

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA FUNCIONAL I  
ANTROPOLOGIA FÍSICA

VALORACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DEL HERBICIDA  
PROPANIL MEDIANTE EL ESTUDIO DE LAS  
ALTERACIONES FISIOLÓGICAS INDUCIDAS EN LA  
ANGUILA (*ANGUILLA ANGUILLA*) DEL PARQUE  
NATURAL DE LA ALBUFERA DE VALENCIA

CRISTINA FERNÁNDEZ VEGA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 16 de juliol de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Enrique Andreu Moliner
- D. José Cerón Madrigal
- D<sup>a</sup>. María Manuela Morales Suárez-Varela
- D. José Vicente Tarazona Lafarga
- D. Jose Juan del Ramo Romero

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Dolores Ferrando Rodrigo

D<sup>a</sup>. Encarnación Sancho Aguilar

©Copyright: Servei de Publicacions  
Cristina Fernández Vega

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.: 978-84-370-7237-1

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

# VNIVERSITAT VALÈNCIA

## FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

**Departament de Biologia Funcional  
i Antropologia Física**



**“Valoración ecotoxicológica del herbicida propanil  
mediante el estudio de las alteraciones fisiológicas  
inducidas en la anguila (*Anguilla anguilla*) del Parque  
Natural de la Albufera de Valencia”**

Memoria presentada por:  
Dña. Cristina Fernández Vega  
Para optar al grado de  
Doctora en Ciencias  
Biológicas.  
Enero 2007.

Las Dras. **Dña. M<sup>a</sup> DOLORES FERRANDO RODRIGO**, Profesora Titular de Fisiología y **Dña. ENCARNACIÓN SANCHO AGUILAR**, Investigadora Programa Ramón y Cajal, del Departamento de Biología Funcional y Antropología Física de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral titulada “**Valoración ecotoxicológica del herbicida propanil mediante el estudio de las alteraciones fisiológicas inducidas en la anguila (*Anguilla anguilla*) del Parque Natural de la Albufera de Valencia**” presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas **Dña. Cristina Fernández Vega**, para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo su dirección, en el Departamento de Biología Funcional y Antropología Física de la Universidad de Valencia.

Y para que así conste, en cumplimiento de la normativa vigente firmamos el presente certificado en,

Burjassot, 22 de Enero de 2007.

Fdo. Prof. Dra. M<sup>a</sup> Dolores Ferrando Rodrigo  
Aguilar

Fdo. Dra. Encarnación Sancho

Es para mí un honor además de una gran satisfacción poder manifestar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de un modo u otro han contribuido a la realización de este trabajo.

A la Prof. María Dolores Ferrando Rodrigo, que fue mi profesora de Fisiología Animal y a la que debo esta oportunidad, por su sabia orientación, su gran profesionalidad y por la confianza que depositó en mí desde el primer día.

Al Prof. Enrique Andreu Moliner por permitir integrarme en su equipo de investigación, y facilitarme siempre y en todo momento todo aquello que para el desarrollo de este trabajo necesitara, además de su apoyo y confianza depositados en mí.

Es muy grato para mí poder mostrar mi agradecimiento a la Dra. Encarnación Sancho Aguilar, "Encarna", por la dedicación constante que me ofreció, por la paciencia que mostró conmigo y de la que estaré siempre muy agradecida. Gracias a sus siempre sabios consejos, valiosas enseñanzas y oportunas correcciones he aprendido y me ha servido de guía constante a lo largo del trabajo de investigación. Con su gran sentido del humor, su cercanía y humanidad no reñido con una gran profesionalidad ha sido un honor para mí trabajar bajo sus directrices y desde el primer momento se ha ganado mi admiración, lealtad y amistad. Y que perdurarán siempre.

A la Conselleria de Cultura, Educació i Esport de la Generalitat Valenciana, que gracias a la beca predoctoral que me concedió he podido llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

Al Departament de Biologia Animal y Antropologia Física por ofrecerme las instalaciones en las que he podido desarrollar el presente trabajo.

A mis compañeras de laboratorio, Susana, María y M<sup>a</sup> José, que desde el primer momento hicieron que me sintiese integrada en el grupo de trabajo, por las largas horas de laboratorio y animada charla de los temas más variopintos que compartimos y que ahora me resulta tan grato recordar, por el afecto que me brindaron desde el primer día y que me hicieron tan agradable la estancia en el laboratorio.

A Jesús Fuente Morillo, por su desinteresada ayuda en el tratamiento estadístico de los resultados.

A "las Isabeles" y también a Fina, por su ayuda con todo lo referente al a veces tedioso "papeleo" administrativo.

Y en el no menos importante ámbito de lo personal, quisiera mostrar mi agradecimiento de un modo muy especial a Steffen von Laufenberg, mi marido, por estar siempre y en todo momento a mi lado, por mostrarme su apoyo y comprensión a lo largo de estos años. Sus consejos y sus acertadas palabras sobretodo en los momentos de inquietud han supuesto verdaderamente un bálsamo para mi espíritu. Nunca le agradeceré lo suficiente su paciencia, tolerancia y ánimo que nunca me faltaron tanto en los buenos como en los a veces no tan felices momentos.

A mis padres Tomás y Julita, a los que tanto debo, por todo el cariño y afecto que me han dado, porque han creído siempre en mí y porque sin ellos no sería lo que hoy soy.

A mis hermanos: a Fernando y María, a Roberto y Belén, a Rubén y Dulce, a Carlos, a Jose, a Gema y Adrián y a Raquel. Todos ellos me han apoyado siempre, me han infundido ánimos, y han estado incondicionalmente a mi lado. En el trajín del día a día, muchas veces no tenemos tiempo para decir lo importantes que son. Por eso quiero aprovechar estas líneas para agradecerles a todos su apoyo y decirles la suerte que tengo de tenerles siempre cerca.

A Beatriz, mi suegra, por su generosidad y por su bondad, por preocuparse siempre de nosotros.

Y como no, a mis preciosos bebés, Marc y Aroa, dos deliciosas críaturitas que son mi alegría y me llenan de felicidad cada minuto del día.

A todos, gracias de corazón.

***A Steffen***

***“Lo importante en ciencia no es tanto obtener nuevos hechos como descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos”***

Albert Szent-Györgyi, (1893-1986)  
bioquímico y biólogo molecular



## **ÍNDICE**

# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1.1. Plaguicidas.....	3
1.1.1. El herbicida Propanil.....	4
1.1.1.1. Toxicología del herbicida Propanil.....	5
1.2. Parque Natural de la Albufera de Valencia.....	6
1.3. La anguila europea: <i>Anguilla anguilla</i> .....	8
1.4. Toxicidad aguda.....	11
1.5. Toxicidad subletal.....	12
1.5.1. Respuesta de estrés en peces y biomarcadores de exposición a plaguicidas.....	12
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1. Animales experimentales.....	21
3.1.1. Mantenimiento y aclimatación.....	21
3.1.1.1. Condiciones de laboratorio.....	21
3.1.1.2. Propiedades del medio experimental.....	22
3.2. Plaguicida ensayado.....	22
3.3. Estudio de toxicidad.....	22
3.3.1. Toxicidad aguda.....	23
3.3.1.1. Ensayo preliminar.....	23
3.3.1.2. Ensayo definitivo.....	23
3.3.2. Toxicidad subletal.....	24
3.3.2.1. Cálculos teóricos previos.....	24
3.3.2.2. Diseño experimental.....	26
3.3.2.2.1. Fase de exposición.....	26
3.3.2.2.2. Fase de recuperación.....	26
3.3.2.3 Selección y obtención de muestras biológicas.....	27
3.3.2.3.1 Sangre.....	28
3.3.2.3.2 Cerebro.....	28
3.3.2.3.3 Hígado.....	28
3.3.2.3.4 Corazón.....	28

3.3.2.3.5 Musculatura esquelética.....	29
3.3.2.3.6 Branquias.....	29
3.4. Procedimiento analítico.....	29
3.4.1. Aparatos y accesorios.....	30
3.4.2. Protocolos de análisis.....	31
3.4.2.1. Metodología analítica para la determinación de metabolitos.....	31
3.4.2.1.1. Albúmina.....	32
3.4.2.1.2. Colesterol.....	33
3.4.2.1.3. Glucosa.....	34
3.4.2.1.4. Lactato.....	35
3.4.2.1.5. Proteínas totales.....	36
3.4.2.1.6. Triglicéridos.....	37
3.4.2.1.7. Glucógeno.....	38
3.4.2.2. Metodología analítica para las determinaciones enzimáticas.....	39
3.4.2.2.1. Alanina Aminotransferasa (ALT/GPT).....	40
3.4.2.2.2. Aspartato Aminotransferasa (AST/GOT).....	41
3.4.2.2.3. Fosfatasa Alcalina (ALP).....	42
3.4.2.2.4. $\gamma$ - Glutamil Transferasa ( $\gamma$ -GT).....	43
3.4.2.2.5. Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	44
3.4.3. Contenido calórico (CC).....	45
3.4.4. Índice hepatosomático (HSI).....	45
3.4.5. Contenido hídrico (CH).....	45
3.5. Tratamiento estadístico.....	45
3.5.1. Toxicidad aguda.....	45
3.5.2. Toxicidad subletal.....	46
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1. Ensayo de toxicidad aguda.....	48
4.1.1. Ensayo preliminar.....	48
4.1.2. Ensayo definitivo de toxicidad aguda.....	48
4.2. Estudio de los parámetros fisiológicos.....	53
4.2.1. Experimento control.....	53
4.2.1.1. Metabolitos.....	53
4.2.1.2. Enzimas.....	55

4.2.1.3. Contenido calórico (CC).....	56
4.2.1.4. Índice hepatosomático (HSI).....	56
4.2.1.5. Contenido hídrico (CH).....	56
4.2.2. Toxicidad subletal.....	66
4.2.2.1. Plasma: Metabolitos.....	66
4.2.2.1.1. Glucosa.....	66
4.2.2.1.2. Lactato.....	70
4.2.2.1.3. Proteínas totales.....	72
4.2.2.1.4. Albúmina.....	74
4.2.2.1.5. Colesterol.....	74
4.2.2.1.6. Triglicéridos.....	77
4.2.2.2. Plasma: Enzimas.....	79
4.2.2.2.1. Actividad Aspartato Aminotransferasa (AST).....	79
4.2.2.2.2. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP).....	81
4.2.2.3. Plasma: Correlación lineal entre parámetros.....	83
4.2.2.4. Hígado: Metabolitos.....	84
4.2.2.4.1. Glucosa.....	84
4.2.2.4.2. Lactato.....	88
4.2.2.4.3. Glucógeno.....	90
4.2.2.4.4. Proteínas totales.....	92
4.2.2.4.5. Colesterol.....	96
4.2.2.4.6. Triglicéridos.....	96
4.2.2.5. Hígado: Correlación lineal entre parámetros (1).....	97
4.2.2.6. Hígado: Enzimas.....	99
4.2.2.6.1. Actividad Alanina Aminotransferasa (ALT).....	99
4.2.2.6.2. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP).....	103
4.2.2.6.3. Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	103
4.2.2.6.4. Actividad $\gamma$ -Glutamil Transferasa ( $\gamma$ -GT).....	106
4.2.2.7. Hígado: Contenido calórico.....	107
4.2.2.8. Índice hepatosomático.....	111
4.2.2.9. Hígado: Contenido hídrico.....	112
4.2.2.10. Hígado: Correlación lineal entre parámetros (2).....	115
4.2.2.11. Musculatura esquelética: Metabolitos.....	116

4.2.2.11.1. Glucosa.....	116
4.2.2.11.2. Lactato.....	116
4.2.2.11.3. Glucógeno.....	121
4.2.2.11.4. Proteínas totales.....	122
4.2.2.11.5. Colesterol.....	125
4.2.2.11.6. Triglicéridos.....	127
4.2.2.12. Musculatura esquelética: Correlación lineal entre parámetros (1).....	127
4.2.2.13. Musculatura esquelética: Enzimas.....	129
4.2.2.13.1. Actividad Alanina Aminotransferasa (ALT).....	129
4.2.2.13.2. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP).....	130
4.2.2.13.3. Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	136
4.2.2.13.4. Actividad $\gamma$ -Glutamyl Transferasa ( $\gamma$ -GT).....	137
4.2.2.14. Musculatura esquelética: Contenido calórico.....	137
4.2.2.15. Musculatura esquelética: Contenido hídrico.....	142
4.2.2.16. Musculatura esquelética: Correlación lineal entre parámetros (2).....	144
4.2.2.17. Cerebro: Metabolitos.....	145
4.2.2.17.1. Glucosa.....	145
4.2.2.17.2. Lactato.....	149
4.2.2.17.3. Proteínas totales.....	152
4.2.2.18. Cerebro: Enzimas.....	152
4.2.2.18.1. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP).....	152
4.2.2.18.2. Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	154
4.2.2.19. Cerebro: Correlación lineal entre parámetros.....	156
4.2.2.20. Branquia: Metabolitos.....	156
4.2.2.20.1. Lactato.....	156
4.2.2.20.2. Proteínas totales.....	160
4.2.2.21. Branquia: Enzimas.....	162
4.2.2.21.1. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP).....	162
4.2.2.21.2. Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	164
4.2.2.22. Branquia: Contenido hídrico.....	164
4.2.2.23. Branquia: Correlación lineal entre parámetros.....	167
4.2.2.24. Corazón: Metabolitos.....	168
4.2.2.24.1. Glucosa.....	168

4.2.2.24.2. Lactato.....	168
4.2.2.24.3. Proteínas totales.....	173
4.2.2.25. Corazón: Enzimas.....	173
4.2.2.25.1. Actividad Alanina Aminotransferasa (ALT).....	173
4.2.2.25.2. Actividad $\gamma$ -Glutamil Transferasa ( $\gamma$ -GT).....	176
4.2.2.26. Corazón: Correlación lineal entre parámetros.....	178
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>180</b>
5.1. Ensayo de toxicidad aguda.....	181
5.2 Toxicidad subletal: Respuesta de estrés.....	185
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>219</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>222</b>
<b>8. ANEXO ESTADÍSTICA.....</b>	<b>238</b>
8.1. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el plasma.....	239
8.2. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el hígado.....	247
8.3. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en la musculatura esquelética.....	260
8.4. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el cerebro.....	272
8.5. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en la branquia.....	277
8.6. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el corazón.....	282

## **1. INTRODUCCIÓN**

La Cumbre del Milenio celebrada en Johannesburgo en el año 2002 estableció los “Retos del Milenio” que identifican las prioridades para lograr un Desarrollo Sostenible para el Planeta tratando de hacer compatibles Progreso Económico y Protección del Medio Ambiente, contribuyendo a mejorar el “Bienestar Humano” en este nuevo milenio.

La agricultura del siglo XXI tiene un papel crucial en la consecución de las diversas metas que plantea el Desarrollo Sostenible. Mantener elevados rendimientos agrícolas es inconcebible sin el uso de fitosanitarios. Su eliminación es difícil, ya que hoy en día no existe una alternativa totalmente válida. En muchos casos, los niveles de productividad y rentabilidad de un cultivo sólo son alcanzables mediante la aplicación de plaguicidas.

Uno de los cultivos más importantes a escala mundial es el cultivo del arroz. Está considerado como el cereal más importante del planeta por la extensión de la superficie dedicada a su cultivo y el número de personas que depende de sus cosechas, además de representar el alimento básico para más de la mitad de la población mundial (Alexandratos, 1995). En Europa el arroz se cultiva principalmente en la Cuenca Mediterránea, representando España, con 113.076 hectáreas en el año 2001, un 28.2% de la superficie total agrícola dedicada al cultivo del arroz (Astorga Ramírez, 2001). En nuestro país, se cultiva generalmente en campos situados en la periferia de Espacios Naturales en los que las prácticas agrícolas tienen que coexistir con la flora y fauna salvajes, como es el caso del Parque Natural de la Albufera de Valencia.



## **1.1. PLAGUICIDAS**

Se define como plaguicida a “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir o controlar toda especie de plantas o animales indeseables, y que abarca también a cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a ser utilizadas como reguladoras del crecimiento vegetal, como defoliantes o desecantes”, según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (F.A.O., 1999).

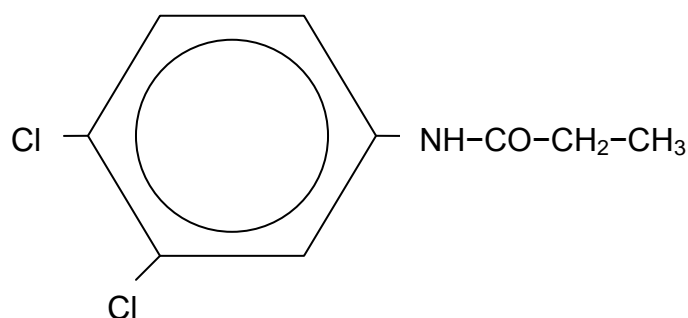
La Organización Mundial de la Salud (O.M.S., 2003) clasifica a los plaguicidas en diferentes categorías de peligrosidad según su toxicidad sobre micromamíferos expuestos por vía oral o dérmica. Por el Real Decreto 3349/1983 y el Real Decreto 162/1991, en España se clasifican según su modo de acción, el uso al que van destinados, los organismos que controlan, su naturaleza química, su presentación de formulados comerciales y su grado de toxicidad.

La problemática medioambiental derivada del uso de los plaguicidas es muy amplia y engloba muy diversos aspectos como el desequilibrio de los sistemas biológicos, el desarrollo de resistencias a los plaguicidas, lo que obliga a utilizar mayores concentraciones o productos de mayor efectividad, o los posibles efectos tóxicos para el hombre y/o otros organismos para los cuales no han sido diseñados. A esto se debe añadir la contaminación permanente producida por los residuos de plaguicidas o la toxicidad de los compuestos resultantes de su degradación química o metabólica, que en algunos casos pueden resultar tanto o más tóxicos que el compuesto original (Primo y Carrasco, 1990).

Los ecosistemas acuáticos constituyen una de las áreas más susceptibles de vertido de residuos industriales y agrícolas. Derivados de su uso en la agricultura, los plaguicidas pueden alcanzar los recursos hídricos por fuga o deriva desde el lugar de aplicación, por arrastre de aguas superficiales o escorrentía, por lixiviación a través del suelo por las aguas de lluvia y/o riego o directamente por fumigación. Algunas de estas sustancias químicas pueden persistir en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo, a menudo sin sufrir ningún tipo de transformación. Estos compuestos, además de afectar a los organismos causantes de la plaga para la cual han sido diseñados, también afectan a otros seres vivos para los que no están destinados. En este sentido, los peces constituyen un importante grupo de organismos no diana. Están expuestos a los plaguicidas a través de su tegumento, de sus finas y ampliamente vascularizadas branquias y/o por la ingestión de alimento contaminado. Además por situarse en los niveles superiores de las pirámides tróficas, son especialmente vulnerables a los plaguicidas por fenómenos de biomagnificación (Hontela, 1997). Una vez han ingresado en el organismo, estos compuestos pueden ocasionar importantes perturbaciones en su equilibrio metabólico y fisiológico.

### 1.1.1. EL HERBICIDA PROPANIL

De nombre común propanil fue comercializado por primera vez por Room & Haas Co. en 1961. Es una acetanilida perteneciente a la clase química de las amidas herbicidas. Su nombre científico (IUPAC) es 3'4'-dicloropropionanilida (figura 1), otros sinónimos químicos son: N-(3'4'-diclorofenil) propanamida y 3,4-DCPA (Tomlin, 1997).



**Figura 1.** Estructura química del propanil.

El producto puro es un sólido cristalino de color marrón, con una solubilidad en el agua de 225 mg/L a 25°C. Su solubilidad en disolventes orgánicos es de  $1.7 \times 10^6$  mg/L en acetona y  $1.1 \times 10^6$  mg/L en etanol, a 25°C. Es hidrolizado en medio ácido o alcalino, dando 3,4-dicloroanilina (DCA) y ácido propiónico. Su coeficiente de partición n-octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ) es de 3.3 (Worthing, 1987; EXTTOXNET, 1996; Tomlin, 1997). La vida media varía notablemente dependiendo del pH del agua, como lo demuestran los estudios de Konstantinou y cols. (2001), que determinaron una vida media que fluctúa entre 60 días (en agua continental lacustre a pH 8.5) y 40 días (en aguas subterráneas a pH 7.2).

Se trata de un herbicida selectivo de aplicación post-emergente en arrozales (2.5-5.0 kg/ha) usado para el control de hierbas de hoja ancha y malas hierbas de los géneros *Digitaria*, *Echinochloa*, *Panicum* y *Setaria* entre otros (Tomlin, 1997). Se absorbe por contacto a través de las hojas y causa clorosis seguida de desecación foliar y necrosis. Su modo de acción es por inhibición de la fotosíntesis: la molécula de propanil bloquea la cadena de transporte electrónico en la membrana tilacoidal de los cloroplastos, entre las plastoquinonas  $Q_A$  y  $Q_B$ , lo que produce la inhibición de la reacción de Hill en el fotosistema II, impidiendo la fotólisis del agua y la liberación de  $O_2$  (Huppatz, 1996).

Según la clasificación toxicológica de los plaguicidas establecida por la O.M.S. (2003) el herbicida propanil pertenece a la categoría II (producto moderadamente peligroso/dañino), dentro de un rango de categorías que va de la I (extremadamente peligroso) a la IV (no peligroso).

En condiciones naturales el herbicida propanil se degrada fácilmente por hidrólisis, degradación bacteriana y fotólisis a varios metabolitos, de los cuales la 3,4-dicloroanilina

(DCA), el 3,3'-4,4'-tetracloroazobenzeno (TCAB) y el 3,3'-4,4'-tetracloroazoxibenzeno (TCAOB) presentan una toxicidad y una persistencia muy superior a la del compuesto parental (O.M.S., 2003).

#### **1.1.1.1. Toxicología del herbicida Propanil**

El propanil es posiblemente el herbicida más utilizado a escala mundial en el cultivo del arroz (Photuluri y cols., 1991; Moore y Farris, 1997), incluyendo el Delta del Ebro (Tarragona) y el Parque Natural de la Albufera de Valencia, donde se utiliza desde hace más de dos décadas. En el agua del Delta del Ebro se han detectado concentraciones elevadas de propanil y DCA, de hasta 71.1 y 470 µg/L respectivamente, detectándose niveles de los mismos aún después de 8 días tras su aplicación (Santos y cols., 1998). Estos niveles serían suficientes para evitar o retardar el desarrollo de la vegetación sumergida, que es necesaria como fuente de alimentación o refugio de muchos invertebrados y vertebrados, destruyéndose así el hábitat necesario para que las comunidades de animales se desarrollen (Mañosa y cols., 2001). Se han detectado concentraciones de propanil de 28 µg/L en diferentes canales de irrigación del arrozal de la Albufera de Valencia (Gómez de Barreda y cols., 2002).

Este herbicida es un potente inhibidor de la fotosíntesis del fitoplancton, primer eslabón en las cadenas tróficas acuáticas. Según Tucker (1987) bastarían concentraciones de propanil de 50 µg/L para inhibir la fotosíntesis del fitoplancton y disminuir drásticamente el oxígeno disuelto del agua, lo que indirectamente ocasionaría grandes pérdidas en áreas de cría de especies piscícolas próximas a arrozales. Gómez de Barreda y cols. (2004) determinaron que 0.29 y 3.21 mg/L de propanil serían suficientes para inhibir un 50% (a las 72 h) el crecimiento de dos especies de fitoplancton representativas de humedales mediterráneos y aisladas en la Albufera, *Scenedesmus acutus* y *Chlorella saccharophila* respectivamente.

Su liposolubilidad le confiere, entre otras propiedades, la de ser absorbido a través de tegumento y mucosas y otras membranas externas de los animales pasando a vía sistémica, sin precisar un ingreso por vía oral (Sanz y Repetto, 1995). Parece que en algunas especies de peces, el propanil se acumula en los tejidos de forma relativamente rápida y el estado de equilibrio se alcanza en las primeras 24 h, como observaron Call y cols. (1983) y Schlenk y Moore (1993) en las especies *Pimepahaes promelas* e *Ictalurus punctatus* respectivamente. Respecto de la eliminación del propanil, las diferencias interespecíficas se hacen más evidentes a juzgar por los resultados obtenidos por estos mismos autores, que observaron que en los individuos de la especie *Ictalurus punctatus* tras 6 días se había eliminado un 62 % de la concentración inicial, mientras que en los individuos de la especie *Pimepahaes promelas* a los 10 días se detectaba solamente un 5% de la concentración inicial.

Su metabolización tiene lugar por hidrólisis principalmente. En vertebrados es hidrolizado por la enzima acilamidasa hepática, formando ácido propiónico y DCA (Mc Millan y cols.,

1990a). En concreto en mamíferos, se ha observado que la exposición a este herbicida afecta a los eritrocitos, causando metahemoglobinemia, anemia, cianosis y hemolisis (Singleton y Murphy, 1973; McMillan y cols. 1990a,b,c, 1991). Otros efectos observados también en mamíferos incluyen neurotoxicidad e inmunotoxicidad, además de atrofia del timo y cambios en el peso del timo y el bazo (Theus y cols., 1993; Cuff y cols., 1996; Zhao y cols., 1995, 1999), toxicidad renal con aumento de la actividad lactato deshidrogenasa (Valentovic y cols., 1995), mielotoxicidad (Blyler y cols., 1994) y peroxidación lipídica en tejidos como hígado y cerebro (Santillo y cols. 1995). También se citan metahemoglobinemia, hipoxia tisular, depresión del sistema nervioso central y del sistema respiratorio (Eddleston y cols. 2002). Se ha demostrado que los metabolitos TCAB y TCAOB son citotóxicos, embriocidas y teratogénicos (Hassoun y cols., 1984; Pothuluri y cols. 1991; van Birgelen y cols., 1999).

En los peces encontramos que el herbicida propanil es tóxico en las primeras etapas del desarrollo: disminuye la tasa de eclosión y afecta al normal desarrollo y supervivencia de larvas y juveniles, con efectos teratogénicos y muerte, como en *Pimephales promelas* (Call y cols., 1983). También en adultos de la misma especie se ha observado edema corporal, además de enrojecimiento y hemorragia en la masa visceral (Call y cols., 1987). En individuos de diferentes especies provocó alteraciones morfológicas y fisiológicas así como inhibición del crecimiento durante 60 días de exposición, sin que los animales mostraran signos de recuperación tras un largo periodo de permanencia en agua libre de propanil (Popova, 1973). El principal metabolito del propanil (DCA) induce la formación de radicales libres e inhibe la actividad de enzimas antioxidantes, causando estrés oxidativo y peroxidación lipídica como se ha observado en el hígado de *Carassius auratus* (Li y cols., 2002 y 2003). Además la formación de metahemoglobina podría ser un posible mecanismo de toxicidad del propanil en peces, como indican los estudios de Schlenk y Moore (1993).

## **1.2. PARQUE NATURAL DE LA ALBUFERA DE VALENCIA**

Constituye uno de los principales ambientes lagunares costeros del Mediterráneo. Se ubica a 10 Km al sur de la ciudad de Valencia, entre las desembocaduras de los ríos Turia y Júcar. Dada su importancia ecológica, este hábitat ha sido declarado Parque Natural mediante el Decreto 89/1986, de 8 de julio, y el 8 de mayo de 1990 es incorporado a la *Lista de Zonas Húmedas de Importancia Internacional* en la Conferencia de Ramsar. Posteriormente ha sido declarado como *Zona de Especial Protección Para las Aves* (ZEPA) por la directiva 94/24/CE, el 8 de junio de 1994. Igualmente cuenta con numerosos hábitats protegidos, incluidos en la Directiva 92/5510/CE, relativa a la Conservación de los Hábitats y la Fauna y Flora Silvestres.



**Figura 2.** Lago de la Albufera y campos de arroz circundantes.

El área protegida tiene una extensión próxima a las 21.000 hectáreas (ha), entre los que cabe destacar el marjal, el lago y la barra o cordón litoral. El marjal constituye el ambiente más característico de la Albufera y el de mayor extensión. El cultivo del arroz es el principal aprovechamiento del marjal y ocupa actualmente dos tercios de la superficie total del Parque Natural (14.000 ha).

El lago de la Albufera cuenta con una superficie de 2.837 ha y una profundidad media inferior a los 80 centímetros. Su extensión original se ha reducido por la acción del hombre que ha transformado su perímetro para posibilitar el cultivo del arroz. El lago se conecta con los arrozales mediante multitud de canales y acequias, que posibilitan la práctica del cultivo del arroz por el método tradicional de inundación (figura 2). Por ello se vierten al lago residuos procedentes de la actividad agrícola, además de los vertidos de origen urbano e industrial (Consellería de Medio Ambiente, 1991).

El cultivo del arroz constituye una actividad agrícola de arraigada tradición en el Parque Natural, introducida por los árabes a finales del siglo XIV (figura 3). A mediados del siglo pasado se cambió al sistema de cultivo intensivo que se desarrolla en la actualidad y que presenta serios inconvenientes, entre los que se incluye, además del uso masivo de plaguicidas, los derivados de la quema de rastrojo y una progresiva erosión que conduce a la pérdida de suelo y acelera la colmatación del lago. Este sistema de cultivo se realiza mediante inundación de los arrozales, periodo en el cual tiene lugar la aplicación de grandes dosis de

herbicidas. Por ello, la fauna que habita o accede a estas aguas, se ve expuesta en determinadas épocas, a elevadas concentraciones de estos herbicidas.



**Figura 3.** Plantones de arroz.

Las principales fuentes de contaminación y toxicidad del agua de la Albufera se deben a la eutrofización por los numerosos vertidos urbanos, a los metales pesados derivados de la actividad industrial y a los elevados niveles de plaguicidas procedentes del uso agrícola, según un análisis reciente del agua recogida en diferentes canales de irrigación de la Albufera (Boluda y cols., 2002). Según estos autores hace absolutamente esencial completar estos estudios con otros que conduzcan a la determinación del grado de toxicidad que suponen estas aguas sobre especies que presenten un ciclo biológico complejo, desarrollando estudios de toxicidad crónica y de genotoxicidad.

### **1.3. LA ANGUILA EUROPEA: *Anguilla anguilla***

La anguila europea, *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758), es un pez teleósteo perteneciente a la Clase Osteictio, Orden Anguilliforme, Suborden Enquelicéfalo y Familia Anguillidae (Lozano, 1947) (figura 4). Se trata de un pez migratorio que se distribuye por la costa atlántica europea, norte de África, Mediterráneo oriental y Mar Negro (Castelló, 1993).

Se reconoce por su cuerpo alargado, serpentiforme, de sección redondeada en la parte anterior, con una larga aleta impar resultante de la fusión de las aletas dorsal, caudal y anal, y sin aletas pelvianas. Presenta escamas muy pequeñas sobre una piel rica en glándulas

mucosas, una mandíbula inferior ligeramente más alargada que la superior y una línea lateral muy visible. Las aberturas branquiales son reducidas (Cardona, 1993).



**Figura 4.** Anguila europea, *Anguilla anguilla*.

Presentan un ciclo biológico complejo con aspectos que aún permanecen sin resolver. Se cree que la anguila desova en el Mar de los Sargazos, a 4000-7000 Km de distancia de las costas europeas y norteafricanas. Se sabe que la puesta se produce a unos 600 m de profundidad, en oscuridad y bajo elevada presión, durante los meses de marzo a julio, aunque nunca ha podido ser observada. Del huevo nace una larva, denominada leptocéfala, transparente y aplanada, carnívora, que se alimenta de zooplancton. Estas larvas comienzan una migración hacia el nordeste a través del Atlántico, transportadas por la corriente del Golfo y por la deriva del Atlántico Norte, y que dura aproximadamente 3 años. Cuando llegan a la plataforma continental europea y africana sufren una metamorfosis transformándose en angulas, que emigran hacia las aguas salobres de lagunas litorales, estuarios y deltas, penetrando luego en los ríos (migración anadrómica). En España, tiene lugar durante los meses de noviembre y diciembre (Muus, 1981; Pillay, 1997).

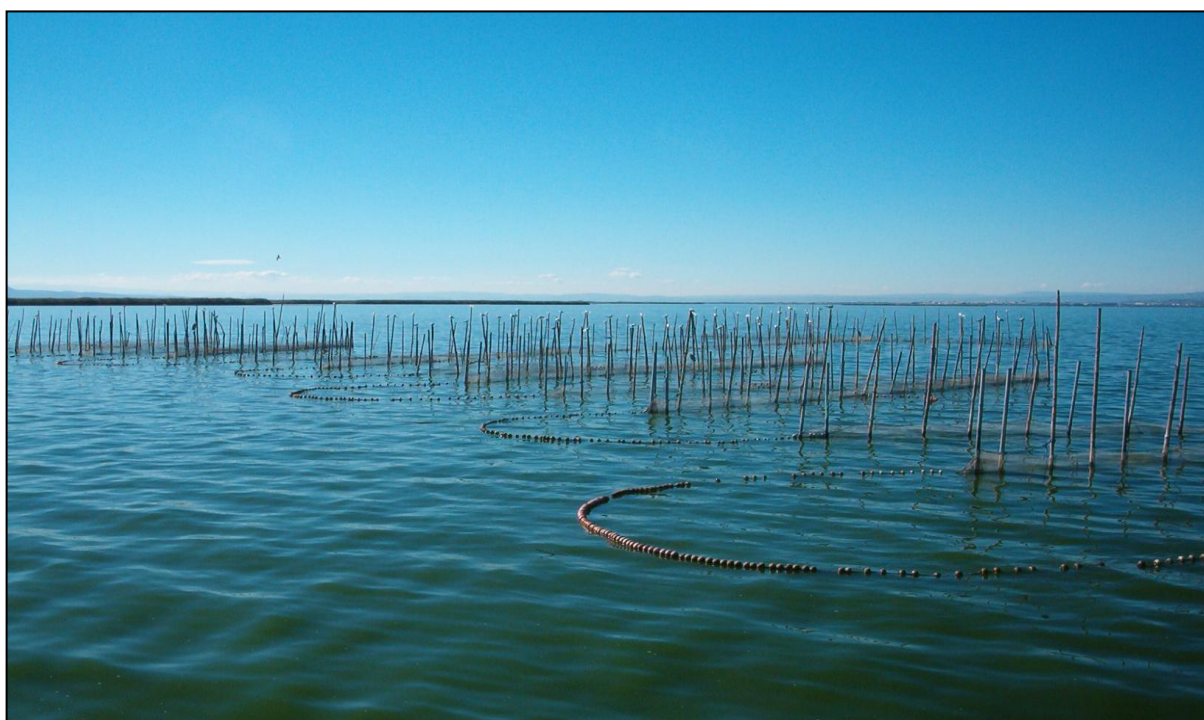
Una vez en aguas continentales adoptan un comportamiento sedentario y territorial que se caracteriza por una intensa actividad alimentaria. Durante este período se la conoce como *yellow eel*, por su coloración amarillenta en el plano ventral, mientras el dorso adquiere un tono gris parduzco, tratándose de individuos sexualmente inmaduros. Su crecimiento es muy rápido durante los meses cálidos, pero a temperaturas del agua inferiores a 10-12°C cesa la actividad trófica y se interrumpe el crecimiento. Son animales que presentan una mayor actividad nocturna y pasan la mayor parte del día enterrados en el fango o debajo de las piedras y raíces. Las gónadas se mantienen indiferenciadas durante muchos años hasta que los individuos alcanzan tallas de 30 a 40 cm (Brusle, 1991).

Después de permanecer entre 5-15 años en aguas continentales, la anguila experimenta cambios profundos que conciernen entre otros, al tegumento que en el vientre se vuelve



plateado y más oscuro en el torso, pasando a denominarse ahora *silver eel*. Se diferencian sexualmente, pero permanecen en reposo sexual. La madurez sexual la alcanzan a lo largo de su migración catadrómica (Castelló, 1993). Más del 25% de su peso lo constituyen las grasas que le proporcionan la energía necesaria para la migración transoceánica hasta llegar al Mar de los Sargazos (Brusle, 1991)

Se trata de un pez muy apreciado tradicionalmente en la Comunidad Valenciana. Habita en el Parque Natural de la Albufera, tanto en el lago como en los canales y acequias que comunican con él (figura 5). Su densidad poblacional en los últimos años ha descendido drásticamente debido, entre otras causas, a la contaminación de las aguas del Parque.



**Figura 5.** Sistemas de redes en la Albufera para la pesca de anguilas, *llisas* y lubinas.

La anguila se utiliza para monitorizar el estado de la contaminación acuática en determinadas áreas (Van der Oost, 1996, 1997) y resulta idónea para los estudios de toxicidad subletal de plaguicidas empleados en el control de plagas en el Parque Natural de la Albufera (Sancho, 1996).



#### **1.4. TOXICIDAD AGUDA**

La toxicidad aguda se define como los efectos adversos totales producidos por una sustancia tóxica cuando se administra en forma de concentración única (Hunter y Smeets, 1977).

La evaluación más común de la toxicidad es la medida de la letalidad a corto plazo. En el medio acuático y para una sustancia dada, esta medida implica la determinación de la concentración media que es letal para una proporción fija, normalmente el 50%, de una población dada de organismos acuáticos después de la exposición continua durante un periodo de tiempo concreto, generalmente 48 o 96 horas en peces (Johnson y Finley, 1980).

Así, la concentración letal (CL) para el 50% de la población después de una exposición continua durante 96 horas se designa como  $CL_{50-96}$  h. La concentración letal se expresa generalmente en miligramos de producto por litro de medio o bien por kilogramo de peso corporal del organismo (Duffus, 1983).

Existe una relación de proporcionalidad inversa entre la medida de la  $CL_{50}$  y la toxicidad de un compuesto, de forma que cuanto menor sea el valor de la  $CL_{50}$  mayor será la toxicidad del compuesto sobre el organismo en cuestión.

Este dato es un requisito previo necesario para determinar las concentraciones subletales en estudios de toxicidad subaguda, crónica, etc.,.

Además de la  $CL_{50}$  se pueden calcular otros parámetros a partir de los datos obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda, como la NOEC (No Observed Effect Concentration), que es la concentración mayor de la sustancia ensayada que no produce efectos nocivos estadísticamente significativos respecto de los organismos control en un ensayo específico. También se puede calcular la LOEC (Lowest Observed Effect Concentration), que es la concentración menor que produce algún efecto estadísticamente significativo sobre los organismos tratados comparado con los controles en un ensayo específico (Rand, 1995).

Previamente al inicio de los ensayos de toxicidad aguda es conveniente efectuar una serie de pruebas preliminares con objeto de acotar un rango de concentraciones con el que se trabajará en los ensayos de toxicidad aguda definitivos. Con peces, en estas experiencias previas se emplea un rango de concentraciones muy amplio de la sustancia a ensayar, utilizándose 3-5 individuos por cada concentración.

En los ensayos de toxicidad aguda definitivos se ensayan 4-6 concentraciones diferentes del tóxico y se emplean 10 animales por cada concentración, se efectúan de 3 a 4 réplicas del ensayo. Se contabilizan el número de animales muertos cada 24 horas (Sprague, 1973).

Todos los ensayos de toxicidad deben incluir un control para asegurar que los efectos observados son atribuibles a la sustancia ensayada y no a otra causa. En aquellos ensayos en

los que la sustancia ensayada presente una solubilidad en agua escasa o nula, es necesario el empleo de un disolvente orgánico (acetona, etanol, ...) como vehículo que facilite la disolución del producto en el medio acuoso (Rand, 1995).

## **1.5. TOXICIDAD SUBLETAL:**

### ***1.5.1. RESPUESTA DE ESTRÉS EN PECES Y BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS***

La exposición de los animales acuáticos a concentraciones subletales de un tóxico puede ocasionar en ellos una respuesta de estrés (Sindermann, 1996).

En el medio acuático los animales rara vez se encuentran expuestos a concentraciones tóxicas elevadas salvo en caso de accidente o a menos que se hallen restringidos al punto de vertido del contaminante. En general, mas allá del punto inicial de vertido, tiene lugar la dispersión y dilución del producto hasta concentraciones bajas y potencialmente subletales que generalmente no provocan la muerte de los organismos, pero podrían llegar a causar un profundo impacto en el mantenimiento de sus funciones fisiológicas, metabólicas y comportamentales (Rand, 1995).

Este rango o “zona subletal” es la de mayor interés para fisiólogos y ecofisiólogos. En los estudios fisiológicos generalmente se estudia la concentración de algún metabolito o enzima (p.e. glucosa plasmática, lactato deshidrogenasa) o bien la tasa de alguna función fisiológica (p.e. consumo de oxígeno). Una respuesta fisiológica es entonces un cambio en uno o más de estos parámetros causado por las variaciones de un factor medioambiental, como por ejemplo la presencia de un plaguicida. La magnitud de la respuesta depende de la intensidad y duración del cambio en el factor medioambiental. Cada especie tiene una serie de zonas fisiológicas vitales con respecto a variaciones de cualquier factor medioambiental. El animal generalmente funciona dentro de una zona óptima de equilibrio, más allá de la cual tiene un límite de compensación ante los cambios que se producen en un factor medioambiental determinado con objeto de mantener su equilibrio homeostático. Más allá de ese límite se incrementa el gasto energético y se producen alteraciones, que serán reversibles o irreversibles según la magnitud y duración de la variación en el factor medioambiental (Heath, 1995, Sindermann, 1996).

El estrés es un mecanismo de compensación global (fisiológico, bioquímico, morfológico y comportamental) que el animal adopta en respuesta a un factor físico o químico que constituye el agente estresante. Este agente estresante ejerce su acción a nivel celular/molecular u orgánico/tisular o bien sobre el individuo en su totalidad. Cuando estos agentes exceden la capacidad de los tejidos u órganos para compensar la situación de estrés puede sobrevenir la muerte del individuo (Sindermann, 1996).

La respuesta primaria de estrés en mamíferos y también en peces ante el agente estresante, constituye un aumento de la producción y secreción de las hormonas cortisol y catecolaminas. Estas hormonas son las responsables de los efectos secundarios que se generan en los diferentes órganos y que constituyen la respuesta secundaria de estrés. Entre las distintas modificaciones fisiológicas que ocasionan cabe destacar: hiperglucemia y reducción de las reservas glucogénicas; aumento del ácido láctico; reducción de proteínas musculares y hepáticas; alteración del metabolismo lipídico; alteración de diferentes actividades enzimáticas; alteración del metabolismo hídrico con pérdida de electrolitos (hipocloremia) y diuresis; estimulación del ritmo cardíaco y aumento del flujo sanguíneo a las branquias; inmunodepresión con reducción del número de leucocitos (leucopenia) y de las defensas en general. La respuesta terciaria de estrés incluirá cambios en el crecimiento y desarrollo, en la reproducción y la supervivencia de los individuos. Así los estados de estrés prolongado conducen a un estado de salud deficiente o precario de los animales que va en detrimento de las poblaciones (Planas, 1993; Heath, 1995).

El estudio de esta respuesta inducida en los peces como consecuencia de la exposición a concentraciones subletales de un determinado plaguicida se utiliza como herramienta para detectar el grado de estrés y sus consecuencias fisiológicas. Los peces teleosteos son buenos indicadores de la contaminación acuática, su respuesta de estrés es bastante similar a la encontrada en otros vertebrados incluyendo mamíferos; de esta forma, resulta fácil encontrar explicaciones comparables entre ambos grupos (Sindermann, 1996).

Peters y cols. (1980) en un estudio clásico realizado con la anguila europea (*Anguilla anguilla*) investigaron como la variación en los factores medioambientales, incluyendo la contaminación, provocaban una respuesta de estrés. Demostraron que al ser expuestas a factores ambientales estresantes, las anguilas exhibían una sintomatología clínica similar a la observada en humanos bajo situaciones de estrés. Y bajo condiciones de estrés prolongado algunas anguilas llegaban a sufrir extrema debilidad muriendo a las pocas semanas.

Los cambios bioquímicos, fisiológicos e histológicos utilizados para estimar tanto la exposición a productos contaminantes como sus efectos resultantes los denominamos biomarcadores (Mustafa, 1997).

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática presente virtualmente en todos los tejidos del organismo que juega un papel importante en el ciclo glucolítico. Es responsable de la regeneración del NAD<sup>+</sup> a partir del NADH, necesario para la continuación del ciclo glucolítico y la subsiguiente formación de ATP, y por tanto crucial para el normal desarrollo de las funciones celulares. Paralelamente, la LDH cataliza la reducción reversible del piruvato a lactato, cuando la cantidad de oxígeno disponible es limitada. En condiciones fisiológicamente normales, solamente una pequeña fracción de la energía de la glucosa se libera en la conversión anaeróbica hasta lactato ya que se puede obtener mucha

mas energía de forma aeróbica por la vía del ácido cítrico y la cadena de transporte electrónico (Everse y Kaplan, 1973; Vassault, 1983; Strayer, 1996). La actividad LDH constituye un buen indicador de la capacidad anaeróbica de un tejido (Pelletier y cols., 1993). Su estudio en Toxicología y Bioquímica Clínica sirve también para diagnosticar lesiones celulares, orgánicas y tisulares (Gupta y cols., 1991; Sing y Sharma, 1998).

Las enzimas aminotransferasas, alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), también conocidas como glutamato piruvato transaminasa (GPT) y glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) respectivamente, catalizan la transferencia de un grupo  $\alpha$ -amino desde un  $\alpha$ -aminoácido (alanina o aspartato) hasta el  $\alpha$ -cetoglutarato, permitiendo así la degradación de los aminoácidos que no son utilizados de inmediato para la síntesis de proteínas y otras biomoléculas, utilizándose como combustible metabólico, tras su transaminación, a través del ciclo de Krebs (Strayer, 1996). En general, una situación de estrés induce un aumento de los procesos de transaminación. Este proceso es necesario para hacer frente a la crisis energética debida el estrés (David y cols., 2004). Además, se utilizan tradicionalmente en Clínica Humana y Veterinaria como herramientas de diagnóstico para determinar lesiones hepáticas. En condiciones normales, estas enzimas se encuentran en bajas concentraciones en el plasma, pero si existen daños en las células hepáticas, son vertidas a sangre, detectándose un incremento de estas actividades enzimáticas en el plasma. Las células hepáticas son particularmente ricas en aminotransferasas, debido a que constituyen el principal órgano para la interconversión de nutrientes, aunque niveles elevados de ALT y AST en plasma también pueden deberse a lesiones en otros tejidos (Heath, 1995).

La fosfatasa alcalina (ALP), enzima presente en todos los tejidos, está involucrada en la generación de fósforo inorgánico necesario para la síntesis de ADN, fosfolípidos, fosfoproteínas, nucleoproteínas, etc (Strayer, 1996). Esta enzima juega un importante papel en el transporte activo de moléculas químicas y nutrientes a través de las membranas celulares mediante el proceso de fosforilación de los carbohidratos y lípidos (Hugon y Bogers, 1966; Tripathi y Singh, 2003). En Toxicología, el aumento de la actividad de esta enzima por la exposición a xenobióticos se asocia con lesiones en los tejidos y necrosis celular (Tripathi y Sing, 2003).

La actividad enzimática  $\gamma$ -glutamil transferasa ( $\gamma$ -GT), también conocida como  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, es una enzima implicada en el transporte de glutatión al interior de los tejidos. El glutatión, tripéptido presente en grandes cantidades prácticamente en todos los organismos aeróbicos, interviene en varios fenómenos celulares de gran importancia, como la detoxificación de xenobióticos, eliminación de radicales libres, modulación de la función inmune, expresión génica y síntesis de ADN (Meister y Anderson, 1983; Kretzschmar, 1996; Sies, 1999). El glutatión se sintetiza en el hígado y se exporta hacia el torrente sanguíneo distribuyéndose a otros tejidos. Tiene transportadores específicos para exportarlo fuera de las

células, pero no para transportarse dentro de éstas (Ookhtens y Kaplowitz, 1998). En la parte externa de la membrana plasmática se encuentra anclada la enzima  $\gamma$ -GT, que es la única proteasa capaz de degradar al glutatión, sólo o conjugado, permitiendo así la reabsorción de sus catabolitos del plasma, regenerándose éste nuevamente en el citosol. Esta enzima permite pues, mantener unas altas concentraciones de glutatión en los tejidos extrahepáticos (Gallagher y Di Giulio, 1992). Se utiliza en Toxicología como medida de la detoxificación de xenobióticos y de estrés oxidativo (Meister y Anderson, 1983; Almar y cols., 1998).

Debido a que los compuestos xenobióticos pueden afectar a la función de las enzimas, los cambios en los niveles orgánicos de éstas tales como la ALP, las aminotransferasas ALT y AST, la LDH y la  $\gamma$ -GT son candidatos lógicos para su uso como biomarcadores (Mayer y cols., 1992).

En los mamíferos, el aumento de los niveles plasmáticos de glucosa y de la hormona cortisol pueden ayudar a diagnosticar un estado de estrés general. Un aumento de los niveles plasmáticos de lactato y de la enzima LDH se usan como medida del incremento del metabolismo anaerobio, que junto con la merma de las reservas glucogénicas, proteínicas y lipídicas reflejan la necesidad de obtención de energía impuesta bajo condiciones de estrés. El descenso de los niveles de albúmina plasmática, principal proteína sintetizada por el hígado y secretada posteriormente al torrente circulatorio, es indicativo de alteraciones en la función hepática. La disfunción de ciertas enzimas como la ALP que indican lesiones a nivel orgánico o tisular, al igual que las actividades ALT y AST, que son empleadas, además, como medida de la interconversión entre proteínas y carbohidratos, son alteradas durante una situación de estrés. La cuantificación de moléculas y enzimas antioxidantes como el glutatión o la actividad  $\gamma$ -GT son indicativos de estrés oxidativo y de la activación de rutas de detoxificación de productos xenobióticos. Todos estos parámetros son también utilizables en los peces para la cuantificación de la respuesta de estrés, además de los índices órgano-somáticos, que como el índice hepatosomático (HSI), son considerados indicadores del estado de salud en peces, y son a menudo empleados como indicadores de la exposición a sustancias contaminantes, o la retención de líquido en tejidos u órganos que puede determinar alteraciones en su capacidad osmorreguladora por exposición a sustancias tóxicas (Folmar, 1993; Rambabu y Rao, 1994; Heath, 1995; Borah y Yadav, 1996; De la Torre y cols., 1999; Lohner y cols., 2001).

El empleo de biomarcadores posibilita por un lado, la detección temprana de la presencia de niveles subletales de sustancias contaminantes liberadas al medio ambiente (tanto si son conocidas como desconocidas) y por otro la determinación del estado de salud de los individuos de una población acuática. Esto permitiría tomar acciones preventivas que remedien los problemas derivados de la contaminación medioambiental.

A este efecto, es conveniente realizar una búsqueda y seguimiento de aquellos parámetros fisiológicos “alterados” o “afectados” durante la exposición de los animales a un contaminante, observando el grado de esta alteración, su evolución y/o la tendencia a recuperar las características registradas en los animales que no tuvieron contacto con el agente estresante a lo largo de un periodo de permanencia en agua exenta del mismo que denominamos fase de recuperación, inmediatamente posterior a la fase de exposición. Cada vez existe más interés por el estudio del grado de recuperación de los valores iniciales en diferentes parámetros fisiológicos/bioquímicos de los animales sometidos a un factor estresante. La capacidad de los animales de recuperar su equilibrio homeostático una vez desaparecido el agente estresante del medio es importante para evaluar en qué medida los individuos quedan afectados después de un episodio de contaminación o exposición a una sustancia tóxica, lo que repercutirá en su posterior capacidad de supervivencia y éxito reproductivo.

## **2. OBJETIVOS**

En el presente trabajo se pretenden alcanzar los siguientes objetivos:

- 1°.** Evaluar la toxicidad aguda del herbicida propanil sobre la anguila europea *Anguilla anguilla* determinando para ello su efecto sobre la mortalidad de los individuos.
  
- 2°.** Estudiar y comparar la respuesta secundaria de estrés inducida en la anguila bajo la influencia de dos concentraciones subletales del herbicida propanil, mediante la medida de los niveles de glucosa, glucógeno, proteínas totales, lípidos y lactato en diferentes órganos y tejidos.
  
- 3°.** Determinar el grado de alteración de la actividad de diferentes actividades enzimáticas (Alanina y Aspartato aminotransferasas, Fosfatasa alcalina, Lactato deshidrogenasa y  $\gamma$ -Glutamyl transferasa) en órganos y tejidos seleccionados de la anguila como consecuencia de su exposición al herbicida.
  
- 4°.** Determinar el impacto de la exposición de las anguilas a concentraciones subletales del herbicida propanil sobre el contenido calórico hepático y muscular.
  
- 5°.** Evaluar y comparar el estado de la función hepática como consecuencia de la exposición de la anguila a las dos concentraciones subletales del herbicida propanil, determinando para ello los niveles de albúmina, proteínas totales y la actividad Aspartato aminotransferasa plasmáticas, junto con las enzimas Alanina aminotransferasa, Fosfatasa



alcalina, Lactato deshidrogenasa y  $\gamma$ -Glutamyl transferasa hepáticas, además del índice hepatosomático y del contenido hídrico en este órgano.

**6°.** Comparar el efecto generado por las diferentes concentraciones de herbicida y tiempos de exposición ensayados sobre cada uno de los parámetros bioquímicos seleccionados.

**7°.** Valorar la influencia del tiempo en la fase de recuperación para la evaluación y predicción de la recuperación de los animales tras el impacto de el herbicida en los diferentes parámetros estudiados.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

Los materiales y métodos que se describen a continuación siguen las recomendaciones de la *Organisation for Economic Co-operation and Development (O.E.C.D., 1998)* para el correcto manejo y mantenimiento de los animales así como para el desarrollo de los diferentes experimentos llevados a cabo.

### **3.1. ANIMALES EXPERIMENTALES**

Los peces empleados en el presente trabajo pertenecen a la especie *Anguilla anguilla* (Linneo), conocida comúnmente como anguila europea.

Las anguilas procedieron del Parque Natural de la Albufera de Valencia y fueron adquiridas en la Cofradía de Pescadores de El Palmar. Inmediatamente tras su adquisición se transportaron al laboratorio en recipientes isotérmicos para garantizar unas condiciones óptimas de traslado (Ferrando, 1990).

Se trabajó con animales en su fase de vida dulceacuícola, de longitudes comprendidas entre 16-20 cm y pesos inferiores a 40 g, tratándose, por tanto, de individuos no diferenciados sexualmente (Castelló, 1993).

Se desecharon aquellos ejemplares que presentaban un aspecto irregular como presencia de heridas, anomalías en la pigmentación, señales de infección microbiana o fúngica,... y cualquier otra anomalía que pudiera apreciarse como indicativo de enfermedad.

Se utilizaron un total de 451 individuos repartidos como sigue: para los ensayos de toxicidad aguda se emplearon 25 individuos en el ensayo preliminar y 210 individuos en el ensayo definitivo, para los experimentos de fisiología se emplearon 72 individuos en el experimento control, 72 animales para el primer ensayo de toxicidad subletal y 72 individuos para el segundo ensayo de toxicidad subletal.

#### **3.1.1. MANTENIMIENTO Y ACLIMATACIÓN**

##### **3.1.1.1. Condiciones de Laboratorio**

Una vez en el Laboratorio de Ecotoxicología de la Universitat de València, las anguilas se mantuvieron en un tanque de cristal de 200 L de capacidad, provisto de un sistema cerrado de circulación de agua y capacitado con una bomba de filtrado físico, a fin de conservar el agua libre de partículas y materia orgánica en suspensión (Ferrando, 1990; Sancho, 1996).

Para garantizar la saturación de oxígeno en el agua se instalaron dos compresores de aire (flujo 2 x 200 L/h), conectados mediante tubos de PVC a difusores terminales adheridos al fondo del acuario.

La temperatura del agua se mantuvo constante a  $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , temperatura óptima para el correcto funcionamiento de la anguila *A. anguilla* (Lecompte-Finiger, 1981; Peters y Hong,

1985). El fotoperiodo se mantuvo en un régimen de 12 h:12 h luz/oscuridad controlado mediante un temporizador.

La duración del periodo de aclimatación fue de un mínimo de 7 días y un máximo de 8 días durante el cual las anguilas no fueron alimentadas (Van Waarde y cols., 1983; Ferrando, 1990; Sancho, 1996).

### **3.1.1.2. Propiedades del Medio Experimental**

El agua utilizada tanto para el periodo de aclimatación como para los distintos experimentos procedió de la red local de suministro de Aguas Potables. Con objeto de eliminar el exceso de cloro, el circuito se conectó 24 horas previas a la introducción de los animales.

Las propiedades físico-químicas del agua fueron:

**pH:** 7.0-7.8 (pH-metro marca Crison, modelo Digilab 517).

**Alcalinidad:** 3.5-4.5 mmol/L (kit de Aquamerck nº11109).

**Clorinidad:** <0.1mg/L, medida como cloro activo libre total (kit de Aquamerck nº 11157).

**Dureza total:** 180-300 mg/L de CaCO<sub>3</sub> que corresponde a un agua semidura según la clasificación de Merck. Las valoraciones se hicieron mediante complexometría con titriplex III (kit de Aquamerck nº8039).

**Sólidos en suspensión:** <10 mg/L. Determinados por filtración al vacío mediante un crisol filtrante de la marca Duran, poro nº3 (diámetro de poro 16-40 µm).

**Conductividad:** 1200 µmhos (conductímetro Y.S.I. modelo 33).

**Salinidad:** 0.9 ‰ (conductímetro Y.S.I. modelo 33).

### **3.2. PLAGUICIDA ENSAYADO**

El plaguicida utilizado en el presente trabajo fue el herbicida propanil (3',4'-dicloropropionanilida) como producto contaminante para la exposición de las anguilas. No se emplearon formulados sino que se trabajó con el producto técnico con un grado de pureza del 80%. Este compuesto presenta una elevada solubilidad en agua (225 mg/L, 25°C, Tomlin, 1997), por lo tanto no fue necesario el uso de ningún disolvente. El herbicida fue suministrado por el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Valencia, España).

### **3.3. ESTUDIO DE TOXICIDAD**

El estudio de la toxicidad del herbicida propanil en la anguila *A. anguilla* se llevó a cabo siguiendo las directrices de la *O.E.C.D.* (1998).

### **3.3.1. TOXICIDAD AGUDA**

En los ensayos de toxicidad aguda se emplearon acuarios de cristal de 20 L de capacidad con un volumen de 15 L de agua cada uno. Para garantizar un aporte de oxígeno suficiente se instalaron compresores de aire conectados cada uno de ellos mediante un tubo de P.V.C con un difusor terminal adosado al fondo del acuario. Estas condiciones se mantuvieron durante 24 h. Transcurrido este tiempo se introdujeron los peces y tras otro periodo de 24 h se adicionó el herbicida.

Los estudios de toxicidad aguda se efectuaron bajo condiciones *estáticas* de exposición al plaguicida: se adicionó la cantidad deseada de herbicida al comienzo del ensayo (0 h) y no se renovó el medio durante las 96 h que duró la prueba.

Se instaló un acuario con animales control (sólo con agua), en las mismas condiciones experimentales exceptuando la adición de herbicida.

Todos los acuarios fueron cubiertos con tapas de acero inoxidable convenientemente perforadas para permitir una adecuada ventilación, evitando de este modo la fuga de los animales experimentales.

La temperatura del agua se mantuvo constante a  $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . El fotoperiodo se mantuvo en un régimen de 12 h:12 h luz/oscuridad controlado mediante un temporizador.

#### **3.3.1.1. Ensayo Preliminar**

Se realizaron una serie de pruebas previas con el objeto de acotar el rango de concentraciones de propanil a utilizar en el ensayo de toxicidad aguda definitivo.

El rango de concentraciones utilizado en este ensayo fue seleccionado en base a los datos bibliográficos referidos para otras especies de peces. Las concentraciones empleadas fueron de 10, 20, 40 y 50 mg/L, utilizándose 5 anguilas por acuario.

#### **3.3.1.2. Ensayo Definitivo**

Una vez finalizada la experiencia preliminar y acotado el rango de concentraciones entre 20 y 50 mg/L, se iniciaron las pruebas definitivas de toxicidad aguda del herbicida propanil en la especie objeto de estudio. Se seleccionaron 6 concentraciones de propanil: 20, 25, 30, 35, 45 y 50 mg/L.

El número de peces utilizados por concentración fue de 10. Se efectuaron tres réplicas del ensayo. En todos los casos, se mantuvo un grupo control con 10 individuos. Cada 24 h de un total de 96 h se revisaron los acuarios, contabilizando y retirando los animales muertos.

### 3.3.2. TOXICIDAD SUBLETAL

Una vez determinada la Toxicidad Letal del herbicida propanil en la anguila, se inició el estudio de posibles alteraciones que concentraciones subletales de éste podían provocar en su fisiología. Se seleccionaron dos concentraciones subagudas: 1/10 y 1/50 de la CL<sub>50</sub>-96 h. Para ello se realizaron ensayos previos con concentraciones comprendidas entre 1/2 y 1/50. En los casos en que se utilizaron concentraciones superiores a 1/10 de la CL<sub>50</sub>-96 h se produjo mortalidad durante el tiempo del ensayo, por ello se optó por seleccionar 1/10 de la CL<sub>50</sub>-96 h como la concentración más elevada a ensayar, y una 2<sup>a</sup> concentración cinco veces inferior a la primera: 1/50 de la CL<sub>50</sub>-96 h.

Se realizaron un total de 3 experimentos:

- 1<sup>er</sup> Experimento: **Animales control** (agua experimental exenta de propanil).
- 2<sup>o</sup> Experimento: **Animales expuestos a 0.63 mg/L de propanil** (1/50 de la CL<sub>50</sub>-96 h).
- 3<sup>er</sup> Experimento: **Animales expuestos a 3.16 mg/L de propanil** (1/10 de la CL<sub>50</sub>-96 h).

Todos ellos se llevaron a cabo exactamente bajo las mismas condiciones experimentales mediante un sistema de flujo continuo, para lo cual se procedió a la instalación de un sistema continuo de circulación de medio (*Flow-Through System Test*).

#### 3.3.2.1. Cálculos Teóricos Previos

Como paso previo al inicio de la fase experimental, se efectuó un cálculo teórico del tiempo estimado de duración óptima de las fases que integran las experiencias: la **fase de exposición** de los animales al herbicida y la **fase de recuperación** en agua circulante sin tóxico, siguiendo las recomendaciones de la *O.E.C.D.* (1998).

Para ello se utilizó el dato del **coeficiente de partición octanol/agua ( $K_{ow}$ )** para el herbicida propanil con valores de  $\log K_{ow}=3.3$  (Tomlin, 1997) y  $\log K_{ow}=3.12$  (*I.P.C.S.*, 1999).

Se realizó una estimación de la duración óptima de la experiencia, tras el cálculo de la duración de la fase de exposición ( $u$ ) y de la fase de recuperación ( $2u$ ) según la fórmula (*O.E.C.D.*, 1998):

$$1.6/K_2 \leq u < 3.0/K_2$$

que comprende el 95% del estado de equilibrio, entendiendo como tal el estado en el cual la cantidad de compuesto que está siendo incorporado al organismo está en equilibrio con la concentración del mismo en el agua, siendo  $K_2$  tasa de eliminación del compuesto desde el organismo al medio.

A partir de los datos citados previamente, se estimó el valor de la tasa de eliminación teórica (denominada aquí  $K'_2$ ) mediante la ecuación (O.E.C.D., 1998):

$$\text{Log } K'_2 = -0.414 \log K_{ow} + 0.122$$

Sustituyendo el  $\log K_{ow}$  por 3.3 (Tomlin, 1997) en la ecuación, obtenemos el siguiente valor para  $K'_2$ :

$$K'_2 = 0.057 \text{ horas}^{-1}$$

Volviendo a la primera ecuación, si sustituimos en ésta  $K_2$  por el dato estimado teóricamente, denominado  $K'_2$ , obtendremos la duración óptima de las fases de exposición y de recuperación. Así:

- Fase de exposición:  $28.08 \text{ h} \leq u < 52.64 \text{ h}$
- Fase de recuperación:  $56.15 \text{ h} \leq 2u < 105.28 \text{ h}$

Realizando los mismos cálculos para un valor de  $\log K_{ow} = 3.12$  (I.P.C.S., 1999) obtenemos los siguientes resultados:

- $K'_2 = 0.068 \text{ horas}^{-1}$
- Duración óptima de la fase de exposición:  $23.65 \text{ h} \leq u < 44.78 \text{ h}$
- Duración óptima de la fase de recuperación:  $47.3 \text{ h} \leq 2u < 89.55 \text{ h}$

A partir de estos datos teóricos obtuvimos la siguiente información:

$0.057 \text{ h}^{-1} < K'_2 < 0.068 \text{ h}^{-1}$
$23.65 \text{ h} < u < 52.64 \text{ h}$
$47.3 \text{ h} < 2u < 105.28 \text{ h}$

Estos cálculos nos proporcionan una estimación del tiempo mínimo que sería suficiente para garantizar que el sistema alcanza, con un 95% de probabilidad, el estado de equilibrio, donde la tasa de incorporación del producto al organismo estaría en equilibrio con su tasa de eliminación. No obstante, en estos cálculos se consideran únicamente las características fisicoquímicas del producto, sin tener en cuenta la especie biológica ensayada. En este sentido habrá que considerar que la especie empleada en este trabajo, *Anguilla anguilla* es un pez con un alto contenido de tejido adiposo, tejido en el cual, como es sabido, se acumulan los plaguicidas.

A partir de los datos teóricos obtenidos se diseñaron los ensayos de toxicidad subletal como sigue: el tiempo total de cada experiencia fue de 216 horas, repartidas en una primera fase, la **fase de exposición** a propanil, con una duración de **72 horas**, seguida de una **fase de recuperación**, en la cual los animales fueron transferidos a un medio exento del plaguicida y mantenidos en estas condiciones durante un periodo adicional de **144 horas**.

### **3.3.2.2. Diseño Experimental**

#### **3.3.2.2.1. Fase de Exposición**

En los experimentos con propanil, se preparó una solución patrón disolviendo el herbicida en agua en un recipiente de vidrio ámbar cerrado con 4 L de agua. Se conectó éste a una bomba peristáltica (GILSON Minipuls 3) mediante una pipeta de vidrio (1 mL de capacidad) unida a un tubo de silicona (1 mm de diámetro interno), generando un flujo constante de la solución de 2.44 mL/min a una velocidad de 29.5 r.p.m. Esta solución era vertida en un recipiente adosado al borde del acuario donde se mezclaba con agua procedente de un reservorio de agua en el que ésta era aireada hasta saturación y suministrada a una velocidad constante (250 mL/min), disolviendo la solución patrón de plaguicida 104 veces. Finalmente, la dilución con la concentración de herbicida deseada era vertida por rebosamiento en un acuario de vidrio de 200 L de capacidad provisto de 120 L de agua (Sancho, 1996) (figura 6).

El suministro de oxígeno estuvo garantizado por la colocación de dos compresores (flujo de aire 2 x 200 L/h) conectados a tubos de P.V.C unidos a dos difusores terminales adheridos a la base del acuario.

En estas condiciones, el medio experimental se renovó 3 veces/día. Para garantizar su estabilidad el sistema se conectó 48 h antes de introducir a los animales.

La temperatura del agua se mantuvo constante a  $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . El fotoperiodo se mantuvo en un régimen de 12 h:12 h luz/oscuridad controlado mediante un temporizador.

Tras 0, 2, 12, 24, 48, 56 y 72 h se extrajeron aleatoriamente 6 anguilas (a cada tiempo) del acuario para la obtención de muestras biológicas.

#### **3.3.2.2.2. Fase de Recuperación**

En una segunda parte de los experimentos 30 anguilas previamente expuestas a propanil durante 72 h (apartado 3.3.2.2.1) fueron transferidas a un acuario de cristal de 200 L de capacidad, con agua circulante (250 mL/min) exenta de herbicida durante un periodo adicional de 144 h. Tras 8, 24, 48, 96 y 144 h en estas condiciones 6 anguilas (a cada tiempo) fueron extraídas al azar para la toma de muestras biológicas.





**Figura 6.** Sistema de flujo continuo.

### ***3.3.2.3. Selección y Obtención de Muestras Biológicas***

Inmediatamente tras la extracción de las anguilas del medio experimental a cada tiempo de muestreo, los animales fueron anestesiados con metilsulfonato de tricáina (MS222) en una concentración de 0.33 g/L de agua (Singh y cols., 1996) y pesados individualmente en una balanza PRECISA 500M-2000C. Después se procedió a su disección y obtención de los distintos órganos y tejidos objeto de estudio sobre hielo picado y con la mayor brevedad posible (Ferrando y Andreu, 1991a).

Las muestras biológicas seleccionadas fueron sangre, cerebro, hígado, corazón, musculatura estriada y branquias.

#### **3.3.2.3.1. Sangre**

Se colocó el animal anestesiado en posición supina y se efectuó una punción intracardiaca con jeringuillas tipo insulina heparinizadas (heparina sódica 5%) de 1 mL de capacidad. Se anotó el volumen de sangre extraído e inmediatamente después se colocó en tubos Ependorf (1.5 mL de capacidad) y se centrifugó a 2109 g durante 15 min a una T<sup>a</sup> de 4°C en una ultracentrífuga MICROFRIGER-BL P-SELECTA. Se recuperó el plasma y se mantuvo en congelación a -24°C hasta su posterior análisis (Holmberg y cols, 1972). El plasma se utilizó para la determinación de su contenido en glucosa, lactato, proteínas totales, albúmina, triglicéridos, colesterol y para la determinación de las actividades enzimáticas aspartato aminotransferasa y fosfatasa alcalina.

#### **3.3.2.3.2. Cerebro**

Tras la obtención del plasma, se colocó el animal en posición dorso-ventral y sujetando la cabeza con unas pinzas dentadas se seccionó ésta y se separó mediante un corte con tijeras a nivel cervical. Posteriormente, mediante pinzas dentadas y tijeras se abrió la caja craneal, quedando la masa cerebral al descubierto, que se extrajo con la ayuda de unas pinzas finas curvas y se depositó en una placa Petri sobre hielo picado. Se determinó el contenido en glucosa, lactato, proteínas totales, y se determinaron las actividades enzimáticas fosfatasa alcalina y lactato deshidrogenasa.

#### **3.3.2.3.3. Hígado**

Manteniendo el cuerpo del animal en posición supina, se practicó un corte longitudinal de la pared abdominal desde el ano hasta un punto medio en el eje imaginario entre las aletas pectorales, con ayuda de pinzas dentadas y tijeras finas. Una vez abierto el abdomen se procedió a seccionar el intestino mediante un corte con tijeras seguido de una suave tracción, separando a continuación la vesícula biliar y liberando el hígado mediante un corte con tijeras y preservándolo en una placa Petri sobre hielo picado. Se determinó el contenido en glucosa, glucógeno, lactato, proteínas totales, triglicéridos y colesterol, así como las actividades enzimáticas alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa y  $\gamma$ -glutamyl transferasa. Se calculó además el índice hepatosomático, el contenido calórico y el contenido hídrico.

#### **3.3.2.3.4. Corazón**

Se procedió a la incisión y apertura del saco pericárdico para proceder a la extracción del órgano cardiaco mediante un corte con tijeras finas. Se colocó inmediatamente en una placa Petri sobre hielo picado. Se procedió a la determinación del contenido en glucosa, lactato, proteínas totales y de las actividades enzimáticas alanina aminotransferasa y  $\gamma$ -glutamyl transferasa.

### **3.3.2.3.5. Musculatura esquelética**

Con ayuda de pinzas y tijeras se separó una porción de músculo de la región abdominal inmediatamente posterior a las aletas pectorales. A la porción de musculatura seccionada se la liberó de piel y grasa adheridos y se colocó en una placa Petri sobre hielo picado.

Se practicó una incisión a nivel de cada opérculo desde una posición posterior hacia una posición anterior de la mandíbula inferior con la ayuda de pinzas dentadas y tijeras y se procedió a la ablación del paquete muscular que separa ambas cavidades branquiales (musculatura hipobranquial) que se liberó de los restos de piel y grasa adheridos y se colocó en una placa Petri sobre hielo picado. Se determinó el contenido en glucosa, glucógeno, lactato, proteínas totales, triglicéridos y colesterol y las actividades enzimáticas alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa y  $\gamma$ -glutamyl transferasa. Se reservó una porción de músculo para la cuantificación del contenido calórico y del contenido hídrico.

### **3.3.2.3.6. Branquias**

Una vez visualizadas las branquias se procedió a su separación de ambas cavidades branquiales mediante incisión y corte con tijeras puntiagudas rectas y se colocaron sobre una placa Petri sobre hielo picado. Se determinó el contenido en lactato y proteínas totales y se midieron las actividades enzimáticas fosfatasa alcalina y lactato deshidrogenasa, además del contenido hídrico.

Todas las muestras fueron pesadas en fresco en una balanza de precisión COBOS-precisión A-220-CSI y colocadas en frascos de vidrio etiquetados para su mantenimiento a  $-24^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis bioquímico / enzimático.

## **3.4. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO**

Para proceder al análisis bioquímico de las diferentes muestras biológicas, cada muestra de tejido húmedo fue homogenizada individualmente en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.2,  $T \leq 4^{\circ}\text{C}$ ) en una proporción de 20 mg de tejido húmedo: 1 mL de tampón (Lockhart y Metner, 1979). Tras la centrifugación de los homogenados (1666 g, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) se empleó el sobrenadante para la determinación de los diferentes parámetros bioquímicos. Las muestras de plasma, por su parte, fueron empleadas directamente para la cuantificación de metabolitos y enzimas.

### **3.4.1. APARATOS Y ACCESORIOS**

Los análisis se realizaron utilizando el autoanalizador bioquímico Coulter Chemistry Profile Analyzer (C.P.A.; Coulter Scientific, Margency, Francia) (figura 7).

Este aparato dispone de tres bandejas independientes: una con capacidad para 32 muestras y 16 posiciones para calibradores y controles de calibración, una segunda bandeja para los reactivos provista de 8 posiciones distintas y una tercera denominada “bandeja de reacción” constituida por 64 cubetas de PVC agrupadas de 8 en 8. En esta tercera bandeja se ubican una lámpara de luz halógena, filtros para las diferentes longitudes de onda y un lector de absorbancia.



**Figura 7.** Autoanalizador bioquímico CPA.

El autoanalizador está provisto de un brazo robótico controlado mediante un microprocesador interno, capaz de pipetear una determinada cantidad previamente programada de muestra y de reactivos. Para ello dispone de dos jeringas Hamilton de 50 y 500  $\mu\text{L}$  con las que aspira muestra y reactivo respectivamente, mezclándolos a continuación en una cubeta de la bandeja de reacción.

Todas las medidas se llevaron a cabo a 37°C, temperatura de incubación por defecto del autoanalizador.

Los detalles de la programación para los diferentes métodos empleados para la determinación paramétrica en el autoanalizador están resumidos en las tablas 2-13.

### 3.4.2. PROTOCOLOS DE ANÁLISIS

#### 3.4.2.1. Metodología Analítica para la Determinación de Metabolitos.

En la tabla 1 se resumen los métodos analíticos empleados para la determinación de los diferentes metabolitos así como las muestras biológicas en los que fueron estudiados. Todos los análisis se realizaron mediante metodología espectrofotométrica y en todos ellos se procedió al empleo de kits comerciales por su disponibilidad, fácil manejo y fiabilidad en la obtención de los resultados. Los kits fueron suministrados por la casa comercial Spinreact, S.A. (España). La única excepción fue la cuantificación de glucógeno, que fue analizado con reactivos preparados en el propio laboratorio.

**Tabla 1.** Tabla resumen de los métodos analíticos empleados en la determinación de los diferentes metabolitos y muestras biológicas analizadas.

Metabolito	Método	Referencia	Muestras biológicas
Albúmina	Verde Bromocresol	Doumas y cols. (1971)	Plasma
Colesterol	CHOD (Colesterol Oxidasa) / PAP (4-Aminoantipirina)	Trinder (1969)	Plasma, hígado, músculo
Glucosa	GOD (Glucosa Oxidasa) / PAP (4-Aminoantipirina)	Trinder (1969)	Plasma, hígado, músculo, cerebro, corazón
Lactato	Lactato Oxidasa-PAP (4-aminoantipirina)	Gau (1984)	Plasma, hígado, músculo, cerebro, corazón, branquia
Proteínas totales	Reaccion de Biuret (sales de cobre en medio alcalino)	Weichselbaum (1946)	Plasma, hígado, músculo, cerebro, corazón, branquia
Triglicéridos	GPO (Glicerol 3 fosfato Oxidasa) / PAP (4-Aminoantipirina)	Fossatti y Prencipe (1982)	Plasma, hígado, músculo
Glucógeno	Método de la Antrona	Seifter y cols. (1950)	Hígado, músculo

### 3.4.2.1.1. Albúmina

La albúmina fue determinada en muestras de plasma, según la metodología indicada por Doumas y cols. (1971) (tabla 1).

