

## Efecto agudo del carbofuran en juveniles de *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes 1835) (Atheriniformes: Atherinopsidae)

### Acute effect of carbofuran in *Chirostoma humboldtianum* juveniles (Atheriniformes: Atherinopsidae)

Octavio Abeja-Pineda<sup>1</sup>, Gerardo Figueroa-Lucero<sup>1</sup>✉, María Cecilia Hernández-Rubio<sup>2</sup> y Liliana Favari Perozzi<sup>3</sup>

Recibido: 12 de noviembre de 2021.

Aceptado: 05 de abril de 2023.

Publicado: diciembre de 2023.

#### RESUMEN

**Antecedentes:** Las poblaciones de *Chirostoma* han disminuido por pérdida de su hábitat, la introducción de especies exóticas y la contaminación. *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes, 1835) se registró en la cuenca de México, por última vez, en 1957. El carbofuran es un insecticida carbámico, sistémico de amplio espectro, por lo que su uso se ha prohibido en muchos países. Sin embargo, en México se utiliza ampliamente y sus efectos no se han evaluado en peces endémicos. **Objetivo:** Evaluar el efecto agudo del Carbofuran® en juveniles de *Chirostoma humboldtianum* a través de biomarcadores de neurotoxicidad y de estrés oxidativo en el cerebro, el hígado, las branquias y los músculos. **Método:** Se evaluó el efecto del carbofuran (0.0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mg/L, n = 10 y tres réplicas) en un ensayo estático, sin recambio de agua durante 96 h, en juveniles de siete meses de edad. Los peces se obtuvieron por fertilización *in vitro*, de reproductores mantenidos en cautiverio, certificados morfológica y genéticamente. **Resultados:** La CL<sub>50</sub> fue de 0.077 mg/L<sup>-1</sup> (0.028 – 0.118 mg/L<sup>-1</sup>,  $\alpha = 0.05$ ) a las 96 h de exposición. La actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) se inhibe en el cerebro y en el hígado. El nivel de lipoperoxidación (LPO) fue significativamente mayor en las branquias que en el hígado y los músculos ( $p < 0.05$ ). Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) presentan un patrón similar de activación en las branquias y el hígado. **Conclusiones:** El carbofuran causa daño neurotóxico y oxidativo, en juveniles de *C. humboldtianum* en concentraciones menores a las registradas en otras especies de peces.

**Palabras clave:** Carbofuran, estrés oxidativo, lipoperoxidación, neurotoxicidad.

#### ABSTRACT

**Background:** *Chirostoma* populations have diminished because of loss of their habitat, introduction of exotic species and pollution. *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes, 1835) was recorded in Mexico basin, for last time in 1957. Carbofuran is a carbamic insecticide, broad spectrum systemic; its use is prohibited in many countries. However, in Mexico, it is widely used and its effects has not been evaluated in endemic fish. **Goals:** Evaluate acute effect of Carbofuran® in juveniles of *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes, 1835) through neurotoxicity biomarkers and oxidative stress on brain, liver, gills and muscles. **Methods:** Effect Carbofuran (0.0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mg/L) was evaluated in a static essay during 96 h without renewal water on seven-months old juveniles. Fish were obtained by *in vitro* fertilization, from breeders in captivity, morphologically and genetically certified. **Results:** CL<sub>50</sub> was 0.077 mg/L at 96 h (0.028 – 0.118 mg/L<sup>-1</sup>,  $\alpha = 0.05$ ). Acetylcholinesterase activity (AChE) is inhibited in gills and liver. Lipoperoxidation level (LPO) was significantly higher in gills than liver and muscles ( $p < 0.05$ ). Superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) enzymes present a similar pattern in gills and liver. **Conclusions:** carbofuran causes neurotoxic and oxidative damage even at lower concentrations than those reported in other fish species.

**Keywords:** Carbofuran, lipoperoxidation, neurotoxicity, stress oxidative.

<sup>1</sup> Planta Experimental de Producción Acuicola, Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina. Ciudad de México, 09340. México.

<sup>2</sup> Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n. Col. Santo Tomás. Ciudad de México, 11340. México.

<sup>3</sup> Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Ciudad de México, 07360. México

#### \*Corresponding author:

Gerardo Figueroa-Lucero: e-mail: gfiguer@xanum.uam.mx

#### To quote as:

Abeja-Pineda, O., G. Figueroa-Lucero, M. C. Hernández-Rubio y L. Favari Perozzi. 2023. Efecto agudo del carbofuran en juveniles de *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes 1835) (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Hidrobiológica* 33 (3): 281-290.

DOI:10.24275/GUQB9526

## INTRODUCCIÓN

Uno de los grupos de contaminantes de mayor incidencia en los sistemas acuáticos y terrestres, lo constituyen los plaguicidas. Durante las últimas décadas, su uso se ha incrementado en todo el mundo, principalmente en países en desarrollo, con el fin de proteger los cultivos y al ser humano, de plagas y enfermedades (Lal *et al.*, 2013). Aunque algunos de ellos presentan una toxicidad selectiva en los sistemas terrestres, su uso generalizado ocasiona graves efectos nocivos en otras especies no blanco, incluyendo daño genético (Lal *et al.*, 2013; Nikoloff *et al.*, 2012).

Los sistemas acuáticos son uno de los reservorios finales de los plaguicidas, los que, por su composición química, concentración y sus metabolitos, pueden ocasionar efectos adversos sobre las respuestas fisiológicas, retraso en el crecimiento, reproducción o incrementar la mortalidad según el período de desarrollo de los animales (Dobšiková 2003; Ghazala *et al.*, 2014). Los efectos sinérgicos o las consecuencias de las interacciones entre dos o más contaminantes en el mismo organismo acuático son todavía pobremente entendidas (Pelletier 1986; Arcagni *et al.*, 2017; Amoatey *et al.*, 2019).

Las respuestas a los contaminantes en los organismos se han evaluado comúnmente a través de la mortalidad acumulada, medida como  $CL_{50}$ . En décadas recientes, se ha incorporado el uso de biomarcadores, como una alternativa útil para estimar los efectos de las sustancias tóxicas sobre los peces. Los biomarcadores son indicadores sensibles para detectar o diagnosticar efectos subletales, que demuestran que las sustancias tóxicas han ingresado a un organismo y se han distribuido en sus tejidos, produciendo daños al ADN, al sistema endócrino, cambios en la función reproductiva, en la disminución del crecimiento, que se reflejan en la sobrevivencia (Livingstone, 2003; Van der Oost *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2005).

El Carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7benzofuranol N-metil carbamato) es un insecticida carbámico sistémico de amplio espectro; se utiliza comúnmente para eliminar plagas agrícolas, presenta una toxicidad selectiva sobre insectos, ácaros y nemátodos por contacto e ingestión (Ensibi *et al.*, 2012; Barbieri *et al.*, 2017). Sin embargo, su uso generalizado ocasiona graves efectos, que incluye daño genético en otras especies no objetivo, como peces e invertebrados acuáticos, abejas, aves y mamíferos (Collective SPA, 2002; Clasen *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2015). Debido a que es uno de los insecticidas con mayores implicaciones negativas globales sobre la vida silvestre, ha sido prohibido por la USFDA en los Estados Unidos de América y Europa (Gupta 2009; USFDA 2014), pero se utiliza ampliamente en México.

