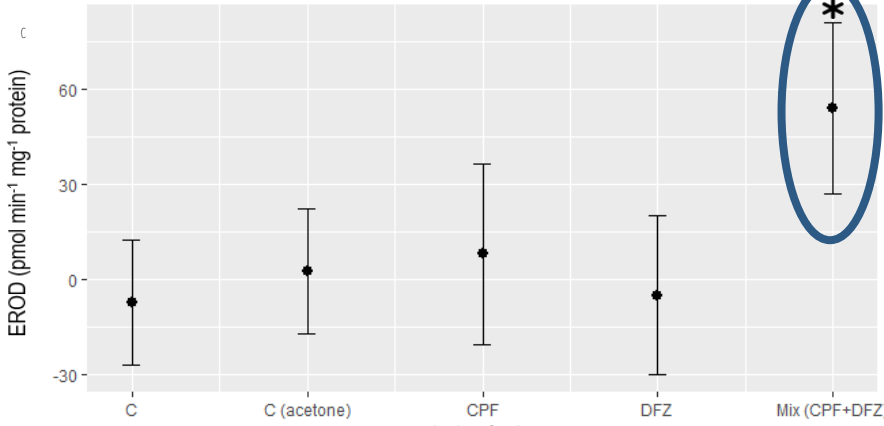
ChE
Cerebro



ChE
Músculo



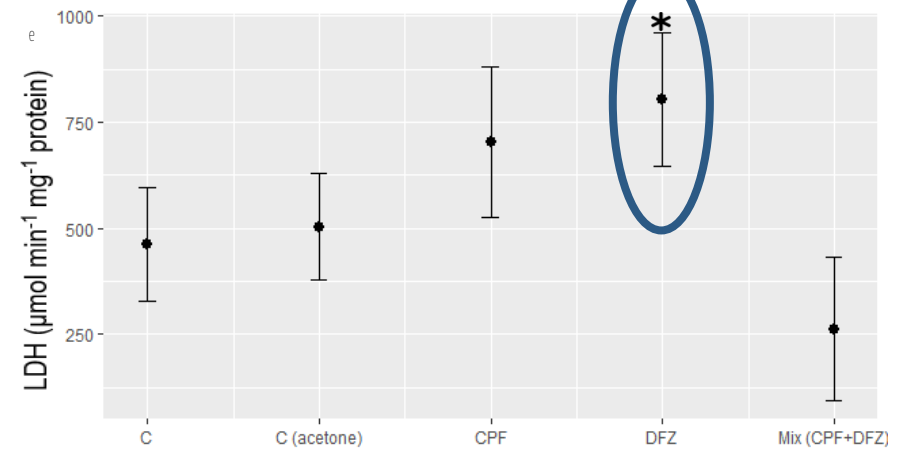
EROD
Hígado



CAT
Branquias



LDH
Músculo



Interpretación resultados

Metodología aplicada:

3. Medición de biomarcadores histopatológicos

Evaluar la toxicidad de la mezcla del clorpirifos y el difenoconazol en peces nativos (*Parachromis dovii*) en una exposición subcrónica a través de la evaluación de cambios histopatológicos

