

Estrés oxidativo y genotoxicidad en células branquiales de los peces cebra (*Danio rerio*) adultos sometidos a concentraciones ambientales de plaguicidas y mezclas complejas

Paravani Enrique V.; Acosta María G.; Bianchi Mariana; Battauz Yamila S.; Poletta Gisela L.; Sasal María C.; Simoniello María F.; Odetti Lucia M.; Querubín Pereyra Pablo L.; Roda Rocío M.

Autores: Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Entre Ríos, Ruta 11, km 10, 3100 Oro Verde, Entre Ríos, Argentina

Contacto: enrique.paravani@uner.edu.ar

ARK: [Completar con el número de ARK correspondiente \(Carolina\)](#)

Resumen

La exposición crónica de organismos a bajas concentraciones de pesticidas puede tener efectos acumulativos subletales que influyen en el metabolismo energético, la aptitud física y el éxito reproductivo. Para evaluar el impacto del glifosato, 2,4-D e imidacloprid, tanto de manera individual como en combinación, en concentraciones ambientalmente relevantes, se utilizaron branquias de peces cebra adultos (*Danio rerio*), exponiéndolos a los diferentes pesticidas y su mezcla durante 96 horas. Se realizaron análisis de comportamiento, exámenes histológicos, análisis de daño en el ADN y perfilado de la expresión génica. Las investigaciones de comportamiento mostraron una mayor locomoción exhibida por los peces control en comparación con los animales expuestos al glifosato, 2,4-D, imidacloprid y principalmente aquellos expuestos a la mezcla de pesticidas. Todos los grupos expuestos a los pesticidas individualmente, mostraron una disminución en el tiempo de tigmotaxis, lo que indica una reducción en el comportamiento de protección de depredadores. El análisis histológico reveló disparidades significativas en las estructuras de tejido. La exposición al imidacloprid produjo daño leve (G1), el glifosato produjo daño moderado (G2) a grave (G3), el 2,4-D y la mezcla de todos ellos en las mismas concentraciones generaron lesiones graves (G3). Los plaguicidas de forma individual y su mezcla, produjeron daño oxidativo a nivel del ADN de forma muy significativa. Los estudios de expresión génica mostraron una sobreexpresión tanto de los genes involucrados en las vías de estrés oxidativo y apoptosis celular, mientras que en todos los casos disminuyó la expresión del gen *ogg1*, involucrado en la reparación del ADN.

Palabras clave: contaminación ambiental, estrés oxidativo, apoptosis, plaguicidas, *Danio rerio*

Introducción

Se estima que aproximadamente se utilizan 2 millones de toneladas de pesticidas en todo el mundo cada año, y esta cantidad está aumentando rápidamente (Sharma et al., 2019). El glifosato es un herbicida sistémico de amplio espectro ampliamente utilizado en la agricultura, así como en la silvicultura, la jardinería y la industria maderera, para el control no selectivo de malezas anuales y perennes, mientras que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un herbicida hormonal auxínico sistémico utilizado para el control de malezas de hoja ancha. Por otro lado, el imidacloprid es un neonicotinoide, un tipo de insecticida neuroactivo a base de nicotina y una sustancia con actividad insecticida sistémica. Investigaciones previas han demostrado que estos pesticidas o sus productos de degradación tienen un impacto directo o indirecto en la contaminación del aire, agua y/o suelo, lo que conduce a perturbaciones en los ecosistemas. Además, la presencia de pesticidas en aguas superficiales y subterráneas ha sido ampliamente documentada en diversos continentes, planteando un problema significativo a nivel local, regional, nacional y global (Sharma et al., 2019). Las consecuencias de los pesticidas en las poblaciones naturales se subestiman con frecuencia o permanecen completamente desconocidas (Kock et al., 2023).

Entre las especies de peces utilizadas en la investigación, el pez cebra (*Danio rerio*) ha surgido como un sistema modelo prominente en diversas áreas de investigación (Silva Brito et al., 2022). Se ha utilizado ampliamente en estudios de genotoxicidad (Canedo y Rocha, 2021), inmunotoxicidad (Zanandrea et al., 2020; Cheng et al., 2021), cardiotoxicidad (Zakaria et al., 2018), hepatotoxicidad (Goessling y Sadler, 2015; Verneti et al., 2017), neurotoxicidad (d'Amora y Giordani, 2018), y ha demostrado su valor en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos mediante el uso de líneas transgénicas (García et al., 2016; Lai et al., 2021). Además, el pez cebra ha sido reconocido como un modelo alternativo ético basado en los principios éticos de los 10Rs (Canedo et al., 2022).

Las branquias de los peces son órganos vitales para el transporte de iones en ambientes acuáticos expuestos a contaminantes químicos (Evans et al., 2005). El epitelio branquial sirve como la principal interfaz entre los organismos acuáticos y su entorno, lo que lo convierte en un objetivo importante para los contaminantes. Estos contaminantes tienen el potencial de atravesar las láminas branquiales, ingresar al torrente sanguíneo y causar diferentes grados de daño al organismo (Evans et al., 2005). En consecuencia, el epitelio branquial se ha utilizado ampliamente en diversos estudios, tanto en ecosistemas acuáticos naturales como en laboratorios (Rohani, 2023). Las alteraciones histológicas comúnmente observadas en las branquias después de la exposición directa a contaminantes incluyen edema, hiperplasia epitelial de las láminas secundarias, infiltración de células epiteliales, fusión lamelar y necrosis de las láminas secundarias (Rohani, 2023).

Se han informado varios estudios de comportamiento en diferentes etapas de la vida del pez cebra para analizar contaminantes toxicológicos (Dutra Costa et al., 2020). El análisis del comportamiento motor y no motor es un método rentable, no invasivo y eficiente que utiliza tecnología simple para proporcionar una amplia gama de aplicaciones que incluyen el descubrimiento y cribado de medicamentos, la identificación de trastornos neuroconductuales y la toxicología química (Selvaraj et al., 2019). La locomoción como comportamiento motor proporciona información cuantitativa que se puede utilizar como biomarcador general del estrés tóxico (Dutra Costa et al., 2020). La

tigmotaxis, también conocida como “comportamiento de preferencia por la pared”, es un patrón de comportamiento observado en animales en el que tienden a evitar el área central de una cámara de prueba y, en cambio, pasan la mayor parte de su tiempo cerca de las paredes (Richendrfer et al., 2012; Baiamonte et al., 2016). Esta característica de comportamiento puede utilizarse como un mecanismo para el aprendizaje espacial de un nuevo entorno o un comportamiento defensivo desencadenado por una respuesta al estrés. La relación entre la tigmotaxis y el comportamiento no motor, como la ansiedad, ha sido validada farmacológicamente tanto en etapas adultas como larvarias del pez cebra (Richendrfer et al., 2012; Baiamonte et al., 2016). En consecuencia, los ensayos que miden la tigmotaxis en el pez cebra tienen un poder predictivo significativo en los campos de la neurofarmacología y la neurotoxicología.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), incluidos los radicales anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo, se generan constantemente en organismos que consumen oxígeno (Jin et al., 2010). Cuando los organismos están expuestos a xenobióticos o contaminantes químicos tóxicos, puede producirse un desequilibrio entre ROS endógenos y exógenos, lo que conduce a una reducción en los mecanismos de defensa antioxidante y, potencialmente, causa daño oxidativo y apoptosis en los organismos (Valavanidis et al., 2006).

En el presente estudio, realizamos una investigación *in vivo* para evaluar los posibles efectos de los pesticidas individuales, así como de su mezcla. El estudio abarcó una duración de 96 horas. Realizamos análisis de comportamiento motor y evaluaciones de comportamiento no motor tanto en los peces expuestos como en los de control. Además, realizamos un examen histológico, un examen de daño al ADN utilizando el ensayo de cometas y examinamos la expresión de ARNm de genes asociados con vías de apoptosis celular y/o reparación del ADN, incluidos los genes clave involucrados en la vía de estrés oxidativo, específicamente en las células branquiales de peces cebra adultos.

Materiales y métodos

Configuración experimental y tratamientos

Empleamos ejemplares de pez cebra de ocho meses de edad de sexo mixto y tipo silvestre. Los individuos fueron criados en nuestro laboratorio a partir de peces reproductores y se mantuvieron utilizando el mismo sistema descrito por Paravani et al., (2019, 2023).

Previo a la exposición a los pesticidas, los peces cebra adultos se aclimataron durante 48 horas en tanques de vidrio bajo un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (Westerfield, 2007). Luego, se colocaron diez individuos en cada tanque para cada grupo experimental (N=50, Tabla 1). En todos los casos, las soluciones se renovaron diariamente y las exposiciones duraron 96 horas. Los peces se utilizaron para el estudio de comportamiento y luego se los sacrificó enfriándolos en hielo, se les extrajeron las branquias y se procesaron para los estudios de histología, ensayo cometa y biología molecular (Paravani et al., 2019).

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las directrices para la investigación con animales de laboratorio, de granja y silvestres del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET, 2005).

Tabla 1: Grupos experimentales expuestos a formulaciones de pesticidas a base de glifosato, 2,4-D, Imidacloprid y su mezcla ternaria.