El carbofuran es altamente tóxico para los peces, diversos estudios con diferentes períodos de exposición han reportado  $CL_{50}$  menores a 1 mg/L (Trotter *et al.*, 1991). De acuerdo con la EPA (2002), *Oncorhynchus mikiss* y *Cyprinus carpio* presentan  $CL_{50}$  entre 0.8-0.9 mg/L. Por otro lado, se han obtenido  $CL_{50}$  de 0.2245 mg/L en *Poecilia reticulata* después de 96 h de exposición. En *Carassius auratus* no se observaron muertes después de 48 h con 0.5 mg/L de carbofuran. Sin embargo, esta concentración representa la  $CL_{50}$  a 96 de exposición para *Cyprinus carpio* (Bretaud *et al.*, 2000; Dobšiková 2003). Esto indica que la tolerancia al carbofuran es variable y específica.

En México, el carbofuran se utiliza ampliamente en los cultivos agrícolas y representa un riesgo de contaminación para la biota acuá-

tica. El efecto más importante ocasionado por los plaguicidas carbámicos sobre los peces, es el daño en el sistema nervioso, éste se debe principalmente a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Casida & Quistad, 2004), la cual sobre estimula la actividad neurológica de los peces (Iannacone *et al.*, 2011). Por otro lado, en las sinapsis nerviosas y uniones neuromusculares, la inhibición de la enzima AChE, causa una hiper-activación de los receptores de acetilcolina (muscarínico y nicotínico) y puede causar la muerte debido a la tetanización del músculo, además de insuficiencia respiratoria (Ray & Ghosh, 2006). La intoxicación aguda en virtud de la inhibición reversible (carbamilación) de la AChE es una de las alteraciones mayormente reportada para el carbofuran sobre los peces (Casida 1963; O'Brien, 1967).

La peroxidación lipídica es otra forma de intoxicación por los radicales libres; en este sentido, se han estudiado algunos insecticidas y herbicidas como inductores de estrés oxidativo, que originan efectos negativos sobre los lípidos, las proteínas de las membranas celulares, inhiben la actividad y la integridad estructural de las enzimas antioxidantes, comprometiendo la eficacia del sistema inmune de los peces (Lushchack, 2011; Ranjbar, 2014). Sobresalen por sus efectos, la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) por lo que han sido las más estudiadas; entre las no enzimáticas, el ácido ascórbico (vitamina C), el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), el glutatión (GSH), los  $\beta$ -caroteno (vitamina A) y los flavonoides (Ochoa & González, 2008).

El género *Chirostoma* Swainson, 1839 es endémico de México, pertenece a la familia Atherinopsidae y conforma un conjunto de especies con un origen monofilético, que se originó en un tiempo muy corto, en un área geográfica relativamente pequeña, cuya diversificación y especiación se remonta a 0.520 millones de años en la Mesa Central de México (Echelle & Echelle, 1984; Bloom *et al.*, 2013).

*Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes, 1835) es la primera especie íctica descrita por la ciencia en México. Es una de las especies de peces blancos que conserva el patrón de distribución más antiguo del género *Chirostoma* y se considera la especie basal de los peces blancos (Barbour 1973; Paulo-Maya *et al.*, 2000; Bloom *et al.*, 2013; Campanella *et al.*, 2015).

Esta especie es de hábitats lacustres y se distribuye actualmente, de manera discontinua en sistemas lénticos, desde el Estado de México hasta Nayarit, a lo largo del sistema Lerma-Santiago. Esta región se caracteriza por un alto grado de desarrollo agrícola, urbanización e industrialización. Estos procesos afectan en diferente grado, la calidad del aire, del agua, del suelo y a las comunidades naturales que habitan en el mismo (Hernández-Rubio *et al.*, 2006). Particularmente la cuenca del Sistema Lerma Santiago, se ha considerado una de las más contaminadas de México y sus efectos no sólo se restringen a las poblaciones de peces, sino que incluyen a las comunidades humanas que habitan las zonas ribereñas, entre otros (Priego *et al.*, 2004).

En algunas especies del género, como *Chirostoma jordani* Woolman 1894, se han registrado cambios en la actividad enzimática (Dzul-Caamal *et al.*, 2014), así como la inhibición de la acetilcolinesterasa por insecticidas organofosforados y la toxicidad del cloruro de cadmio en embriones de *C. humboldtianum* (Altamirano-Lozano *et al.*, 2005).

El presente trabajo aborda el análisis del efecto del Carbofuran en juveniles de *C. humboldtianum*, a través de la mortalidad ( $CL_{50}$ ), de biomarcadores de neurotoxicidad y de estrés oxidativo de exposición directa, sobre el cerebro, el hígado, las branquias y los músculos. Así

mismo, se espera lograr conocimientos más amplios sobre el efecto de los insecticidas carbámicos sobre otras especies de peces, tomando como base a *C. humboldtianum*, especie con gran importancia, tanto ecológica como económica en México.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Tóxico.** Se evaluó el efecto de cinco concentraciones (0.0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 mg/L) de Carbofuran (Furadan® 350L.) (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato; pureza de 33.21%, CAS: 1563-66-2) por dilución de una solución patrón de 137 µl en 100 ml de etanol absoluto (J.T.Baker®); la cantidad del solvente en los acuarios fue mínima, por lo tanto no se consideró un grupo control para el solvente (Ensibi *et al.*, 2012). Las concentraciones se determinaron por bioensayos previos y tomando en consideración las CL<sub>50</sub> ya establecidas para carbofuran, en otras especies de peces de agua dulce. Así mismo, se siguieron los protocolos establecidos en el marco de pruebas de toxicidad de la Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (USEPA 2002) y de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD 2012) para el desarrollo del experimento.

**Organismos de prueba.** Se utilizaron juveniles de *C. humboldtianum* de siete meses de edad,  $7.45 \pm 0.3$  cm y  $2.76 \pm 0.2$  g. Se obtuvieron por fertilización *in vitro*, de reproductores en cautiverio, certificados morfológica y genéticamente. Para la obtención de los huevos se emplearon 6 hembras y 12 machos. Los embriones se mantuvieron en agua con una dureza de  $120 \pm 20$  mg/L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>, con una salinidad de 4 g/L NaCl, a  $20 \pm 1$  °C, pH  $8 \pm 0.5$  y un fotoperíodo de 12:12 hasta su eclosión. Las larvas se alimentaron con *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786) (Rotifera) y *Artemia franciscana* Kellog, 1906 (Anostraca); los juveniles se alimentaron con neonatos de *Daphnia pulex* Linnaeus, 1758 (Cladocera), larvas de *Chironomus plumosus* (Linnaeus, 1758) (Diptera), anfípodos *Hyaella azteca* (Saussure, 1858) (Amphipoda) y alimento balanceado hasta los siete meses de edad. Los juveniles de esta edad, se trasladaron a acuarios de 40 L, 24 h antes de ser utilizados en el bioensayo. No se les proporcionó alimento durante el tiempo de exposición al tóxico. Los peces fueron del tamaño adecuado para obtener la cantidad de tejidos (branquias, músculo, hígado y cerebro) necesarios para la cuantificación enzimática.

Todos los organismos se trataron de acuerdo con la guía ética de la norma oficial mexicana, que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

**Diseño experimental.** Se realizó un bioensayo agudo de tipo estático, sin recambio de agua, en acuarios de 40 L, con agua reconstituida con una dureza de  $120 \pm 20$  mg/L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> (EPA 1993), a  $20 \pm 1$  °C, con aireación constante ( $4.0 \pm 6.5$  mg/L O<sub>2</sub>), pH  $8 \pm 0.5$  y fotoperíodo 12:12. Se emplearon diez organismos por tratamiento: 0.0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, mg/L<sup>-1</sup> de carbofuran, con tres réplicas. Se realizó el registro de la mortalidad y efectos visibles durante las 96 horas de exposición, retirando los individuos muertos al momento de ser detectados.