El fundamento del método consiste en una prueba colorimétrica en la que la albúmina se combina con el verde de bromocresol a pH 4.2 produciéndose un cambio de color del indicador, de amarillo verdoso a verde azulado. La concentración final fue expresada en g/100 mL de plasma.

Los detalles de programación del método para la determinación de la albúmina en el autoanalizador (CPA) vienen expuestos en la tabla 2.

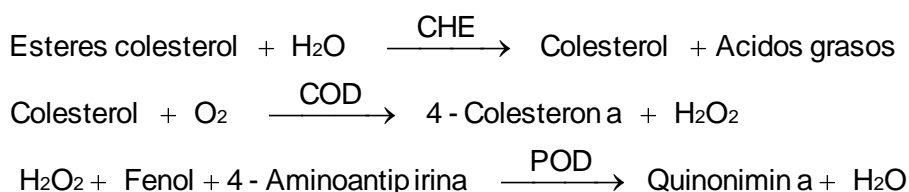
**Tabla 2.** Condiciones de programación del CPA para la determinación de la albúmina plasmática en la anguila.

<b>Temperatura</b>	37°C
<b>Longitud de onda</b>	630 nm
<b>Volumen muestra</b>	4 µL
<b>Volumen reactivo</b>	400 µL
<b>Tipo de reacción</b>	Modo básico
<b>Tipo de cálculo</b>	Punto final
<b>Primera lectura</b>	Absorbancia del blanco
<b>Ultima lectura</b>	98 segundos
<b>Numero de calibradores</b>	5
<b>Unidades</b>	
• <b>Plasma</b>	g/100 mL

### 3.4.2.1.2. Colesterol

Los niveles de colesterol en muestras de plasma, hígado y musculatura estriada de las anguilas experimentales se determinó según la metodología indicada por Trinder (1969) (tabla 1). Los detalles de programación del método para la determinación del colesterol en el autoanizador vienen expuestos en la tabla 3.

El fundamento bioquímico del método es el siguiente: la enzima Colesterol Esterasa (CHE) hidroliza los ésteres de colesterol presentes en la muestra dando colesterol libre y ácidos grasos; una posterior oxidación enzimática mediante la Colesterol Oxidasa (COD) da lugar a la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y colesterona. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se valora por la reacción de Trinder, mediante un cromógeno, fenol y 4-Aminoantipirina, en presencia de la enzima Peroxidasa (POD), formando una quinonimina cuya coloración es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra.



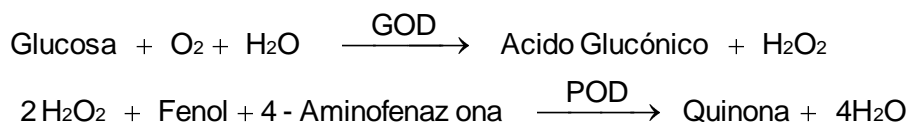
La concentración final se expresó como mg/100 mL en el plasma y como mg/g de peso húmedo en las muestras de tejido.

**Tabla 3.** Condiciones de programación del CPA para la determinación de colesterol en la anguila.

<b>Temperatura</b>	37°C
<b>Longitud de onda</b>	500 nm
<b>Volumen muestra</b>	3 µL
<b>Volumen reactivo</b>	300 µL
<b>Tipo de reacción</b>	Modo básico
<b>Tipo de cálculo</b>	Punto final
<b>Primera lectura</b>	Absorbancia del blanco
<b>Ultima lectura</b>	293 segundos
<b>Numero de calibradores</b>	5
<b>Unidades</b>	
• Plasma	mg/100 mL
• Hígado, músculo	mg/g

### 3.4.2.1.3. Glucosa

La determinación de glucosa se efectuó en muestras de plasma, hígado, músculo estriado, cerebro y corazón mediante el método de Trinder (1969) (tabla 1) según las siguientes reacciones:



La Glucosa Oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, la fenol-aminofenazona, en presencia de la enzima Peroxidasa (POD). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.

La concentración final se expresó como mg/100 mL en el plasma y como mg/g de peso húmedo en las muestras de tejido.

Los detalles de programación del método para la determinación de la glucosa en el autoanalizador vienen expuestos en la tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones de programación del CPA para la determinación de los niveles de glucosa en la anguila.

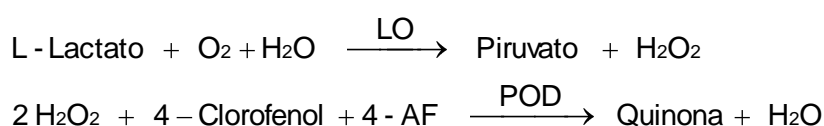
<b>Temperatura</b>	37°C
<b>Longitud de onda</b>	500 nm
<b>Volumen muestra</b>	3 µL
<b>Volumen reactivo</b>	250 µL
<b>Tipo de reacción</b>	Modo básico
<b>Tipo de cálculo</b>	Sustrato inicial
<b>Primera lectura</b>	38 segundos
<b>Última lectura</b>	114 segundos
<b>Numero de calibradores</b>	5
<b>Unidades</b>	
• Plasma	mg/100 mL
• Hígado, músculo, cerebro, corazón	mg/g



### 3.4.2.1.4. Lactato

Se efectuó la determinación de los niveles de lactato en muestras de plasma, hígado, musculatura estriada, cerebro, corazón y branquia de las anguilas, siguiendo la metodología de Gau (1984) (tabla 1). Los detalles de programación del método para la determinación del lactato en el autoanizador vienen expuestos en la tabla 5.

El fundamento del método es el siguiente: el lactato es oxidado por la Lactato Oxidasa (LO) a piruvato y peróxido de hidrógeno, el cual en presencia de Peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF) y 4-clorofenol forma un compuesto rosáceo, que será proporcional a la concentración de lactato en la muestra.



La concentración final se expresó como mg/100 mL en el plasma y como mg/g de peso húmedo en las muestras de tejido.

**Tabla 5.** Condiciones de programación del CPA para la determinación de lactato en la anguila.

<b>Temperatura</b>	37°C
<b>Longitud de onda</b>	500 nm
<b>Volumen muestra</b>	3 µL
<b>Volumen reactivo</b>	300 µL
<b>Tipo de reacción</b>	Modo básico
<b>Tipo de cálculo</b>	Punto final
<b>Primera lectura</b>	Absorbancia del blanco
<b>Ultima lectura</b>	293 segundos
<b>Numero de calibradores</b>	5
<b>Unidades</b>	
• <b>Plasma</b>	mg/100 mL
• <b>Hígado, músculo, cerebro, corazón, branquia</b>	mg/g

### 3.4.2.1.5. Proteínas Totales

La determinación de los niveles de proteínas totales se efectuó en muestras de plasma, hígado, musculatura estriada, cerebro, corazón y branquia de las anguilas siguiendo el método de Weichselbaum (1946) (tabla 1). Los detalles de programación del método en el autoanalizador vienen expuestos en la tabla 6.

El fundamento del método se basa en que los grupos  $-\text{CO}-\text{NH}-$  de las cadenas peptídicas, en presencia de una solución de sales cúpricas que contienen el reactivo tartrato (Reactivo de Biuret), desarrollan una reacción color azul violáceo en medio alcalino.

Las unidades finales fueron expresadas en g/100 mL en el plasma y en mg/g de peso húmedo en las muestras de tejido.

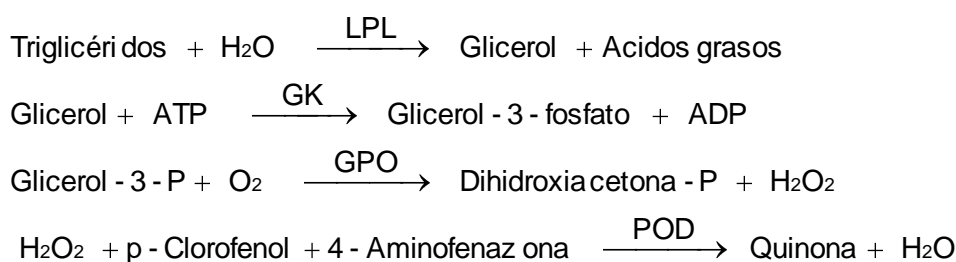
**Tabla 6.** Condiciones de programación del CPA para la determinación de proteínas totales en la anguila.

<b>Temperatura</b>	37°C
<b>Longitud de onda</b>	550 nm
<b>Volumen muestra</b>	5 $\mu\text{L}$
<b>Volumen reactivo</b>	250 $\mu\text{L}$
<b>Tipo de reacción</b>	Modo básico
<b>Tipo de cálculo</b>	Punto final
<b>Primera lectura</b>	Absorbancia del blanco
<b>Ultima lectura</b>	158 segundos
<b>Numero de calibradores</b>	5
<b>Unidades</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plasma</li> <li>• Hígado, músculo, cerebro, corazón, branquia</li> </ul>	g/100 mL mg/g

### 3.4.2.1.6. Triglicéridos

Se determinó el contenido de triglicéridos en muestras de plasma, hígado y musculatura estriada de las anguilas procedentes de los diferentes experimentos, según el método de Fossatti y Prencipe (1982) (tabla 1). Los detalles de programación del método para la determinación de triglicéridos en el autoanizador vienen expuestos en la tabla 7.

El fundamento del método se basa en que los triglicéridos son hidrolizados enzimáticamente por la enzima Lipoprotein Lipasa (LPL) a glicerol, el cual, mediante la acción de las enzimas Glicerol Quinasa (GK) y Glicerol Peroxidasa (GPO), libera el peróxido de hidrógeno que se valora mediante la reacción de Trinder, de acuerdo a las siguientes reacciones:



Las unidades finales fueron expresadas en mg/100 mL en el plasma y en mg/g de peso húmedo en las muestras de tejido seleccionadas.

**Tabla 7.** Condiciones de programación del CPA para la determinación de triglicéridos en la anguila.

<b>Temperatura</b>	37°C
<b>Longitud de onda</b>	500 nm
<b>Volumen muestra</b>	3 µL
<b>Volumen reactivo</b>	300 µL
<b>Tipo de reacción</b>	Modo básico
<b>Tipo de cálculo</b>	Punto final
<b>Primera lectura</b>	Absorbancia del blanco
<b>Ultima lectura</b>	293 segundos
<b>Numero de calibradores</b>	5
<b>Unidades</b>	
• Plasma	mg/100 mL
• Hígado, músculo	mg/g

### 3.4.2.1.7. Glucógeno

Para la determinación de los niveles de glucógeno en muestras de hígado y músculo estriado se recurrió al método de la Antrona de Seifter y cols. (1950).

El primer paso consistió en la homogeneización de la muestra (0.2-0.5 g de tejido) con 0.5 mL de KOH al 60% y 1 mL de KOH al 30 ‰. Los homogeneizados se incubaron a 100°C durante 30 minutos en un baño SELECTA PRECISTERM, permitiendo así la digestión de la muestra por el hidróxido. A continuación se enfriaron durante 5 minutos en agua corriente y posteriormente se añadieron 4 mL de etanol al 80 % (-20°C), lo que detuvo la digestión. Se agitaron las muestras y se permitió la precipitación del glucógeno manteniéndose en reposo nocturno a -24°C para garantizar una precipitación total.

Una vez pasado este tiempo, se procedió a la centrifugación de las muestras (937 g, 20 min), eliminándose el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en agua destilada.

Se tomaron 0.25 mL de esta solución y se les adicionó 1.75 mL de Reactivo de Antrona (solución de Antrona al 0.05 % en ácido sulfúrico al 72 %). Se introdujo la mezcla en el baño María a 100°C durante 15 minutos. Durante este tiempo el ácido sulfúrico hidrolizó el glucógeno en sus monómeros constituyentes, los cuales reaccionaron con la Antrona originándose un compuesto de color verdoso.

Tras enfriar las muestras, se procedió a la lectura de su absorbancia en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 620 nm frente a un blanco de agua destilada y reactivo de antrona.

La concentración de glucógeno en las muestras se determinó mediante una curva patrón de glucosa, que relaciona la concentración de glucosa frente a la absorbancia. A partir de ésta, se obtuvo una recta de regresión,  $y = a+bx$ , donde  $y$  representa la absorbancia y  $x$  la concentración en  $\mu\text{g/g}$  de glucosa. Una vez sustituidos los valores de la absorbancia de cada muestra en la recta de regresión y ajustados los datos por el volumen muestral inicial y corregidos por el peso de la muestra, se obtuvieron los correspondientes valores de concentración de glucógeno expresados finalmente en mg/g de tejido húmedo.

### 3.4.2.2. Metodología Analítica para las Determinaciones Enzimáticas.

Antes de proceder a la selección de las enzimas objeto de estudio, se efectuó un barrido previo de todas las enzimas relacionadas en la tabla 8 en todos los órganos y tejidos seleccionados así como en el plasma de la anguila. No en todos los casos se obtuvo actividad o ésta no resultó interpretable, seleccionando finalmente las actividades enzimáticas en aquellas muestras en las que se obtuvieron unos resultados coherentes.

Los métodos analíticos empleados así como las muestras biológicas en las que se determinó cada enzima están reflejados en la tabla 8. Todos los análisis se realizaron mediante métodos espectrofotométricos con kits comerciales suministrados por la casa Spinreact S.A. (España).

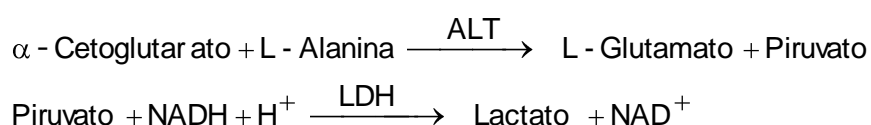
**Tabla 8.** Tabla resumen de los métodos analíticos empleados en la determinación de enzimas y muestras biológicas analizadas.

Enzima	Número EC	Sustrato	Referencia	Muestras biológicas
ALT (GPT)	2.6.1.2	$\alpha$ -cetoglutarato/L-alanina	Bergmeyer y cols. (1978)	Hígado, músculo, corazón
AST (GOT)	2.6.1.1	$\alpha$ -cetoglutarato/L-aspartato	Bergmeyer y cols. (1978)	Plasma
ALP	3.1.3.1	p-nitrofenilfosfato	Wenger (1984)	Plasma, hígado, músculo, cerebro, branquia
$\gamma$ -GT	2.3.2.2	L- $\gamma$ -glutamil-3-carboxi-p-nitroanilida	Szasz (1969)	Hígado, músculo, corazón
LDH	1.1.1.27	Piruvato	Vassault (1983)	Hígado, músculo, cerebro, branquia

### 3.4.2.2.1. Alanina Aminotransferasa (ALT/GPT)

La actividad enzimática ALT se estudió en muestras de tejido hepático, cardíaco y en la musculatura estriada de la anguila según el método de Bergmeyer y cols. (1978) (tabla 8). Esta actividad también se determinó en el plasma, si bien no se obtuvo señal. Los detalles de programación del método para la determinación de la ALT en el autoanalizador vienen expuestos en la tabla 9.

El fundamento del método es el siguiente: la enzima ALT cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al  $\alpha$ -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada. La actividad enzimática ALT final fue expresada en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  en los diferentes tejidos.

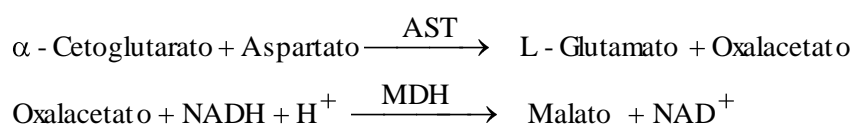
**Tabla 9.** Condiciones de programación del CPA para la determinación de la enzima ALT en la anguila.

<b>Temperatura</b>	37°C
<b>Longitud de onda</b>	340 nm
<b>Volumen muestra</b>	20 $\mu\text{L}$
<b>Volumen reactivo</b>	250 $\mu\text{L}$
<b>Tipo de reacción</b>	Modo básico
<b>Tipo de cálculo</b>	Cinético
<b>Dirección de la reacción</b>	Decreciente
<b>Primera lectura</b>	68 segundos
<b>Número de lecturas</b>	5
<b>Intervalo</b>	45 segundos
<b>Coeficiente calibración</b>	-2143
<b>Unidades</b>	
• <b>Hígado, músculo, corazón</b>	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$

### 3.4.2.2.2. Aspartato Aminotransferasa (AST/GOT)

Como se observa en la tabla 8, la determinación de la actividad enzimática AST se realizó en el plasma de los animales experimentales, siguiendo el método de Bergmeyer y cols. (1978). Si bien esta actividad se trató de determinar en los mismos tejidos en los que se estudió la actividad ALT, sólo se obtuvo señal en el plasma de las anguilas. Los detalles de programación del método para la determinación de la AST en el autoanizador vienen expuestos en la tabla 10.

El fundamento del método es el siguiente: la enzima AST cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al  $\alpha$ -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra ensayada. La actividad enzimática AST final fue expresada en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$  de plasma.

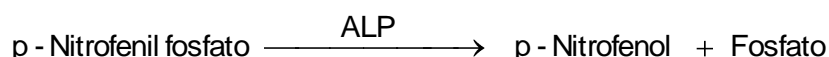
**Tabla 10.** Condiciones de programación del CPA para la determinación de la enzima AST en la anguila.

<b>Temperatura</b>	37°C
<b>Longitud de onda</b>	340 nm
<b>Volumen muestra</b>	20 $\mu\text{L}$
<b>Volumen reactivo</b>	250 $\mu\text{L}$
<b>Tipo de reacción</b>	Modo básico
<b>Tipo de cálculo</b>	Cinético
<b>Dirección de la reacción</b>	Decreciente
<b>Primera lectura</b>	68 segundos
<b>Número de lecturas</b>	5
<b>Intervalo</b>	45 segundos
<b>Coeficiente calibración</b>	-2143
<b>Unidades</b>	
• <b>Plasma</b>	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$

### 3.4.2.2.3. Fosfatasa Alcalina (ALP)

Se realizó un seguimiento de esta actividad enzimática en el plasma, hígado, músculo esquelético, cerebro y branquia de la anguila según la metodología de Wenger (1984) (tabla 8). Los detalles de programación del método para la determinación de la actividad ALP en el autoanizador vienen expuestos en la tabla 11.

El fundamento del método se basa en que la enzima ALP cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato en medio alcalino (pH 10.4) liberando p-nitrofenol y fosfato, según la siguiente reacción:



La velocidad de formación del P-nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALP en la muestra ensayada.

La actividad enzimática ALP final fue expresada en nmol/min/mL en el plasma y en  $\mu\text{mol/min/g}$  en los tejidos.

**Tabla 11.** Condiciones de programación del CPA para la determinación de la enzima ALP en la anguila.

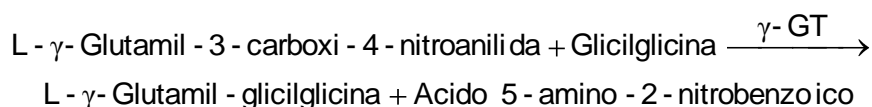
<b>Temperatura</b>	37°C
<b>Longitud de onda</b>	405 nm
<b>Volumen muestra</b>	5 $\mu\text{L}$
<b>Volumen reactivo</b>	250 $\mu\text{L}$
<b>Tipo de reacción</b>	Modo básico
<b>Tipo de cálculo</b>	Cinético
<b>Dirección de la reacción</b>	Creciente
<b>Primera lectura</b>	38 segundos
<b>Número de lecturas</b>	5
<b>Intervalo</b>	45 segundos
<b>Coeficiente calibración</b>	2772
<b>Unidades</b>	
• Plasma	nmol/min/mL
• Hígado, músculo, cerebro, branquia	$\mu\text{mol/min/g}$



### 3.4.2.2.4. $\gamma$ - Glutamil Transferasa ( $\gamma$ -GT)

Se realizó un seguimiento de la actividad  $\gamma$ -GT en el hígado, en la musculatura estriada y en el corazón de la anguila según la metodología de Szasz (1969) (tabla 8).

El fundamento del método se basa en que la actividad  $\gamma$ -GT cataliza la transferencia de un grupo  $\gamma$ -glutamilo de la  $\gamma$ -glutamil-p-nitroanilida al dipéptido aceptor glicilglicina, de acuerdo a la siguiente reacción:



La velocidad de formación del ácido 5-amino-2-nitrobenzoico, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de  $\gamma$ -GT en la muestra ensayada.

Los detalles de programación del método para la determinación de la actividad  $\gamma$ -GT en el autoanizador vienen expuestos en la tabla 12.

La actividad enzimática  $\gamma$ -GT final fue expresada en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  en todos los casos.

**Tabla 12.** Condiciones de programación del CPA para la determinación de la actividad  $\gamma$ -GT en la anguila.

<b>Temperatura</b>	37°C
<b>Longitud de onda</b>	405 nm
<b>Volumen muestra</b>	20 $\mu\text{L}$
<b>Volumen reactivo</b>	250 $\mu\text{L}$
<b>Tipo de reacción</b>	Modo básico
<b>Tipo de cálculo</b>	Cinético
<b>Dirección de la reacción</b>	Creciente
<b>Primera lectura</b>	38 segundos
<b>Número de lecturas</b>	5
<b>Intervalo</b>	30 segundos
<b>Coeficiente calibración</b>	1467
<b>Unidades</b>	
• <b>Hígado, músculo, corazón</b>	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$

### 3.4.2.2.5. Lactato Deshidrogenasa (LDH)

La actividad LDH se estudió en el hígado, músculo, cerebro y branquia de la anguila según el método de Vassault (1983) (tabla 8). Los detalles de programación del método para la determinación de la actividad LDH en el autoanalizador vienen expuestos en la tabla 13.

El fundamento del método se basa en que la actividad LDH cataliza la reducción del piruvato en presencia de NADH, de acuerdo a la siguiente reacción:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de LDH en la muestra ensayada.

La actividad enzimática LDH final fue expresada en  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  en todos los casos.

**Tabla 13.** Condiciones de programación del CPA para la determinación de la enzima LDH en la anguila.

<b>Temperatura</b>	37°C
<b>Longitud de onda</b>	340 nm
<b>Volumen muestra</b>	8 $\mu\text{L}$
<b>Volumen reactivo</b>	250 $\mu\text{L}$
<b>Tipo de reacción</b>	Modo básico
<b>Tipo de cálculo</b>	Cinético
<b>Dirección de la reacción</b>	Decreciente
<b>Primera lectura</b>	23 segundos
<b>Número de lecturas</b>	5
<b>Intervalo</b>	45 segundos
<b>Coefficiente calibración</b>	-5119
<b>Unidades</b>	
• <b>Hígado, músculo, cerebro, branquia</b>	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$

### **3.4.3. CONTENIDO CALÓRICO**

Se procedió al cálculo del contenido calórico, expresado como calorías/g de tejido húmedo, en hígado y musculatura estriada. Para ello se calculó el valor de energía fisiológicamente disponible en hígado / músculo de los peces a partir de los carbohidratos, grasas y proteínas, asumiendo 4.10 cal/mg para glucógeno, 4.80 cal/mg para proteínas y 9.45 cal/mg para lípidos (Brett y Groves, 1979).

### **3.4.4. INDICE HEPATOSOMÁTICO ( HSI )**

A partir de los datos referentes al peso húmedo de los individuos y de sus correspondientes órganos hepáticos, se procedió al cálculo del índice hepatosomático como la relación porcentual entre el peso húmedo (en gramos) del hígado frente al peso (en kilogramos) del organismo, con objeto de observar posibles variaciones de esta relación, indicativas de lesiones por exposición al herbicida. Un aumento del índice supondría un aumento del tamaño hepático inducido por la presencia del herbicida. Alteraciones en esta relación serían indicativas de posibles lesiones en el tejido hepático debido a la exposición a sustancias tóxicas, resultando un fácil y rápido biomarcador de la intoxicación por la presencia de xenobióticos en el medio (Heath, 1995).

### **3.4.5. CONTENIDO HÍDRICO**

Las variaciones del contenido hídrico tisular podrían estar relacionadas con alteraciones de la capacidad osmorreguladora en los tejidos de los peces expuestos a diferentes sustancias tóxicas. La determinación del contenido en agua tisular resulta técnicamente sencilla, mostrando una gran estabilidad en los resultados obtenidos, lo cual avala su utilización como método rápido y sencillo para el estudio preliminar de los efectos causados por la intoxicación con sustancias contaminantes liberadas al medio ambiente (Heath, 1995). La cuantificación del contenido en agua se efectuó en muestras de músculo esquelético, hepáticas y branquiales, que una vez disectadas se pesaron en fresco y a continuación se colocaron en una estufa (105°C durante 72 h) tras lo cual se procedió nuevamente a su pesaje (Wedemeyer and McLeay, 1981; Heath, 1984).

## **3.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

### **3.5.1. TOXICIDAD AGUDA**

Para la evaluación de los resultados en los experimentos de toxicidad aguda se calcularon los porcentajes de mortalidad cada 24 h para cada concentración de plaguicida ensayada. A partir de estos resultados, se calculó la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición, utilizándose un programa informático basado en el Método de Litchfield y

Wilcoxon (1948). Se calculó la  $CL_{50}$  media y su intervalo de confianza con una probabilidad del 95% para cada tiempo.

### **3.5.2. TOXICIDAD SUBLETAL**

Los datos referentes a la toxicidad subletal se procesaron con el programa estadístico SPSS+. Para la evaluación del grado de significación de los resultados obtenidos en los experimentos realizados se recurrió al análisis de la Varianza (ANOVA). Cuando el análisis de la varianza dio valores para la “F” de Snedecor superiores a los tabulados (probabilidad  $p=0.05$ ) se efectuó una estimación del grado de significación de la diferencia entre los valores medios de las correspondientes series con el Test de Duncan, aceptando como valores significativos los superiores a los tabulados para una probabilidad  $p<0.05$ .

## **4. RESULTADOS**

## 4.1. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA

### 4.1.1. ENSAYO PRELIMINAR

Los resultados del presente estudio referentes a la mortalidad acumulada en la anguila *A. anguilla* durante la prueba preliminar en el ensayo de toxicidad del herbicida propanil se muestran en la tabla 14. Los resultados preliminares mostraron que la concentración de 10 mg/L de propanil no produjo mortalidad en los animales objeto de estudio durante 96 h de exposición. Por otro lado, la concentración de 50 mg/L provocó un 100% de mortalidad de los animales experimentales ya a las 72 h de exposición en estas condiciones.

**Tabla 14.** Mortalidad acumulada (n° muertos/total animales expuestos) en la anguila *A. anguilla* provocada por diferentes concentraciones de propanil a lo largo del tiempo de exposición.

Propanil (mg/L)	Tiempo de Exposición			
	24h	48h	72h	96h
10	0/5	0/5	0/5	0/5
20	0/5	1/5	1/5	2/5
40	1/5	1/5	2/5	4/5
50	4/5	4/5	5/5	5/5

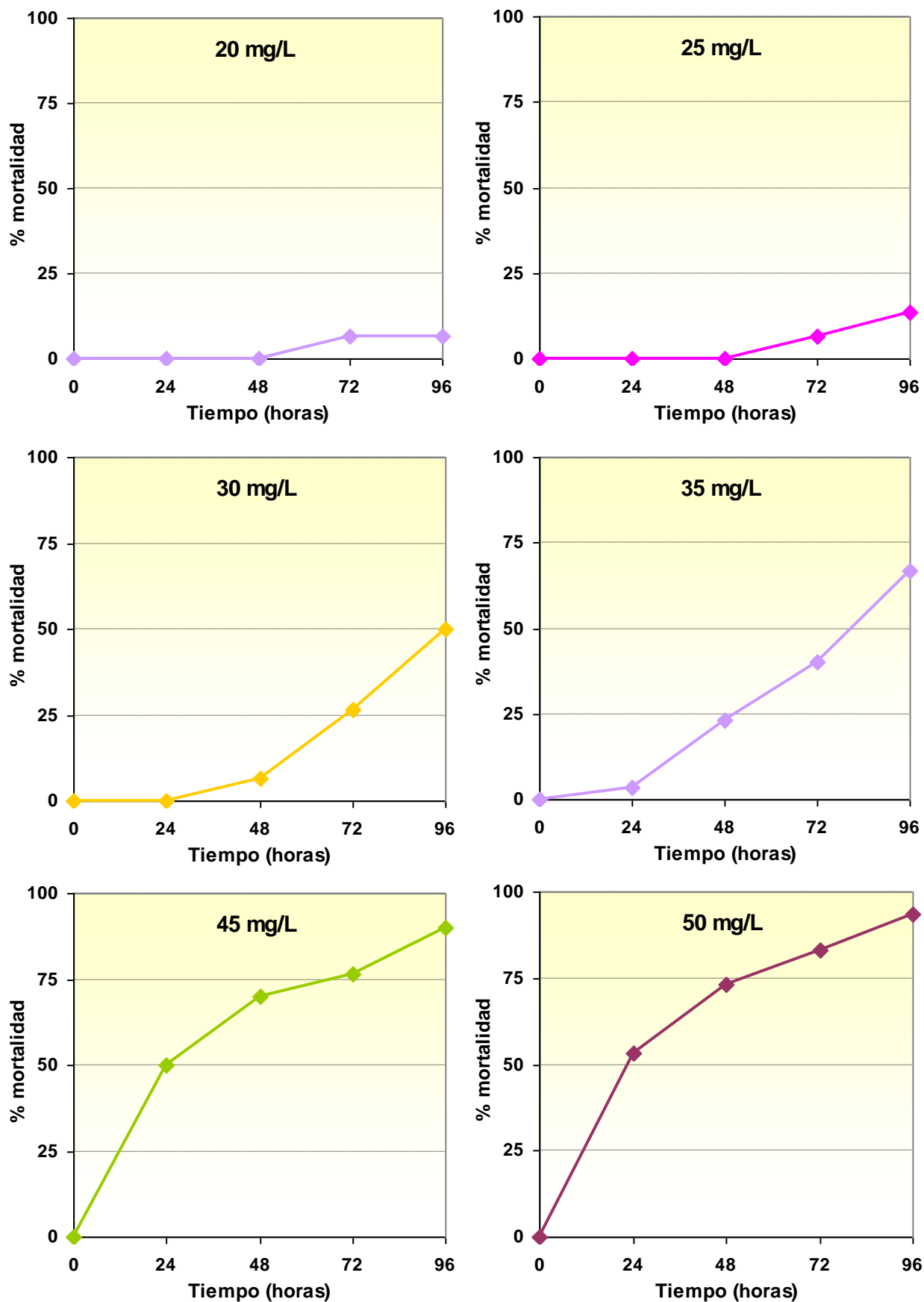
### 4.1.2. ENSAYO DEFINITIVO DE TOXICIDAD AGUDA

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo preliminar (tabla 14) se seleccionaron 6 concentraciones de propanil, comprendidas entre 20 mg/L y 50 mg/L (concentración que provocó una mortalidad del 100% a las 96 h en el ensayo preliminar). Las concentraciones seleccionadas fueron: 20, 25, 30, 35, 45 y 50 mg/L. Los resultados de mortalidad acumulada obtenidos en el ensayo definitivo de toxicidad aguda aparecen reflejados en la tabla 15.

**Tabla 15.** Mortalidad acumulada (n° muertos/total animales expuestos) en la anguila *A. anguilla* provocada por diferentes concentraciones de propanil en condiciones experimentales.

Propanil (mg/L)	Tiempo de Exposición			
	24h	48h	72h	96h
20	0/30	0/30	2/30	2/30
25	0/30	0/30	2/30	4/30
30	0/30	2/30	8/30	15/30
35	1/30	7/30	12/30	20/30
45	15/30	21/30	23/30	27/30
50	16/30	22/30	25/30	28/30

En la figura 8 se ilustran gráficamente los porcentajes de mortalidad acumulada registrados cada 24 h a lo largo del periodo de exposición para cada concentración de propanil ensayada. Tal y como se desprende de los resultados obtenidos, a las 24 h no se registró mortalidad en las anguilas sometidas a aquellas concentraciones de plaguicida inferiores a 35 mg/L (20, 25 y 30 mg/L), incluso se observó que en aquellas expuestas a 35 mg/L el porcentaje de mortalidad resultó muy bajo (3.33%), mientras que con 45 y 50 mg/L de propanil la mortalidad acumulada a las 24 h fue ya del 50%. Las concentraciones de 20 y 25 mg/L provocaron unos porcentajes de mortalidad muy bajos durante todo el experimento, de hecho no se registró mortalidad hasta las 72 h del inicio del ensayo, con un 6.67 % en ambos casos, que aumentó hasta un 13.33% en el ensayo con 25 mg/L al finalizar el mismo (96 h). En los ensayos realizados con las dos concentraciones de herbicida intermedias (30 y 35 mg/L) se observó un aumento progresivo en los porcentajes de mortalidad a partir de las 24 h de exposición de los animales, de forma que a las 96 h alcanzaron valores del 50 y del 66.67% respectivamente. En los ensayos con 45 y 50 mg/L, tal y como se observa en la figura 8, se obtuvieron unos resultados muy similares durante todo el ensayo ( $r = 0.99$ ), observándose una elevada mortalidad ya desde las 24 h (50%), que aumentó hasta casi un 100% de mortalidad a las 96 h.



**Figura 8.** Porcentajes acumulados de mortalidad provocada por las distintas concentraciones de propanil en la anguila tras 24, 48, 72 y 96 h de exposición aguda en condiciones experimentales.



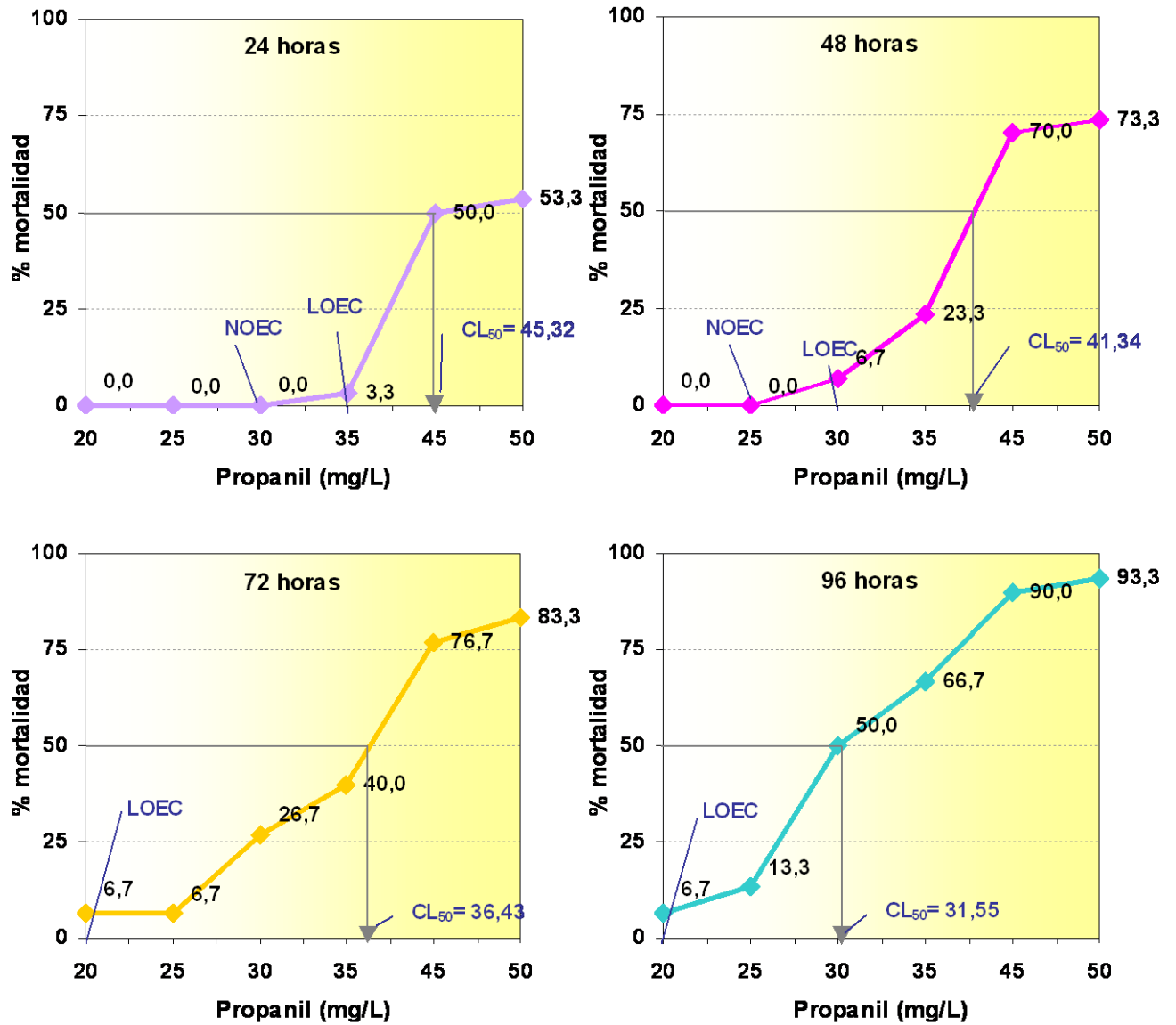
A partir de los resultados obtenidos en los experimentos de toxicidad aguda se determinó la concentración letal cincuenta (CL<sub>50</sub>) del propanil en *A. anguilla* a las 24, 48, 72 y 96 h. Los datos aparecen reflejados en la tabla 16 junto con sus límites de confianza para una probabilidad del 95%. Tal y como puede observarse, la CL<sub>50</sub> decrece conforme se incrementa el periodo de exposición a propanil, lo cual sería indicativo de un aumento de la toxicidad del propanil en la anguila a medida que aumenta el tiempo de exposición al mismo.

A partir de los resultados experimentales, se pudieron determinar la NOEC (No Observed Effect Concentration), o concentración máxima de la sustancia ensayada que no produjo mortalidad durante el ensayo, así como la LOEC (Lowest Observed Effect Concentration), o concentración más baja que produjo mortalidad durante el ensayo. En la tabla 16 se recogen los valores de NOEC y de LOEC para los diferentes tiempos de exposición. Tal y como cabría esperar (y al igual que sucedió con la CL<sub>50</sub>), tanto la LOEC como la NOEC decrecen a medida que aumenta el tiempo de exposición de las anguilas al herbicida. Así, la NOEC a las 24 h fue de 30 mg/L, mientras que a las 48 h su valor fue de 25 mg/L. A tiempos de exposición superiores no fue posible determinar la NOEC a partir de los datos del ensayo definitivo de toxicidad aguda, puesto que se observó mortalidad en todas las concentraciones ensayadas a partir de 72 h. En cuanto a la concentración más baja que sí produjo mortalidad (LOEC) a las 24 h fue de 35 mg/L, descendiendo a 30 mg/L 24 h más tarde. Tras 72 y 96 h de exposición la LOEC fue de 20 mg/L.

Es posible observar gráficamente la evolución de la CL<sub>50</sub> así como los valores de la NOEC y la LOEC a cada tiempo de exposición en la figura 9, donde se representan en el eje de coordenadas los porcentajes de mortalidad acumulada a cada tiempo de exposición provocada por cada una de las concentraciones de propanil ensayadas (representadas en el eje de abcisas).

**Tabla 16.** CL<sub>50</sub> (mg/L) de propanil para la anguila europea, *Anguilla anguilla*, Intervalos de confianza (I.C.), NOEC y LOEC a diferentes tiempos de exposición.

	Tiempo de Exposición			
	24h	48h	72h	96h
<b>CL<sub>50</sub></b>	45.32	41.34	36.43	31.55
<b>(I.C.95%)</b>	(43.84-52.26)	(38.99-44.56)	(33.94-39.53)	(29.51-33.50)
<b>NOEC</b>	30 mg/L	25 mg/L	--	--
<b>LOEC</b>	35 mg/L	30 mg/L	20 mg/L	20 mg/L



**Figura 9.** Porcentajes acumulados de mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición de la anguila europea a distintas concentraciones de propanil.

## 4.2. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

### 4.2.1. EXPERIMENTO CONTROL

Para determinar el efecto del herbicida propanil en anguilas procedentes de una población “salvaje” en condiciones de laboratorio, en primer lugar se efectuó un análisis previo del estado de una submuestra de dicha población. En concreto, un grupo de anguilas denominado **Control**, se evaluó durante un tiempo determinado (9 días), con objeto de conocer su estado fisiológico y efectuar un análisis de los parámetros bioquímicos y enzimológicos que, posteriormente, se emplearían como biomarcadores de la exposición de la anguila al herbicida propanil. De este modo, cualquier alteración observable en las anguilas tratadas podría ser atribuida al agente estresante, en este caso el herbicida propanil.

#### 4.2.1.1. Metabolitos

Los resultados obtenidos en el presente trabajo relativos a los metabolitos estudiados en los diferentes órganos y tejidos de las anguilas procedentes del experimento control se muestran en las tablas 17-24. En las figuras 10-15, 18-23, 31-36, 43-45, 48, 49, 53-55 se representan gráficamente estos mismos resultados como porcentajes en relación a sus respectivos valores a las 0 h.

Tal y como se refleja en los resultados, el manejo y mantenimiento de los animales en agua experimental durante 9 días en condiciones de laboratorio no afectó a los niveles de los metabolitos estudiados en las muestras biológicas obtenidas de las anguilas del experimento control, los cuales mostraron uniformidad a lo largo de la experiencia, puesto que no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las diferentes medidas tomadas a lo largo del tiempo para cada parámetro estudiado, tal y como evidenció el análisis estadístico de los resultados (apdo. 8: ANOVA, anexo estadística).

Así, los niveles de **glucosa** detectados en el **plasma** (tabla 17, figura 10) oscilaron entre 55.49-76.17 mg/100 mL a lo largo de las 216 h de experimento, con un valor medio de 68.34 mg/100 mL. De entre los tejidos en los que se determinó este metabolito, es en el **hígado** (tabla 18, figura 18) donde se registraron los niveles de glucosa más elevados, con un valor medio de 10.93 mg/g, seguido del **corazón**, donde los valores oscilaron entre 1.68-1.92 mg/g (tabla 24, figura 53). En el **músculo esquelético** se registraron valores medios inferiores (0.45 mg/g) (tabla 20, figura 31) y más próximos a los determinados en el **cerebro**, que oscilaron entre 0.31-0.35 mg/g (tabla 22, figura 43).

Los niveles **plasmáticos** de **lactato** (tabla 17) fueron del orden de 9 veces inferiores a los de glucosa, de manera que se determinaron valores medios de 7.16 mg/100 mL, que oscilaron entre 6.13-8.36 mg/100 mL a lo largo del experimento, tal y como se refleja también en la figura 11. En cuanto al resto de tejidos analizados, los niveles de lactato registrados fueron

bastante homogéneos; así, en el **corazón** los niveles medios fueron de 1.85 mg/g (tabla 24, figura 54), muy parecidos a los determinados en el **músculo esquelético**, de 1.78 mg/g (tabla 20, figura 32) y en el **cerebro**, con 1.57 mg/g (tabla 22, figura 44); valores ligeramente inferiores fueron determinados en el **hígado**, con 1.07 mg/g (tabla 18, figura 19), y por último, los niveles de lactato **branquiales** oscilaron entre 0.45-0.50 mg/g (tabla 23, figura 48).

Las reservas de **glucógeno** se determinaron en muestras de tejido hepático y muscular, observándose importantes diferencias en cuanto a los niveles en cada tejido. Así, en el **hígado**, los niveles de glucógeno oscilaron entre 230.03-241.80 mg/g (tabla 18, figura 20), que resultaron ser hasta 43 veces superiores a los determinados en la **musculatura esquelética**, donde el valor medio fue de 5.46 mg/g (tabla 20, figura 33), lo que evidencia la importancia del hígado como reservorio de carbohidratos en la anguila.

Tal y como puede verse en la tabla 17 y figura 12, los niveles de **proteínas totales plasmáticas** registrados durante el experimento control adoptaron valores muy uniformes, entre 3.90-4.24 g/100 mL, con una media de 4.07 g/100 mL. Además de en el plasma, las proteínas totales se determinaron en todos los órganos disectados, de los cuales, en los que se registró un mayor contenido proteico fueron, en orden decreciente: hígado > músculo esquelético > corazón > cerebro > branquia. Así, los niveles medios determinados en el **hígado** (tabla 18, figura 21) fueron de 320 mg/g, lo que supone un valor 1.2 veces superior al detectado en el **músculo esquelético** (270.9 mg/g) (tabla 20, figura 34), 2.9 veces superior al registrado en el **corazón** (tabla 24, figura 55), con 110.9 mg/g, 5 veces superior al determinado en el **cerebro** (63.6 mg/g) y 5.6 veces superior al observado en la **branquia** (56.9 mg/g) (tabla 23, figura 49).

En cuanto a la **albúmina plasmática** (tabla 17, figura 13), se registraron valores comprendidos entre 2.41-2.62 g/100 mL, con una media de 2.51 g/100 mL. La relación albúmina/proteínas totales plasmáticas osciló entre 0.57 y 0.67 (media de 0.62) a lo largo de la experiencia.

Los niveles de **colesterol plasmático** determinados se situaron entre 230.62-248.70 mg/100 mL a lo largo de los 9 días de observación, como se refleja en tabla 17 y figura 14. También se determinó este metabolito en muestras de hígado y músculo esquelético: en el **hígado** sus niveles oscilaron entre 9.26-10.81 mg/g (tabla 18, figura 22), valores que resultaron 2.8 veces superiores a los determinados en el **músculo esquelético**, con unos valores medios de colesterol de 3.71 mg/g (tabla 20, figura 35).

Tal y como queda reflejado en la tabla 17, los niveles de **triglicéridos plasmáticos** fueron comparables a los del colesterol plasmático, con unos valores medios de 226.85 mg/100 mL (figura 15). Esta reserva lipídica también fue determinada en los tejidos hepático y muscular. En el **hígado** los niveles de triglicéridos medidos estuvieron comprendidos entre 27.44-31.38

mg/g (tabla 18, figura 23), niveles que descendieron a una media de 16.26 mg/g en el caso del **músculo** (tabla 20, figura 36).

#### 4.2.1.2. Enzimas

Las diferentes actividades enzimáticas estudiadas en los órganos y tejidos de las anguilas del experimento control no se vieron alteradas por las condiciones experimentales, del laboratorio o la manipulación de los animales, tal y como se observa en las tablas 17-24. Así, para cada actividad enzimática se observó homogeneidad a lo largo del tiempo, de modo que efectivamente el análisis de la varianza no mostró la existencia de diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las medidas tomadas a los distintos tiempos del experimento en ninguna de las actividades enzimáticas estudiadas (apdo. 8: ANOVA, anexo estadística).

La enzima **alanina aminotransferasa (ALT)** pudo ser estudiada en muestras de hígado, músculo esquelético y corazón. Tal y como se observa en la tabla 19, esta actividad enzimática adoptó valores entre 6.29-8.00  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  en el **tejido hepático** (figura 24), tejido en el que se observó la máxima actividad, de manera que ésta supuso 3.8 veces la actividad registrada en el **corazón**, donde osciló entre 1.74-2.02  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  (tabla 23, figura 56), y 8.6 veces la actividad en el **músculo esquelético**, donde los valores medios fueron de 0.83  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  (tabla 21, figura 37).

Respecto a la actividad **aspartato aminotransferasa (AST)** sólo se pudo estudiar en el **plasma** de las anguilas control (tal y como previamente se comentó en Material y Métodos), mostrándose sus valores muy uniformes a lo largo de las 216 h que duró la experiencia, tal y como se observa en la figura 16, con un valor medio de 0.23  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$  (tabla 17).

La actividad **fosfatasa alcalina (ALP)** fue determinada en muestras de plasma, hígado, músculo esquelético, cerebro y branquia. En el **plasma** (figura 17), mostró una actividad media de 43.49  $\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$ , como se refleja en la tabla 17. En cuanto a los tejidos, la máxima actividad se observó en el **cerebro**, con valores entre 1.74 y 2.02  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  (tabla 22, figura 46), seguido del **hígado**, con una actividad media de 1.28  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  (tabla 19, figura 25). En las **branquias**, se determinaron valores comprendidos entre 0.33-0.37  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  (tabla 23, figura 50), mientras que en el **músculo esquelético** la actividad media fue de 0.11  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  (tabla 21, figura 38).

En cuanto a la actividad **lactato deshidrogenasa (LDH)** se determinó en muestras de hígado, músculo esquelético, cerebro y branquia. Los máximos valores de actividad se registraron en el músculo, seguido del hígado, cerebro y branquia. Así, en el **músculo esquelético** esta actividad alcanzó un valor medio de 104.94  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  (tabla 20, figura 39), y de 24.89-28.68  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  en el **hígado** (tabla 19, figura 26). En el **cerebro**, los valores estuvieron comprendidos entre 16.76-21.93  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  (tabla 22, figura 47), mayores que en las **branquias**, con una actividad media de 12.73  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  (tabla 23, figura 51).

La actividad  $\gamma$ -glutamyl transferasa ( $\gamma$ -GT) en el **hígado** osciló entre 1.14-1.30  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  (tabla 19 y figura 27). Esta enzima también se determinó en muestras de músculo esquelético y cardiaco: en el **músculo esquelético** la actividad varió entre 0.12-0.14  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  (tabla 21, figura 40), valores comparables a los determinados en muestras de **músculo cardiaco**, donde se obtuvo una actividad  $\gamma$ -GT media ligeramente inferior, de 0.12  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  (tabla 24, figura 57).

#### **4.2.1.3. Contenido Calórico (CC)**

En las tablas 19 y 21 aparecen los valores correspondientes al **contenido calórico** determinado en el hígado y en la musculatura esquelética de anguilas procedentes del experimento control. En las figuras 28 y 41 se ilustran gráficamente estos resultados como porcentajes en relación a sus respectivos valores a las 0 h. La permanencia de los animales en agua durante 216 h en condiciones de laboratorio no produjo alteraciones significativas ( $p > 0.05$ ) entre los distintos valores de contenido calórico tomados a lo largo del tiempo, tal y como demostró el análisis de la varianza (ANOVA, anexo 8.2, tabla 2.11; anexo 8.3, tabla 3.11).

En el **hígado** (tabla 19, figura 28) la reserva energética fisiológicamente disponible alcanzó un valor medio de 2881 cal/g, comprendido entre 2733-3002 cal/g, y que representó prácticamente el doble de las reservas energéticas almacenadas en la **musculatura esquelética**, con 1510 cal/g de contenido calórico medio y que oscilaron entre 1424.6-1589.9 cal/g a lo largo de la experiencia (tabla 21, figura 41).

#### **4.2.1.4. Índice Hepatosomático (HSI)**

Tampoco durante la permanencia de las anguilas en condiciones control se registraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) a lo largo del tiempo en lo que al **índice hepatosomático** se refiere (tabla 19, figura 29), tal y como reveló el análisis de la varianza correspondiente (ANOVA, anexo 8.2: tabla 2.12). Así, este índice se mantuvo uniforme a lo largo del experimento, tal y como se observa en la figura 29, donde se representa como porcentaje respecto al valor a las 0 h. Durante toda la experiencia los valores del HSI estuvieron comprendidos entre 13.9-14.8, tal y como se refleja a su vez en la tabla 19.

#### **4.2.1.5. Contenido Hídrico (CH)**

Los valores del **contenido hídrico** estudiado en muestras procedentes de hígado, músculo esquelético y branquias de la anguila aparecen expuestos en las tablas 19, 21 y 23, respectivamente. Como cabría esperar, ni la ubicación de los animales en agua experimental durante 9 días, ni tampoco la anestesia ni la manipulación de los animales para la obtención de las muestras biológicas, alteraron el equilibrio hídrico normal en estos tejidos (figuras 30,

42 y 52), tal y como demostró el análisis estadístico de los resultados (ANOVA ( $p > 0.05$ ), anexo 8.2, tabla 2.13; anexo 8.3, tabla 3.11; anexo 8.5, tabla 5.5).

El **músculo esquelético** (figura 42) presentó un elevado contenido hídrico, con unos valores comprendidos entre 0.33-0.43, tal y como puede observarse en la tabla 21, y que resultaron del orden de 3 veces el volumen hídrico contenido en el hígado o en la branquia. Así, en el **hígado** el contenido hídrico medio fue de 0.12 (tabla 19, figura 30), similar al volumen hídrico **branquial**, con un valor medio a su vez de 0.12 (tabla 23, figura 52).

**Tabla 17.** Valores medios  $\pm$  DE. del contenido de glucosa (mg/100mL), lactato (mg/100mL), proteínas totales (g/100mL), albúmina (g/100mL), colesterol (mg/100mL), triglicéridos (mg/100mL) y de las actividades enzimáticas AST ( $\mu$ mol/min/mL) y ALP (nmol/min/mL) en el plasma de la anguila *A. anguilla* a lo largo de 216 horas de permanencia en agua experimental.

<b>PLASMA</b>									
<b>Fase de Exposición (Horas)</b>									
	0	2	12	24	48	56	72		
GLUCOSA	65.11 $\pm$ 6.17	76.17 $\pm$ 12.99	55.49 $\pm$ 12.84	75.41 $\pm$ 12.74	64.83 $\pm$ 17.06	61.63 $\pm$ 10.18	67.17 $\pm$ 19.06		
LACTATO	6.60 $\pm$ 2.22	6.48 $\pm$ 1.98	6.13 $\pm$ 2.15	6.76 $\pm$ 1.59	8.05 $\pm$ 1.59	7.50 $\pm$ 2.60	6.45 $\pm$ 1.58		
PROTEINAS	4.10 $\pm$ 0.53	4.24 $\pm$ 0.66	4.14 $\pm$ 0.63	3.94 $\pm$ 0.60	3.97 $\pm$ 0.54	4.20 $\pm$ 0.46	4.10 $\pm$ 0.55		
ALBÚMINA	2.47 $\pm$ 0.40	2.59 $\pm$ 0.70	2.50 $\pm$ 0.66	2.57 $\pm$ 0.59	2.43 $\pm$ 0.66	2.57 $\pm$ 0.63	2.44 $\pm$ 0.42		
COLESTEROL	233.42 $\pm$ 43.66	247.27 $\pm$ 30.00	245.24 $\pm$ 27.10	242.45 $\pm$ 35.99	236.92 $\pm$ 25.95	248.70 $\pm$ 17.15	230.62 $\pm$ 18.02		
TRIGLICÉRIDOS	222.95 $\pm$ 46.66	239.24 $\pm$ 74.16	264.89 $\pm$ 73.86	205.10 $\pm$ 52.79	206.46 $\pm$ 60.39	245.41 $\pm$ 36.83	199.34 $\pm$ 32.43		
AST	0.21 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.07	0.21 $\pm$ 0.06	0.22 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.06		
ALP	42.02 $\pm$ 11.07	46.03 $\pm$ 7.59	40.72 $\pm$ 4.48	41.66 $\pm$ 5.70	44.00 $\pm$ 6.39	52.89 $\pm$ 9.18	38.96 $\pm$ 7.28		
<b>Fase de Recuperación (Horas)</b>									
	80	96	120	168	216				
GLUCOSA	69.60 $\pm$ 18.42	74.78 $\pm$ 15.52	65.31 $\pm$ 9.51	73.09 $\pm$ 10.67	71.44 $\pm$ 11.79				
LACTATO	7.46 $\pm$ 2.21	8.63 $\pm$ 2.15	8.51 $\pm$ 2.22	7.19 $\pm$ 1.68	6.14 $\pm$ 1.79				
PROTEINAS	4.24 $\pm$ 0.51	3.90 $\pm$ 0.47	3.99 $\pm$ 0.47	4.00 $\pm$ 0.33	3.98 $\pm$ 0.21				
ALBÚMINA	2.41 $\pm$ 0.54	2.62 $\pm$ 0.54	2.45 $\pm$ 0.61	2.45 $\pm$ 0.65	2.59 $\pm$ 0.52				
COLESTEROL	239.47 $\pm$ 35.16	245.05 $\pm$ 43.58	246.29 $\pm$ 24.13	248.50 $\pm$ 28.22	232.71 $\pm$ 19.45				
TRIGLICÉRIDOS	213.89 $\pm$ 31.98	244.95 $\pm$ 40.46	216.55 $\pm$ 39.99	256.67 $\pm$ 48.09	205.63 $\pm$ 51.96				
AST	0.21 $\pm$ 0.06	0.26 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.06	0.23 $\pm$ 0.08				
ALP	38.72 $\pm$ 7.25	50.21 $\pm$ 12.43	43.25 $\pm$ 7.79	42.61 $\pm$ 11.94	40.80 $\pm$ 4.04				



**Tabla 18.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido de glucosa (mg/g), lactato (mg/g), glucógeno (mg/g), proteínas totales (mg/g), colesterol (mg/g) y triglicéridos (mg/g) en el hígado de la anguilla *A. anguilla* a lo largo de 216 horas de permanencia en agua experimental.

HÍGADO						
Fase de Exposición (Horas)						
	0	2	12	24	48	72
GLUCOSA	10.70 $\pm$ 1.00	10.74 $\pm$ 1.03	10.22 $\pm$ 1.55	10.97 $\pm$ 1.24	11.47 $\pm$ 1.37	11.20 $\pm$ 1.08
LACTATO	1.07 $\pm$ 0.25	1.12 $\pm$ 0.20	1.07 $\pm$ 0.21	1.13 $\pm$ 0.23	1.18 $\pm$ 0.16	1.10 $\pm$ 0.25
GLUCÓGENO	234.47 $\pm$ 32.89	230.03 $\pm$ 18.75	236.21 $\pm$ 20.23	234.69 $\pm$ 36.30	241.80 $\pm$ 30.22	236.02 $\pm$ 48.62
PROTEÍNAS	331.27 $\pm$ 96.46	347.08 $\pm$ 90.66	328.16 $\pm$ 70.43	338.21 $\pm$ 90.50	308.88 $\pm$ 93.63	342.15 $\pm$ 86.76
COLESTEROL	10.60 $\pm$ 2.23	10.81 $\pm$ 1.19	9.26 $\pm$ 1.58	10.07 $\pm$ 1.22	10.12 $\pm$ 1.38	10.76 $\pm$ 0.74
TRIGLICÉRIDOS	29.64 $\pm$ 6.32	30.86 $\pm$ 5.41	29.75 $\pm$ 3.51	29.04 $\pm$ 3.95	29.00 $\pm$ 2.91	27.44 $\pm$ 4.75
Fase de Recuperación (Horas)						
	80	96	120	168	216	
GLUCOSA	11.26 $\pm$ 1.45	11.00 $\pm$ 0.74	11.21 $\pm$ 0.82	10.69 $\pm$ 1.07	10.66 $\pm$ 0.77	
LACTATO	1.01 $\pm$ 0.20	0.94 $\pm$ 0.17	1.08 $\pm$ 0.18	0.99 $\pm$ 0.23	1.08 $\pm$ 0.20	
GLUCÓGENO	236.54 $\pm$ 37.74	237.46 $\pm$ 52.83	238.88 $\pm$ 43.88	233.26 $\pm$ 39.27	235.12 $\pm$ 34.01	
PROTEÍNAS	286.45 $\pm$ 58.48	304.29 $\pm$ 90.80	294.53 $\pm$ 73.66	319.07 $\pm$ 92.44	294.81 $\pm$ 95.62	
COLESTEROL	10.31 $\pm$ 1.06	10.23 $\pm$ 1.50	10.06 $\pm$ 1.45	10.60 $\pm$ 1.75	10.54 $\pm$ 0.98	
TRIGLICÉRIDOS	30.78 $\pm$ 5.34	31.38 $\pm$ 5.31	29.40 $\pm$ 5.81	29.45 $\pm$ 4.19	29.23 $\pm$ 3.33	

**Tabla 19.** Valores medios  $\pm$  DE. de las actividades enzimáticas ALT ( $\mu$ mol/min/g), ALP ( $\mu$ mol/min/g),  $\gamma$ -GT ( $\mu$ mol/min/g) y LDH ( $\mu$ mol/min/g), del contenido calórico (CC), del índice hepatosomático (HSI) y del contenido hídrico (CH) en el hígado de la anguilla *A. anguilla* a lo largo de 216 horas de permanencia en agua experimental.

<b>HÍGADO</b>									
<b>Fase de Exposición (Horas)</b>									
	0	2	12	24	48	56	72		
ALT	6.88 $\pm$ 1.34	7.15 $\pm$ 1.34	8.00 $\pm$ 1.68	7.73 $\pm$ 1.67	7.28 $\pm$ 1.12	6.29 $\pm$ 0.93	7.20 $\pm$ 1.35		
ALP	1.38 $\pm$ 0.32	1.37 $\pm$ 0.28	1.27 $\pm$ 0.33	1.24 $\pm$ 0.30	1.34 $\pm$ 0.26	1.27 $\pm$ 0.29	1.19 $\pm$ 0.20		
$\gamma$ -GT	1.30 $\pm$ 0.27	1.30 $\pm$ 0.17	1.26 $\pm$ 0.13	1.19 $\pm$ 0.15	1.33 $\pm$ 0.17	1.25 $\pm$ 0.27	1.14 $\pm$ 0.16		
LDH	24.89 $\pm$ 4.11	26.70 $\pm$ 3.70	25.02 $\pm$ 2.47	25.79 $\pm$ 2.89	28.68 $\pm$ 2.99	26.48 $\pm$ 2.79	25.83 $\pm$ 2.61		
CC	2931.63 $\pm$ 510.21	3002.88 $\pm$ 400.22	2917.00 $\pm$ 332.29	2955.26 $\pm$ 535.41	2843.66 $\pm$ 544.72	2970.93 $\pm$ 333.23	300.56 $\pm$ 401.09		
HSI	14.29 $\pm$ 1.29	14.28 $\pm$ 1.29	14.82 $\pm$ 1.42	14.26 $\pm$ 1.67	14.21 $\pm$ 1.13	14.77 $\pm$ 1.37	14.06 $\pm$ 1.38		
CH	0.11 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.02		
<b>Fase de Recuperación (Horas)</b>									
	80	96	120	168	216				
ALT	6.86 $\pm$ 1.19	7.01 $\pm$ 1.10	7.44 $\pm$ 0.97	6.83 $\pm$ 0.99	7.06 $\pm$ 1.16				
ALP	1.21 $\pm$ 0.30	1.24 $\pm$ 0.28	1.30 $\pm$ 0.22	1.25 $\pm$ 0.23	1.24 $\pm$ 0.27				
$\gamma$ -GT	1.56 $\pm$ 0.20	1.34 $\pm$ 0.19	1.28 $\pm$ 0.29	1.44 $\pm$ 0.19	1.21 $\pm$ 0.12				
LDH	26.86 $\pm$ 2.90	26.98 $\pm$ 5.21	28.48 $\pm$ 2.41	27.57 $\pm$ 2.69	25.86 $\pm$ 2.83				
CC	2733.07 $\pm$ 211.00	2827.47 $\pm$ 377.00	2766.03 $\pm$ 336.03	2886.38 $\pm$ 443.09	2754.92 $\pm$ 485.91				
HSI	14.78 $\pm$ 1.64	14.56 $\pm$ 0.98	14.25 $\pm$ 1.31	13.87 $\pm$ 1.49	14.14 $\pm$ 1.22				
CH	0.13 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.03				

**Tabla 20.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido de glucosa (mg/g), lactato (mg/g), gluógeno (mg/g), proteínas totales (mg/g), colesterol (mg/g) y triglicéridos (mg/g) en la musculatura esquelética de la anguilla *A. anguilla* a lo largo de 216 horas de permanencia en agua experimental.

MÚSCULO ESQUELÉTICO							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	12	24	48	56	72
GLUCOSA	0.43 $\pm$ 0.09	0.47 $\pm$ 0.14	0.46 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.09	0.48 $\pm$ 0.08	0.42 $\pm$ 0.13
LACTATO	1.78 $\pm$ 0.16	1.77 $\pm$ 0.15	1.75 $\pm$ 0.27	1.79 $\pm$ 0.22	1.78 $\pm$ 0.14	1.77 $\pm$ 0.26	1.77 $\pm$ 0.16
GLUCÓGENO	5.23 $\pm$ 1.45	5.50 $\pm$ 1.39	5.51 $\pm$ 1.27	5.12 $\pm$ 1.11	5.84 $\pm$ 1.11	5.57 $\pm$ 1.24	5.40 $\pm$ 1.56
PROTEÍNAS	276.47 $\pm$ 51.91	284.22 $\pm$ 47.41	254.79 $\pm$ 77.61	279.71 $\pm$ 60.68	254.36 $\pm$ 53.80	265.85 $\pm$ 77.25	279.00 $\pm$ 67.77
COLESTEROL	3.70 $\pm$ 0.85	3.84 $\pm$ 0.88	3.76 $\pm$ 1.00	3.65 $\pm$ 1.00	3.63 $\pm$ 0.68	3.67 $\pm$ 0.66	3.75 $\pm$ 1.08
TRIGLICÉRIDOS	16.05 $\pm$ 4.15	17.64 $\pm$ 4.06	16.24 $\pm$ 4.48	16.02 $\pm$ 2.72	16.18 $\pm$ 4.77	15.67 $\pm$ 2.00	15.88 $\pm$ 3.71
Fase de Recuperación (Horas)							
	80	96	120	168	216		
GLUCOSA	0.44 $\pm$ 0.10	0.48 $\pm$ 0.10	0.41 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.08	0.47 $\pm$ 0.06		
LACTATO	1.77 $\pm$ 0.32	1.78 $\pm$ 0.28	1.77 $\pm$ 0.26	1.79 $\pm$ 0.13	1.79 $\pm$ 0.27		
GLUCÓGENO	5.47 $\pm$ 1.06	5.60 $\pm$ 1.28	5.27 $\pm$ 0.98	5.47 $\pm$ 1.43	5.50 $\pm$ 1.32		
PROTEÍNAS	253.33 $\pm$ 64.00	278.55 $\pm$ 65.69	287.58 $\pm$ 31.09	271.89 $\pm$ 53.63	265.12 $\pm$ 31.82		
COLESTEROL	3.69 $\pm$ 1.02	3.72 $\pm$ 0.80	3.61 $\pm$ 0.81	3.75 $\pm$ 0.69	3.71 $\pm$ 1.01		
TRIGLICÉRIDOS	16.01 $\pm$ 3.69	16.43 $\pm$ 3.62	16.28 $\pm$ 2.95	16.23 $\pm$ 3.74	15.28 $\pm$ 3.56		

**Tabla 21.** Valores medios  $\pm$  D.E. de las actividades enzimáticas ALT ( $\mu$ mol/min/g), ALP ( $\mu$ mol/min/g),  $\gamma$ -GT ( $\mu$ mol/min/g) y LDH ( $\mu$ mol/min/g), del contenido calórico (CC) y del contenido hídrico (CH) en la musculatura esquelética de la anguilla *A. anguilla* a lo largo de 216 horas de permanencia en agua experimental.

MÚSCULO ESQUELÉTICO							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	12	24	48	56	72
ALT	0.84 $\pm$ 0.20	0.71 $\pm$ 0.15	0.82 $\pm$ 0.11	0.72 $\pm$ 0.09	0.88 $\pm$ 0.16	0.87 $\pm$ 0.08	0.87 $\pm$ 0.09
ALP	0.11 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02
$\gamma$ -GT	0.13 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.03
LDH	104.05 $\pm$ 15.16	100.53 $\pm$ 19.75	107.78 $\pm$ 16.78	105.36 $\pm$ 20.69	107.11 $\pm$ 23.19	106.31 $\pm$ 23.62	104.99 $\pm$ 15.06
CC	1535.17 $\pm$ 267.84	1589.75 $\pm$ 254.87	1434.59 $\pm$ 374.43	1549.44 $\pm$ 305.04	1432.05 $\pm$ 252.15	1481.63 $\pm$ 363.77	1546.88 $\pm$ 304.21
CH	0.33 $\pm$ 0.09	0.41 $\pm$ 0.10	0.35 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.14	0.38 $\pm$ 0.09	0.38 $\pm$ 0.11	0.35 $\pm$ 0.12
Fase de Recuperación (Horas)							
	80	96	120	168	216		
ALT	0.82 $\pm$ 0.09	0.89 $\pm$ 0.11	0.85 $\pm$ 0.08	0.79 $\pm$ 0.18	0.87 $\pm$ 0.13		
ALP	0.11 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.02		
$\gamma$ -GT	0.13 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.02		
LDH	106.92 $\pm$ 18.66	101.17 $\pm$ 20.21	104.65 $\pm$ 15.36	104.26 $\pm$ 22.14	105.47 $\pm$ 15.28		
CC	1424.60 $\pm$ 318.70	1550.36 $\pm$ 294.33	1589.94 $\pm$ 150.00	1516.22 $\pm$ 274.62	1474.61 $\pm$ 153.90		
CH	0.43 $\pm$ 0.07	0.37 $\pm$ 0.11	0.37 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.11	0.36 $\pm$ 0.09		

**Tabla 22.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido en glucosa (mg/g), lactato (mg/g) y proteínas totales (mg/g) y de las actividades enzimáticas ALP ( $^{\circ}$ mol/min/g) y LDH ( $^{\circ}$ mol/min/g) en el cerebro de la anguilla *A. anguilla* a lo largo de 216 horas de permanencia en agua experimental.

CEREBRO							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	12	24	48	56	72
GLUCOSA	0.32 $\pm$ 0.08	0.34 $\pm$ 0.06	0.35 $\pm$ 0.07	0.35 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.06	0.34 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.06
LACTATO	1.47 $\pm$ 0.21	1.48 $\pm$ 0.16	1.56 $\pm$ 0.12	1.63 $\pm$ 0.11	1.54 $\pm$ 0.11	1.61 $\pm$ 0.12	1.54 $\pm$ 0.05
PROTEINAS	61.44 $\pm$ 7.64	64.30 $\pm$ 7.25	62.40 $\pm$ 6.57	61.26 $\pm$ 6.45	62.90 $\pm$ 5.41	63.35 $\pm$ 6.29	65.69 $\pm$ 6.79
ALP	1.74 $\pm$ 0.35	1.81 $\pm$ 0.34	2.02 $\pm$ 0.40	1.74 $\pm$ 0.26	1.98 $\pm$ 0.26	1.75 $\pm$ 0.37	1.79 $\pm$ 0.55
LDH	17.23 $\pm$ 4.33	18.58 $\pm$ 7.26	19.36 $\pm$ 6.29	17.35 $\pm$ 3.74	21.93 $\pm$ 4.29	17.59 $\pm$ 4.32	21.88 $\pm$ 7.52
Fase de Recuperación (Horas)							
	80	96	120	168	216		
GLUCOSA	0.32 $\pm$ 0.07	0.31 $\pm$ 0.07	0.32 $\pm$ 0.07	0.33 $\pm$ 0.08	0.32 $\pm$ 0.08		
LACTATO	1.66 $\pm$ 0.16	1.59 $\pm$ 0.16	1.61 $\pm$ 0.15	1.51 $\pm$ 0.15	1.65 $\pm$ 0.15		
PROTEINAS	65.95 $\pm$ 4.11	66.01 $\pm$ 6.98	63.72 $\pm$ 7.09	65.25 $\pm$ 5.36	60.82 $\pm$ 6.20		
ALP	1.99 $\pm$ 0.20	1.79 $\pm$ 0.32	2.00 $\pm$ 0.25	1.80 $\pm$ 0.23	1.91 $\pm$ 0.30		
LDH	19.71 $\pm$ 3.75	18.99 $\pm$ 3.33	16.76 $\pm$ 3.00	16.95 $\pm$ 2.24	19.71 $\pm$ 3.67		

**Tabla 23.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido en lactato (mg/g) y proteínas totales (mg/g), de las actividades ALP ( $\mu$ mol/min/g) y LDH ( $\mu$ mol/min/g) y del contenido hídrico (CH) en la branquia de la anguilla *A. anguilla* a lo largo de 216 horas de permanencia en agua experimental.

BRANQUIA							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	12	24	48	56	72
LACTATO	0.48 $\pm$ 0.06	0.50 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.09	0.49 $\pm$ 0.07	0.46 $\pm$ 0.06	0.45 $\pm$ 0.08
PROTEINAS	57.78 $\pm$ 8.32	57.04 $\pm$ 6.00	56.52 $\pm$ 8.01	56.40 $\pm$ 4.79	58.91 $\pm$ 4.63	55.45 $\pm$ 7.12	56.86 $\pm$ 9.40
ALP	0.33 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.05	0.37 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.07	0.35 $\pm$ 0.06
LDH	12.06 $\pm$ 2.30	13.77 $\pm$ 2.26	12.07 $\pm$ 1.80	10.82 $\pm$ 2.91	12.07 $\pm$ 3.26	12.28 $\pm$ 2.85	13.66 $\pm$ 3.14
CH	0.13 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.03
Fase de Recuperación (Horas)							
	80	96	120	168	216		
LACTATO	0.47 $\pm$ 0.06	0.50 $\pm$ 0.07	0.48 $\pm$ 0.08	0.47 $\pm$ 0.06	0.48 $\pm$ 0.07		
PROTEINAS	56.88 $\pm$ 5.49	58.09 $\pm$ 5.17	56.84 $\pm$ 4.90	56.51 $\pm$ 5.88	56.11 $\pm$ 7.62		
ALP	0.37 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.08	0.36 $\pm$ 0.08	0.36 $\pm$ 0.07	0.35 $\pm$ 0.03		
LDH	13.52 $\pm$ 2.95	13.55 $\pm$ 2.95	13.65 $\pm$ 2.46	11.24 $\pm$ 2.66	13.42 $\pm$ 2.27		
CH	0.13 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.02		

**Tabla 24.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido en glucosa (mg/g), lactato (mg/g) y proteínas totales (mg/g) y de las actividades enzimáticas ALT ( $^{\circ}$ mol/min/g) y  $\gamma$ -GT ( $^{\circ}$ mol/min/g) en el corazón de la anguilla *A. anguilla* a lo largo de 216 horas de permanencia en agua experimental.

CORAZÓN							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	12	24	48	56	72
GLUCOSA	1.81 $\pm$ 0.46	1.88 $\pm$ 0.35	1.68 $\pm$ 0.33	1.92 $\pm$ 0.43	1.87 $\pm$ 0.15	1.86 $\pm$ 0.40	1.83 $\pm$ 0.31
LACTATO	1.84 $\pm$ 0.20	1.92 $\pm$ 0.15	1.92 $\pm$ 0.22	1.91 $\pm$ 0.32	1.75 $\pm$ 0.26	1.93 $\pm$ 0.35	1.75 $\pm$ 0.29
PROTEINAS	118.12 $\pm$ 18.27	111.26 $\pm$ 20.99	112.97 $\pm$ 17.99	109.62 $\pm$ 10.27	101.53 $\pm$ 15.19	100.34 $\pm$ 13.48	118.63 $\pm$ 25.15
ALT	1.93 $\pm$ 0.26	1.94 $\pm$ 0.23	1.84 $\pm$ 0.25	1.89 $\pm$ 0.36	1.74 $\pm$ 0.32	2.02 $\pm$ 0.27	1.95 $\pm$ 0.24
$\gamma$ -GT	0.12 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.02
Fase de Recuperación (Horas)							
	80	96	120	168	216		
GLUCOSA	1.78 $\pm$ 0.31	1.78 $\pm$ 0.28	1.46 $\pm$ 0.26	1.70 $\pm$ 0.47	1.74 $\pm$ 0.38		
LACTATO	1.83 $\pm$ 0.29	1.76 $\pm$ 0.29	1.80 $\pm$ 0.30	1.91 $\pm$ 0.23	1.87 $\pm$ 0.28		
PROTEINAS	108.73 $\pm$ 10.47	116.46 $\pm$ 24.18	111.00 $\pm$ 17.67	103.89 $\pm$ 18.12	118.17 $\pm$ 11.49		
ALT	1.94 $\pm$ 0.29	1.91 $\pm$ 0.40	1.97 $\pm$ 0.27	1.84 $\pm$ 0.43	1.83 $\pm$ 0.45		
$\gamma$ -GT	0.12 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.03		

## **4.2.2. TOXICIDAD SUBLETAL**

### **4.2.2.1. Plasma: Metabolitos**

#### **4.2.2.1.1. Glucosa**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo relativos a los niveles de glucosa (mg/100 mL) en el plasma de las anguilas expuestas a las dos concentraciones subletales de propanil ensayadas (0.63 y 3.16 mg/L) aparecen reflejados en las tablas 25 y 26. En la figura 10 se ilustran gráficamente estos resultados como porcentajes respecto al valor inicial (0 h) para cada uno de los experimentos.