Tratamientos	Compuestos	Concentración	Número de individuos
Control	Agua de canilla		10
Glifosato	Roundup®full II (66.2%)	0.5 mg/L	10
2,4-D	Hexil®-Adama (50%)	0.8 mg/L	10
Imidacloprid	Imistar®(35%)	5.5 mg/L	10
Mezcla	Glifosato + 2,4-D + Imidacloprid	0.5 mg/L + 0.8 mg/L + 5.5 mg/L	10

Test de comportamiento

Todos los videos se grabaron en un dispositivo fabricado en nuestro laboratorio basado en trabajos anteriores (Selvaraj et al., 2019). El dispositivo tiene una fuente de luz blanca fría que cubre toda la superficie a filmar. Se ha colocado un vidrio opaco sobre esta fuente de luz que permite que la luz se difunda desde abajo y que sea uniforme en toda la superficie. Se coloca una caja oscura sobre la superficie del vidrio para evitar que entre luz exterior y se ha hecho una pequeña apertura en la parte superior para instalar la cámara. El contenedor donde se observa el pez cebr se colocó dentro de la caja, siempre en la misma posición y con el mismo volumen de agua. La temperatura del agua era de 25 ± 2 °C. Se obtuvo un video de un minuto para cada pez utilizando una cámara de 13 MP.

El video se preprocesó utilizando el software Free Studio - Free Video to JPG converter para obtener 10 fotogramas por segundo. Los fotogramas se redimensionaron a 768 x 432 píxeles utilizando el software Free Studio - Free Image convert and resize y se guardaron. Posteriormente, utilizando el software ImageJ, se importaron los 600 fotogramas, se convirtieron a 8 bits y se ajustaron los umbrales. Luego, se ejecutó el complemento wrMTrck de ImageJ utilizando la configuración optimizada para analizar el comportamiento locomotor de los peces cebr adultos de cinco meses de edad (Selvaraj et al., 2019). Las coordenadas X e Y (datos en bruto, en píxeles) se obtuvieron como salida en wrMTrck. La distancia recorrida por el pez se calculó entre fotogramas consecutivos utilizando la fórmula:

$$\text{Distancia entre fotogramas (píxeles)} = \sqrt{(([\Delta X])^2 + ([\Delta Y])^2)}$$

La distancia en píxeles entre fotogramas consecutivos se convirtió a milímetros (mm) multiplicándola por un factor de conversión, calculado dividiendo el tamaño real del tanque en mm entre el tamaño del tanque en píxeles medido a partir del fotograma de video, utilizando la herramienta de medición en ImageJ. Si el desplazamiento del pez en 0.1 s resultó en 1 mm o menos, se clasificó como comportamiento de congelación; si fue de 10 mm o más, se clasificó como comportamiento de movimiento rápido (Selvaraj et al., 2019).

Otros resultados obtenidos con wrMTrck, como la longitud total, la velocidad máxima y promedio en píxeles, se convirtieron a cm o mm multiplicando los valores de píxeles por el factor de conversión, calculado como se mencionó anteriormente.

Además, el comportamiento basado en el ángulo se calculó evaluando el ángulo de giro para cada fotograma utilizando la fórmula descrita por Selvaraj et al. (2019),

el ángulo de giro negativo indica Movimiento en Sentido Antihorario (CCWM, por sus siglas en inglés), mientras que el ángulo de giro positivo sugiere Movimiento en Sentido Horario (CWM, por sus siglas en inglés).

Para analizar el comportamiento de tigmotaxis, se obtuvieron las trayectorias generadas por wrMTrck en cada caso. Además, para proceder a un análisis cuantitativo, se utilizaron las coordenadas X e Y en una hoja de cálculo de Excel para calcular la distancia a cada pared del contenedor para cada fotograma, y este valor se utilizó para obtener la distancia mínima a la pared (MWD, por sus siglas en inglés). Si el MWD fue menor a una cuarta parte de la longitud del contenedor, se colocaba la palabra "pared" en la celda siguiente; de lo contrario, "centro". Luego, se contaron los fotogramas que contenían la palabra "pared" y se calcularon los segundos de tigmotaxis como el número de fotogramas dividido por 10.

Extracción de branquias

Se extrajeron las branquias de ambos lados de cada espécimen y posteriormente se procesaron y utilizaron para análisis histológicos, ensayo cometa y biología molecular (Paravani et al., 2019).

Preparación de tejidos para evaluación histológica

Las muestras de branquias se lavaron con solución salina fosfato 0.1 M (PBS 1X, pH 7.4) y luego se fijaron con paraformaldehído al 4%. Posteriormente, se deshidrataron en etanol y se incluyeron en parafina. Finalmente, se realizaron secciones seriadas utilizando un microtomo ReichertUltracut-S. Para el análisis morfológico, las secciones sagitales de 5 μm de grosor se desparafinaron, rehidrataron y tiñeron con hematoxilina-eosina (HE).

Basándose en las imágenes obtenidas de diferentes secciones histológicas de las branquias de los peces cebra expuestos individualmente a los pesticidas y a la mezcla de pesticidas, se analizó cada muestra ($n = 10$) para observar las diferentes alteraciones producidas y cuantificarlas. Se registró la frecuencia de cada daño histopatológico y la gravedad del daño, y luego se calculó el índice de alteración. El tipo y la gravedad de las lesiones se clasificaron según Poleksic y Mitrovic-Tutundzic (1994). El daño se clasificó en tres grados de gravedad: lesiones leves que no afectan la función del órgano (G1); lesiones moderadamente graves que pueden afectar la función del órgano y pueden ser irreversibles, pero generalmente están localizadas (G2); y lesiones muy graves e irreversibles que afectan la función del órgano (G3). Posteriormente, se calculó el índice de alteración como la suma de los tipos de lesiones en cada una de las tres etapas de gravedad y se multiplicó por el índice de cada etapa (1, 10 y 100, respectivamente) (Poleksic y Mitrovic-Tutundzic, 1994).

Análisis de la expresión génica

En el estudio, se extrajo ARN total de las branquias utilizando el Kit de Purificación de ARN GeneJET (Thermo Scientific®) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN en cada muestra se evaluó midiendo la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm. Posteriormente, el ARN se desnaturalizó a 65 °C durante 15 minutos. Para

la síntesis de cDNA, se empleó el Kit de síntesis de cDNA Revert Aid First Strand (Thermo Scientific®). El cDNA resultante se utilizó directamente para la PCR utilizando un termociclador Ivema T-18 (Llavallol, BA, Argentina) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, alineación a 50 °C durante 90 segundos y extensión a 72 °C durante 90 segundos. Los cebadores oligonucleotídicos utilizados para detectar los niveles de expresión de los genes específicos se describieron en la Tabla 2. Los niveles de expresión de ARNm se normalizaron utilizando transcritos de β -actina como referencia (Jin et al., 2011; Paravani et al., 2018, 2019, 2023). Para determinar los niveles de ARNm, cada gen de interés y el ARNm de β -actina se coamplificaron utilizando ARN de células branquiales extraídas como plantilla tanto de los peces tratados como de control. Los productos resultantes de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. Las bandas de cDNA se visualizaron utilizando un transiluminador UV (Spectroline TE-312S, Spectronics Corporation, Westbury, NY) y se registraron con una cámara digital. Después de visualizar las bandas de cDNA, se cuantificó la intensidad de cada banda, incluido el control interno (β -actina) y los genes de interés, utilizando el software ImageJ. Las relaciones de intensidad se calcularon comparando la intensidad de cada banda de gen con la del control interno (β -actina). Al grupo control se le asignó el valor de 1 para servir como referencia. Posteriormente, los valores de cada grupo tratado se analizaron en relación con el grupo control. Estos valores se representaron en un gráfico de barras para ilustrar los niveles de expresión relativos de los genes cada grupo tratado en comparación con el grupo de control.

Tabla 2. Secuencias de los pares de cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

Gen target	Secuencia de los cebadores (5' a 3')	Longitud del producto (pb)	Vol (μ l)	Tm (°C)
<i>Mnsod</i>	F: CCGGACTATGTTAAGGCCATCT	22	1,8	54,5
	R: ACACTCGGTTGCTCTCTTTTCTCT	24	1,8	53,3
<i>Cat</i>	F: GGGCAACTGGGATCTTACA	20	1,8	46,5
	R: TTTATGGGACCAGACCTTGG	20	1,8	45,1
<i>p53</i>	F: GGGCAATCAGCGAGCAAA	18	1,8	55,6
	R: ACTGACCTTCTGAGTCTCCA	21	1,8	52,4
<i>Ogg1</i>	F: TCGGATTGTATTAGCCC	17	1,8	50,0
	R: AAACCCAAAGATGGAGG	17	1,8	50,0
<i>Bcl-2</i>	F: AGGAAAATGGAGGTTGGGATG	21	1,8	57,9
	R: TGTTAGGTATGAAAACGGGTGGA	23	1,8	59,6
<i>Bax</i>	F: GGCTATTTCAACCAGGGTTCC	21	1,8	58,9
	R: TGCGAATCACCAATGCTGT	19	1,8	58,0

Caspase-9	F: AAATACATAGCAAGGCAACC	19	1,8	53,9
	R: CACAGGGAATCAAGAAAGG	20	1,8	53,2
Caspase-3	F: CCGCTGCCCATCACTA	16	1,8	55,5
	R: ATCCTTTCACGACCATCT	18	1,8	52,7
β -actin	F: ATGGATGAGGAAATCGCTGCC	21	1,8	56,9
	R: CTCCTGATGTCTGGGTCGTC	21	1,8	56,1

Determinación del Índice de daño al ADN: Ensayo Cometa.