Al finalizar el tiempo de exposición, los organismos sobrevivientes en cada tratamiento se sacrificaron por bloqueo medular, vía craneal a la altura del opérculo. Se extrajeron los tejidos (branquias, cerebro, hígado y músculo) que se mantuvieron a -80°C Centígrados. Para el análisis bioquímico se utilizaron los tejidos de cinco individuos, se maceraron y

homogeneizaron en agua tridestilada, con un homogeneizador eléctrico (Biospecific product, Inc. Model 398).

**Determinación bioquímica de las enzimas.** La actividad enzimática se determinó en alícuotas de homogeneizados al 10% (peso/volumen) de cada uno de los órganos, por duplicado y las lecturas se realizaron con un espectrofotómetro Spectronic 20-D®. La actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) se cuantificó en el cerebro y el hígado, mediante la técnica de Hestrin (1949). Se emplearon alícuotas de 1 mL del homogeneizado, al 10 % y a 4°C y se centrifugaron a 3500 revoluciones por minuto (rpm) por 15 minutos. Se tomó 1 mL del sobrenadante, se añadieron 2 mL de Tris-HCL (0.02 N, pH 7) y 1.0 mL de acetilcolina 8 mM. Se agitó y se incubó a 25 °C durante 20 minutos. Para detener la reacción, se agregó 1 mL de hidroxilamina alcalina 2 M, 1 mL de ácido clorhídrico 4 N, y 1 mL de cloruro férrico 0.37 M, disuelto en ácido clorhídrico 0.1 N. Se centrifugó a 3000 rpm por 5 min y se midió la absorbancia a 540 nm.

El nivel de lipoperoxidación (LPO) se determinó en las branquias, el hígado y el músculo, siguiendo el método de Buege & Aust (1978). Se empleó 0.5 g. de cada tejido y se homogeneizaron por separado, con 5 mL de agua tridestilada. A 300 mL de cada homogeneizado, se agregaron 700 mL de Tris-HCL 150 mM (pH 7.4) y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 2 mL de ácido barbitúrico (TBA) al 0.375% disuelto en ácido tricloroacético al 15%, a cada muestra y se mantuvieron a ebullición durante 45 minutos. La mezcla, una vez fría, se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y la absorbancia se leyó a 532 nm. El nivel de lipoperoxidación se midió en nanomoles de malondialdehído/miligramo de proteína (MDA/mg proteína) con un coeficiente de extinción molar de  $1.56 \times 10^5$  /M cm.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se determinó en las branquias, el hígado y el músculo por el método de Sun *et al.* (1988). Se emplearon alícuotas de 1.5 mL del homogeneizado al 10% y a 4°C; se filtró a través de una gasa y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos. Se tomaron 0.5 mL del sobrenadante y se agregaron 1.5 mL de agua tridestilada. Posteriormente, se añadieron 8 mL de 3:5 cloroformo/etanol. Se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min, a 4°C. Se transfirieron 0.5 mL del sobrenadante a 2.5 mL de la mezcla compuesta de xantina 0.1 mM, ácido dietiltriampinopentaacético (DETAPAC) 1 mM, 50 mg de albúmina sérica, nitrozultetrazoilo 25 µM, ácido disulfónico bathocuproine 250 µM y carbonato de sodio 40 mM (pH 10.2). La reacción se inició con la adición de 20 U/mL de xantina oxidasa y se incubó a 25°C durante 20 minutos. Se terminó la reacción con 1 mL de cloruro cúprico 0.8 mM; la absorbancia se midió a 560 nm y la actividad de la SOD se midió en unidades totales/mg de proteína.

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) se determinó en las branquias, el hígado y el músculo, mediante el método de Lawrence & Burk (1976) con hidroperóxido de cumeno como sustrato. Se filtró una alícuota de 1.5 mL del homogeneizado al 10%, a 4 °C y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos. La mezcla de reacción se conformó por 200 mL del sobrenadante del homogeneizado, 2 mL de buffer de fosfatos 75 mM (pH 7.0), 50 mL de glutatión 60 mM, 0.1 mL de la glutatión reductasa 30 U/mL, 0.1 mL de sal disódica de EDTA 15 mM, 0.1 mL del fosfato de β-nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) 3 mM, y 0.45 mL de H<sub>2</sub>O, con un volumen final de 3.0 mL. La reacción se inició con 0.1 mL de hidroperóxido de cumeno 45 mM. La conversión de NADPH a NADP<sup>+</sup> se midió continuamente a 340 nm durante 4 minutos. La actividad de la GPx se expresa en nmol NADPH oxidado a NADP<sup>+</sup>/

min/mg de proteínas, con un coeficiente de extinción de  $6.22 \times 10^6 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . El contenido de proteínas se estimó por el método de Bradford (1976) y se utilizó albúmina sérica bovina como estándar, mismas que se emplearon en el procesamiento de la actividad enzimática.

**Análisis estadístico.** Una vez obtenida la relación de organismos muertos y vivos en cada concentración, se determinó la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) con la mortalidad acumulada en cada concentración, mediante el método probit XLstat v.101 (Addinsoft, 2014). El efecto del carbofuran sobre la sobrevivencia final de los juveniles se evaluó a través de un ANOVA de una vía, tipo I ( $\alpha = 0,05$ ), previa normalización de los resultados (arcoseno Öpi).

Para determinar el efecto del carbofuran sobre la actividad enzimática en cada tejido, se aplicó un ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ) y posteriormente, una comparación múltiple de medias, por el método de Tukey (Zar 1984).

Los resultados de la actividad de la AChE se expresaron en porcentajes de inhibición/estimulación de la Acetilcolinesterasa vs. el control y se calculó con base en la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ), de la muestra de prueba y el control, siguiendo la ecuación:  $I\mu i = ((\mu c - \mu i) / \mu c) * 100$  (ISO 8692, 2004).

donde:

$I\mu i$  = porcentaje de inhibición para la concentración de estudio de la prueba  $i$

$\mu i$  = tasa de crecimiento promedio para la concentración de estudio de la prueba  $i$

$\mu c$  = tasa de crecimiento promedio para el lote control

Un valor negativo de  $I\mu i$  significa estimulación de la actividad de AChE; un valor positivo significa inhibición de la actividad de la AChE.

### RESULTADOS

**Concentración letal media CL50.** La CL50 fue de 0.077 mg/L (0.028 - 0.118  $\text{mg/L}^{-1}$ ,  $\alpha = 0.05$ ) a 96-h (Tabla 1). Se presentó el 100% de mortalidad en la concentración más alta de carbofuran (0.4 mg/L), por lo que estos individuos no se consideraron para el análisis enzimático. En el grupo control no se presentó muerte de organismos, no se observaron cambios en el nado ni lesiones musculares o en las aletas.

**Inhibición/Estimulación de la Acetilcolinesterasa (AChE).** El efecto neurotóxico del carbofuran en el cerebro de *C. humboldtianum*, evalua-

do mediante la inhibición/estimulación de la enzima acetilcolinesterasa, presentó un patrón inverso con respecto a las concentraciones de carbofuran. La mayor inhibición (41.30 %, 37.90%) se observó en las concentraciones de 0.025 mg/L y 0.05 mg/L. En las concentraciones más altas (0.1 mg/L y 0.2 mg/L), la inhibición fue de 28.22% y 5.62%, respectivamente (ANOVA  $p < 0.05$ ). En el hígado, la respuesta de la AChE se incrementó con el aumento en la concentración del tóxico (ANOVA  $p < 0.05$ ). Se observó una estimulación de -21.77% de la AChE en la concentración 0.2 mg/L de carbofuran; en las concentraciones de 0.025 mg/L y 0.1 mg/L, la estimulación de la AChE fue de -0.073% y -3.002%. Sin embargo, en la concentración de 0.05 mg/L se presentó una inhibición en la actividad de acetilcolinesterasa de 7.48% (Fig. 1).