Ensayo crónico



Control negativo, solvente y mezcla de CPF +DFZ



14 días



Renovación cada 48 horas



Alimentación diaria



Análisis histopatológico



Análisis estadístico

Análisis histopatológicos



Incisión



Fijación
Formalina bufferada 10%

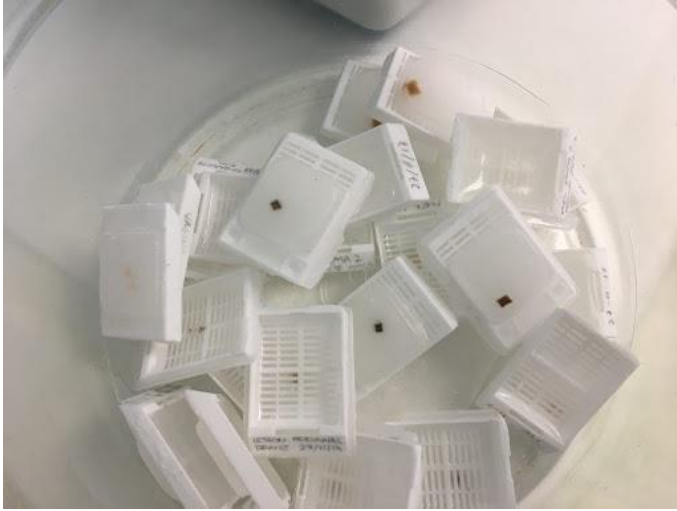


Descalcificación



Deshidratación en
alcoholes, tratamiento con
xileno y embebidos en
parafina

Bloques de parafina



4-5 μm

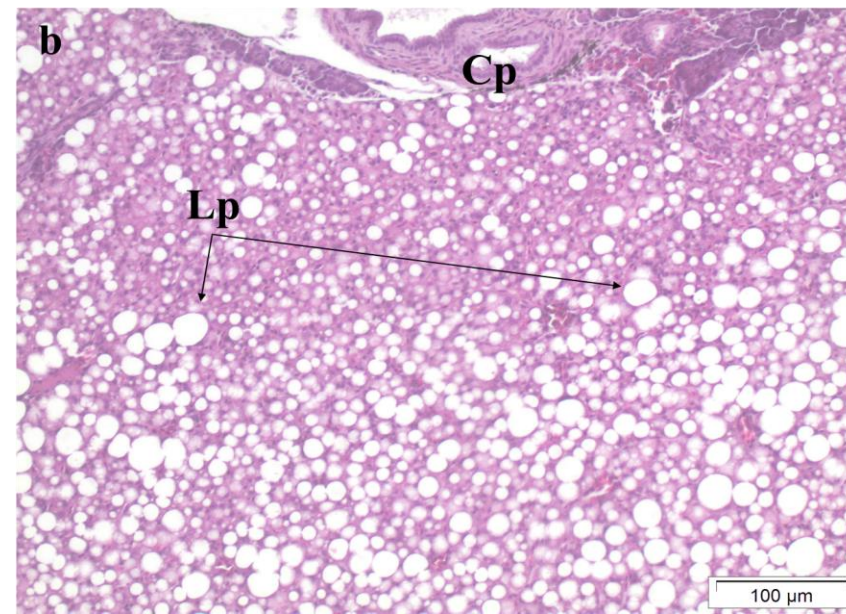
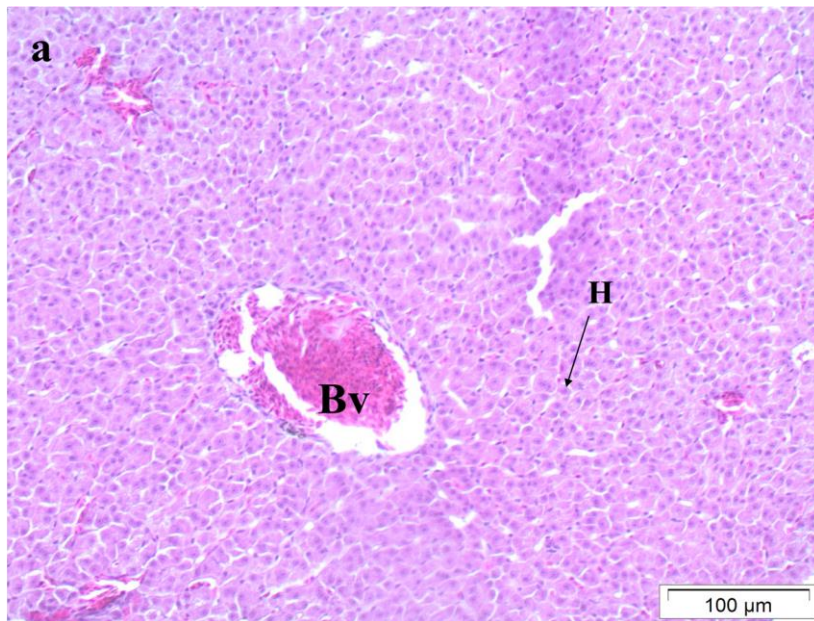