La electroforesis en gel de células individuales, (SCG: *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) conocida como Ensayo Cometa (EC). El EC ofrece la posibilidad de estudiar daños y reparaciones del ADN tanto *in vitro* como *in vivo*, en diferentes tipos celulares y organismos, ya que no requiere que las células se encuentren en fase de división. En el presente proyecto, la técnica del EC a pH alcalino fue implementada en bioensayos desarrollados por triplicado, para las células branquiales de peces cebra, con el fin de evaluar el índice de daño al ADN tanto en los peces control, como en los expuestos a los plaguicidas y a la mezcla, en un estudio *in vivo*.

Las branquias fueron extraídas desplazando hacia adelante ambos opérculos. Los arcos y peines fueron separados y los filamentos branquiales lavados en tubos Eppendorf conteniendo 1 ml de PBS 1X y sometidas a una agitación suave durante 3 minutos para su disociación. Los sobrenadantes conteniendo las células libres fueron transferidos a un segundo tubo con 1 ml de PBS 1X y centrifugados a 45 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los homogenatos celulares fueron mezclados con 200 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma®) 1% y extendidos sobre portaobjetos. Posteriormente los vidrios fueron sumergidos inmediatamente en buffer de lisis enfriada en hielo (NaCl 2,5 M; Na₂EDTA 100 mM; 10 mM de Trizma base; Triton X-100 1% y DMSO 10%, pH 10), durante 1 h y sumergidos en solución de corrida (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM, pH 13) durante 10 minutos. A continuación, sometidos a electroforesis en la misma solución a 300 mA y 25 V (0,90 V/cm), durante 10 minutos, en frío. La basicidad fue neutralizada con tres cambios de Tris 0,4 M (pH 7,5), 5 minutos cada uno. Por último, los portaobjetos fueron deshidratados en etanol 96% durante 5 minutos, secados a temperatura ambiente y codificados para el análisis a doble ciego con el fin de conferir confiabilidad a la cuantificación.

Inmediatamente antes de proceder al análisis, los portaobjetos fueron teñidos con naranja de acridina (100 μ g/ml, Sigma®). Las imágenes fueron analizadas utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus BX50, identificando y contabilizando un total de 100 células por cada animal. Estas fueron seleccionadas al azar, superponiendo una cuadrícula sobre el portaobjetos, para evitar la repetición del registro de las células. Las células fueron clasificadas en 5 grupos de acuerdo con el tamaño, intensidad y longitud de la cola (clase 0 = células normales, mientras que el daño máximo corresponde a la clase 4). El índice de daño del ADN fue calculado mediante la siguiente ecuación:

Dónde: n₁, n₂, n₃ y n₄ constituyen el número de células en las clases 1, 2, 3 y 4 del daño, respectivamente.

Análisis estadístico

Todo el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, EE. UU.). Para realizar todo el análisis estadístico, se compararon los grupos expuestos con el grupo control utilizando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, según si se cumplían los supuestos de homogeneidad y homocedasticidad. Los resultados de la prueba de comportamiento se presentaron en un gráfico de caja. Los resultados de la expresión génica se presentan como medias \pm error estándar. Las diferencias con $p \leq 0.05$ (*) se consideraron estadísticamente significativas, $p \leq 0.01$ (**) se consideraron muy significativas y $p \leq 0.001$ (***) se consideraron altamente significativas.

Resultados

Efectos de los pesticidas en las pruebas de comportamiento

El patrón de comportamiento locomotor fue diferente entre los peces expuestos a pesticidas y los de control. La longitud total y la velocidad promedio de todos los grupos de peces expuestos disminuyeron significativamente en comparación con el control. Los peces expuestos a la mezcla de todos los pesticidas mostraron el patrón de locomoción más diferente. Mostraron una disminución altamente significativa en la longitud recorrida (cm), la velocidad promedio (mm/s) y la velocidad máxima (mm/s) en comparación con los peces control. Además, los peces control exhibieron un comportamiento de movimiento rápido más alto (datos no mostrados) y un comportamiento de congelación significativamente menor (menor tiempo congelado) en comparación con aquellos expuestos a la mezcla de pesticidas (Figura 1). Además, el movimiento en sentido horario y antihorario no mostró diferencias en ningún caso (datos no mostrados).

La figura 2 muestra las trayectorias generadas por wrMTrck para un espécimen del grupo control y uno expuesto representativo de cada grupo experimental. Las perturbaciones que se muestran en las trayectorias se analizaron como tigmotaxis. Los resultados mostraron diferencias entre las preferencias hacia la pared entre el grupo de control y los peces expuestos a glifosato, 2,4-D e imidacloprid, pero no en el caso de la mezcla.

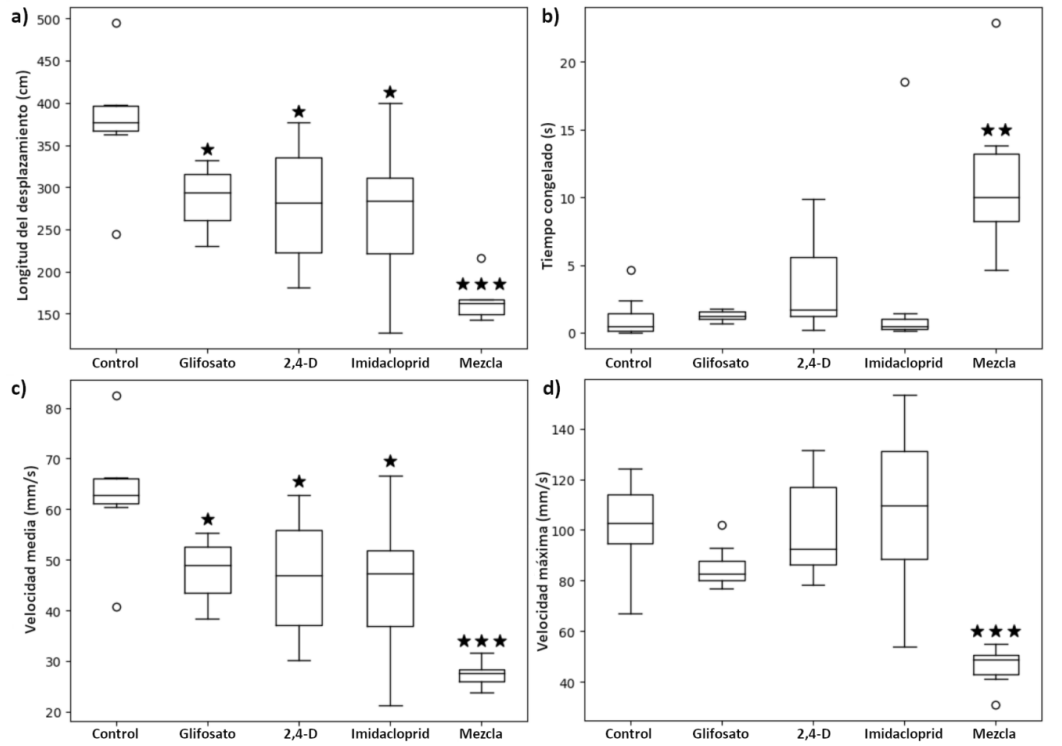


Figura 1. a) Longitud del desplazamiento, b) tiempo congelado, c) velocidad media, d) velocidad máxima en los grupos control y expuestos (n = 7).

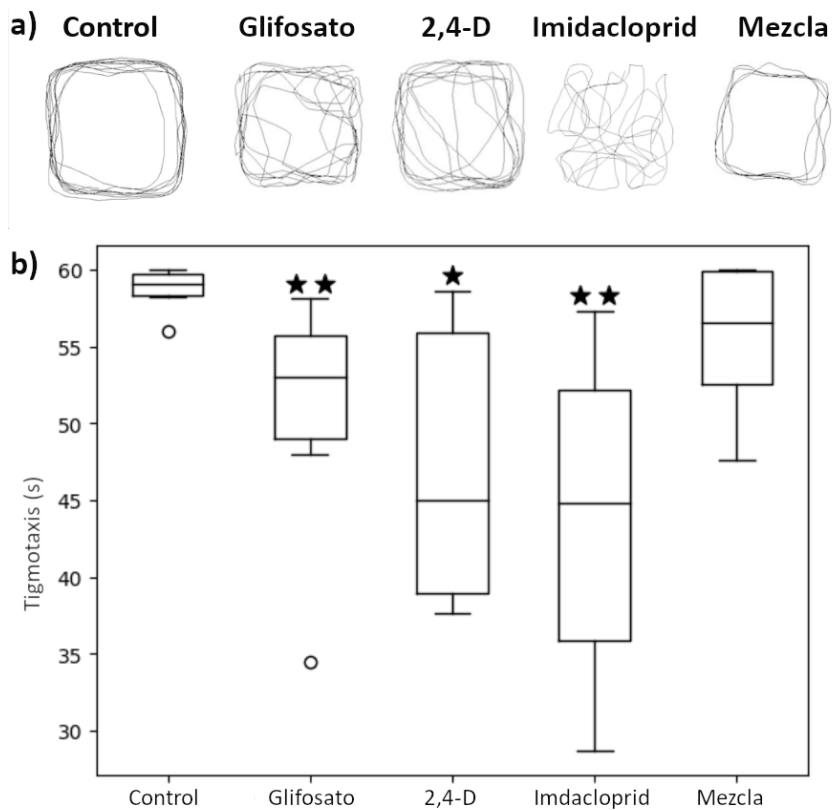


Figura 2. a) Trayectoria representativa de nado de un pez de control y un individuo de cada grupo expuesto. b) Segundos por minuto que el grupo control y los grupos expuestos pasaron cerca de la pared del contenedor en la prueba de comportamiento, expresados como medias \pm desviación estándar (n = 6).