**Nivel de Lipoperoxidación (LPO).** En el nivel de LPO se observó un incremento proporcional al incremento de las concentraciones del carbofuran, en los tejidos analizados de *C. humboldtianum*. En las branquias se registraron los niveles más altos (0.33, 0.32, 0.49 y 0.84 nmol MDA/mg de proteína) respectivamente (ANOVA  $p < 0.05$ ). En el tejido de los músculos el nivel de LPO fue de (0.20, 0.29, 0.17 y 0.16 nmol de MDA/mg de proteína) (ANOVA  $p < 0.05$ ), lo cual indica que el nivel de LPO disminuye ligeramente en las concentraciones más bajas de carbofuran. Mientras que en el hígado, el nivel de peroxidación lipídica fue de 0.07 nmol de MDA/mg de proteína en la concentración de 0.2 mg/L; en las concentraciones menores de carbofuran, el nivel de LPO fue inferior a los valores registrados para el hígado de los organismos control (ANOVA  $p < 0.05$ ) (Fig. 2).

**Actividad de la Superóxido dismutasa (SOD).** La respuesta antioxidante de la enzima SOD presentó una tendencia a aumentar con el incremento de las concentraciones del carbofuran (ANOVA  $p < 0.05$ ). En las branquias se observó la mayor actividad de la enzima (0.0027, 0.0019, 0.0024 y 0.0024 Unidades/mg proteína); el hígado fue el segundo órgano en donde la actividad de la SOD fue de 0.0018, 0.0019, 0.0021 y 0.0024 Unidades/mg proteína. Finalmente, en el músculo se determinó una actividad menor: 0.0017, 0.0009, 0.0017 y 0.0019 Unidades/mg proteína (Fig. 3).

**Actividad de la Glutación peroxidasa (GPx).** En el hígado, se presentó un incremento notable en la actividad de la GPx, con respecto al testigo, pero en relación inversa a las concentraciones del carbofuran (4.41, 3.10, 4.30, y 3.80 n mol NADPH/min mg de proteína, respectivamente). Una respuesta semejante se registró en los músculos con respecto al grupo control, aunque en las concentraciones menores del tratamiento (0.21, 0.26, 0.18, y 0.11 nmol NADPH/min mg de proteína). La actividad de la Gpx en las branquias, se observó un ligero incremento en relación al aumento de las concentraciones del carbofuran (0.56, 0.91, 0.60, 0.75 nmol NADPH/min mg de proteína) (ANOVA  $p < 0.05$ ) (Fig. 4).

Tabla 1. Toxicidad aguda de Carbofuran en *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes 1835)

Compuesto	Ecuación de la Regresión	Toxicidad aguda		Media LC50
		Intervalos de confianza 95%		
	$y = ax + b$	Inferior	Superior	mg/L
		mg/L	mg/L	
Carbofuran	$0.7613x + 1.3279$  $R^2 = 0.9912$	0.028	0.118	0.077

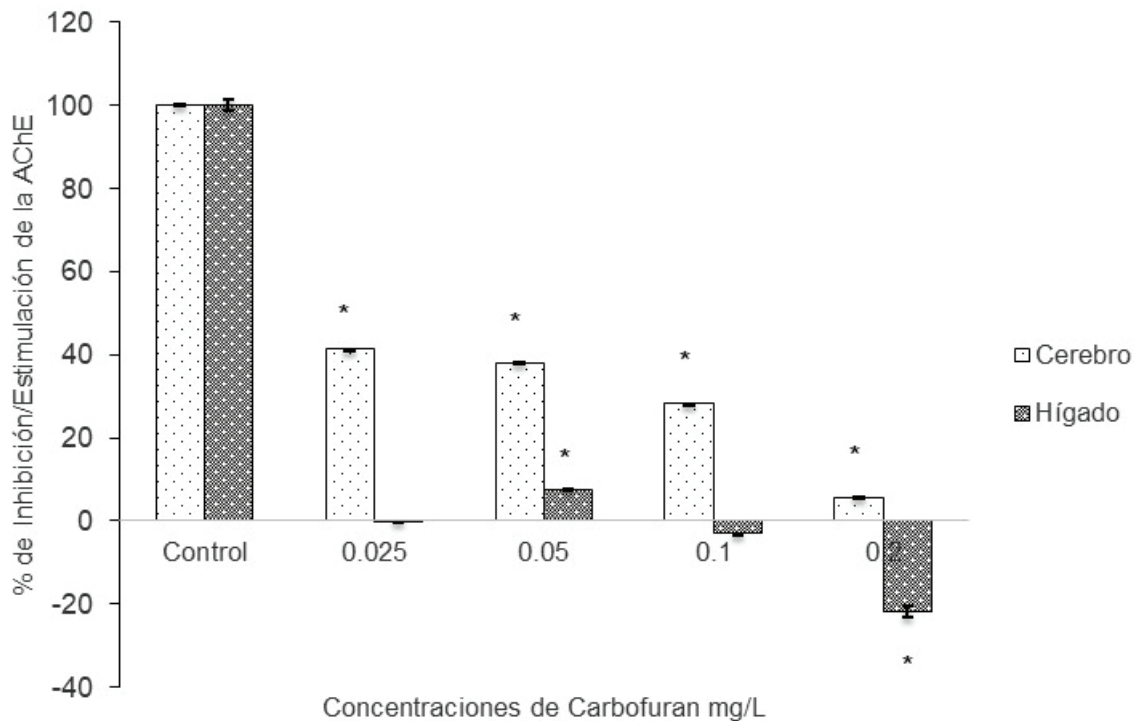


Figura 1. Inhibición/Estimulación de la acetilcolinesterasa (%) en el cerebro y el hígado de juveniles de *Chirostoma humboldtianum*, expuestos a diferentes concentraciones de carbofuran por 96 h. n=5, las barras muestran el error estándar, \* diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Los plaguicidas son los compuestos que se encuentran en mayor concentración en los sistemas acuáticos, con mayor frecuencia, debido a su extenso uso en las actividades agrícolas, industriales y domésticas. Sin embargo, poco se sabe del efecto que estos agroquímicos ocasionan en las especies de peces endémicas de México. Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen el primer estudio sobre la toxicidad del carbofuran en *C. humboldtianum*.

Los juveniles mostraron una sensibilidad muy alta al carbofuran, ya que la  $CL_{50}$  (0.077 mg/L/96 h) se encuentra por debajo de los valores de  $CL_{50}$  determinados para otras especies de peces, como en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (22-29 mg/L/96 horas) y en la carpa dorada (*Carassius auratus*) (1.75 mg/L/96 h) (Yi *et al.*, 2006).

Los resultados en la acetilcolinesterasa muestran que los carbamatos poseen la capacidad de inhibir o estimular la actividad de la enzima tanto en el cerebro como en el hígado de *C. humboldtianum*, cuyo efecto se expresa de forma distinta en cada órgano, lo cual se relaciona con las funciones que cada uno de ellos desempeña.

El primer paso en el proceso de inhibición de la AChE por un éster de un organofosforado o un carbamato, involucra la formación del complejo enzima-inhibidor, con la posterior carbamitación del hidroxilo de serina (Fukuto, 1990). Cuando se inhibe la actividad de la enzima, la acetilcolina no se descompone en colina y ácido acético, lo que ocasiona que se acumule en las uniones sinápticas o neuromusculares y altera el funcionamiento del sistema nervioso y, en consecuencia,

afecta la locomoción y el equilibrio de los peces (Dutta & Arends, 2003). En *C. humboldtianum* se observó que la inhibición/estimulación de la acetilcolinesterasa no sólo causa la pérdida del equilibrio en el nado de los peces; sino que, como efecto de la tetanización y contracciones musculares, se producen lesiones en el músculo y las aletas que conlleva a necrosis del pedúnculo caudal.