Se registró un claro aumento del contenido de glucosa en el plasma de las anguilas procedentes de ambos tratamientos con propanil, estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) desde las primeras horas de exposición. Además, las diferencias observadas se mantuvieron tanto en la fase de exposición como en la de recuperación en los dos experimentos con el herbicida.

En el experimento con 0.63 mg/L, ya a las 2 h de contacto con el herbicida los niveles glucídicos registrados fueron un 107% superiores a los tomados como control (0 h), y aumentaron hasta un 146% 10 h más tarde (a las 12 h). Esta hiperglucemia se mantuvo durante toda la fase de exposición con valores superiores al 100%, registrándose el máximo aumento a las 72 h, con un 158% sobre el valor inicial. Después de transferir los animales a un medio exento de propanil, se observó una progresiva tendencia a la recuperación de los niveles iniciales, aunque al finalizar el experimento aún se detectaron valores un 63% superiores a los registrados a las 0 h.

Al igual que lo observado en el experimento con 0.63 mg/L, en el experimento con la concentración más elevada de herbicida (3.16 mg/L), se observaron niveles elevados de glucosa plasmática desde el primer tiempo de medida (2 h), que fueron un 160% superiores al valor inicial. Aunque se observaron importantes oscilaciones en cuanto al contenido glucídico plasmático durante la fase de contacto con el propanil, los niveles se mantuvieron siempre por encima respecto al nivel a las 0 h. El máximo valor se alcanzó ya a las 48 h de exposición, con un aumento del 227% con respecto al valor a las 0 h, mayor que el alcanzado en el experimento anterior. Esta hiperglucemia se mantuvo incluso una vez transferidos los animales a un medio carente de herbicida (fase de recuperación), de hecho durante las primeras 24 h en estas condiciones los niveles de glucosa detectados fueron muy elevados, un 210% superiores al valor control. A partir de las 48 h en esta fase (120 h) se observó una tendencia al restablecimiento de los niveles de partida, no obstante aún fueron estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) al finalizar la experiencia.

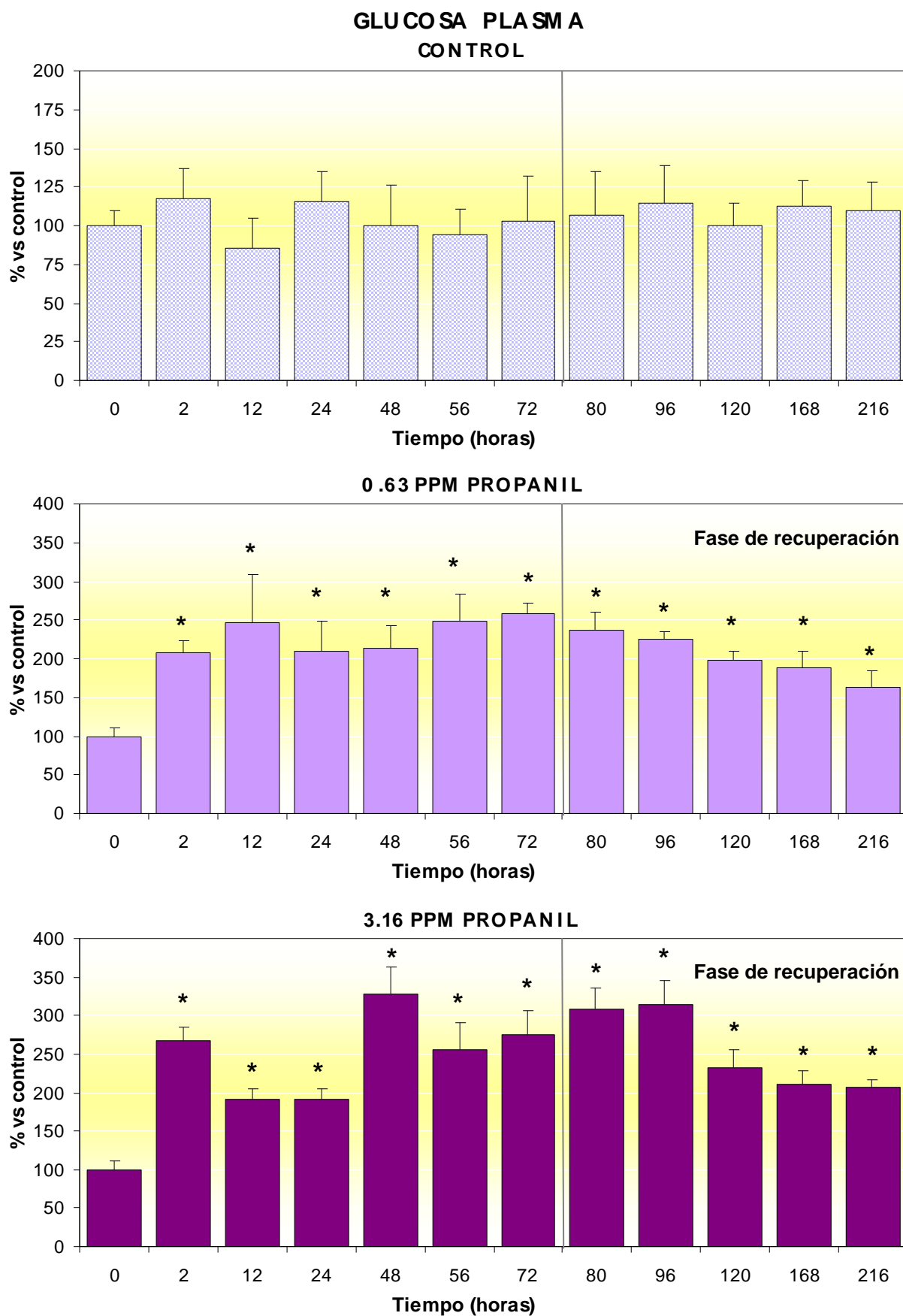


**Tabla 25.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido de glucosa (mg/100mL), lactato (mg/100mL), proteínas totales (g/100mL), albúmina (g/100mL), colesterol (mg/100mL), triglicéridos (mg/100mL) y de las actividades enzimáticas AST (U/ml/min/mL) y ALP (mmol/min/mL) en el plasma de la anguilla *A. anguilla* a lo largo de la exposición a **0.63 mg/L** de propamyl y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\ast p < 0.05$ ).

<b>PLASMA</b>									
<b>Fase de Exposición (Horas)</b>									
	0	2	12	24	48	56	72		
GLUCOSA	50.48 $\pm$ 5.62	104.86 $\pm$ 7.94*	124.28 $\pm$ 31.58*	106.02 $\pm$ 18.99*	107.88 $\pm$ 14.75*	125.90 $\pm$ 17.36*	130.65 $\pm$ 6.35*		
LACTATO	10.07 $\pm$ 1.91	26.21 $\pm$ 4.67*	35.54 $\pm$ 6.49*	36.87 $\pm$ 4.06*	37.30 $\pm$ 4.59*	35.54 $\pm$ 4.50*	34.87 $\pm$ 3.65*		
PROTEINAS	4.48 $\pm$ 0.48	3.08 $\pm$ 0.56*	2.92 $\pm$ 0.52*	2.99 $\pm$ 0.46*	2.90 $\pm$ 0.63*	2.84 $\pm$ 0.50*	3.39 $\pm$ 0.62*		
ALBÚMINA	2.51 $\pm$ 0.29	1.42 $\pm$ 0.25*	1.39 $\pm$ 0.14*	1.15 $\pm$ 0.22*	1.54 $\pm$ 0.36*	1.65 $\pm$ 0.37*	1.79 $\pm$ 0.38*		
COLESTEROL	276.53 $\pm$ 36.97	317.96 $\pm$ 38.65	378.11 $\pm$ 57.68*	365.09 $\pm$ 50.98*	349.00 $\pm$ 55.86*	345.20 $\pm$ 33.57*	442.30 $\pm$ 51.62*		
TRIGLICÉRIDOS	179.80 $\pm$ 16.68	303.70 $\pm$ 64.68*	312.86 $\pm$ 49.72*	374.00 $\pm$ 65.27*	317.23 $\pm$ 68.65*	319.04 $\pm$ 14.27*	299.91 $\pm$ 48.29*		
AST	0.22 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.09	0.34 $\pm$ 0.03*	0.34 $\pm$ 0.06	0.45 $\pm$ 0.09*	0.43 $\pm$ 0.09*		
ALP	41.66 $\pm$ 5.70	63.88 $\pm$ 7.57*	64.17 $\pm$ 6.26*	59.69 $\pm$ 7.13*	61.35 $\pm$ 8.05*	61.33 $\pm$ 2.71*	64.33 $\pm$ 11.39*		
<b>Fase de Recuperación (Horas)</b>									
	80	96	120	168	216				
GLUCOSA	119.71 $\pm$ 11.33*	113.96 $\pm$ 4.98*	100.40 $\pm$ 5.68*	95.48 $\pm$ 10.59*	82.67 $\pm$ 10.82*				
LACTATO	33.31 $\pm$ 6.43*	28.18 $\pm$ 3.09*	25.49 $\pm$ 3.46*	18.37 $\pm$ 2.19*	20.33 $\pm$ 3.36*				
PROTEINAS	4.09 $\pm$ 0.63	4.18 $\pm$ 0.94	3.96 $\pm$ 0.20	3.96 $\pm$ 0.40	3.89 $\pm$ 0.42				
ALBÚMINA	2.28 $\pm$ 0.54	2.26 $\pm$ 0.55	2.86 $\pm$ 0.47	2.45 $\pm$ 0.70	2.40 $\pm$ 0.65				
COLESTEROL	426.61 $\pm$ 24.74*	346.70 $\pm$ 35.48*	295.58 $\pm$ 45.76	373.39 $\pm$ 38.46*	301.71 $\pm$ 47.02				
TRIGLICÉRIDOS	345.03 $\pm$ 56.05*	286.66 $\pm$ 59.46*	282.72 $\pm$ 45.97*	280.39 $\pm$ 34.86*	260.23 $\pm$ 38.37*				
AST	0.34 $\pm$ 0.14	0.33 $\pm$ 0.14	0.29 $\pm$ 0.12	0.28 $\pm$ 0.12	0.21 $\pm$ 0.10				
ALP	67.41 $\pm$ 4.61*	50.96 $\pm$ 5.60	46.64 $\pm$ 5.76	50.41 $\pm$ 11.30	43.24 $\pm$ 6.99				

**Tabla 26.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido de glucosa (mg/100mL), lactato (mg/100mL), proteínas totales (g/100mL), albúmina (g/100mL), colesterol (mg/100mL), triglicéridos (mg/100mL) y de las actividades enzimáticas AST (Umol/min/mL) y ALP (nmol/min/mL) en el plasma de la anguila *A. anguilla* a lo largo de la exposición a 3,16 mg/L de propamyl y la posterior recuperación en un medio exento de herbicidas. ( $^*p < 0.05$ ).

PLASMA									
Fase de Exposición (Horas)									
	0	2	12	24	48	56	72		
GLUCOSA	51.68 $\pm$ 5.51	138.13 $\pm$ 9.29*	98.36 $\pm$ 7.56*	101.27 $\pm$ 6.63*	169.25 $\pm$ 18.12*	132.58 $\pm$ 17.95*	141.81 $\pm$ 16.98*		
LACTATO	10.80 $\pm$ 0.94	37.40 $\pm$ 5.92*	40.04 $\pm$ 2.58*	51.15 $\pm$ 6.53*	42.31 $\pm$ 2.81*	42.36 $\pm$ 6.43*	49.79 $\pm$ 7.28*		
PROTEÍNAS	4.48 $\pm$ 0.36	3.26 $\pm$ 0.37*	2.75 $\pm$ 0.44*	2.63 $\pm$ 0.42*	3.43 $\pm$ 0.36*	3.53 $\pm$ 0.26*	3.71 $\pm$ 0.56*		
ALBÚMINA	2.72 $\pm$ 0.18	2.14 $\pm$ 0.37*	1.43 $\pm$ 0.29*	0.88 $\pm$ 0.39*	1.76 $\pm$ 0.41*	1.93 $\pm$ 0.30*	2.58 $\pm$ 0.36*		
COLESTEROL	267.62 $\pm$ 30.94	336.31 $\pm$ 38.96*	358.77 $\pm$ 39.04*	396.66 $\pm$ 41.74*	357.51 $\pm$ 21.36*	396.77 $\pm$ 50.07*	364.33 $\pm$ 52.56*		
TRIGLICÉRIDOS	186.52 $\pm$ 15.20	341.18 $\pm$ 51.70*	339.58 $\pm$ 55.29*	339.90 $\pm$ 62.05*	374.14 $\pm$ 33.09*	318.22 $\pm$ 46.93*	349.53 $\pm$ 49.63*		
AST	0.21 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.04*	0.29 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.08*	0.37 $\pm$ 0.09*	0.60 $\pm$ 0.04*	0.81 $\pm$ 0.11*		
ALP	35.46 $\pm$ 7.09	40.61 $\pm$ 7.43	39.90 $\pm$ 4.32	57.86 $\pm$ 11.64*	50.23 $\pm$ 4.86*	60.94 $\pm$ 7.91*	58.98 $\pm$ 5.62*		
Fase de Recuperación (Horas)									
	80	96	120	168	216				
GLUCOSA	159.36 $\pm$ 14.10*	162.28 $\pm$ 15.98*	120.10 $\pm$ 12.06*	108.72 $\pm$ 9.71*	106.70 $\pm$ 5.01*				
LACTATO	53.38 $\pm$ 8.75*	36.22 $\pm$ 2.47*	35.25 $\pm$ 2.45*	28.40 $\pm$ 4.28*	21.77 $\pm$ 3.48*				
PROTEÍNAS	4.41 $\pm$ 0.59	3.95 $\pm$ 0.41	4.05 $\pm$ 0.52	4.48 $\pm$ 0.59	4.43 $\pm$ 0.25				
ALBÚMINA	2.83 $\pm$ 0.64	3.06 $\pm$ 0.56	3.29 $\pm$ 0.59	3.31 $\pm$ 0.65	3.31 $\pm$ 0.56				
COLESTEROL	385.44 $\pm$ 15.58*	405.41 $\pm$ 37.91*	399.94 $\pm$ 14.79*	413.28 $\pm$ 49.93*	286.27 $\pm$ 9.56				
TRIGLICÉRIDOS	299.00 $\pm$ 42.70*	334.72 $\pm$ 63.28*	318.57 $\pm$ 35.60*	239.49 $\pm$ 57.27	306.13 $\pm$ 56.25*				
AST	0.74 $\pm$ 0.08*	0.72 $\pm$ 0.09*	0.37 $\pm$ 0.05*	0.37 $\pm$ 0.05*	0.42 $\pm$ 0.10*				
ALP	71.48 $\pm$ 5.65*	46.89 $\pm$ 3.43*	47.70 $\pm$ 1.61*	56.48 $\pm$ 8.83*	65.66 $\pm$ 3.30*				



**Figura 10.** Niveles de glucosa plasmática (% vs. 0 horas) en la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

El análisis de la varianza (ANOVA), mostró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre los distintos valores para este parámetro en cada uno de experimentos con propanil (anexo 8.1: tabla 1.1). El posterior test de Duncan reveló la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre todos los valores determinados a partir de las 2 h y el valor control, con lo que podemos indicar la existencia de hiperglucemia en las anguilas ( $p < 0.05$ ) durante ambas experiencias (anexo 8.1: figuras 1.1 y 1.2).

#### **4.2.2.1.2. Lactato**

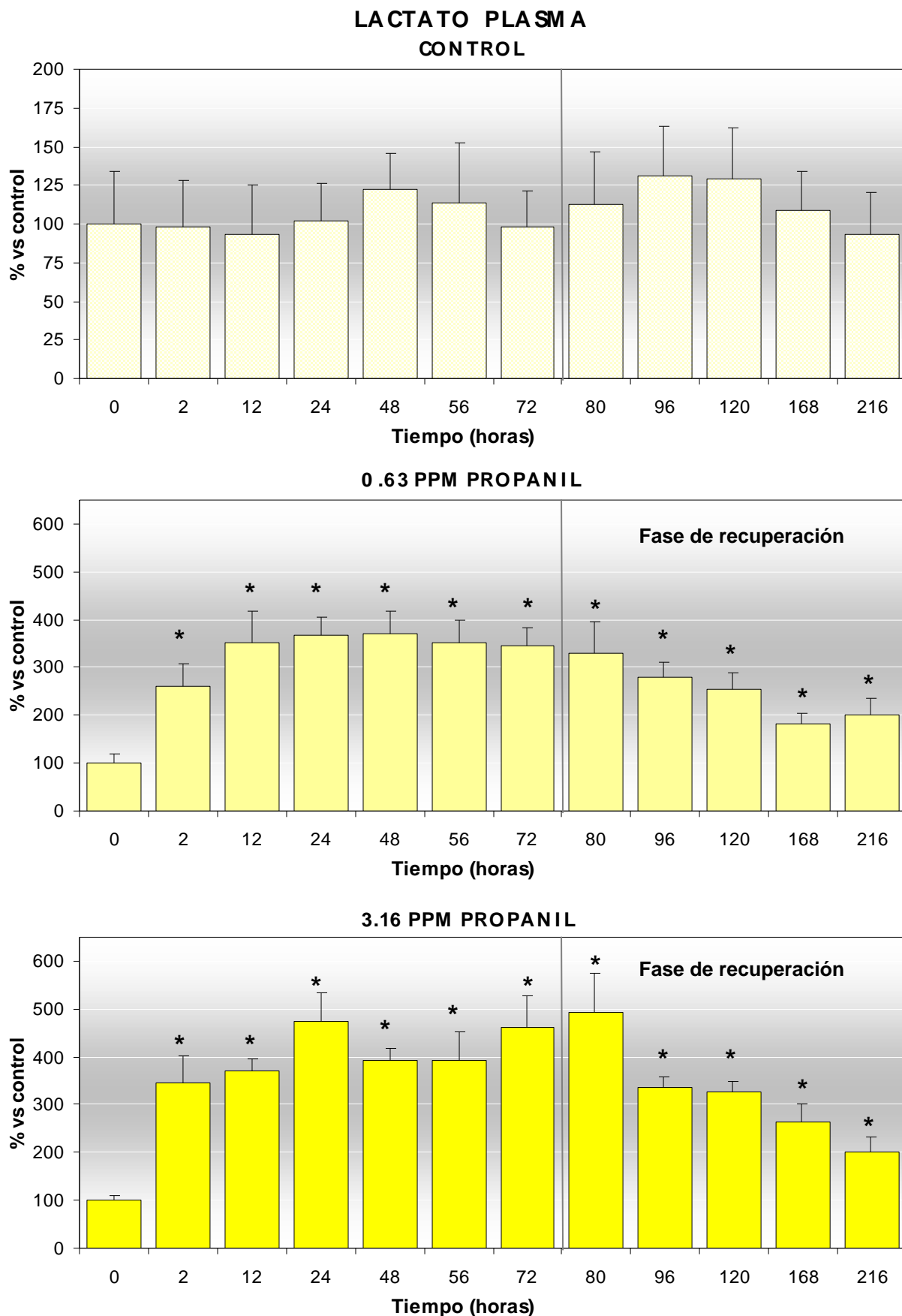
Los niveles de lactato plasmático (mg/100 mL) determinados en los animales expuestos al plaguicida, se muestran en las tablas 25 y 26 y en la figura 11 se ilustran gráficamente como porcentajes respecto al valor inicial (0 h).

Durante la exposición a ambas concentraciones de propanil el contenido de lactato en el plasma aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) respecto a los valores a las 0 h ya desde las 2 h de tratamiento, este aumento se prolongó durante todo el tiempo que duró cada experimento con el herbicida (figura 11). Esta hiperlactemia observada resultó ser función lineal de la concentración de propanil empleada ( $r = 0.91$ , tabla 27), observándose un predecible mayor efecto con la concentración más elevada.

En las anguilas expuestas a 0.63 mg/L el aumento de los niveles de lactato plasmático fue del 160% ya en el primer tiempo de medida (2 h), y aumentó hasta un 253% a las 12 h de exposición. El máximo valor se registró a las 48 h de exposición (270% sobre los valores control) de modo que no se registraron valores inferiores al 245% sobre el valor inicial entre las 12-72 h de exposición. Una vez desaparecido el agente tóxico del medio, se observó una tendencia paulatina a la recuperación, aunque sin alcanzar los niveles de partida tras seis días de permanencia en esas condiciones ( $p < 0.05$ ).

En las anguilas tratadas con una concentración de propanil 5 veces superior a la anterior (3.16 mg/L), se registró una mayor hiperlactemia durante todo el experimento: ya desde las 2 h hubo un aumento de los niveles de lactato del 246 % respecto al valor de referencia. Este aumento aún fue mayor en el siguiente tiempo de medida (270% a las 12 h) y alcanzó el máximo valor a las 24 h, con un 373% vs. control. Los niveles registrados al finalizar esta 1ª fase (72 h) fueron asimismo muy elevados, un 360% sobre 0 h. Tras 8 h en agua exenta de propanil una vez ya en la 2ª fase del experimento, se registró el máximo valor, a partir del cual los niveles tendieron progresivamente a disminuir. A diferencia de lo que ocurría en el experimento anterior no se logró la recuperación de los niveles normales una vez finalizado el ensayo.

El análisis de la varianza (anexo 8.1, tabla 1.2) demostró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre los distintos valores en cada uno de los experimentos. El test



**Figura 11.** Niveles de lactato plasmático (% vs. 0 horas) en la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

de Duncan evidenció la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los niveles de lactato a las 0 h y el determinado a todos los demás tiempos (anexo 8.1, figuras 1.3 y 1.4).

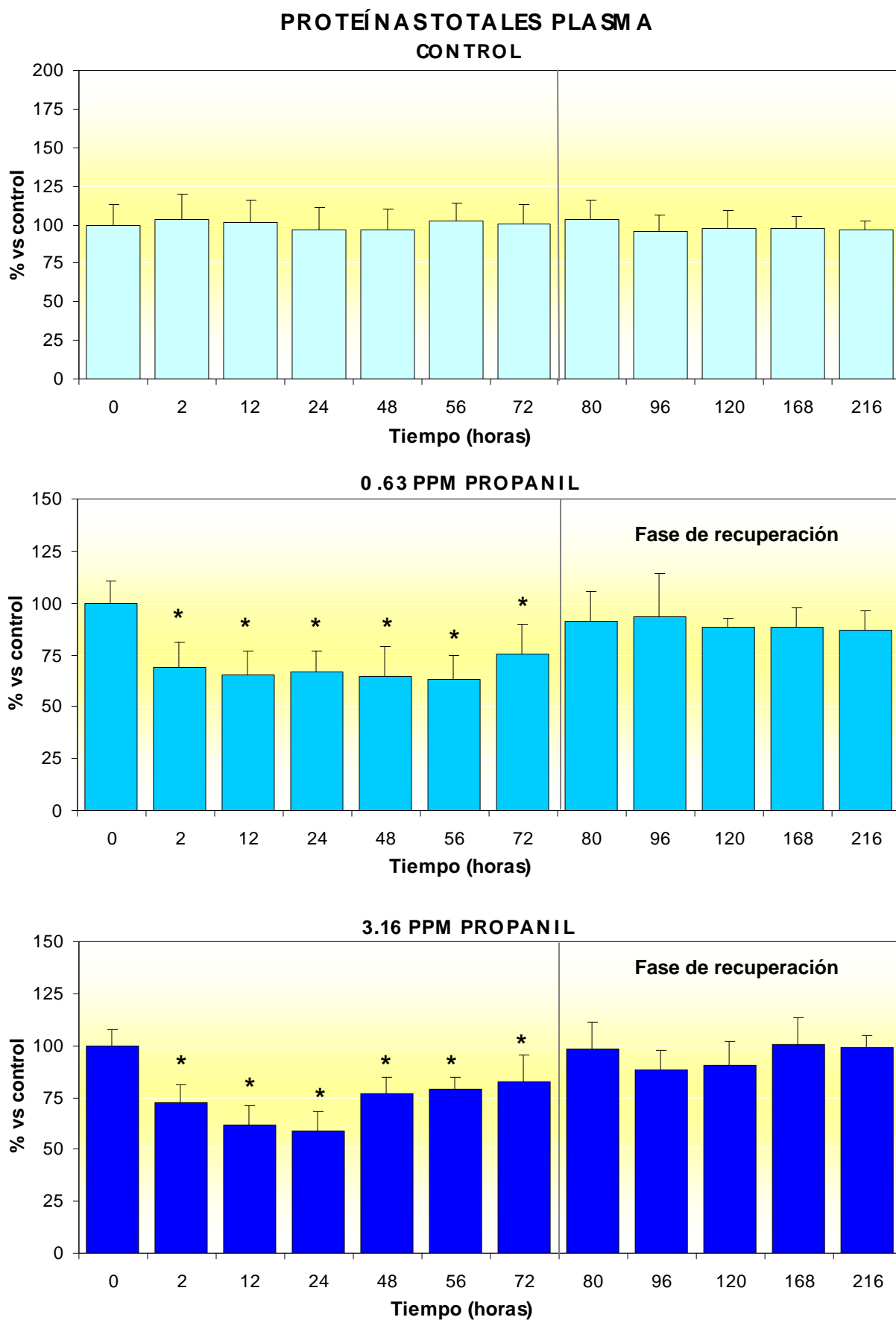
#### **4.2.2.1.3. Proteínas Totales**

En las tablas 25 y 26 aparecen representados en g/100 mL los resultados obtenidos para los valores plasmáticos de proteínas totales. Tal y como se refleja también en la figura 12, se observó un descenso del contenido proteico en el plasma de las anguilas durante la exposición a este herbicida. En efecto, se observó que los niveles de proteínas totales plasmáticas disminuyeron en las anguilas expuestas al herbicida propanil durante el tiempo que duró la fase de exposición (72 h), de modo que independientemente de la concentración ensayada, los animales presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con los valores iniciales (0 h) a los diferentes tiempos de medida.

En el experimento con 0.63 mg/L de propanil, se detectó un descenso de las proteínas totales del 31% respecto al valor inicial ya a las 2 h de contacto con el herbicida. Este descenso se mantuvo homogéneo durante el periodo comprendido entre las 2-56 h de exposición, con porcentajes de descenso entre el 31-37%, e inferior (del 25%) a las 72 h de esta primera fase. De hecho no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los diferentes valores tomados durante toda la fase de exposición (entre las 2-72 h), lo cual indicaría que la hipoproteïnemia provocada desde los primeros momentos de contacto de las anguilas con el propanil se mantuvo homogénea durante toda esta 1ª fase. A partir de 8 h en medio sin herbicida no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) frente a los valores control de los valores de proteínas totales en el plasma de las anguilas, por lo tanto se observó una clara recuperación de los mismos.

También la exposición de los animales a 3.16 mg/L de propanil provocó una disminución del contenido proteico en el plasma de los animales desde el primer tiempo de medida (descenso del 27% a las 2 h). Estos niveles descendieron progresivamente hasta las 24 h, momento en el que se registró el máximo descenso, del 41% respecto al valor control. A partir de este momento los porcentajes de descenso oscilaron entre el 23% y el 17% (48-72 h). La transferencia a un medio libre de plaguicida permitió a los animales restaurar rápidamente los niveles normales de proteínas totales en el plasma ya desde el primer tiempo de medida en estas condiciones (80 h).

El análisis de la varianza (ANOVA, anexo 8.1, tabla 1.3) reveló la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre los distintos valores determinados en cada experimento y el valor control. Un análisis estadístico posterior con el test de Duncan evidenció la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los niveles de proteínas totales tomados a las 0 h y los determinados entre las 2-72 h (fase de exposición) tanto en el tratamiento con 0.63 mg/L como en el de 3.16 mg/L (anexo 8.1, figuras 1.5 y 1.6).



**Figura 12.** Niveles de proteínas totales (% vs. 0 horas) en el plasma de la anguilla *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

#### 4.2.2.1.4. Albúmina

En las tablas 25 y 26 se indican los valores correspondientes a los niveles de albúmina plasmática, en g/100 mL. Como puede verse además en la figura 13, se observó un descenso estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) ya desde las primeras horas de exposición en los animales procedentes de ambos ensayos con propanil y en función lineal a la concentración de propanil empleada, con un coeficiente de correlación entre ambas experiencias de  $r = 0.92$  (tabla 27).

Así, en los animales expuestos a 0.63 mg/L se produjo un descenso medio de la albúmina plasmática del 50%, que se mantuvo relativamente uniforme a lo largo del periodo de exposición, puesto que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los diferentes valores tomados a lo largo de la fase de exposición al propanil, concretamente entre las 2-56 h. Tras su transferencia a agua limpia (fase de recuperación), los animales recuperaron los niveles iniciales, tal y como evidenció el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.1: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 1.4; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 1.7).

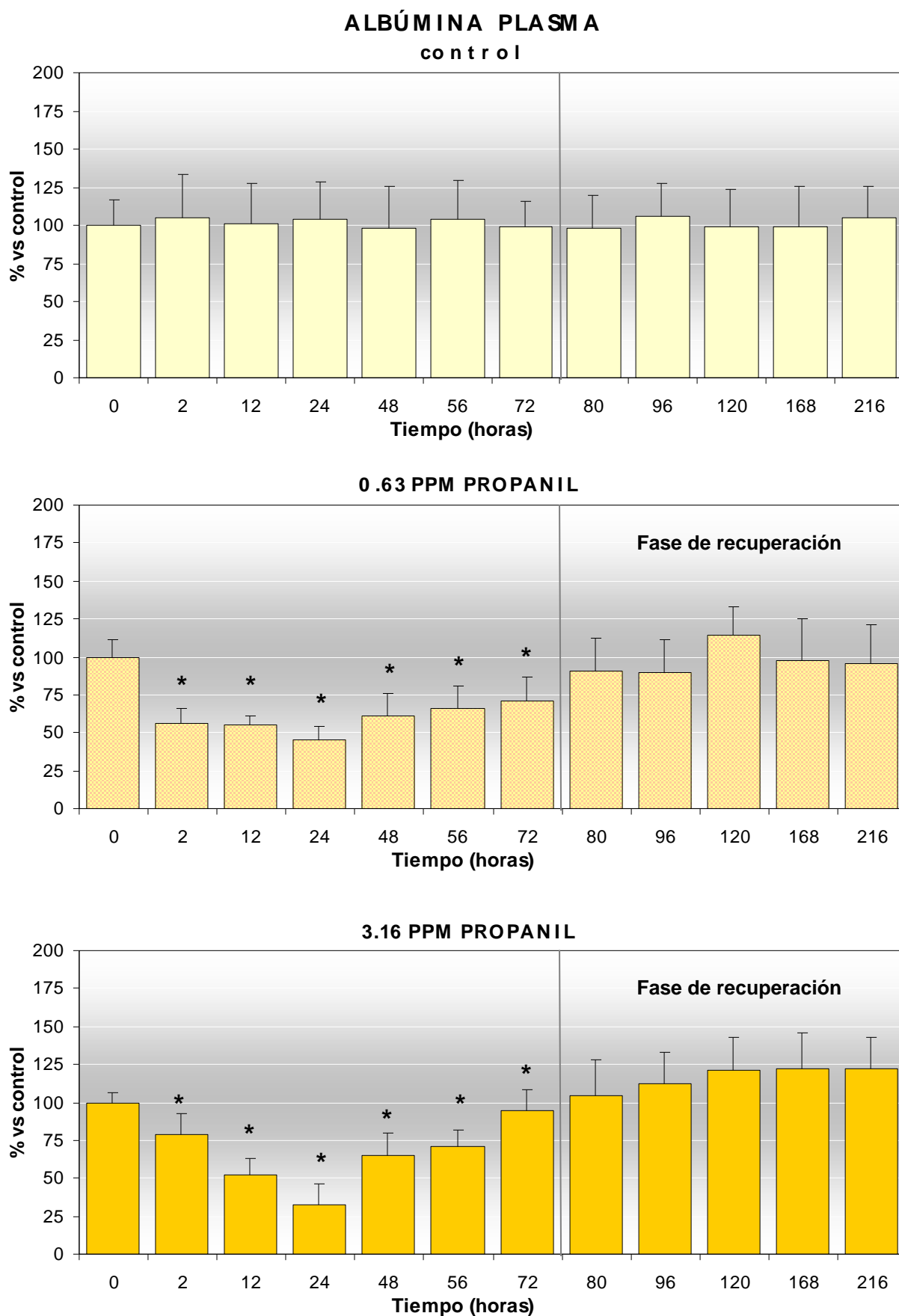
En el experimento con la concentración de propanil más elevada, se registró asimismo un descenso desde las 2 h de exposición (20%). El contenido de albúmina en el plasma decreció progresivamente hasta las 24 h, donde se registró el mínimo valor, que supuso un descenso de los niveles de albúmina del 68%. Una vez en la fase de recuperación se restablecieron los niveles de albúmina iniciales, no observándose diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el valor a las 0 h y los comprendidos entre las 80 y las 216 h del experimento (anexo 8.1: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 1.4; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 1.8).

El análisis de la correlación lineal entre las alteraciones observadas en la albúmina plasmática y las observadas en las proteínas totales del plasma debido a la presencia de propanil en el medio, reveló la existencia de una relación lineal directa, tal y como evidencian las rectas de regresión lineal calculadas entre ambos parámetros para cada concentración ensayada ( $r = 0.86$  y  $r = 0.91$  para 0.63 mg/L y 3.16 mg/L respectivamente) (tabla 28).

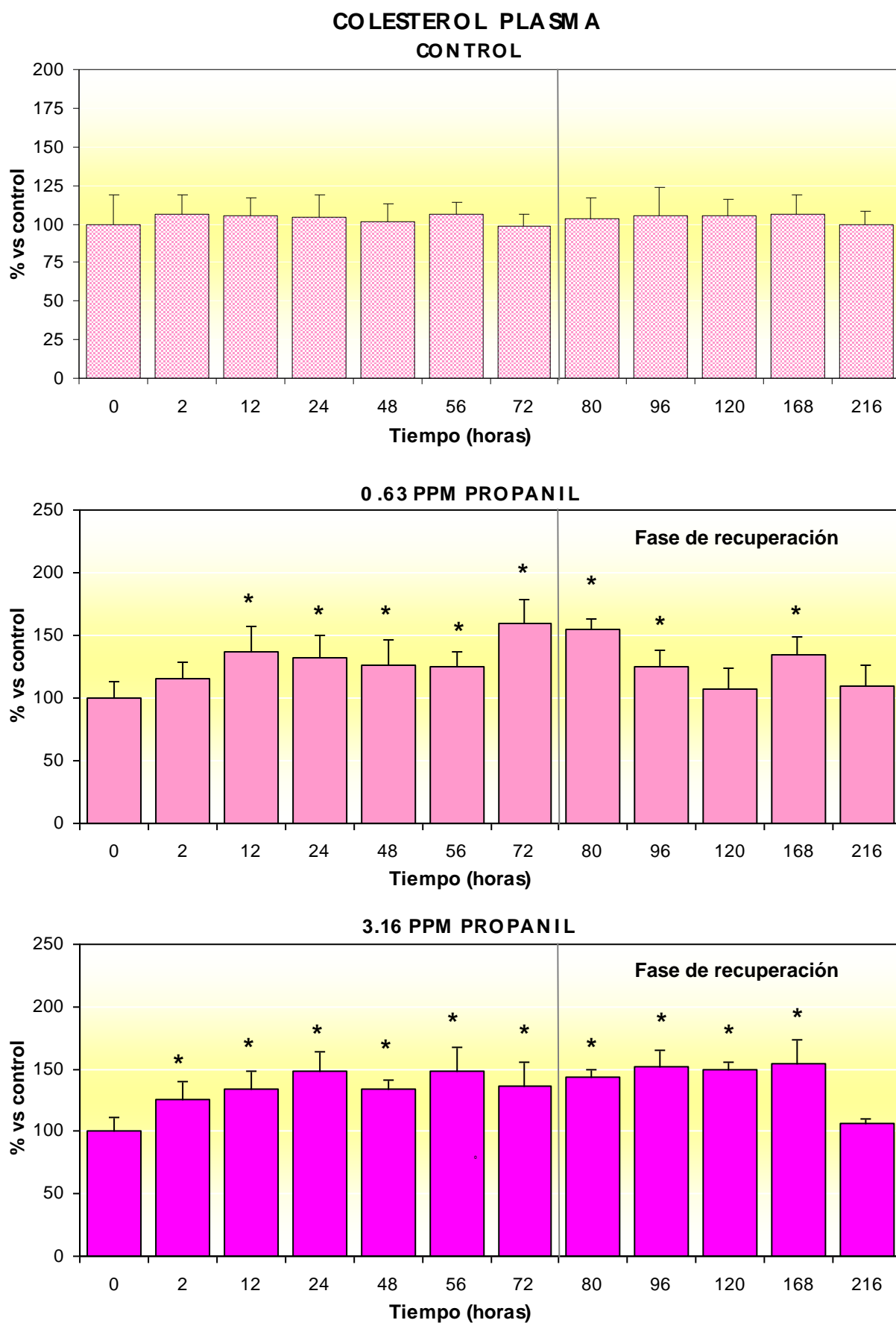
#### 4.2.2.1.5. Colesterol

Se observó un aumento de los niveles de colesterol plasmático (mg/100 mL) desde primeras horas de contacto de las anguilas con el propanil (tablas 25 y 26, figura 14). El análisis estadístico de los resultados (anexo 8.1, tabla 1.5) corroboró lo observado: el ANOVA mostró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre los distintos valores para este parámetro en ambas experiencias. En el experimento con 0.63 mg/L, el test de Duncan (anexo 8.1, figura 1.9) reveló que dicho aumento fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) respecto al control desde las 12 h de contacto con el propanil (35% vs. 0 h). Esta





**Figura 13.** Niveles de albúmina plasmática (% vs. 0 horas) en la anguilla *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 14.** Niveles de colesterol plasmático (% vs. 0 horas) en la anguilla *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

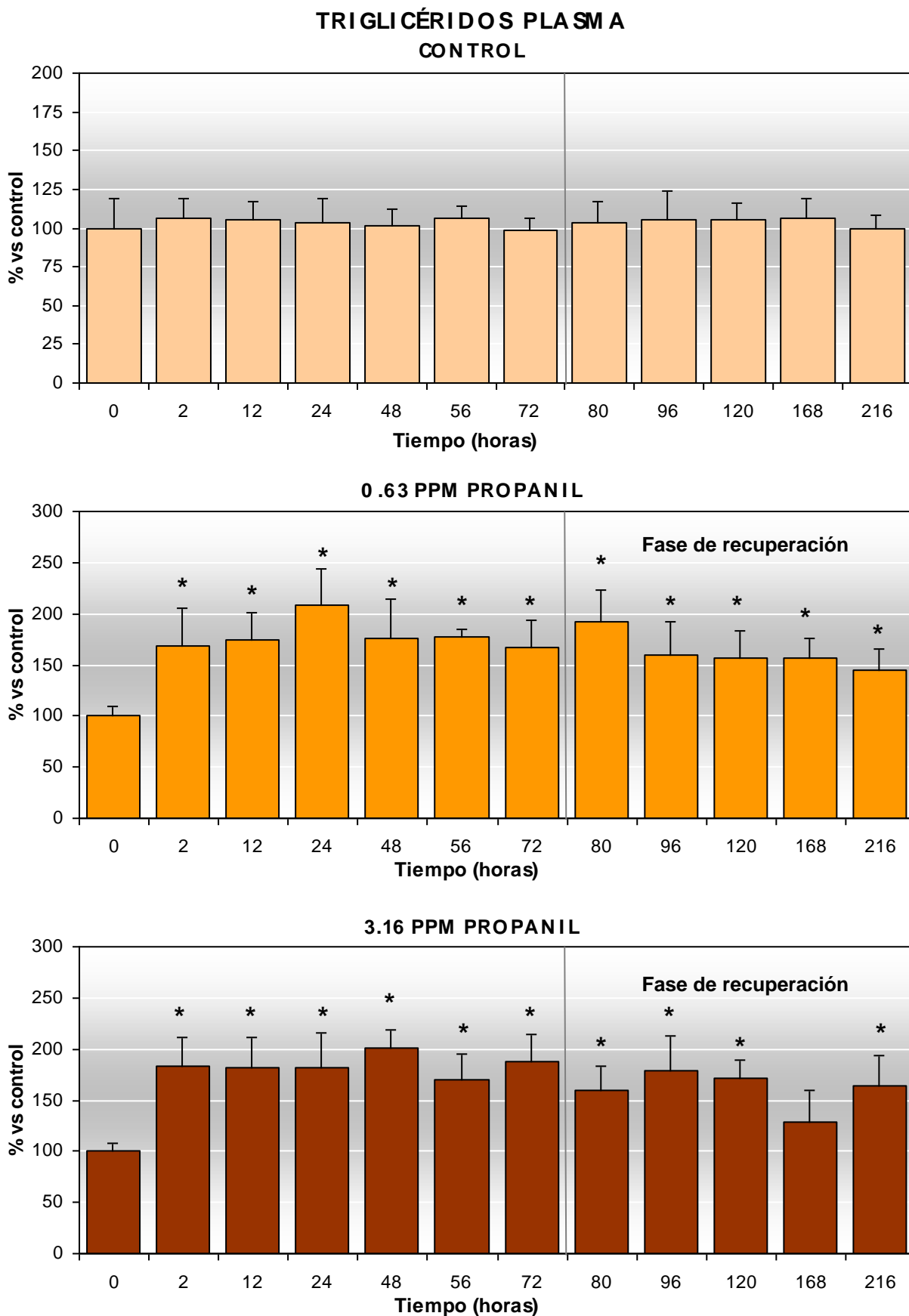
hipercolesterolemia fue homogénea durante el periodo comprendido entre las 12-56 h de la fase de exposición, como evidenció el test de Duncan (anexo 8.1, figura 1.9), con un incremento medio del 30% durante este periodo. Al finalizar esta 1ª fase (72 h de exposición) se registró el máximo aumento, un 66% sobre el valor a las 0 h, que no varió significativamente ( $p>0.05$ ) tras 8 h de permanencia de los animales pre-tratados en agua no contaminada. No obstante, durante esta 2ª fase del experimento, si bien los niveles oscilaron a lo largo del tiempo, se recuperaron antes de su finalización de modo que a las 216 h no existieron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) con el control (test de Duncan, anexo 8.1, figura 1.9).

En el experimento con 3.16 mg/L de herbicida, el test de Duncan (anexo 8.1, figura 1.10) reveló que las diferencias respecto al control fueron significativas ya desde las 2 h (un aumento del 25%). El colesterol plasmático aumentó paulatinamente hasta las 24 h (45%), momento a partir del cual esta hipercolesterolemia se mantuvo prácticamente invariable a lo largo de la fase de exposición e incluso durante la fase de recuperación. Sólo a las 216 h (seis días de permanencia en agua limpia) se observó una recuperación de los valores normales de colesterol ( $p>0.05$ ) (anexo 8.1, figura 1.10).

#### **4.2.2.1.6. Triglicéridos**

La exposición de los animales a propanil provocó una clara y rápida hipertriglicemia que se inició ya a las 2 h de exposición, y que se prolongó además durante la fase de recuperación en agua limpia, con independencia de la concentración de propanil ensayada. Estos valores aparecen indicados en las tablas 25 y 26 y en la figura 15.

En los animales tratados con 0.63 mg/L, se observó un brusco aumento de los niveles de este componente lipídico (69%) desde primeras horas de contacto con el herbicida (2 h), momento a partir del cual los niveles prácticamente se mantuvieron invariables durante toda la fase de exposición, con un incremento medio durante este periodo del 78%. De hecho no se detectaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) (test de Duncan, anexo 8.1: figura 1.11) entre los diferentes valores tomados durante toda la 1ª fase del experimento (entre las 2-72 h), a excepción de las 24 h, que coincide con el máximo aumento registrado (108% vs. 0 h). Las diferencias con respecto al control se mantuvieron incluso una vez transferidas las anguilas a agua exenta de propanil. Durante esta 2ª fase, y a semejanza de lo ocurrido en la 1ª, este aumento se mantuvo muy uniforme, con un incremento medio del 54%, no registrándose diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los diferentes niveles determinados durante esta fase (test de Duncan, anexo 8.1: figura 1.11), si exceptuamos el valor determinado a 8 h en agua limpia, donde el aumento fue del 90%. Al finalizar el experimento los niveles aún fueron un 45% superiores al valor al comienzo del mismo (0 h).



**Figura 15.** Niveles de triglicéridos plasmáticos (% vs. 0 horas) en la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

En los animales expuestos a 3.16 mg/L de propanil, a semejanza de lo ocurrido en el experimento anterior, se observó un rápido aumento de los niveles de triglicéridos (tabla 26). La exposición a propanil durante 72 h indujo en las anguilas un aumento de los niveles de triglicéridos circulantes estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) desde el primer tiempo de medida (del 83% a las 2 h), y salvo fluctuaciones que no alcanzan a ser estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), se mantuvieron elevados en el plasma de los peces durante las 72 h de exposición, con un incremento medio del 84% durante esta 1ª fase (figura 15). Este aumento se prolongó inclusive una vez eliminado el propanil del medio, observándose también durante esta 2ª fase homogeneidad a lo largo del tiempo, con un incremento medio del 69%. Al finalizar la experiencia aún se registraron unos niveles del 64% sobre el valor a las 0 h.

El resultado del análisis de la varianza (anexo 8.1: tabla 1.6) mostró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre los distintos valores determinados en los animales expuestos a propanil. El test de Duncan correspondiente evidenció que el contenido de triglicéridos en las muestras de los animales a las 0 h fue estadísticamente diferente del resto ( $p < 0.05$ ) en los animales expuestos a cada una de las concentraciones de propanil a excepción de las 168 h en el experimento con 3.16 mg/L (anexo 8.1: figuras 1.11 y 1.12).

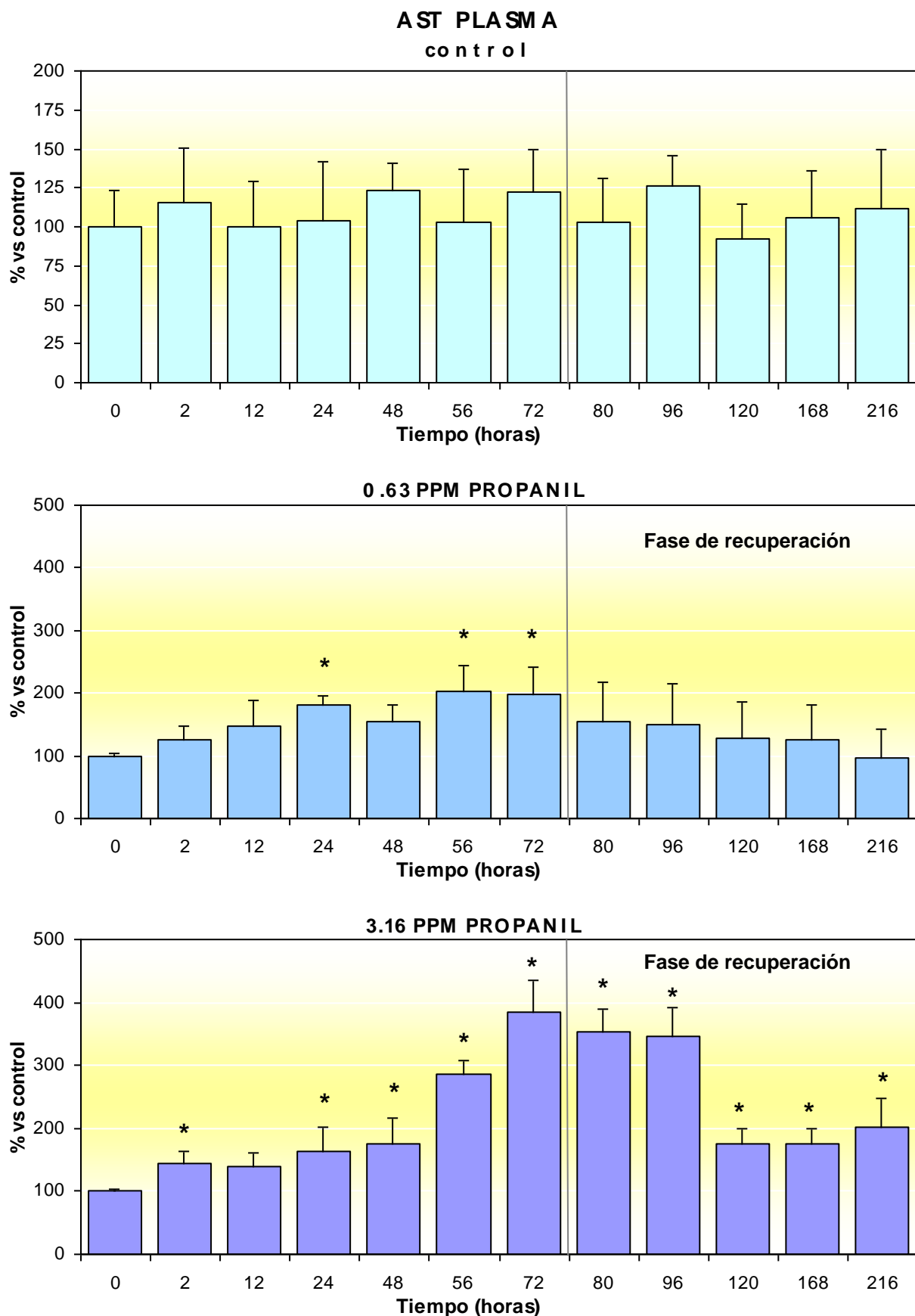
#### **4.2.2.2. Plasma: Enzimas**

##### **4.2.2.2.1. Actividad Aspartato Aminotransferasa (AST)**

En las tablas 25 y 26 se expresan los valores de la actividad enzimática AST ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ ) en el plasma las anguilas expuestas a propanil, representándose éstos como porcentajes respecto al valor inicial en la figura 16.

El contacto de los animales con 0.63 mg/L de propanil, provocó una alteración de esta actividad con un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) desde las 24 h de exposición (81% de incremento), tal y como se refleja en la figura 16, que alcanzó hasta un 103% sobre el valor control a las 56 h, y que se mantuvo invariable 16 h más tarde (a las 72 h), puesto que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la actividad entre estos tiempos de medida (test de Duncan, anexo 8.1: figura 1.13). Una vez cesada la fase de exposición, la actividad AST plasmática recuperó los valores de partida ya desde el primer tiempo de medida en agua exenta de herbicida (80 h de experimento) (tabla 25). El análisis estadístico corroboró estos resultados: el ANOVA señaló la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), que el test de Duncan ( $p < 0.05$ ) estableció entre la actividad a las 0 h y las actividades a las 24, 56 y 72 h de exposición (anexo 8.1: tabla 1.7 y figura 1.13).

En los animales procedentes del experimento con 3.16 mg/L de propanil se observó un aumento de la actividad enzimática (figura 16), en este caso significativo ( $p < 0.05$ ) ya a partir



**Figura 16.** Actividad enzimática AST (% vs. 0 horas) en el plasma de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

de las 2 h de exposición (44% de incremento), que continuó aumentando progresivamente durante esta fase hasta alcanzar su máximo a las 72 h (280% vs. 0 h). En este caso, el grado de alteración se mantuvo aún tras 24 h después de la transferencia a agua sin propanil (250% vs. 0 h), tal y como evidenció el test de Duncan (anexo 8.1: figura 1.14). Tras 120 h esta actividad mostró una tendencia hacia la normalización y recuperación de los valores respecto de la actividad inicial, sin embargo el aumento fue todavía del 75% entre las 120-168 h. En esta 2ª fase, a diferencia de lo ocurrido con la concentración más baja, la actividad no se recuperó al finalizar el ensayo, mostrándose todavía incrementada en un 101% (tabla 26). El ANOVA indicó la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre los diferentes valores, y el posterior test de Duncan los determinó ( $p < 0.05$ ) entre las 0 h y el resto de los tiempos a excepción de las 12 h (anexo 8.1: tabla 1.7 y figura 1.14).

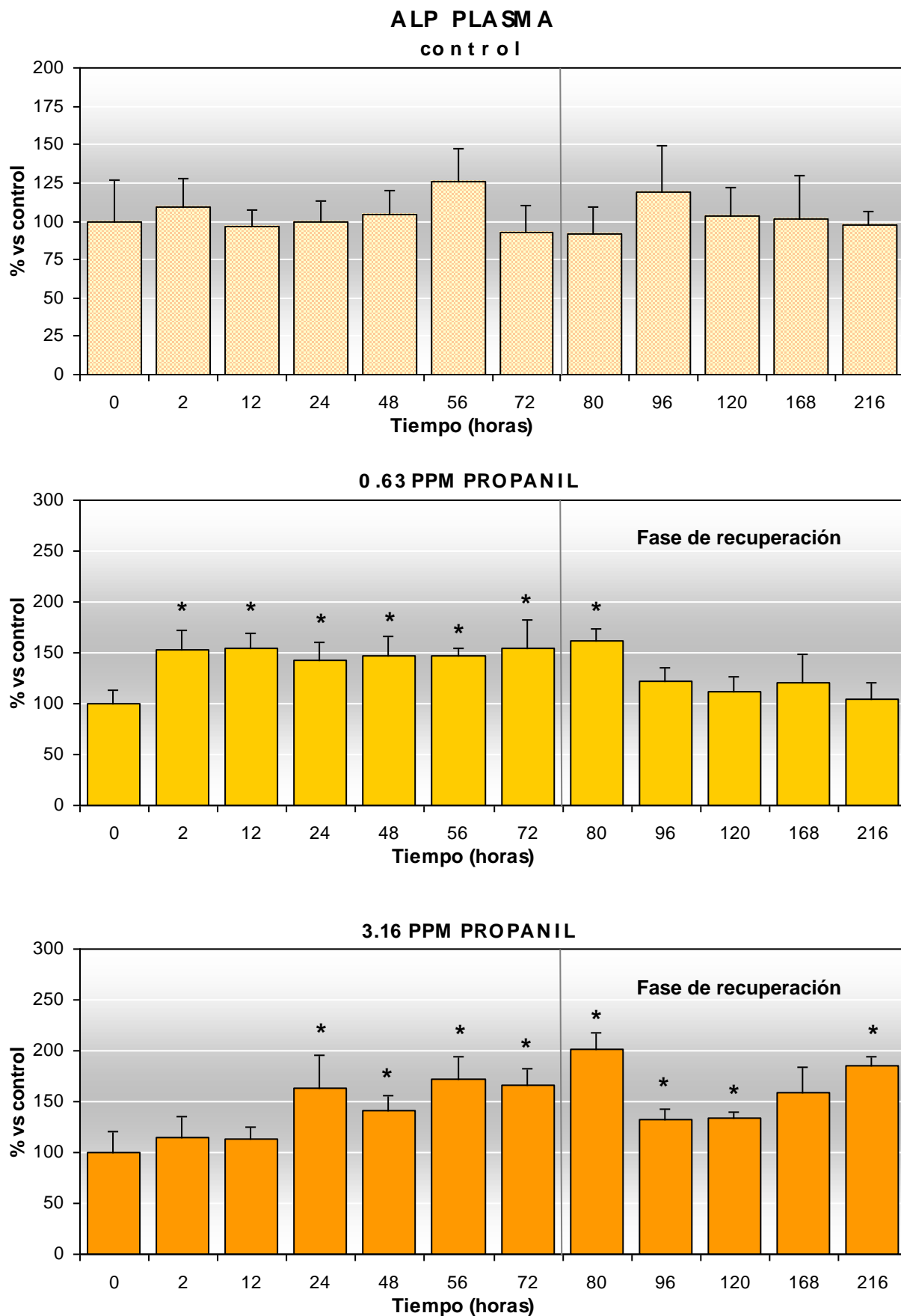
#### **4.2.2.2.2. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP)**

Los resultados obtenidos en *A. anguilla* acerca de la actividad ALP plasmática (nmol/min/mL) durante las experiencias con el herbicida aparecen reflejados en las tablas 25 y 26. La figura 17 representa gráficamente la evolución de esta actividad a lo largo del tiempo para cada experimento.

Se observaron alteraciones de la normal actividad ALP en las anguilas expuestas al herbicida propanil. Esta actividad mostró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) desde las 2 h de exposición a 0.63 mg/L, con un 53% vs. 0 h., que se mantuvo prácticamente sin variación durante las 72 h de exposición, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores medidos en el intervalo entre las 2-80 h (test de Duncan, anexo 8.1: figura 1.16), con valores de media un 50% superiores a los registrados a las 0 h durante toda la exposición (tabla 25, figura 17). Durante la exposición a 3.16 mg/L la actividad ALP plasmática mostró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) a partir de las 24 h de exposición (61% vs. 0 h), que fue máximo a las 72 h con un 71% de aumento sobre el valor de inicial.

Ya en la fase de recuperación, mientras que las anguilas expuestas a 0.63 mg/L recuperaron su actividad tras 24 h de permanencia en agua exenta de propanil, las anguilas tratadas con 3.16 mg/L no sólo no recuperaron los valores iniciales, sino que al finalizar el experimento el aumento de la actividad era aún del 85 % (tabla 26, figura 17).

El análisis de la varianza corroboró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) (anexo 8.1: tabla 1.8). En la experiencia con 0.63 mg/L el posterior test de Duncan evidenció diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la actividad ALP a las 0 h y la registrada a todos los tiempos de la fase de exposición y a las 80 h ya en la fase de recuperación. En la experiencia con 3.16 mg/L el test de Duncan mostró que las diferencias eran significativas ( $p < 0.05$ ) entre 0 h y el resto de los tiempos excepto las 2 y las 12 h de la 1ª fase (anexo 8.1: figuras 1.15 y 1.16).



**Figura 17.** Actividad enzimática ALP (% vs. 0 horas) en el plasma de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**4.2.2.3. Plasma: Correlación Lineal entre Parámetros**

La correlación lineal entre los valores determinados para los diferentes parámetros medidos en el plasma entre ambas experiencias con propanil aparecen en la tabla 27. Y en la tabla 28 se reflejan los datos correspondientes a la correlación lineal entre la albúmina y las proteínas totales en cada uno de los experimentos con el herbicida.

**Tabla 27.** Rectas de regresión ( $y = a + bx$ ) y coeficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre los valores relativos a los metabolitos y enzimas estudiados en el plasma de las anguilas procedentes de ambos experimentos con propanil.

0.63 mg/L / 3.16 mg/L	$y = a + bx$	$r$
Glucosa	$y = 13.9 + 1.046 x$	0.69
Lactato	$y = 13.9 + 1.046 x$	0.91
Proteínas totales	$y = 0.40 + 0.943 x$	0.85
Albúmina	$y = -0.22 + 1.347 x$	0.92
Colesterol	$y = 203.4 + 0.457 x$	0.49
Triglicéridos	$y = 82.25 + 0.775 x$	0.72
AST	$y = -0.03 + 1.534 x$	0.58
ALP	$y = 37.03 + 0.278 x$	0.23

Se observó que la correlación lineal entre las concentraciones de propanil a las que se expusieron los animales y el efecto sobre el parámetro estudiado, en el caso de la albúmina fue muy elevada ( $r = 0.92$ ), con lo cual se podría “predecir” el efecto producido sobre este metabolito con la concentración más alta, que sería ajustable a lo esperado a partir de los datos obtenidos con la concentración más baja. También se puede decir que el efecto producido por el propanil sobre los niveles de lactato plasmáticos sigue una correlación lineal entre las dos concentraciones estudiadas, como así lo demuestra el coeficiente de correlación lineal obtenido ( $r = 0.91$ ) y lo mismo en el caso de las proteínas totales ( $r = 0.85$ ), seguidos de los triglicéridos y glucosa plasmáticos, con coeficientes de correlación de Pearson de 0.72 y 0.69 respectivamente. Sin embargo, y a la vista de los resultados, los efectos producidos por el propanil en el caso del colesterol plasmático no se ajustan a una función lineal ( $r = 0.49$ ). Tampoco existe una buena correlación lineal entre las diferentes concentraciones de propanil utilizadas y las actividades enzimáticas AST y ALP en el plasma de las anguilas.

**Tabla 28.** Rectas de regresión ( $y = a + bx$ ) y coeficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre los valores de albúmina y proteínas totales en el plasma de la anguila para cada concentración de propanil estudiada.

Albúmina / Prot. totales	$y = a + bx$	$r$
0.63 mg/L	$y = 1.66 + 0.958 x$	0.86
3.16 mg/L	$y = 1.95 + 0.741 x$	0.91

Como ya se comentó (apdo. 4.3.1.4), existe un alto grado de correlación lineal entre los valores correspondientes a la albúmina y las proteínas totales determinados en el plasma tanto en el experimento con 0.63 mg/L de propanil, como pone de manifiesto el coeficiente de correlación obtenido ( $r = 0.86$ ), como en el experimento con 3.16 mg/L, donde este coeficiente aún fue mayor ( $r = 0.91$ ).

#### **4.2.2.4. Hígado: Metabolitos**

##### **4.2.2.4.1. Glucosa**

En las tablas 29 y 30 se muestran los niveles de glucosa hepática (mg/g) determinados en las anguilas procedentes de los experimentos con 0.63 y 3.16 mg/L de propanil, respectivamente. En la figura 18 aparecen los resultados gráficamente ilustrados como porcentajes respecto de los valores registrados al inicio de cada experimento. Se observó que durante la exposición al herbicida se produjo un descenso de los niveles de glucosa hepática que tendieron a normalizarse, entendiendo la normalización como la recuperación de los valores iniciales, una vez los animales están en la fase de recuperación, es decir, una vez cesa la exposición al herbicida propanil.

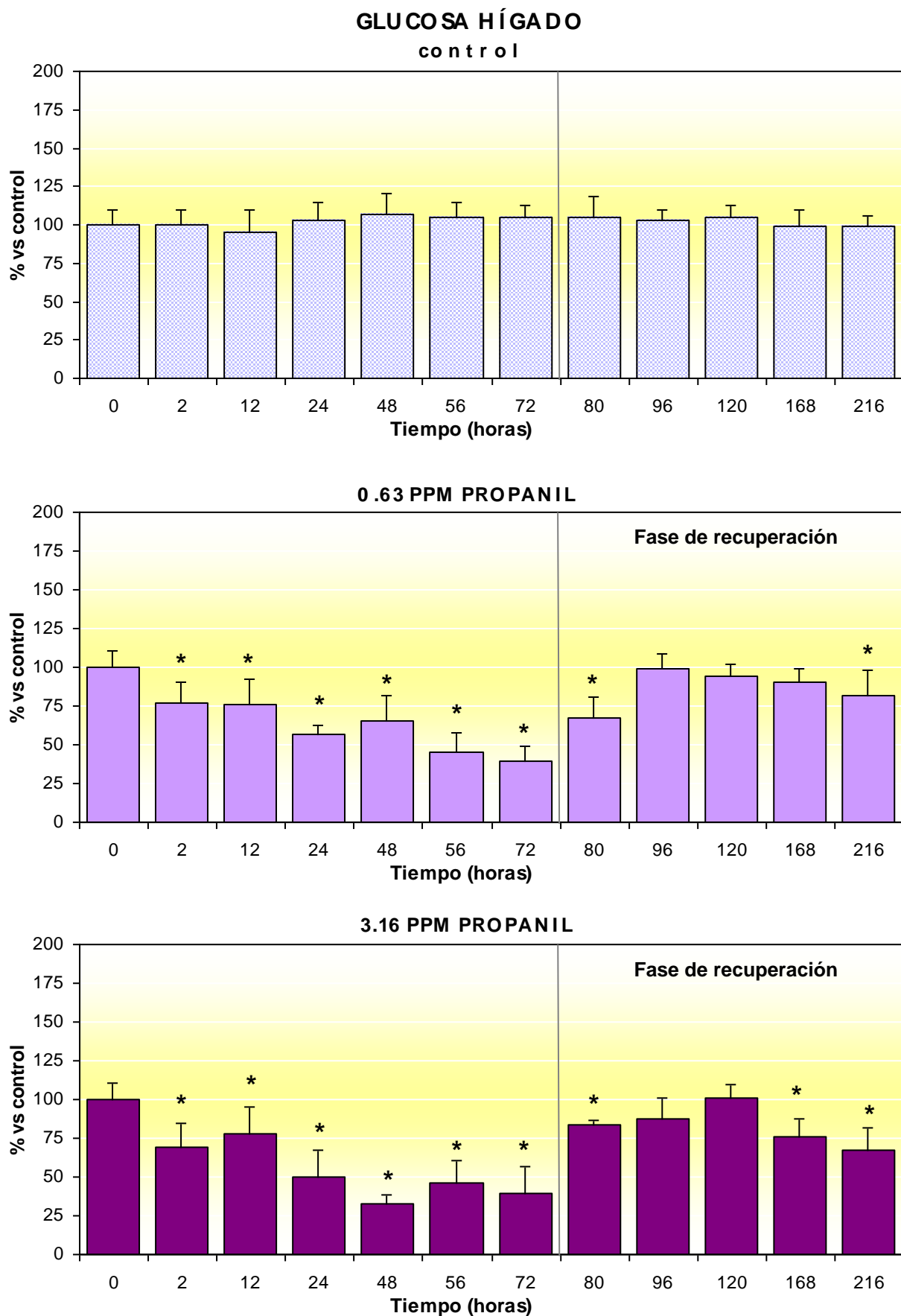
Como se refleja en la figura 18, se observó un descenso paulatino desde primeras horas de contacto con el herbicida en anguilas expuestas a cada una de las dos concentraciones de propanil, siguiendo una pauta muy similar en ambas experiencias tal y como evidencia el coeficiente de correlación lineal calculado entre ambas ( $r = 0.84$ , tabla 31). Así, ya a las 2 h de exposición se apreció una reducción del 25% en animales expuestos a 0.63 mg/L, y del 31% en los expuestos a 3.16 mg/L. A partir de este momento los niveles glucídicos hepáticos disminuyeron gradualmente a lo largo del tiempo en ambos experimentos. La máxima reducción se observó entre las 56-72 h (reducción del 55-60%) en anguilas expuestas a 0.63 mg/L e incluso antes, a las 48 h con una reducción del 67%, en anguilas expuestas a 3.16 mg/L de propanil. Este porcentaje de reducción en las reservas glucídicas se prolongó,

**Tabla 29** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido de glucosa (mg/g), lactato (mg/g), glucógeno (mg/g), proteínas totales (mg/g), colesterol (mg/g) y triglicéridos (mg/g) en el hígado de la anguilla *A. anguilla* a lo largo de la exposición a **0.63 mg/L** de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\ast$ )  $p < 0.05$ .

HÍGADO							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	12	24	48	56	72
GLUCOSA	10.80 $\pm$ 1.11	8.35 $\pm$ 1.43*	8.21 $\pm$ 1.76*	6.14 $\pm$ 0.65*	7.01 $\pm$ 1.79*	4.85 $\pm$ 1.41*	4.29 $\pm$ 0.96*
LACTATO	1.09 $\pm$ 0.16	1.01 $\pm$ 0.13	1.68 $\pm$ 0.34*	1.65 $\pm$ 0.27*	1.58 $\pm$ 0.25*	2.14 $\pm$ 0.10*	2.06 $\pm$ 0.13*
GLUCÓGENO	335.32 $\pm$ 22.28	280.06 $\pm$ 32.94*	233.71 $\pm$ 19.13*	67.18 $\pm$ 17.72*	11.95 $\pm$ 5.59*	20.57 $\pm$ 6.28*	9.23 $\pm$ 2.26*
PROTEÍNAS	408.97 $\pm$ 52.12	174.67 $\pm$ 47.29*	308.44 $\pm$ 65.67*	170.10 $\pm$ 86.21*	179.40 $\pm$ 53.75*	283.49 $\pm$ 70.91*	306.25 $\pm$ 74.51*
COLESTEROL	13.37 $\pm$ 1.61	6.56 $\pm$ 1.16*	9.20 $\pm$ 1.52*	6.22 $\pm$ 0.79*	4.85 $\pm$ 0.86*	8.03 $\pm$ 1.96*	8.51 $\pm$ 1.04*
TRIGLICÉRIDOS	34.01 $\pm$ 4.83	22.94 $\pm$ 4.61*	23.98 $\pm$ 4.35*	21.30 $\pm$ 4.52*	20.82 $\pm$ 2.89*	24.67 $\pm$ 4.44*	25.32 $\pm$ 0.70*
Fase de Recuperación (Horas)							
	80	96	120	168	216		
GLUCOSA	7.24 $\pm$ 1.51*	10.66 $\pm$ 1.09	10.20 $\pm$ 0.85	9.80 $\pm$ 0.92	8.86 $\pm$ 1.73*		
LACTATO	1.95 $\pm$ 0.14*	1.45 $\pm$ 0.29*	1.40 $\pm$ 0.25*	1.95 $\pm$ 0.36*	1.69 $\pm$ 0.25*		
GLUCÓGENO	37.76 $\pm$ 11.92*	78.35 $\pm$ 11.07*	120.20 $\pm$ 47.21*	136.77 $\pm$ 18.15*	126.49 $\pm$ 16.28*		
PROTEÍNAS	228.66 $\pm$ 31.60*	163.43 $\pm$ 29.12*	122.17 $\pm$ 33.51*	167.66 $\pm$ 40.85*	242.65 $\pm$ 67.24*		
COLESTEROL	4.83 $\pm$ 0.76*	3.02 $\pm$ 0.64*	2.13 $\pm$ 0.11*	2.92 $\pm$ 0.67*	5.11 $\pm$ 1.94*		
TRIGLICÉRIDOS	14.51 $\pm$ 0.63*	10.82 $\pm$ 2.01*	9.89 $\pm$ 1.39*	13.44 $\pm$ 3.64*	15.74 $\pm$ 2.49*		

**Tabla 30.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido de glucosa (mg/g), lactato (mg/g), gluocógeno (mg/g), proteínas totales (mg/g), colesterol (mg/g) y triglicéridos (mg/g) en el hígado de la anguilla *A. anguilla* a lo largo de la exposición a 3,16 mg/L de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\ast$ )  $p < 0,05$ .

HÍGADO							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	12	24	48	56	72
GLUCOSA	10.11 $\pm$ 1.12	7.00 $\pm$ 1.58 <sup>*</sup>	7.86 $\pm$ 1.76 <sup>*</sup>	5.09 $\pm$ 1.67 <sup>*</sup>	3.34 $\pm$ 0.58 <sup>*</sup>	4.64 $\pm$ 1.44 <sup>*</sup>	4.02 $\pm$ 1.72 <sup>*</sup>
LACTATO	1.00 $\pm$ 0.13	1.24 $\pm$ 0.25	1.76 $\pm$ 0.25 <sup>*</sup>	1.59 $\pm$ 0.21 <sup>*</sup>	1.66 $\pm$ 0.32 <sup>*</sup>	2.74 $\pm$ 0.28 <sup>*</sup>	2.52 $\pm$ 0.39 <sup>*</sup>
GLUCÓGENO	338.57 $\pm$ 26.43	229.98 $\pm$ 39.18 <sup>*</sup>	53.54 $\pm$ 34.00 <sup>*</sup>	55.23 $\pm$ 24.30 <sup>*</sup>	7.78 $\pm$ 2.46 <sup>*</sup>	7.30 $\pm$ 1.70 <sup>*</sup>	36.77 $\pm$ 15.28 <sup>*</sup>
PROTEÍNAS	433.17 $\pm$ 73.05	164.66 $\pm$ 57.69 <sup>*</sup>	232.05 $\pm$ 74.59 <sup>*</sup>	221.46 $\pm$ 29.57 <sup>*</sup>	177.64 $\pm$ 53.12 <sup>*</sup>	248.36 $\pm$ 33.75 <sup>*</sup>	191.72 $\pm$ 61.19 <sup>*</sup>
COLESTEROL	12.46 $\pm$ 1.88	4.71 $\pm$ 0.70 <sup>*</sup>	5.94 $\pm$ 1.15 <sup>*</sup>	5.43 $\pm$ 1.63 <sup>*</sup>	4.36 $\pm$ 1.16 <sup>*</sup>	7.40 $\pm$ 1.45 <sup>*</sup>	4.74 $\pm$ 1.12 <sup>*</sup>
TRIGLICÉRIDOS	37.61 $\pm$ 2.90	26.19 $\pm$ 2.93 <sup>*</sup>	22.32 $\pm$ 2.87 <sup>*</sup>	21.53 $\pm$ 2.53 <sup>*</sup>	20.72 $\pm$ 4.02 <sup>*</sup>	22.57 $\pm$ 3.48 <sup>*</sup>	19.69 $\pm$ 4.29 <sup>*</sup>
Fase de Recuperación (Horas)							
	80	96	120	168	216		
GLUCOSA	8.42 $\pm$ 0.35 <sup>*</sup>	8.87 $\pm$ 1.34	10.19 $\pm$ 0.88	7.72 $\pm$ 1.17 <sup>*</sup>	6.79 $\pm$ 1.51 <sup>*</sup>		
LACTATO	2.08 $\pm$ 0.43 <sup>*</sup>	2.08 $\pm$ 0.35 <sup>*</sup>	2.07 $\pm$ 0.19 <sup>*</sup>	2.20 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>	1.69 $\pm$ 0.17 <sup>*</sup>		
GLUCÓGENO	13.31 $\pm$ 4.07 <sup>*</sup>	24.22 $\pm$ 9.61 <sup>*</sup>	19.06 $\pm$ 4.71 <sup>*</sup>	34.84 $\pm$ 14.14 <sup>*</sup>	47.57 $\pm$ 14.57 <sup>*</sup>		
PROTEÍNAS	143.09 $\pm$ 10.00 <sup>*</sup>	146.41 $\pm$ 21.41 <sup>*</sup>	183.89 $\pm$ 32.09 <sup>*</sup>	160.08 $\pm$ 30.36 <sup>*</sup>	198.55 $\pm$ 66.43 <sup>*</sup>		
COLESTEROL	4.17 $\pm$ 0.75 <sup>*</sup>	2.54 $\pm$ 0.46 <sup>*</sup>	4.64 $\pm$ 1.34 <sup>*</sup>	2.54 $\pm$ 0.51 <sup>*</sup>	3.85 $\pm$ 0.49 <sup>*</sup>		
TRIGLICÉRIDOS	13.57 $\pm$ 0.81 <sup>*</sup>	12.19 $\pm$ 3.00 <sup>*</sup>	13.09 $\pm$ 2.19 <sup>*</sup>	14.29 $\pm$ 3.20 <sup>*</sup>	15.12 $\pm$ 2.93 <sup>*</sup>		



**Figura 18.** Niveles de glucosa hepática (% vs. 0 horas) en la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

además, hasta finalizar la fase de exposición (72 h), tal y como puso de manifiesto el test de Duncan, que evidenció que no existían diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los valores tomados a 48, 56 y 72 h (anexo 8.2: figura 2.2).

Después de transferir los animales a un medio libre de propanil, la pauta observada en los niveles de glucosa hepática nuevamente fue muy similar con ambos tratamientos: en el primer tiempo de medida ya en la 2ª fase (80 h), las diferencias con el valor control aún fueron significativas ( $p<0.05$ ) y aunque se observó una tendencia a la recuperación de los niveles de partida tras 24 h en estas condiciones, éstos volvieron a disminuir de manera significativa antes de finalizar las experiencias (tablas 29 y 30).