Evaluación histológica

La estructura branquial de *D. rerio*, al igual que en otros teleósteos, consta de cuatro arcos branquiales en ambos lados de la cabeza. Cada arco branquial está compuesto por dos filas de filamentos branquiales o láminas primarias, donde cada lámina primaria posee láminas secundarias que están regularmente espaciadas entre sí, por encima y por debajo del eje horizontal del filamento. Las láminas secundarias contienen pequeños capilares sanguíneos y la sangre fluye en dirección opuesta al agua, por lo que el oxígeno se absorbe a lo largo de toda la longitud de las láminas secundarias.

El análisis histológico de las branquias de los peces cebra adultos control no reveló alteraciones ni lesiones observables en ninguna de las áreas examinadas, lo que indica que el tejido puede considerarse histológicamente normal en general (Figura 3a). En cuanto a las branquias de los peces cebra expuestos a imidacloprid, las lesiones observadas pueden ser categorizadas como G1. Estas incluyen dilataciones de capilares en el ápice de las láminas, hiperplasia epitelial en la base de las láminas secundarias y congestión (Figura 3b). Se observaron lesiones significativas en las branquias expuestas a glifosato. Entre ellas se encuentran la fusión de las láminas secundarias (Figura 3c, flecha roja), láminas secundarias con focos de necrosis y presencia de leucocitos (Figura 3c, flecha negra), sectores con hiperplasia epitelial en la base de las láminas (Figura 3d, flecha amarilla), y presencia de dilataciones capilares en el ápice de las láminas y canal marginal dilatado (Figura 3d, flecha rosa). En conjunto, estas lesiones observadas indican un grado de lesión que varía entre G2 y G3 para este tejido (Figura 3d). En las branquias de los peces cebra expuestos a 2,4-D, se observaron diversos tipos de lesiones. Estas incluyen la dilatación de capilares en el ápice de las láminas (Figura 3e, flecha azul), congestión, focos de hiperplasia epitelial en la base de las láminas (Figura 3f, flecha verde), fusión de las láminas secundarias, presencia de células mucosas en las láminas secundarias y, en algunas láminas, un cierto grado de necrosis. Según estas observaciones, el grado de lesión para este tejido se clasificó como G3 (Figura 3e y f). Después de la exposición de los peces cebra a la solución que contiene la mezcla, se observaron las siguientes lesiones en las branquias: congestión, hiperplasia en las células epiteliales en la base de las láminas, fusión y ausencia de láminas secundarias, y dilatación capilar en el ápice de las láminas. Basándose en estas observaciones, el grado de lesión en las branquias podría clasificarse como G3 (Figura 3g y h).

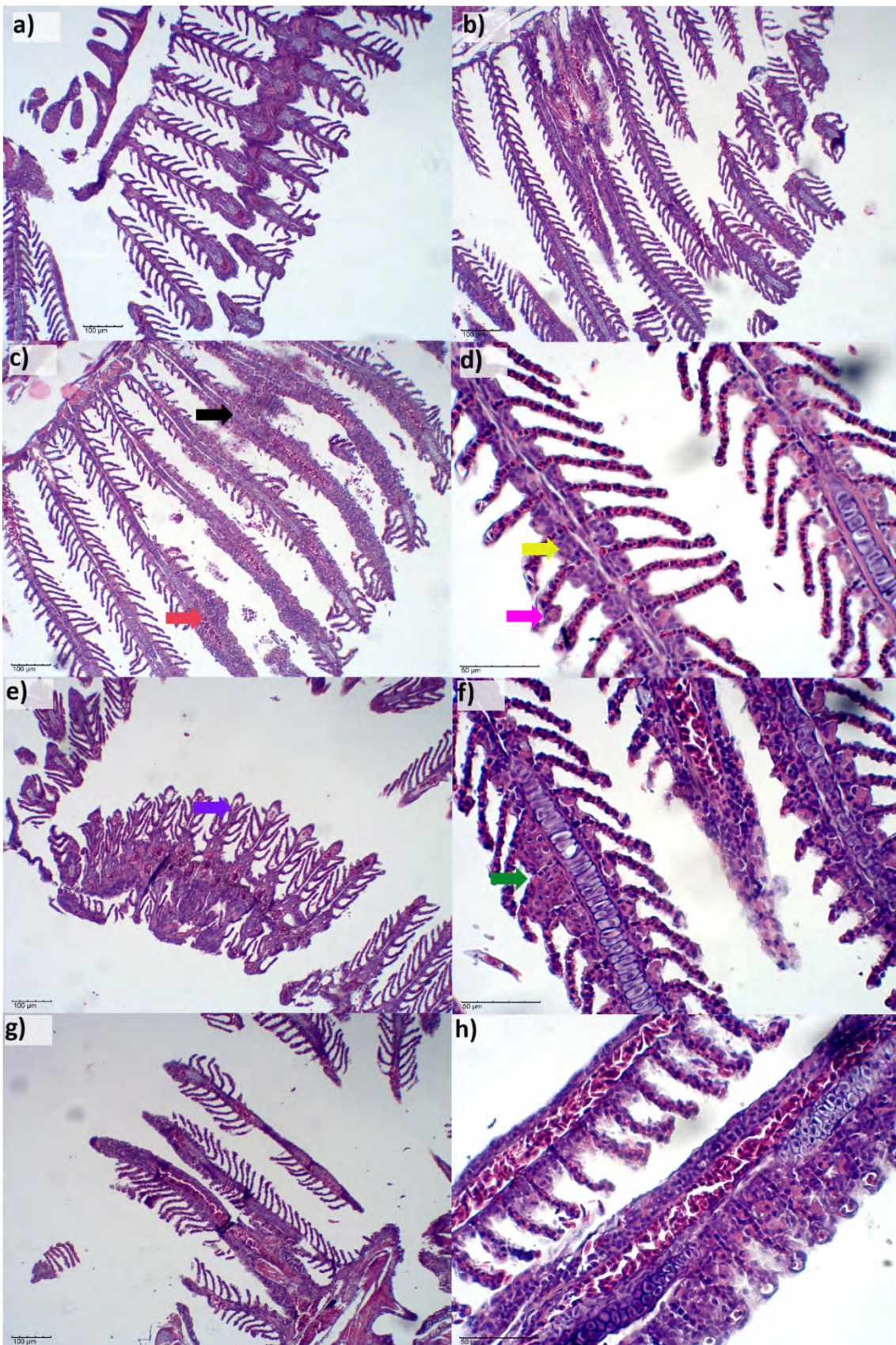


Figura 3. Tejido branquial teñido con H&E de peces cebra adultos: a) control, no se observaron cambios morfológicos, b) expuesto a imidacloprid, lesión leve (G1), c) y d) expuesto a glifosato, lesión moderada a severa (G2 y G3), fusión de las láminas secundarias (flecha roja), láminas secundarias con focos de necrosis y presencia de leucocitos (flecha negra), sectores con hiperplasia del epitelio en la base de las láminas (flecha amarilla), canal marginal dilatado (flecha rosa), e) y f) expuesto a 2,4-D, lesión severa (G3), dilatación de capilares en el ápice de las láminas (flecha azul), focos de hiperplasia epitelial en la base de las láminas (flecha verde), g y h) expuesto a la mezcla de pesticidas, lesión severa (G3). Las barras de calibración se indican en cada imagen.

Efecto de los pesticidas en la expresión génica

Basándose en los resultados obtenidos del análisis y cuantificación de la expresión génica en las branquias de peces cebra adultos expuestos a pesticidas individuales, así como a la mezcla, se puede observar un patrón consistente en todos los genes probados, incluidos aquellos involucrados en las vías de estrés oxidativo (*cat* y *sod*) y la vía de apoptosis celular (*p53*, *Bcl-2*, *Bax*, *caspasa-9* y *caspasa-3*), en comparación con el grupo de control. Es notable que hay una regulación al alza de los genes asociados con la vía de estrés oxidativo y la vía de apoptosis celular, mientras que el gen *ogg1*, responsable de la reparación del ADN, muestra una regulación a la baja en todos los casos (Figura 4).