Así mismo, se ha registrado que el carbofuran inhibe la actividad de la AChE en cerebro y en músculo de peces de agua dulce y de agua salobre (*Carassius auratus*, Bretaud *et al.*, 2000; *Ciprinus carpio*, Dembelé *et al.*, 2000; *Channa punctatus*, Jash & Bhattacharya, 1983). Por otro lado, Favari *et al.* (2003), reportan inhibición de la AChE en el hígado y el músculo de *Xiphophorus helleri* expuestos al efecto tóxico del agua de un embalse contaminado por compuestos de uso agrícola y desechos municipales.

Otros estudios también han reportado variaciones en la actividad de AChE en diferentes órganos de peces expuestos a diferentes insecticidas en *Cyprinus carpio* con paraquat (Nemcsók *et al.*, 1984), en *Ictalurus punctatus* con clorpirifos y paration (Straus & Chambers, 1995), en *Rhamdia quelen* con glifosato (Glusczak *et al.*, 2007), en *Prochilodus lineatus* con el herbicida Roundup, un organofosforado (Modesto & Martínez, 2010).

La peroxidación lipídica es uno de los mecanismos más importantes de la acción tóxica de los insecticidas ya sea organofosforados o carbamatos (Glusczak *et al.*, 2007). La lipoperoxidación se inicia por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que atacan a todas las mo-

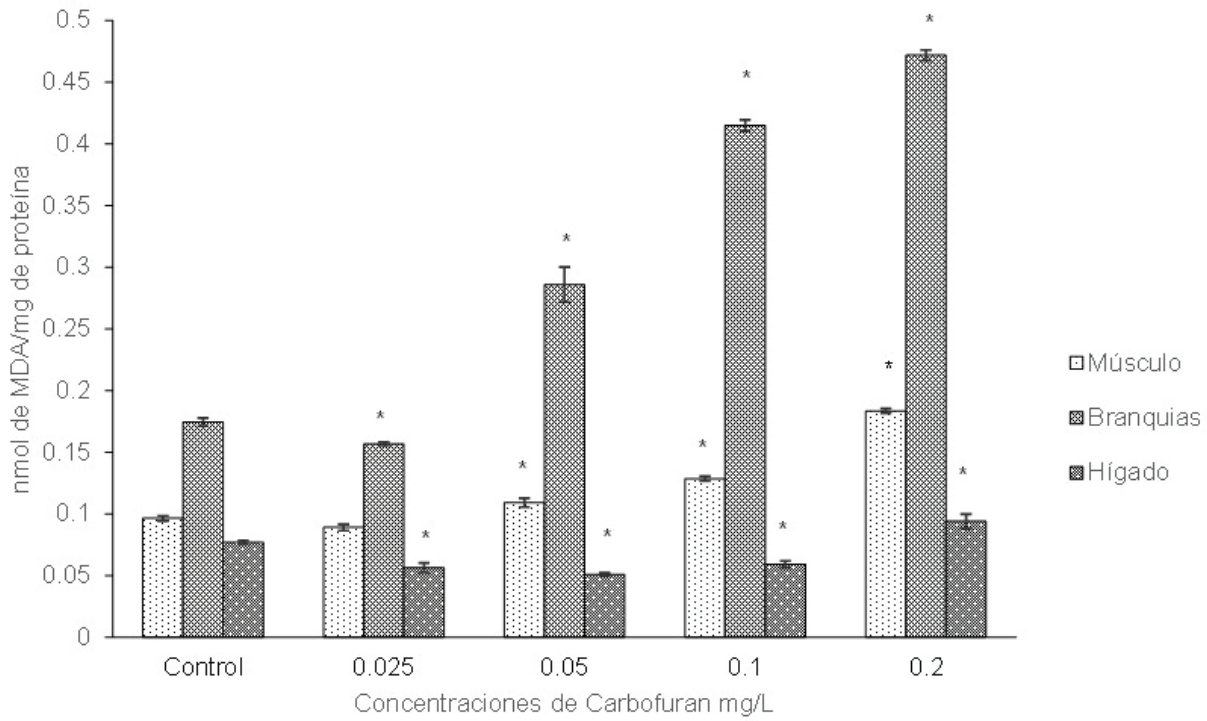


Figura 2. Nivel de liperoxidación en músculo, branquias e hígado de *Chirostoma humboldtianum*. n=5, las barras muestran el error estándar, \*diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

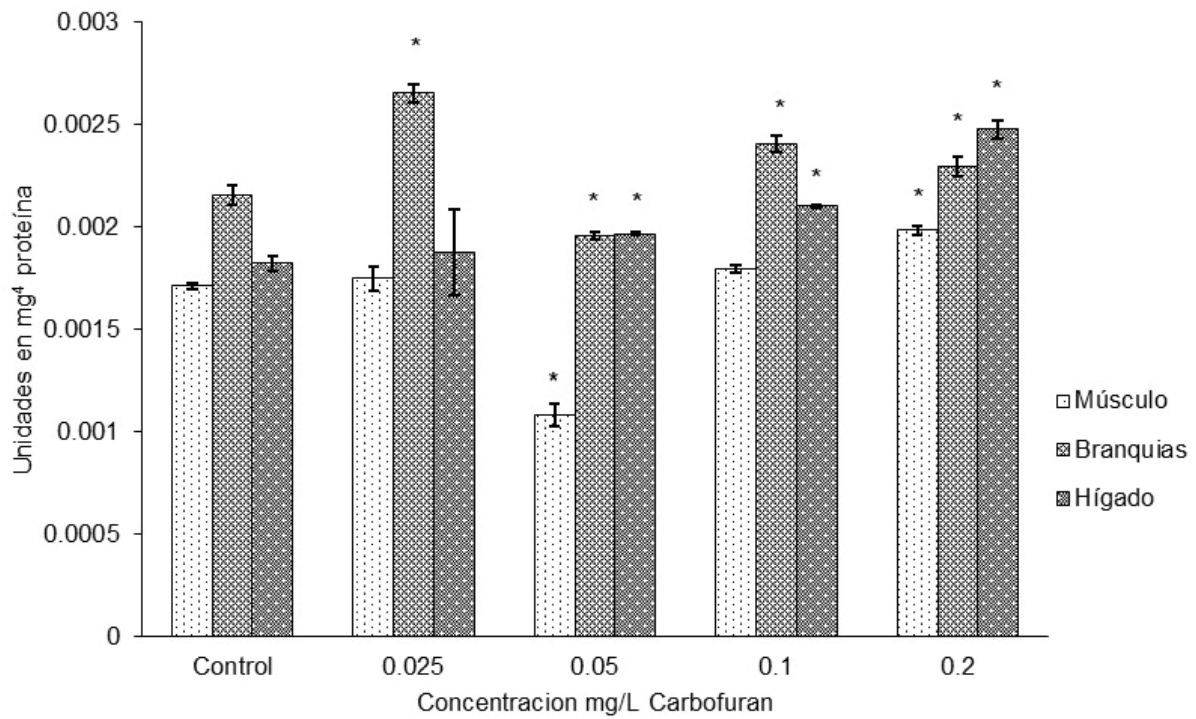


Figura 3. Actividad de la SOD en músculo, branquias e hígado de *Chirostoma humboldtianum*. n=5, las barras muestran el error estándar, \*diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

lécúlas biológicas; incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, ya que extraen un hidrogeno y los convierten, por una serie de reacciones posteriores, en aldehídos reactivos como el malondialdehído (MDA), el principal producto de la peroxidación. Al presentarse en los lípidos de las membranas celulares, se altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica, que conduce a una inestabilidad de la membrana y causa daño y muerte celular (Halliwell & Chirico, 1993; Ochoa & González, 2008). Los resultados obtenidos en el presente estudio indican daño peroxidativo debido al carbofuran, el cual se reflejó en el incremento del nivel de la peroxidación lipídica en branquias y músculo, dos de los principales órganos afectados por las especies reactivas de oxígeno. Esto se debe a que la exposición directa de las branquias a los plaguicidas disueltos durante el intercambio gaseoso altera su función celular. Por otro lado, el tejido muscular de los peces puede ser afectado por la absorción cutánea al estar en contacto directo con el insecticida disuelto (Heath, 1995).