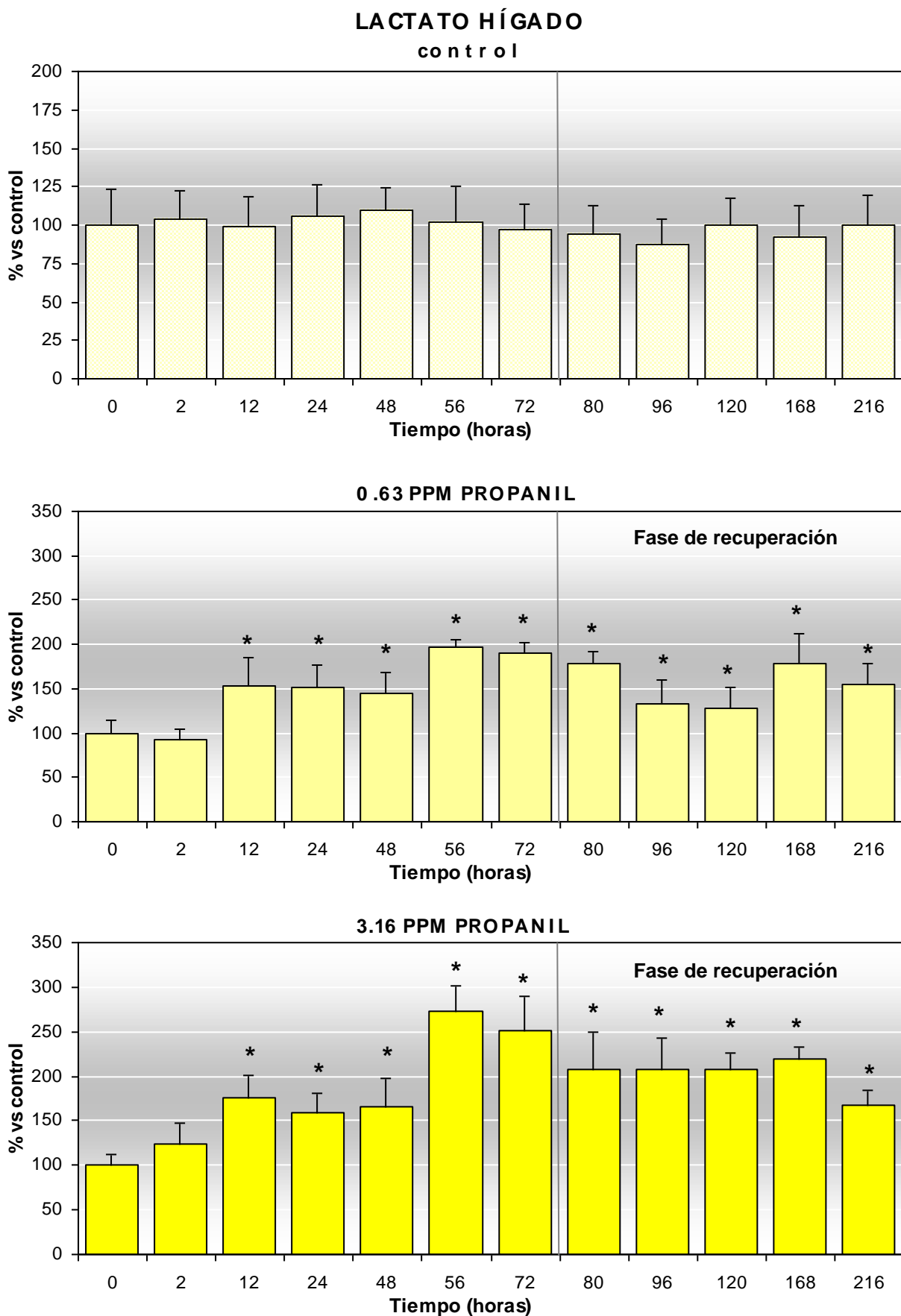
El análisis de la varianza de los resultados verificó la existencia de diferencias significativas ( $p<0.0001$ ) entre los valores de glucosa hepática: el test de Duncan mostró diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre los valores tomados a las 0 h y los del resto de las medidas salvo a las 96, 120 y 168 h en el experimento con 0.63 mg/L y a las 96 y 120 h en el caso del tratamiento con 3.16 mg/L de propanil, en ambos casos ya en la fase de recuperación (anexo 8.2: tabla 2.1 y figuras 2.1 y 2.2).

#### **4.2.2.4.2. Lactato**

Los valores de lactato hepáticos (mg/g) durante la exposición de las anguilas al plaguicida experimentaron, en ambos ensayos, un aumento desde las 12 h de contacto de los animales con el herbicida y que fue función directa de la concentración de propanil empleada ( $r=0.85$ , tabla 28).

Tal y como se observa en la tabla 29 y figura 19, en las anguilas tratadas con 0.63 mg/L el aumento detectado a partir de las 12 h se mantuvo invariable hasta las 48 h, constatado por el test de Duncan (anexo 8.2: figura 2.3), con un aumento medio del 50% durante este periodo (entre 12-48 h). El máximo valor se determinó entre las 56-72 h de tratamiento, con un incremento medio del 93%, que aún se mantuvo hasta 8 h después de transferir a los animales a agua sin propanil, puesto que el test de Duncan (anexo 8.2: figura 2.3) no determinó diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los valores tomados entre las 56 y las 80 h. Durante las siguientes 24-48 h de esta 2ª fase si bien se observó cierta tendencia a la recuperación (aumento sólo del 30% entre las 96-120 h), los valores fueron fluctuantes y las diferencias se volvieron a incrementar antes de finalizar la experiencia, con unos niveles superiores al 50% respecto a los valores de partida.

Del mismo modo, en los animales expuestos a 3.16 mg/L el lactato hepático aumentó a partir de las 12 h, manteniéndose uniforme durante las siguientes 24-48 h (no se determinaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre estos valores, ver anexo 8.2: figura 2.4) con un aumento medio del 67% durante este intervalo. También en este caso se alcanzó el máximo



**Figura 19.** Niveles de lactato hepático (% vs. 0 horas) en la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

aumento de los niveles de lactato entre las 56-72 h de exposición, con un valor medio del 162%. Durante la 2ª fase del experimento este parámetro permaneció alterado: tras 8 h en agua limpia el aumento aún fue del 107%, aumento que se mantuvo homogéneo a lo largo de esta fase de recuperación (entre las 80-168 h) (test de Duncan, anexo 8.2: figura 2.3). Tras seis días en agua limpia se determinaron valores para este parámetro aún un 68% superiores al valor de referencia (figura 19).

El análisis estadístico evidenció la existencia de diferencias significativas entre los diferentes valores de lactato hepático ( $p < 0.0001$ ). El test de Duncan demostró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los valores a las 0 h y el resto de tiempos a partir de las 12 h, tanto en animales expuestos a 0.63 mg/L como en aquellos expuestos a 3.16 mg/L (anexo 8.2: figuras 2.3 y 2.4).

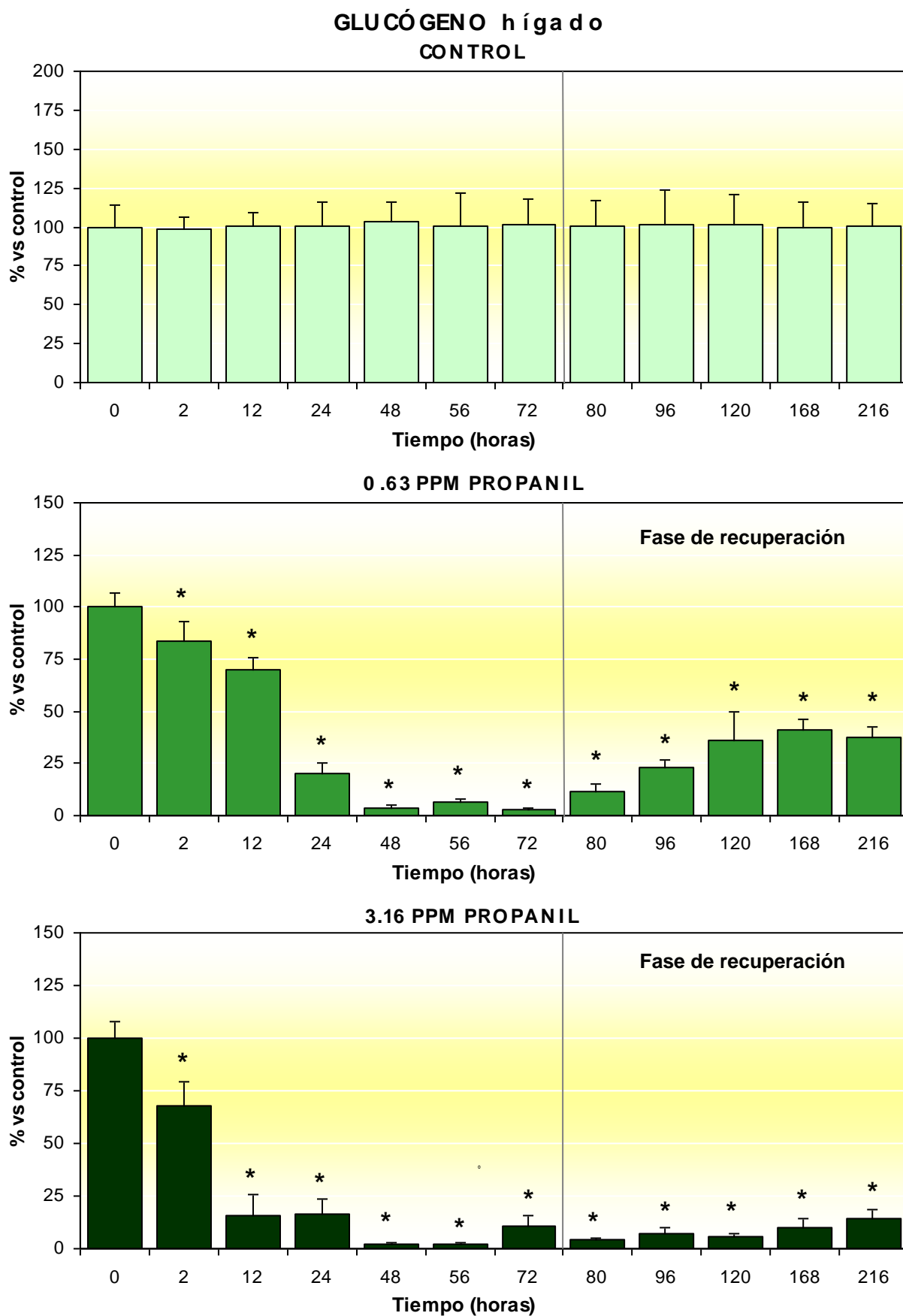
#### **4.2.2.4.3. Glucógeno**

Los valores determinados de glucógeno hepático (mg/g) en anguilas procedentes de las dos experiencias con propanil (tablas 29 y 30) se ilustran gráficamente en la figura 20.

El contacto de los animales con el herbicida provocó una importante movilización de las reservas de glucógeno hepático. Además los valores determinados tras la exposición a ambas concentraciones de propanil siguieron una correlación lineal, observándose una mayor reducción con la concentración de propanil más alta ( $r = 0.85$ , tabla 31). Tal y como se refleja en la figura 20, ya en la experiencia con 0.63 mg/L de propanil se observó una importante movilización de las reservas glucogénicas, con un descenso gradual desde el inicio del experimento, representando las reservas un 83% vs. control a las 2 h y un 69% a las 12 h. A las 24 h ya sólo constituyeron un 20% del valor control, y aún disminuyeron a menos del 10% entre las 48 y 72 h de exposición, intervalo que supuso la máxima movilización observada, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre estos valores (test de Duncan, anexo 8.2: figura 2.6). Una vez se ubicaron los animales en agua exenta de plaguicida se observó cierta tendencia a la recuperación, paulatina y progresiva, a partir de las 24 h en estas condiciones, de manera que a las 96 h los niveles alcanzaron un 23% del valor inicial e incluso un 41% a las 168 h. No obstante, la drástica movilización de los niveles de glucógeno observada debida a la exposición de las anguilas a propanil, incluso a esta concentración, conllevó que al finalizar la experiencia los niveles sólo supusieran un 35 % de los tomados a las 0 h (tabla 21).

En la experiencia con 3.16 mg/L de propanil, la reducción fue evidente desde las 2 h de exposición, siendo muy acusada a partir de las 12 h y hasta finalizar el experimento (figura 20), de modo que los niveles de esta reserva energética no superaron el 10% durante el intervalo entre las 48-72 h de exposición al propanil. Además, no se observó tendencia alguna a la recuperación de los valores iniciales tras la transferencia a agua, de manera que esta





**Figura 20.** Niveles de glucógeno hepático (% vs. 0 horas) en la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

drástica movilización aún se mantuvo 48 h después de ubicados los animales en medio limpio, no detectándose diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores tomados entre las 48-120 h tal y como corroboró el test de Duncan (anexo 8.2: figura 2.6). Las reservas hepáticas no supusieron más del 10% del valor inicial durante toda la fase de recuperación (80-168 h) y sólo un 14 % al finalizar la misma (tabla 22). El ANOVA correspondiente indicó la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) en ambos experimentos, que el posterior test de Duncan reveló ( $p < 0.05$ ) entre el contenido de glucógeno a las 0 h y el del resto de medidas (anexo 8.2: tabla 2.3 y figuras 2.5 y 2.6).

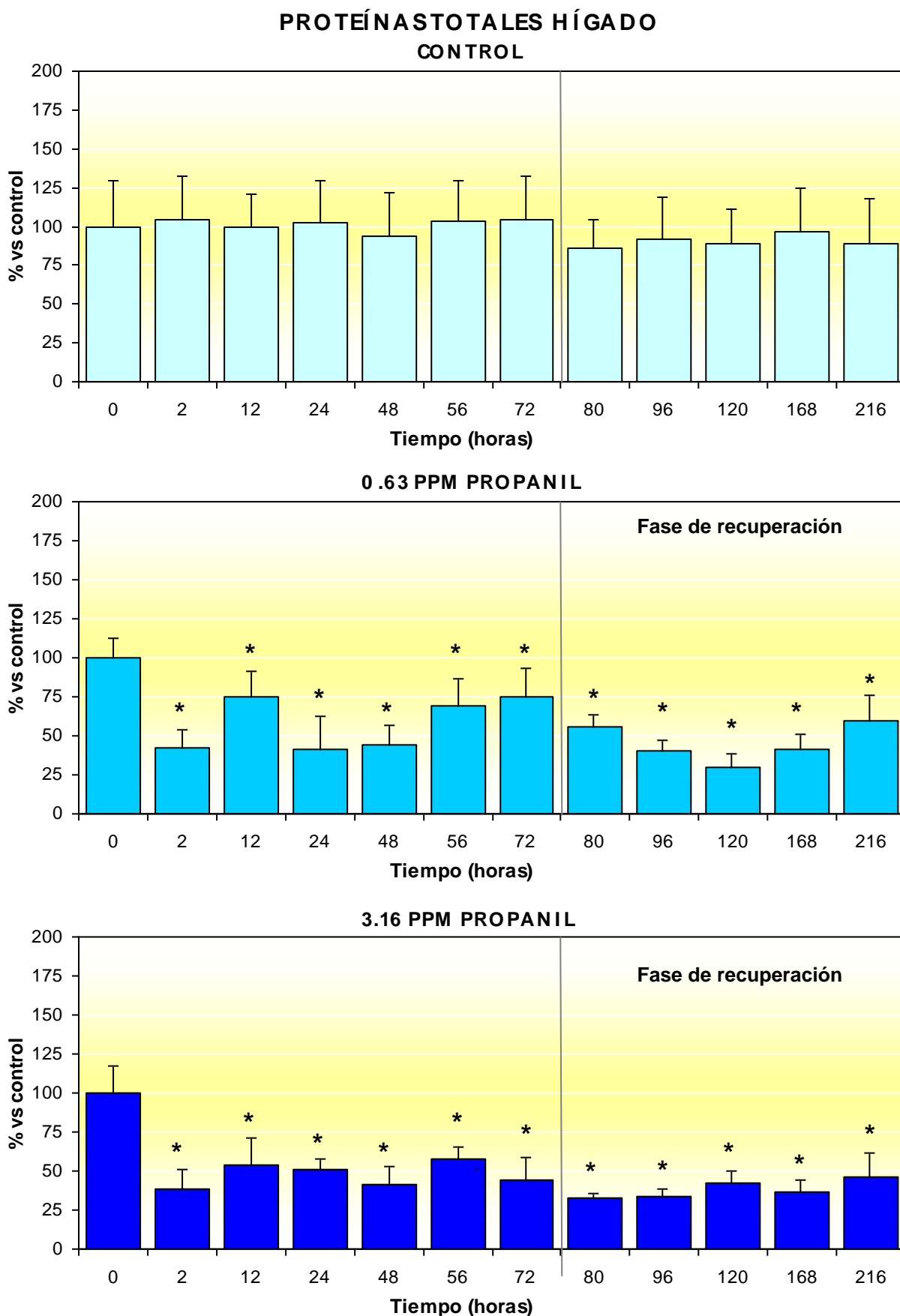
#### **4.2.2.4.4. Proteínas Totales**

En las tablas 29 y 30 quedan reflejados los valores determinados de proteínas totales en hígado (mg/g) en las anguilas durante las experiencias con propanil. La figura 21 representa los porcentajes de estos valores respecto a los valores control.

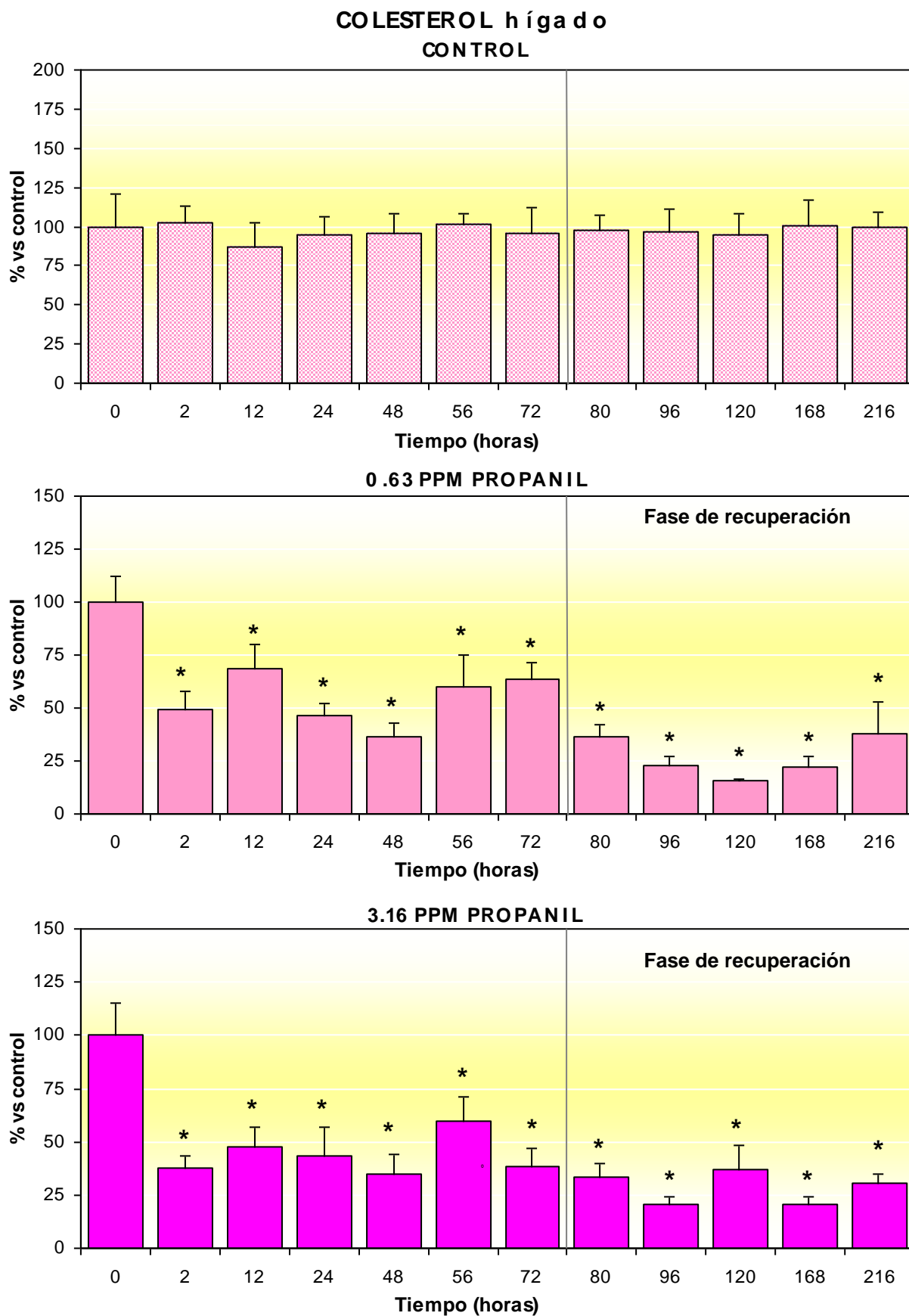
Se observó un descenso significativo del contenido proteico desde las 2 h en ambas experiencias, como evidenció el análisis de la varianza ( $p < 0.0001$ ) (anexo 8.2: tabla 2.4). Este descenso, que mostró una correlación lineal entre las concentraciones de propanil empleadas ( $r = 0.78$ , tabla 31), se mantuvo a lo largo de las fases de exposición y de recuperación ( $p < 0.05$ ), de manera que no llegaron a restaurarse en ningún momento los niveles iniciales en ninguna de las experiencias, tal y como reveló el test de Duncan (anexo 8.2: figuras 2.7 y 2.8).

Durante la exposición a 0.63 mg/L de propanil se observaron fluctuaciones en el contenido proteico a lo largo del tiempo, con el mínimo registro entre las 24-48 h (figura 21), periodo en el cual los niveles no superaron el 44% de los tomados como control. Entre las 56-72 h los niveles aumentaron hasta constituir un 72% de los niveles iniciales, aunque las diferencias respecto al valor control siguieron siendo estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Una vez en agua sin propanil no se observó recuperación de los niveles proteicos, de hecho, no se registraron valores superiores al 41% entre las 96 y las 120 h, y a las 216 h las reservas hepáticas de proteínas totales todavía constituyeron un 60% del valor control (tabla 29).

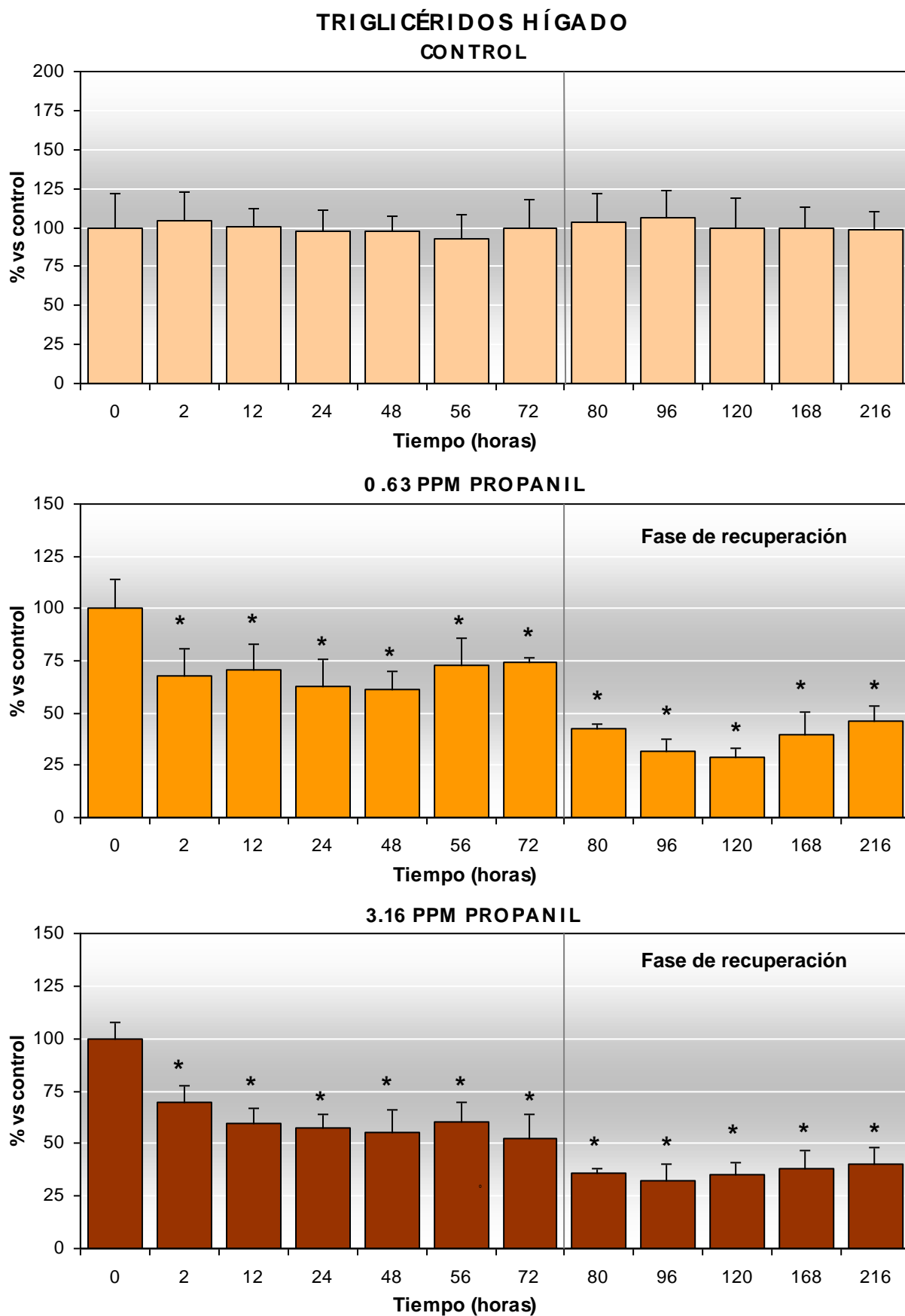
En las anguilas expuestas a 3.16 mg/L de propanil la disminución de los niveles proteicos fue más homogénea, con menores fluctuaciones a lo largo del tiempo (figura 21). Durante la fase de exposición la máxima movilización se registró a las 2 h, con unos niveles que supusieron un 38% del valor de referencia, y valores similares se registraron también a las 48 h (41%) y a las 72 h (44%), sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con los registrados a las 2 h (test de Duncan, anexo 8.2: figura 2.8). En la fase de recuperación no se observó tendencia alguna a la restauración de los valores tomados como control, de hecho, las reservas continuaron mermadas, y entre las 80-96 h sólo representaron el 33% del valor inicial. Además durante toda esta 2ª fase se observó homogeneidad, no detectándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los valores a lo largo de la misma (test de Duncan, anexo 8.2:



**Figura 21.** Niveles de proteínas totales (% vs. 0 horas) en el hígado de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 22.** Niveles de colesterol hepático (% vs. 0 horas) en la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 23.** Niveles de triglicéridos hepáticos (% vs. 0 horas) en la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

figura 2.8). Tras seis días en agua sin propanil, estas reservas constituyeron sólo el 45% respecto de las registradas al inicio de la experiencia (tabla 30) confirmando una drástica movilización.

#### **4.2.2.4.5. Colesterol**

En las tablas 29 y 30 se relacionan los niveles de colesterol hepáticos (mg/g) en anguilas procedentes de los experimentos con propanil y en la figura 22 aparecen representados como porcentaje respecto al valor inicial.

Se observó un descenso generalizado de este lípido independientemente de la concentración ensayada (figura 22), que siguió una pauta muy similar en ambos experimentos ( $r=0.87$ , tabla 31) y que fue estadísticamente significativo ( $p<0.05$ ) a todos los tiempos de medida frente a las 0 h, tal y como reveló el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.2: ANOVA ( $p<0.0001$ ), tabla 2.6; test de Duncan ( $p<0.05$ ), figuras 2.11 y 2.12). Durante la exposición a 0.63 mg/L de propanil se observaron oscilaciones durante todo el experimento. El mayor descenso se registró a las 48 h, de manera que a este tiempo los niveles sólo representaron un 35% del valor de referencia (tabla 29). Este mismo descenso, un 35%, se registró prácticamente durante toda la exposición a 3.16 mg/L (tabla 30). En la fase de recuperación, no se detectó tendencia al restablecimiento de los valores de partida en ningún caso, de manera que los valores no superaron el 40% de los iniciales en ningún tiempo de medida e independientemente de la concentración de propanil empleada. Al finalizar las experiencias (a las 216 h), se registraron unos niveles del 38% en el experimento con la concentración más baja, e incluso inferiores, del 30%, en el experimento con la más alta (figura 22).

#### **4.2.2.4.6. Triglicéridos**

Los niveles hepáticos de triglicéridos (mg/g) determinados en anguilas expuestas a propanil se muestran en las tablas 29 y 30 y se ilustran gráficamente en figura 23.

Se produjo una movilización de los triglicéridos hepáticos durante la exposición a propanil que siguió una pauta muy similar en ambas experiencias (figura 23) y que fue función lineal de la concentración de propanil empleada ( $r=0.93$ , tabla 31). Esta movilización se tradujo en un descenso significativo ( $p<0.05$ ) desde el primer tiempo de medida (2 h) que se mantuvo durante las 216 h de experimento, independientemente de la concentración de propanil empleada en el ensayo (figura 23), como corroboró el análisis estadístico de los resultados. Así, el análisis de la varianza (ANOVA), reveló la existencia de diferencias significativas ( $p<0.0001$ ) entre los niveles de triglicéridos determinados a los diferentes tiempos en cada experimento. El test de Duncan *a posteriori* reveló la existencia de diferencias significativas

( $p < 0.05$ ) entre el valor tomado como control y el resto de valores (anexo 8.2.: tabla 2.6 y figuras 2.11 y 2.12).

En la experiencia con 1/50 de la  $CL_{50-96}$  h de propanil (0.63 mg/L), se observó en los animales un descenso del 33% desde las primeras horas de contacto con el herbicida, que se mantuvo prácticamente sin variación durante toda la fase de exposición al mismo (figura 23), es decir, a lo largo de 72 h de contacto con el herbicida no se registraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores comprendidos en este periodo (entre 2-72 h) (test de Duncan, anexo 8.2.: figura 2.11). Tras esta fase, la permanencia de los peces en agua durante seis días fue insuficiente para permitir una recuperación de los valores de referencia en ningún caso, de hecho se observó incluso un mayor descenso, de manera que la máxima movilización se registró entre las 96-168 h, con un descenso medio del 66%. A las 216 h los triglicéridos hepáticos sólo representaron un 46% de los registrados a las 0 h y fueron los valores más altos registrados en esta 2ª fase (tabla 29).

Durante la exposición a 3.16 mg/L de propanil se observó una pauta muy similar, si bien los porcentajes de movilización de los triglicéridos hepáticos fueron aún mayores. Así, la movilización de este componente lipídico también fue muy homogénea durante la 1ª fase del experimento, concretamente desde las 12 h y hasta finalizar la misma, con un descenso medio del 43%, no registrándose diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores comprendidos en dicho periodo (test de Duncan, anexo 8.2.: figura 2.12). Tampoco durante este experimento se restablecieron los valores de partida una vez eliminado el propanil del agua experimental, e incluso al igual que en el caso anterior, descendieron aún más. Así, durante toda la fase de recuperación los triglicéridos sólo representaron un 36% del valor control, porcentaje de movilización que no varió durante todo el periodo, como corroboró el test de Duncan (anexo 8.2.: figura 2.12).

Cabe señalar la existencia de un alto grado de correlación lineal entre los niveles hepáticos de colesterol y triglicéridos en las anguilas expuestas (tabla 32), tal y como evidenciaron los coeficientes de correlación calculados para la relación colesterol/triglicéridos en el experimento con 0.63 mg/L ( $r = 0.96$ ) y en el experimento con 3.16 mg/L ( $r = 0.89$ ) de propanil.

#### **4.2.2.5. Hígado: Correlación Lineal entre Parámetros (1)**

En la tabla 31 se refleja la correlación lineal entre los valores obtenidos para los metabolitos estudiados en el hígado en ambas experiencias con propanil.

**Tabla 31.** Rectas de regresión ( $y= a + bx$ ) y coeficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre los valores relativos a los metabolitos estudiados en el hígado de las anguilas procedentes de ambos experimentos con propanil.

0.63 mg/L / 3.16 mg/L	$y= a + bx$	$r$
Glucosa	$y= -0.15 + 0.885 x$	0.84
Lactato	$y= -0.02 + 1.166 x$	0.84
Glucógeno	$y= -25.29 + 0.804 x$	0.85
Proteínas totales	$y= 39.9 + 0.734 x$	0.78
Colesterol	$y= 0.73 + 0.722 x$	0.87
Triglicéridos	$y= 1.15 + 0.948 x$	0.93

En general, la correlación lineal entre los resultados de ambos experimentos con propanil resultó bastante elevada, con lo que cabría esperar que el efecto producido sobre cualquiera de los metabolitos estudiados al exponer a los animales a la concentración más alta se podría llegar a predecir a partir de los datos obtenidos para la concentración más baja. En el caso de los metabolitos relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, glucosa, lactato y glucógeno, se observó una correlación lineal entre los resultados obtenidos en ambas experiencias elevada, con unos coeficientes de correlación de Pearson muy similares, de 0.84 tanto para la glucosa como para el lactato y ligeramente superior, de 0.85, para el glucógeno. También el efecto producido por el propanil sobre los niveles de lípidos hepáticos siguió una pauta muy similar con las dos concentraciones estudiadas, como así lo demuestra el coeficiente de correlación lineal obtenido para los niveles de triglicéridos ( $r= 0.93$ ) y de colesterol ( $r= 0.87$ ). En el caso de las proteínas totales el coeficiente de correlación lineal fue de 0.78.

**Tabla 32.** Rectas de regresión ( $y= a + bx$ ) y coeficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre los valores de colesterol y triglicéridos en el hígado para cada concentración de propanil estudiada.

Colesterol / Triglicéridos	$y= a + bx$	$r$
0.63 mg/L	$y= 6.54 + 2.127 x$	0.96
3.16 mg/L	$y= 7.26 + 2.417 x$	0.89



En la tabla 32 se muestran los datos correspondientes a la correlación lineal entre los niveles de colesterol y triglicéridos determinados en cada uno de los experimentos con el herbicida.

Como ya se ha comentado, existe un alto grado de correlación lineal entre los valores correspondientes al componente lipídico determinados en el hígado tanto en el experimento con 0.63 mg/L de propanil, como pone de manifiesto el alto coeficiente de correlación lineal obtenido ( $r= 0.96$ ), como en el experimento con 3.16 mg/L ( $r= 0.86$ ).

#### **4.2.2.6. Hígado: Enzimas**

##### **4.2.2.6.1. Actividad Alanina Aminotransferasa (ALT)**

En las tablas 33 y 34 se detalla la actividad enzimática ALT expresada como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  en el hígado de las anguilas expuestas a los diferentes tratamientos y en la figura 24 se representan estos resultados como porcentaje respecto al valor determinado a las 0 h.

La exposición a propanil provocó un aumento de la actividad ALT, que se ajusta a una correlación lineal entre las concentraciones de herbicida empleadas ( $r=0.82$ , tabla 36). En las anguilas expuestas a 0.63 mg/L de propanil, este aumento fue estadísticamente significativo ( $p<0.05$ ) a partir de las 56 h de exposición (figura 24), registrándose precisamente a este tiempo la máxima actividad ALT, un 75% sobre el valor control. El incremento de la actividad se mantuvo, aunque en menor medida, hasta finalizar la fase exposición y se prolongó hasta 4 días después de la transferencia de los animales a agua exenta de herbicida, con un aumento medio entre las 72-168 h del 33%, sin diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre los valores registrados durante este intervalo (test de Duncan, anexo 8.2: figura 2.13).

El análisis estadístico de los resultados evidenció la existencia de diferencias significativas ( $p<0.05$ ) en la experiencia con 0.63 mg/L entre los valores de la actividad ALT a las 0 h y los determinados a las 56 y 72 horas de la fase de exposición y de las 80-168 h ya en la fase de recuperación (anexo 8.2: tabla 2.7, figura 2.13).

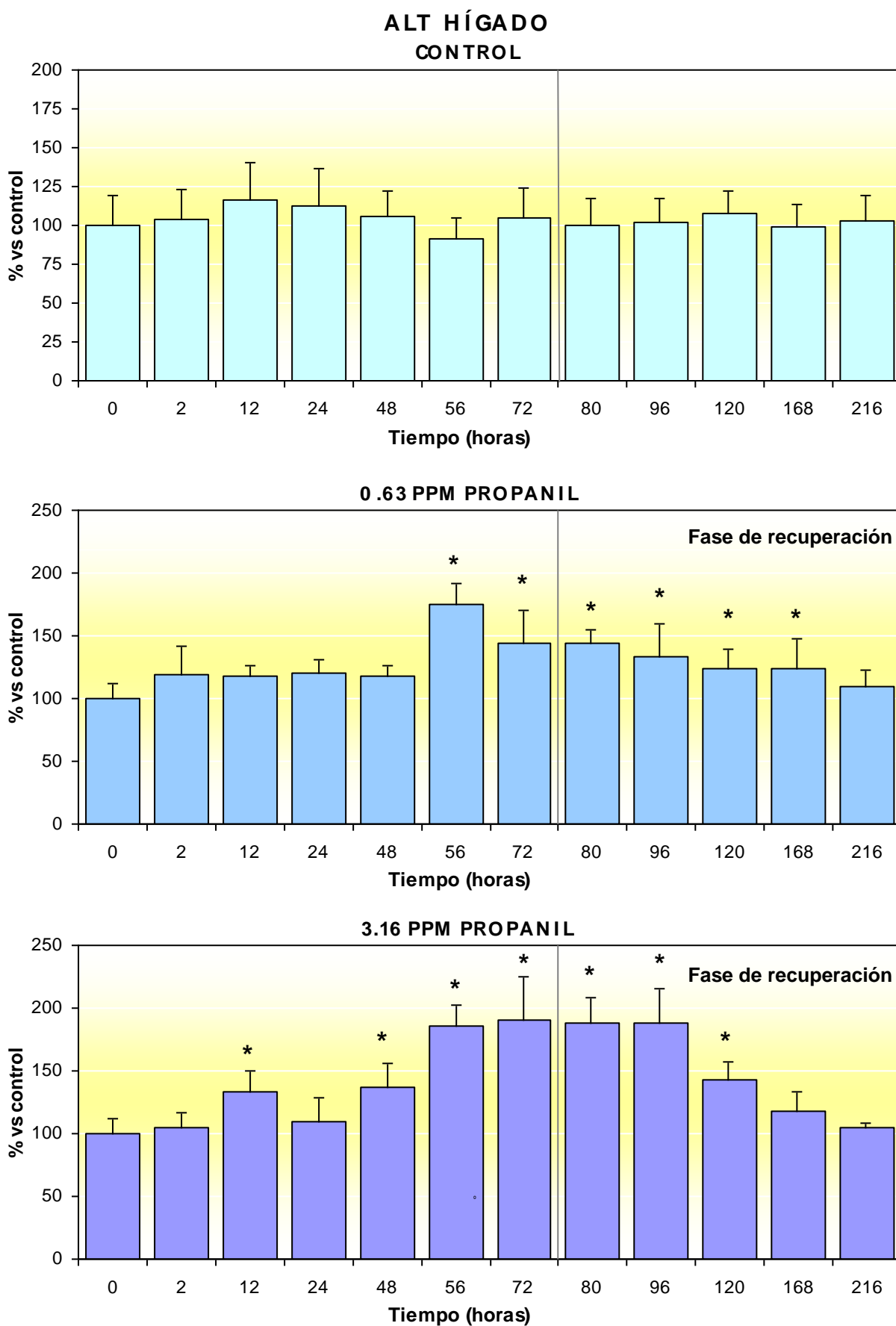
Por su parte, en los animales expuestos a 3.16 mg/L de propanil el aumento de esta actividad fue significativo ( $p<0.05$ ) ya desde las 12 h de exposición (figura 24). Al igual que en el experimento anterior, la máxima actividad se registró a las 56 h de contacto con el herbicida, si bien en este caso, este grado de alteración se mantuvo prácticamente constante (test de Duncan, anexo 8.2: figura 2.14) durante las siguientes 40 h (hasta las 96 h ya en agua exenta de propanil), con un aumento medio del 88% sobre las 0 h. A partir de aquí se observó una recuperación paulatina de la actividad, y ya no se registraron diferencias significativas ( $p<0.05$ ) respecto al valor inicial en los dos últimos tiempos de muestreo (tabla 34).

**Tabla 33.** Valores medios  $\pm$  D.E. de las actividades enzimáticas ALT ( $\mu$ mol/min/g), ALP ( $\mu$ mol/min/g),  $\gamma$ -GT ( $\mu$ mol/min/g) y LDH ( $\mu$ mol/min/g), del contenido calórico (CC), del índice hepatosomático (HSI) y del contenido hídrico (CH) en el hígado de la anguilla *A. anguilla* a lo largo de la exposición a **0.63 mg/L** de propamyl y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\rightarrow$ ) $p<0.05$ .

<b>HÍGADO</b>							
<b>Fase de Exposición (Horas)</b>							
	0	2	12	24	48	56	72
ALT	6.13 $\pm$ 0.70	7.31 $\pm$ 1.41	7.20 $\pm$ 0.51	7.37 $\pm$ 0.65	7.23 $\pm$ 0.54	10.74 $\pm$ 1.03*	8.82 $\pm$ 1.58*
ALP	0.87 $\pm$ 0.17	1.22 $\pm$ 0.26*	0.94 $\pm$ 0.23	1.34 $\pm$ 0.33*	1.55 $\pm$ 0.25*	2.13 $\pm$ 0.47*	1.95 $\pm$ 0.41*
$\gamma$ -GT	1.54 $\pm$ 0.09	1.08 $\pm$ 0.22*	0.98 $\pm$ 0.24*	1.16 $\pm$ 0.26*	1.06 $\pm$ 0.19*	1.29 $\pm$ 0.26*	1.17 $\pm$ 0.17*
LDH	15.83 $\pm$ 3.13	14.53 $\pm$ 1.75	16.71 $\pm$ 4.08	19.14 $\pm$ 3.00	15.32 $\pm$ 1.57	17.62 $\pm$ 3.71	16.98 $\pm$ 3.75
CC	3785.62 $\pm$ 324.41	2265.47 $\pm$ 393.52*	2752.31 $\pm$ 303.17*	1352.99 $\pm$ 390.48*	1152.65 $\pm$ 278.72*	1754.12 $\pm$ 403.46*	1827.54 $\pm$ 371.10*
HSI	13.03 $\pm$ 1.47	16.66 $\pm$ 1.38*	16.46 $\pm$ 2.18*	16.53 $\pm$ 2.19*	16.70 $\pm$ 1.37*	15.01 $\pm$ 1.01	13.22 $\pm$ 1.69
CH	0.28 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.16*	0.46 $\pm$ 0.04*	0.37 $\pm$ 0.09	0.46 $\pm$ 0.11*	0.31 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.08*
<b>Fase de Recuperación (Horas)</b>							
	80	96	120	168	216		
ALT	8.86 $\pm$ 0.66*	8.16 $\pm$ 1.65*	7.57 $\pm$ 0.98*	7.62 $\pm$ 1.41*	6.72 $\pm$ 0.79		
ALP	2.41 $\pm$ 0.21*	1.65 $\pm$ 0.18*	1.51 $\pm$ 0.17*	1.74 $\pm$ 0.19*	2.26 $\pm$ 0.25*		
$\gamma$ -GT	1.17 $\pm$ 0.18*	1.15 $\pm$ 0.13*	1.36 $\pm$ 0.16	1.10 $\pm$ 0.11*	1.18 $\pm$ 0.16*		
LDH	19.87 $\pm$ 1.57*	24.26 $\pm$ 3.25*	25.50 $\pm$ 3.50*	26.08 $\pm$ 2.55*	24.45 $\pm$ 1.71*		
CC	1435.18 $\pm$ 155.52*	1236.45 $\pm$ 197.06*	1192.74 $\pm$ 216.45*	1520.18 $\pm$ 184.88*	1880.38 $\pm$ 409.57*		
HSI	15.27 $\pm$ 1.93*	14.32 $\pm$ 1.41	14.51 $\pm$ 1.57	14.78 $\pm$ 0.95	14.25 $\pm$ 1.21		
CH	0.36 $\pm$ 0.09	0.28 $\pm$ 0.03	0.30 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.06*	0.32 $\pm$ 0.04		

**Tabla 34.** Valores medios  $\pm$  D.E. de las actividades enzimáticas ALT ( $\mu$ mol/min/g), ALP ( $\mu$ mol/min/g),  $\gamma$ -GT ( $\mu$ mol/min/g) y LDH ( $\mu$ mol/min/g), del contenido calórico (CC), del índice hepatosomático (HSI) y del contenido hídrico (CH) en el hígado de la anguilla *A. anguilla* a lo largo de la exposición a 3.16 mg/L de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\rightarrow$ ) $p < 0.05$ .

<b>HÍGADO</b>									
<b>Fase de Exposición (Horas)</b>									
	0	2	12	24	48	56	72		
ALT	6.13 $\pm$ 0.71	6.41 $\pm$ 0.78	8.18 $\pm$ 1.05*	6.71 $\pm$ 1.21	8.42 $\pm$ 1.18*	11.40 $\pm$ 1.03*	11.67 $\pm$ 2.14*		
ALP	0.81 $\pm$ 0.24	1.61 $\pm$ 0.29*	1.63 $\pm$ 0.24*	2.03 $\pm$ 0.41*	2.65 $\pm$ 0.15*	1.92 $\pm$ 0.26*	1.92 $\pm$ 0.10*		
$\gamma$ -GT	1.62 $\pm$ 0.22	0.81 $\pm$ 0.14*	1.25 $\pm$ 0.13*	1.08 $\pm$ 0.23*	0.83 $\pm$ 0.13*	0.80 $\pm$ 0.03*	0.90 $\pm$ 0.13*		
LDH	13.57 $\pm$ 0.81	13.56 $\pm$ 1.80	17.85 $\pm$ 3.52*	16.32 $\pm$ 1.98	14.63 $\pm$ 1.24	24.72 $\pm$ 2.94*	24.66 $\pm$ 3.58*		
CC	3940.50 $\pm$ 347.22	2025.23 $\pm$ 393.40*	1600.35 $\pm$ 401.60*	1544.24 $\pm$ 226.16*	1121.57 $\pm$ 284.17*	1505.32 $\pm$ 187.83*	1301.93 $\pm$ 335.86*		
HSI	13.01 $\pm$ 1.62	18.50 $\pm$ 1.12*	17.50 $\pm$ 1.05*	17.13 $\pm$ 0.53*	16.12 $\pm$ 0.98*	16.27 $\pm$ 1.61*	16.89 $\pm$ 1.71*		
CH	0.29 $\pm$ 0.04	0.57 $\pm$ 0.16*	0.51 $\pm$ 0.12*	0.58 $\pm$ 0.09*	0.47 $\pm$ 0.07*	0.46 $\pm$ 0.06*	0.42 $\pm$ 0.17*		
<b>Fase de Recuperación (Horas)</b>									
	80	96	120	168	216				
ALT	11.51 $\pm$ 1.27*	11.55 $\pm$ 1.68*	8.80 $\pm$ 0.84*	7.26 $\pm$ 0.92	6.43 $\pm$ 0.23				
ALP	2.10 $\pm$ 0.37*	2.16 $\pm$ 0.36*	2.37 $\pm$ 0.36*	1.94 $\pm$ 0.20*	2.31 $\pm$ 0.33*				
$\gamma$ -GT	1.13 $\pm$ 0.08*	1.22 $\pm$ 0.13*	1.49 $\pm$ 0.26	1.33 $\pm$ 0.19*	1.37 $\pm$ 0.19*				
LDH	24.27 $\pm$ 2.82*	28.94 $\pm$ 3.60*	26.44 $\pm$ 2.11*	21.87 $\pm$ 1.95*	26.49 $\pm$ 1.35*				
CC	909.09 $\pm$ 49.39*	941.29 $\pm$ 127.46*	1128.09 $\pm$ 152.13*	1070.36 $\pm$ 141.80*	1327.35 $\pm$ 352.00*				
HSI	17.85 $\pm$ 1.37*	16.25 $\pm$ 0.84*	17.56 $\pm$ 1.55*	17.01 $\pm$ 2.43*	15.88 $\pm$ 1.82*				
CH	0.44 $\pm$ 0.07*	0.43 $\pm$ 0.10*	0.43 $\pm$ 0.09*	0.41 $\pm$ 0.07*	0.36 $\pm$ 0.07				



**Figura 24.** Actividad enzimática ALT (% vs. 0 horas) en el hígado de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

Las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para los valores de la actividad ALT a las 0 h y el resto de los tiempos salvo las 2 y 24 h de la fase de exposición y las 168 y 216 h de la fase de recuperación (anexo 8.2: tabla 2.7, figura 2.14).

#### **4.2.2.6.2. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP)**

Los resultados correspondientes a la actividad enzimática ALP ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) en el hígado de anguilas expuestas a 0.63 y 3.16 mg/L de propanil respectivamente muestran que esta actividad enzimática se alteró durante la exposición de las anguilas a propanil (tabla 33 y 34, figura 25).

El contacto de los animales con 0.63 mg/L de propanil provocó un aumento paulatino de la actividad ALP desde las 2 h (40% de incremento) hasta las 56 h (140% de incremento) que se mantuvo a lo largo de las fases de exposición y de recuperación. No se llegaron a restaurar los niveles control tras seis días en agua exenta de propanil (158% de incremento al finalizar el experimento). La máxima actividad se registró a las 80 h (175%), tal y como se refleja en la figura 25.

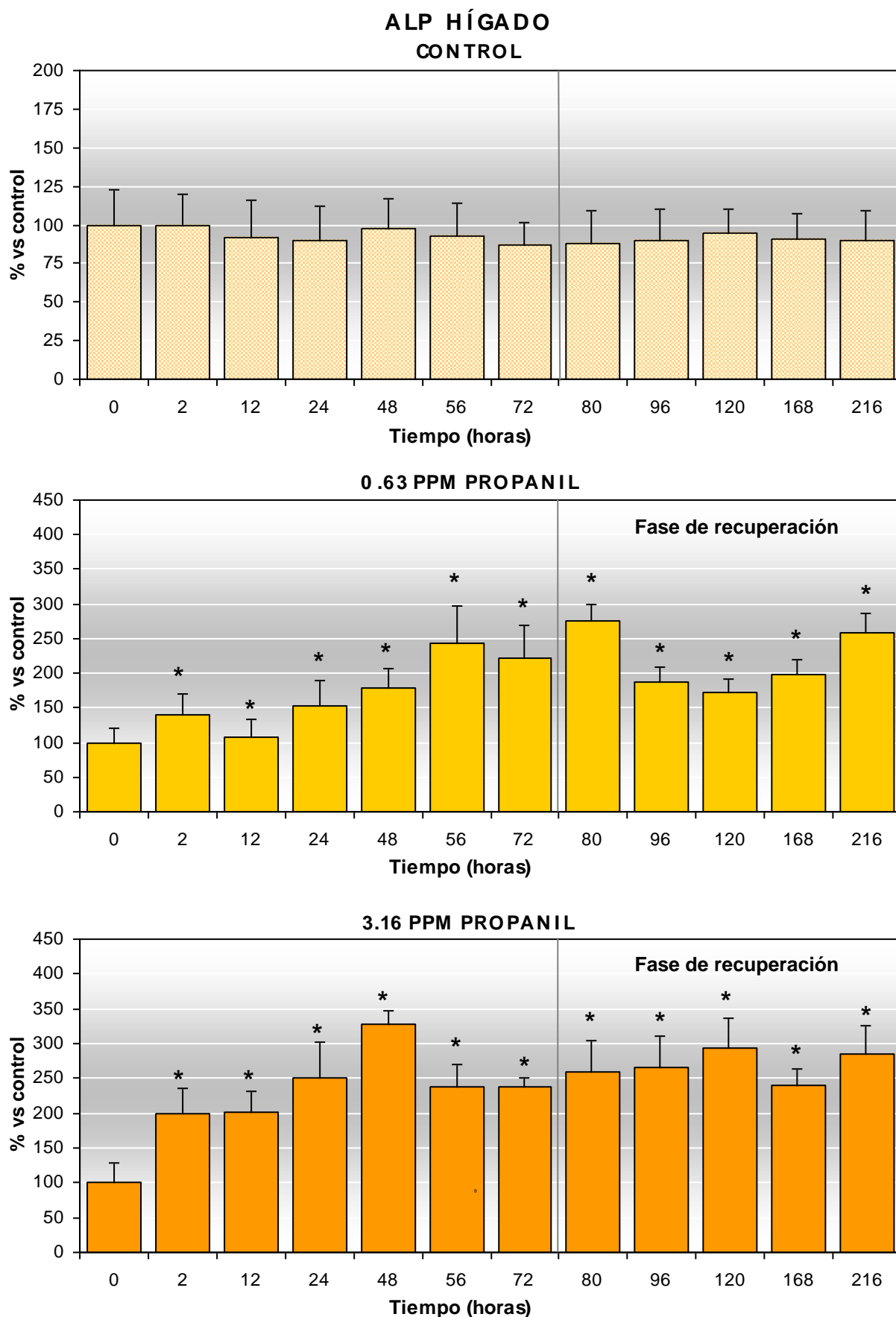
La alteración de este enzima fue más acentuada en el experimento con la concentración más alta, con mayores porcentajes de incremento (figura 25). La exposición a 3.16 mg/L provocó un aumento de la actividad ALP desde las 2 h (99% de incremento) que se incrementó aún más hasta las 48 h, donde se registró la máxima actividad (225% de aumento). La ALP hepática se mantuvo elevada a lo largo de todo el experimento sin mostrar tendencia alguna a la recuperación de los valores iniciales incluso una vez transferidos los animales a un medio sin herbicida, con un aumento medio de la actividad superior al 140% durante toda la fase de recuperación e incluso del 185% al finalizar el experimento (216 h).

El análisis de la varianza indicó la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre los valores de actividad ALP determinada a los diferentes tiempos en ambos experimentos con propanil, que las posteriores pruebas de Duncan revelaron ( $p < 0.05$ ) entre los valores de actividad a las 0 h y a los demás tiempos de medida (anexo 8.2: tabla 2.8 y figuras 2.15 y 2.16).

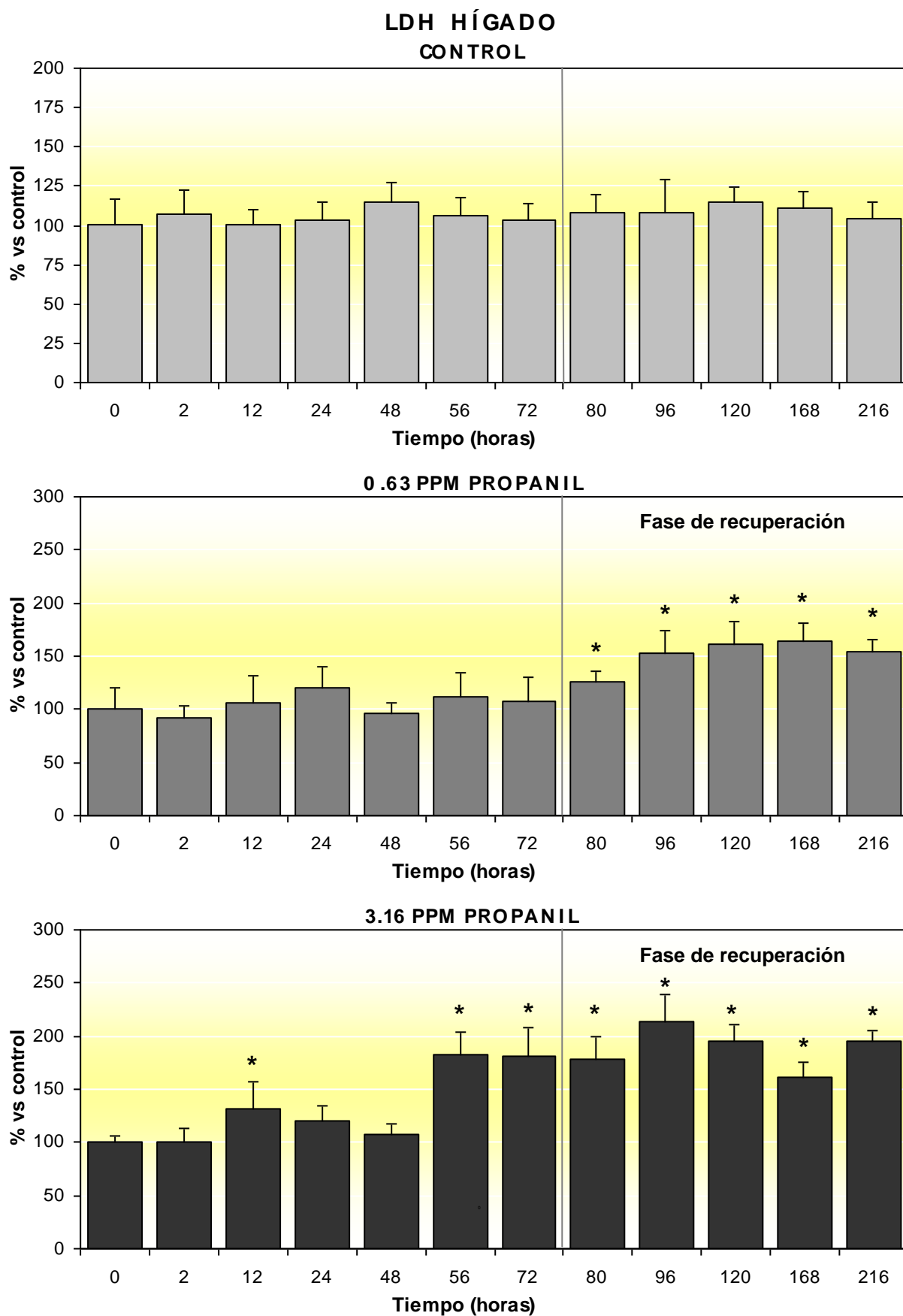
#### **4.2.2.6.3. Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH)**

Los resultados relativos a la actividad LDH hepática, medida como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ , aparecen reflejados en las tablas 33 y 34 y su evolución a lo largo de las 216 h se refleja en la figura 26.

La actividad enzimática LDH hepática sufrió alteración a partir de las 72 h de exposición en las anguilas expuestas a 0.63 mg/L de propanil. Así, si bien se observan fluctuaciones entre los valores determinados a los diferentes tiempos de medida durante la fase de exposición, el análisis estadístico no consideró que estas diferencias fueran estadísticamente significativas



**Figura 25.** Actividad enzimática ALP (% vs. 0 horas) en el hígado de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 26.** Actividad enzimática LDH (% vs. 0 horas) en el hígado de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

respecto al control ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, una vez en la 2ª fase del experimento se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de esta actividad, con un incremento del 26% en el primer tiempo de esta fase (80 h), y un aumento hasta del 53% en el siguiente tiempo de medida (16 h más tarde) que se mantuvo así hasta finalizar el experimento, con un incremento medio del 58% entre las 96 y 216 h (anexo 8.2: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 2.10; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 2.19).

En los animales expuestos a la concentración más alta de propanil (3.16 mg/L), el comportamiento de esta actividad siguió las mismas pautas. Así, si bien la actividad LDH hepática mostró oscilaciones durante las primeras 48 h, ésta aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) a partir de 56 h de exposición, con un 80% de incremento sobre el valor control (figura 26). Este porcentaje de incremento se prolongó hasta finalizar la fase de exposición y durante las primeras 8 h de la fase de recuperación (test de Duncan, anexo 8.2: figura 2.20). El aumento en la LDH hepática se prolongó durante toda la fase de recuperación (figura 26), incluso la máxima actividad medida en el experimento se registró tras 24 h en estas condiciones (a las 96 h) con un incremento del 113%, y todavía del 93% al finalizar el mismo (anexo 8.2: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 2.10; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 2.20).

#### **4.2.2.6.4. Actividad $\gamma$ -Glutamyl Transferasa ( $\gamma$ -GT)**

En las tablas 33 y 34 aparecen indicados los resultados de la actividad  $\gamma$ -GT ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) y representados gráficamente en forma de porcentajes en la figura 27.

Esta actividad se redujo significativamente ( $p < 0.05$ ) desde las primeras horas de contacto de los animales con el producto (figura 27) manteniéndose significativamente inhibida ( $p < 0.05$ ) durante todo el experimento, tanto con 0.63 mg/L como con 3.16 mg/L de propanil (anexo 8.2: tabla 2.9 y figuras 2.17 y 2.18).

La exposición de los animales a la concentración más baja de herbicida empleada provocó un descenso de esta actividad enzimática de un 30% ya a las 2 h del inicio del experimento. Esta reducción de la actividad  $\gamma$ -GT hepática se mantuvo relativamente homogénea durante toda la fase de exposición a propanil e incluso una vez se ubicaron los animales en agua carente de herbicida (a excepción de las 120 h), puesto que no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los diferentes valores, salvo entre los valores a las 12 y a las 56 h, como señaló el test de Duncan (anexo 8.2: figura 2.19). La mínima actividad enzimática se registró a las 12 h, con sólo un 64% de la actividad inicial (tabla 33).

En el experimento con 3.16 mg/L de propanil, se registró una disminución de la  $\gamma$ -GT hepática también desde las 2 h de exposición, si bien en este caso el porcentaje de inhibición alcanzó el 50%. Tras fluctuaciones en esta actividad (25% de reducción a las 12 h), ésta volvió a descender hasta el 50% a las 48 h y se mantuvo así hasta finalizar la fase de exposición (72 h). Durante la fase de recuperación, se observó una tendencia progresiva al



aumento y recuperación de los valores iniciales, si bien tras 144 h en agua limpia (216 h de experimento) la actividad  $\gamma$ -GT mostró todavía una reducción superior al 15% respecto de la actividad inicial (tabla 34).

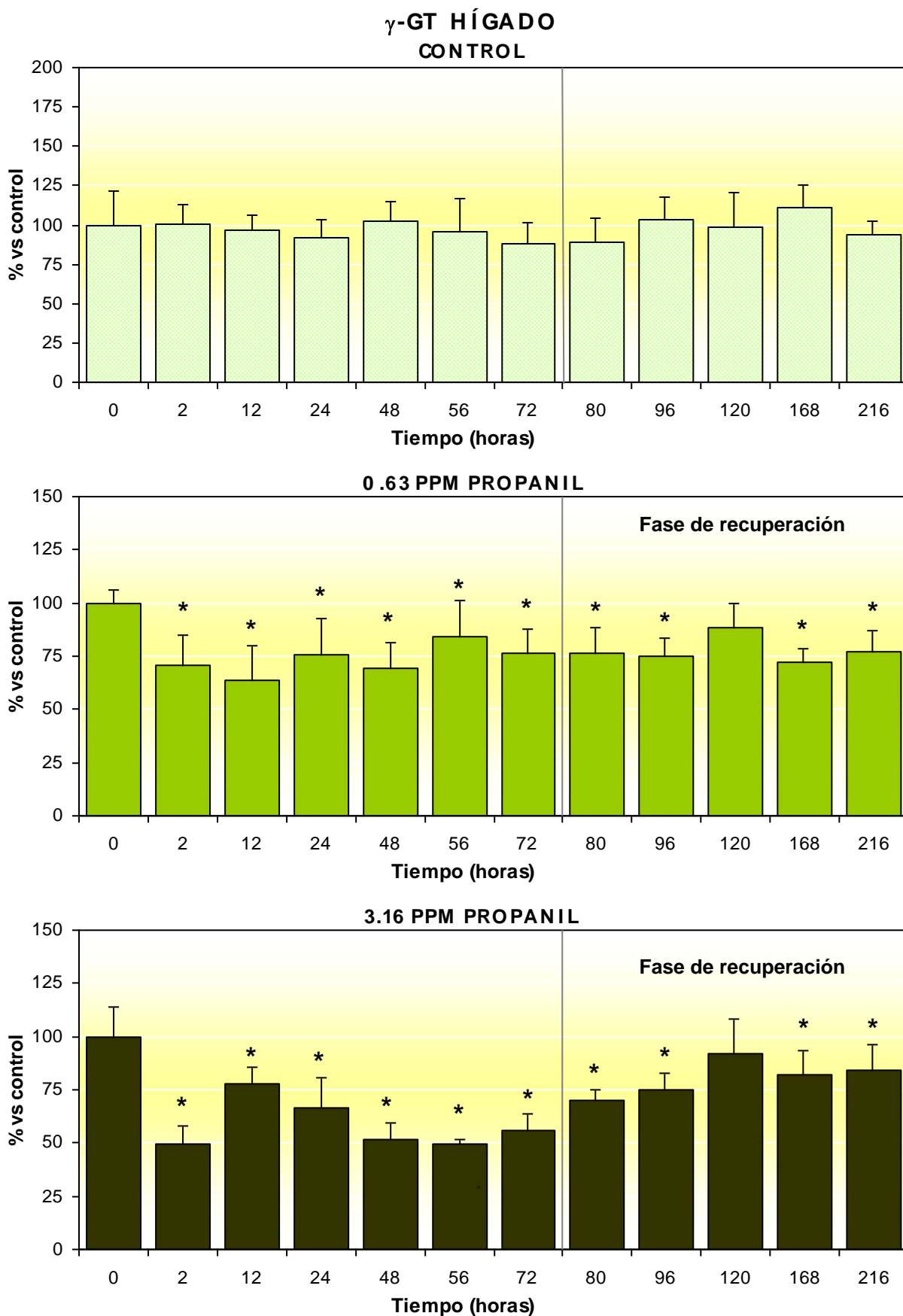
El análisis estadístico de los resultados mostró la existencia de diferencias significativas entre los valores a las 0 horas y el resto de los tiempos salvo a las 120 horas en ambos experimentos (anexo 8.2: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 2.9; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figuras 2.19 y 2.20).

#### **4.2.2.7. Hígado: Contenido Calórico**

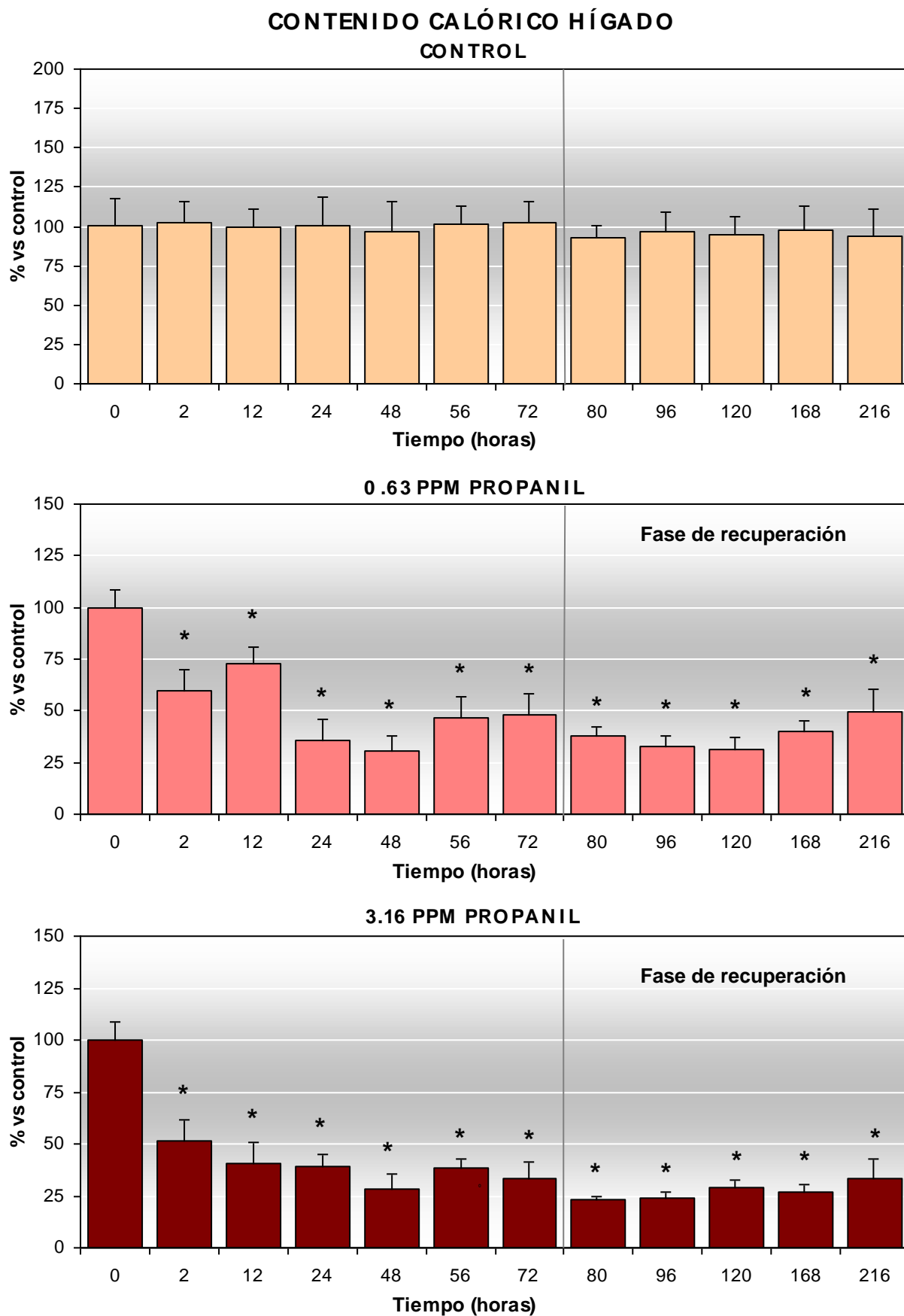
La exposición de la anguila a un medio contaminado con propanil provocó una movilización de las reservas calóricas, valoradas como descenso del contenido calórico en el hígado de los animales expuestos (tablas 33 y 34). Este descenso se ajustó a una correlación lineal entre las concentraciones de propanil empleadas ( $r = 0.90$ , tabla 35). La movilización de las reservas hepáticas de proteínas, glucógeno y lípidos se tradujo en un efectivo descenso de la energía fisiológicamente disponible, medida como cal/g, estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) desde primeras horas de exposición y que se prolongó durante los 9 días que duraron ambas experiencias, independientemente de la concentración utilizada (figura 28).

En el experimento con la concentración más baja de propanil (0.63 mg/L) el contenido calórico hepático a las 2 h fue de 2266 cal/g, un 60% del valor a las 0 h (3786 cal/g) tal y como se observa en la tabla 33. Posteriormente se produjo una drástica movilización de las reservas hepáticas, de modo que se determinó un descenso del contenido calórico de hasta el 70% a las 48 h, máximo descenso observado durante la exposición (figura 28). Al finalizar ésta, el contenido calórico en el hígado de las anguilas sólo representó un 48% del valor a las 0 h. Una vez eliminado el agente estresante del medio no se observó recuperación de los niveles, no obteniéndose valores superiores al 50% a ningún tiempo de medida durante la 2ª fase del experimento (anexo 8.2: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 2.11; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 2.21).

Como cabría esperar (tabla 34 y figura 28), la disminución del contenido calórico fue más acusada en las anguilas expuestas a 3.16 mg/L: a las 2 h los niveles ya sólo supusieron un 50% del nivel a las 0 h, con un descenso máximo (72%) también a las 48 h, registrándose sólo un 33% de las reservas iniciales al finalizar la fase de exposición (72 h). Una vez en agua exenta de herbicida, el contenido calórico no fue superior al 28% vs. 0 h entre las 80 y las 168 h, y al final de la experiencia sólo representó un 34% del valor inicial (anexo 8.2: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 2.11; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 2.22).



**Figura 27.** Actividad enzimática  $\gamma$ -GT (% vs. 0 horas) en el hígado de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 28.** Contenido calórico (% vs. 0 horas) en el hígado de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

En la tabla 35 se comparan los porcentajes de reducción de glucógeno, proteínas totales y lípidos (colesterol y triglicéridos) en el hígado al finalizar las fases de exposición (72 h) y recuperación (216 h) en las dos experiencias con propanil. Además se detallan los porcentajes del contenido calórico que representan glucógeno, proteínas y lípidos tanto al inicio (0 h) como al final de cada una de las fases en que se dividieron los experimentos.

**Tabla 35.** Porcentajes de reducción de las reservas energéticas en el hígado de *Anguilla anguilla* a las 0, 72 y 216 horas de cada experiencia con propanil, y porcentajes en los que se distribuyó el contenido calórico entre los diferentes parámetros energéticos a estos mismos tiempos.

1/50 CL <sub>50</sub> -96 h: 0.63 mg/L propanil						
	Glucógeno	Proteínas	Lípidos	Glucógeno	Proteínas	Lípidos
0 h	0	0	0	36	52	12
72 h	97	25	29	2	80	18
216 h	62	41	60	28	62	10
1/10 CL <sub>50</sub> -96 h: 3.16 mg/L propanil						
	Glucógeno	Proteínas	Lípidos	Glucógeno	Proteínas	Lípidos
0h	0	0	0	35	53	12
72 h	89	56	51	11	71	18
216 h	86	54	62	15	72	13

En la experiencia con 0.63 mg/L de propanil se observó que al finalizar la fase de exposición, la mayor reducción la sufrió el glucógeno hepático (97% de reducción), acompañado de una movilización menos significativa tanto de proteínas como de lípidos hepáticos, con unos porcentajes de reducción bastante similares, del 25% y del 29% respectivamente, lo que en conjunto se tradujo en una disminución del 52% del contenido calórico registrado en el hígado al finalizar la fase de exposición (72 h). Una vez finalizada la 2ª fase del experimento (216 h) se advierte una recuperación parcial de las reservas de glucógeno, llegando a representar el 38% del valor a las 0 h. Se observó, sin embargo, una disminución de las reservas tanto proteicas como lipídicas en este órgano, lo cual explica la nula recuperación del contenido calórico al finalizar la fase de recuperación (50% del valor a las 0 h).

En las anguilas expuestas a 3.16 mg/L de propanil, al igual que en el caso anterior, se observó que la reserva más utilizada a las 72 h fue el glucógeno hepático, que a este tiempo de medida se movilizó hasta el 89% de su contenido inicial. Se observó además que las anguilas expuestas a 3.16 mg/L hacen un mayor uso de las reservas tanto proteicas como lipídicas, como reflejan los mayores porcentajes de reducción obtenidos a este tiempo, del 56 y 51%, respectivamente. Todo ello avala la mayor reducción del contenido calórico observada tras 72 h de permanencia de los animales en un medio con 3.16 mg/L de herbicida, donde sólo supuso el 33% del valor inicial. Después de 6 días en un medio exento de propanil, los animales no mostraron recuperación de los niveles de glucógeno, proteínas totales o lípidos, como se deduce a partir de los datos obtenidos al finalizar la fase de recuperación lo cual confirmaría un contenido calórico en el hígado que sólo representó un 34% del inicial al finalizar esta experiencia.

El contenido calórico a las 0 h se distribuyó en un 52-53% de proteínas totales, un 35-36% de glucógeno y un 12% de lípidos. Después de 72 h de exposición a 0.63 mg/L de propanil, el glucógeno representó sólo un 2% del contenido calórico total, un 80% lo representaron las proteínas totales y el 18% los lípidos. Al finalizar el experimento, después de un periodo de recuperación de 144 h, se observó un reajuste en las proporciones de los tres parámetros, de modo que del contenido calórico medido, un 28% correspondió al glucógeno, un 62% a las proteínas totales y un 10% a los lípidos.

En la experiencia con 3.16 mg/L de propanil el glucógeno hepático representó un 35% del contenido calórico inicial y disminuyó hasta sólo un 11% después de 72 h de contacto con el herbicida, mientras que las proteínas totales y los lípidos supusieron un 71 y un 18% del contenido calórico hepático tras el periodo de exposición respectivamente (53% y 12% al inicio del experimento respectivamente). Una vez finalizada la fase de recuperación, la distribución del contenido calórico no varió de manera importante respecto a la observada al finalizar la fase de exposición. Así, el contenido calórico a este tiempo se repartió entre un 15% de glucógeno, un 72% de proteínas totales y un 13% de lípidos.

#### **4.2.2.8. Índice Hepatosomático (HSI)**

El contacto de las anguilas con agua contaminada con propanil supuso un aumento del valor del índice hepatosomático (HSI) en los animales ya desde las primeras horas de medida (2 h), si bien este aumento fue razonablemente mayor en los animales expuestos a la concentración más elevada (figura 29). En la experiencia con 0.63 mg/L de propanil las diferencias entre los distintos valores de HSI calculados fueron significativas ( $p < 0.05$ ) con el control entre las 2 y las 48 h de exposición, tal y como muestra el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.2: ANOVA ( $p < 0.001$ ), tabla 2.12; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 2.23). A partir de las 56 h y hasta finalizar el experimento no se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) frente al valor inicial. Tampoco se registraron diferencias estadísticamente

significativas ( $p>0.05$ ) entre los valores de HSI determinados entre las 2 y 48 h de exposición (test de Duncan anexo 8.2: figura 2.23), con un aumento medio durante este intervalo del 27% (tabla 33).