Fijación y tinción

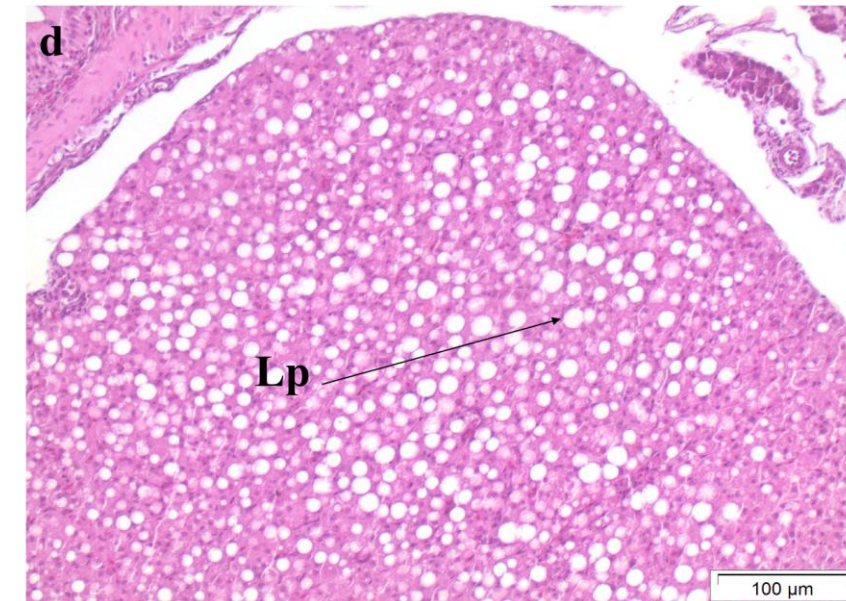
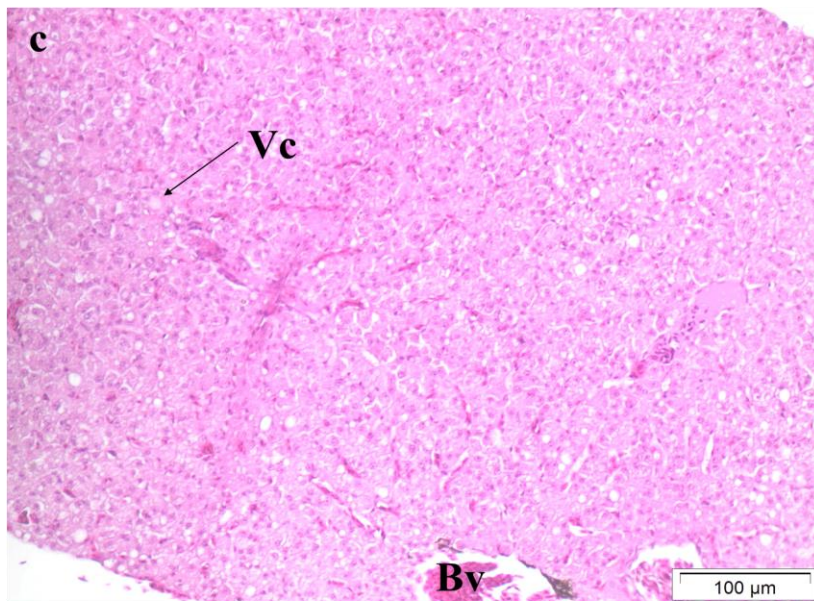