Sin embargo, en el hígado debido a su función de desintoxicación no se presentaron diferencias significativas en el nivel de LPO con respecto a los valores del control. Esto confirma la eficiencia de este órgano, para contrarrestar el impacto de los peróxidos y especies reactivas generados por la exposición a los contaminantes. En el hígado se genera la mayor cantidad de radicales libres, debido a las reacciones oxidativas y por consiguiente, presenta la mayor actividad enzimática antioxidante (Güll *et al.*, 2004, Avci *et al.*, 2005). Además, el hígado es el órgano más resistente al daño por radicales libres (Atli & Canli, 2010). De acuerdo con esto, la actividad enzimática hepática de la SOD y la GPx se incrementó posiblemente, como una reacción ante la presencia

de peróxidos y las especies reactivas, lo cual evitó un nivel mayor de peroxidación lipídica en este órgano. Sin embargo, se debe considerar que cada una de las enzimas antioxidantes presenta mecanismos de reacción, en los que intervienen procesos de activación e inactivación de las enzimas, además de la carbonilación de las proteínas, debido a la acción directa de la formación de radicales libres que pueden causar la pérdida en la actividad de las enzimas y la alteración de las proteínas de las membranas (Modesto & Martínez, 2010).

La peroxidación lipídica está asociada a la presencia de radicales libres y un exceso de éstos, puede activar o inactivar a las enzimas antioxidantes como la SOD y la GPx, entre otras (Modesto & Martínez, 2010). La SOD es la responsable de catalizar al radical superóxido reactivo (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y la GPx participa en la reducción de peróxido de hidrógeno, en oxígeno y agua (Atli & Canli, 2010).

La actividad de la SOD y la GPx indica la presencia de especies reactivas, generadas durante los procesos de biotransformación de los metabolitos y reaccionan de manera diferente en los tejidos. La SOD es la primera barrera del mecanismo de defensa antioxidante ante la presencia de iones superóxidos. Un abatimiento en la actividad de la SOD indica que la capacidad antioxidante de la enzima fue superada por productos superóxidos, como se observó en el músculo y en el hígado de *C. humboldtianum*. Lo anterior coincide con la disminución en la actividad de la SOD en tejidos de tilapias expuestas a oxyfluorfen y en *Carassius auratus* a triclorofenol señalados por (Peixoto *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2007) respectivamente.

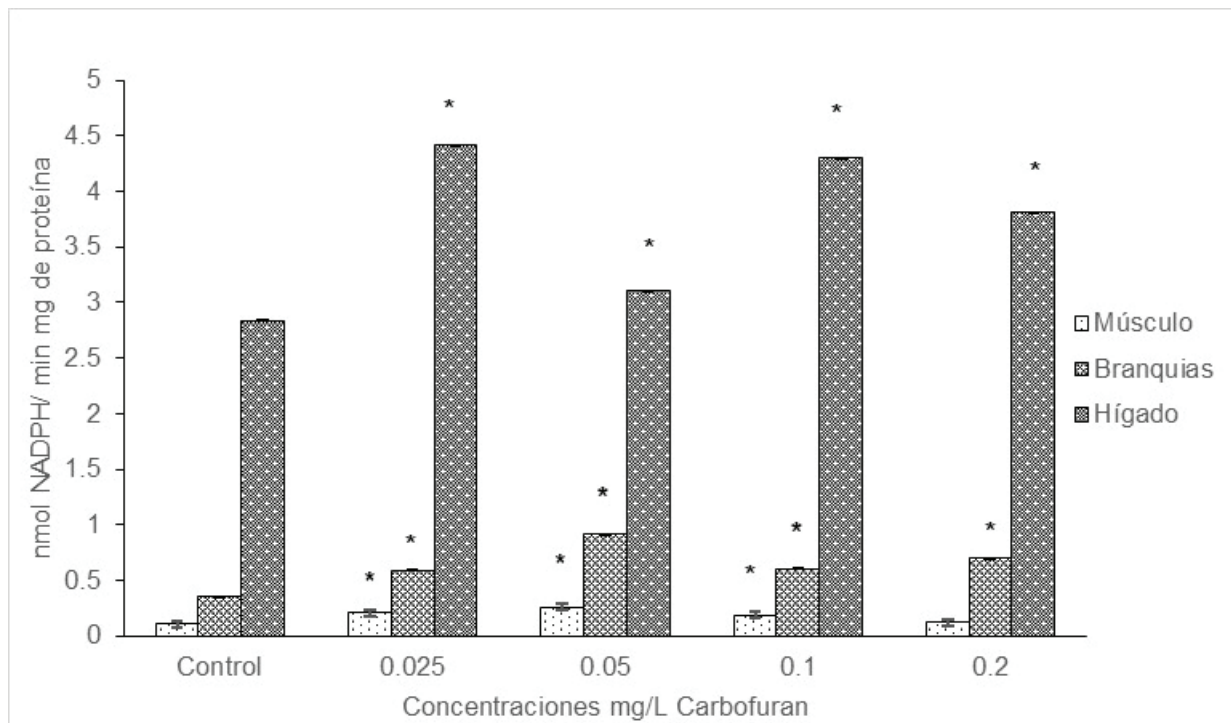


Figura 4. Actividad de la GPx en músculo, branquias e hígado de juveniles de *Chirostoma humboldtianum*. n=5, las barras muestran el error estándar, \*diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Así mismo, el aumento de la actividad de la GPx y la disminución en el nivel de LPO en el hígado de *C. humboldtianum*, muestra la eficacia de este órgano en la neutralización y transformación de los peróxidos e hidroperóxidos orgánicos para su fácil eliminación. Sin embargo, las branquias y el músculo no respondieron de la misma manera, ya que la baja actividad de la glutatión peroxidasa demuestra la incapacidad del sistema antioxidante en estos órganos, para la neutralización y detoxificación de los peróxidos, dando como resultado un aumento en el nivel de lipoperoxidación. Lo anterior coincide con los resultados de Ahmad *et al.*, 2000, donde señalan una capacidad menor de las branquias y los riñones para neutralizar el impacto de los peróxidos y especies reactivas generadas por contaminantes industriales en *Channa punctatus*.

El presente trabajo es uno de los primeros registros de la evaluación de la toxicidad por insecticidas en especies de peces nativos de México. Aún cuando todas las especies de *Chirostoma* presentan un alto grado de irritabilidad durante su manejo, que pudiera alterar su respuesta fisiológica ante el estrés, los resultados demuestran que las concentraciones probadas de carbofuran causan la muerte, además de daño neurotóxico y oxidativo en juveniles de *C. humboldtianum*, en concentraciones inferiores a las probadas en otras especies de peces.