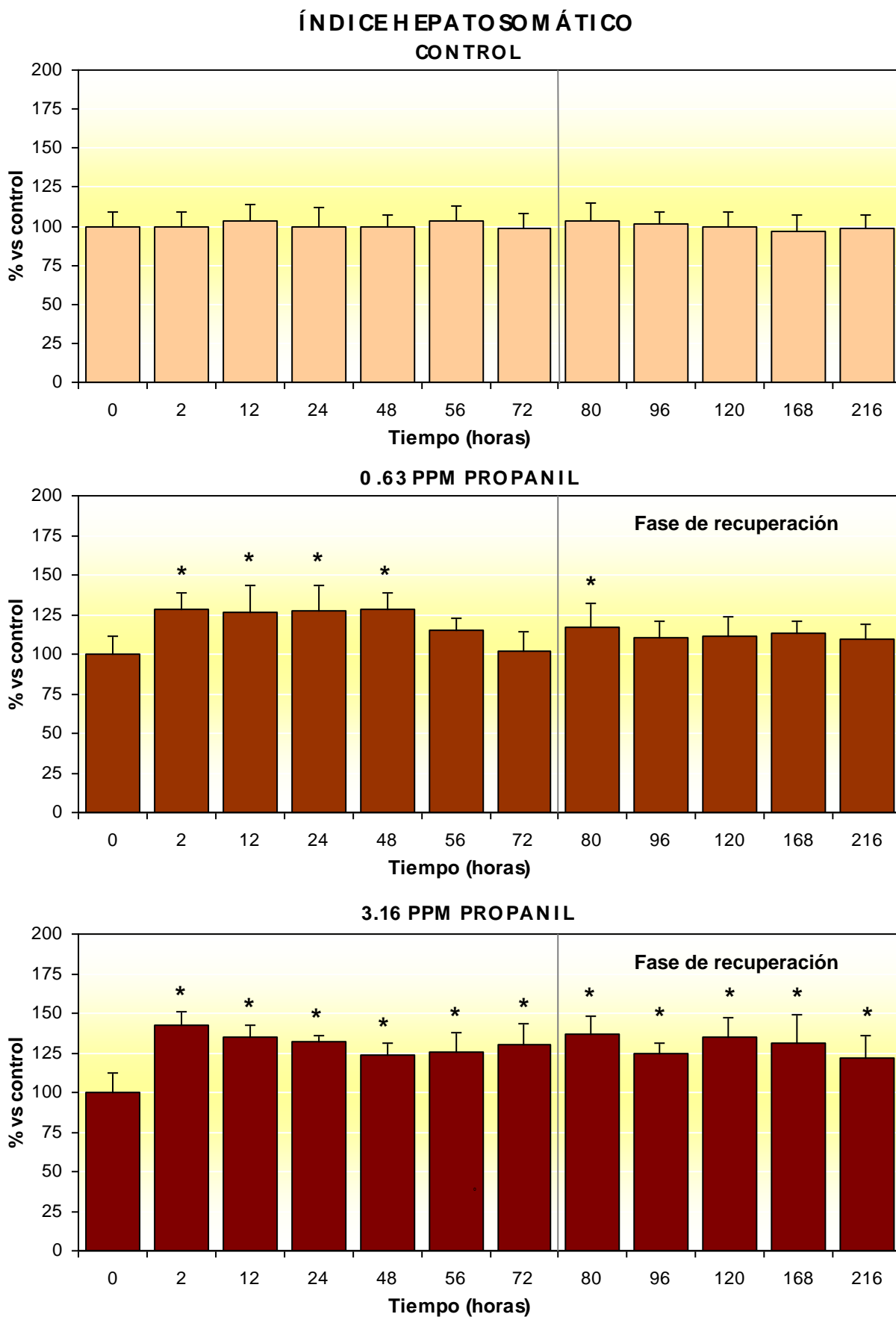
En las anguilas expuestas a 3.16 mg/L el aumento determinado en el HSI fue estadísticamente significativo a lo largo de toda la experiencia (anexo 8.2: ANOVA ( $p<0.0001$ ), tabla 2.12; test de Duncan ( $p<0.05$ ), figura 2.24). El máximo valor se calculó a las 2 h de contacto con el herbicida (42% sobre el valor inicial). A partir de este momento, el aumento del tamaño hepático se mantendrá uniforme a lo largo de toda la experiencia, de modo que las diferencias entre los valores calculados no fueron estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) (test de Duncan, anexo 8.2: figura 2.24) ni en la fase de exposición (a excepción del 1<sup>er</sup> tiempo de medida), con un incremento medio del 29%, ni durante toda la fase de recuperación, donde el incremento medio del HSI fue del 30%. Al finalizar la experiencia (216 h) el HSI continuó incrementado en un 22% (tabla 34).

#### **4.2.2.9. Hígado: Contenido Hídrico**

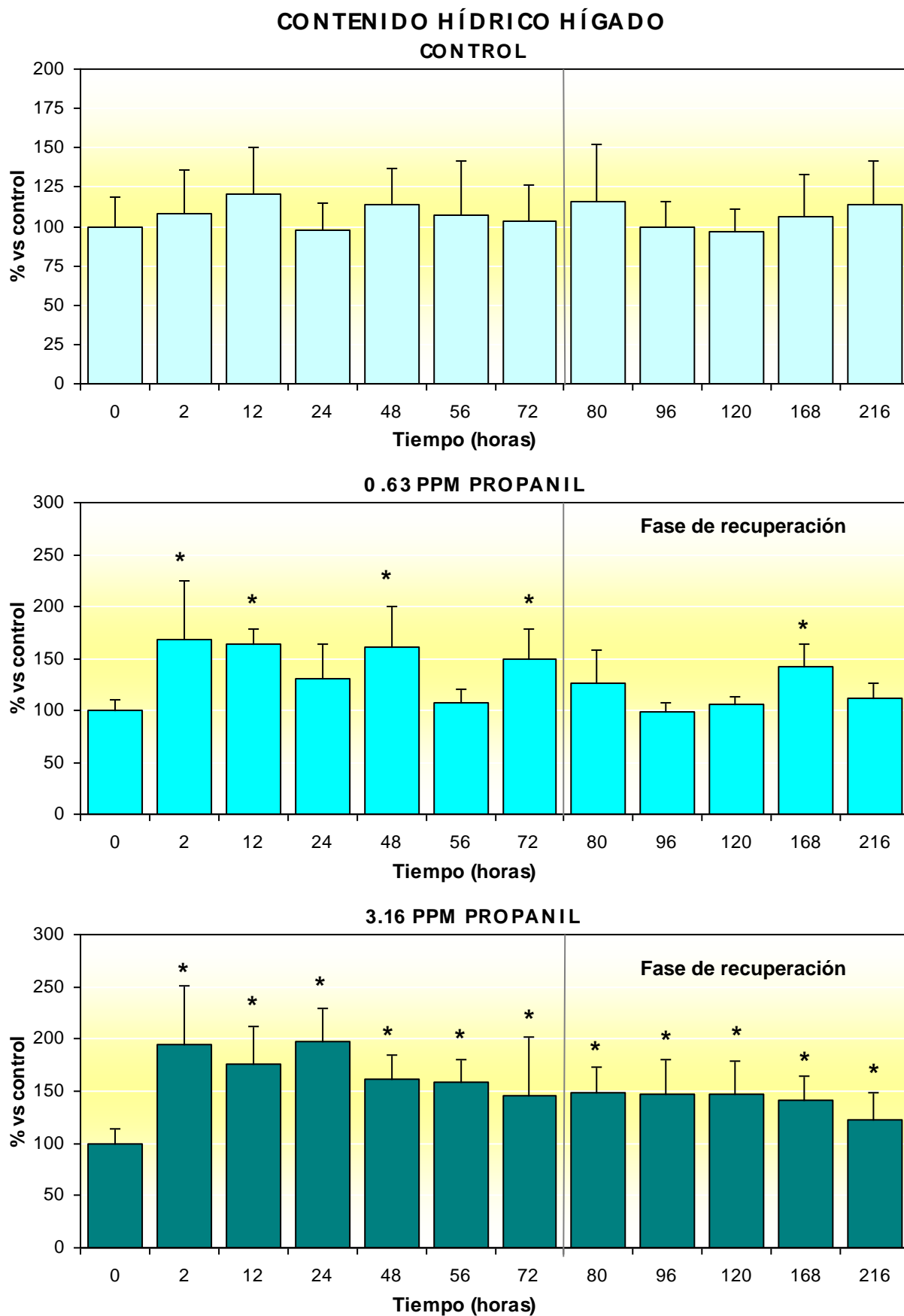
El contenido hídrico determinado en muestras hepáticas de las anguilas procedentes de los dos experimentos con el herbicida aparece en las tablas 33 y 34 y su evolución a lo largo del tiempo como porcentaje vs. 0 h se representa en la figura 30.

Como se observa, si tomamos el porcentaje de contenido hídrico en el hígado de los animales antes de ser expuestos al herbicida propanil como valor normal o control, la exposición a un medio contaminado con este herbicida alteró este valor de forma significativa en las anguilas expuestas (figura 30). Para los animales expuestos a 0.63 mg/L este aumento fue estadísticamente significativo ( $p<0.05$ ) a las 2, 12, 48 y 72 h de la fase de exposición (anexo 8.2: ANOVA ( $p<0.0001$ ), tabla 2.13; test de Duncan ( $p<0.05$ ), figura 2.25). Con fluctuaciones entre los diferentes tiempos de medida, este incremento positivo del contenido hídrico registrado a estos tiempos fue en torno al 60% (tabla 33).

Durante la exposición a 3.16 mg/L de propanil se observó un aumento de este parámetro durante todo el experimento, máximo a las 24 h (98%) como se observa en la figura 30. A partir de las 48 h y hasta las 168 h de experimento este aumento se mantuvo homogéneo, con un incremento medio del 50% (tabla 34), pues no se registraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) entre los diferentes valores determinados durante este intervalo (test de Duncan, anexo 8.2: figura 2.26). El análisis estadístico de los resultados (anexo 8.2: ANOVA ( $p<0.0005$ ), tabla 2.13; test de Duncan ( $p<0.05$ ), figura 2.26) indicó la existencia de diferencias significativas entre el valor a las 0 h y el determinado para el resto de los tiempos excepto a las 216 h. Así, se recuperaron los niveles iniciales de este índice después de 6 días de permanencia de los animales en agua limpia ( $p>0.05$ ).



**Figura 29.** Índice hepatosomático (% vs. 0 horas) de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 30.** Contenido hídrico (% vs. 0 horas) en el hígado de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**4.2.2.10. Hígado: Correlación Lineal entre Parámetros (2)**

En la tabla 36 se muestran los datos correspondientes a la correlación lineal entre los valores obtenidos para las diferentes actividades enzimáticas estudiadas en el hígado así como para el contenido calórico (CC), índice hepatosomático (HSI) y contenido hídrico (CH) en este órgano entre las dos experiencias con propanil.

**Tabla 36.** Rectas de regresión ( $y = a + bx$ ) y coeficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre los valores relativos a los enzimas, contenido calórico (CC), índice hepatosomático (HSI) y contenido hídrico (CH) estudiados en el hígado de las anguilas procedentes de ambos experimentos con propanil.

0.63 mg/L / 3.16 mg/L	$y = a + bx$	$r$
ALT	$y = -3.13 + 0.816 x$	0.82
ALP	$y = 1.09 + 0.525 x$	0.56
LDH	$y = 2.47 + 0.947 x$	0.72
$\gamma$ -GT	$y = 0.02 + 0.946 x$	0.51
CC	$y = -22.5 + 0.951 x$	0.90
HSI	$y = 7.24 + 0.625 x$	0.58
CH	$y = 0.20 + 0.664 x$	0.60

La correlación lineal resultó bastante elevada en el caso de la enzima ALT, como evidencia el coeficiente de correlación de Pearson obtenido ( $r = 0.82$ ). También sería un buen ajuste el de los resultados obtenidos para la actividad LDH hepática, con un coeficiente de correlación de 0.72. Sin embargo, y a la vista de los resultados, la bondad del ajuste para la actividad ALP hepática no fue muy buena ( $r = 0.56$ ), como tampoco lo fue para la actividad  $\gamma$ -GT, con un coeficiente de correlación lineal de 0.51. En el caso del contenido calórico existe un alto grado de correlación lineal entre los valores procedentes de ambos ensayos, con un coeficiente de 0.90. Sin embargo ni el índice hepatosomático ni el contenido hídrico tienen un ajuste óptimo, como ponen de manifiesto los bajos coeficientes de correlación obtenidos ( $r = 0.58$  y  $r = 0.60$  respectivamente).

#### **4.2.2.11. Musculatura Esquelética: Metabolitos**

##### **4.2.2.11.1. Glucosa**

Los niveles de glucosa en la musculatura esquelética (mg/g) de anguilas procedentes de los experimentos con propanil se muestran en las tablas 37 y 38 y en la figura 31.

Se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de los niveles en los animales expuestos al herbicida ya desde las 2 h de exposición, independientemente de la concentración ensayada, aumento que fue significativo ( $p < 0.05$ ) durante toda la experiencia con la concentración más elevada (anexo 8.3: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 3.1; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 3.2). En la experiencia con 0.63 mg/L el aumento de los niveles de glucosa fue máximo entre las 2-12 h de exposición, con un 117% vs. control. A partir de las 48 h de exposición (105% vs. 0 h) se observó una tendencia a la disminución y recuperación de los niveles, de manera que entre las 56-72 h de exposición este aumento fue menor, del 75%. Una vez en la fase de recuperación ya no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) frente al control tras 24 h en estas condiciones, como evidenció el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.3: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 3.1; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 3.1).

En las anguilas expuestas a 3.16 mg/L se observó un aumento gradual de la glucosa muscular que abarcaría desde las primeras 2 h de medida hasta las 48 h, momento en el que se detectó el máximo aumento (150% sobre los valores control). A partir de aquí los valores se mantuvieron elevados hasta finalizar la exposición (127% a las 72 h). La eliminación del herbicida del medio permitió a los animales cierta recuperación de la glucosa muscular, con un aumento medio durante toda esta fase del 55%, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores medidos entre las 80-216 h de experimento (test de Duncan, anexo 8.3: figura 3.2), no obstante seis días en estas condiciones fueron insuficientes para permitir recobrar los niveles de partida ( $p < 0.05$ ).

##### **4.2.2.11.2. Lactato**

Se produjo un aumento del lactato muscular (mg/g) estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) ya desde las primeras horas de medida (2 h) en las anguilas expuestas al herbicida, tal y como se refleja en las tablas 37 y 38 y figura 32, que se prolongó durante toda la fase de exposición a ambos tratamientos y que mostró una buena correlación lineal entre las concentraciones de propanil utilizadas ( $r = 0.88$ , tabla 39).

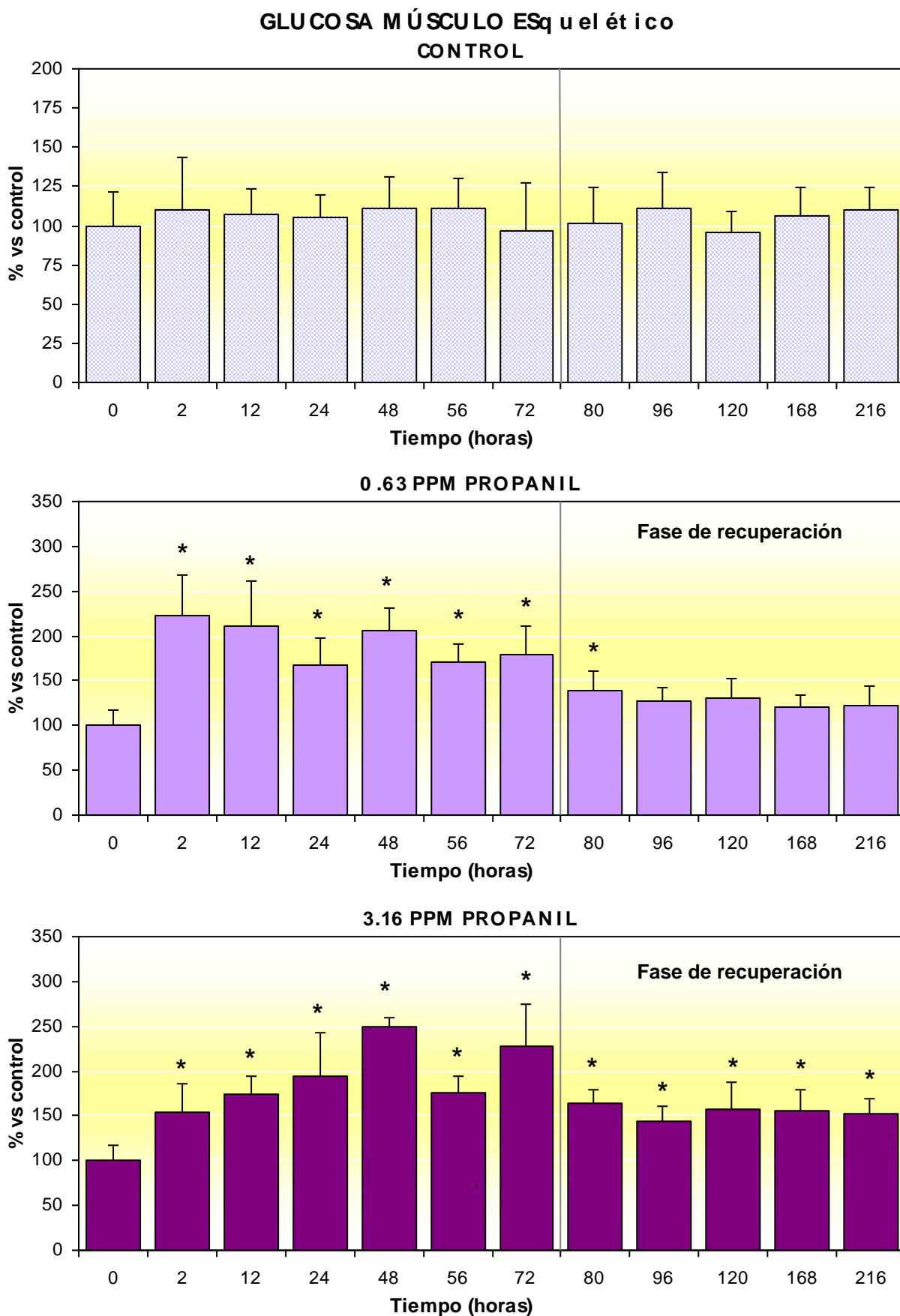
En anguilas expuestas a 0.63 mg/L, este aumento de los niveles de lactato, que fue ya del 85% sobre el control a las 2 h, alcanzó el máximo valor a las 12 h de exposición, con un 120% sobre las 0 h. Durante el periodo comprendido entre las 24-56 h de exposición el aumento fue  $\geq 100\%$  (figura 32). Tras la transferencia de los animales a agua exenta de

**Tabla 37.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido de glucosa (mg/g), lactato (mg/g), glucógeno (mg/g), proteínas totales (mg/g), colesterol (mg/g) y triglicéridos (mg/g) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo 72 horas de exposición a **0.63 mg/L** de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\leftarrow p<0.05$ ).

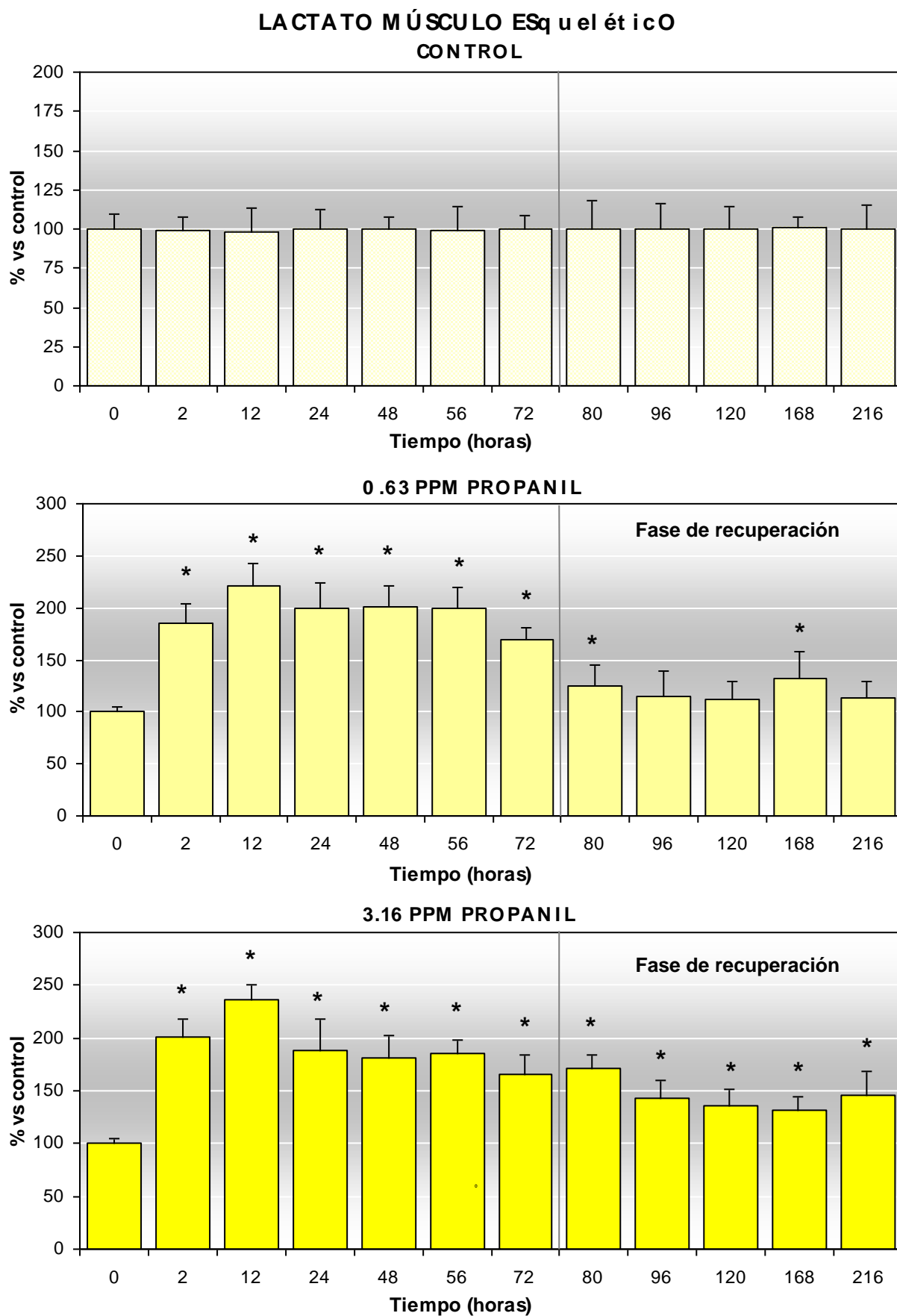
<b>MÚSCULO ESQUELÉTICO</b>							
<b>Fase de Exposición (Horas)</b>							
	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>56</b>	<b>72</b>
GLUCOSA	0.44 $\pm$ 0.08	0.99 $\pm$ 0.20*	0.93 $\pm$ 0.23*	0.74 $\pm$ 0.13*	0.91 $\pm$ 0.11*	0.76 $\pm$ 0.08*	0.79 $\pm$ 0.14*
LACTATO	1.32 $\pm$ 0.05	2.44 $\pm$ 0.24*	2.92 $\pm$ 0.27*	2.64 $\pm$ 0.31*	2.65 $\pm$ 0.28*	2.64 $\pm$ 0.26*	2.24 $\pm$ 0.14*
GLUCÓGENO	7.17 $\pm$ 0.70	3.88 $\pm$ 0.60*	3.86 $\pm$ 0.57*	2.17 $\pm$ 0.34*	1.47 $\pm$ 0.04*	1.69 $\pm$ 0.37*	1.68 $\pm$ 0.17*
PROTEÍNAS	381.37 $\pm$ 45.42	278.35 $\pm$ 46.41*	309.16 $\pm$ 52.62*	229.60 $\pm$ 56.65*	325.80 $\pm$ 48.95*	257.90 $\pm$ 37.07*	155.65 $\pm$ 46.70*
COLESTEROL	7.70 $\pm$ 1.07	6.12 $\pm$ 1.29*	6.36 $\pm$ 1.63*	6.75 $\pm$ 1.62	4.46 $\pm$ 0.79*	5.27 $\pm$ 1.26*	4.09 $\pm$ 0.71*
TRIGLICÉRIDOS	28.78 $\pm$ 4.89	34.03 $\pm$ 4.65*	34.85 $\pm$ 6.65*	34.53 $\pm$ 7.81	28.25 $\pm$ 3.22	23.62 $\pm$ 6.33	12.72 $\pm$ 5.62*
<b>Fase de Recuperación (Horas)</b>							
	<b>80</b>	<b>96</b>	<b>120</b>	<b>168</b>	<b>216</b>		
GLUCOSA	0.62 $\pm$ 0.10*	0.56 $\pm$ 0.07	0.58 $\pm$ 0.09	0.53 $\pm$ 0.06	0.54 $\pm$ 0.09		
LACTATO	1.65 $\pm$ 0.27*	1.51 $\pm$ 0.32	1.48 $\pm$ 0.22	1.74 $\pm$ 0.34*	1.50 $\pm$ 0.20		
GLUCÓGENO	2.69 $\pm$ 0.27*	3.01 $\pm$ 0.68*	2.08 $\pm$ 0.64*	2.52 $\pm$ 0.49*	2.94 $\pm$ 0.63*		
PROTEÍNAS	178.74 $\pm$ 32.15*	116.34 $\pm$ 38.24*	109.28 $\pm$ 31.40*	173.69 $\pm$ 48.58*	157.90 $\pm$ 38.69*		
COLESTEROL	4.97 $\pm$ 1.33*	2.40 $\pm$ 0.62*	2.39 $\pm$ 0.52*	3.51 $\pm$ 0.80*	3.64 $\pm$ 0.62*		
TRIGLICÉRIDOS	18.09 $\pm$ 1.63*	11.13 $\pm$ 1.88*	10.48 $\pm$ 2.17*	18.78 $\pm$ 4.23*	17.50 $\pm$ 1.78*		

**Tabla 38.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido de glucosa (mg/g), lactato (mg/g), glucógeno (mg/g), proteínas totales (mg/g), colesterol (mg/g) y triglicéridos (mg/g) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo 72 horas de exposición a 3.16 mg/L de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\leftarrow p<0.05$ ).

<b>MÚSCULO ESQUELÉTICO</b>						
<b>Fase de Exposición (Horas)</b>						
	0	2	12	24	48	72
GLUCOSA	0.44 $\pm$ 0.07	0.68 $\pm$ 0.14*	0.77 $\pm$ 0.09*	0.86 $\pm$ 0.22*	1.10 $\pm$ 0.05*	1.00 $\pm$ 0.20*
LACTATO	1.28 $\pm$ 0.06	2.57 $\pm$ 0.22*	3.01 $\pm$ 0.18*	2.41 $\pm$ 0.38*	2.32 $\pm$ 0.27*	2.12 $\pm$ 0.24*
GLUCÓGENO	7.15 $\pm$ 0.61	3.88 $\pm$ 0.85*	4.18 $\pm$ 0.59*	2.42 $\pm$ 0.46*	1.63 $\pm$ 0.17*	1.70 $\pm$ 0.13*
PROTEÍNAS	395.60 $\pm$ 22.26	289.73 $\pm$ 27.16*	310.66 $\pm$ 49.93*	284.36 $\pm$ 84.63*	195.85 $\pm$ 26.92*	123.61 $\pm$ 29.70*
COLESTEROL	8.42 $\pm$ 1.31	5.35 $\pm$ 0.59*	6.49 $\pm$ 1.06*	5.21 $\pm$ 1.94*	4.33 $\pm$ 1.01*	2.83 $\pm$ 0.22*
TRIGLICÉRIDOS	28.58 $\pm$ 6.36	22.37 $\pm$ 3.53*	23.94 $\pm$ 4.53	22.57 $\pm$ 6.71*	21.97 $\pm$ 4.11*	19.93 $\pm$ 5.27*
<b>Fase de Recuperación (Horas)</b>						
	80	96	120	168	216	
GLUCOSA	0.72 $\pm$ 0.07*	0.63 $\pm$ 0.07*	0.70 $\pm$ 0.13*	0.69 $\pm$ 0.10*	0.67 $\pm$ 0.07*	
LACTATO	2.19 $\pm$ 0.16*	1.84 $\pm$ 0.21*	1.73 $\pm$ 0.21*	1.68 $\pm$ 0.16*	1.86 $\pm$ 0.28*	
GLUCÓGENO	0.99 $\pm$ 0.049*	2.28 $\pm$ 0.35*	1.74 $\pm$ 0.50*	1.54 $\pm$ 0.75*	1.99 $\pm$ 0.55*	
PROTEÍNAS	176.66 $\pm$ 44.72*	204.08 $\pm$ 71.69*	205.11 $\pm$ 47.32*	160.30 $\pm$ 13.88*	116.78 $\pm$ 40.20*	
COLESTEROL	4.45 $\pm$ 1.09*	4.60 $\pm$ 0.44*	3.98 $\pm$ 0.87*	2.05 $\pm$ 0.44*	2.20 $\pm$ 0.89*	
TRIGLICÉRIDOS	18.20 $\pm$ 1.91*	17.61 $\pm$ 3.07*	16.25 $\pm$ 2.95*	12.57 $\pm$ 2.47*	12.35 $\pm$ 3.29*	



**Figura 31.** Niveles de glucosa (% vs. 0 horas) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 32.** Niveles de lactato (% vs. 0 horas) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

herbicida y a partir de 24 h en estas condiciones no se observaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en los niveles de lactato frente al control, tal y como corroboró el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.3: ANOVA ( $p<0.0001$ ), tabla 3.2; test de Duncan ( $p<0.05$ ), figura 3.2).

En los animales expuestos a 3.16 mg/L, el aumento de los niveles de lactato muscular ya fue un 101% superior al valor inicial a las 2 h, y al igual que ocurría con la experiencia anterior, los valores alcanzaron el máximo aumento a las 12 h, con un porcentaje del 135% sobre el control (figura 32). Este aumento se prolongó durante toda la 1ª fase del experimento y, a diferencia de lo ocurrido en la experiencia con 0.63 mg/L, tras 6 días de permanencia en agua sin herbicida no se observó recuperación ( $p<0.05$ ), con valores aún un 45% superiores al valor a las 0 h al finalizar el experimento (anexo 8.3: ANOVA ( $p<0.0001$ ), tabla 3.2; test de Duncan ( $p<0.05$ ), figuras 3.2 y 3.3).

#### **4.2.2.11.3. Glucógeno**

Los niveles musculares de glucógeno (mg/g) se reflejan en las tablas 37 y 38 y su evolución a lo largo de los 9 días de duración de las experiencias, en porcentaje respecto a las 0 h, se muestra en la figura 33.

Al igual que ocurría con el tejido hepático, se observó una rápida movilización de esta reserva energética en el músculo esquelético, que se inició ya a las 2 h de contacto con el herbicida en ambos tratamientos y que siguió una pauta muy parecida en ambas experiencias, como evidenció el elevado coeficiente de correlación lineal obtenido ( $r=0.93$ , tabla 39). A este tiempo, el porcentaje de reducción fue ya del 45% en anguilas procedentes de ambos experimentos, porcentaje que se mantuvo sin variación ( $p>0.05$ ) hasta el siguiente tiempo de medida (12 h) con independencia de la procedencia de las anguilas. Otra similitud entre ambos experimentos lo constituye el hecho de que entre las 48-72 h de la fase de exposición las reservas de glucógeno muscular no superaron el 25% de las registradas a las 0 h y además durante este intervalo las reservas no variaron significativamente entre ellas ( $p>0.05$ ), como evidenció el análisis estadístico de los resultados (test de Duncan, anexo 8.3.: figuras 3.5 y 3.6). Al finalizar la fase de exposición a propanil la merma en las reservas glucogénicas fue del 73-74% en las anguilas expuestas a ambos tratamientos.

Durante la fase de recuperación en agua sin contaminante, las reservas continuaron mermadas, de manera que los niveles no superaron el 42% en las anguilas procedentes del experimento con 0.63 mg/L (tabla 37). Así, durante esta 2ª fase, si bien se observaron oscilaciones en el contenido glucogénico, seis días de permanencia en estas condiciones fueron insuficientes para permitir una recuperación de los niveles de referencia, de manera que a las 216 h los niveles representaron el 41% del valor inicial en el caso de las anguilas pre-tratadas con 0.63 mg/L de propanil (figura 33). En el caso de las anguilas expuestas a 3.16

mg/L de propanil la máxima movilización del glucógeno muscular fue determinada a las 80 h de experimento, es decir, una vez transcurridas 8 h de permanencia de los animales en agua sin herbicida, con un contenido en glucógeno muscular que sólo supuso el 14% del valor de referencia (tabla 38). Durante esta fase de recuperación los niveles no superaron el 32% de los niveles iniciales en ningún caso, incluso a las 216 h los niveles representaron sólo el 28% en las anguilas pre-expuestas a 3.16 mg/L (figura 33).

El análisis estadístico de los resultados reveló la existencia de diferencias significativas entre el valor control y los valores a los diferentes tiempos en ambos tratamientos (anexo 8.3.: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 3.3; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figuras 3.5 y 3.6).

#### **4.2.2.11.4. Proteínas Totales**

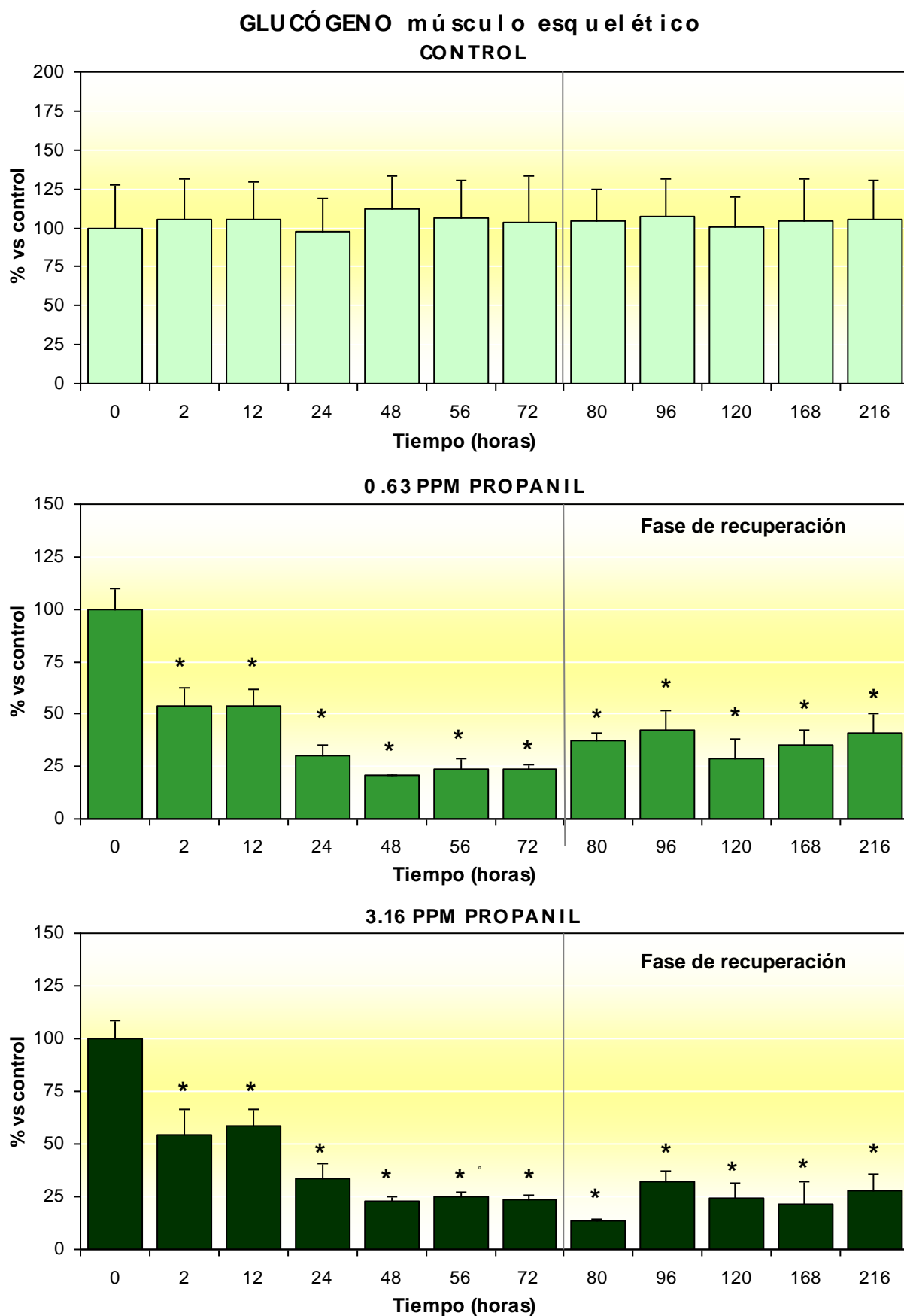
Los niveles de proteínas totales en la musculatura esquelética aparecen reflejados, como porcentaje respecto del valor tomado como control, en la figura 34, y en mg/g en las tablas 27 y 28, según procedan los animales del experimento con 0.63 ó 3.16 mg/L, respectivamente.

Se observó un descenso gradual de las reservas proteicas musculares en las anguilas expuestas, con independencia de la concentración de propanil ensayada. Este descenso, significativo ( $p < 0.05$ ) ya desde el primer tiempo de medida en ambas experiencias, con una movilización del 27% a las 2 h en ambos casos, fue progresando a lo largo de las fases de exposición, detectándose la máxima reducción a las 72 h también en ambos experimentos, con descensos del 60 % en anguilas expuestas a 0.63 mg/L y del 70% en las tratadas con 3.16 mg/L (figura 34).

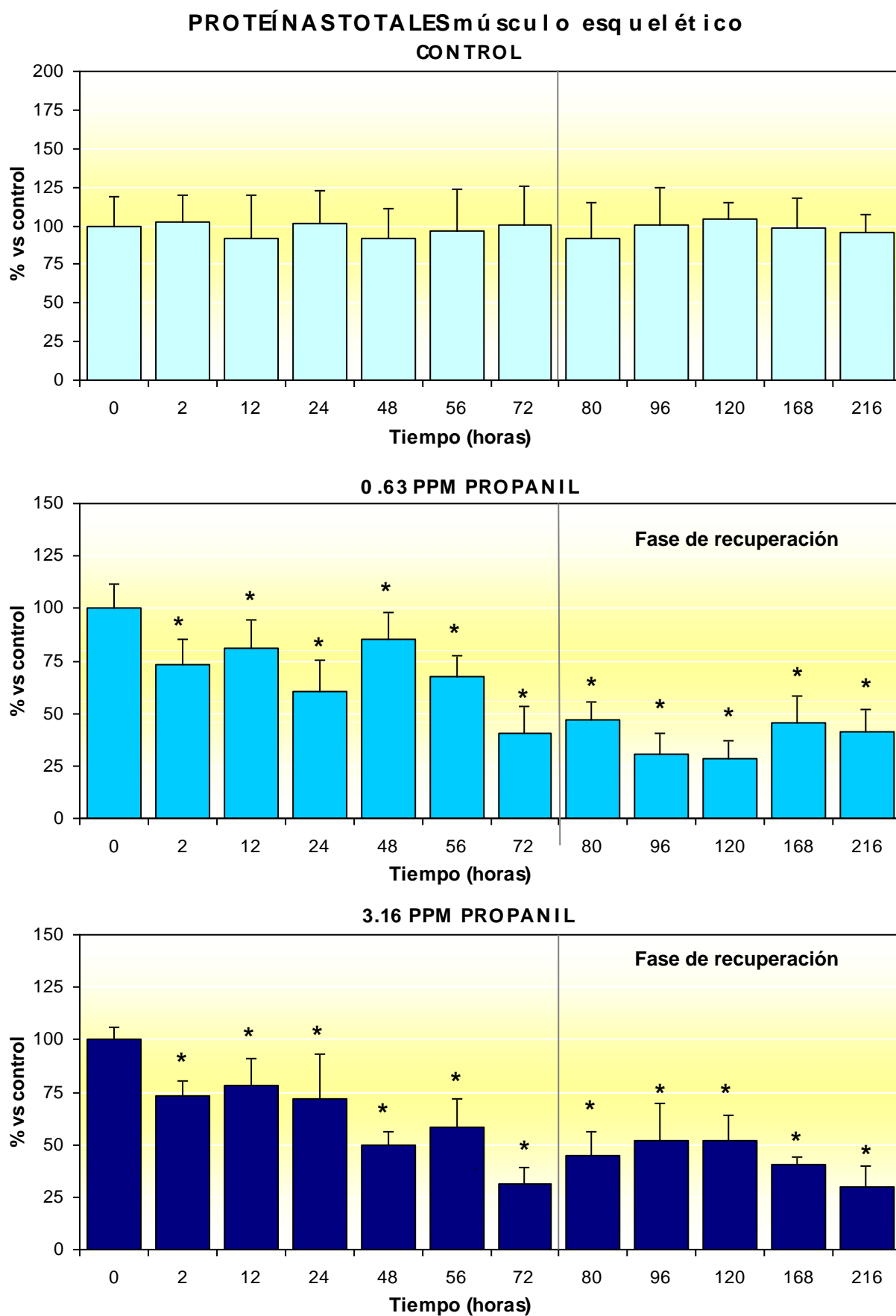
Una vez se ubicaron los animales en agua sin propanil no se observó tendencia a la recuperación de las proteínas cualquiera que fuese la concentración ensayada. Incluso los niveles decayeron aún más: así, en el experimento con 0.63 mg/L, entre 24 y 48 h tras la eliminación del propanil del medio, las reservas proteicas no superaron el 30% del valor control. En cualquier caso, a las 216 h las reservas sólo constituyeron un 40% de las registradas al inicio del experimento. En los animales pre-expuestos a 3.16 mg/L, si bien se observaron fluctuaciones entre las 96 y 120 h de medida, al finalizar la experiencia el contenido proteico supuso sólo un 30% de las reservas proteicas registradas inicialmente (figura 34).

El análisis estadístico de los resultados ratificó lo expuesto: el ANOVA indicó la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) en ambos experimentos, que el posterior test de Duncan reveló ( $p < 0.05$ ) entre las concentraciones de proteínas determinadas a las 0 h y a los demás tiempos (anexo 8.3: tabla 3.4 y figuras 3.7 y 3.8).





**Figura 33.** Niveles de glucógeno (% vs. 0 horas) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 34.** Niveles de proteínas totales (% vs. 0 horas) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

#### 4.2.2.11.5. Colesterol

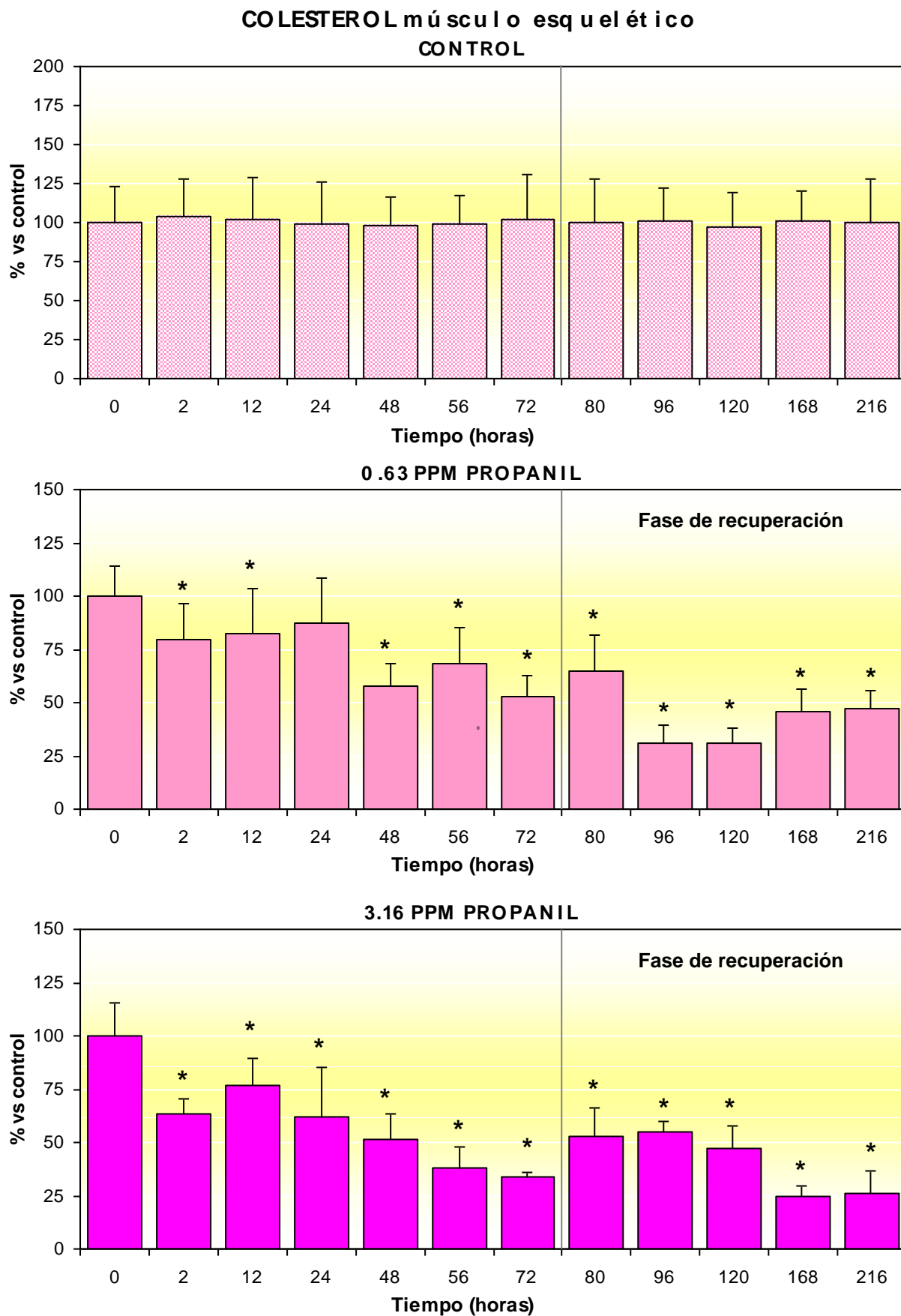
Tal y como se refleja en las tablas 37 y 38, donde se detallan los resultados de colesterol en músculo de la anguila obtenidos en mg/g, se observó un descenso significativo de los niveles de colesterol como consecuencia de la exposición de las anguilas a propanil, como evidenció el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.3.: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 3.5; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figuras 3.9 y 3.10). Esta movilización fue progresivamente en aumento a lo largo de las fases de exposición y de recuperación (figura 35), de modo que no se recuperaron los valores control en los animales procedentes de ambos tratamientos ( $p < 0.05$ ), como puso en evidencia el test de Duncan (anexo 8.3: figuras 3.9 y 3.10).

En el experimento con una concentración de propanil de 0.63 mg/L, los niveles de colesterol descendieron un 20% durante las primeras horas de tratamiento (2 h), descenso que no varió significativamente entre las 2 y las 24 h, como demostró el test de Duncan (anexo 8.3: figura 3.9). A partir de las 48 h se observó un descenso de más del 40% respecto al valor inicial, que se mantuvo hasta finalizar la fase de exposición e incluso hasta 8 h después de ubicar a los animales en agua sin herbicida (figura 35), ya que no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores determinados entre las 48-80 h de experimento (test de Duncan, anexo 8.3: figura 3.9).

De cualquier modo, la transferencia de los animales a un medio sin propanil durante seis días no fue suficiente para permitir la recuperación de los niveles de colesterol iniciales. Entre las 96-120 h los niveles sólo supusieron un 30% de los medidos a las 0 h (figura 35) y al finalizar la experiencia (entre las 168 y 216 h) el contenido de colesterol muscular sólo representó un 46% del valor inicial.

En los animales expuestos a una concentración de propanil más elevada, de 3.16 mg/L, ya a las 2 h se observó un descenso ligeramente superior, del 36%, respecto al valor inicial (figura 35). A medida que fue progresando la fase de exposición, los niveles de colesterol fueron descendiendo paulatinamente, de modo que al finalizar esta fase se detectó un descenso del 66% respecto al valor control.

Tampoco en este experimento, la eliminación del herbicida del medio experimental permitió el restablecimiento de los niveles de partida. Así, durante las primeras 24 h en estas condiciones (entre las 80 y las 120 h desde el inicio del experimento) los niveles no superaron el 55% del valor inicial, e incluso descendieron aún más al finalizar la fase de recuperación, de manera que a las 216 h los niveles de colesterol sólo supusieron un 25 % sobre los medidos a las 0 h (figura 35).



**Figura 35.** Niveles de colesterol (% vs. 0 horas) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

#### **4.2.2.11.6. Triglicéridos**

Los resultados obtenidos para este metabolito, expresados en mg/g, aparecen reflejados en las tablas 27 y 28 y en la figura 36 aparecen representados como porcentaje vs. 0 h.

En los animales expuestos a 0.63 mg/L de propanil se produjo un descenso significativo ( $p < 0.05$ ) de los triglicéridos musculares sólo después de 72 h de contacto con el herbicida, con un 55% de descenso respecto a las 0 h (figura 36) que se prolongó durante toda la fase de recuperación en agua exenta de propanil. De hecho, el máximo descenso se registró tras 24-48 h en estas condiciones (entre las 96 y 120 h desde el inicio del experimento) y durante este tiempo los triglicéridos sólo representaron un 37% de los niveles a las 0 h. Al finalizar esta 2ª fase si bien se observó un cierto aumento, los valores representaron aún un 63% del valor control.

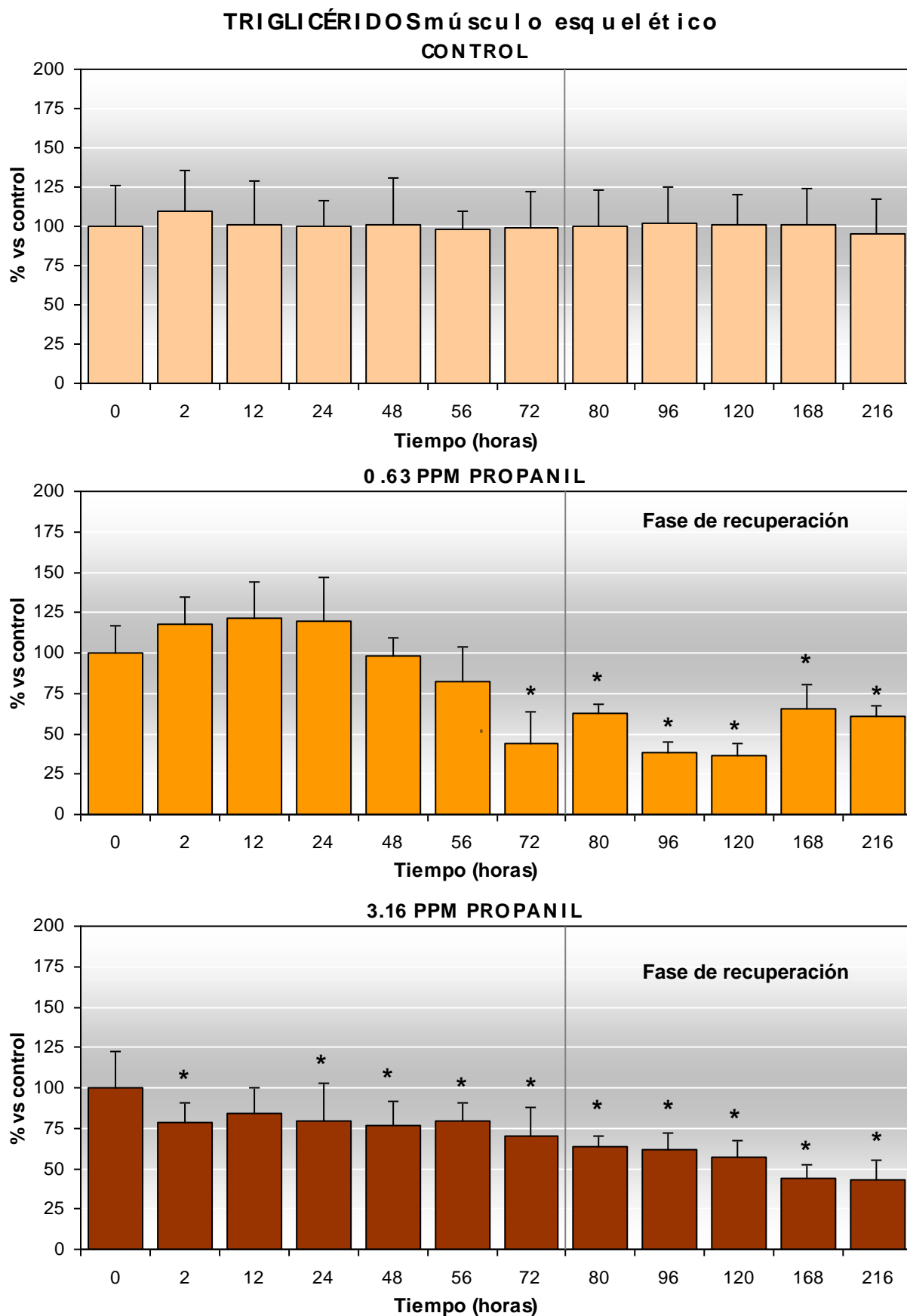
El análisis estadístico de los resultados evidenció la existencia de diferencias significativas (anexo 8.3: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 3.6) que el posterior test de Duncan ( $p < 0.05$ ) concretó entre el valor a las 0 h y los registrados desde las 72 h hasta la finalización del experimento (anexo 8.3: figura 3.11).

Para los animales expuestos a 3.16 mg/L, la movilización de los triglicéridos musculares comenzó antes, desde las 2 h de exposición, con un descenso del 21% respecto al valor control. Este descenso se mantuvo homogéneo durante toda la fase de exposición, de hecho, y como evidenció el test de Duncan, no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los diferentes valores determinados a lo largo de esta fase (entre las 2-72 h) (anexo 8.3: figura 3.12). A lo largo de la 2ª fase del experimento la movilización fue aumentando de forma progresiva y estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) de manera que el máximo descenso observado durante toda la experiencia se produjo entre las 168 y 216 h, con unos niveles que representaron sólo un 43% de los determinados a las 0 h (figura 36). El análisis de la varianza señaló la existencia de diferencias significativas (anexo 8.3: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 3.6) que el posterior test de Duncan ( $p < 0.05$ ) concretó entre el valor a las 0 h y todos los demás tiempos a excepción de las 12 h de exposición (anexo 8.3: figura 3.12).

#### **4.2.2.12. *Musculatura Esquelética: Correlación Lineal entre Parámetros (1)***

En la tabla 39 se muestra la correlación lineal entre los valores obtenidos para los metabolitos estudiados en el músculo esquelético en ambas experiencias con propanil.

En general, la correlación lineal para los metabolitos estudiados en el músculo no fue tan elevada como en el hígado (apdo. 4.3.5). Así, en el caso de la glucosa el coeficiente de correlación lineal obtenido fue sólo de 0.63. Respecto al resto de metabolitos relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, es decir, lactato y glucógeno, sí se observa una buena



**Figura 36.** Niveles de triglicéridos (% vs. 0 horas) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

correlación lineal y al igual que en el hígado, resultó muy elevada, con unos coeficientes de correlación de Pearson de 0.88 para el lactato y de 0.93 para el glucógeno. Para las proteínas totales se obtuvo un coeficiente de correlación lineal de 0.75, seguido del colesterol muscular donde este coeficiente adoptó un valor de 0.72. A diferencia de lo observado en el hígado, para los triglicéridos musculares existe un peor ajuste ( $r = 0.67$ ).

**Tabla 39.** Rectas de regresión ( $y = a + bx$ ) y coeficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre los valores relativos a los metabolitos estudiados en el músculo esquelético de las anguilas procedentes de ambos experimentos con propanil.

0.63 mg/L / 3.16 mg/L	$y = a + bx$	$r$
Glucosa	$y = 0.33 + 0.596 x$	0.63
Lactato	$y = 0.65 + 0.711 x$	0.88
Glucógeno	$y = -0.41 + 1.027 x$	0.93
Proteínas totales	$y = 68.86 + 0.698 x$	0.75
Colesterol	$y = 0.74 + 0.767 x$	0.72
Triglicéridos	$y = 12.05 + 0.346 x$	0.67

#### 4.2.2.13. *Musculatura Esquelética: Enzimas*

##### 4.2.2.13.1. **Actividad Alanina Aminotransferasa (ALT)**

En las tablas 40 y 41 se indican los valores correspondientes a la actividad ALT ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) determinados en el músculo de las anguilas tratadas con propanil.

Tal y como se refleja en la figura 37, se observaron fluctuaciones en la medida de la actividad ALT durante la fase de exposición a propanil en ambas experiencias, con una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en algunos tiempos de medida. En el experimento con 0.63 mg/L se observó un descenso medio del 30% durante esta fase, que fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) a todos los tiempos excepto a las 48 h. En el caso de las anguilas tratadas con 3.16 mg/L se observó un descenso del 30%, sólo significativo ( $p < 0.05$ ) a las 24 h de exposición (figura 37).

Una vez en agua exenta de propanil, la actividad continuó alterada e incrementada significativamente ( $p < 0.05$ ) en algunos tiempos de medida, independientemente de la procedencia de los animales. En el experimento con 0.63 mg/L esta actividad mostró

diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el control entre las 96 y las 120 h, con un incremento medio del 35% sobre el valor a las 0 h. En los animales pre-tratados con 3.16 mg/L esta actividad aumentó significativamente entre las 80 y las 96 h de experimento, con unos porcentajes del 35 y del 49% respectivamente. En cualquier caso, la actividad ALT muscular se recuperó ya que tras seis días en agua sin propanil no se determinaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para esta actividad respecto de sus respectivos valores control en las anguilas procedentes de ambos experimentos, tal y como reveló el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.3: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 3.7; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figuras 3.13 y 3.14).

#### **4.2.2.13.2. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP)**

La actividad enzimática ALP ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) en músculo esquelético de anguilas expuestas a propanil se detallan en las tablas 40 y 41 y su evolución a lo largo de las 216 h que duró cada experimento se ilustra en la figura 38.

Tal y como se desprende de los resultados, se observaron alteraciones en esta función enzimática en los animales expuestos a propanil (figura 38). En la experiencia con 0.63 mg/L se observó un incremento de la actividad ALP muscular (figura 38) estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) respecto al control entre las 48 h y las 72 h de la fase de exposición, con un aumento medio del 50%, y sin observarse diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores determinados durante este intervalo (test de Duncan, anexo 8.3: figura 3.16). Este aumento de la actividad ALP muscular fue notorio incluso una vez eliminado el propanil del medio, con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al valor de referencia hasta 4 días en estas condiciones, si bien la actividad mostró un incremento menor, del 28% de media vs. control, recuperándose la actividad normal antes de finalizar la experiencia, tal y como mostró el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.3: ANOVA ( $p < 0.0005$ ), tabla 3.8; test de Duncan, figura 3.16).

Tal y como refleja la figura 38, se observó mayor y más temprana alteración en esta función enzimática en los animales expuestos a la concentración más elevada. Así, la actividad ALP mostró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) desde el inicio del experimento con 3.16 mg/L (80% vs. control a las 2 h). Este incremento se mantuvo por encima del 50% durante toda la fase de exposición, con un 73% al finalizar la misma y que se prolongó incluso tras 8 h ya en la fase de recuperación, puesto que este valor no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con los determinados entre las 24 y las 72 h de la fase de exposición (test de Duncan, anexo 8.3: figura 3.15). Tras 24 h en estas condiciones el aumento observado fue aún del 48%, pero se recuperó la actividad normal tras 48 h de permanencia en agua libre de propanil.

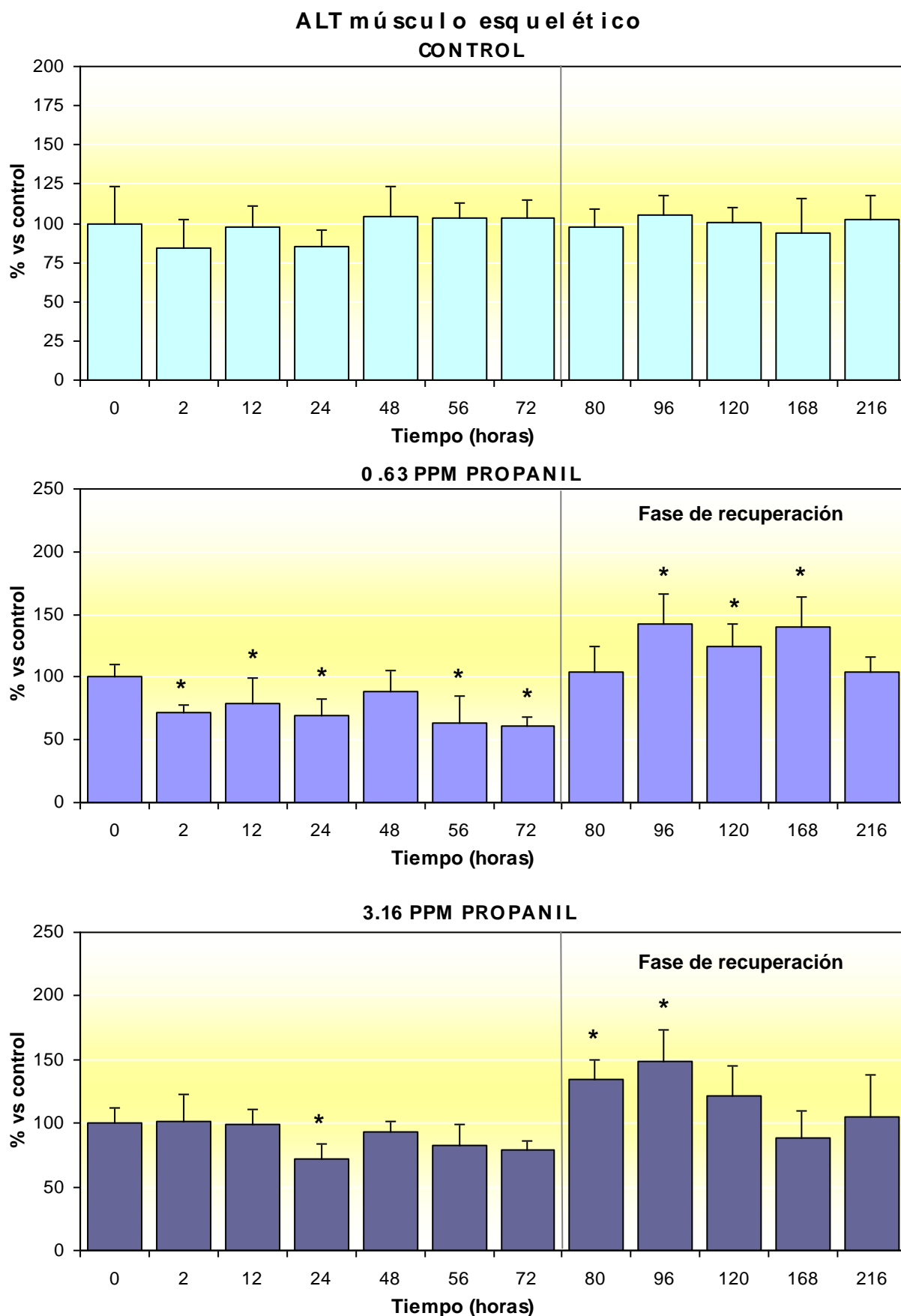


**Tabla 40** Valores medios  $\pm$  D.E. de las actividades enzimáticas ALT ( $\mu$ mol/min/g), ALP ( $\mu$ mol/min/g),  $\gamma$ -GT ( $\mu$ mol/min/g) y LDH ( $\mu$ mol/min/g), del contenido calórico (CC) y del contenido hídrico (CH) en la musculatura esquelética de la anguilla *A. anguilla* a lo largo 72 horas de exposición a **0.63 mg/L** de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\rightarrow$ ) $p<0.05$ .

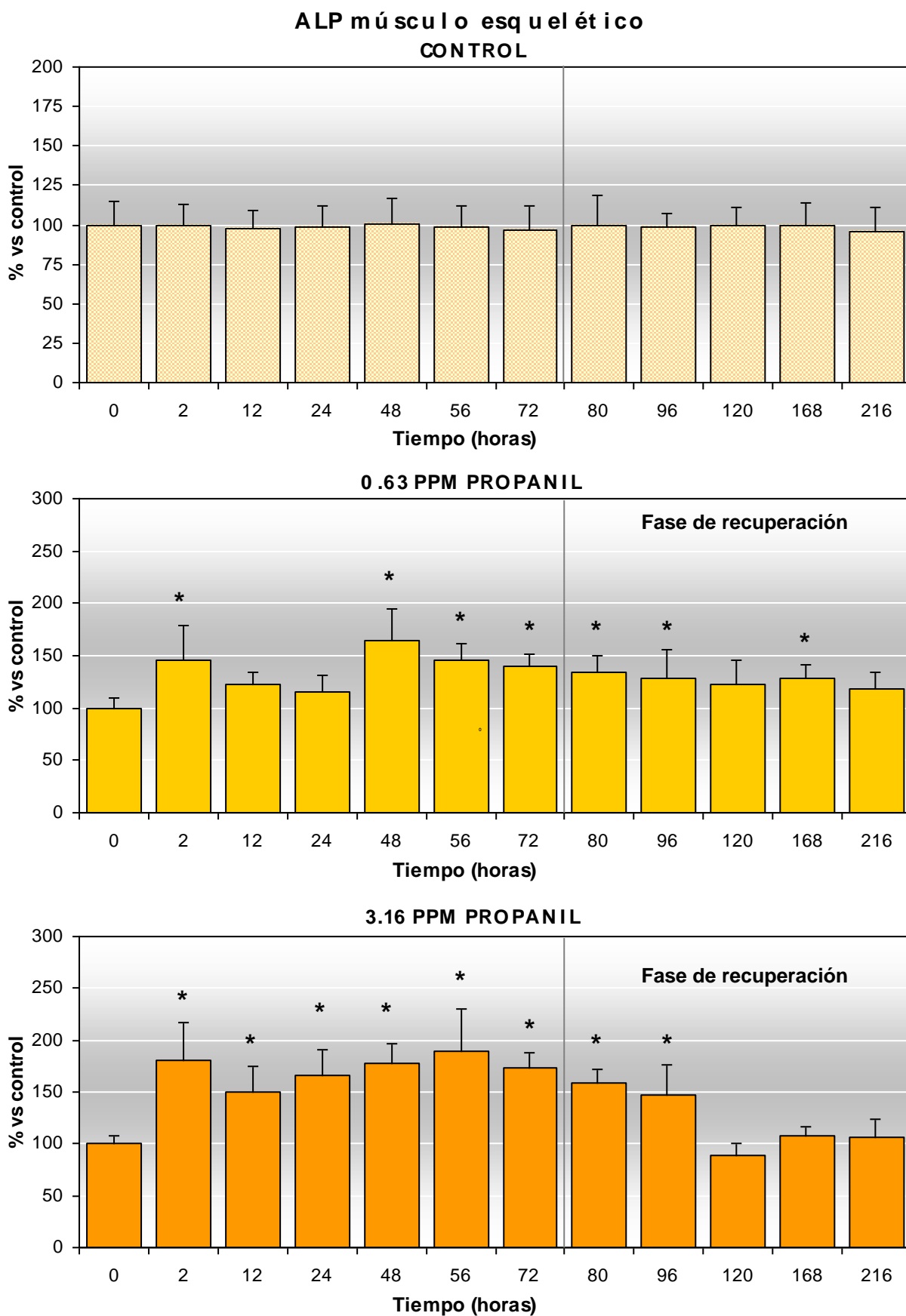
MÚSCULO ESQUELÉTICO							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	1 2	2 4	4 8	5 6	7 2
ALT	0.63 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.04*	0.50 $\pm$ 0.13*	0.44 $\pm$ 0.09*	0.56 $\pm$ 0.11	0.40 $\pm$ 0.13*	0.38 $\pm$ 0.05*
ALP	0.11 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.04*	0.14 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.03*	0.16 $\pm$ 0.02*	0.16 $\pm$ 0.01*
$\gamma$ -GT	0.13 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.02*	0.16 $\pm$ 0.02*	0.13 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.01*	0.17 $\pm$ 0.03*	0.18 $\pm$ 0.04*
LDH	118.17 $\pm$ 8.09	148.97 $\pm$ 21.50*	153.90 $\pm$ 17.96*	161.32 $\pm$ 13.64*	162.89 $\pm$ 21.86*	172.21 $\pm$ 16.38*	191.26 $\pm$ 22.12*
CC	2204.68 $\pm$ 235.74	1731.39 $\pm$ 258.73*	1889.27 $\pm$ 322.76*	1501.03 $\pm$ 314.12*	1878.92 $\pm$ 264.78*	1517.91 $\pm$ 212.18*	912.84 $\pm$ 274.15*
CH	0.19 $\pm$ 0.06	0.27 $\pm$ 0.08	0.44 $\pm$ 0.10*	0.32 $\pm$ 0.09*	0.26 $\pm$ 0.07	0.37 $\pm$ 0.10*	0.31 $\pm$ 0.06
Fase de Recuperación (Horas)							
	8 0	9 6	1 2 0	1 6 8	2 1 6		
ALT	0.66 $\pm$ 0.13	0.90 $\pm$ 0.15*	0.78 $\pm$ 0.12*	0.88 $\pm$ 0.15*	0.66 $\pm$ 0.07		
ALP	0.15 $\pm$ 0.02*	0.14 $\pm$ 0.03*	0.14 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.02*	0.13 $\pm$ 0.02		
$\gamma$ -GT	0.16 $\pm$ 0.02*	0.15 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.03		
LDH	156.17 $\pm$ 15.55*	156.56 $\pm$ 29.33*	159.49 $\pm$ 3.81*	138.26 $\pm$ 9.72	118.23 $\pm$ 11.98		
CC	1086.93 $\pm$ 149.56*	698.59 $\pm$ 203.62*	654.67 $\pm$ 169.92*	1054.65 $\pm$ 253.91*	969.81 $\pm$ 190.36*		
CH	0.42 $\pm$ 0.11*	0.45 $\pm$ 0.08*	0.41 $\pm$ 0.13*	0.39 $\pm$ 0.13*	0.34 $\pm$ 0.14*		

**Tabla 41.** Valores medios  $\pm$  D.E. de las actividades enzimáticas ALT ( $\mu$ mol/min/g), ALP ( $\mu$ mol/min/g),  $\gamma$ -GT ( $\mu$ mol/min/g) y LDH ( $\mu$ mol/min/g), del contenido calórico (CC) y del contenido hídrico (CH) en la musculatura esquelética de la anguilla *A. anguilla* a lo largo 72 horas de exposición a 3,16 mg/L de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\rightarrow$ ) $p<0.05$ .

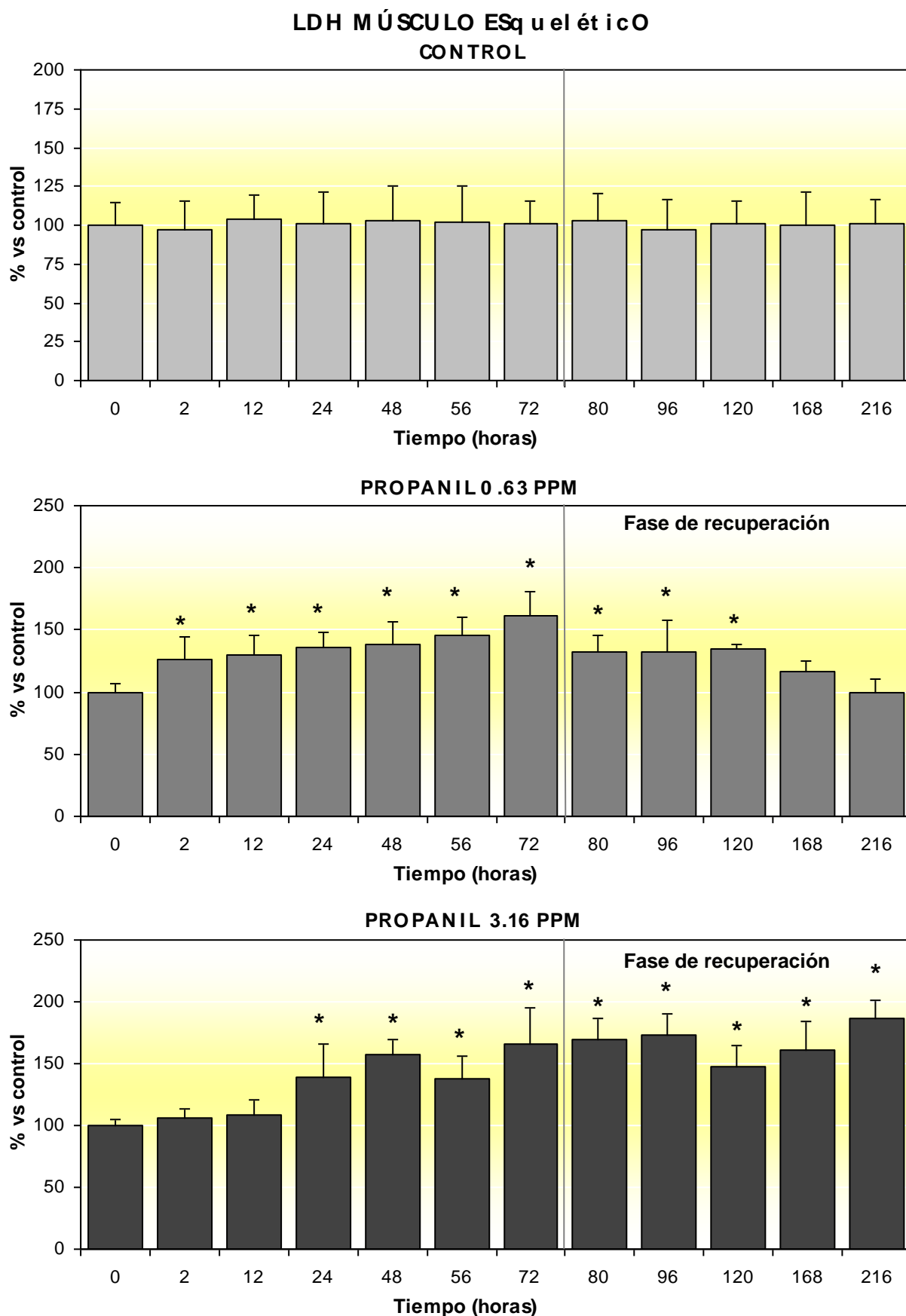
MÚSCULO ESQUELÉTICO							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	12	24	48	56	72
ALT	0.61 $\pm$ 0.07	0.62 $\pm$ 0.13	0.60 $\pm$ 0.07	0.44 $\pm$ 0.07*	0.57 $\pm$ 0.05	0.50 $\pm$ 0.12	0.48 $\pm$ 0.04
ALP	0.12 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.04*	0.17 $\pm$ 0.038*	0.19 $\pm$ 0.03*	0.21 $\pm$ 0.02*	0.22 $\pm$ 0.05*	0.20 $\pm$ 0.02*
$\gamma$ -GT	0.13 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.04*	0.16 $\pm$ 0.03*	0.16 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.02*	0.22 $\pm$ 0.04*	0.16 $\pm$ 0.04
LDH	116.75 $\pm$ 6.07	123.93 $\pm$ 8.98	126.13 $\pm$ 14.60	162.93 $\pm$ 31.01*	183.71 $\pm$ 14.25*	160.74 $\pm$ 22.21*	193.06 $\pm$ 34.32*
CC	2277.84 $\pm$ 142.65	1668.57 $\pm$ 100.28*	1795.84 $\pm$ 282.48*	1637.43 $\pm$ 454.32*	1195.34 $\pm$ 158.50*	1353.60 $\pm$ 288.74*	815.41 $\pm$ 179.04*
CH	0.20 $\pm$ 0.06	0.44 $\pm$ 0.07*	0.65 $\pm$ 0.22*	0.49 $\pm$ 0.09*	0.53 $\pm$ 0.09*	0.43 $\pm$ 0.07*	0.53 $\pm$ 0.16*
Fase de Recuperación (Horas)							
	80	96	120	168	216		
ALT	0.82 $\pm$ 0.09*	0.91 $\pm$ 0.15*	0.74 $\pm$ 0.14	0.54 $\pm$ 0.13	0.64 $\pm$ 0.20		
ALP	0.18 $\pm$ 0.02*	0.17 $\pm$ 0.03*	0.10 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02		
$\gamma$ -GT	0.18 $\pm$ 0.01*	0.18 $\pm$ 0.03*	0.17 $\pm$ 0.03*	0.18 $\pm$ 0.02*	0.18 $\pm$ 0.02*		
LDH	197.71 $\pm$ 20.20*	202.25 $\pm$ 19.31*	172.49 $\pm$ 19.19*	188.05 $\pm$ 26.63*	217.85 $\pm$ 17.57*		
CC	1066.09 $\pm$ 220.15*	1198.82 $\pm$ 358.52*	1182.82 $\pm$ 237.72*	913.84 $\pm$ 81.84*	706.13 $\pm$ 194.18*		
CH	0.52 $\pm$ 0.16*	0.63 $\pm$ 0.08*	0.57 $\pm$ 0.08*	0.53 $\pm$ 0.08*	0.56 $\pm$ 0.10*		



**Figura 37.** Actividad enzimática ALT (% vs. 0 horas) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 38.** Actividad enzimática ALP (% vs. 0 horas) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 39.** Actividad enzimática LDH (% vs. 0 horas) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

El análisis estadístico de estos resultados mostró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el valor control y todos los determinados entre las 2 y las 96 h de experimento (anexo 8.3: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 3.8; test de Duncan, figura 3.15).