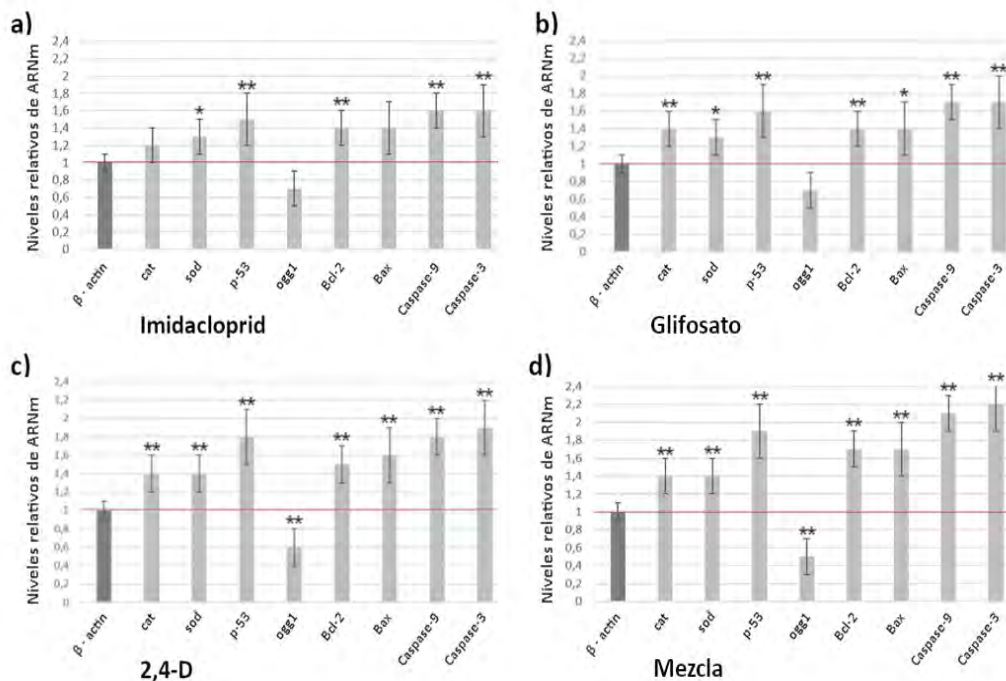


Figura 4: Expresión de ARNm de genes involucrados en el estrés oxidativo (*cat* y *sod*), vías de apoptosis celular (*p53*, *Bcl-2*, *Bax*, *caspasa-9* y *caspasa-3*) y reparación del ADN (*ogg1*) medida en las branquias de peces cebra expuestos a a) Imidacloprid, b) glifosato, c) 2,4-D y d) la mezcla de ellos durante 96 h. Los niveles de expresión de ARNm se expresaron en relación a la expresión del gen de normalización β -actina.

Evaluación del índice de daño del ADN

Como paso previo al comienzo del estudio de los posibles efectos de los plaguicidas de forma individual como de su mezcla, se determinaron los valores del Índice de Daño Basal (IDB) del ADN en las células branquiales de peces cebra sin tratamiento. Para cumplir con este objetivo, se empleó la técnica del ensayo cometa en las células branquiales.

Los valores del IDB obtenidos en las células branquiales para los peces cebra machos y hembras no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos ($p > 0,05$) siendo respectivamente 186 ± 15 y 183 ± 32 ; por lo que se verifica que los valores de IDB exhiben un alto grado de homogeneidad en el daño del ADN (Figura 5) de los peces no tratados. Estos resultados permitieron conducir los siguientes ensayos, independientemente del sexo de los animales.

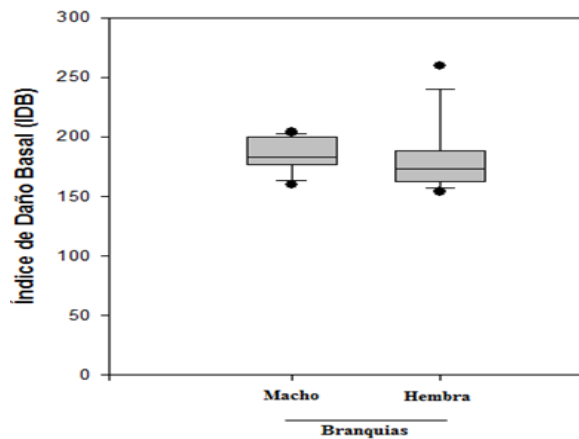


Figura 5. Diagrama de caja de los valores de IDB en células branquiales de peces cebra sin tratar. Puede observarse la alta homogeneidad y sin diferencias significativas en los valores del IDB para peces machos y hembras.

Con el objetivo de determinar si las células branquiales de los peces cebra son sensibles a los genotóxicos y si esta sensibilidad se puede cuantificar por medio del ensayo cometa, se diseñó un ensayo *in vitro* donde las células branquiales se sometieron al posible efecto del peróxido de hidrógeno. La exposición de las branquias a las diferentes concentraciones de H_2O_2 causaron incrementos del ID muy significativos, con respecto al control ($^{**}p < 0,01$, Figura 6). En términos porcentuales los aumentos del ID respecto al control fueron respectivamente: 22,2% ($2,5 \mu M$); 51,1% ($5,0 \mu M$) y 58,6%, ($10,0 \mu M$) para las células branquiales.

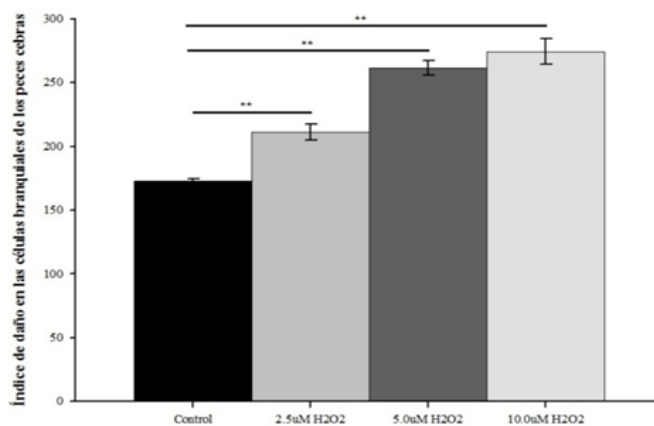


Figura 6. Histograma representando el índice de daño del ADN en las células branquiales de los peces cebra después de la exposición *in vitro* al H₂O₂. Control; 2,5 µM de H₂O₂; 5,0 µM de H₂O₂; 10,0 µM H₂O₂.

Una vez establecida la sensibilidad de células branquiales a un agente genotóxico *in vitro* se realizó el bioensayo *in vivo*, exponiendo a los peces, a los plaguicidas de forma individual y a la mezcla de ellos, según las concentraciones antes mencionadas y durante 96 h (Figura 7).

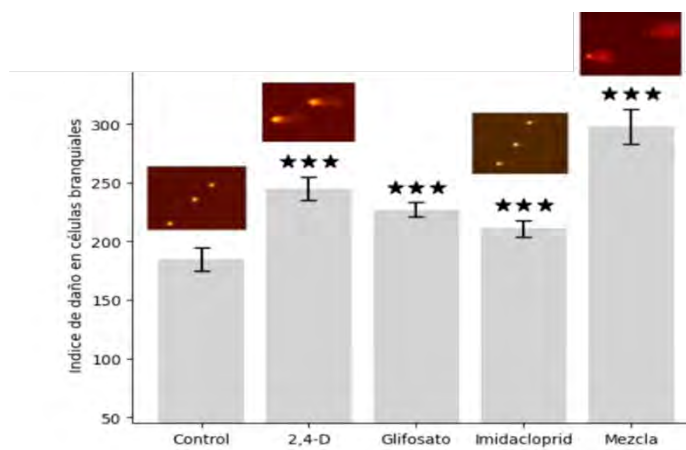


Figura 7. Histograma mostrando los valores del ID del ADN en las células branquiales de peces cebra expuestos a los plaguicidas (2,4-D, glifosato e imidacloprid) y su mezcla en contracciones ambientalmente relevantes durante 96 h, y células branquiales de peces cebra control.

Como se observa en la Figura 7, los plaguicidas de forma individual y su mezcla, producen un daño oxidativo a nivel del ADN de forma muy significativa, luego de las 96 h de exposición bajo condiciones ambientalmente relevantes.

Discusión

Al evaluar los procesos de contaminación en los cuerpos de agua, los pesticidas emergen como uno de los grupos más cruciales de xenobióticos. La utilización de diversas especies de peces para delinear la porción bioaccesible de la contaminación en

un ecosistema se justifica por su participación en diferentes niveles tróficos, su sensibilidad a bajas concentraciones de sustancias tóxicas y su capacidad para acumular directamente sustancias perjudiciales del agua contaminada, así como indirectamente a través del consumo de organismos acuáticos contaminados (Cavaş y Ergene-Gözükara, 2005). La contaminación ambiental, especialmente la contaminación acuática, no solo afecta la supervivencia y reproducción de los organismos acuáticos, sino que también tiene un impacto negativo en la salud humana, principalmente a través de procesos de bioconcentración.

La sensibilidad a diferentes contaminantes convierte al pez cebra en un organismo modelo para el monitoreo ambiental. Se pueden observar cambios en la morfología, la expresión génica, el comportamiento y la fisiología como indicadores biológicos. Muchos contaminantes ambientales interfieren con las funciones del sistema endocrino, afectan el desarrollo, causan daño al ADN e inducen estrés oxidativo en el pez cebra (Jin et al., 2010, 2011; Shao et al., 2012).

Efectos de los pesticidas en el comportamiento

Las interacciones presa-depredador abarcan la percepción de agentes depredadores, estímulos peligrosos, hábitats riesgosos y estímulos benignos (no depredadores o lugares seguros), que son imperativos para aumentar la probabilidad de supervivencia de los organismos (Lopes et al., 2022).