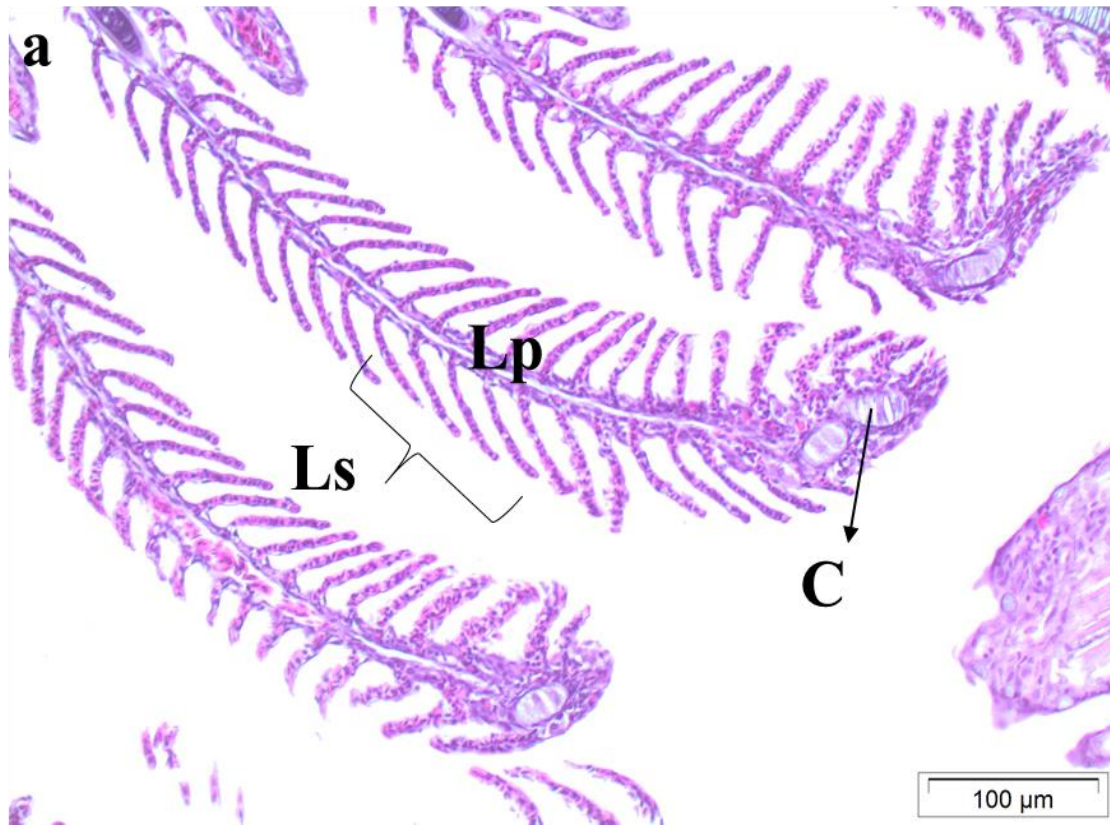
**Hígado
CONTROL**



**Hígado
EXPUESTOS**



Branquias CONTROL



Branquias EXPUESTOS



Figura 7. Cortes transversales de branquias de *P. dovii* después de la exposición a CPF (5.5 $\mu\text{g/L}$) + DFZ (325 $\mu\text{g/L}$) por 14 días. Estructura normal de branquias (A), se muestra cartílago (C) lamella primaria (Lp) y secundaria (Ls) sin lesiones. Estructuras branquiales con alteraciones histopatológicas (B): Hiperemia (Hp), fusion de laminillas (*); infiltraciones celulares (flecha) y acortamiento (Sh).

Análisis de datos

Semi-cuantitativo

- Observaciones
- Descripción por individuo

Cuantitativo

- Conteos por campo, índices
- Morfometría

Gracias