#### **4.2.2.13.3. Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH)**

En las tablas 40 y 41 se expresan los valores de la actividad enzimática LDH ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) en el músculo esquelético de anguilas expuestas a propanil.

Tal y como se refleja en la figura 39, donde se representan gráficamente los resultados obtenidos en forma de porcentajes, al exponer a los animales a 0.63 mg/L de propanil se observó un aumento de la actividad LDH ya desde el inicio del experimento, que se mantuvo homogéneo durante el intervalo entre las 2-56 h de exposición, con un aumento medio del 35%. El análisis estadístico de los resultados no encontró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para los valores comprendidos entre estos tiempos de muestreo (test de Duncan, anexo 8.3: figura 3.17). La máxima actividad enzimática se registró a las 72 h de exposición con un 60% sobre el valor a las 0 h. Las alteraciones observadas en la actividad LDH se prolongaron durante la 2ª parte del experimento, con un aumento medio también del 35% entre las 80 y las 120 h, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre estos valores. Una vez ubicados los animales en agua sin plaguicida, se recuperaron los valores de partida tras 48 h en estas condiciones (tabla 40), y a partir de este tiempo no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores a los diferentes tiempos de medida y el determinado a las 0 h como control.

En el caso de los animales procedentes del experimento con 3.16 mg/L la actividad LDH muscular sufrió un aumento paulatino y estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) desde las 24 h de exposición (40%), que alcanzó su máximo entre las 72 y las 96 h de experimento, con un aumento medio sobre el valor control durante este periodo del 69%. Durante la fase de recuperación, a diferencia de lo observado en los animales expuestos a 0.63 mg/L, donde la actividad se recuperó tras 96 h de permanencia en agua no contaminada, en este caso la actividad LDH se mantuvo alterada a lo largo de toda la experiencia ( $p < 0.05$ ), de manera que tras 6 días en estas condiciones aún se registró un 86% de incremento (tabla 41).

El análisis estadístico ratificó estos resultados: en el tratamiento con 0.63 mg/L de propanil, el ANOVA señaló la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ), que el test de Duncan ( $p < 0.05$ ) estableció entre la actividad a las 0 h y las actividades comprendidas entre las 2 y las 120 h (anexo 8.3: tabla 3.9 y figuras 3.17 y 3.18). El ANOVA correspondiente para el experimento con 3.16 mg/L indicó la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre los valores medidos a diferentes tiempos y el control, que el posterior test de Duncan determinó ( $p < 0.05$ ) entre las actividades enzimáticas determinadas a las 0 h y el resto de los tiempos, salvo a las 2 y las 12 h.

#### **4.2.2.13.4. Actividad $\gamma$ -Glutamil Transferasa ( $\gamma$ -GT)**

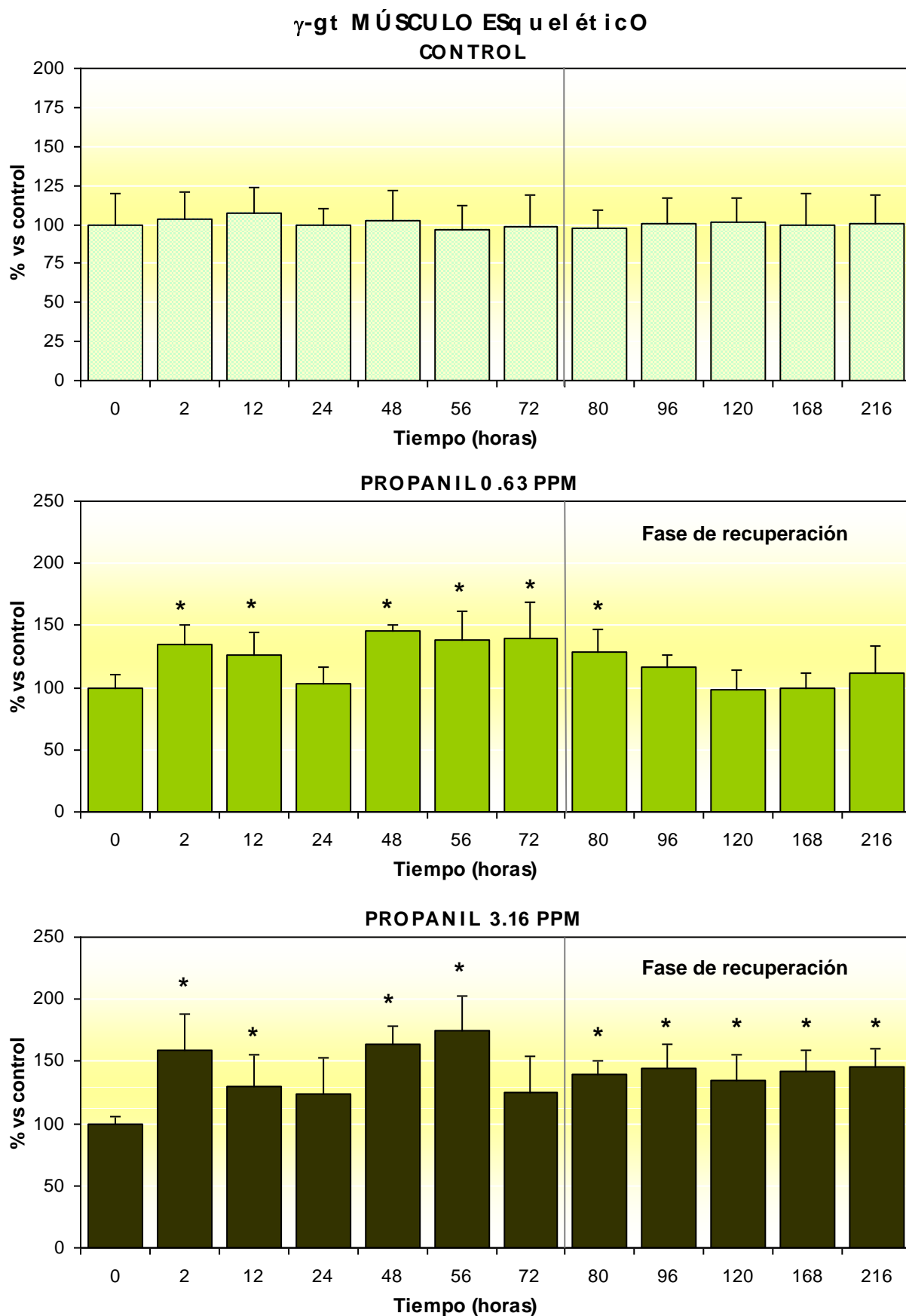
La exposición a 0.63 mg/L de propanil provocó un aumento de la actividad enzimática  $\gamma$ -GT ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) (tabla 40, figura 40), estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) entre 2-80 h del experimento, máximo a las 48 h de exposición con un aumento del 45% sobre el valor inicial. Este aumento de la actividad se mantuvo estabilizado entre las 48 y las 80 h del experimento, no observándose diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre estos valores (test de Duncan, anexo 8.3: figura 3.20). A partir de este momento, que se corresponde con 8 h de permanencia de los animales en la fase de recuperación, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) frente al control, tal y como confirmó el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.3: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 3.10; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 3.20).

La exposición de las anguilas a una concentración superior de propanil provocó un mayor y más rápido aumento de la actividad  $\gamma$ -GT en la musculatura esquelética de los animales experimentales, que se prolongó prácticamente durante toda la experiencia con 3.16 mg/L, tal y como se refleja en la tabla 41 y la figura 40. La máxima actividad se registró a las 56 h de exposición, con un 75% sobre el valor a las 0 h. Durante toda la fase de recuperación se mantuvo un incremento medio de la actividad del 40%, de modo que después de 144 h en agua limpia no se restauraron los niveles normales de esta actividad ( $p < 0.05$ ). Aunque durante la fase de exposición se observaron fluctuaciones en la actividad  $\gamma$ -GT, durante la fase de recuperación el aumento observado se mantuvo muy homogéneo, puesto que no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores determinados a lo largo de esta fase (test de Duncan, anexo 8.3: figura 3.19). El análisis estadístico ratificó estos resultados: se evidenció la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la actividad a las 0 h y en el resto de los tiempos salvo a las 24 y 72 h de la fase de exposición (anexo 8.3: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 3.10; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 3.19).

#### **4.2.2.14. Musculatura esquelética: Contenido Calórico**

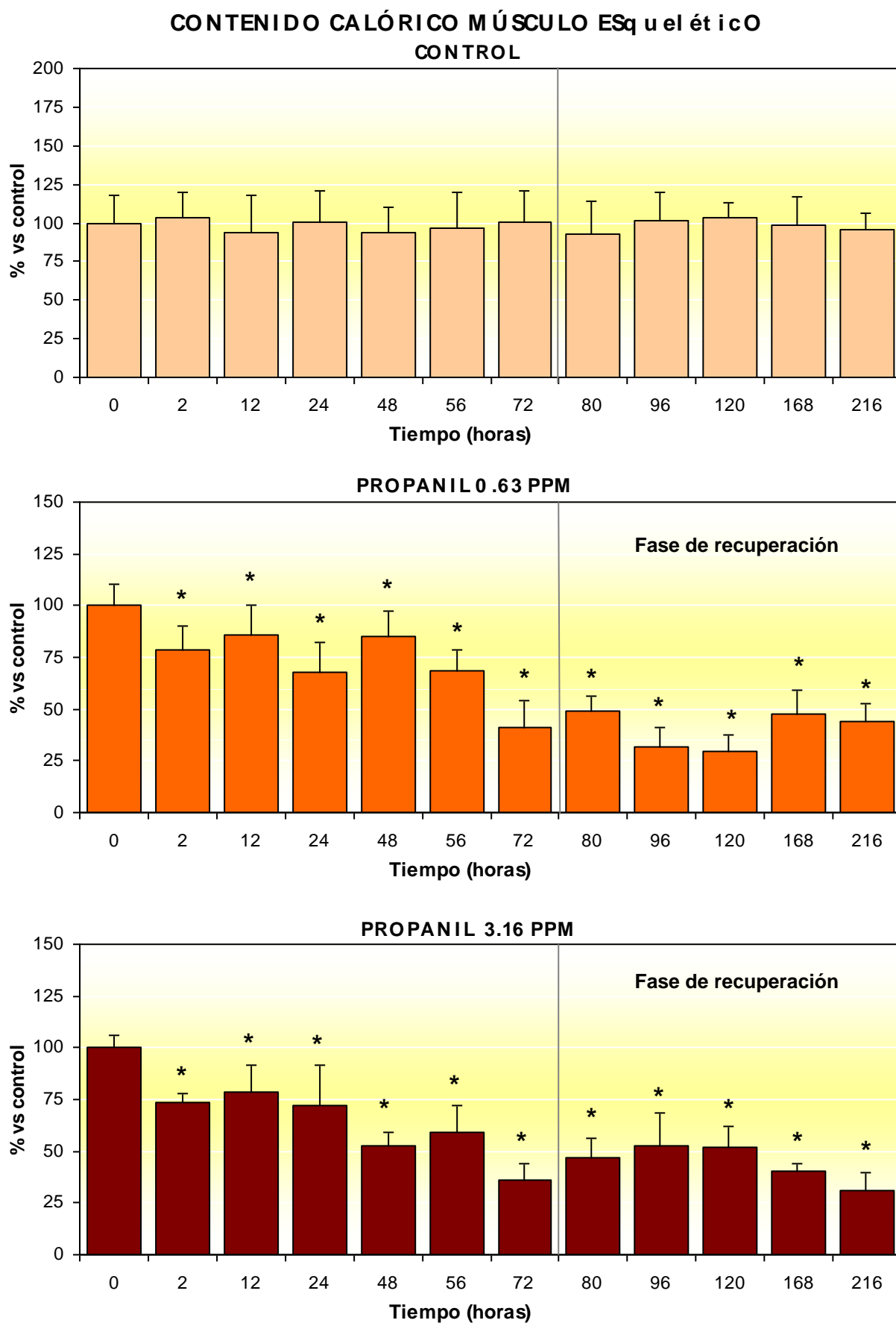
Se observó un descenso del contenido calórico de la musculatura esquelética de los animales expuestos al herbicida propanil, constatándose además una correlación lineal entre las concentraciones de propanil utilizadas ( $r = 0.78$ , tabla 43). Esta disminución fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) ya desde primeras horas de exposición (2 h) y se prolongó durante las 216 horas que duró la experiencia independientemente del ensayo de donde procedieron los animales, tal y como evidenció el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.3: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 3.11; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figuras 3.21 y 3.22),.

A las 2 h de exposición a 0.63 mg/L de propanil las reservas energéticas (cal/g) descendieron un 21% respecto de las determinadas a las 0 h. Se observaron fluctuaciones a lo



**Figura 40.** Actividad enzimática  $\gamma$ -GT (% vs. 0 horas) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .





**Figura 41.** Contenido calórico (% vs. 0 horas) en la musculatura esquelética de la anguilla *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

largo del tiempo durante la fase de exposición, aunque en cualquier caso fueron siempre estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) con el control. El mínimo valor para el contenido calórico durante esta 1ª fase se determinó al finalizar la misma, a las 72 h, con sólo un 41% del valor control (figura 41). Durante la fase de recuperación no se observó tendencia al restablecimiento del contenido calórico, de manera que las reservas continuaron mermadas, e incluso tras 24-48 h en estas condiciones constituyeron sólo un 30% de las reservas iniciales. Cabe señalar que el contenido calórico muscular fue inferior al 50% durante toda esta 2ª fase del experimento (tabla 40, figura 41).

Tal y como queda reflejado en la tabla 41, la reducción en el contenido calórico muscular fue más drástica en la experiencia con la concentración más elevada de propanil, fundamentalmente durante la fase de exposición: a las 2 h los niveles supusieron un 73% de los iniciales, valor que fue descendiendo progresivamente hasta las 72 h de exposición, donde sólo representaron un 36%. Una vez en la 2ª fase, y al igual que ocurría con la experiencia previa, tampoco se observó recuperación de los niveles de referencia, de manera que la energía fisiológicamente disponible durante esta fase no fue superior al 50%, e incluso representó sólo un 31% respecto al valor inicial al final de la experiencia (figura 41).

En la tabla 42 se comparan los porcentajes de reducción de glucógeno, proteínas totales y lípidos (colesterol y triglicéridos) en la musculatura esquelética al finalizar las fases de exposición (72 h) y recuperación (216 h), en las dos experiencias con propanil. Asimismo se detallan los porcentajes en los que se distribuyó el contenido calórico entre las diferentes reservas energéticas a las 0 h, 72 h y 216 h de experimento, que coinciden con el inicio y final de la fase de exposición y final de la fase de recuperación.

Al igual que ocurrió en el hígado, en la experiencia con 0.63 mg/L de propanil la mayor movilización al finalizar la fase de exposición la sufrió el glucógeno muscular, con un porcentaje de reducción del 77%, acompañado de una menor movilización tanto de proteínas como de lípidos, con unos porcentajes de reducción bastante similares, del 59% y del 54% respectivamente. Sin embargo, los porcentajes de reducción tanto de proteínas totales como de lípidos musculares fue casi el doble de lo que ocurría en el hígado (apdo 4.3.7). Conjuntamente, estas movilizaciones se tradujeron en una disminución del 59% del contenido calórico registrado en la musculatura esquelética al finalizar la fase de exposición (72 h).

Una vez finalizada la fase de recuperación se observó un ligero restablecimiento de las reservas de glucógeno, con un porcentaje de reducción del 59%. Algo similar sucedió con las reservas lipídicas, de manera que a las 216 h del experimento se determinó un porcentaje de reducción menor, del 42%. Se observó, sin embargo, una nula recuperación del componente proteico, de hecho los porcentajes de reducción al finalizar las dos fases del experimento

fueron idénticos (59%). El contenido calórico al finalizar la fase de recuperación mostró todavía un descenso del 56% respecto al control.

En las anguilas sometidas a 3.16 mg/L de propanil, también se observó que la reserva más utilizada en el músculo al finalizar la fase de exposición fue el glucógeno, con un porcentaje de reducción similar en ambos experimentos (76%). En este caso, las anguilas hicieron un mayor uso de las reservas proteicas si nos atenemos al mayor porcentaje de reducción, del 69% a las 72 h. La reducción del contenido lipídico al finalizar la 1ª fase del experimento fue del 39%. Todo ello confirmaría los bajos niveles de contenido calórico observados tras 72 h de permanencia de los animales en un medio con 3.16 mg/L de herbicida, donde la energía fisiológicamente disponible estuvo muy mermada y no fue superior al 36% del valor al comienzo del experimento.

Al igual que ocurría en el hígado, no se observó recuperación alguna de los niveles de glucógeno, proteínas totales o lípidos en las anguilas pre-tratadas con la concentración más elevada de propanil una vez eliminado éste del medio, como confirman los datos obtenidos al finalizar la fase de recuperación (72, 70 y 61% de reducción respectivamente), lo cual avalaría la mayor reducción del contenido calórico del músculo al finalizar esta experiencia con 3.16 mg/L (31% del valor a las 0 h).

**Tabla 42.** Porcentajes de reducción de las reservas energéticas en la musculatura esquelética de *Anguilla anguilla* a las 0, 72 y 216 horas de cada experiencia con propanil, y porcentajes en los que se distribuyó el contenido calórico entre los diferentes parámetros energéticos a estos mismos tiempos.

1/50 CL <sub>50</sub> -96 h: 0.63 mg/L propanil						
	Glucógeno	Proteínas	Lípidos	Glucógeno	Proteínas	Lípidos
0 h	0	0	0	2	83	15
72 h	77	59	54	1	82	17
216 h	59	59	42	1	78	21
1/10 CL <sub>50</sub> -96 h: 3.16 mg/L propanil						
	Glucógeno	Proteínas	Lípidos	Glucógeno	Proteínas	Lípidos
0h	0	0	0	2	83	15
72 h	76	69	39	1	73	26
216 h	72	70	61	1	79	20

En cuanto a la distribución de la energía fisiológicamente disponible entre los diferentes metabolitos energéticos en el músculo de las anguilas a las 0 h, se observa que el mayor porcentaje, un 83%, lo constituyen las proteínas, seguido de los lípidos, con un 15%, mientras que las reservas de glucógeno sólo representan un 2%, independientemente del experimento del que procedan.

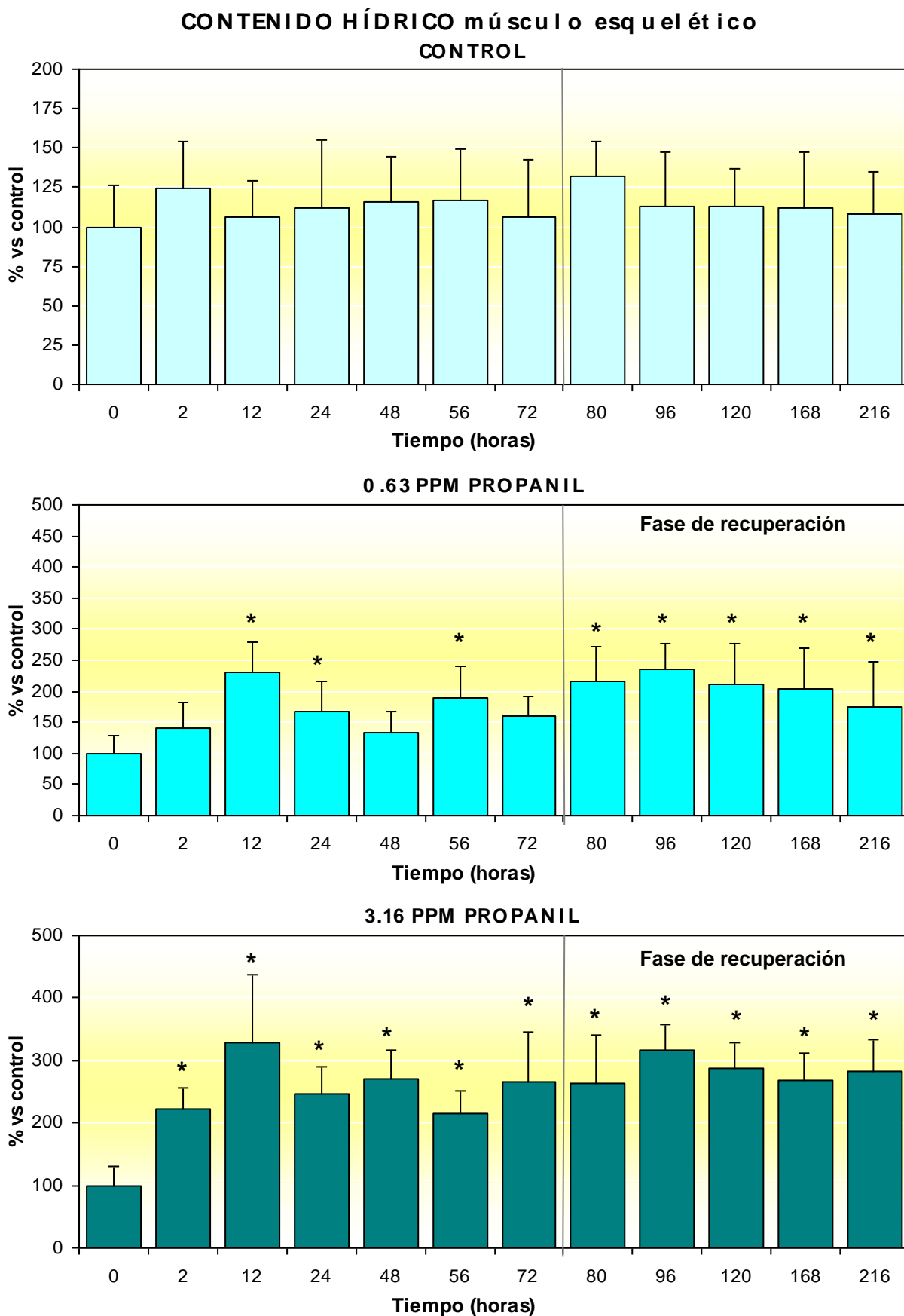
En el experimento con 0.63 mg/L de propanil, y tras la movilización experimentada por las diferentes variables energéticas después de 72 h de exposición, el contenido calórico quedó distribuido como sigue: un 82% correspondió a las proteínas totales, un 17% a los lípidos y un 1% al glucógeno. Al final del experimento, la ligera recuperación de las reservas glucogénicas y lipídicas unido a la nula recuperación de las proteínas totales, se reflejó en los porcentajes en los que se distribuyó el contenido calórico: un 78% de proteínas totales y un 21% de lípidos y un 1% de glucógeno.

En la experiencia con 3.16 mg/L, la mayor movilización de las proteínas musculares se tradujo en que la energía fisiológicamente disponible a partir de éstas se viera reducida desde un 83% inicial hasta un 73% después de 72 h de contacto con el herbicida. Mientras, los lípidos, con un menor descenso, llegaron a representar el 26% del contenido calórico muscular tras el periodo de exposición (15% a las 0 h). El glucógeno muscular también sufrió una importante movilización (76%), no obstante, su aporte al contenido calórico muscular es muy bajo (2% a las 0 h). Tras la fase de recuperación las proteínas totales volvieron a aumentar hasta un 79%. Se observó, sin embargo, un descenso de los lípidos, que de representar un 26% al finalizar la fase de exposición (72 h), pasaron a representar un 20% tras seis días de permanencia de los animales en agua limpia (216 h de experimento), debido a una mayor movilización de estos últimos respecto de la observada al final de la exposición.

#### **4.2.2.15. *Musculatura esquelética: Contenido Hídrico***

En las tablas 40 y 41 se muestran los niveles relativos al contenido hídrico en el músculo esquelético de anguilas procedentes de los distintos experimentos.

Se observaron alteraciones en el equilibrio hídrico muscular en las anguilas procedentes de los experimentos con el herbicida (figura 42). En anguilas expuestas a la concentración menor (0.63 mg/L), las diferencias con el control se hicieron significativas ( $p < 0.05$ ) en algunos tiempos de medida durante la fase de exposición y ya de un modo continuo durante toda la fase de recuperación, según los resultados del análisis estadístico (anexo 8.3: ANOVA ( $p < 0.0005$ ), tabla 3.11; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 3.21). A los 4 días desde el inicio del experimento se observó el máximo aumento en el contenido hídrico, con un incremento del 135% vs. control. Al final de la experiencia el valor determinado fue un 75% superior al valor tomado como control (tabla 40 y figura 42).



**Figura 42.** Contenido hídrico (% vs. 0 horas) en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

Las alteraciones en el equilibrio hídrico muscular fueron más evidentes en los peces procedentes del experimento con la concentración más elevada (figura 42). El ANOVA (anexo 8.3, tabla 3.11) demostró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0005$ ), que el test de Duncan ( $p < 0.05$ ) concretó entre el valor a las 0 h y el determinado a todos los demás tiempos en anguilas expuestas 3.16 mg/L (anexo 8.3, figura 3.22). La máxima alteración se observó a las 12 h de exposición, con un aumento del 225% vs. control. Si bien se observaron oscilaciones a lo largo de la fase de exposición, el contenido hídrico siempre fue superior al 100% durante esta 1ª fase, con un 166% sobre el valor inicial al finalizar la misma (72 h). Este mismo grado de alteración se observó incluso una vez transferidas las anguilas a agua sin propanil, de manera que durante toda la fase de recuperación el incremento medio del contenido hídrico fue del 180% respecto a las 0 h, no observándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los valores determinados entre las 72 y las 216 h de experimento (test de Duncan, anexo 8.3: figura 3.22). Por tanto, al finalizar el experimento (9 días) el contenido hídrico estaba incrementado aún en un 180% (tabla 41).

**4.2.2.16. Musculatura Esquelética: Correlación Lineal entre Parámetros (2)**

En la tabla 43 se muestran las correlaciones lineales calculadas entre los valores obtenidos para las enzimas, contenido calórico (CC) y contenido hídrico (CH) estudiadas en este tejido entre las dos experiencias con propanil.

**Tabla 43.** Rectas de regresión ( $y = a + bx$ ) y coeficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre los valores relativos a los enzimas, contenido calórico (CC) y contenido hídrico (CH) estudiados en la musculatura esquelética de las anguilas procedentes de ambos experimentos con propanil.

0.63 mg/L / 3.16 mg/L	$y = a + bx$	$r$
ALT	$Y = 0.31 + 0.517 x$	0.67
ALP	$y = -0.05 + 1.54 x$	0.71
LDH	$y = 135.5 + 0.227 x$	0.14
$\gamma$ -GT	$y = 0.08 + 0.663 x$	0.58
CC	$y = 386.2 + 0.694 x$	0.78
CH	$y = 0.12 + 1.119 x$	0.77

En el caso de las enzimas, solamente parece ajustarse a una función lineal la actividad ALP, como evidencia el coeficiente de correlación lineal obtenido ( $r= 0.71$ ). También el contenido calórico así como el contenido hídrico, muestran la existencia de una buena correlación lineal entre los valores obtenidos en ambos experimentos con propanil ( $r= 0.78$  y  $r= 0.79$  respectivamente). Sin embargo, y a diferencia de lo observado en el hígado, en el caso de las actividades enzimáticas ALT y  $\gamma$ -GT la correlación lineal obtenida en el músculo es peor ( $r= 0.67$  y  $r= 0.58$  respectivamente). Tampoco la enzima LDH se ajustó a una función lineal, como pone de manifiesto el bajo coeficiente de correlación obtenido ( $r= 0.14$ ).

#### **4.2.2.17. Cerebro: Metabolitos**

##### **4.2.2.17.1. Glucosa**

Se registró una rápida caída de los niveles de glucosa cerebrales (mg/g) en las anguilas procedentes de ambos experimentos desde los primeros momentos de contacto con el herbicida (tablas 44 y 45 y figura 43), seguido de un posterior aumento, de modo que durante ambos experimentos, independientemente de la concentración ensayada, se observaron fluctuaciones que siguieron la misma pauta en ambos casos ( $r=0.75$ , tabla 46).

En la experiencia con 0.63 mg/L de propanil, los niveles disminuyeron drásticamente, de manera que ya a las 2 h representaban un 40% del valor a las 0 h. A partir de este momento se observó una tendencia a aumentar y recuperar los niveles de glucosa cerebral, de modo que al finalizar esta fase (72 h) los valores estaban incluso aumentados significativamente ( $p<0.05$ ) frente al valor inicial.

También se observó una drástica reducción de la glucosa cerebral en las anguilas expuestas a una concentración mayor de propanil, de modo que a las 2 h de experimento representaba sólo un 33% del valor inicial y que se mantuvo muy disminuida hasta 48 h después, momento en el cual los valores se incrementaron de manera significativa frente al control ( $p<0.05$ ), al igual que a las 56 h. A partir de este tiempo de medida no se observaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) con el control, de modo que antes de finalizar la fase de exposición se lograron equilibrar los valores de glucosa cerebral.

De cualquier modo, y en ambos experimentos, durante la fase de recuperación se volvieron a determinar diferencias significativas ( $p<0.05$ ) con el valor inicial a partir de 120 h de experimento, probablemente como reajustes de las alteraciones fisiológicas producidas en los animales durante su exposición a este herbicida. Así, los niveles de glucosa al finalizar el experimento fueron todavía estadísticamente diferentes ( $p<0.05$ ) con el valor a las 0 h, representando un 70% o un 50% respecto de éste, según los animales procedieran del experimento con 0.63 mg/L o con 3.16 mg/L de propanil.

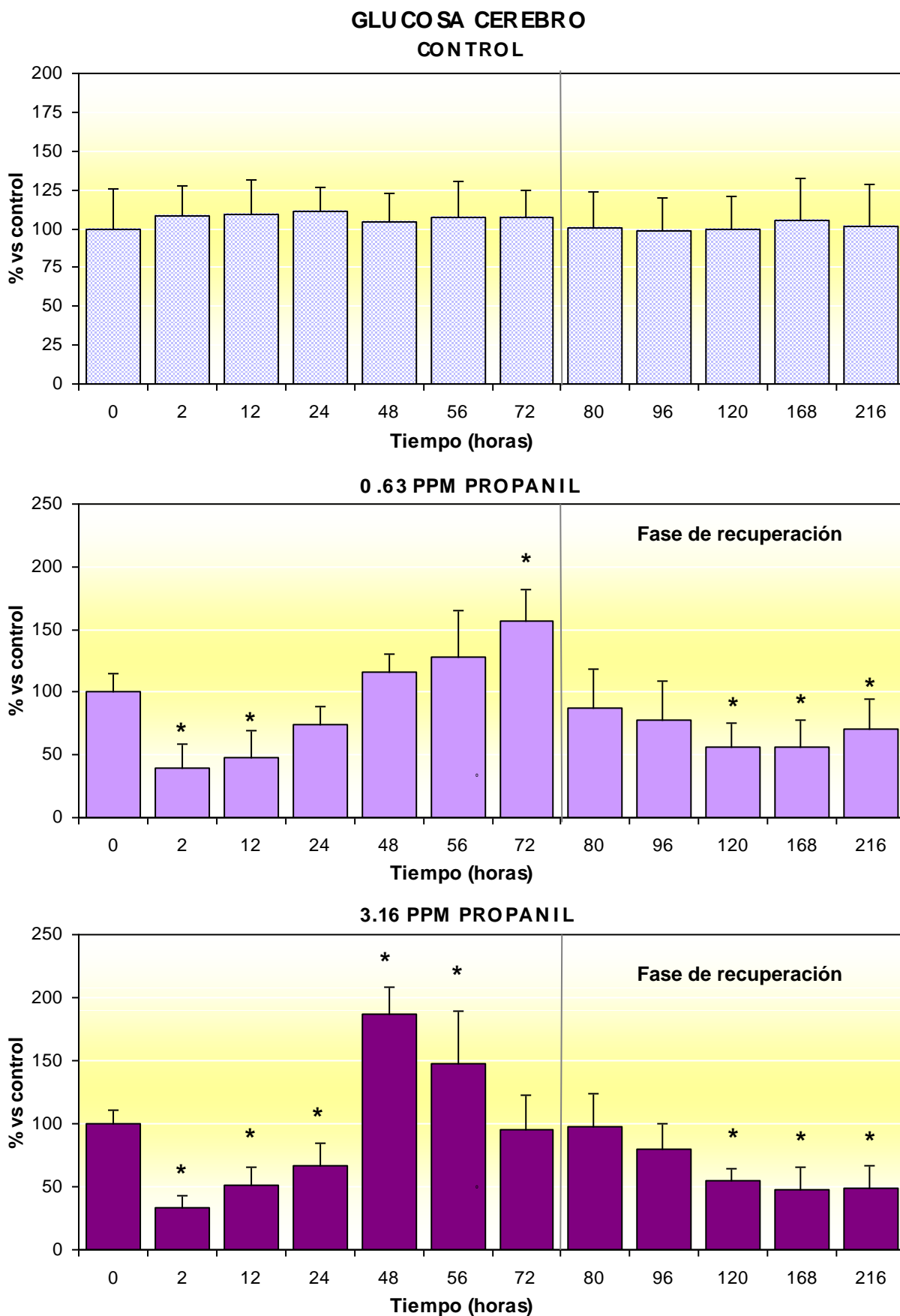
**Tabla 44.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido en glucosa (mg/g), lactato (mg/g) y proteínas totales (mg/g) y de las actividades enzimáticas ALP ( $^{\circ}$ mol/min/g) y LDH ( $^{\circ}$ mol/min/g) en el cerebro de la anguilla *A. anguilla* a lo largo 72 horas de exposición a **0.63 mg/L** de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\ast p < 0.05$ ).

CEREBRO							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	12	24	48	56	72
GLUCOSA	0.57 $\pm$ 0.09	0.23 $\pm$ 0.11*	0.27 $\pm$ 0.12*	0.43 $\pm$ 0.08	0.66 $\pm$ 0.09	0.73 $\pm$ 0.21	0.90 $\pm$ 0.15*
LACTATO	1.09 $\pm$ 0.21	1.65 $\pm$ 0.24*	2.13 $\pm$ 0.17*	1.87 $\pm$ 0.26*	2.09 $\pm$ 0.22*	2.01 $\pm$ 0.10*	1.75 $\pm$ 0.10*
PROTEINAS	67.11 $\pm$ 8.24	68.21 $\pm$ 12.78	74.29 $\pm$ 11.94	77.51 $\pm$ 13.58	58.88 $\pm$ 13.32	46.80 $\pm$ 6.79*	37.32 $\pm$ 7.69*
ALP	1.61 $\pm$ 0.18	2.21 $\pm$ 0.45*	2.46 $\pm$ 0.36*	2.07 $\pm$ 0.29*	1.87 $\pm$ 0.26	1.77 $\pm$ 0.35	1.91 $\pm$ 0.15
LDH	17.68 $\pm$ 2.29	24.54 $\pm$ 3.56*	19.59 $\pm$ 2.96	22.69 $\pm$ 6.34	24.84 $\pm$ 4.92*	16.56 $\pm$ 4.12	21.59 $\pm$ 6.01
Fase de Recuperación (Horas)							
	80	96	120	168	216		
GLUCOSA	0.50 $\pm$ 0.18	0.44 $\pm$ 0.18	0.32 $\pm$ 0.11*	0.323 $\pm$ 0.12*	0.403 $\pm$ 0.14*		
LACTATO	1.74 $\pm$ 0.09*	1.67 $\pm$ 0.15*	1.49 $\pm$ 0.04*	1.49 $\pm$ 0.11*	1.48 $\pm$ 0.08*		
PROTEINAS	43.55 $\pm$ 5.59*	54.64 $\pm$ 2.77*	52.84 $\pm$ 7.15*	47.82 $\pm$ 6.40*	46.46 $\pm$ 2.92*		
ALP	2.05 $\pm$ 0.17*	2.01 $\pm$ 0.39*	1.95 $\pm$ 0.40	2.10 $\pm$ 0.20*	1.96 $\pm$ 0.08		
LDH	23.78 $\pm$ 5.40*	20.22 $\pm$ 4.38	21.68 $\pm$ 4.16	20.20 $\pm$ 3.93	26.64 $\pm$ 1.91*		



**Tabla 45.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido en glucosa (mg/g), lactato (mg/g) y proteínas totales (mg/g) y de las actividades enzimáticas ALP ( $\mu$ mol/min/g) y LDH ( $\mu$ mol/min/g) en el cerebro de la anguilla *A. anguilla* a lo largo 72 horas de exposición a 3.16 mg/L de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\ast p < 0.05$ ).

CEREBRO							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	12	24	48	56	72
GLUCOSA	0.40 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.04*	0.21 $\pm$ 0.06*	0.27 $\pm$ 0.07*	0.75 $\pm$ 0.09*	0.59 $\pm$ 0.17*	0.38 $\pm$ 0.11
LACTATO	1.01 $\pm$ 0.13	2.13 $\pm$ 0.15*	2.33 $\pm$ 0.21*	2.58 $\pm$ 0.23*	2.08 $\pm$ 0.24*	2.26 $\pm$ 0.12*	2.34 $\pm$ 0.17*
PROTEINAS	67.11 $\pm$ 8.24	54.53 $\pm$ 9.25*	69.21 $\pm$ 5.46	52.24 $\pm$ 8.47*	54.13 $\pm$ 6.03*	56.37 $\pm$ 7.64*	43.61 $\pm$ 11.36*
ALP	1.64 $\pm$ 0.10	1.94 $\pm$ 0.28	2.57 $\pm$ 0.34*	1.85 $\pm$ 0.20*	2.09 $\pm$ 0.19*	2.17 $\pm$ 0.36*	2.31 $\pm$ 0.45*
LDH	20.81 $\pm$ 3.74	30.83 $\pm$ 2.66*	36.21 $\pm$ 6.82*	35.90 $\pm$ 5.25*	37.61 $\pm$ 6.55*	35.64 $\pm$ 3.76*	33.09 $\pm$ 2.30*
Fase de Recuperación (Horas)							
	80	96	120	168	216		
GLUCOSA	0.39 $\pm$ 0.10	0.32 $\pm$ 0.08	0.22 $\pm$ 0.04*	0.19 $\pm$ 0.07*	0.20 $\pm$ 0.07*		
LACTATO	1.87 $\pm$ 0.10*	1.71 $\pm$ 0.10*	1.67 $\pm$ 0.08*	1.58 $\pm$ 0.16*	1.99 $\pm$ 0.13*		
PROTEINAS	43.88 $\pm$ 5.91*	30.67 $\pm$ 2.99*	49.79 $\pm$ 10.34*	47.78 $\pm$ 8.66*	29.67 $\pm$ 4.20*		
ALP	2.21 $\pm$ 0.28*	2.17 $\pm$ 0.32*	2.29 $\pm$ 0.13*	2.19 $\pm$ 0.14*	1.96 $\pm$ 0.09*		
LDH	21.15 $\pm$ 1.52	13.95 $\pm$ 4.08*	14.75 $\pm$ 2.94*	20.30 $\pm$ 7.02	26.59 $\pm$ 5.25*		



**Figura 43.** Niveles de glucosa (% vs. 0 horas) en el cerebro de la anguilla *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

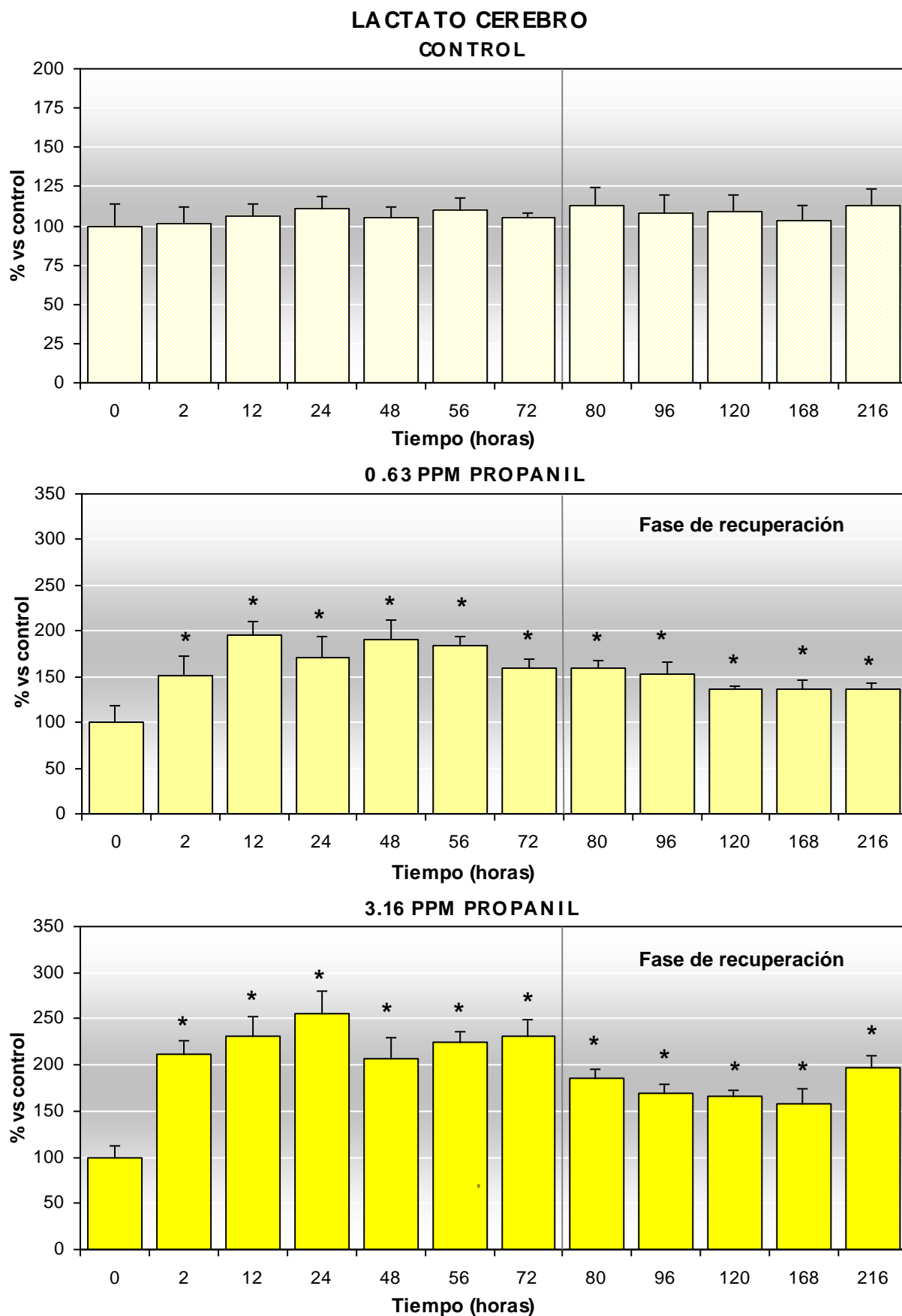
El ANOVA reveló la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) entre los valores determinados a lo largo de cada tratamiento con propanil, que el test de Duncan evidenció ( $p < 0.05$ ) entre los niveles a las 0 h y el resto de los tiempos salvo entre las 72-96 h en la experiencia con 3.16 mg/L, y entre las 0 h y las 2, 12 y 72 de la fase de exposición y las 120-216 h ya en la fase de recuperación en la experiencia con 0.63 mg/L (anexo 8.4: tabla 4.1, figuras 4.1 y 4.2).

#### **4.2.2.17.2. Lactato**

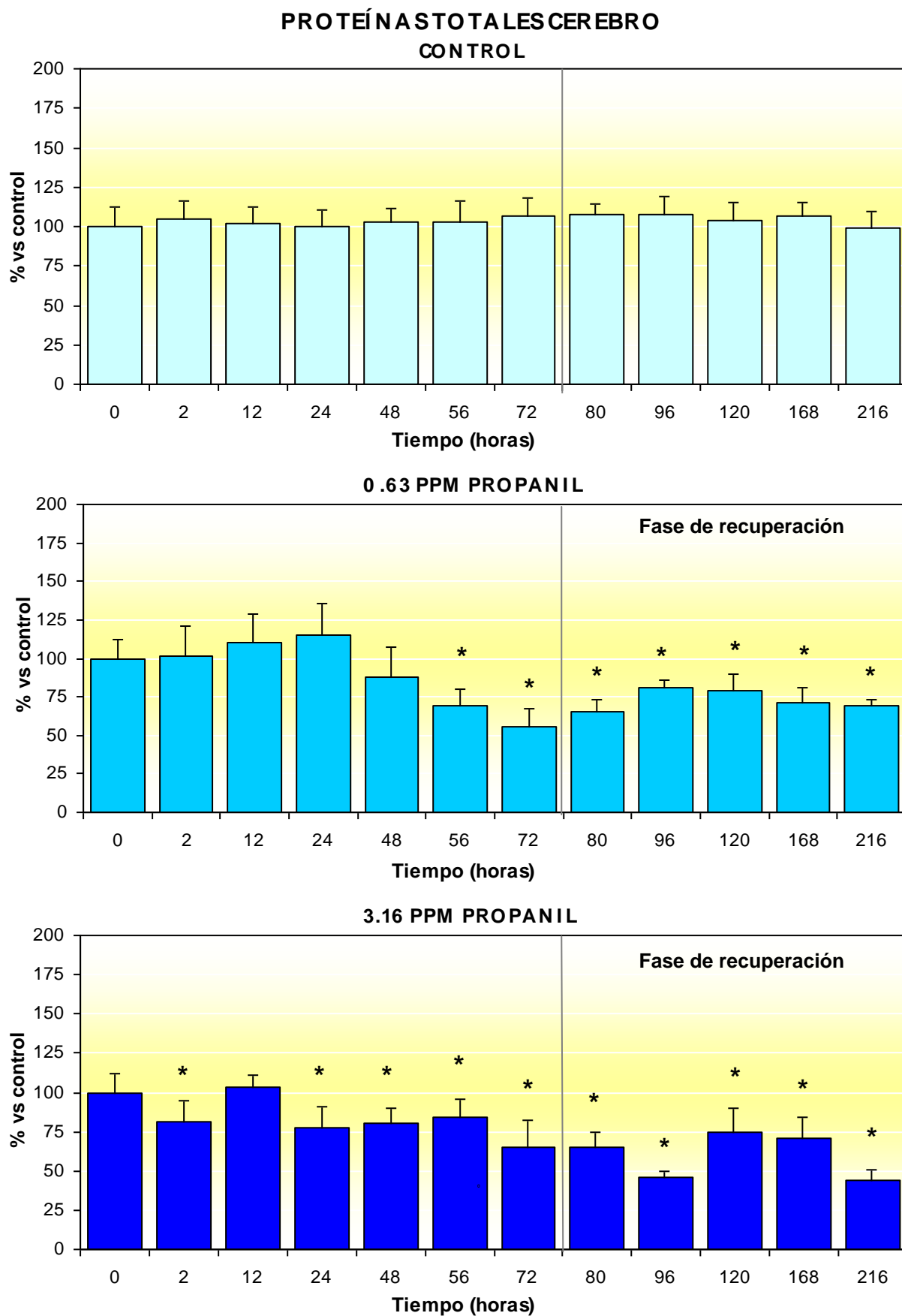
Esta drástica reducción de la glucosa cerebral (apdo. 4.3.17.1) estuvo acompañada de un aumento de los niveles lactato (mg/g) en los animales expuestos al plaguicida y que se prolongó hasta finalizar las experiencias (tablas 44 y 45). Este aumento se correlacionó linealmente entre las concentraciones de propanil empleadas, como evidenció el coeficiente de correlación lineal obtenido entre ambos experimentos ( $r = 0.81$ , tabla 46). Este incremento, estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) ya a las 2 h de exposición a 0.63 mg/L (51% vs. 0 h), alcanzó el máximo valor a las 12 h, con un aumento del 95% sobre el valor control (figura 44), que se mantuvo prácticamente hasta las 56 h de exposición. A partir de este momento se observó una tendencia progresiva a la recuperación: entre las 72 y las 96 h los niveles fueron de media ya un 57% superiores al inicial, y a partir de las 120 h (48 h en agua limpia) estuvieron aumentados sólo un 36% respecto al valor registrado al inicio de la experiencia (tabla 44).

El aumento de los niveles de lactato cerebrales fue aún más patente en anguilas expuestas a una concentración de propanil cinco veces superior (3.16 mg/L): desde el primer tiempo de medida el aumento fue ya del 110% sobre el control, alcanzando el máximo valor, un 155%, en las primeras 24 h de exposición (figura 44). Durante esta fase, si bien se observaron oscilaciones, los niveles estuvieron siempre aumentados por encima del 100% respecto al valor inicial. Al finalizar esta 1ª fase (72 h) fueron del 130% sobre el control (60% en el experimento con 0.63 mg/L). Este aumento durante la exposición de los animales a propanil se prolongó también durante toda fase de recuperación, de forma que tras seis días en agua sin plaguicida aún se determinaron valores un 95% superiores a los registrados al inicio de la experiencia (tabla 45).

El análisis de la varianza (anexo 8.4: tabla 4.2.) señaló la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores determinados a lo largo de los experimentos con propanil ( $p < 0.0001$ ). El test de Duncan demostró que tales diferencias eran significativas entre los valores a las 0 h y al resto de los tiempos en ambos experimentos (anexo 8.4: figuras 4.3 y 4.4).



**Figura 44.** Niveles de lactato (% vs. 0 horas) en el cerebro de la anguilla *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 45.** Niveles de proteínas totales (% vs. 0 horas) en el cerebro de la anguilla *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

### **4.2.2.17.3. Proteínas Totales**

Los niveles proteicos, expresados en mg/g, determinados en el cerebro de anguilas expuestas a propanil se muestran en las tablas 44 y 45.

En la experiencia con 0.63 mg/L se observó un descenso progresivo y significativo ( $p < 0.05$ ) desde las 56 h de exposición (del 30%) que fue máximo 24 h más tarde (a las 72 h), con un descenso del 45% sobre el valor control (figura 45). La movilización de las proteínas totales se prolongó también una vez transferidos los animales a agua sin herbicida, de forma que los niveles proteicos representaron un 73% de los determinados a las 0 h (27% de descenso) durante la 2ª fase del experimento. Esta disminución se mantuvo homogénea, de modo que el test de Duncan no reveló la existencia de diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores determinados durante toda esta 2ª fase (anexo 8.4: figura 4.5).

El análisis estadístico de los resultados reveló la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el valor control y los tomados entre las 56 y las 216 h del experimento (anexo 8.4: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 4.3; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 4.5).

En el experimento con la concentración de 3.16 mg/L se observó un descenso de los niveles proteicos del 20% desde el inicio hasta las 56 h de experimento, descenso que aún se incrementó a un 35% al final de la fase de exposición. No hubo tendencia a la recuperación de los valores iniciales una vez desaparecido el herbicida del medio, de hecho el mínimo valor se determinó tras 24 h en agua limpia (55%) y al final de la experiencia.

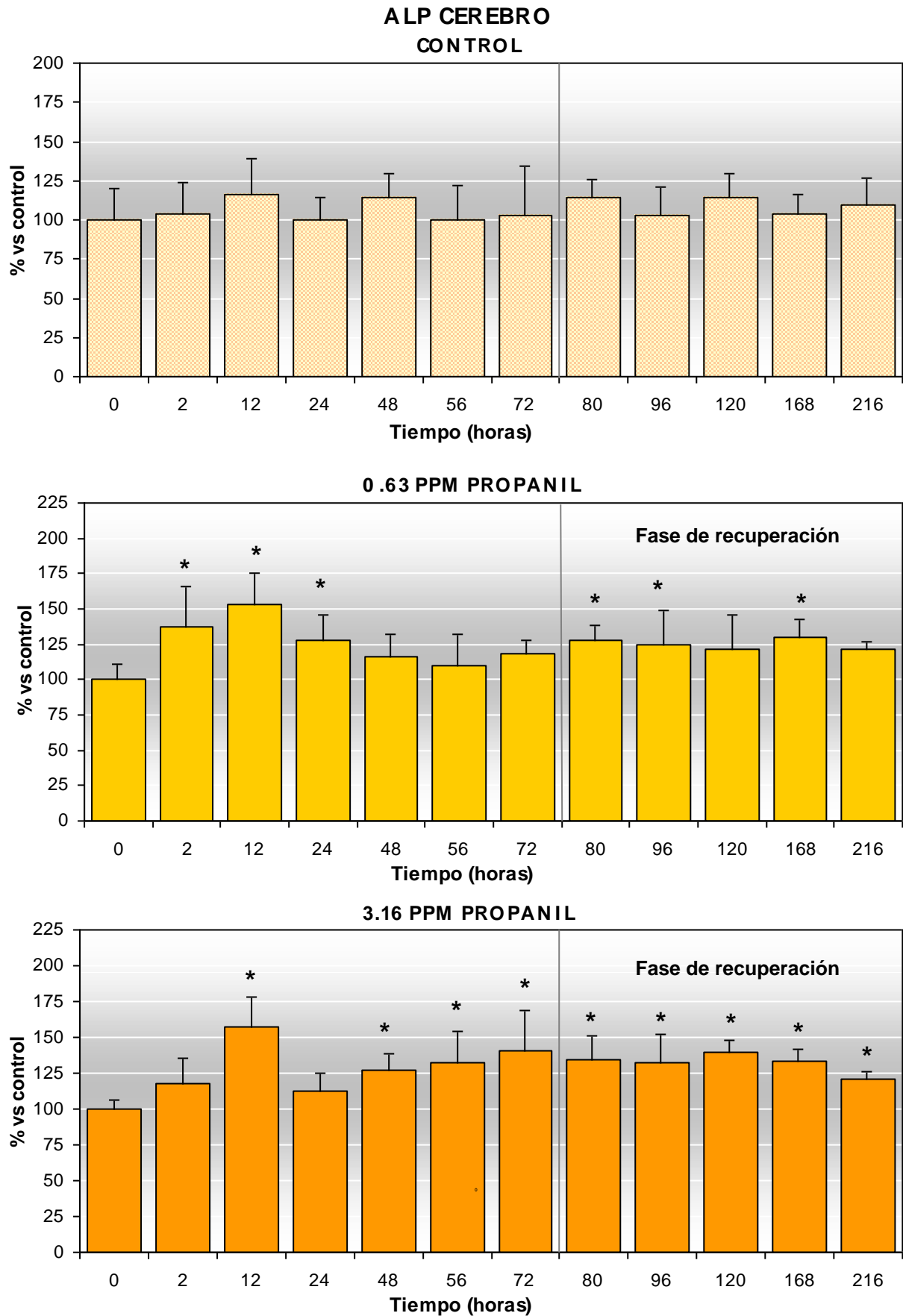
El análisis estadístico de los resultados mostró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el valor control y el resto de los tiempos excepto el tomado a las 12 h (anexo 8.4: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 4.3; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 4.6).

### **4.2.2.18. Cerebro: Enzimas**

#### **4.2.2.18.1. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP)**

La actividad enzimática fosfatasa alcalina (ALP) cerebral ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) en las anguilas durante los experimentos con propanil aparece detallada en las tablas 44 y 45 y representada gráficamente como porcentajes en la figura 46.

En los animales expuestos a 0.63 mg/L de propanil se observó una alteración de esta actividad cerebral durante las primeras 24 h de contacto de los animales con el herbicida (fase de exposición), con un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) durante este tiempo, que fue máximo a las 12 h con un 53% sobre la actividad inicial (tabla 44). También fueron significativos los aumentos determinados a las 80 y 96 h ya en la fase de recuperación (25% vs. 0 h) y a las 168 h (30% vs. 0 h), tal y como evidenció el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.4: ANOVA ( $p < 0.005$ ), tabla 5.4; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 4.7).



**Figura 46.** Actividad enzimática ALP (% vs. 0 horas) en el cerebro de la anguilla *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

El tratamiento con una concentración de propanil superior (3.16 mg/L), provocó un aumento de la actividad ALP estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) a partir de las 12 h de exposición, con un aumento del 55% sobre la actividad a las 0 h (figura 46), máximo aumento detectado durante la experiencia. Este incremento, si bien con oscilaciones, se prolongó hasta finalizar la fase de exposición, con 41% sobre la actividad inicial a las 72 h. No hubo posterior recuperación de la actividad ALP durante la 2ª fase del experimento, de manera que se mantuvo alterada, con un incremento medio del 32 %, durante toda la fase (el test de Duncan no detectó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los diferentes valores determinados a lo largo de la misma).

El análisis estadístico de los resultados del experimento con 3.16 mg/L reveló la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el valor inicial y el resto de los tiempos a excepción de las 2 y las 24 h (anexo 8.4: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 4.4; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 4.8).

#### **4.2.2.18.2. Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH)**

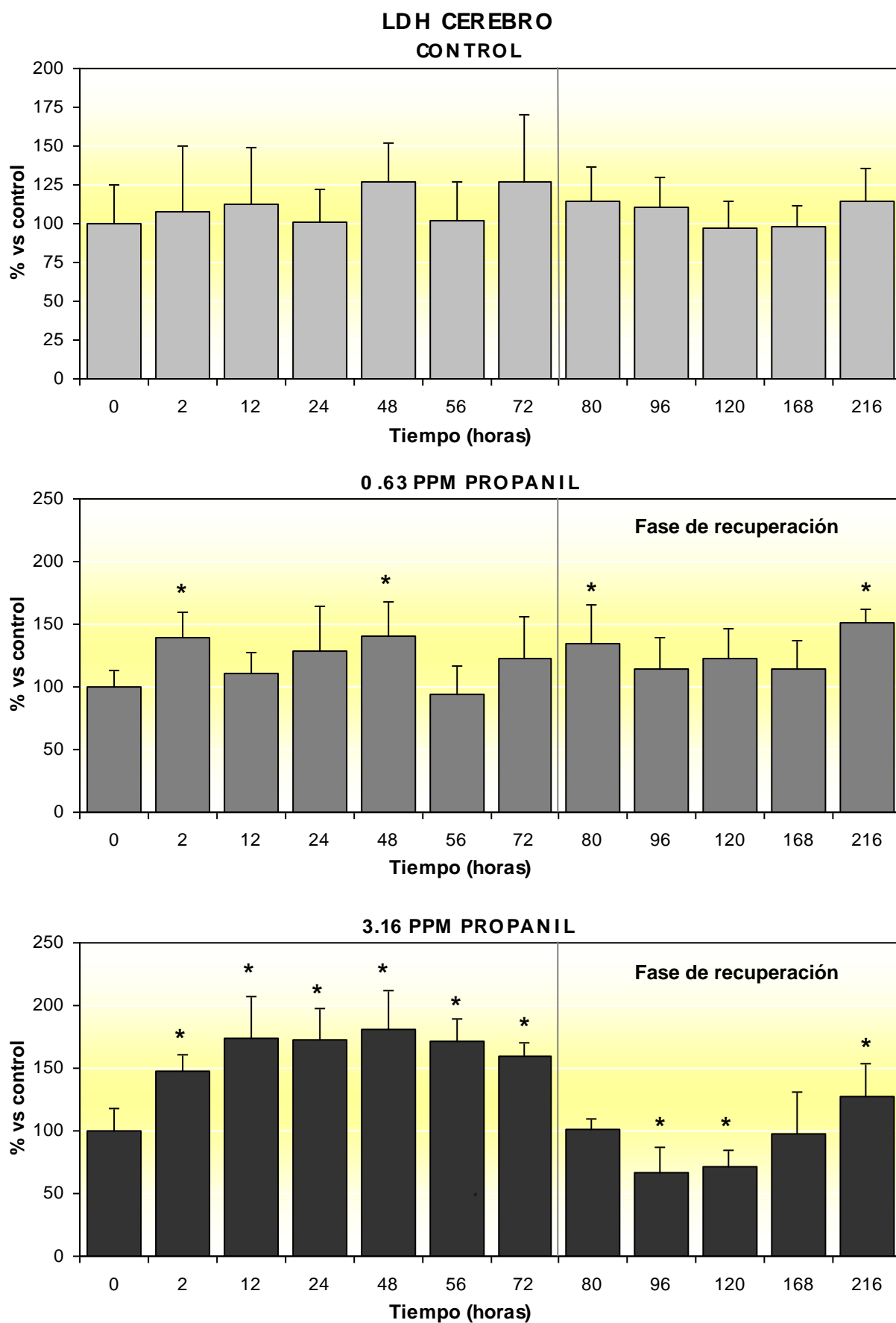
En las tablas 44 y 45 aparecen los valores correspondientes a la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) cerebral ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) de los animales expuestos a 0.63 y 3.16 mg/L de propanil.

En la figura 47 se observa como la actividad LDH cerebral sufrió alteraciones a lo largo de las fases de exposición, fundamentalmente en los animales expuestos a la concentración de propanil más elevada.

Durante la exposición a 0.63 mg/L de herbicida se observaron alteraciones en la función LDH, que en algunos casos (a las 2 y a las 48 h) fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), con un aumento del 40% sobre el valor control (figura 47). En la fase de recuperación también se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a las 80 h (35% vs. control) y a las 216 h de experimento (50% vs. control), tal y como puso de manifiesto el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.4: ANOVA ( $p < 0.005$ ), tabla 4.5; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 4.9).

Durante la exposición de las anguilas a 3.16 mg/L (concentración de propanil cinco veces superior) se observó una hiperactividad clara de la función LDH cerebral durante toda la fase de exposición (72 h). Así, se determinó un incremento significativo de la actividad ( $p < 0.05$ ) ya desde las 2 h (48%) que se mantuvo durante toda la fase, con un aumento del 70-80% entre las 12-56 h de medida. Una vez en la 2ª fase del experimento, se observaron importantes fluctuaciones a lo largo de la misma. Al finalizar el experimento la actividad continuó aumentada significativamente ( $p < 0.05$ ) (28% vs. control).





**Figura 47.** Actividad enzimática LDH (% vs. 0 horas) en el cerebro de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

El análisis estadístico reveló la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el valor a las 0 h y el resto de los tiempos excepto a 80 y 168 h del experimento con 3.16 mg/L (anexo 8.4: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 4.5; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 4.10).

#### 4.2.2.19. Cerebro: Correlación Lineal entre Parámetros

El estudio de la correlación lineal entre los valores determinados de los diferentes metabolitos y enzimas medidos en el cerebro de las anguilas procedentes de ambas experiencias con propanil aparecen en la tabla 46.

A la vista de los diferentes coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) obtenidos, la mejor correlación lineal entre los resultados de ambas experiencias se observó en el caso del lactato ( $r = 0.81$ ), También el efecto producido con la concentración más alta de herbicida sobre el contenido de glucosa cerebral sería ajustable a lo esperado a partir de los datos obtenidos con la concentración más baja del mismo, como así lo demuestra el coeficiente de correlación obtenido ( $r = 0.75$ ). Sin embargo, y a la vista de los resultados, los valores de proteínas totales en el cerebro ( $r = 0.60$ ) y de las actividades ALP y LDH cerebrales ( $r = 0.56$  y  $r = 0.10$ , respectivamente) serían poco correlacionables linealmente.

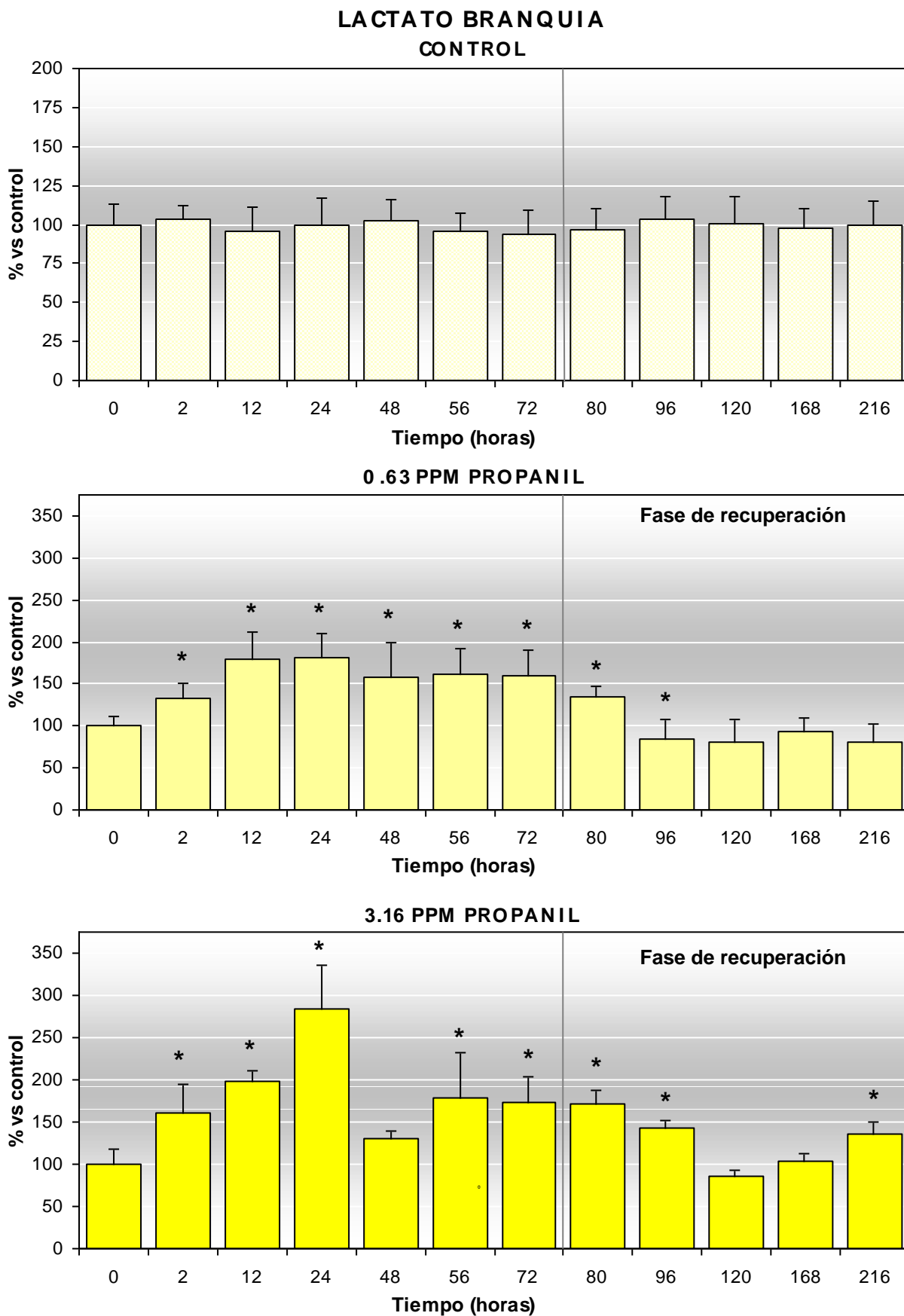
**Tabla 46.** Rectas de regresión ( $y = a + bx$ ) y coeficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre los valores relativos a los metabolitos y enzimas estudiados en el cerebro de las anguilas procedentes de ambos experimentos con propanil.

0.63 mg/L / 3.16 mg/L	$y = a + bx$	$r$
Glucosa	$y = 0.013 + 0.674 x$	0.75
Lactato	$y = -0.024 + 1.164 x$	0.81
Proteínas totales	$y = 0.527 + 0.583 x$	0.60
ALP	$y = 0.854 + 0.634 x$	0.56
LDH	$y = 20.84 + 0.294 x$	0.10

#### 4.2.2.20. Branquia: Metabolitos

##### 4.2.2.20.1. Lactato

Tal y como se refleja en las tablas 47 y 48 y figura 48, los niveles de lactato branquial (mg/g) aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en las anguilas expuestas a propanil,



**Figura 48.** Niveles de lactato (% vs. 0 horas) en la branquia de la anguilla *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

**Tabla 47.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido en lactato (mg/g) y proteínas totales (mg/g), de las actividades enzimáticas ALP ( $^{\circ}$ mol/min/g) y LDH ( $^{\circ}$ mol/min/g) y del contenido hídrico (CH) en la branquia de la anguilla *A. anguilla* a lo largo 72 horas de exposición a **0.63 mg/L** de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\rightarrow$ ) $p<0.05$ .

BRANQUIA						
Fase de Exposición (Horas)						
	0	2	12	24	48	72
LACTATO	0.51 $\pm$ 0.06	0.68 $\pm$ 0.09*	0.92 $\pm$ 0.17*	0.99 $\pm$ 0.15*	0.82 $\pm$ 0.21*	0.83 $\pm$ 0.16*
PROTEINAS	72.43 $\pm$ 4.97	55.42 $\pm$ 6.82*	67.75 $\pm$ 3.62	64.15 $\pm$ 8.72	59.90 $\pm$ 8.59*	54.41 $\pm$ 12.50*
ALP	0.44 $\pm$ 0.07	0.40 $\pm$ 0.11	0.40 $\pm$ 0.09	0.40 $\pm$ 0.06	0.38 $\pm$ 0.06	0.41 $\pm$ 0.05
LDH	16.00 $\pm$ 3.15	16.08 $\pm$ 6.00	18.70 $\pm$ 4.04	17.25 $\pm$ 4.85	17.45 $\pm$ 3.48	16.94 $\pm$ 1.92
CH	0.15 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.10	0.21 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.10	0.28 $\pm$ 0.06*	0.27 $\pm$ 0.04*
Fase de Recuperación (Horas)						
	80	96	120	168	216	
LACTATO	0.70 $\pm$ 0.06*	0.43 $\pm$ 0.12	0.42 $\pm$ 0.13	0.48 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.11	
PROTEINAS	51.72 $\pm$ 5.29*	52.76 $\pm$ 6.32*	36.07 $\pm$ 5.98*	41.57 $\pm$ 3.51*	36.74 $\pm$ 4.30*	
ALP	0.38 $\pm$ 0.08	0.33 $\pm$ 0.02*	0.29 $\pm$ 0.04*	0.20 $\pm$ 0.04*	0.19 $\pm$ 0.02*	
LDH	19.24 $\pm$ 1.51	18.42 $\pm$ 4.06	13.42 $\pm$ 2.04	12.79 $\pm$ 2.22	16.28 $\pm$ 3.55	
CH	0.25 $\pm$ 0.06*	0.26 $\pm$ 0.05*	0.28 $\pm$ 0.06*	0.26 $\pm$ 0.05*	0.16 $\pm$ 0.03	

**Tabla 48.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido en lactato (mg/g) y proteínas totales (mg/g), de las actividades enzimáticas ALP ( $^{\circ}$ mol/min/g) y LDH ( $^{\circ}$ mol/min/g) y del contenido hídrico (CH) en la branquia de la anguilla *A. anguilla* a lo largo 72 horas de exposición a 3,16 mg/L de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\rightarrow$ ) $p<0.05$ .

BRANQUIA							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	12	24	48	56	72
LACTATO	0.46 $\pm$ 0.08	0.75 $\pm$ 0.16*	0.92 $\pm$ 0.06*	1.32 $\pm$ 0.24*	0.60 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.25*	0.80 $\pm$ 0.14*
PROTEINAS	75.46 $\pm$ 4.29	47.25 $\pm$ 4.53*	63.60 $\pm$ 7.40*	65.88 $\pm$ 9.29*	53.33 $\pm$ 7.63*	55.95 $\pm$ 10.40*	53.85 $\pm$ 5.66*
ALP	0.43 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.06*	0.39 $\pm$ 0.08	0.42 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.08*	0.23 $\pm$ 0.05*	0.19 $\pm$ 0.04*
LDH	16.00 $\pm$ 3.15	14.20 $\pm$ 3.63	16.21 $\pm$ 3.34	13.03 $\pm$ 3.46	13.38 $\pm$ 3.08	12.22 $\pm$ 2.06	15.21 $\pm$ 5.21
CH	0.16 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.07*	0.33 $\pm$ 0.05*	0.34 $\pm$ 0.11*	0.39 $\pm$ 0.11*	0.34 $\pm$ 0.07*	0.36 $\pm$ 0.11*
Fase de Recuperación (Horas)							
	80	96	120	168	216		
LACTATO	0.80 $\pm$ 0.07*	0.67 $\pm$ 0.04*	0.40 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.04	0.63 $\pm$ 0.07*		
PROTEINAS	41.94 $\pm$ 4.30*	37.34 $\pm$ 6.02*	41.08 $\pm$ 7.93*	41.45 $\pm$ 5.38*	37.76 $\pm$ 5.61*		
ALP	0.20 $\pm$ 0.03*	0.16 $\pm$ 0.07*	0.17 $\pm$ 0.06*	0.33 $\pm$ 0.06*	0.37 $\pm$ 0.04		
LDH	15.10 $\pm$ 3.68	13.53 $\pm$ 3.15	15.83 $\pm$ 3.64	11.59 $\pm$ 4.10	18.19 $\pm$ 7.08		
CH	0.30 $\pm$ 0.06*	0.29 $\pm$ 0.10*	0.30 $\pm$ 0.09*	0.29 $\pm$ 0.11*	0.18 $\pm$ 0.03		

observándose un mayor aumento en los animales expuestos a la concentración más alta ( $r=0.78$ , tabla 49).