El presente estudio observó una disminución significativa en el tiempo que los peces expuestos a glifosato, 2,4-D e imidacloprid pasaron en proximidad a la pared, lo que indica una reducción en el comportamiento de tigmotaxis en comparación con los peces de control. La exposición al glifosato puede llevar a una serie de cambios neuronales que interfieren con las habilidades cognitivas del cuerpo para reconocer un entorno hostil. Como resultado, la presencia de glifosato en el entorno impide que los peces exhiban comportamientos aversivos y se protejan de los depredadores. Los peces cebra expuestos a Rondup® pasaron más tiempo en el área de riesgo de depredación en comparación con los peces que no estuvieron expuestos (Pompermaier et al., 2020). Normalmente, cuando los peces detectan la presencia de un depredador, buscan refugio cerca de la periferia de su entorno, reduciendo la probabilidad de depredación.

Otra forma de estudiar las interacciones presa-depredador es el paradigma del tanque novel, que se basa en el comportamiento innato de escape de los peces cebra en un entorno nuevo, donde se espera que los peces cebra se sumerjan en el fondo y permanezcan inmóviles por un período para luego explorar más su entorno (Kysil et al., 2017). Los peces cebra adultos expuestos a 2,4-D aumentaron la distancia total recorrida (3 y 300 µg/L) y las cruzadas entre las zonas del tanque (0.3 µg/L). Además, los peces cebra expuestos a 2,4-D a 0.3 µg/L pasaron más tiempo en la zona superior del aparato y recorrieron una larga distancia en la zona superior, lo que sugiere que la exposición a concentraciones de 2,4-D detectadas en el entorno interrumpe su comportamiento defensivo innato para pasar más tiempo en el fondo (Thiel et al., 2020). Además, la reacción conductual ante un ataque simulado de depredador de aves en peces cebra adultos expuestos a concentraciones subletales de glifosato, 2,4-D y metilbenzoato fue evaluada por Pompermaier et al. (2020). En ese estudio, se observó que los peces expuestos a glifosato y 2,4-D pasaron más tiempo en un área riesgosa, lo que sugiere que los pesticidas interfirieron en su capacidad de percepción del riesgo (Pompermaier et al., 2020).

Una investigación reciente encontró que la exposición al imidacloprid disminuyó la distancia recorrida y aumentó el tiempo pasado sin movimiento (congelación) en peces expuestos a 45 µg/L. Estos peces mostraron locomoción deficiente en parámetros de comportamiento que podrían estar relacionados con la reducción de AChE en el cerebro. En este contexto, observaron hiperlocomoción que podría ser un síntoma de toxicidad por imidacloprid (Guerra et al., 2021).

En el presente estudio, mientras que los peces expuestos a los pesticidas individualmente exhibieron comportamiento de tigmotaxis, los peces expuestos a la mezcla no lo hicieron. Presumimos que la ausencia de tigmotaxis observada en los peces expuestos a la mezcla podría ser consecuencia de su movilidad limitada, caracterizada por una baja distancia recorrida, baja velocidad y un período prolongado de inmovilidad.

Evaluación histológica

En relación con la morfología branquial, la hipertrofia, el levantamiento del epitelio lamelar e hiperplasia que conducen a la fusión completa o parcial de las lamelas, como se observó en este estudio, son mecanismos de defensa comunes que aumentan la distancia para la difusión agua-sangre, reduciendo así la transferencia de agentes estresantes como los pesticidas desde la superficie lamelar al torrente sanguíneo (Lins et al., 2010; Fernandes y Moron, 2020; Viana et al., 2022). La congestión sanguínea está relacionada con trastornos del flujo circulatorio e implica la dilatación de los espacios sanguíneos formados por los bordes de las células pilares adyacentes en la lámina, lo cual puede ocurrir debido a varios factores relacionados con el flujo sanguíneo; la congestión sanguínea puede progresar hacia un aneurisma y la ruptura del aneurisma puede provocar hemorragias locales. Ambas condiciones interrumpen el intercambio de gases, la captación de oxígeno y la excreción de dióxido de carbono, especialmente cuando afectan áreas grandes de las branquias. Los cambios observados ayudan a reducir la absorción por las branquias, pero en un escenario de exposición continua, la histopatología puede progresar y afectar la eficiencia del intercambio de gases, lo que conduce a hipoxia interna (Fernandes et al., 2007; Viana et al., 2022).

Anteriormente se informó que los herbicidas a base de glifosato inducen lesiones histopatológicas en las branquias e hígado de *Jenynsia multidentata* (Hued et al., 2012). Observaciones similares en las branquias de *D. rerio* se publicaron recientemente, mediante una exposición de 15 días a Roundup 10ppm. En el informe, los autores investigaron además el efecto toxicológico del pesticida temefós y el surfactante SDS, y diferentes combinaciones de estos (Santos-Silva et al., 2022). Los efectos de Roundup y las formulaciones de glifosato en el transporte intracelular, microtúbulos y filamentos de actina se analizaron en *Xenopus laevis*, lo que sugiere que la desintegración del citoesqueleto, así como los cambios en la morfología celular y la adherencia, están relacionados con su capacidad para interferir con el equilibrio del Ca²⁺ intracelular (Hedberg y Wallin, 2010). Un informe de impactos toxicológicos de formulaciones comerciales de fipronil y 2,4-D (en forma individual y en mezcla) en *D. rerio*, en exposiciones de 96 horas tanto individuales como en mezcla, encontró un levantamiento del epitelio lamelar en peces expuestos a 2,4-D y mezcla de pesticidas, hiperplasia, fusión parcial y total de las lamelas en todos los grupos expuestos, congestión y aneurisma solo en peces expuestos solo a 2,4-D (Viana et al., 2022). Branquias y músculos de *D. rerio* expuestos a tres concentraciones subletales diferentes de endosulfán (0.1, 0.5 y 1

µg/L), cada una combinada con imidacloprid (1 ppm), durante 21 días, mostraron lesiones marcadas, principalmente en los grupos de alta concentración después de exposiciones prolongadas, lo que indica que una exposición constante a pesticidas durante un período prolongado conduce a efectos perjudiciales (Muazzam et al., 2019).

En este trabajo, se informó de un mayor grado de alteraciones histopatológicas con la mezcla de glifosato + 2,4-D + imidacloprid, lo que indica un posible efecto sinérgico. Aunque varios estudios han informado sobre efectos tóxicos de los pesticidas estudiados en este trabajo, ya sea solos o en combinación con otros compuestos, no encontramos información ecotoxicológica sobre esta combinación particular, por lo que se necesitan más estudios para comprender los mecanismos por los cuales esta mezcla genera efectos tóxicos.

Análisis de la expresión génica

Uno de los efectos más importantes que la exposición a pesticidas puede producir es el desequilibrio entre ROS endógenos y exógenos, generando estrés oxidativo. La exposición a estos agentes puede provocar tanto una disminución en la defensa antioxidante como daño oxidativo en el cuerpo (Valavanidis et al., 2006). En condiciones fisiológicas normales, los ROS son rápidamente eliminados en peces y otros vertebrados por enzimas antioxidantes, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Abele y Puntarulo, 2004; Zhang et al., 2009; Juan et al., 2021). El estrés oxidativo producido por la generación de ROS puede desencadenar la activación de la apoptosis celular. Estos eventos, a su vez, activarían la expresión del gen supresor de tumores *p53*, responsable de inducir la activación de proteínas proapoptóticas como *Bcl2* y *Bax*, que conducen a la liberación de citocromo c en el citoplasma. Allí, debido a su interacción con *Apaf-1* (factor de activación de apoptosis 1), se forma un apoptosoma, activando *caspasa-9*, que a su vez activaría *caspsas (-3 y -7)*, desencadenando la muerte por apoptosis (Galluzzi et al., 2016).

Para comprender el mecanismo genotóxico de los pesticidas individuales y su mezcla en las células branquiales de peces cebra adultos, este estudio evaluó la expresión de los genes *p53*, *Bax*, *Bcl-2*, *caspasa-9*, *caspasa-3*, *ogg1*, *cat* y *sod*. Los genes *p53*, *Bax*, *Bcl-2*, *caspasa-9* y *caspasa-3* son conocidos por estar involucrados en la vía de la apoptosis celular. En particular, el factor de transcripción *p-53* desempeña un papel crucial en la defensa celular contra el estrés (Wang et al., 2019), activando respuestas celulares como la reparación del ADN, la detención del ciclo celular y/o la apoptosis, que proporcionan protección contra el daño del ADN (Wang y Sun, 2010; Hientz et al., 2016).

En el presente estudio, observamos que todos los genes involucrados en la vía de la apoptosis celular aumentaron significativamente su expresión. Estos resultados sugieren que la vía de la apoptosis celular se vio afectada después de la exposición tanto a pesticidas individuales como a la mezcla. Jin et al. (2011) demostraron que los niveles de ARNm de algunos genes de apoptosis, como *p53*, *puma*, *bax*, *apaf1*, *caspasa-9* y *caspasa-3*, aumentaron significativamente después de la exposición a 3 o 10 µg/L de cipermetrina, un pesticida piretroide tipo II ampliamente utilizado.

El sistema de reparación del ADN desempeña un papel vital en la protección contra el daño oxidativo. Por esta razón, se analizó el nivel de expresión del gen *ogg1*, importante en la reparación de productos de guanina oxidativa (Hazra et al., 2007; Wang et al., 2018), para determinar si este gen podría estar involucrado en la toxicidad de los

peces cebra. En nuestro estudio, pudimos observar una regulación negativa en los niveles de ARNm del gen *ogg1*, tanto para pesticidas individuales como para la mezcla.