Por otro lado, en este trabajo se analizaron los efectos del carbofuran sobre juveniles debido a que, en tallas menores, la cantidad de tejido no permite cuantificar el efecto, pero es de esperarse un efecto negativo mayor en larvas y juveniles más pequeños. Durante mucho tiempo, se ha argumentado que la disminución del tamaño de las poblaciones del género *Chirostoma* y su estatus en peligro de extinción, se debe a la falta de regulación de sus pesquerías y a la contaminación de los cuerpos de agua donde habitan. Sin embargo, no existen estudios que permitan demostrar lo segundo. En este caso, se demuestra la alta sensibilidad de *C. humboldtianum* al carbofuran y el efecto negativo de uno de los insecticidas de mayor uso en la agricultura en México y en el mundo. Las lesiones graves de este tóxico a los órganos blanco-probados demuestran la necesidad de desarrollar programas que permitan evaluar los efectos de los insecticidas sobre las especies de peces nativas y endémicas de importancia ecológica y económica, así como también, analizar exhaustivamente la calidad del agua de los sitios de distribución de las especies.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación forma parte de la tesis doctoral del primer autor del Posgrado en Energía y Medio Ambiente de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México y fue financiada por el proyecto **CD. CBS.486.2021**. y por el programa de becas a estudiantes de posgrado de la UAM-Iztapalapa.

## REFERENCIAS

- ADDINSOFT. 2014. XLSTAT. Statistical Software. BroNY, USA: Addinsoft, Inc.
- AHMAD, I., T. HAMID, M. FATIMA, H. S. CHAND, S. K. JAIN, M. ATHAR & S. RAISUDDIN. 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochemica et Biophysica Acta* 1523 (1):37-48. DOI: 10.1016/S0304-4165(00)00098-2
- ALTAMIRANO-LOZANO, M. A., D. TOLEDO-HERRERA, A. RODRÍGUEZ C. & G. FIGUEROA-LUCERO. 2005. *Chirostoma humboldtianum* como modelo *in Vitro* para el estudio de embriotoxicidad de metales pesados. I. Cloruro de Cadmio. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* (21): 71-77. DOI:10.20937/RIC.2018.34.04.13
- AMOATEY, P. & M. S. BAAWAIN. 2019. Effects of pollution on freshwater aquatic organisms. *Water environment Reserch* 91: 1272-1287. DOI:10.1002/wer.1221
- ARCAGNI, M., A. RIZZO, R. JUNCOS, M. PVLIN, L. M. CAMPBELL, M. A. ARRIBÉRE, M. HORVAT & S. RIBEIRO-GUEVARA. 2017. Mercury and selenium in the food web of Lake Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina. *Chemosphere* 166: 163-173.
- ATLI, G. & M. CANLI. 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 (8): 1884-1889. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2010.09.005
- AVCI, A., M. KAÇMAZ & I. DURAK. 2005. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60 (1): 101-105. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2003.10.003
- BARBIERI, E., K. RUÍZ-HIDALGO, K. F. O. REZENDE, A. F. G. LEONARDO. & F. P. SABINO. 2017. Efectos del carbofuran en juveniles de *Oreochromis niloticus* en la toxicidad, metabolismo de rutina y los parámetros hematológicos. *Boletim do Instituto de Pesca* 43(4): 513-526. DOI: 10.20950/1678-2305.2017v43n4p513
- BARBOUR, C. D. 1973. The Systematics and evolution of the genus *Chirostoma Swainson* (Pisces: Atherinidae). *Tulane Studies in Zoology and Botany* 18 (3), 97-141.
- BLOOM, D. D., J. T. WEIR, K. R. PILLER & N. R. LOVEJOY. 2013. Do freshwater fishes diversify faster than marine fishes? A test using state-dependent diversification analyses and molecular phylogenetics of new world silversides (Atherinopsidae). *Evolution* 67: 2040-2057. DOI: 10.1111/evo.12074
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- BRETAUD, S., J. P. TOUTANT & P. SAGLIO. 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47 (2): 117-124. DOI: 10.1006/eesa.2000.1954
- BUEGE, J. A. & S. D. AUST. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymology* 52: 302-310. DOI: 10.1016/S0076-6879(78)52032-6
- CAMPANELLA D., L. C. HUGHES, P. J. UNMACK, D. D. BLOOM, K. R. PILLER & G. ORTÍ. 2015. Multi-locus fossil-calibrated phylogeny of Atheriniformes (Teleostei, Ovalentaria). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 86: 8-23. DOI: 10.1016/j.ympev.2015.03.001
- CASIDA, J. E. 1963. Mode of action of carbamates. *Annual Review of Entomology* 8: 39-58. DOI: 10.1146/annurev.en.08.010163.000351



- CASIDA, J.E. & G. B. QUISTAD. 2004. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chemical Research in Toxicology* 17 (8), 983-998. DOI: 10.1021/tx0499259x
- CLASEN, B., J. LEITEMPERGER, C. MURUSSI, A. PRETTO, C. MENEZES, F. DALABONA, E. MARCHEZAN, M. BOHRER ADAIME, R. ZANELLA & V. L. LORO. 2014. Carbofuran promotes biochemical changes in carp exposed to rice field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and environmental safety* 101: 77-82. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.12.012
- COLLECTIVE OF AUTHORS SPA (State Phytosanitary Administration). 2002. List of the registered plant protection products. Agrospoj, SPA.
- DEMBELÉ, K., E. HAUBRUGE & C. GASPAS. 2000. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterases in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45 (1): 49-54. DOI: 10.1006/eesa.1999.1829
- DOBŠÍKOVÁ, R. 2003. Acute toxicity of carbofuran to selected species of aquatic and terrestrial organisms. *Plant Protection Science* 39, 103-108. DOI: 10.17221/3865-PPS.
- DUTTA, H. M. & D. A. ARENDS. 2003. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environmental Research* 91 (3): 157-162. DOI: 10.1016/S0013-9351(02)00062-2.
- DZUL-CAAMAL, R., M. L. DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, H. F. OLIVARES-RUBIO, E. GARCÍA-LATORRE & A. VEGA-LÓPEZ. 2014. The relationship between the bioactivation and detoxification of diazinon and chlorpyrifos, and the inhibition of acetylcholinesterase activity in *Chirostoma jordani* from three lakes with low to high organophosphate pesticides contamination. *Ecotoxicology* 23: 779-790. DOI: 10.1007/s10646-014-1216-8
- ECELLE, A. A. & A. F. ECELLE. 1984. Evolutionary genetics of a "species flock": atherinid fishes of the Mesa Central Mexico. In: A. A. Echelle y I. Konfield (Eds.), *Evolution of fish species flocks*. Orono, ME (USA) University of Maine. pp. 93-110.
- ENSIBI, C., D. HERNÁNDEZ MORENO, F. SOLER RODRÍGUEZ, M.N. DALY YAHYA, M.P. MINGUEZ-SANTIVÁN & M. PÉREZ-LÓPEZ. 2012. Effects of subchronic exposure to carbofuran on antioxidant defence system and malondialdehyde levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94 (4): 748-759, DOI:10.1080/0272248.2012.672821
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marine organisms, 4<sup>th</sup> end, 243 p.
- EPA. 2002. Public Health Goal for Carbofuran in drink water. United States Environmental Protection Agency. *Manual Office of Environmental Health Hazard Assessment* Washington. EUA, 15 pp.
- FAVARI PEROZZI, L., M. MADRIGAL ORTIZ & E. LÓPEZ LÓPEZ. 2003. Efecto del agua del embalse de la Vega en la lipoperoxidación y los niveles de la acetilcolinesterasa en el hígado y el músculo de *Xiphophorus helleri*. *Revista Interamericana De Contaminación Ambiental* 19(3): 145-155. Recuperado a partir de <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/23755>
- FUKUTO, T. R. 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives* 87: 245-254. DOI: 10.1289/ehp.9087245
- GHAZALA, S. M., L. AHMAD, S. SULTANA, K. AL-GHANIM, F. AL-MISNED & Z. AHMAD. 2014. Fish cholinesterases as biomarkers of sublethal effects of organophosphorus and carbamates in tissues of *Labeo rohita*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 28 (3): 137-142. DOI: 10.1002/jbt.21545
- GLUSCZAK, L., D. DOS SANTOS MIRON, B. S. MORAES, S. R. RODRÍGUEZ, S. M. R. CHITOLINA, V. M. MORSCH & V. L. LORO. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology & Pharmacology* 146: 519-24. DOI: 10.1016/j.cbpc.2007.06.004
- GÜLL, S., E. BELGE-KURUTAS, E. YILDIZ, A. SAHAN & F. DORAN. 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (*Cyprinidae*) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environment International* 30: 605-609. DOI: 10.1016/s0160-4120(03)00059-X
- Gupta, R. C. (2009). Carbofuran toxicity. *Journal of toxicology and environmental health*. Vol.43-4. DOI: 10.1080/15287399409531931
- HALLIWELL, B. & S. CHIRICO. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 57 (5): 715S-725S. DOI: 10.1093/ajcn/57.5.715S
- HEATH, A.G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press. Boca Raton, Florida. DOI: 10.1201/9780203718896.
- HERNÁNDEZ-RUBIO, M. C., G. FIGUEROA-LUCERO, I. A. BARRIGA-SOSA, J. L. ARREDONDO-FIGUEROA & T. CASTRO-BARRERA. 2006. Early development of the shortfin silverside *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes, 1835) (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Aquaculture* 261:1440-1446. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.08.48
- HESTRIN, S. 1949. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytic applications. *Journal of Biological Chemistry* 180: 249-261. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)56740-5
- IANNACONE, J., L. ALVARÍNO & N. MAMANI. 2011. Estimación de la Toxicidad Combinada de Mezclas de Furdán 4F® y Monofos® sobre *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 6 (1): 23-29. DOI:10.5132/jbse.2011.01.004
- ISO 8692. 2004. Water quality freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. *International Organization for Standardization*. Geneva, Switzerland.
- JASH, N. B. & S. BHATTACHARYA. 1983. Delayed toxicity of carbofuran in freshwater teleosts, *Channa punctatus* (Bloch) and *Anabas testudineus* (Bloch). *Water, Air, and Soil Pollution* 19: 209-213. DOI: 10.1007/BF00599047
- LAL, B., M. K. SARANG & P. KUMAR. 2013. Malathion exposure induces the endocrine disruption and growth retardation in the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). *General and Comparative Endocrinology* 181: 139145. DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.11.004
- LAWRENCE, R. A. & R. BURK. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical Biophysical Research Communications* 71: 952-958. DOI: 10.1016/0006-291x(76)90747-6