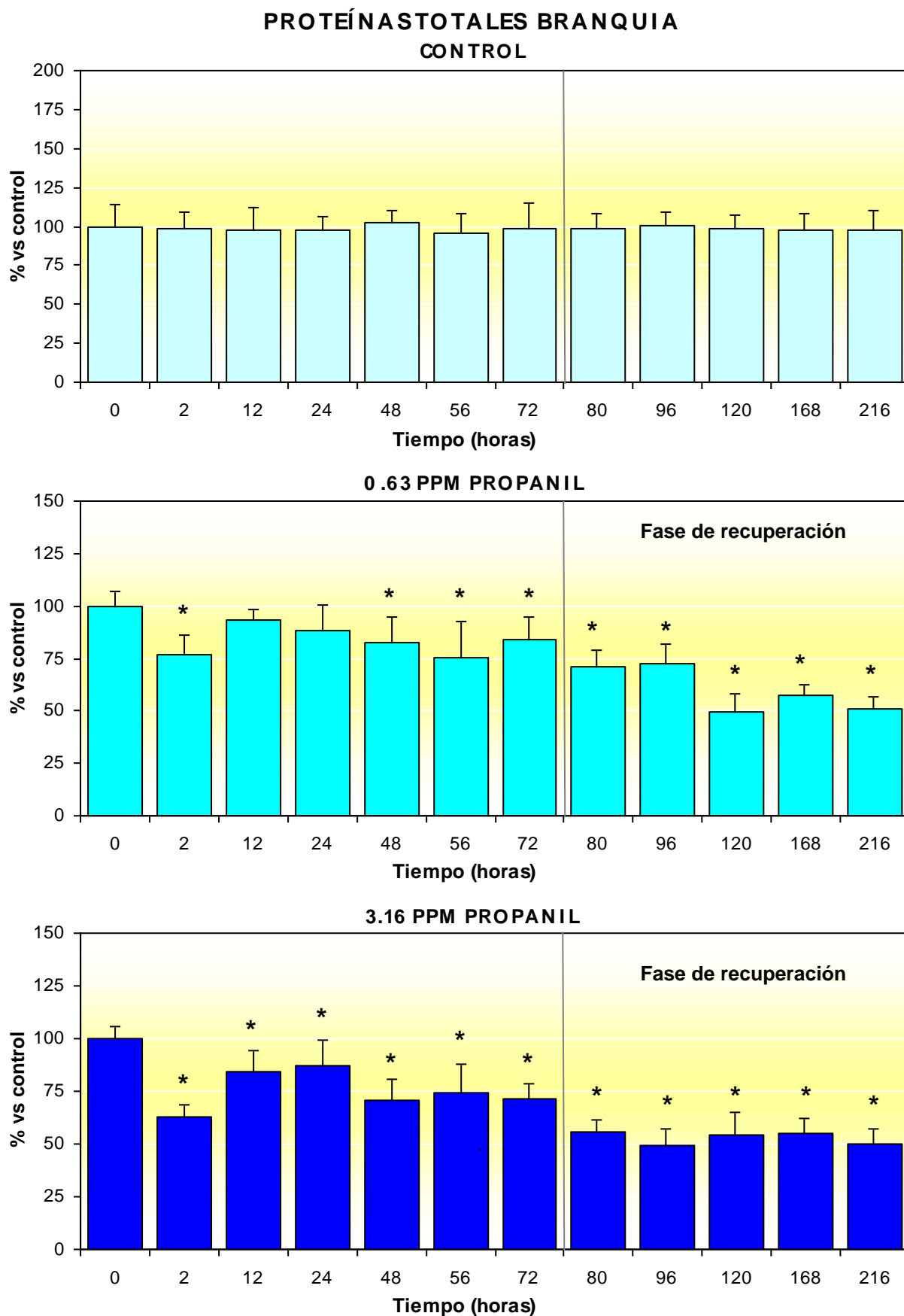
Este aumento del lactato branquial, ya estadísticamente significativo ( $p<0.05$ ) desde las 2 h de exposición a 0.63 mg/L, fue máximo entre las 12-24 h de exposición, con un 80% sobre el valor a las 0 h. Las diferencias con el control se mantuvieron hasta finalizar la fase de exposición, detectándose un aumento medio del 60% entre las 48 y las 72 h, que se mantuvo homogéneo durante este intervalo, tal y como evidenció el test de Duncan (anexo 8.5: figura 5.1). La ubicación de los animales en medio no contaminado permitió la recuperación de los valores iniciales tras 24 h de permanencia de las anguilas pre-tratadas en agua limpia, de modo que ya no se registraron diferencias significativas ( $p<0.05$ ) con el valor inicial a partir de las 96 h de experimento (anexo 8.5: ANOVA ( $p<0.0001$ ), tabla 5.1; test de Duncan ( $p<0.05$ ), figura 5.1).

Las anguilas tratadas con 3.16 mg/L de propanil, mostraron un drástico aumento de los niveles de lactato branquial desde primeras horas del inicio del experimento, de manera que a las 24 h se registró el máximo incremento, del 184% sobre el valor control. En este experimento se observaron importantes oscilaciones, de forma que desde las 56 h hasta finalizar la fase de exposición el aumento fue menor, con un promedio del 76% sobre las 0 h, que se mantuvo tras 8 h de permanencia en agua exenta de herbicida (72% a las 80 h). A partir de 24 h en esta fase (96 h de experimento) se observaron marcadas fluctuaciones en los valores de lactato branquial, de modo que entre las 120-168 h de medida no se determinaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Las diferencias volvieron a ser estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) al finalizar el experimento (216 h), con un aumento de los niveles de lactato del 35%, tal y como evidenció el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.5: ANOVA ( $p<0.0001$ ), tabla 5.1; test de Duncan ( $p<0.05$ ), figuras 5.1 y 5.2).

#### **4.2.2.20.2. Proteínas Totales**

En las tablas 47 y 48 se indican los valores correspondientes a los niveles de proteínas totales (mg/g) determinados en las branquias de las anguilas procedentes de los ensayos con propanil.

Tal y como se refleja además en la figura 49, se observó un descenso estadísticamente significativo ( $p<0.05$ ) desde primeras horas de exposición de las anguilas a ambas concentraciones de propanil, observándose un alto grado de correlación lineal entre los resultados obtenidos de ambos experimentos ( $r=0.87$ , tabla 49). Este descenso fue progresando a lo largo del tiempo independientemente de la concentración de plaguicida a la que se expusieron.



**Figura 49.** Niveles de proteínas totales (% vs. 0 horas) en la branquia de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

En las anguilas expuestas a 0.63 mg/L las diferencias observadas se hicieron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al control a partir de las 48 h de exposición, observándose la máxima reducción de los niveles proteicos entre las 120-216 h de experimento. Durante este intervalo, los niveles representaron un promedio del 53% respecto del valor inicial, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ellos (test de Duncan, anexo 8.5: figura 5.3).

El análisis de la varianza corroboró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) (anexo 8.5: tabla 5.2) y el test de Duncan evidenció diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los niveles proteicos a las 0 h y los registrados a todos los tiempos de medida a excepción de las 12-24 h de la fase de exposición (anexo 8.5: figura 5.3).

En las anguilas expuestas a 3.16 mg/L los niveles proteicos se movilizaron desde el inicio del experimento, con una disminución media del 30% en el intervalo comprendido entre las 48 y las 72 h de exposición. Este descenso, progresivo a lo largo del experimento, fue máximo entre las 80-216 h, manteniéndose uniforme durante toda la fase de recuperación tal y como manifestó el test de Duncan (anexo 8.5: figura 5.4). Durante esta fase los niveles proteicos representaron una media del 50% respecto de los iniciales (figura 49, tabla 48).

El análisis de la varianza mostró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) (anexo 8.5: tabla 5.2) y el posterior test de Duncan mostró que las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) se daban entre los valores determinados a las 0 h y al resto de los tiempos (anexo 8.5: figura 5.4).

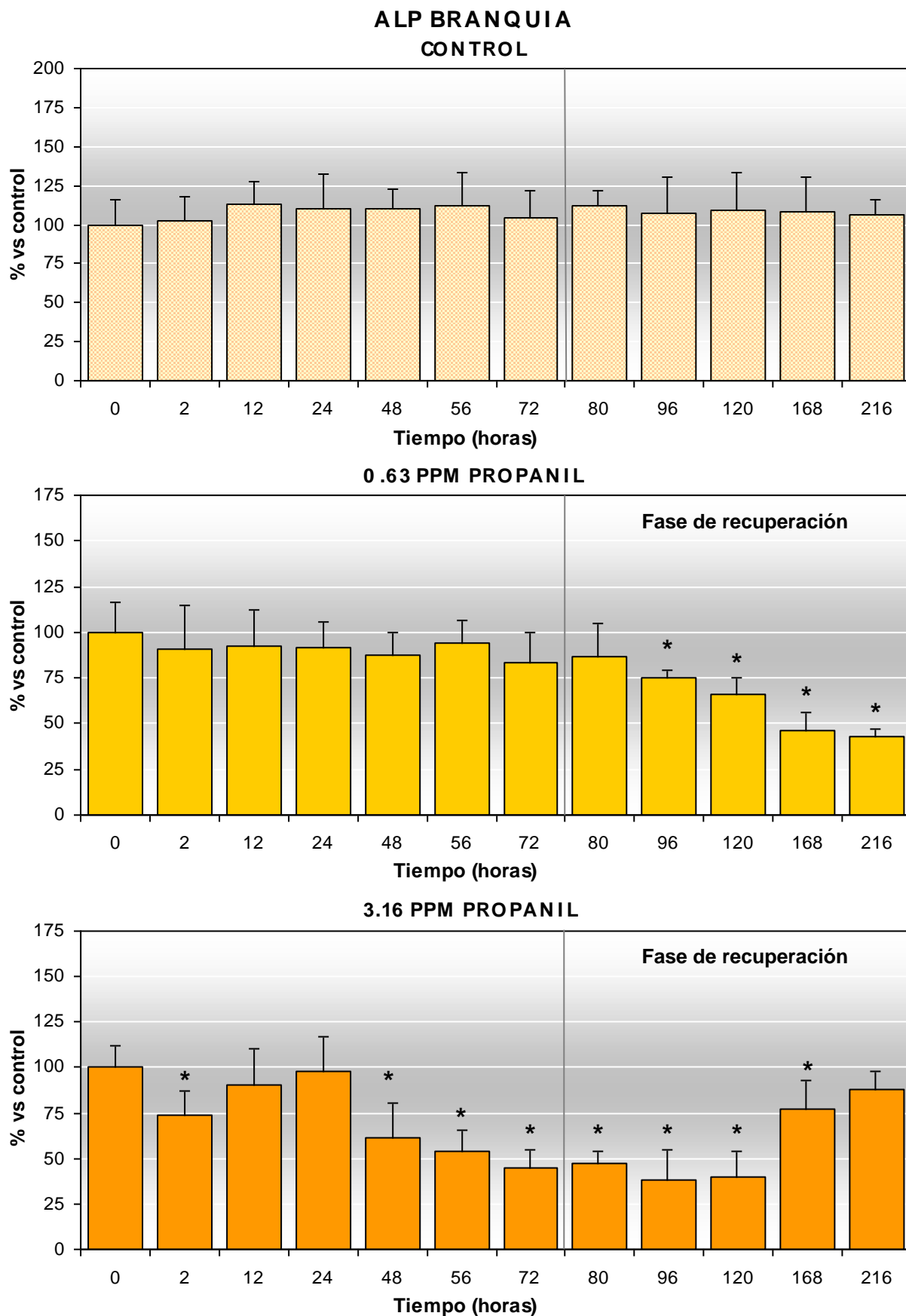
#### **4.2.2.21. Branquia: Enzimas**

##### **4.2.2.21.1. Actividad Fosfatasa Alcalina (ALP)**

Los resultados correspondientes a la actividad fosfatasa alcalina (ALP) branquial ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) aparecen indicados en las tablas 47 y 48, e ilustrados gráficamente en la figura 50, en forma de porcentajes respecto al control.

El normal funcionamiento de este enzima se vio alterado en las anguilas expuestas a propanil: al exponerlas a una concentración de 0.63 mg/L se observó una tendencia a la disminución de la actividad, que sólo fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) durante la 2ª fase del experimento, con un descenso progresivo de la actividad desde un 25% a las 96 h, hasta más del 50% al finalizar el experimento. La mínima actividad se registró entre las 168-216 h, representando sólo un 45% de la actividad inicial. El análisis estadístico corroboró estos resultados: el análisis de la varianza señaló la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) que el test de Duncan a posteriori ( $p < 0.05$ ) concretó entre la actividad a las 0 h y la comprendida entre las 96 y las 216 h (anexo 8.5: tabla 5.3, figura 5.5).





**Figura 50.** Actividad enzimática ALP (% vs. 0 horas) en la branquia de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

En las anguilas expuestas a 3.16 mg/L se observó la misma pauta, de modo que la actividad ALP disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) ya a partir de 56 h de la fase de exposición, con un descenso del 40% que se prolongó hasta finalizar la exposición (55% de descenso a las 72 h) y también a lo largo de la fase de recuperación, tal y como evidenció el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.5: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 5.3; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 5.6). La mínima actividad se registró entre las 56-120 h de experimento, con un valor inferior al 40% de la actividad inicial. El test de Duncan confirmó la no existencia de diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores comprendidos entre estos tiempos (anexo 8.5: figura 5.6). A partir de 120 h de permanencia de las anguilas en agua sin plaguicida se observó una tendencia a la recuperación, y al finalizar la experiencia ya no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) frente al control como se representa en la figura 50.

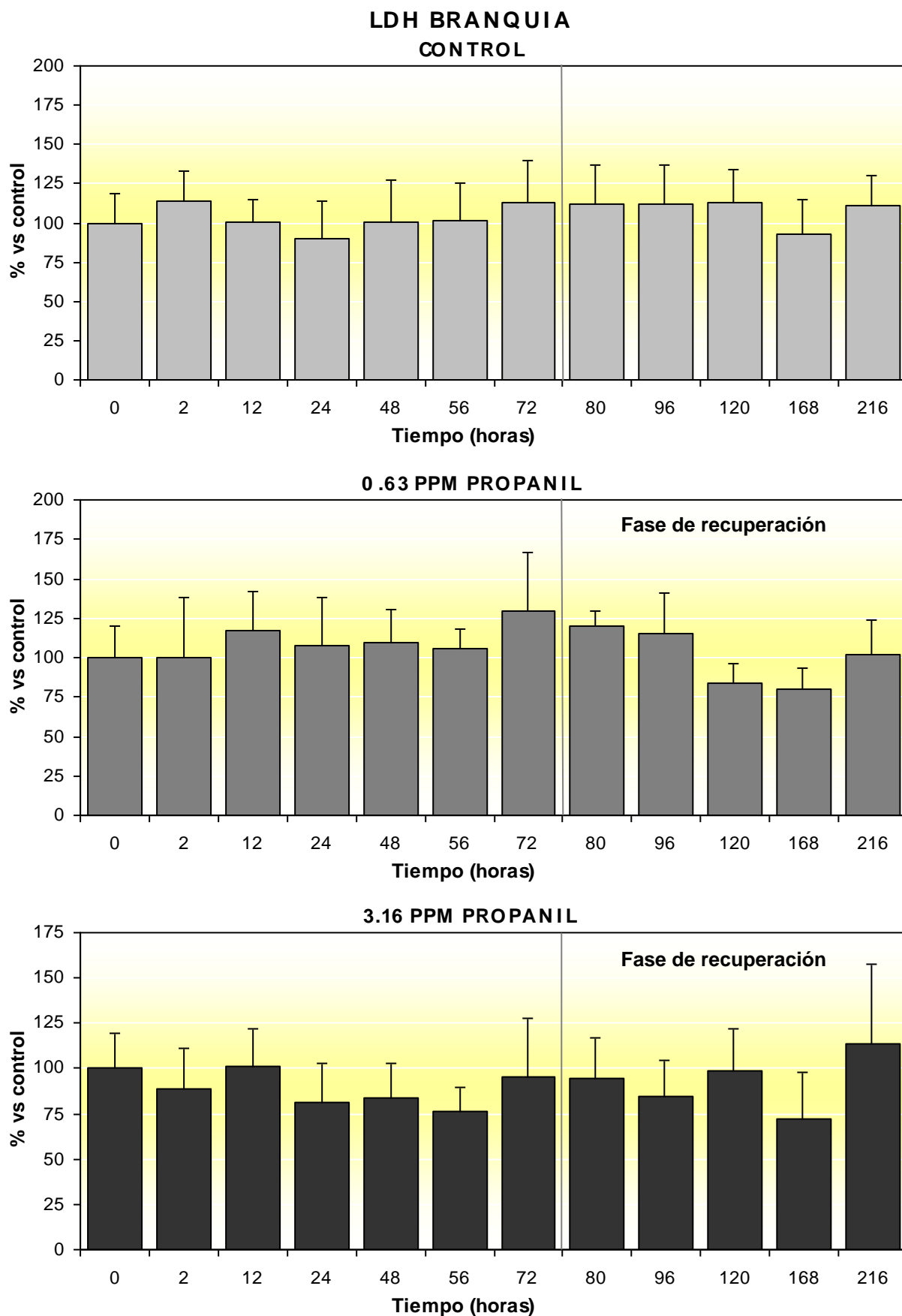
#### **4.2.2.21.2. Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH)**

Los resultados obtenidos para la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) branquial ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) se detallan en la figura 51 y en las tablas 47 y 48. Se observó poca alteración en la actividad LDH branquial en las anguilas procedentes de los experimentos con el herbicida, de manera que aunque se observaron ciertas fluctuaciones entre los valores determinados a los diferentes tiempos de medida, éstas no llegaron a ser estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) frente al valor inicial, como quedó reflejado tras el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.5: tabla 5.4 y figuras 5.7 y 5.8).

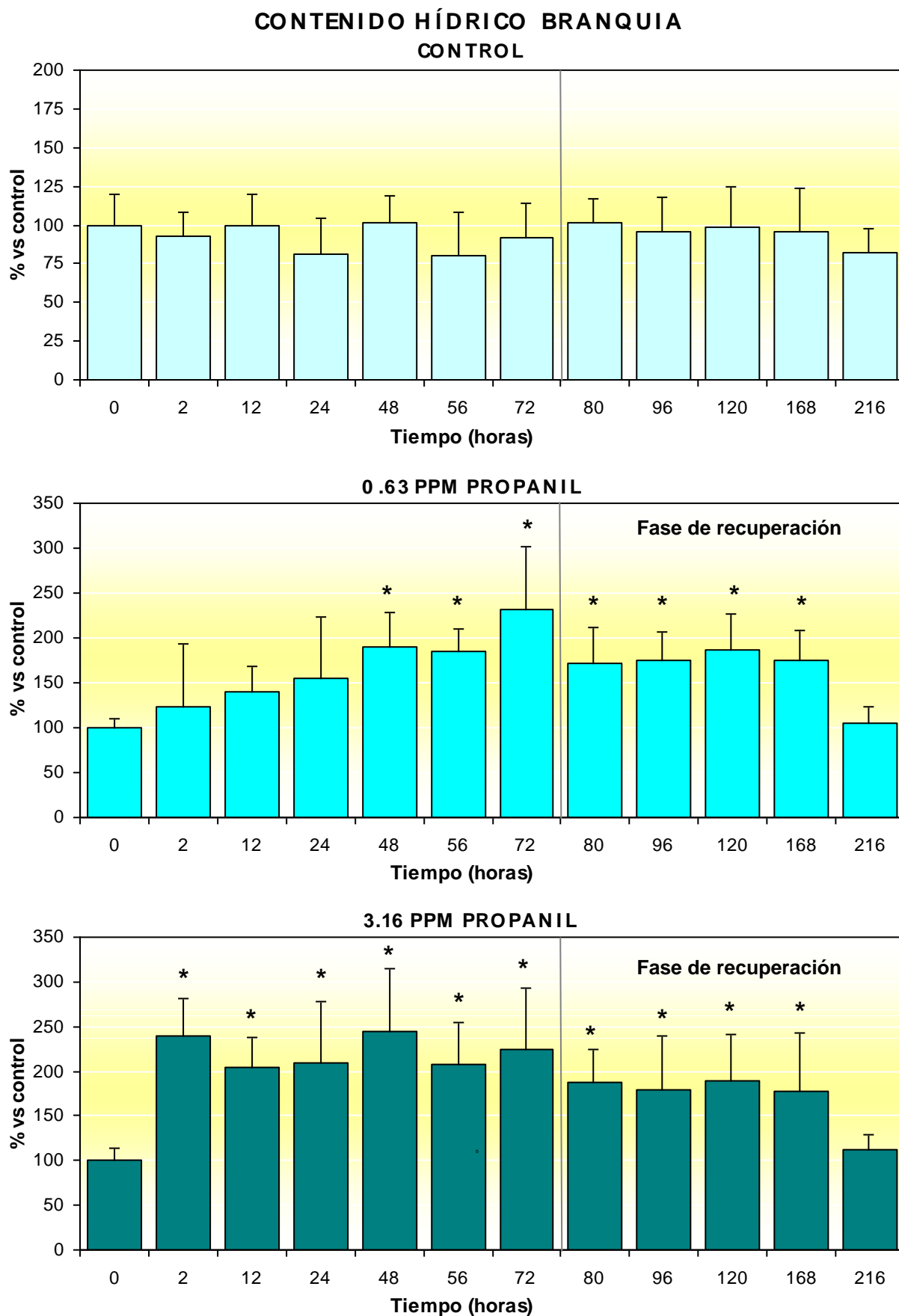
#### **4.2.2.22. Branquia: Contenido Hídrico**

En la figura 52 se reflejan los porcentajes de variación del contenido hídrico (CH) en las branquias de las anguilas a lo largo de los experimentos, tanto durante la exposición a propanil como durante el periodo posterior de recuperación en agua sin herbicida.

En las anguilas expuestas a 0.63 mg/L de propanil (tabla 47) se observó un aumento del contenido hídrico branquial estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) a partir de las 48 h de exposición (89% sobre las 0 h). Esta sobrecarga acuosa se mantuvo de un modo homogéneo hasta finalizar la fase de exposición e incluso todavía tras 4 días de permanencia de los animales en agua no contaminada (168 h). A este respecto, el test de Duncan señaló que no existían diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores comprendidos en el intervalo entre las 48-168 h del experimento. Al finalizar la fase de recuperación (216 h) no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) con el valor inicial, tal y como puso de manifiesto el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.5: ANOVA ( $p < 0.001$ ), tabla 5.5; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 5.9).



**Figura 51.** Actividad enzimática LDH (% vs. 0 horas) en la branquia de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\* $p < 0.05$ ).



**Figura 52.** Contenido hídrico (% vs. 0 horas) en la branquia de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

En el caso de las anguilas expuestas a 3.16 mg/L de herbicida (tabla 48), se observó una sobrecarga acuosa en las branquias, significativa ya desde primeras horas de contacto con el compuesto (139% a las 2 h) que se prolongó igualmente hasta finalizar la fase de exposición (124% a las 72 h). Aunque se observaron fluctuaciones entre los diferentes valores medidos durante esta 1ª fase, los resultados del test de Duncan no señalaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores a lo largo de esta fase, con una sobrecarga acuosa media del 120% sobre el valor inicial. Estas alteraciones se mantuvieron tras la transferencia de los animales a agua sin propanil, concretamente hasta las 168 h (77%) ya en la fase de recuperación. El aumento del contenido hídrico se mantuvo homogéneo también durante esta 2ª fase ( $p > 0.05$ ) (test de Duncan, anexo 8.5: figura 5.10), con un incremento medio del 83% entre las 80 y las 168 h. Finalmente y al igual que se observó en el experimento anterior, tras permitir a las anguilas un periodo de recuperación de seis días en agua limpia, se recuperaron los valores iniciales del contenido hídrico en las branquias (anexo 8.5: ANOVA ( $p < 0.0005$ ), tabla 5.5; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 5.10).

#### 4.2.2.23. Branquia: Correlación lineal entre Parámetros

En la tabla 49 se reflejan los datos correspondientes a la correlación lineal entre los valores determinados para los diferentes parámetros medidos en la branquia de las anguilas procedentes de las experiencias con propanil.

**Tabla 49.** Rectas de regresión ( $y = a + bx$ ) y coeficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre los valores relativos a los diferentes parámetros estudiados en la branquia de las anguilas procedentes de ambos experimentos con propanil.

0.63 mg/L / 3.16 mg/L	$y = a + bx$	$r$
Lactato	$y = 0.089 + 0.953 x$	0.77
Proteínas totales	$y = 1.34 + 0.916 x$	0.87
ALP	$y = 0.24 + 0.096 x$	0.08
LDH	$y = 13.14 + 0.101 x$	0.18
Contenido Hídrico	$y = 0.056 + 1.023 x$	0.61

Los datos obtenidos para los metabolitos (lactato, proteínas) estudiados en el tejido branquial de la anguilas expuestas a ambas experiencias con propanil, mostraron que se ajustan a una función lineal, como pone de manifiesto el coeficiente correlación lineal obtenido, de 0.87 para las proteínas totales y algo menor, de 0.77, en el caso del lactato. No

puede decirse lo mismo en el caso de las actividades enzimáticas estudiadas en este tejido, ALP y LDH, donde el coeficiente de correlación de Pearson fue en ambos casos muy bajo ( $r=0.08$  y  $r=0.18$  respectivamente) ni del contenido hídrico branquial, con un valor de  $r=0.61$ .

#### **4.2.2.24. Corazón: Metabolitos**

##### **4.2.2.24.1. Glucosa**

En las tablas 50 y 51 queda reflejado el contenido de glucosa cardiaco (mg/g) de las anguilas procedentes de ambas experiencias con propanil. La figura 53 representa los porcentajes de estos valores respecto a los valores control.

En el experimento con 0.63 mg/L de propanil se observó un descenso significativo ( $p<0.05$ ) del contenido glucídico desde el primer tiempo de medida (2 h), que se mantuvo a lo largo de la fase de exposición. Tal y como se observa en la figura 53, la máxima disminución se registró tras 24 h de exposición, con valores que representaron un 34% de los registrados a las 0 h. De cualquier modo, durante las siguientes 32 h los niveles medidos no superaron el 50% del valor inicial. Una vez desaparecido el agente estresante del medio (fase de recuperación) se restablecieron los niveles iniciales. El análisis estadístico de los resultados mostró la existencia de diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre los niveles glucídicos en las anguilas control y los determinados a todos los tiempos de la fase de exposición y sólo a las 120 h ya en la 2ª fase del experimento (anexo 8.6: ANOVA ( $p<0.0001$ ), tabla 6.1; test de Duncan ( $p<0.05$ ), figura 6.1).

Del mismo modo, como puede verse en la figura 53, la exposición de las anguilas a 3.16 mg/L provocó un descenso significativo ( $p<0.05$ ) de la glucosa cardiaca también desde las 2 h de exposición (32% de descenso), que se prolongó durante toda la 1ª fase del experimento, con un descenso máximo entre las 24-48 h; en este intervalo los niveles registrados no superaron el 44% del valor inicial. Durante la 2ª fase del experimento y hasta las 120 h, el contenido en glucosa no superó el 60% del valor control, e incluso aún fue un 20% inferior al inicial a las 216 h, tal y como reveló análisis estadístico de los resultados, de modo que tras seis días de permanencia en agua de los animales no se restauraron los niveles normales (anexo 8.6: ANOVA ( $p<0.0001$ ), tabla 6.1; test de Duncan ( $p<0.05$ ), figura 6.2).

##### **4.2.2.24.2. Lactato**

El contacto de los animales con una concentración de herbicida correspondiente a 1/50 de la  $CL_{50-96}$  h de herbicida (0.63 mg/L) (tabla 50 y figura 54) provocó un aumento de los niveles de lactato cardiaco (mg/g) significativo ( $p<0.05$ ) entre las 12 y las 72 h de exposición, y máximo a las 48-56 h (87% de aumento sobre el control). Una vez en la fase de

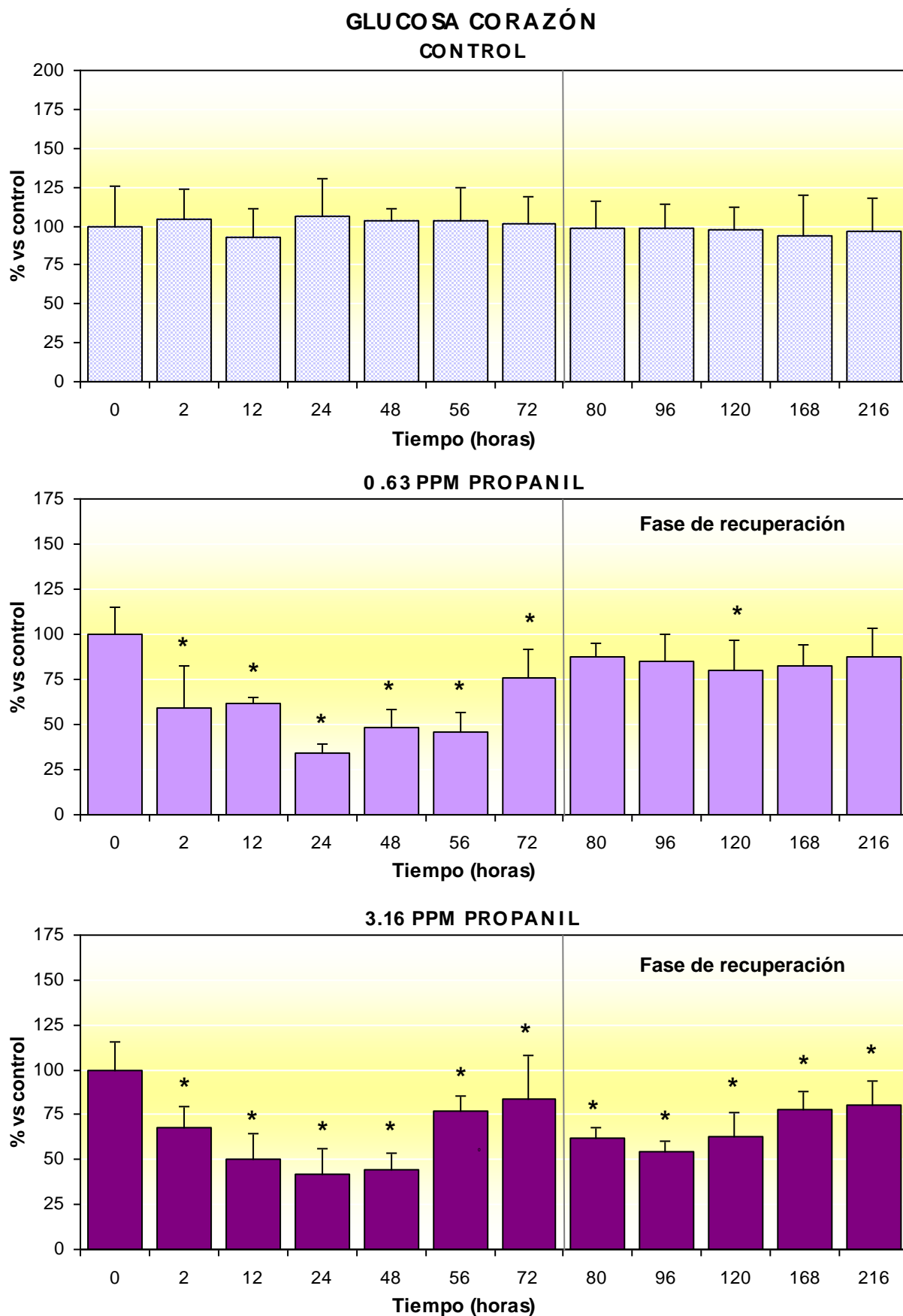
**Tabla 50.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido en glucosa (mg/g), lactato (mg/g) y proteínas totales (mg/g) y de las actividades enzimáticas ALT ( $^{\circ}$ mol/min/g) y  $\gamma$ -GT ( $^{\circ}$ mol/min/g) en el corazón de la anguilla *A. anguilla* a lo largo 72 horas de exposición a 0.63 mg/L de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\ast$   $p < 0.05$ ).

CORAZÓN							
Fase de Exposición (Horas)							
	0	2	12	24	48	56	72
GLUCOSA	2.64 $\pm$ 0.41	1.55 $\pm$ 0.63*	1.62 $\pm$ 0.09*	0.90 $\pm$ 0.15*	1.27 $\pm$ 0.28*	1.20 $\pm$ 0.30*	2.00 $\pm$ 0.42*
LACTATO	1.67 $\pm$ 0.33	1.67 $\pm$ 0.34	2.45 $\pm$ 0.38*	1.90 $\pm$ 0.22	3.13 $\pm$ 0.30*	3.13 $\pm$ 0.49*	2.69 $\pm$ 0.49*
PROTEINAS	131.47 $\pm$ 24.27	114.78 $\pm$ 23.90	133.30 $\pm$ 23.30	144.10 $\pm$ 34.38	154.49 $\pm$ 22.46	172.82 $\pm$ 53.52*	185.98 $\pm$ 66.74*
ALT	1.82 $\pm$ 0.44	3.59 $\pm$ 0.61*	3.48 $\pm$ 0.86*	3.50 $\pm$ 0.73*	3.82 $\pm$ 0.59*	4.08 $\pm$ 0.41*	4.29 $\pm$ 0.65*
$\gamma$ -GT	0.11 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.02*	0.14 $\pm$ 0.03*	0.17 $\pm$ 0.02*	0.13 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.01*	0.15 $\pm$ 0.03*
Fase de Recuperación (Horas)							
	80	96	120	168	216		
GLUCOSA	2.31 $\pm$ 0.19	2.24 $\pm$ 0.41	2.10 $\pm$ 0.46*	2.18 $\pm$ 0.32	2.30 $\pm$ 0.43		
LACTATO	2.05 $\pm$ 0.04	1.99 $\pm$ 0.61	1.92 $\pm$ 0.57	1.92 $\pm$ 0.17	2.05 $\pm$ 0.20		
PROTEINAS	132.30 $\pm$ 14.88	127.74 $\pm$ 11.47	106.56 $\pm$ 18.54	117.56 $\pm$ 15.62	121.24 $\pm$ 13.42		
ALT	3.33 $\pm$ 0.60*	2.02 $\pm$ 0.39	2.36 $\pm$ 0.33	1.66 $\pm$ 0.40	1.87 $\pm$ 0.21		
$\gamma$ -GT	0.16 $\pm$ 0.02*	0.15 $\pm$ 0.02*	0.15 $\pm$ 0.02*	0.21 $\pm$ 0.03*	0.13 $\pm$ 0.01		

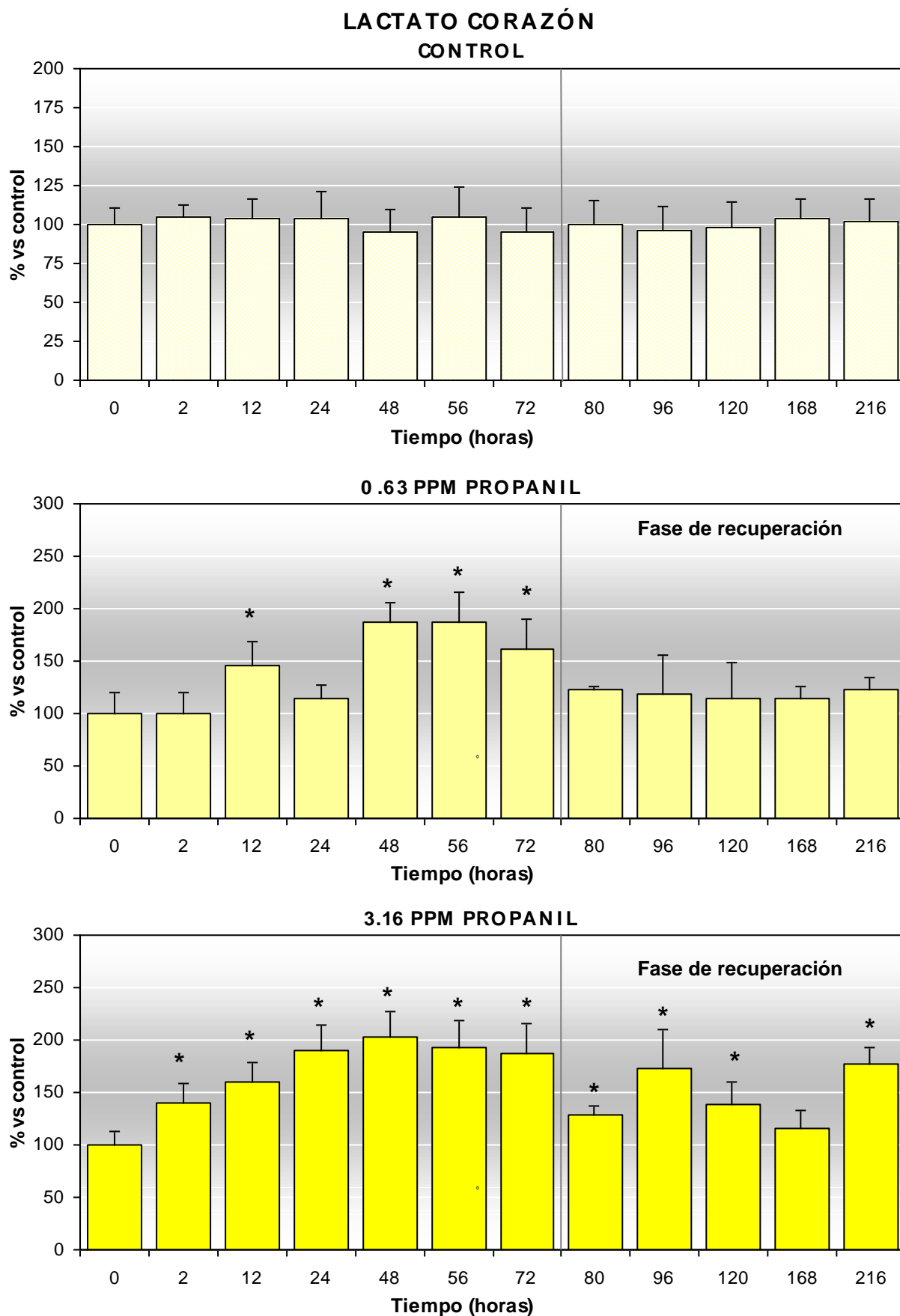
**Tabla 51.** Valores medios  $\pm$  D.E. del contenido en glucosa (mg/g), lactato (mg/g) y proteínas totales (mg/g) y de las actividades enzimáticas ALT ( $^{\circ}$ mol/min/g) y  $\gamma$ -GT ( $^{\circ}$ mol/min/g) en el corazón de la anguila *A. anguilla* a lo largo 72 horas de exposición a 3.16 mg/L de propanil y la posterior recuperación en un medio exento de herbicida. ( $\ast$   $p < 0.05$ ).

<b>CORAZÓN</b>							
<b>Fase de Exposición (Horas)</b>							
	0	2	12	24	48	56	72
GLUCOSA	2.64 $\pm$ 0.41	1.80 $\pm$ 0.30*	1.33 $\pm$ 0.37*	1.11 $\pm$ 0.38*	1.18 $\pm$ 0.23*	2.03 $\pm$ 0.22*	2.22 $\pm$ 0.65*
LACTATO	1.74 $\pm$ 0.22	2.44 $\pm$ 0.32*	2.78 $\pm$ 0.33*	3.31 $\pm$ 0.43*	3.54 $\pm$ 0.42*	3.36 $\pm$ 0.45*	3.25 $\pm$ 0.50*
PROTEINAS	104.59 $\pm$ 15.95	70.64 $\pm$ 13.03*	78.42 $\pm$ 18.01*	87.40 $\pm$ 15.44	101.35 $\pm$ 18.17	102.41 $\pm$ 17.08	101.81 $\pm$ 21.56
ALT	1.55 $\pm$ 0.16	2.55 $\pm$ 0.31*	2.91 $\pm$ 0.40*	3.24 $\pm$ 0.42*	4.62 $\pm$ 0.39*	4.67 $\pm$ 0.25*	4.57 $\pm$ 0.76*
$\gamma$ -GT	0.11 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.03*	0.21 $\pm$ 0.03*	0.15 $\pm$ 0.01*	0.21 $\pm$ 0.03*
<b>Fase de Recuperación (Horas)</b>							
	80	96	120	168	216		
GLUCOSA	1.65 $\pm$ 0.15*	1.43 $\pm$ 0.16*	1.66 $\pm$ 0.36*	2.06 $\pm$ 0.26*	2.12 $\pm$ 0.35*		
LACTATO	2.25 $\pm$ 0.14*	3.00 $\pm$ 0.64*	2.42 $\pm$ 0.37*	2.01 $\pm$ 0.31	3.08 $\pm$ 0.28*		
PROTEINAS	98.46 $\pm$ 11.48	112.51 $\pm$ 17.14	102.18 $\pm$ 18.15	107.51 $\pm$ 7.96	104.30 $\pm$ 8.13		
ALT	3.33 $\pm$ 0.60*	1.78 $\pm$ 0.32	1.59 $\pm$ 0.24	2.12 $\pm$ 0.53*	2.98 $\pm$ 0.23*		
$\gamma$ -GT	0.23 $\pm$ 0.04*	0.20 $\pm$ 0.04*	0.17 $\pm$ 0.03*	0.20 $\pm$ 0.03*	0.13 $\pm$ 0.01		





**Figura 53.** Niveles de glucosa (% vs. 0 horas) en el corazón de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 54.** Niveles de lactato (% vs. 0 horas) en el corazón de la anguilla *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

recuperación, los valores se normalizaron rápidamente, de modo que no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) respecto al valor inicial desde el primer tiempo de medida en esta fase, a partir de 80 h de experimento. El análisis estadístico de los resultados corroboró lo expuesto: las diferencias con el valor inicial fueron significativas ( $p < 0.05$ ) a las 12, 48, 56 y 72 h de la fase de exposición (anexo 8.6: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 6.2; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 6.3).

Se determinó un aumento paulatino de los niveles de lactato cardiaco (mg/g), significativo ( $p < 0.05$ ) ya a las 2 h de exposición, y que alcanzó el máximo valor tras 48 h (103% sobre las 0 h) en animales expuestos una concentración de herbicida correspondiente a 1/10 de la  $CL_{50}$ -96 h (3.16 mg/L) (tabla 51 y figura 54). Este máximo incremento se mantuvo durante el intervalo comprendido entre las 24-72 h de exposición, ya que no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores medidos durante este tiempo (test de Duncan, anexo 8.6: figura 6.4). Este aumento se prolongó a lo largo de la fase de recuperación, de manera que durante la permanencia de los animales en agua libre de propanil, si bien se observaron oscilaciones, no llegaron a restaurarse los niveles iniciales al finalizar el experimento (75% de incremento a las 216 h) (anexo 8.6: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 6.2; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 6.4).

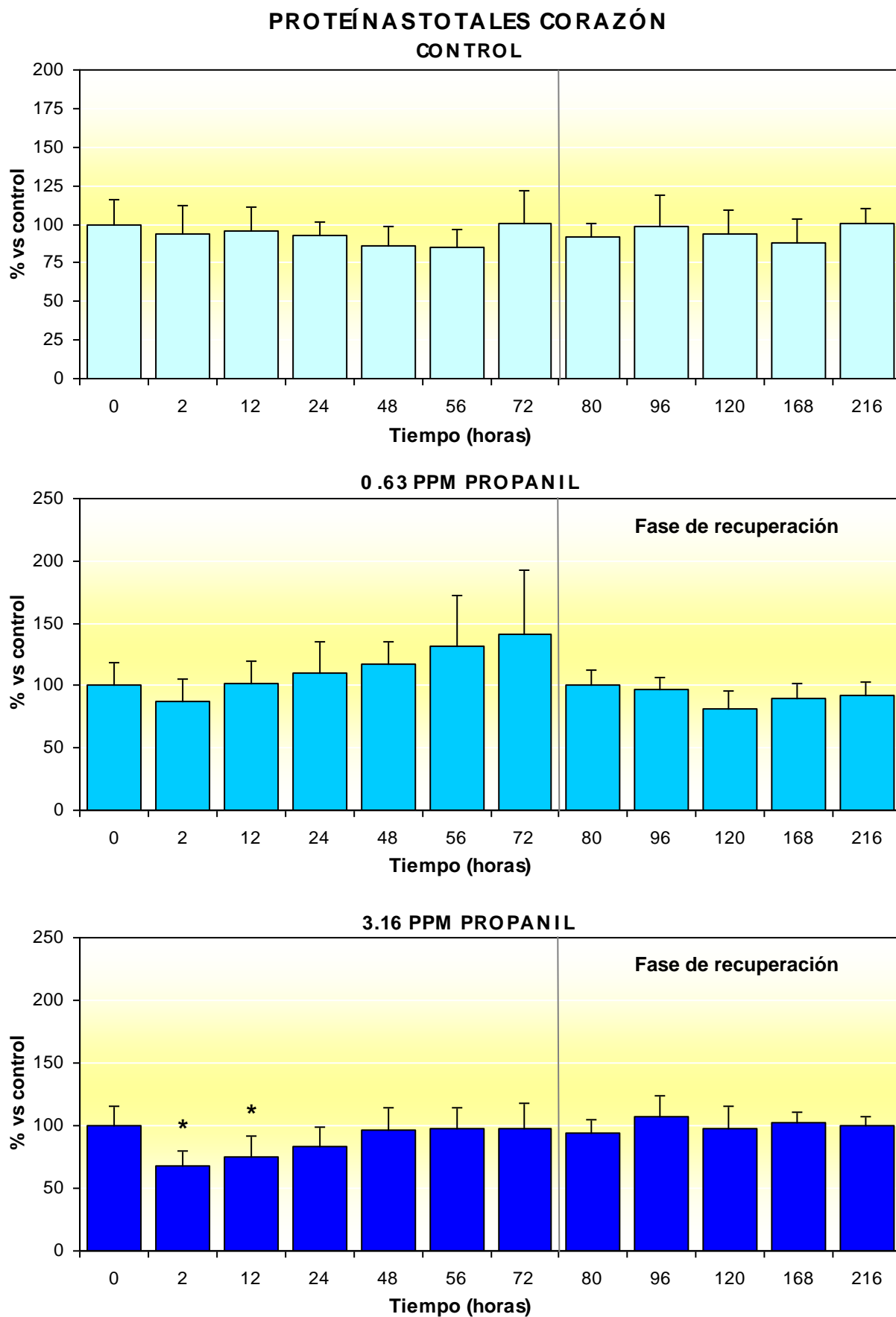
#### **4.2.2.24.3. Proteínas Totales**

En la figura 55 y en las tablas 50-51 aparecen representados los resultados obtenidos para los niveles de proteínas totales (mg/g) en el corazón de los animales expuestos a propanil. Según los datos, parece que las alteraciones producidas en este metabolito no muestran ninguna tendencia. Los valores determinados a lo largo del experimento con 0.63 mg/L de herbicida no mostraron fluctuaciones significativas ( $p > 0.05$ ), tal y como mostró el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.6: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 6.2; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 6.3). También el análisis estadístico de los resultados mostró que los valores de proteínas totales en el corazón de las anguilas procedentes del experimento con 3.16 mg/L eran uniformes excepto los determinados a las 2-12 h, que estarían disminuidos frente a los determinados a 0 h y esta disminución resultó estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), como se refleja en el anexo 8.6: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 6.2; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 6.4.

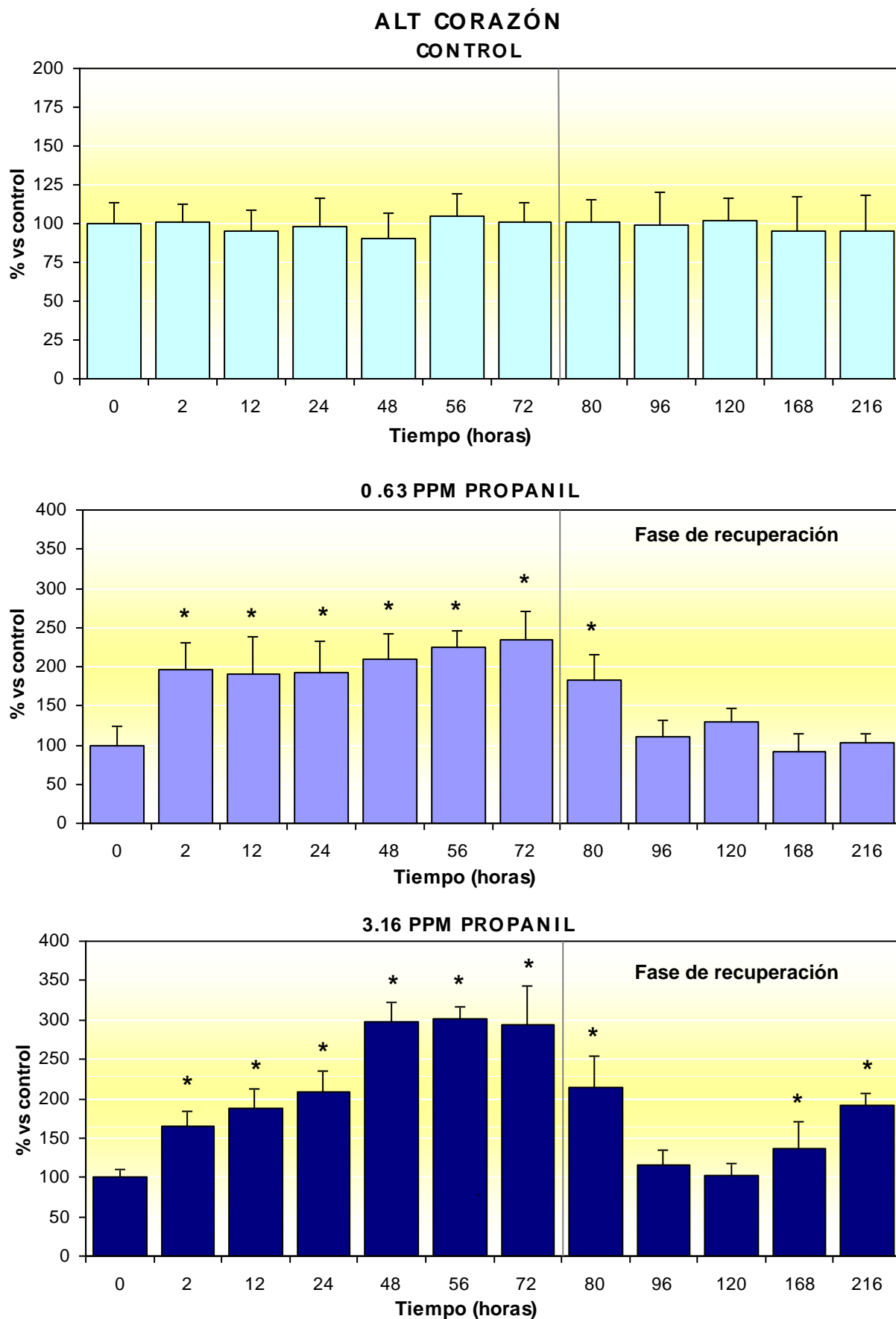
#### **4.2.2.25. Corazón: Enzimas**

##### **4.2.2.25.1. Actividad Alanina Aminotransferasa (ALT)**

Los resultados de esta actividad enzimática ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) en los animales tratados se muestran en las tablas 50 y 51 y se representan gráficamente, en porcentaje frente al control, en la figura 56.



**Figura 55.** Niveles de proteínas totales (% vs. 0 horas) en el corazón de la anguilla *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .



**Figura 56.** Actividad enzimática ALT (% vs. 0 horas) en el corazón de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

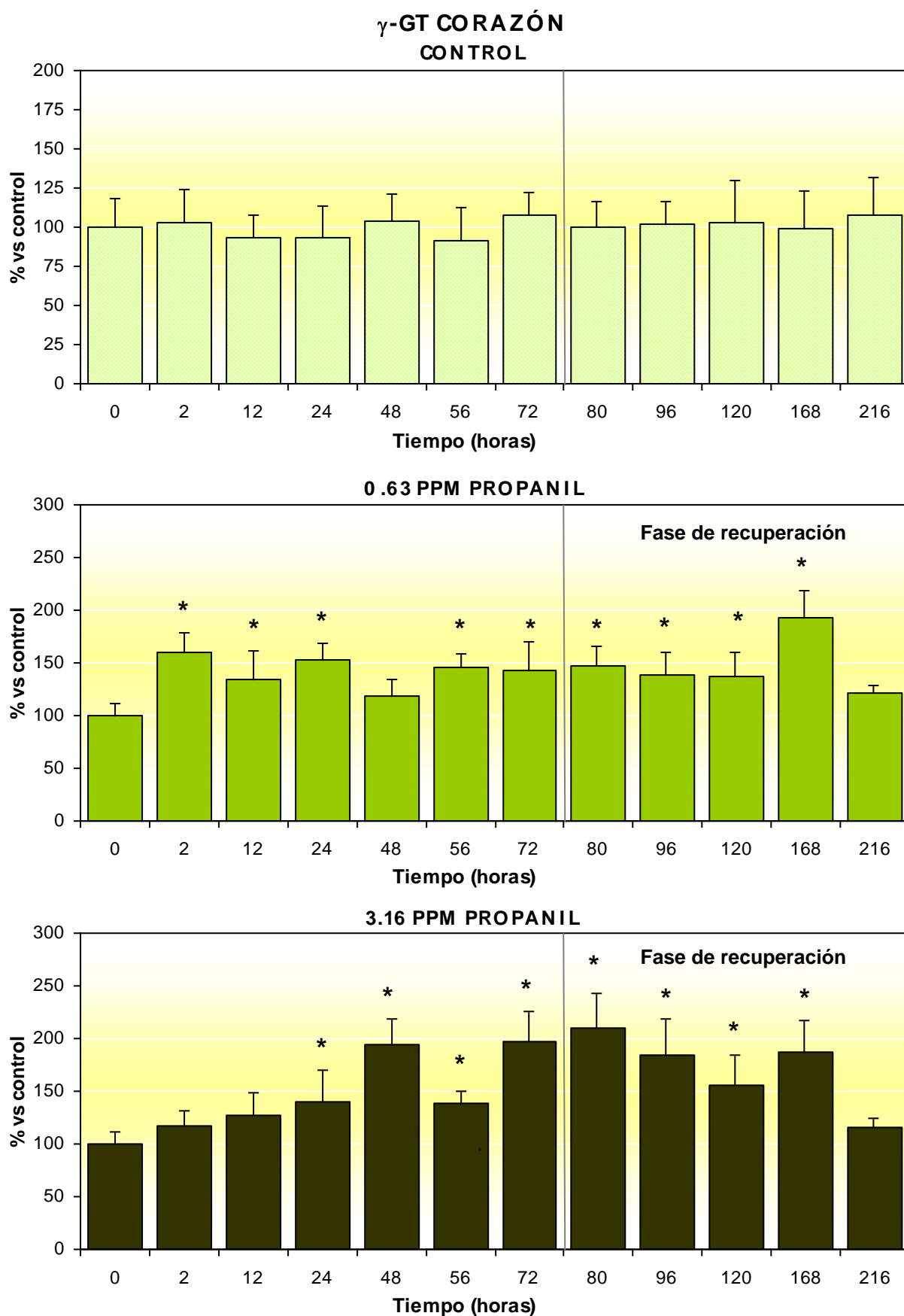
La enzima alanina aminotransferasa (ALT) cardiaca mostró un incremento de su actividad en los peces expuestos a propanil, evidenciando un alto grado de correlación lineal entre ambos experimentos con propanil, con un coeficiente de correlación de Pearson de 0.82.

Como se observa en la figura 56, este aumento fue significativo ( $p < 0.05$ ) ya desde las 2 h de exposición a 0.63 mg/L de propanil, manteniéndose muy homogéneo durante las siguientes 56 h, con un aumento medio del 103% durante este periodo de tiempo. Efectivamente, el test de Duncan mostró que no hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los valores comprendidos entre las 2 y las 56 h de experimento (anexo 8.6: figura 6.7). A las 72 h de exposición se alcanzó la máxima actividad registrada, del 135 % respecto al valor de referencia. Una vez en agua exenta de herbicida se observó una rápida tendencia a la recuperación de la actividad ALT, no observándose diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con el control a partir de las 96 h de medida hasta finalizar la experiencia, tal y como evidenció el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.6: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 6.4; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 6.7).

En los animales expuestos a la concentración más elevada de propanil (3.16 mg/L) se observó asimismo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la actividad ALT también desde las primeras horas de exposición (64% sobre el control), que aumentó progresivamente hasta las 48-72 h, donde se registró la máxima actividad, del 200 % sobre el valor inicial (figura 56). Tras la ubicación de las anguilas en agua exenta de herbicida, aunque se observaron oscilaciones a lo largo de esta 2ª fase, no se llegó a restaurar la actividad normal ( $p < 0.05$ ) al finalizar la misma, de modo que aún se registró un 90% de incremento sobre el control a las 216 h. El análisis estadístico verificó estos resultados, mostrando la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el control a todos los tiempos excepto a las 96 y las 120 h (anexo 8.6: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 6.4; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 6.8).

#### **4.2.2.25.2. Actividad $\gamma$ -Glutamil Transferasa ( $\gamma$ -GT)**

Durante la experiencia con 0.63 mg/L de propanil (tabla 50) se observó un aumento de la actividad  $\gamma$ -Glutamil Transferasa ( $\gamma$ -GT) ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ ) estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) ya a las 2 h de exposición al herbicida, con un 59% de incremento sobre la actividad inicial, que se mantuvo uniforme a lo largo de toda la fase de exposición e incluso tras 48 h una vez eliminado el componente estresante del medio (fase de recuperación). No se detectaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores comprendidos entre las 2 y las 120 h del experimento (excepto a las 48 h) como verificó el test de Duncan (anexo 8.6: figura 6.9). El incremento medio durante este intervalo fue del 45% (figura 57). Fueron necesarios los seis días de permanencia de los animales pre-tratados en agua exenta de herbicida para que la actividad recuperara la normalidad. Así, a las 216 h ya no se detectaron diferencias



**Figura 57.** Actividad enzimática  $\gamma$ -GT (% vs. 0 horas) en el corazón de la anguila *A. anguilla* durante los diferentes experimentos. (\*) $p < 0.05$ .

estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). El análisis estadístico mostró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la actividad inicial y la tomada al resto de los tiempos salvo a las 48 h de la 1ª fase y a las 216 h ya en la 2ª fase del experimento (anexo 8.6: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 6.5; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 6.9).

La exposición de las anguilas a 3.16 mg/L de propanil (tabla 51) se tradujo en un aumento significativo de la actividad  $\gamma$ -GT cardiaca desde las 24 h de exposición, con un 40% de incremento sobre las 0 h. Como puede observarse en la figura 57, esta actividad alcanzó un aumento del 94% 24 h más tarde (a las 48 h), y volvió a alcanzar valores entre un 84-110% superiores al inicial a las 72 h y durante las primeras 24 h de la fase de recuperación (80-96 h de experimento). Esta alteración de la actividad  $\gamma$ -GT se observó también tras cuatro días de permanencia en agua exenta de plaguicida (figura 57). Así, al igual que lo observado en el experimento anterior, se determinó un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) de la actividad  $\gamma$ -GT durante ambas fases que integraron el experimento a excepción del último tiempo de medida (216 h), tal y como corroboró el análisis estadístico de los resultados (anexo 8.6: ANOVA ( $p < 0.0001$ ), tabla 6.5; test de Duncan ( $p < 0.05$ ), figura 6.10).

#### 4.2.2.26. Corazón: Correlación Lineal entre Parámetros

La correlación lineal entre los valores determinados para los diferentes metabolitos y enzimas medidos en el corazón de las anguilas procedentes de ambas experiencias con propanil se reflejan en la tabla 52.

**Tabla 52.** Rectas de regresión ( $y = a + bx$ ) y coeficientes de correlación lineal ( $r$ ) entre los valores relativos a los metabolitos y enzimas estudiados en el corazón de las anguilas procedentes de ambos experimentos con propanil.

0.63 mg/L / 3.16 mg/L	$y = a + bx$	$r$
Glucosa	$y = 0.78 + 0.528 x$	0.62
Lactato	$y = 0.98 + 0.802 x$	0.71
Proteínas totales	$y = 90.78 + 0.047 x$	0.13
ALT	$y = 0.06 + 0.982 x$	0.82
$\gamma$ -GT	$y = 0.08 + 0.354 x$	0.35

Se observó una buena correlación lineal entre los resultados obtenidos a partir de ambas experiencias con propanil para la actividad enzimática ALT ( $r = 0.82$ ) y el lactato, con un



coeficiente de correlación lineal de 0.71. Sin embargo, parece que los resultados obtenidos para las proteínas totales, glucosa y actividad  $\gamma$ -GT procedentes de ambos experimentos no se ajustaron bien a una correlación lineal (tabla 52).

## **5. DISCUSIÓN**

## 5.1. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA

Los resultados de toxicidad aguda del herbicida propanil obtenidos para la especie *Anguilla anguilla* en el presente trabajo, muestran ya en las pruebas preliminares que este herbicida es moderadamente tóxico (según la clasificación toxicológica establecida por la O.M.S, 2003), siendo necesarias concentraciones superiores a 10 mg/L para producir alguna mortalidad en los peces expuestos durante 96 horas. Cabe señalar que el 100% de los animales control sobrevivió al tiempo estipulado, tanto en las pruebas preliminares como en el ensayo de toxicidad aguda definitivo.

La mortalidad de las anguilas expuestas a propanil en el ensayo de toxicidad aguda, mostró ser función tanto de la concentración del herbicida ensayada como del tiempo de exposición al mismo. Así pues, ésta fue máxima a las 96 horas de exposición y con la concentración más elevada (50 mg/L, tabla 16). A la vista de los resultados, la  $CL_{50}$  del herbicida propanil sobre la anguila europea, *Anguilla anguilla*, disminuyó al aumentar el tiempo de exposición, lo que implica que la toxicidad provocada por el herbicida en la anguila aumentó conforme se incrementó el tiempo de contacto con el mismo.

Está documentado que en mamíferos la toxicidad aguda del propanil se manifiesta en primer lugar por la formación de metahemoglobina, originada por los metabolitos oxidados que se forman en la hidrólisis enzimática de propanil (Singleton y Murphy, 1973; Chow y Murphy, 1975; McMillan y cols., 1990a) y que podría ser también un posible mecanismo de toxicidad en peces (Schlenk y Moore, 1993). En mamíferos, este herbicida es hidrolizado por la enzima acilamidasa hepática, formando ácido propiónico y 3,4- dicloroanilina (DCA), éste último como principal metabolito (Singleton y Murphy, 1973). La DCA induce la formación de radicales libres y altera la normal actividad de enzimas y moléculas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, la nitrato sintetasa, el glutatión, el malondialdehído y el óxido nítrico, causando estrés oxidativo y peroxidación lipídica, como se ha visto en el pez de agua dulce *Carassius auratus*, lo que podría explicar, al menos en parte, la toxicidad del propanil en peces (Li y cols., 2002 y 2003).

La anguila *A. anguilla*, con una  $CL_{50-96h}$  de 31.55 mg/L, parece ser un pez relativamente resistente al herbicida propanil, si se la compara con otras especies de peces, como *Salmo gairdneri*, *Ictalurus punctatus*, *Cyprinodon variegatus* o *Lepomis macrochirus* para los cuales la  $CL_{50-96h}$  de este herbicida resultó ser de 2.3, 3.8, 4.6 y 5.4 mg/L respectivamente (Mc Corckle y cols., 1977; Room y Haas, 1991; Meister, 1992; EXTTOXNET, 1996). Lorenzo y Gómez de Barreda (2001) publicaron que la  $CL_{50-96h}$  del propanil para el pez autóctono del Parque Natural de la Albufera, *Lebias ibera*, estaba comprendida entre 5.51 y 8.26 mg/L, si bien estos autores no aportan el dato exacto. Por su parte, Call y cols. (1983) publicaron una  $CL_{50}$  de este herbicida en la especie *Pimephales promelas* tras 24, 48, 72 y 96 h de exposición de 11.5, 10.2, 8.6 y 3.4 mg/L respectivamente. También se han determinado valores del orden

de 6.0, 6.1, 7.6 y 9.0 mg/L para la CL<sub>50</sub>-96h de este herbicida en las especies *Ictalurus punctatus*, *Carassius auratus*, *Pimephales promelas* y *Poecilia reticulata*, respectivamente (Wellborn, 1984; Call y cols., 1987; Crossland, 1990; Li y cols., 2002).

La mayor resistencia de la anguila al herbicida propanil queda también puesta de manifiesto al comparar los resultados obtenidos en esta especie con las CL<sub>50</sub> en otras especies de peces a las 48 horas de exposición, como *Cyprinus carpio*, con un valor de CL<sub>50</sub>-48h entre 8-11 mg/L (Tomlin, 1997), las especies *Pimephales promelas* y *Poecilia reticulata* con CL<sub>50</sub>-48h de 8.99 y 9.5 mg/L respectivamente (Crossland, 1990; Moore y Farris, 1997) o las especies *Carassius auratus* y *Oryzias latipes* con una CL<sub>50</sub>-48h de 14 mg/L (Worthing, 1987), mientras que en la anguila obtuvimos un valor de 41.34 mg/L (48 h de exposición).

A la vista de los datos obtenidos en la bibliografía, la toxicidad aguda provocada por el herbicida propanil en los peces dulceacuícolas presenta bastante variabilidad, y además la anguila *A. anguilla* debería ser clasificada como una especie “relativamente” resistente a la toxicidad provocada por este compuesto, con valores de CL<sub>50</sub> estimados para esta especie del orden de 3 a 13 veces superiores a los determinados para otras especies de peces.

Efectivamente, la anguila europea parece bastante resistente a la toxicidad inducida en general por los herbicidas. Así, la CL<sub>50</sub> determinada para esta especie a las 96 horas de exposición a otros herbicidas como los tiocarbamatos tiobencarb y molinato fue de 13.23 mg/L (Fernández-Vega y cols., 1999) y de 33.46 mg/L (Fernández-Vega, datos no publicados) respectivamente. En este caso, el herbicida tiobencarb resultó ser más tóxico para la anguila que el molinato o el propanil, de modo que en las mismas condiciones experimentales se requirieron menores concentraciones para causar la muerte de los animales. Por otro lado, los herbicidas molinato y propanil presentaron unos valores de toxicidad letal muy similares en los individuos testados.

En general, parece que los herbicidas tipo tiocarbamatos y amidas muestran una toxicidad relativamente moderada sobre *A. anguilla* si comparamos los datos anteriores con los obtenidos para esta especie con otros plaguicidas. Así, la CL<sub>50</sub>-96h de los insecticidas organoclorados endosulfan y lindano fue de 0.041 y 0.68 mg/L respectivamente y de 0.08 y 0.2 mg/L la CL<sub>50</sub>-96h de los insecticidas organofosforados diazinón y fenitrotión respectivamente (Ferrando, 1990; Sancho, 1991). Así pues, estos insecticidas presentarían una toxicidad para la anguila entre 46 y 770 veces superior a la presentada por el herbicida propanil sobre dicha especie.

Los síntomas de intoxicación que se pudieron observar en las anguilas durante la exposición a concentraciones agudas de propanil fueron: agitación, convulsiones y movimientos violentos durante las primeras 8 horas de exposición. Tras estos síntomas iniciales, se observaron movimientos progresivamente erráticos, acompañados de pérdida de equilibrio para finalizar con un estado de hipoactividad y letargia. Posteriormente, se observó

---

un estado de extenuación y una tendencia a permanecer en el fondo del acuario sin observarse movimientos operculares (durante una media de un minuto aproximadamente) y manteniendo las lengüetas operculares abiertos. En ese estado, no se observó en los peces la típica reacción de escape que se produce en condiciones normales tras suave estimulación. La hipoactividad y letargia son síntomas típicos en los peces causados por la exposición a los herbicidas tipo amidas (Crossland, 1990). Efectos parecidos se han observado en la anguila europea durante la exposición a herbicidas tiocarbamatos como el tiobencarb o el molinato (Fernández-Vega y cols., 1999; y Sancho y cols., 2000). En mamíferos, como ratas albinas adultas, se han descrito los efectos causados por la exposición aguda a propanil, observando en éstas un periodo inicial de agitación seguido por una prolongada depresión acompañada de miorrelajación, movimientos descoordinados, dilatación de pupilas e hipotermia, seguido de coma, parálisis completa y muerte en 24-48 h (Chand, 1973).

Además de los síntomas citados, las anguilas expuestas a propanil mostraron un aspecto hemorrágico generalizado, con un color rojizo y petequias por toda la superficie corporal e incluso hemorragias en las vísceras y en órganos internos como el hígado, condición que se observó a partir de las primeras 24 horas de exposición y que fue en aumento a lo largo de todo el periodo. Síntomas parecidos fueron previamente descritos en otras especies de peces como consecuencia de la exposición a propanil. Así, Call y cols. (1983) citaron manchas rojizas en el tegumento de individuos juveniles del pez *Pimephales promelas*, debido aparentemente a hemorragia o a alguna anomalía de los vasos sanguíneos. En adultos de la misma especie se ha citado también edema corporal, además de enrojecimiento y hemorragia en la masa visceral (Call y cols., 1987). McMillan y cols. (1990a, 1990b) demostraron que este herbicida afecta a los eritrocitos en mamíferos causando metahemoglobinemia y anemia en ratón. Alteraciones hematológicas junto con presencia de petequias y de hemorragias puntuales en individuos de las especies *Cyprinus carpio* y *Anguilla anguilla* han sido también citados durante exposiciones al herbicida tiocarbamato molinato (Kawatsu 1980; Sancho y cols., 2000). La presencia de petequias como consecuencia de la exposición a plaguicidas puede revelar un serio riesgo de los animales a padecer un estado anémico debido a la pérdida de sangre (Sancho y cols., 2000). Esta presencia de hemorragias observada en las anguilas podría ser inducida por el estrés oxidativo generado como consecuencia de la intoxicación con propanil, ya que una disminución de las reservas celulares de glutatión resultaría en una mayor permeabilidad y una menor funcionalidad de la membrana eritrocitaria hasta producir hemorragia hemolítica (Uhlrig y Wendel, 1992).

Aunque el propanil, y en general, las amidas herbicidas, tienen una baja toxicidad para los mamíferos (por ejemplo, la  $DL_{50}$  oral del propanil en ratones es de 1800 mg/kg y en ratas de 2500 mg/kg (Tomlin, 1997), resultan mucho más tóxicos para las especies acuáticas, entre ellas, los peces, como indican los datos de toxicidad aguda. Las diferencias toxicológicas observadas entre las distintas especies de peces ante un mismo compuesto, pueden deberse,

entre otros, a los distintos sistemas de detoxificación implicados en metabolizar el compuesto, y como consecuencia, a las distintas tasas de bioconcentración y depuración del mismo en el organismo. Los productos xenobióticos tienden a ser menos tóxicos cuando se acumulan lentamente, cuando se eliminan rápidamente y/o cuando se activan metabólicamente con lentitud o se desactivan rápidamente. De este modo, los procesos que minimizan el tiempo de permanencia de un xenobiótico, en su forma tóxica, en el organismo pueden ser considerados funcionalmente protectores (Tjeerdema y Crosby, 1988). La toxicidad selectiva del herbicida propanil sobre determinadas especies podría deberse, pues, a una combinación de varios factores, entre ellos a una alta bioconcentración, una eliminación más lenta, un mecanismo de detoxificación menos eficiente de este compuesto, o bien que al intentar degradar el compuesto parental se genera un metabolito más tóxico en esas especies más sensibles al mismo.

El propanil es un herbicida que se aplica para el tratamiento de las malas hierbas en los arrozales de la Albufera de Valencia durante su inundación. Los niveles determinados en el agua de algunos canales de irrigación de estos campos son bajos, del orden de 0.028 mg/L (Gómez de Barreda y cols., 2002), aunque es muy probable que durante las épocas de fumigación existan en los cultivos y en las acequias concentraciones más elevadas de sus metabolitos, como la DCA, el TCAB o el TCAOB, más tóxicos que el compuesto parental, con el consiguiente impacto sobre las especies que habitan la zona, como es el caso de la anguila europea. Por ejemplo, en las aguas del Delta del Ebro (amplia zona dedicada entre otros cultivos al del arrozal), Santos y cols. (1998) detectaron concentraciones mucho más elevadas de propanil y DCA (0.071 y 0.470 mg/L respectivamente), y estos niveles se detectaron aún 8 días después de su aplicación.

## 5.2 TOXICIDAD SUBLETAL: RESPUESTA DE ESTRÉS

Para la determinación de los diferentes metabolitos y enzimas estudiados en las muestras biológicas de la anguila se aplicaron las técnicas clínicas habituales empleadas en Clínica Humana y Veterinaria. El empleo de estas técnicas para el estudio de las alteraciones fisiológicas en animales expuestos a sustancias contaminantes de diversa naturaleza es una práctica habitual en Toxicología Acuática. Así, es posible estudiar la magnitud de la respuesta de los organismos expuestos frente a un agente contaminante y comprobar si la capacidad de respuesta se ve alterada, lo que se reflejaría en cambios en los constituyentes de la sangre y tejidos, o por el contrario, el fenómeno de respuesta se produce con normalidad y sin mayor perjuicio para los individuos expuestos.

Un problema que apareció a la hora de comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los aportados por otros autores, es la variación existente en los niveles en sangre y otros tejidos de los distintos parámetros bioquímicos entre unas especies de peces y otras, entre las distintas poblaciones dentro de una misma especie, e incluso entre las distintas épocas del año dentro de una misma población, lo que dificulta el establecimiento de valores de referencia para desarrollar y aplicar los tests de diagnóstico. En nuestro caso, este problema se agravó al tratarse de poblaciones de anguilas salvajes, donde la variabilidad existente en diversos parámetros como el estado nutricional previo, exposición a sustancias tóxicas en el medio natural, etc..., puede ser elevada de un individuo a otro. Por ello, para minimizar estos inconvenientes, a la hora de llevar a cabo cada experimento empleamos como referencia los datos obtenidos a partir de una submuestra de individuos obtenidos y mantenidos exactamente en las mismas condiciones que los que serían posteriormente sometidos al plaguicida (submuestra correspondiente a las 0 horas en el presente estudio).

El periodo de una semana utilizado para la aclimatación de los animales a las condiciones de laboratorio antes de la realización de los ensayos de toxicidad, se considera suficiente para equilibrar las constantes fisiológicas tras la situación de estrés que supone la captura y traslado de los animales desde la Cofradía de Pescadores del Palmar al laboratorio (Ferrando 1990; Sancho, 1996). Los cambios que sufren los peces en los niveles sanguíneos de glucosa y ácidos grasos, como consecuencia de su captura y transporte, desaparecen como máximo tras seis días de mantenimiento en el laboratorio, recuperándose los niveles normales al cabo de una semana (Plisetskaya, 1980).

La temperatura a la que tuvieron lugar la aclimatación y las distintas experiencias (22 °C) se encuentra dentro del rango óptimo para el normal funcionamiento de la anguila *A. anguilla* (Van Waarde y cols, 1983; Ferrando, 1990; Sancho, 1996).

Las anguilas no fueron alimentadas ni durante la fase de aclimatación ni durante las distintas experiencias, ya que las poblaciones salvajes de esta especie no se alimentan en

cautividad (Van Waarde y cols, 1983; Ferrando, 1990; Sancho, 1996).

Antes de iniciar los experimentos con propanil, se procedió a efectuar un experimento control, realizando un análisis completo de todos los parámetros fisiológicos objeto de estudio en una población salvaje de anguilas no expuestas a tratamiento alguno. Se comprobó que el mantenimiento de las anguilas en las condiciones de laboratorio descritas en el capítulo de Material y Métodos (Apdo. 3.3.2) durante 216 h en un medio continuo de circulación de agua, no provocó alteraciones fisiológicas significativas en ninguno de los parámetros estudiados, observándose homogeneidad a lo largo del tiempo para cada uno de ellos. Ello permitió inferir posteriormente que las alteraciones observadas en los parámetros de medida en los ejemplares expuestos al herbicida propanil, fueron consecuencia de la presencia del herbicida en su medio, único factor diferencial respecto del experimento control.

Durante el tiempo que duraron las experiencias con concentraciones subletales de propanil, no se registró mortalidad entre los individuos expuestos. Sí se observaron, sin embargo, los síntomas de intoxicación descritos para este compuesto en el test de toxicidad aguda, especialmente entre las 12-72 horas.

La exposición constante de la anguila *A. anguilla* a concentraciones subletales del herbicida propanil durante 72 horas, se tradujo en la alteración de su metabolismo intermediario. Como consecuencia, diferentes metabolitos y enzimas sufrieron alteraciones en los distintos órganos y tejidos examinados.

Así, se pudo observar en la anguila una clara respuesta funcional frente a la presencia del herbicida en su medio. Como respuesta al estado de estrés se produjo un aumento de la **glucosa plasmática** que se prolongó durante todo el tiempo de exposición e incluso una vez eliminado el herbicida del medio. Se observaron, no obstante, diferencias en los resultados dependiendo de la concentración a la que se expusieron las anguilas.

En el experimento con 0.63 mg/L de propanil en el medio el aumento de la glucosa plasmática llegó a un 158% al finalizar la exposición y se prolongó durante toda la experiencia. Paralelamente, se produjo una movilización de las reservas hepáticas y musculares de **glucógeno** durante toda la fase de exposición, sin apreciarse posterior tendencia hacia la recuperación una vez desaparecido el factor estresante del medio, de manera que en el hígado estas reservas sólo constituyeron el 35% de los valores iniciales al finalizar el ensayo, mientras que en el músculo estriado tampoco superaron el 40% del valor control.