Se puede hipotetizar que la sobreexpresión de *p-53* está involucrada en la activación de *caspasa-3* (Jiang et al., 2016). *p-53* puede desencadenar respuestas celulares (reparación o apoptosis) dependiendo de la intensidad del estrés químico (Chiang et al., 2013). Si las alteraciones del ADN persisten y los mecanismos de reparación son insuficientes, se desencadenará la apoptosis celular dependiente de caspasa. Varios estudios han informado sobre la regulación transcripcional de *p53* y *caspasa-3* en larvas de pez cebra después de la exposición a pesticidas (Zhu et al., 2015; Jiang et al., 2016; Zhao et al., 2016; Li et al., 2018; Islam et al., 2018). Sin embargo, este estudio es el primero en demostrar la alteración de las vías de reparación del ADN y apoptosis utilizando los genes *p53*, *Bax*, *Bcl-2*, *caspasa-9*, *caspasa-3*, *ogg1* en las branquias de peces cebra adultos bajo concentraciones ambientalmente relevantes de los pesticidas glifosato, 2,4-D e imidacloprid, tanto individualmente como en mezcla.

Además, el análisis de la expresión génica de *cat* y *sod* se ha utilizado para detectar toxicidad y monitorear los efectos de contaminantes químicos (Sheader et al., 2006; Woo et al., 2009). En este estudio, se demostró una sobreexpresión en los niveles de ARNm de estos genes en las células branquiales de peces cebra adultos tratados tanto con pesticidas individuales como con la mezcla. Esto sugiere que las vías CAT y SOD también están directamente involucradas como respuesta al estrés oxidativo causado por la exposición a estos pesticidas. Un trabajo anterior demuestra que el imidacloprid, a varias dosis (0.3, 1.25 y 5 mg/mL), induce estrés oxidativo y daño en el ADN en peces cebra después de 7, 14, 21 y 28 días de exposición (Ge et al., 2015). Esta exposición al imidacloprid altera los niveles de actividad de CAT y SOD, indicando la participación de estas enzimas en la respuesta al estrés oxidativo causado por el pesticida.

Evaluación del índice de daño del ADN

Los plaguicidas estudiados de manera individual y su mezcla, producen un daño oxidativo a nivel del ADN de forma muy significativa, luego de las 96 h de exposición bajo condiciones ambientalmente relevantes.

Estos resultados son coincidentes con los arrojados por los estudios anteriores, tanto histológicos como moleculares, por lo que se puede apreciar una correlación entre los estudios a lo largo del tiempo de ensayo.

Conclusiones

Basándonos en los resultados encontrados en nuestro estudio, se puede concluir que la exposición a los pesticidas de forma individual y, especialmente, en su mezcla, podría tener un efecto potencialmente tóxico en los peces cebra expuestos durante 96 horas a concentraciones subletales. Se evidenciaron consecuencias negativas a nivel conductual, incluyendo diversos grados de alteraciones histológicas y modificaciones en los niveles de genes clave involucrados en las vías de estrés oxidativo y apoptosis celular en el tejido branquial. Los efectos a corto plazo encontrados podrían tener consecuencias significativas a largo plazo para la población de peces y el ecosistema acuático en general. Por lo tanto, nuestros hallazgos refuerzan la necesidad de utilizar marcadores tempranos para estar alerta ante posibles alteraciones.

Indicadores de producción

Congreso internacional

2023. SETAC Latin America 15th Biennial Meeting. Pesticide-Induced Alterations in Zebrafish Behavior, Histology, and Gene Expression: An Integrated Approach. M. Bianchi, E.V. Paravani, M.G. Acosta, L. Odetti, M.F. Simoniello, G.L. Poletta. Resumen aprobado, se presenta en septiembre en formato poster.

Paper académico

Bianchi, M., Paravani, E. V., Acosta, M. G., Odetti, L. M., Simoniello, M. F., & Poletta, G. L. (2024). Pesticide-induced alterations in zebrafish (*Danio rerio*) behavior, histology, DNA damage and mRNA expression: An integrated approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 280, 109895. DOI: 10.1016/j.cbpc.2024.109895

Bibliografía

- Abele, D., Puntarulo, S., 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 138, 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.05.013>
- Baiamonte, M., Parker, M.O., Vinson, G.P., Brennan, C.H., 2016. Sustained Effects of Developmental Exposure to Ethanol on Zebrafish Anxiety-Like Behaviour. *PLoS ONE* 11, e0148425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148425>
- Canedo, A., Rocha, T.L., 2021. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. *Sci. Total Environ.* 762, 144084. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144084>
- Canedo, A., Saiki, P., Santos, A.L., Carneiro, K. da S., Souza, A.M. de, Qualhato, G., Brito, R. da S., Mello-Andrade, F., Rocha, T.L., 2022. Zebrafish (*Danio rerio*) meets bioethics: the 10Rs ethical principles in research. *Ciênc. Anim. Bras.* 23, e. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-70884>
- Cavaş, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 74, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001>
- Cheng, B., Zou, L., Zhang, H., Cao, Z., Liao, X., Shen, T., Xiong, G., Xiao, J., Liu, H., Lu, H., 2021. Effects of cyhalofop-butyl on the developmental toxicity and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 263, 127849. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127849>
- Chiang, M.-F., Chou, P.-Y., Wang, W.-J., Sze, C.-I., Chang, N.-S., 2013. Tumor Suppressor WWOX and p53 Alterations and Drug Resistance in Glioblastomas. *Front. Oncol.* 3.
- CONICET, 2005. Reference Ethical Framework for Biomedical Research: Ethical principles for research with laboratory, farm and wild animals. RESOLUCION D Nro. 1047, ANEXO I.
- d'Amora, M., Giordani, S., 2018. The Utility of Zebrafish as a Model for Screening Developmental Neurotoxicity. *Front. Neurosci.* 12.
- Dutra Costa, B.P., Aquino Moura, L., Gomes Pinto, S.A., Lima-Maximino, M., Maximino, C.,

2020. Zebrafish Models in Neural and Behavioral Toxicology across the Life Stages. *Fishes* 5, 23. <https://doi.org/10.3390/fishes5030023>
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol. Rev.* 85, 97–177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>
- Fernandes, M., Moron, S., Sakuragui, M., 2007. Gill Morphological Adjustments to Environment and the Gas Exchange Function, in: *Fish Respiration and Environment*. CRC Press.
- Fernandes, M.N., Moron, S.E., 2020. Chapter 10 - Breathing and respiratory adaptations, in: Baldisserotto, B., Urbinati, E.C., Cyrino, J.E.P. (Eds.), *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Academic Press, pp. 217–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.00010-5>
- Galluzzi, L., López-Soto, A., Kumar, S., Kroemer, G., 2016. Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity* 44, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.020>
- Garcia, G.R., Noyes, P.D., Tanguay, R.L., 2016. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacol. Ther.* 161, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.009>
- Ge, W., Yan, S., Wang, Jinhua, Zhu, L., Chen, A., Wang, Jun, 2015. Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Agric. Food Chem.* 63, 1856–1862. <https://doi.org/10.1021/jf504895h>
- Goessling, W., Sadler, K.C., 2015. Zebrafish: An Important Tool for Liver Disease Research. *Gastroenterology* 149, 1361–1377. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.08.034>
- Guerra, L.J., do Amaral, A.M.B., de Quadros, V.A., da Luz Fiuza, T., Rosemberg, D.B., Prestes, O.D., Zanella, R., Clasen, B., Loro, V.L., 2021. Biochemical and Behavioral Responses in Zebrafish Exposed to Imidacloprid Oxidative Damage and Antioxidant Responses. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 255–264. <https://doi.org/10.1007/s00244-021-00865-9>
- Hazra, T.K., Das, A., Das, S., Choudhury, S., Kow, Y.W., Roy, R., 2007. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: A new perspective. *DNA Repair, Repair of small base lesions in DNA—from molecular biology to phenotype* 6, 470–480. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.011>
- Hedberg, D., Wallin, M., 2010. Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicol. In Vitro* 24, 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.020>
- Hientz, K., Mohr, A., Bhakta-Guha, D., Efferth, T., 2016. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* 8, 8921–8946. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13475>
- Hued, A.C., Oberhofer, S., de los Ángeles Bistoni, M., 2012. Exposure to a commercial glyphosate formulation (Roundup®) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsiamultidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 107–117. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9686-7>
- Islam, F., Wang, J., Farooq, M.A., Khan, M.S.S., Xu, L., Zhu, J., Zhao, M., Muños, S., Li, Q.X., Zhou, W., 2018. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environ. Int.* 111, 332–351. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.020>