- LI F., L. JI, Y. LUO & K. OH. 2007. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius Auratus* Liver as Affected by 2,4,6-trichlorophenol. *Chemosphere* 67 (1): 13-19. DOI:10.1016/j.chemosphere.2006.10.030
- LIVINGSTONE, D. R. 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire* 154 (6): 427-30.
- LUSHCHACK, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101: 13-30. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 2002. Quinta edición. U.S. EPA Office of Water, Washington, D.C. EPA-821-R-02-012. 266 pp.
- MODESTO, K. A. & C. B. R. MARTÍNEZ. 2010. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78 (1): 294-299. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.10.047
- MOREIRA, R.A., A. DA SILVA MANSANO & O. ROCHA. 2015. The toxicity of carbofuran to the freshwater rotifer, *Philodina roseola*. *Ecotoxicology* 24: 604-615. DOI: 10.1007/s10646-014-1408-2
- NEMCSÓK, J., A. NÉMETH, Z. BUZÁS & L. BOROSS. 1984. Effects of copper, zinc, and paraquat on acetylcholinesterase activity in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology* 5 (1): 23-31. DOI: 10.1016/0166-445X(84)90029-8
- NIKOLOFF, N., S. SOLONESKI & M. L. LARRAMENDY. 2012. Genotoxic and cytotoxic evaluation of the herbicide flurochloridone on Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicology in Vitro* 26 (1): 157-163. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.10.015
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999. Que determina las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Diario oficial de la Federación*. 6 de diciembre de 1999. México.
- O'BRIEN, R. D. 1967. *Insecticides: Action and Metabolism*. Academic Press, New York, EUA. DOI: 10.1016/C2013-0-11985-X
- OCHOA D. M. & J. F. GONZÁLEZ. 2008. Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 55:115-126.
- ORGANIZATION FOR THE ECONOMICAL COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). 2012. *Fish acute toxicity test*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 203.
- PAULO-MAYA, J., G. FIGUEROA-LUCERO & M. SORIA-BARRETO. 2000. Peces dulceacuícolas mexicanos XIX. *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinopsidae). *Zoología Informa* 43: 59-74.
- PELLETIER M. 1986. Mercury-Selenium interactions in aquatic organisms: a review. *Marine Environmental Research* 18 (2): 111-132. DOI: 0143-8174/86/503-50
- PEIXOTO, F., D. ALVES-FERNANDES, D. SANTOS & A. FONTAÍNHAS FERNANDES. 2006. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85 (2): 91-96. DOI: 10.1016/j.pestbp.2005.10.007
- PRIEGO A., H. COTLER, A. FREGOSO, N. LUNA & C. ENRIQUEZ. 2004. La dinámica ambiental de la cuenca Lerma-Chapala. *Gaceta Ecológica* 71: 23-38.
- RANJBAR A. 2014. Evidence of oxidative damage in paraquat toxicity. *Zahedan Journal Research in Medical Sciences* 16 (12): 1-8.
- RAY, A. K. & M. C. GHOSH. 2006. Aquatic toxicity of carbamates and organophosphates. *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds* chapter 45: 657-672. DOI: 10.1016/B978-012088523-7/50046-6
- STRAUS, D. L. & J. E. CHAMBERS. 1995. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion, and S S S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). *Aquatic Toxicology* 33 (3-4): 311-324. DOI: 10.1016/0166-445X(95)00024-X
- SUN, Y., L. W. OBERLEY & Y. LI. 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 34 (3): 497-500. DOI: 10.1093/clinchem/34.3.497
- TROTTER, D. M., R. A. KENT & M. P. WONG. 1991: Aquatic fate and effect of carbofuran. *Critical Reviews in Environmental Control* 21 (2): 137-176. DOI: 10.1080/10643389109388412
- USFDA (U.S. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION). 2014. Pesticides residue monitoring program. Disponible en línea en <http://w.w.w.fda.gov/food/foodboinellnesscontaminants/pesticides/default.html> (consultado 15 mayo 2021).
- VAN DER OOST, R., J. BEYER & N. P. E. VERMEULEN. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13 (2): 57-149. DOI: 10.1016/s1382-6689(02)00126-6
- YI, M.Q., H. X. LIU, X. Y. SHI, P. LIANG & X. W. GAO. 2006. Inhibitory effects of four carbamate insecticides on acetylcholinesterase of male and female *Carassius auratus* in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143(1): 113-116. DOI: 10.1016/j.cbpc.2005.12.008
- YOUNG, G., P. M. LOKMAN, I. NAKAMURA & F. W. GOETZ. 2005. Gonadal steroidogenesis in teleost fish. In: Melamed, P. & N. Sherwood (eds). *Molecular aspects of fish and marine biology 4: Hormones and their receptors in fish reproduction*. Hackensack: World Scientific Publishing Co, pp. 155-223.
- ZAR J. H. 1984, *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Nueva Jersey, EUA, 718 p.