- Jiang, J., Chen, Y., Yu, R., Zhao, X., Wang, Q., Cai, L., 2016. Pretilachlor has the potential to induce endocrine disruption, oxidative stress, apoptosis and immunotoxicity during zebrafish embryo development. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 42, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.006>
- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z., 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 78, 846–852. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.044>
- Jin, Y., Zheng, S., Pu, Y., Shu, L., Sun, L., Liu, W., Fu, Z., 2011. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 82, 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.072>
- Juan, C.A., Pérez de la Lastra, J.M., Plou, F.J., Pérez-Lebeña, E., 2021. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Kock, A., Glanville, H.C., Law, A.C., Stanton, T., Carter, L.J., Taylor, J.C., 2023. Emerging challenges of the impacts of pharmaceuticals on aquatic ecosystems: A diatom perspective. *Sci. Total Environ.* 878, 162939. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162939>
- Kysil, E.V., Meshalkina, D.A., Frick, E.E., Echevarria, D.J., Rosemberg, D.B., Maximino, C., Lima, M.G., Abreu, M.S., Giacomini, A.C., Barcellos, L.J.G., Song, C., Kalueff, A.V., 2017. Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. *Zebrafish* 14, 197–208. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1415>
- Lai, K.P., Gong, Z., Tse, W.K.F., 2021. Zebrafish as the toxicant screening model: Transgenic and omics approaches. *Aquat. Toxicol.* 234, 105813. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105813>
- Li, H., Yu, S., Cao, F., Wang, C., Zheng, M., Li, X., Qiu, L., 2018. Developmental toxicity and potential mechanisms of pyraoxystrobin to zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 151, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.061>
- Lins, J. a. P.N., Kirschnik, P.G., Queiroz, V. da S., Cirio, S.M., 2010. Use of fish as biomarkers for monitoring aquatic environment. *Rev. Acadêmica Ciênc. Agrár. E Ambient.* 8, 469–484.
- Lopes, A.R., Moraes, J.S., Martins, C. de M.G., 2022. Effects of the herbicide glyphosate on fish from embryos to adults: a review addressing behavior patterns and mechanisms behind them. *Aquat. Toxicol.* 251, 106281. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106281>
- Muazzam, B., Munawar, K., Khan, I.A., Jahan, S., Iqbal, M., Asi, M.R., Farooqi, A., Nazli, A., Hussain, I., Zafar, M.I., 2019. Stress response and toxicity studies on zebrafish exposed to endosulfan and imidacloprid present in water. *J. Water Supply Res. Technol.-Aqua* 68, 718–730. <https://doi.org/10.2166/aqua.2019.077>
- Paravani, E.V., Bianchi, M., Querubín Pereyra, P.L., Acosta, M.G., Odetti, L., Simoniello, M.F., Poletta, G., 2023. DNA damage, alterations in the expression of antioxidant enzyme genes and in the histoarchitecture of gill cells of zebrafish exposed to 17- α -ethinylestradiol. *Drug Chem. Toxicol.* 1–7. <https://doi.org/10.1080/01480545.2023.2188441>
- Paravani, E.V., Simoniello, M.F., Poletta, G.L., Casco, V.H., 2019. Cypermethrin induction of DNA damage and oxidative stress in zebrafish gill cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*

- 173, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.004>
- Paravani, E.V., Simoniello, M.F., Poletta, G.L., Zolessi, F.R., Casco, V.H., 2018. Cypermethrin: Oxidative stress and genotoxicity in retinal cells of the adult zebrafish. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 826, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.12.010>
- Poleksic, V., Mitrovic-Tutundzic, V., 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. Fishing News Books for FAO.
- Pompermaier, A., Kirsten, K., Soares, S.M., Fortuna, M., Kalichak, F., Idalencio, R., Koakoski, G., Barreto, R.E., Barcellos, L.J.G., 2020. Waterborne agrichemicals compromise the anti-predatory behavior of zebrafish. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 38559–38567. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09862-2>
- Richendrfer, H., Pelkowski, S.D., Colwill, R.M., Créton, R., 2012. Developmental sub-chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Neurotoxicol. Teratol.* 34, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.04.010>
- Rohani, M.F., 2023. Pesticides toxicity in fish: Histopathological and hemato-biochemical aspects – A review. *Emerg. Contam.* 9, 100234. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2023.100234>
- Santos-Silva, T., Ribeiro, R.I.M. de A., Alves, S.N., Thomé, R.G., Santos, H.B. dos, 2022. Assessment of the Toxicological Effects of Pesticides and Detergent Mixtures on Zebrafish Gills: a Histological Study. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 64, e21210198. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021210198>
- Selvaraj, V., Venkatasubramanian, H., Ilango, K., Santhakumar, K., 2019. A simple method to study motor and non-motor behaviors in adult zebrafish. *J. Neurosci. Methods* 320, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.03.008>
- Shao, B., Zhu, L., Dong, M., Wang, Jun, Wang, Jinhua, Xie, H., Zhang, Q., Du, Z., Zhu, S., 2012. DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology* 21, 1533–1540. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0907-2>
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G.P.S., Handa, N., Kohli, S.K., Yadav, P., Bali, A.S., Parihar, R.D., Dar, O.I., Singh, K., Jasrotia, S., Bakshi, P., Ramakrishnan, M., Kumar, S., Bhardwaj, R., Thukral, A.K., 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* 1, 1446. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>
- Shader, D.L., Williams, T.D., Lyons, B.P., Chipman, J.K., 2006. Oxidative stress response of European flounder (*Platichthys flesus*) to cadmium determined by a custom cDNA microarray. *Mar. Environ. Res.* 62, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.03.001>
- Silva Brito, R., Canedo, A., Farias, D., Rocha, T.L., 2022. Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends. *Sci. Total Environ.* 848, 157665. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157665>
- Thiel, N.A., Sachett, A., Schneider, S.E., Garbinato, C., Decui, L., Eichwald, T., Conterato, G.M.M., Latini, A., Piato, A., Siebel, A.M., 2020. Exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid impairs mitochondrial function, oxidative status, and behavior in adult zebrafish. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27, 45874–45882. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10497-6>
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>

- Vernetti, L.A., Vogt, A., Gough, A., Taylor, D.L., 2017. Evolution of Experimental Models of the Liver to Predict Human Drug Hepatotoxicity and Efficacy. *Clin. Liver Dis.* 21, 197–214. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.013>
- Viana, N.P., da Silva, L.C.M., Portruneli, N., Soares, M.P., Cardoso, I.L., Bonansea, R.I., Goulart, B.V., Montagner, C.C., Espíndola, E.L.G., Wunderlin, D.A., Fernandes, M.N., 2022. Bioconcentration and toxicological impacts of fipronil and 2,4-D commercial formulations (single and in mixture) in the tropical fish, *Danio rerio*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 29, 11685–11698. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16352-6>
- Wang, R., Hao, W., Pan, L., Boldogh, I., Ba, X., 2018. The roles of base excision repair enzyme OGG1 in gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 3741–3750. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2887-8>
- Wang, W., Wang, B., Liu, Z., Xia, X., 2019. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryo exposed to 6-benzylaminopurine. *Chemosphere* 233, 336–346. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.261>
- Wang, Z., Sun, Y., 2010. Targeting p53 for Novel Anticancer Therapy. *Transl. Oncol.* 3, 1–12. <https://doi.org/10.1593/tlo.09250>
- Westerfield, M., 2007. *THE Zebrafish Book a Guide for the Laboratory Use of Zebrafish *Danio***, 5th Edition. ed. Univ. of Oregon Press, Eugene.
- Woo, S., Yum, S., Kim, D.-W., Park, H.-S., 2009. Transcripts level responses in a marine medaka (*Oryzias javanicus*) exposed to organophosphorus pesticide. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 427–432. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.10.100>
- Zakaria, Z.Z., Benslimane, F.M., Nasrallah, G.K., Shurbaji, S., Younes, N.N., Mraiche, F., Da'as, S.I., Yalcin, H.C., 2018. Using Zebrafish for Investigating the Molecular Mechanisms of Drug-Induced Cardiotoxicity. *BioMed Res. Int.* 2018, 1642684. <https://doi.org/10.1155/2018/1642684>
- Zanandrea, R., Bonan, C.D., Campos, M.M., 2020. Zebrafish as a model for inflammation and drug discovery. *Drug Discov. Today* 25, 2201–2211. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.09.036>
- Zhang, X., Xie, P., Li, D., Tang, R., Lei, H., Zhao, Y., 2009. Time-dependent oxidative stress responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 574–578. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9671-2>
- Zhao, X., Ren, X., Zhu, R., Luo, Z., Ren, B., 2016. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 180, 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.013>
- Zhu, L., Mu, X., Wang, K., Chai, T., Yang, Y., Qiu, L., Wang, C., 2015. Cyhalofop-butyl has the potential to induce developmental toxicity, oxidative stress and apoptosis in early life stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 203, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.044>

PID 6207 Denominación del Proyecto

Estrés oxidativo y genotoxicidad en células branquiales de los peces cebra (*Danio rerio*) adultos sometidos a concentraciones ambientales de plaguicidas y mezclas complejas.

Director

Paravani, Enrique Valentín

Codirectora

Acosta, María Gabriela

Unidad de Ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Ingeniería

Contacto

enrique.paravani@uner.edu.ar

Cátedra/s, área o disciplina científica

Química General e Inorgánica. Laboratorio de Química Ambiental.

Integrantes del proyecto

Internos: Bianchi Mariana. Externos: Battauz Yamila Soledad; Poletta Gisela Laura; Sasal María Carolina; Simoniello María Fernanda; Odetti Lucia Magdalena. Becarios: Querubín Pereyra Pablo Luciano; Roda Rocío Milagros

Fechas de iniciación y de finalización efectivas

15 de agosto 2019 y 07 de julio 2023

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S. N° 438/23 (24-11-2023)