En el experimento con 3.16 mg/L de propanil en el medio la respuesta de estrés fue aún más acentuada. Así, los niveles de glucosa plasmática llegaron a ser del 227% ya a las 48 h y aún fue un 105% superior al control al finalizar el experimento. Las reservas de glucógeno



hepático estuvieron muy mermadas durante todo el experimento y no mostraron recuperación, llegando a suponer sólo el 14% de los valores iniciales al finalizar el ensayo. En el músculo los efectos de la exposición a una mayor concentración de propanil sobre la movilización de glucógeno se hicieron también evidentes durante la fase de recuperación (30% vs. control al finalizar el ensayo).

La dinámica de la respuesta de estrés se caracteriza en general por una fase de alarma durante la cual los niveles de adrenalina se elevan rápidamente causando la movilización del glucógeno hepático hacia glucosa plasmática. A este proceso le sucede una fase de resistencia en la cual los niveles de glucosa permanecen elevados, mientras que los niveles de glucógeno pueden recuperarse o no dependiendo de la magnitud de la hiperglucemia, dieta, .... Si el factor estresante continúa puede producirse la adaptación del organismo o su agotamiento. La adaptación implica cambios en varios procesos fisiológicos, lo que en último término permitiría al animal recuperar su homeostasis. En el caso por ejemplo de la glucosa plasmática esto significaría el restablecimiento de sus valores normales. Cuando la intensidad y duración del estrés es lo suficiente elevada puede sobrevenir el agotamiento, caracterizado por una depleción de las reservas de glucógeno hepático, un descenso de los niveles de cortisol, una depresión de la respuesta inmune, así como un conjunto de cambios que hacen al organismo menos capaz para sobrevivir, especialmente si otros factores estresantes están presentes (Selye, 1973; Pickering, 1981; Heath, 1995). Bálint y cols. (1997) estudiaron muestras procedentes de dos episodios de mortandad masiva de *Anguilla anguilla* por envenenamiento con plaguicidas ocurridos en el Lago Balaton (Hungría) en 1991 y 1995. En los animales afectados se determinó un incremento muy acusado de los niveles plasmáticos de glucosa, siendo incluso 2.5 veces superior en los individuos muertos. Además observaron que los individuos afectados presentaban una fuerte infección causada por el nematodo *Anguillicola crassus*, estando asimismo la mayoría de las anguilas infectadas por la bacteria *Aeromonas punctata*. Una situación de estrés permanente debilita las defensas inmunitarias reduciendo la formación de  $\gamma$ -globulina así como la producción de interferón, los cuales juegan un papel esencial en la resistencia de los peces a varias enfermedades víricas y bacterianas (Némsock y Boross, 1982).

En condiciones normales y a diferencia de los mamíferos, los peces utilizan como principal fuente de energía sus reservas de proteínas y lípidos. Sin embargo, bajo condiciones de estrés agudo asociado a factores bióticos o abióticos, los peces son, en cierto modo, similares a otros vertebrados, movilizándolo y utilizando los carbohidratos para hacer frente a la elevada demanda energética que requiere el organismo bajo tales condiciones de estrés. Durante este estado, los niveles de carbohidratos así como su control hormonal varían rápidamente, aunque los peces disponen de mucha más energía a partir de las proteínas del músculo y de las

reservas lipídicas almacenadas en otras partes del cuerpo (Heath, 1995).

El factor estresante genera en los peces una respuesta nerviosa instantánea, a través del estímulo del sistema nervioso simpático, que actúa directamente sobre aquellos órganos inervados por él, liberando noradrenalina, en el llamado efecto periférico. También ejerce su acción sobre la médula adrenal (tejido cromafín en los peces), que libera a la sangre sus mediadores catocolamínicos (adrenalina y noradrenalina), conocido como efecto sistémico. Las catecolaminas estimulan la glucogenolisis en el hígado (la principal reserva corporal de carbohidratos se localiza en el hígado en forma de glucógeno), traducándose en la liberación de glucosa libre a la sangre. Para poder hacer frente a la alta demanda energética ocasionada por la situación de estrés, el glucógeno, debido a su fácil disponibilidad para la producción de energía, puede ser rápidamente catabolizado, lo cual se traduce en un descenso de sus reservas en los animales estresados y en un aumento de la glucosa sanguínea. Asimismo, las catecolaminas promueven la utilización de ésta por el músculo y activan la lipólisis, facilitando la liberación de ácidos grasos a la sangre. Estos efectos adrenérgicos pueden ocasionar el incremento de la glucemia plasmática en cuestión de minutos desde el inicio del estrés. Frecuentemente coincidiendo con la situación de estrés se produce un incremento de la concentración de lactato plasmático, pero no está claro si es debido a la estimulación adrenérgica de la glucólisis o a un efecto directo del estrés (p.e. hipoxia) sobre el tejido muscular, pudiendo estar implicados, por supuesto, ambos mecanismos (Heath, 1995).

El estímulo estresante provoca además la secreción del factor liberador de corticotropina (CRF) por las células neurosecretoras del hipotálamo, el cual estimula la producción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) por las células adenohipofisarias, la cual vía sanguínea alcanza el córtex adrenal (glándula interrenal en los peces) donde estimula a su vez la síntesis y secreción de glucocorticoides, fundamentalmente cortisol. Éstos promueven, por un lado, el catabolismo de las proteínas tisulares, proporcionando aminoácidos para ser utilizados en el hígado para la síntesis de glucosa (gluconeogénesis) y facilitan, asimismo, la síntesis de glucosa a partir de piruvato en este órgano, favoreciéndose la formación de glucógeno en el hígado. Por otro lado, el cortisol actúa sobre el tejido adiposo, favoreciendo la movilización de los ácidos grasos, con un aumento de sus niveles en el plasma y facilitando su disposición como fuente de energía. Una vez en el hígado, los ácidos grasos contribuirán a la formación de cuerpos cetónicos y acetyl-CoA, acentuando el efecto gluconeogénico (Planas, 1993; Guyton, 1996).

Folmar (1993) tras comparar los efectos ejercidos por diferentes sustancias tóxicas, orgánicas e inorgánicas, en diferentes especies de peces teleósteos, concluyó que una respuesta típica de estrés agudo incluye un incremento de las catecolaminas y el cortisol circulantes, el cual es máximo en 1 hora, y que determina una hiperglucemia que alcanza su cota más elevada a las 4-5 horas desde el inicio del estrés. El rápido incremento de los niveles

de glucosa plasmática estaría determinado por la glucogenolisis hepática y muscular, iniciado por la acción de las catecolaminas, mientras que el mantenimiento de estos niveles elevados de glucosa estaría determinado por la gluconeogénesis (a partir del catabolismo proteico y lipídico) estimulada por la acción del cortisol.

Además de este aumento de la glucosa plasmática, se registró también en las anguilas un aumento de este metabolito en el músculo y un descenso en hígado y corazón. Como ya se ha comentado, las reservas de **glucógeno**, tanto hepáticas como musculares, fueron movilizadas durante toda la exposición de los animales al herbicida, independientemente de la concentración empleada. Se observó un aumento generalizado de **lactato** en todos los tejidos en que fue determinado (sangre, hígado, músculo estriado, cerebro, branquia y corazón). Paralelamente los niveles de **proteínas totales** en el plasma, musculatura estriada, hígado, cerebro y branquia disminuyeron, si bien en el corazón se mantuvieron relativamente homogéneas. Se acompañó también de una movilización de los lípidos (**colesterol** y **triglicéridos**) en hígado y músculo estriado, que se tradujo en un incremento de su presencia en el plasma.

La exposición de individuos de esta especie, *Anguilla anguilla*, a plaguicidas de distinta naturaleza induce esta típica respuesta de estrés, como ha sido citada previamente por diversos autores. Así, la exposición subletal al insecticida organoclorado lindano provocó un aumento de los niveles plasmáticos de glucosa, piruvato y lípidos, paralelo a una movilización de las reservas de glucógeno, lípidos totales y colesterol en hígado y músculo, incluso se determinó una disminución del glucógeno y colesterol cerebral y branquial. Todos estos reajustes metabólicos estuvieron acompañados de un aumento generalizado de los niveles de lactato, como describieron Ferrando y Andreu en diferentes trabajos (Ferrando y cols., 1989; Ferrando y Andreu, 1991a, 1991b, 1992). Similar respuesta se observó en la anguila europea expuesta al plaguicida organoclorado endosulfan (Gimeno y cols., 1994, 1995).

Del mismo modo, el tratamiento de la anguila *A. anguilla* con concentraciones subletales de compuestos organofosforados como el insecticida fenitrotion desencadenaron rápidamente hiperglucemia acompañada del descenso de las proteínas totales (plasma, hígado, musculatura estriada, cerebro y branquias) y las reservas de glucógeno y lípidos totales (hígado y musculatura estriada) junto con un aumento generalizado de lactato (Sancho y cols., 1996, 1997, 1998a, 1999). También Cerón y cols. (1996, 1997) refieren en la anguila esta respuesta a la intoxicación con el plaguicida organofosforado diazinon.

También compuestos herbicidas como el tiocarbamato tiobencarb han sido citados como inductores de esta respuesta de estrés en la anguila (Fernández-Vega y cols., 2002a). En el caso del herbicida tiobencarb se observó una tendencia clara al restablecimiento de las distintas reservas de la anguila tras un periodo de recuperación en agua limpia, a diferencia de lo observado con el propanil, fundamentalmente con la concentración más elevada, que dejó a

---

la anguila con muy pocas reservas de glucógeno, proteínas totales o lípidos, ya que después de acabar los experimentos no sólo no se vió tendencia a su recuperación sino que además éstas siguieron muy mermadas.

Está claro pues, que los plaguicidas citados junto con el herbicida propanil presentado en este trabajo inducen aún en concentraciones subletales una respuesta de estrés clara en la anguila *A. anguilla*.

Los procesos de síntesis y degradación del glucógeno regulan el nivel de glucosa sanguínea y suministran un depósito de glucosa utilizable durante una mayor actividad muscular. Los principales tejidos de almacenamiento de glucógeno son el hígado y el músculo esquelético. Aunque la concentración de glucógeno es superior en el hígado que en el músculo, se acumula más glucógeno en el músculo esquelético debido a su mayor masa (Strayer, 1996). El glucógeno hepático y muscular de las anguilas fue mayoritariamente desviado, muy probablemente, para su utilización a través del proceso de glucogenolisis, lo que explicaría el descenso observado en estos tejidos, con objeto de proporcionar energía extra para hacer frente a la situación de estrés que supuso para los peces la presencia de propanil en el agua.

Por otro lado, un incremento de actividad en la ruta glucogenolítica favorecería la mayor disponibilidad de glucosa en las células de los peces sometidos a condiciones de hipoxia o anoxia, para la obtención de energía mediante su degradación vía anaerobiosis. Esto podría ser utilizado por los peces durante una situación de estrés inducida por la presencia de plaguicidas, tal y como se ha observado en diferentes especies piscícolas, cuando los animales han estado expuestos a concentraciones subletales de plaguicidas, independientemente del grupo químico al que pertenecen. Así, Gill y cols. (1990a) observaron una movilización del glucógeno en hígado y cerebro unida a hiperglucemia plasmática además de hiperlactemia en el pez *Punthius conchoni* por la intoxicación con el insecticida organofosforado fosfamidon. Singh y cols. (1996) constataron que la exposición durante 12 días del pez de agua dulce *Heteropneustes fossilis* al plaguicida organoclorado aldrín provocó la reducción de las reservas de glucógeno tanto en el hígado como en el músculo, acompañado de una elevada hiperglucemia plasmática durante todo el ensayo, además de una reducción del contenido proteico hepático y muscular. También tras la exposición a plaguicidas organofosforados, como observaron Oruç y Üner (1998) al exponer a la carpa, *Cyprinus carpio*, a azinfosmetil, con un aumento de la glucemia plasmática acompañada del descenso del glucógeno hepático y muscular con todas las concentraciones y tiempos ensayados.

Los cambios en el contenido de glucógeno tisular se relacionan con los niveles de catecolaminas y glucocorticoides circulantes segregados bajo una situación de estrés. Se ha demostrado en peces que las catecolaminas segregadas bajo esta condición de “alarma” reducen el contenido de glucógeno hepático mediante la estimulación de las enzimas

glucógeno fosforilasas (Pikering, 1981). Begum (2004) detectó una movilización de las reservas de glucógeno tanto hepáticas como, en menor medida, musculares en el pez de agua dulce *Clarias batrachus* expuesto durante 6 días al insecticida carbofuran, acompañado de una incrementada actividad glucógeno fosforilasa *a* en ambos tejidos. Esta enzima cataliza la primera reacción de la glucogenolisis, liberando glucosa-1-fosfato a partir del glucógeno. Tras un periodo de 6 días en agua sin plaguicida los niveles de glucógeno se recuperaron, pero la actividad glucógeno fosforilasa se mantuvo incrementada en ambos tejidos.

Desde un punto de vista fisiológico, el contenido de glucógeno muscular depende de la concentración de glucosa en plasma así como de su propia capacidad de síntesis, lo que lo diferenciaría del hígado, donde la concentración de glucógeno depende principalmente de la capacidad sintética. Shakoori y cols. (1996) investigaron los efectos tóxicos provocados en el pez de agua dulce *Ctenopharyngodon idella*, por una exposición de 4 semanas a una dosis subletal del insecticida fenvalerato, observando un descenso significativo de glucógeno, proteínas totales, aminoácidos y colesterol en el hígado, además de un aumento de la glucosa. Del mismo modo, también observaron un descenso de glucógeno y proteínas totales en la musculatura estriada. Estos autores sugirieron que el aumento de la glucosa hepática y el descenso del contenido de glucógeno eran debidos a una mayor actividad de la ruta glucogenolítica así como a una inhibición de la glucolisis. Paralelamente, se observó la inhibición de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) hepática, lo que efectivamente se traduciría en una desviación hacia la gluconeogénesis que explicaría el aumento constatado de la glucosa en este órgano.

En un estudio reciente sobre el efecto del plaguicida organofosforado dimecrom y el carbamato ziram sobre el metabolismo de los carbohidratos en el pez dulceacuícola *Sarotherodon mossambicus* (Thangavel y cols., 2004) se constató que el órgano más afectado fue el hígado, donde se detectó una movilización del glucógeno acompañada de una elevada acidosis láctica (acumulación de lactato), además de un descenso de la glucosa hepática. En el músculo también se produjo degradación del glucógeno y descenso de la glucosa, pero en este caso sin elevación del lactato, lo cual podría ser considerado como una adaptación del pez para evitar la fatiga muscular (debida a la acidosis láctica) promovida por una mayor actividad impuesta por la condición de estrés. También en el tejido cardiaco se determinó por un descenso de glucosa acompañado de un aumento del lactato.

En el presente estudio, el herbicida propanil produjo un descenso de la glucosa hepática en las anguilas desde las primeras horas, que fue máximo a las 72 h (60%) durante el tratamiento con la concentración más baja, y aún antes, a las 48 h (67%), con la más alta. Una vez en agua limpia, si bien los niveles tendieron a la recuperación, éstos volvieron a decaer antes de finalizados los experimentos, independientemente de la concentración de propanil utilizada. Este descenso podría indicar su utilización directa por las células hepáticas, además de su

---

exportación a sangre para ser transportada a otros tejidos donde la capacidad sintética de esta molécula energética es mucho menor, como el cerebro, el músculo esquelético o el músculo cardiaco. Efectivamente, el hígado ayuda a mantener los niveles de glucosa sanguínea, de modo que el cerebro y el músculo puedan extraer suficiente glucosa para atender sus demandas metabólicas (Strayer, 1996). De hecho, en la musculatura esquelética se observó un aumento de la glucosa desde primeras horas de exposición a propanil. En la experiencia con 0.63 mg/L, los niveles se recuperaron una vez eliminado el propanil del agua, a diferencia de lo ocurrido en la experiencia con 3.16 mg/L, donde los niveles permanecieron aumentados durante toda la experiencia.

De Aguiar y cols. (2004) publicaron un descenso de los niveles de glucógeno en el músculo y un descenso del glucógeno y de la glucosa hepáticos, acompañado de un incremento de la glucemia plasmática en el pez dulceacuícola *Brycon cephalus* expuesto al organofosforado metil-paration, lo que estaría indicando el uso de los carbohidratos en los órganos de reserva y la exportación de la glucosa hacia la sangre para ser distribuida a otros tejidos.

Se observó un descenso de la glucosa cerebral durante las primeras 24 h, aumentando durante las 48-72 h de exposición, para volver a decaer a partir de las 120 h, siguiendo la misma pauta en las anguilas de ambos experimentos. El herbicida propanil es neurotóxico en mamíferos (Theus y cols., 1993) y se ha comprobado que el sistema nervioso aumenta sus requerimientos energéticos durante la exposición a plaguicidas neurotóxicos (Anand y cols., 1985). Por otro lado, la molécula de glucosa representa la única fuente de energía consumible por las neuronas. Tras un primer descenso de sus niveles, el aumento subsiguiente de la glucosa cerebral sería una consecuencia del mecanismo adoptado por el organismo para dotar a este órgano de la energía necesaria para el mantenimiento sus funciones fisiológicas, y procedería, fundamentalmente, de la gluconeogénesis hepática. No obstante, es posible que las demandas energéticas inducidas por la intoxicación con el propanil excedieran la capacidad de las anguilas de mantener su homeostasis en este órgano, puesto que los niveles de glucosa volvieron a decaer antes de finalizadas las experiencias.

En el músculo cardiaco de la anguila se observó un descenso de los niveles glucídicos, que se prolongó durante la fase de exposición con la concentración más baja de propanil, con un descenso máximo del 34%, pero se recuperó a las pocas horas de eliminado el herbicida del medio, lo que contribuiría a mantener el tejido cardiaco en condiciones energéticas óptimas para una mejor actividad cardiaca en los peces tras la situación de estrés. Sin embargo en la experiencia con 3.16 mg/L, los niveles permanecieron disminuidos durante toda la experiencia, incluso durante los 6 días de permanencia en agua no contaminada. Este descenso glucídico sería consecuencia de una mayor actividad glucolítica en las células cardiacas con objeto de obtener la energía extra necesaria para hacer frente al aumento de la

actividad cardiaca (tanto la frecuencia como la potencia cardiacas se incrementan bajo una situación de estrés). Este fenómeno ha sido previamente descrito en el pez dulceacuícola *Sarotherodon mossambicus* expuesto a los plaguicidas Dimecrom y Ziram, donde en el corazón, además de un descenso de la glucosa, se observó un aumento de lactato (Thangavel y cols., 2004).

En *A. anguilla* se observó, en este estudio, un aumento generalizado de los niveles de **lactato** en todos los tejidos analizados ya desde primeras horas de contacto de los animales con el herbicida propanil. Se pudo constatar que este aumento guardó una relación concentración-respuesta, obteniéndose coeficientes de correlación comprendidos entre 0.78 (cerebro) y 0.91 (plasma). Si bien durante la fase de recuperación de las anguilas expuestas a la concentración menor de propanil algunos tejidos lograron recuperar los niveles de lactato iniciales (branquias, músculo y corazón), en las anguilas expuestas a la concentración más elevada, el aumento generalizado de los niveles de lactato se mantuvo también tras 6 días de permanencia en agua libre de contaminante. Los valores más elevados se registraron entre las 12-48 h en todas las muestras, a excepción del hígado, que se alcanzó a las 56 h. En el plasma, los valores determinados llegaron a ser 3.7 veces más elevados que al comienzo de la experiencia (370%), y en branquias e hígado, los valores alcanzaron el 184% y 173% de los valores iniciales, respectivamente. También fueron muy importantes en el cerebro (155%) y en el músculo (135%).

El cálculo de los niveles de lactato en los tejidos se utiliza como medida del metabolismo anaerobio. Un aumento del metabolismo anaerobio constituye una rápida y clara respuesta contra el déficit energético causado por un déficit de oxígeno en los tejidos (Van der Thillart, 1986). El aumento de lactato registrado en los tejidos analizados en las anguilas expuestas a propanil, sería indicativo de mayores requerimientos energéticos consecuencia de la situación de “alarma” provocada durante su exposición al herbicida.

El lactato se forma en los tejidos cuando la velocidad de la glucólisis supera a la velocidad metabólica del ciclo del ácido cítrico y de la cadena respiratoria. De este modo, la formación de lactato en las células de los organismos superiores se produce cuando la cantidad de oxígeno disponible es limitada, como ocurre en el músculo durante la actividad intensa o bien cuando el aporte de oxígeno disminuye, como por ejemplo por la exposición a sustancias contaminantes. En condiciones normales, solamente una pequeña fracción de la energía de la glucosa se libera en la conversión anaeróbica hasta lactato, ya que se puede extraer mucha más energía de forma aeróbica por la vía del ácido cítrico y de la cadena respiratoria. De manera que la formación de lactato supone “ganar tiempo” ya que permite la regeneración del  $\text{NAD}^+$  necesario para la continuidad de la glucólisis, impidiendo que ésta cese en condiciones anaerobias (Strayer, 1996).

Debido a su diseño y funcionalidad, las branquias son un tejido muy sensible a condiciones ambientales desfavorables y constituyen uno de los primeros órganos afectados bajo tales condiciones (Peters y Hong, 1985). Su extensa superficie y su fina estructura a modo de tamiz, las hacen particularmente susceptibles a la exposición continuada a agentes nocivos que contaminan el medio acuático (Lichtenfels y cols., 1996). Se han publicado numerosos trabajos acerca de las lesiones inducidas en el tejido branquial por la presencia de distintas sustancias tóxicas en el agua (Heath, 1995; Borah y Yadav, 1996; Lichtenfels y cols., 1996; Karan y cols., 1998). Santos y cols. (1990) observaron hipertrofia y formaciones edematosas en las laminillas branquiales de la anguila europea expuesta a residuos industriales. Estas lesiones provocan a la vez importantes desajustes en la incorporación de oxígeno a través de las branquias, lo que unido a una mayor demanda de energía, origina un ambiente interno gravemente hipóxico o anóxico.

También los herbicidas son capaces de alterar la integridad estructural y funcional del tejido branquial. En este sentido, Neškovic y cols. (1996) observaron diferentes cambios histopatológicos en el tejido branquial de *Cyprinus carpio* expuesto a concentraciones subletales del herbicida glifosato, tales como hiperplasia, edema, infiltración leucocitaria e hipertrofia de las células de cloruro, lo que indicaría un importante daño estructural y funcional en este tejido. Estos estudios se verían apoyados por los efectuados posteriormente por Jiraungkoorskul y cols. (2003) que encontraron asimismo diversos daños histopatológicos ocasionados por el mismo herbicida en el pez dulceacuícola *Oreochromis niloticus*. La exposición a otro herbicida, el tiocarbamato tiobencarb, provocó diferentes lesiones en las branquias del pez *Gambusia affinis*, caracterizadas por la hipertrofia del epitelio respiratorio con infiltración leucocitaria del epitelio branquial, hiperplasia de las células mucosas, fusión completa de las lamelas secundarias y hemorragias con ruptura del epitelio (Persichino y cols., 1998). También los estudios histológicos efectuados por Poleksić y Karan (1999), en diferentes tejidos de *Cyprinus carpio*, ponen de manifiesto la capacidad de otro herbicida, en este caso, la dinitroanilina trifluralin, de provocar lesiones en las branquias, como hiperplasia y edema del epitelio branquial primario y secundario o hipertrofia de las células de cloruro. Todos estos herbicidas provocaron además alteraciones de enzimas, tales como la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST), como se discutirá más adelante.

También herbicidas como tiobencarb o propanil, son capaces de afectar y alterar la capacidad funcional de enzimas, como la Acetilcolinesterasa (Fernández-Vega y cols., 2002b), las Adenosin-Trifosfatasa (Sancho y cols., 2003) o la actividad enzimática ALP (ver Resultados, apartado 4.2.14.1), que en las branquias reducen su eficacia como órgano respiratorio. Y como se discutirá más adelante, se observó un aumento del contenido hídrico del tejido branquial de las anguilas, alterando los procesos fisiológicos normales del tejido respiratorio como consecuencia de este estado edematoso. Como resultado, el animal recibe



menor cantidad de oxígeno, desarrollando un estado de hipoxia interna, que provocaría un incremento del metabolismo anaerobio, menos eficiente energéticamente que el metabolismo aerobio, lo que vendría indicado por el espectacular aumento del contenido de lactato tisular en las anguilas experimentales expuestas a la concentración más alta de propanil.

Hay que tener presente que un aumento importante de lactato interferiría con los mecanismos internos necesarios para el mantenimiento del equilibrio ácido-base. Además, el lactato podría también reducir la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y por el dióxido de carbono, disminuyendo así la capacidad transportadora de oxígeno por la sangre (Begum y Vijayaraghvan 1999). Por último, se ha comprobado la implicación del herbicida propanil en el deterioro de los eritrocitos causando metahemoglobinemia y anemia en mamíferos (McMillan y cols., 1990a,c; 1991). De ocurrir lo mismo en peces como la anguila esto implicaría una merma en la capacidad de transportar oxígeno a los tejidos, debido a la incapacidad de la metahemoglobina de unirse al oxígeno, lo que contribuiría a aumentar este estado de hipoxia en la anguila.

Radhaiah y Jayantha (1991) relacionaron un descenso en el aporte de oxígeno con la inhibición de la actividad de las enzimas oxidativas en el pez *Tilapia mossambica* expuesto al insecticida fenvalerato. Tras un aumento inicial de la función de las enzimas oxidativas succinato deshidrogenasa (SDH), malato deshidrogenasa (MDH) e isocitrato deshidrogenasa (IDH), indicativo de una alta tasa metabólica durante el estado inicial de toxicosis, se produjo su inhibición durante el subsiguiente periodo de exposición, evidenciando la reducción operativa del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, observando además un descenso de la tasa de consumo de oxígeno que fue concentración dependiente. Estos autores atribuyeron la inhibición de las enzimas oxidativas al descenso del aporte de oxígeno, particularmente debido a las lesiones estructurales en el tejido respiratorio branquial, combinado con la desorganización mitocondrial, desencadenado por el envenenamiento con el tóxico. También Reddy y cols. (1994) citaron similar inhibición de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en el pez *Channa punctatus* expuesto al insecticida organoclorado lindano.

En general, bajo condiciones de hipoxia o anoxia se eleva la movilización y el consumo de los carbohidratos corporales y se activa la glucogenolisis (Oruç y Ünner, 1998). Padmaja y Balaparameswara (1995) atribuyeron los bajos niveles de carbohidratos en la especie de agua dulce *Bellamyia dissimilis* expuesta a varios plaguicidas, a la utilización directa de estos metabolitos para la generación de energía, una demanda causada por la hipoxia debido a las lesiones en tejido respiratorio inducido por la intoxicación. La exposición a los plaguicidas malation (organofosforado) y carbaryl (carbamato) indujo la disminución del contenido de glucógeno, piruvato y proteínas totales acompañado de un aumento de lactato tanto en el hígado como en el músculo del pez dulceacuícola *Colisa fasciatus* en todos los tiempos y concentraciones ensayadas (Singh y cols., 2004).

Por otro lado, la acumulación de lactato en los tejidos puede llevar a una acidosis metabólica y una subsiguiente fatiga muscular con implicaciones sobre la normal actividad de los peces, como la búsqueda de alimento o capacidad de escape (Tugiyono y Gagnon, 2002).

El principal efecto metabólico como consecuencia del déficit de oxígeno consiste en un aumento de la síntesis de lactato mediante la acción de la enzima **lactato deshidrogenasa**, como un mecanismo compensatorio para combatir el estrés por toxicosis. Esta enzima cataliza la reducción reversible del piruvato, producto final de la glucólisis, a lactato cuando la cantidad de oxígeno en los tejidos es limitada. La anguila *A. anguilla*, sometida a tratamientos subletales con distintos plaguicidas, manifestó invariablemente un aumento de los niveles de lactato en los tejidos analizados (Ferrando y Andreu, 1991a, 1991b, 1992; Gimeno y cols., 1994, 1995; Cerón y cols., 1997; Sancho y cols., 1996, 1997, 1998a). El incremento de este metabolito anaeróbico así como de la actividad LDH es comúnmente observado en peces bajo intoxicación con diferentes plaguicidas (Gill y cols., 1991; Radhaiah y Jayantha, 1992; Reddy y cols., 1994; Szegletes y cols., 1995; Shakoori y cols., 1996). Un aumento de los niveles de lactato y de piruvato (que se transforma a su vez en lactato en condiciones anaeróbicas por acción de la LDH) constituyen un índice bioquímico significativo de un déficit de oxígeno y del estado redox mitocondrial (Gupta y cols., 1991). También indica la posibilidad de un aumento de la gluconeogénesis, con objeto de proporcionar glucosa adicional para compensar el déficit energético debido a las condiciones anóxicas en los peces intoxicados (Reddy y cols., 1994).

La LDH es una enzima citoplasmática presente virtualmente en todos los tejidos animales. Se sabe que en peces esta enzima aumenta en diferentes tejidos por exposición a diferentes tipos de plaguicidas (Radhaiah y Jayantha, 1991, 1992; Borah y Yadav, 1996; Tugiyono y Gagnon, 2002; Singh y Singh, 2004) y de hecho es una enzima considerada como biomarcador citoplasmático (Gupta y cols., 1991). El grado de incremento de la actividad de esta enzima celular depende principalmente de la magnitud y severidad del daño celular (Gupta y cols., 1991). En el presente estudio, la LDH estuvo alterada en hígado, músculo y cerebro de las anguilas expuestas a propanil, con un grado de alteración que fue función de la concentración de herbicida aplicada. En el hígado, la actividad LDH aumentó sólo tras 80 h (50%) en el experimento con 0.63 mg/L de propanil, sin embargo en el experimento con 3.16 mg/L se observó un aumento significativo ya a las 56 h de contacto, con un 90% de aumento. En ambos experimentos las anguilas no recuperaron la actividad inicial tras la permanencia en agua exenta de propanil. En el músculo el efecto se manifestó desde las primeras 24 h, y mientras que en las anguilas expuestas a 0.63 mg/L la actividad se recuperó después de 48 h de comienzo de la fase de eliminación, esta actividad todavía estuvo aumentada un 86% al finalizar el ensayo en anguilas expuestas a la concentración más elevada. La actividad LDH cerebral de las anguilas expuestas a la concentración más elevada de propanil, aumentó hasta un 70-80% durante la exposición, y fue aún un 30% superior al control al finalizar el

experimento. No hubo, sin embargo, alteración significativa en el funcionamiento de esta actividad en las branquias. Estos resultados son comparables a los publicados por Ghosh (1987) en el pez *Clarias batrachus* con un incremento de la actividad LDH en hígado, músculo, cerebro y branquias durante la exposición a plaguicidas organofosforados o a los determinados por Tugiyono y Gagnon (2002) con un aumento de esta actividad en hígado y músculo del pez *Pagrus auratus* como consecuencia de la exposición al plaguicida Na-PCP.

Durante el estudio sobre el efecto que el insecticida piretroide alfametrin provocó en el pez dulceacuícola *Catla catla*, Singh y Singh (2004) observaron el aumento de la actividad LDH (hígado, músculo, cerebro y branquia), acompañado de un descenso generalizado de la actividad de enzimas relacionados con el metabolismo aerobio (SDH, MDH, citocromo *c* oxidasa) y de la actividad  $Mg^{2+}$ ATPasa. Esto indicaría una reducción de los procesos implicados en el metabolismo oxidativo (ciclo de los ácidos tricarboxílicos y cadena de transporte electrónico) resultando en una merma en la capacidad de producción de energía.

La enzima LDH constituye el centro de un delicado equilibrio entre el catabolismo y el anabolismo de los carbohidratos. Begum y Vijayaraghvan (1995a, 1999) observaron un aumento de las actividades LDH y glucógeno fosforilasa, acompañado del descenso de glucógeno y un aumento concomitante de los niveles de glucosa y lactato en hígado y músculo del pez dulceacuícola *Clarias batrachus* promovido por la exposición al insecticida organofosforado dimetoato. La estimulación de la ruta glucolítica para la obtención de energía extra junto al incremento de la actividad LDH indicaría que el producto final de la glucolisis, el piruvato, no entró en el ciclo de Krebs sino que se transformó en lactato bajo condiciones hipóxicas, lo que deriva en la acumulación de lactato en los tejidos. También Oruç y Üner (1998) citan un aumento de la actividad LDH unido a un descenso del glucógeno hepático y muscular así como un aumento de la glucosa plasmática en *Cyprinus carpio* como consecuencia de la exposición al organofosforado azinfosmetil.

La LDH es una enzima citosólica que está presente prácticamente en todos los tejidos, si bien los órganos con mayor concentración en mamíferos son el hígado, el músculo esquelético y el corazón (Gupta y cols., 1991). En la anguila, la mayor concentración de esta enzima se registró en el músculo esquelético, con una actividad media en los individuos control de 105  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ , seguido del hígado>cerebro>branquia, con actividades medias de 27>19>13  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  respectivamente. En mamíferos, cuando existe daño tisular, relacionado con alguna enfermedad o por exposición a alguna sustancia tóxica, se ha visto que la actividad LDH aumenta. Se utiliza como biomarcador de una variedad de enfermedades, intoxicaciones y miopatías, ya que sus niveles plasmáticos aumentan como resultado de un incremento de la permeabilidad de las membranas plasmáticas de los tejidos lesionados, lo que permite la salida al torrente circulatorio de enzimas citoplasmáticas. Gupta y cols. (1991) estudiaron la actividad LDH total en plasma así como sus diferentes isoenzimas, propios de

cada tejido, con objeto de determinar qué órganos estarían dañados, en ratas macho Sprague-Dawley expuestas al insecticida carbamato carbofuran. Estos autores observaron un aumento de la LDH plasmática total así como de los isoenzimas mayoritarios propios de cada uno de los tejidos, lo que demostró que este producto causó daños en todos los tejidos estudiados. En peces, Asztalos y Nemcsok (1985) relacionaron el incremento de la actividad LDH plasmática en *Cyprinus carpio* con lesiones del tejido hepático como consecuencia de su exposición a plaguicidas. Y de igual modo, el aumento que se registró de la actividad LDH en las anguilas, podría estar relacionado con lesiones en los diferentes tejidos como resultado de la contaminación con propanil.

Las **proteínas** son las macromoléculas más abundantes e importantes en los seres vivos y desempeñan funciones clave en casi todos los sistemas biológicos. Cumplen un papel esencial en la arquitectura, fisiología y metabolismo de la célula y constituyen aproximadamente el 50% del peso seco celular. Como constituyentes de las membranas celulares, las proteínas tienen una función vital en las interacciones entre el medio intra y extracelular. Y como enzimas, las proteínas son responsables del mantenimiento de la homeostasis y del delicado equilibrio subcelular, catalizando casi todas las reacciones químicas que tienen lugar en la célula (Strayer, 1996). Bajo situación de estrés (en este caso por la presencia de propanil en el medio), se utilizan como combustible metabólico para la obtención de energía extra necesaria para poder hacer frente a esta situación de “huida / lucha” generada.

En las anguilas expuestas a 0.63 mg/L de herbicida se observó un descenso de las proteínas totales plasmáticas durante la fase de exposición, pero se restablecieron sus niveles durante la fase de recuperación. Igualmente se registró una movilización de las reservas proteicas tanto en la musculatura estriada como, en menor medida, en el hígado y la branquia, que se prolongó durante todo el experimento, mientras que en el cerebro la movilización se observó a partir de las 56 h.

La utilización de las reservas proteicas en las anguilas expuestas a 3.16 mg/L de propanil fue mayor tanto en el músculo como en el hígado, prolongándose durante todo el experimento y con las reservas aún muy mermadas al finalizar la experiencia. En la branquia además la movilización fue máxima durante un mayor periodo de tiempo y en el cerebro la movilización comenzó antes, ya partir de las 2 h. En el plasma los niveles proteicos descendieron también durante la fase de exposición al herbicida.

Esta disminución de los niveles de proteínas totales en los diferentes tejidos analizados de la anguila *A. anguilla* podría estar justificada por una activación de su catabolismo derivada de la exposición a propanil. Se promovería así un aumento de la proteólisis desencadenado por el herbicida y relacionado con la mayor demanda energética como consecuencia de la respuesta de estrés. Esto se traduciría en la obtención de aminoácidos libres utilizables como

---

sustrato metabólico para la síntesis de glucosa a través de la gluconeogénesis, fundamentalmente hepática, o bien, previa transaminación, para su entrada en el ciclo del ácido cítrico.

El uso de las reservas proteicas bajo situaciones de estrés provocadas por la presencia de plaguicidas en el medio es frecuente en los peces, especialmente en los dulceacuícolas (Singh y Bhati, 1994; Singh y cols., 1996; Shakoori y cols., 1996). El descenso de los niveles de proteínas totales puede deberse a un aumento de la actividad proteolítica y a una posible utilización de los productos resultantes con fines metabólicos como publicaron Singh y cols. (1996), al observar un descenso de las proteínas hepáticas y musculares en el pez de agua dulce *Hepteropterus fossilis* expuesto al plaguicida aldrin. Por otro lado, concentraciones subletales del insecticida carbofuran provocaron un descenso del contenido de proteínas totales tanto en el hígado como en musculatura estriada, cerebro, branquia, corazón y riñón en el pez de agua dulce *Clarias batrachus*, directamente proporcional a la concentración de insecticida empleada y al tiempo de duración del tratamiento (Singh y Sharma, 1998). Un descenso de las proteínas hepáticas y musculares también ha sido observado en el pez dulceacuícola *Colisa fasciatus* expuesto a malation y a carbaryl en todas las concentraciones y tiempos estudiados (Singh y cols., 2004). Ello estaría indicando la adaptabilidad fisiológica de los animales para compensar el estrés inducido por el tratamiento. Está claro que para hacer frente a esta situación los animales presentan una elevada demanda energética, que estimularía el catabolismo proteico. También en la anguila europea, se ha observado un descenso significativo del contenido en proteínas totales de órganos como hígado y músculo como un mecanismo que se activa para la obtención de energía “extra” necesaria para hacer frente a la situación impuesta por la intoxicación con plaguicidas (Sancho y cols., 1997, 1998a, 1999, Fernández-Vega y cols., 2002a).

Por otro lado, Borah y Yadav (1996) atribuyeron el descenso del contenido de proteínas totales en músculo y branquias del pez *Hepteropterus fossilis* expuesto al insecticida dimetoato, a una merma de la capacidad de síntesis proteica y/o a un incremento de la proteólisis. Esto último daría lugar a aminoácidos libres utilizables como sustrato metabólico a través del ciclo de Krebs para la obtención de energía adicional impuesta por la condición de estrés.

Los aminoácidos que no son utilizados de inmediato para la síntesis de proteínas y otras biomoléculas, no pueden ser almacenados en la célula, como sucede con los ácidos grasos y la glucosa, ni tampoco pueden ser excretados, utilizándose como combustible metabólico. La degradación de los aminoácidos tiene lugar principalmente en el hígado. La mayoría de los grupos  $\alpha$ -amino de tales aminoácidos sobrantes se convierten en amonio, mientras que sus esqueletos carbonados se transforman en acetil-CoA, acetacetil-CoA, piruvato, o en uno de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. La estrategia de la degradación de

los aminoácidos es formar intermediarios metabólicos principales que puedan convertirse en glucosa o bien oxidarse en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Strayer, 1996).

En el proceso de degradación de muchos aminoácidos, el grupo  $\alpha$ -amino se transfiere al  $\alpha$ -cetoglutarato para formar glutamato, que es desaminado oxidativamente por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), liberando amonio. Las **aminotransferasas**, denominadas también transaminasas, catalizan la transferencia de un grupo  $\alpha$ -amino desde un  $\alpha$ -aminoácido hasta un  $\alpha$ -cetoácido. La alanina aminotransferasa (**ALT**) cataliza la transferencia del grupo  $\alpha$ -amino de la alanina hasta  $\alpha$ -cetoglutarato liberando piruvato y glutamato. La aspartato aminotransferasa (**AST**) a su vez, cataliza la transferencia de un grupo  $\alpha$ -amino del aspartato hasta  $\alpha$ -cetoglutarato liberando oxalacetato y glutamato. Así, se transfieren los grupos  $\alpha$ -amino de estos aminoácidos hasta el glutamato para convertirlos en amonio, que se excreta como tal en peces.

En la anguila *A. anguilla* se observó en general un aumento de la actividades ALT y AST en los órganos y tejidos en los que se estudiaron: sangre, hígado, músculo, y corazón. En el experimento con 0.63 mg/L la actividad AST en sangre aumentó a partir de las 24 h y se normalizó una vez en agua exenta de herbicida. En el hígado la actividad ALT aumentó a partir de las 56 h, y se prolongó hasta 4 días en agua sin propanil, recuperándose al final de la 2ª fase. En el músculo esta enzima aumentó su actividad más tarde que en el resto de tejidos, durante la 2ª fase del experimento, y no se recuperó al finalizar el mismo con independencia de la concentración de propanil empleada. En el corazón, la actividad ALT aumentó desde el inicio del experimento y se recuperó después de 24 h en agua sin plaguicida.

La aplicación de una concentración mayor provocó un efecto más notorio sobre estas enzimas. En el experimento con la concentración más alta, la actividad AST en el plasma aumentó antes, ya desde las 2 h, con un incremento máximo mayor y no se recuperó una vez transferidos los animales a agua sin tóxico. En el hígado, el aumento de la ALT se observó antes, a partir de las 48 h, recuperándose también al final de la 2ª fase. En el corazón la máxima actividad fue mayor y se prolongó durante más tiempo y no se recuperó durante la fase en agua exenta de herbicida.

Este aumento en las actividades aminotransferasas indica que se está produciendo en la anguila un aumento de los procesos de degradación de los aminoácidos procedentes del catabolismo proteico, lo que viene corroborado por el descenso observado de las proteínas en la mayoría de los tejidos analizados y más acentuado en los tejidos implicados en funciones de reserva, como el muscular y el hepático. El aumento de la actividad de estas enzimas proporciona piruvato, oxalacetato,  $\alpha$ -cetoglutarato y glutamato a través de los procesos de transaminación activa y de desaminación oxidativa, como recurso energético dentro del mecanismo de adaptabilidad fisiológica para compensar el estrés por la exposición al herbicida.

La disminución de los niveles de proteínas totales unido a un incremento de las actividades ALT y AST en hígado y músculo se ha citado en individuos de la especie *Clarias batrachus* como consecuencia de la exposición a dimetoato (Begum y Vijayaraghavan, 1995b, 1996) o al insecticida carbofuran (Begum, 2004). Este último autor, además, observó un aumento de aminoácidos libres, y un aumento concomitante del amonio en los mismos tejidos. El aumento de las transaminasas, además de piruvato, oxalacetato y  $\alpha$ -cetoglutarato, proporciona glutamato, que desaminado oxidativamente por la GDH origina amonio, extremo que estaría corroborado por el aumento de amonio y de la actividad GDH observado en hígado y músculo. Este autor observó una recuperación paulatina de los niveles proteicos, fundamentalmente en el hígado, durante un periodo de 6 días en agua exenta de contaminante. La actividad AST volvió a la normalidad en ambos tejidos al final del periodo de recuperación mientras que la ALT no se recuperó tras este periodo.

Esta elevada actividad proteolítica como consecuencia de la exposición de los peces a plaguicidas, también ha sido previamente observada en diferentes tejidos de la carpa *Cyprinus carpio* expuesta al insecticida piretroide cipermetrin, con una disminución generalizada del contenido de proteínas totales y un incremento de los aminoácidos libres, atribuido a su menor utilización en la gluconeogénesis como consecuencia de la exposición de los animales al piretroide, y al hecho de estar involucrados en el mantenimiento de la ósmosis y del equilibrio ácido base celular (David y cols. 2004). Las actividades ALT y AST estuvieron elevadas en todos los tejidos analizados, lo que constituye una clara indicación de la entrada de los aminoácidos en el ciclo de Krebs a través de los procesos de transaminación activa y desaminación oxidativa. La participación de rutas alternativas como las reacciones aminotransferasas son necesarias cuando se produce una inhibición de la actividad de enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo tales como la succinato deshidrogenasa (SDH), la malato deshidrogenasa (MDH), y la citocromo *c* oxidasa, como demostraron Singh y Singh (2004) en hígado, músculo cerebro y branquias del pez duceacuícola *Catla catla* como consecuencia de la intoxicación con el piretroide alfametrin.

Las enzimas aminotransferasas pueden ser utilizadas como biomarcadores sensibles en ensayos de intoxicación experimental con plaguicidas (Heath, 1995). Al tratarse de enzimas intracelulares y puesto que el plasma contiene sólo una pequeña cantidad de las mismas, un aumento plasmático de estas enzimas puede ser representativo de necrosis tisular (Oruç y Ünner, 1998). Estos autores observaron un aumento de las actividades ALT y AST en el plasma acompañado de un descenso de las proteínas totales en hígado y músculo de *Cyprinus carpio* expuesto a dos concentraciones subletales del organofosforado azinfosmetil. Bálint y cols. (1995) encontraron alteraciones citopatológicas en los hepatocitos acompañadas de un incremento de las actividades AST y LDH plasmáticas en *Cyprinus carpio* expuesto al piretroide deltametrin. Los distintos cambios ultraestructurales observados indicarían inequívocamente el daño causado por los plaguicidas en los orgánulos celulares, como la

mitocondria y el núcleo, afectando a los procesos de síntesis de proteínas y de obtención de energía.

Un aumento de las actividades ALT y AST se ha referido en el plasma de *Cyprinus carpio* al exponer a los animales a concentraciones subletales del piretroide deltametrin (Szegletes y cols., 1995). También en la anguila *A. anguilla* la exposición al mismo piretroide supuso un aumento de las actividades ALT y AST en el plasma, del 20% y 100% respectivamente (Bálint y cols., 1997).

Las aminotransferasas son enzimas útiles para la evaluación de lesiones del parénquima hepático (Gingerich, 1982). El aumento de estas enzimas medidas en el plasma se correlaciona con lesiones hepáticas y renales (Bálint y cols., 1997). Se ha demostrado su presencia tanto en el citosol como en la mitocondria de los hepatocitos, de modo que es posible que un aumento de estas actividades en el plasma reflejen la ruptura de las membranas tanto celulares como mitocondriales de los hepatocitos (Hoff y cols., 2003). De Aguiar y cols. (2004) publicaron un aumento de las actividades ALT y AST en plasma del pez dulceacuícola *Brycon cephalus* expuesto al organofosforado metilparation acompañado de un descenso de la actividad ALT en el hígado, lo que explicaría una salida de las enzimas desde el hígado lesionado al plasma. También observaron un aumento de la actividad AST cardiaca, como consecuencia de la ruptura de las membranas mitocondriales de las células cardiacas, con el escape del contenido mitocondrial. La alteración de las funciones cardiacas puede interferir, entre otros, en los procesos celulares de incorporación de O<sub>2</sub> y liberación de CO<sub>2</sub>, lo que conduciría a un estado de hipoxia tisular (De Aguiar y cols., 2004).

Neškovic y cols. (1996) describieron el aumento de las actividades ALT y AST en plasma, hígado, branquias y riñón de *Cyprinus carpio* como consecuencia de la exposición subletal al herbicida glifosato, acompañado de importantes cambios histopatológicos en las branquias y el hígado, como hiperplasia, edema, infiltración leucocitaria e hipertrofia de las células de cloruro y congestión y fibrosis en el hígado, indicativos del importante daño estructural y funcional en estos órganos.

El análisis histológico ha demostrado la relación entre la exposición a concentraciones subletales del herbicida dinitroanilina trifluralin y el aumento de las actividades AST y ALT en sangre, hígado, branquias y riñón de *Cyprinus carpio*, lo que indica daños en estos órganos y tejidos (Poleksić y Karan, 1999). Un aumento significativo de la actividad AST en la branquia estaría relacionado probablemente con la aparición de hiperplasia y edema del epitelio branquial primario y secundario, como mecanismo esencial de defensa de este tejido. Estos autores concluyeron que la hipertrofia observada de las células de cloruro podría apuntar a su papel en la eliminación branquial del herbicida, que excedería a la vía urinaria en la eliminación de sustancias hidrofóbicas como es el caso del herbicida trifluralin. También concluyeron que el incremento de la actividad transaminasa, en las branquias y el plasma, de



los peces expuestos a trifluralin podría indicar la posible “fuga” de enzimas de las células a través de las membranas plasmáticas dañadas y/o a un incremento de su síntesis en los tejidos. Y que el aumento de la actividad AST en hígado y sangre, podría indicar un proceso de necrosis de los hepatocitos del hígado.

También Jiraungkoorskul y cols. (2003) observaron un aumento en la actividad de las enzimas ALT y AST en hígado, branquias y riñón del pez dulceacuícola *Oreochromis niloticus*, como consecuencia de la exposición crónica a concentraciones subletales del herbicida glifosato correlacionado con los diversos daños histopatológicos que ocasionó en estos órganos.

La **albúmina** es una proteína plasmática que en los peces, es sintetizada exclusiva o predominantemente en el hígado, y secretada posteriormente a la sangre. La compleja cantidad de proteínas que se localizan en el plasma tiene su origen, en su mayor parte, en el hígado. Se dividen, en general, en fibrinógenos y albúminas. Estas últimas son importantes en el mantenimiento de la presión osmótica plasmática, en funciones de tamponamiento para el mantenimiento del pH de la sangre, como fuente de aminoácidos y como moléculas transportadoras de hormonas y de sustancias químicas exógenas tales como compuestos orgánicos y metales (Gingerich, 1982; Heath, 1995).

El descenso de los niveles de albúmina plasmática se utiliza para diagnosticar daños o alteraciones de la función hepática (Gingerich, 1982). En la anguila *A. anguilla*, la exposición durante 72 h a concentraciones subletales de propanil provocó el descenso de los niveles de albúmina ya desde primeras horas de exposición. El máximo descenso observado fue del 54% en el experimento con 0.63 mg/L y del 68% en el experimento con 3.16 mg/L. Esta disminución de sus niveles plasmáticos se prolongó durante toda la fase de exposición en ambos experimentos con propanil, pero tendieron a la recuperación de los valores de partida, una vez los animales estuvieron en la fase de recuperación. Este descenso observado en la anguila como consecuencia de la exposición a propanil podría ser indicativo de algún grado de alteración en los hepatocitos que repercutiría en la capacidad de síntesis de la albúmina y como consecuencia en un descenso de sus niveles en el plasma, y/o a su empleo para la obtención de aminoácidos utilizables como recurso energético para la síntesis de glucosa en el hígado o para su entrada en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Se han encontrado pocas referencias bibliográficas que relacionen la exposición a diferentes sustancias tóxicas con la albúmina plasmática de los peces. Pero parece que en general la respuesta a la exposición a estos productos se traduce en un descenso de los niveles plasmáticos de albúmina, como se ha observado en *Cyprinus carpio* expuesto a concentraciones subletales del plaguicida endosulfan, directamente proporcional a la duración del periodo de exposición y a la concentración de insecticida empleada (Jenkins y cols., 2003). Un descenso de los niveles de albúmina plasmática, junto con el aumento de la

glucemia y de las actividades ALT y AST acompañados del aumento de los radicales libres tanto en el plasma como el hígado y el cerebro han sido citados como consecuencia de la intoxicación de la rata Sprague-Dawley con cadmio (El-Demerdash y cols., 2004).

De una manera conjunta, los resultados obtenidos en cuanto al contenido de las proteínas totales en los diferentes tejidos de la anguila, junto con los efectos causados sobre las enzimas aminotransferasas y la albúmina, sugieren un efecto generalizado, ya sea directo o indirecto, del herbicida propanil sobre el metabolismo proteico, interfiriendo en el metabolismo intermediario de los peces, además de interferir con la biosíntesis de lipoproteínas como las de membrana, necesarias para la reparación de membranas biológicas dañadas. En este sentido, se ha demostrado la interferencia del herbicida propanil en la biosíntesis de RNA y enzimas como proteinasas, amilasas y dipeptidasas en vertebrados (Ware, 1983).

Como se explica en el capítulo de Resultados (Aptdos. 4.3.1.5, 4.3.1.6, 4.3.4.5, 4.3.4.6, 4.3.11.5 y 4.3.11.6), la exposición de las anguilas al herbicida propanil provocó alteraciones en su **metabolismo lipídico**, movilizandolas grasas almacenadas, lo que se tradujo en el descenso de los niveles de **colesterol** y **triglicéridos** en el hígado y musculatura estriada, paralelo al aumento de los niveles de lípidos plasmáticos circulantes. Se observaron, no obstante diferencias en los resultados dependiendo de la concentración de propanil a la que se expusieron las anguilas.

En el experimento con la concentración más baja de herbicida (0.63 mg/L), se observó una movilización de colesterol y triglicéridos tanto en el hígado, donde estuvieron disminuidos los niveles toda la experiencia, como en el músculo, donde la máxima movilización de colesterol (70%) se registró en la fase de recuperación. Los triglicéridos musculares se movilizaron a partir de las 72 h, con un descenso entre el 30-55% durante la 2ª fase del experimento. Esta lipólisis hepática y muscular se tradujo en un aumento de los triglicéridos plasmáticos durante todo el ensayo (44% al terminar el ensayo) y en una hipercolesterolemia desde las 12 h hasta las 168 h (aumento medio del 32%).

En el experimento con 3.16 mg/L de propanil, la degradación de colesterol y triglicéridos en el hígado fue mayor, y la movilización fue máxima durante un mayor periodo de tiempo. También lo fue en el músculo, con un descenso máximo de colesterol del 75%. Además los triglicéridos musculares se movilizaron ya a partir de las 24 h, con un descenso de más del 55% al acabar el experimento. El aumento de los triglicéridos plasmáticos se prolongó igualmente durante todo el ensayo, con un mayor incremento al terminar éste (64%) y el aumento de los niveles de colesterol se observó antes, ya desde las 2 h, también hasta 168 h, con aumento medio del 43%.

Los lípidos tienen dos misiones fisiológicas principales en el organismo. En primer lugar, son componentes esenciales de las membranas biológicas. Los principales tipos de lípidos de membrana son los fosfolípidos, los glucolípidos y el colesterol, el cual constituye un tercio de las mismas. En segundo lugar, son esenciales como combustible metabólico, almacenándose en forma de triglicéridos. Éstos son depósitos de energía metabólica altamente concentrada debido a que están en forma reducida y anhidra. El rendimiento de la oxidación completa de los ácidos grasos es de alrededor de 9 cal/mg, a diferencia de las, aproximadamente, 4 cal/mg que se obtienen de los carbohidratos y de las proteínas (Strayer, 1996). El colesterol por su parte, constituye el esteroide más abundante en vertebrados. Se sintetiza en el hígado y una de sus principales funciones es la estabilización de las membranas celulares de los eucariotas. Constituye la capa externa de las lipoproteínas plasmáticas y es además precursor de todas las hormonas esteroideas existentes: glucocorticoides, mineralocorticoides, gestágenos, andrógenos y estrógenos, además de ser precursor de la vitamina D. También las sales biliares son derivados polares del colesterol. Así pues, alteraciones en el metabolismo del colesterol podría traducirse en un aumento de la permeabilidad celular así como en una disfunción hormonal (Heath, 1995; Strayer, 1996).

Bajo una situación de estrés las catecolaminas adrenalina y noradrenalina segregadas promueven la activación de la lipólisis, lo que provoca la descomposición de los triglicéridos y facilita la liberación de ácidos grasos a la sangre. Por otro lado, el cortisol segregado actúa también sobre el tejido graso, favoreciendo la movilización de los ácidos grasos, generando un aumento en el plasma y facilitando, de este modo, su disponibilidad y empleo como fuente de energía mediante la  $\beta$ -oxidación hepática. Los ácidos grasos, además, pueden dar lugar a la formación de cuerpos cetónicos y acetil-CoA en el hígado, contribuyendo a la síntesis de glucosa en este órgano. El descenso observado de los lípidos (triglicéridos y colesterol) estudiados en el presente trabajo, tanto en el hígado como en el músculo, concomitante con el aumento de sus niveles en el plasma de las anguilas como consecuencia de su tratamiento con propanil se explicaría por estos mecanismos fisiológicos.

En este sentido, nuestros resultados concuerdan con los encontrados por otros autores al estudiar el metabolismo lipídico en la anguila bajo el tratamiento con plaguicidas de distinta naturaleza, observando en general, un descenso de los niveles lipídicos en los diferentes tejidos estudiados, acompañado de un aumento de los niveles plasmáticos, ya sea al exponer a los animales a concentraciones subletales de insecticidas organoclorados como lindano (con un descenso de colesterol en los tejidos hepático, muscular, cerebral y branquial) (Ferrando y cols., 1989; Ferrando y Andreu, 1991a, 1991b), organofosforados como fenitrotion (Sancho y cols., 1998a; 1999) o herbicidas como el tiocarbamato tiobencarb (Fernández-Vega y cols., 2002a).

La elevada demanda de energía y su uso como sustrato para la reparación de membranas biológicas dañadas durante la exposición de los peces al plaguicida explicarían el descenso lipídico que se observa en el hígado de las anguilas (Sancho, 1996). La merma de esta reserva energética está supeditada a una disminución de la capacidad sintética de lípidos y/o a un aumento de su  $\beta$ -oxidación en el hígado para combatir la crisis energética bajo el estrés inducido por la presencia del plaguicida, en nuestro caso tipo herbicida. Kaur y Dhawan (1996) observaron la movilización de las reservas lipídicas en el pez *Cirrhina mrigala* durante la intoxicación con el insecticida carbaryl, que disminuyeron, de una manera concentración-dependiente, no sólo en el hígado y músculo sino incluso en las gónadas.

Durante la normal actividad natatoria de los peces la oxidación lipídica les aporta un gran porcentaje del requerimiento energético. La merma de las reservas de lípidos durante la exposición a plaguicidas podría deberse a su utilización, en lugar de la glucosa, para cubrir las necesidades energéticas (Shakoori y cols., 1996).

La disminución de las reservas lipídicas y proteicas bajo situaciones de estrés responde a varios mecanismos, entre los que se incluyen la formación de lipoproteínas, utilizables para reparar las lesiones de las membranas plasmáticas y de los orgánulos celulares y para la reorganización tisular. Los corticoides segregados bajo estas condiciones de estrés actúan favoreciendo la estabilidad de las membranas lisosómicas en las células dañadas de modo que el descenso de lípidos y proteínas tisulares podría estar relacionado con la reparación de los tejidos dañados (Gill y cols., 1991). Este descenso también responde a la activación de la lipólisis y a la utilización directa de estos metabolitos por las células como fuente de energía para cubrir el elevado gasto energético en estas condiciones.

Singh (1992) examinó los cambios producidos en el metabolismo de los lípidos tanto en el hígado como en las gónadas de *Heteropneustes fossilis* expuesto al organofosforado malation durante 4 semanas, observando una reducción de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos, monoglicéridos y ácidos grasos libres en estos órganos. Además, según el autor, la movilización de lípidos hepáticos hacia el ovario pudo verse inhibida como consecuencia de la exposición a este plaguicida. Por otro lado, niveles bajos de colesterol podrían afectar a la biosíntesis de hormonas esteroideas, y por tanto a los procesos implicados en la maduración de los juveniles. En este sentido, un elevado gasto de reservas lipídicas podría llegar a afectar a la reproducción del individuo.

Otros plaguicidas han mostrado inducir el catabolismo de las reservas lipídicas en los peces. Gill y cols. (1991) tras exponer al pez *Barbus conchoniis* a endosulfan observaron el descenso de los lípidos totales en el músculo esquelético, acompañado del aumento de los lípidos totales, colesterol y ácidos grasos libres en el plasma. Los autores sugirieron la lipólisis muscular como responsable del aumento de los niveles lipídicos plasmáticos. Y, por su parte, el aumento del colesterol en el plasma podría deberse a la colesterogénesis *de novo*

en el hígado, que podría haber sido inducida para hacer frente al mayor requerimiento de corticosteroides en respuesta a la situación de estrés generada.

Parece que hay un número variado de caminos por los que el metabolismo del colesterol puede ser alterado por sustancias tóxicas, y la concentración usada puede tener un considerable impacto sobre el carácter del efecto (Heath, 1995). En la sangre de los peces, la literatura recoge tanto hiper- como hipocolesterolemia como consecuencia del tratamiento con plaguicidas. Así la hipercolesterolemia determinada en las anguilas como consecuencia de la exposición al propanil, podría ser reflejo del aumento de su síntesis en el hígado con objeto de utilizarlo para la síntesis de corticoesteroides y/o para la reparación de membranas biológicas. Por otro lado, a este aumento sanguíneo también podría contribuir su liberación desde las membranas celulares dañadas debido a la intoxicación con el propanil. En este sentido, y sabido que los plaguicidas causan daños celulares en los diferentes tejidos, se ha demostrado que el propanil causó la degeneración celular en los tejidos hepático, branquial, renal, intestinal y cardíaco en el pez dulceacuícola *Leuciscus cephalus* (Dezfuli y cols., 2003). Esta capacidad del propanil para provocar lesiones celulares, probablemente estaría también explicando el descenso observado de colesterol en hígado y músculo estriado de las anguilas y su vertido al torrente circulatorio contribuyendo al aumento de sus niveles en sangre.

Muchos compuestos xenobióticos son liposolubles, y se almacenan en los lípidos corporales, por lo que la grasa constituye así un importante reservorio de estas sustancias químicas (Heath, 1995). Con un  $\log K_{OW}$  (coeficiente de partición octanol/agua) alrededor de 3.3 (Tomlin, 1997), el herbicida propanil teóricamente mostraría una alta probabilidad de bioconcentrarse en los tejidos (Shaw y Chadwick, 1998). Los plaguicidas se incorporan desde el agua contaminada principalmente a través de las branquias, pasando al torrente circulatorio y llegando a órganos vitales como el hígado. En este sentido, el hígado de las anguilas, al igual que el resto de su organismo, posee grandes cantidades de grasa. Como consecuencia, los plaguicidas, especialmente los liposolubles, se bioacumularían en este tejido, estando, no obstante, también disponibles para ser metabolizados y finalmente excretados (Larsson y cols., 1991).

La enzima **fosfatasa alcalina (ALP)** participa en la generación de fósforo inorgánico necesario para la síntesis de biomoléculas tales como ADN, fosfolípidos, fosfoproteínas, nucleoproteínas, etc y se localiza en todos los tejidos (Strayer, 1996). Estas enzimas, conocidas también como fosfomonoesterasas, son activas a un pH específico. Están involucradas en el transporte activo de moléculas químicas y nutrientes a través de las membranas celulares mediante el proceso de fosforilación de carbohidratos y lípidos (Hugon y Bogers, 1966; Tripathi y Singh, 2003). También se ha demostrado que la actividad ALP

interviene en la síntesis de proteínas durante la reparación y cicatrización de tejidos dañados (Pilo y cols., 1972) y en la de ciertas enzimas digestivas proteicas (Ibrahim y cols., 1974).

En los estudios de Toxicología, el aumento de la actividad ALP por la exposición a xenobióticos se asocia con lesiones en los tejidos y necrosis celular (Tripathi y Sing, 2003). También, un aumento de la actividad de esta enzima se observa, generalmente, como resultado de una obstrucción intra- o extrahepática del conducto biliar. Así, la estimación de la ALP puede utilizarse para determinar alteraciones hepáticas (Jyothi y Narayan, 1999).

La actividad ALP en la anguila mostró una gran sensibilidad a la presencia de propanil en el medio, su alteración fue significativa en todos los tejidos en los que se estudió. Además su actividad se correlacionó con la concentración de propanil empleada. En sangre la exposición a propanil se tradujo en un aumento de esta actividad enzimática que se prolongó durante toda la fase de exposición en las anguilas tratadas con 0.63 mg/L, con un aumento medio del 50%, si bien se recuperó tras 24 h en agua exenta de herbicida. Con la concentración mayor de propanil hubo un aumento significativo de la actividad desde las 24 h, con un aumento máximo del 71% al final de la fase de exposición y la actividad no se recuperó al finalizar el experimento.

En el hígado, la actividad enzimática aumentó ya desde el inicio en ambos experimentos y no se recuperó en ningún caso. Con 0.63 mg/L de propanil la máxima actividad (175%) se registró a las 80 h, mientras que en el experimento con 3.16 mg/L la máxima alteración se detectó antes (a las 48 h) y el grado de alteración fue mayor, un 225% vs. 0 h.

También se observó un aumento de la actividad ALP en la musculatura esquelética de las anguilas tratadas que se recuperó antes de finalizadas las fases de recuperación. En el cerebro también se registró un aumento significativo de la actividad ALP durante la exposición a propanil que no se recuperó en los animales expuestos a la concentración más elevada al finalizar el experimento. Así, mientras que con la concentración de propanil más baja la actividad enzimática mostró oscilaciones, durante la exposición a 3.16 mg/L aumentó a partir de las 12 h (80%) registrándose un incremento medio del 30% a partir de las 48 h y hasta finalizar el experimento.

En el tejido branquial, se detectó un descenso de esta actividad desde las 96 h (25%) hasta finalizar el experimento con la concentración más baja. Mientras que en el experimento con 3.16 mg/L, los efectos sobre la actividad ALP se observaron ya desde las 48 h de exposición y se prolongaron todo el experimento, con un descenso del 40% entre las 96-120 h de la fase de recuperación.

La administración de 50 mg diarios de propanil por vía oral durante 10 días también produjo una activación de esta actividad enzimática en ratas Sprague-Dawley junto con un aumento de la peroxidación lipídica en el hígado y el cerebro de estos animales (Santillo y

cols., 1995). El aumento de la susceptibilidad de estos tejidos a sufrir lipoperoxidación podría derivarse de la capacidad del herbicida para causar daños tisulares. Y así, el aumento de la citolisis en estos tejidos, indicado por el aumento de los niveles plasmáticos de las actividades ALP y AST, sugeriría que la peroxidación lipídica esta asociada a las lesiones tisulares a consecuencia del tratamiento.

El solo aumento de la actividad ALP es indicativo de la rotura de membranas plasmáticas, con la consiguiente liberación de la enzima ubicada en el interior celular. Y es suficiente para señalar la presencia de daños estructurales y funcionales en órganos y tejidos de especies piscícolas (*Cyprinus Carpio*, *Oreochromis niloticus*) como consecuencia de la exposición a diferentes herbicidas como el glifosato (Neškovic y cols., 1996; Jiraungkoorskul y cols., 2003) o la dinitroanilina trifluralin (Poleksić y Karan 1999), confirmado por el análisis histológico de los tejidos afectados.

Un aumento de la actividad ALP se observa generalmente como resultado de una obstrucción del conducto biliar, por lo que se utiliza para la determinación de las alteraciones hepáticas. Así, como consecuencia de la exposición del pez *Clarias batrachus* a diferentes concentraciones de los plaguicidas carbaryl y forato, Jyothi y Narayan (1999) observaron un aumento de la actividad ALP plasmática (a todos los tiempos ensayados) atribuible a la degeneración y necrosis celular observada en el hígado.

Como consecuencia de la acción tóxica de los productos contaminantes sobre los órganos de los peces se observa una diferente respuesta en la actividad ALP. Así su aumento en órganos como el hígado podría atribuirse a las alteraciones en el centro catalítico de la enzima y/o a lesiones en las membranas celulares, mientras que el descenso, podría estar relacionado con daños estructurales en la maquinaria celular para la producción enzimática, que a su vez se traduciría bien en la disminución de la síntesis de la enzima o bien en la inhibición de su actividad. Gill y cols. (1990b) estudiaron los efectos causados por los plaguicidas aldicarb, fosfamidon y endosulfan sobre la actividad ALP en hígado, músculo esquelético, cerebro y branquia del pez dulceacuícola *Puntius conchonius*, observando tanto una estimulación como una reducción de la actividad enzimática en función del órgano y del plaguicida empleado. Se concluyó que tanto la estimulación como la reducción de la actividad enzimática estaban relacionadas no sólo con el órgano sino también con el plaguicida empleado. Así pues, según estos autores, el descenso de la actividad podría ser debido a lesiones tisulares que desencadenarían una producción enzimática insuficiente, mientras que su aumento podría relacionarse con la influencia de los glucocorticoides. De igual modo, en el presente trabajo el descenso de la actividad ALP determinado en las branquias de las anguilas como consecuencia de la exposición a propanil se relacionó con el aumento de esta actividad en otros órganos y tejidos de los animales.

Borah y Yadav (1996) en los estudios realizados en el pez *Hepteropterus fossilis* también observaron un descenso de la actividad ALP branquial como consecuencia de la exposición a plaguicidas. La consecuencia de este descenso de las actividades fosfatasa, observado en las branquias como consecuencia de la exposición a diferentes plaguicidas sería la disminución de la concentración de fósforo inorgánico, que a su vez, podría llevar a limitar la síntesis de moléculas tales como fosfolípidos, fosfoproteínas, nucleoproteínas, etc. Incluso podría alterar el aporte de fósforo inorgánico necesario para la síntesis de ADN lo cual podría perjudicar el normal crecimiento y desarrollo de los tejidos afectados.

También López-López y cols. (2003) publicaron un aumento de la actividad ALP en el hígado del pez dulceacuícola *Goodea atripinnis* y un descenso de la misma en la branquia del pez dulceacuícola *Ameiops splendens* expuestos a un medio con mezclas de sustancias contaminantes.

La actividad enzimática  **$\gamma$ -glutamyl transferasa ( $\gamma$ -GT)** está implicada en el transporte de glutatión al interior de los tejidos. El glutatión, como molécula antioxidante, es esencial en procesos como la eliminación de radicales libres y la detoxificación de xenobióticos (Meister y Anderson, 1983; Kretzschmar, 1996; Sies, 1999). La  $\gamma$ -GT, única proteasa capaz de degradar al glutatión, presenta su centro catalítico orientado hacia la parte externa de la membrana plasmática, lo que permite la reabsorción de los catabolitos del glutatión desde el espacio extracelular para su regeneración en el citosol. Esta enzima permite pues, regular los niveles intracelulares de glutatión (Gallagher y Di Giulio, 1992). Se utiliza en Toxicología como medida de la detoxificación de xenobióticos y de estrés oxidativo (Meister y Anderson, 1983; Almar y cols., 1998).

Como consecuencia de la exposición de las anguilas al herbicida, en el hígado la actividad  $\gamma$ -GT disminuyó en los dos experimentos con propanil. En los animales expuestos a la concentración más baja, la enzima mostró una inhibición media del 25% durante toda la experiencia, sin mostrar recuperación incluso durante la fase en agua sin herbicida, al igual que lo sucedido en los animales expuestos a la concentración de propanil más elevada. En este caso, esta actividad descendió hasta un 50% con respecto a los individuos no expuestos. Por el contrario, la actividad  $\gamma$ -GT aumentó en el músculo esquelético de las anguilas. Este aumento fue más acusado en los animales expuestos a la concentración de propanil más elevada, no sólo por que se registraron incrementos de actividad de hasta el 75%, sino porque se mantuvo por encima de los valores control durante toda la experiencia; mientras que en los animales expuestos a la concentración más baja, la actividad  $\gamma$ -GT en el músculo estuvo aumentada durante la fase de exposición (máximo del 45%) pero recuperó la normalidad tras 8 horas de permanencia de los animales en agua sin propanil. Al igual que en el músculo estriado, en el tejido cardíaco también se observó el aumento significativo de esta actividad durante ambas



---

experiencias, nuevamente más acusado en aquellos animales expuestos a la concentración más alta, (incremento de hasta el 95%), mientras que con la concentración menor la actividad se mantuvo incrementada de promedio en un 45% durante la mayor parte del experimento. En este caso, fueron necesarios los seis días de permanencia de los animales pre-tratados en agua exenta de herbicida para que la actividad  $\gamma$ -GT en este tejido recuperara la normalidad, con independencia de la concentración de propanil empleada.

La molécula de glutatión es sintetizada en el hígado y exportada hacia el torrente sanguíneo para su distribución a otros tejidos, donde se incorpora al interior celular mediante la actividad  $\gamma$ -GT. Se ha observado que ciertas hormonas segregadas en una situación de estrés, como la adrenalina aumentan el transporte del glutatión hepático al plasma (Sies y Graf, 1985). Como consecuencia de su actividad, la enzima  $\gamma$ -GT permite mantener los niveles de glutatión en los tejidos extrahepáticos. El aumento de los niveles de  $\gamma$ -GT observado en los tejidos muscular y cardiaco de las anguilas podría ser debido a una estimulación de esta actividad con objeto de promover la activación de los procesos antioxidativos y detoxificadores aumentando los niveles intracelulares de glutatión en estos tejidos, mediante su incorporación desde el hígado vía plasma. Así, el descenso de la actividad hepática se debería a su exportación hacia el plasma, estimulado por las hormonas del estrés, y a su distribución hacia otros tejidos que no poseen capacidad sintética de esta molécula antioxidante.

Los estudios llevados a cabo por Peña y cols. (2000) y Peña-Llopis y cols. (2001) en la anguila *A. anguilla*, demostraron que en los peces, los niveles del glutatión en los tejidos extrahepáticos van a depender de la captura del glutatión plasmático por la  $\gamma$ -GT, mientras que en el hígado, si se produce una disminución del glutatión como consecuencia de la exposición a plaguicidas, se puede inducir su síntesis intrahepática incluso hasta alcanzar valores superiores a los determinados en los animales no expuestos. En sus estudios, demostraron que herbicidas tipo tiocarbamatos como el molinato y el tiobencarb e incluso plaguicidas organofosforados como el diclorvós (Peña-Llopis y cols., 2003) disminuyen los niveles de glutatión en el hígado de los peces. También demostraron que el principal mecanismo de toxicidad de los herbicidas tiocarbamatos es la generación de radicales libres, que en exceso conducirían a una situación de estrés oxidativo, seguida probablemente de una inducción de muerte celular, tanto por apoptosis como por necrosis, y finalmente la muerte del organismo. En este sentido, se ha publicado que el principal metabolito del propanil, la 3,4-DCA, induce la generación de radicales libres y provoca un descenso de la actividad de enzimas antioxidantes en el hígado del pez dulceacuícola *Carassius auratus*, causando estrés oxidativo y peroxidación lipídica (Li y cols., 2003).

La exposición de la anguila *A. anguilla* a concentraciones agudas del herbicida molinato provocó un aumento de la actividad  $\gamma$ -GT en el músculo esquelético (Peña-Llopis y cols.,

2001), resultados que coinciden con los encontrados en el presente estudio por exposición a propanil. Según estos autores, la mayor “captura” del glutatión desde el plasma hacia el músculo, disminuiría el glutatión disponible para otros órganos como riñón, intestino, branquia o cerebro. En este último, los niveles de glutatión son cruciales debido a que el cerebro contiene niveles relativamente bajos de otras defensas antioxidantes (por ejemplo, la enzima antioxidante catalasa) así como un alto nivel de lípidos (Cooper y Kristal, 1997).

Favari y cols. (2002) observaron también un aumento de la actividad  $\gamma$ -GT además de un aumento de la peroxidación lipídica en las branquias del pez dulceacuícola *Chirostoma riojai* durante un periodo de tres meses de exposición a agua contaminada con plaguicidas organoclorados y organofosforados. El aumento de la actividad  $\gamma$ -GT observado contribuiría a la eliminación de los plaguicidas mediante la estimulación de los procesos de detoxificación de los mismos en los tejidos afectados.

El hígado constituye un órgano de vital importancia también por su papel fisiológico en la respuesta frente a cualquier condición estresante. En primer lugar, para la producción de la alta demanda de energía que se utiliza en la intensa actividad física manifestada durante la respuesta de estrés. Y en segundo lugar, posee los sistemas necesarios para la metabolización, degradación y excreción fuera del organismo de cualquier molécula extraña que penetra en el organismo, la cual es transportada a través de la circulación portal hasta el hígado. Posee por tanto, la maquinaria enzimática adecuada para la detoxificación y la producción energética. Así pues, su papel en la reorganización fisiológica bajo el impacto por un plaguicida es de suma importancia.

En el presente trabajo, no se llevaron a cabo estudios histopatológicos para determinar daños estructurales en el hígado por la exposición de la anguila al herbicida propanil. Pero, se han referido diversas patologías hepáticas en los peces como consecuencia de la intoxicación con otros herbicidas (Neškovic y cols., 1996; Poleksić y Karan, 1999; Jiraungkoorskul y cols., 2003) y plaguicidas de distinta naturaleza (Leadley y cols., 1998; Oruç y Üner, 1998). Y del mismo modo el aumento del tamaño del hígado ha sido citado en peces que han sido expuestos a algún contaminante orgánico (Everaarts y cols., 1993; Leadley y cols., 1998; Karels y cols., 2001). Por otro lado, el herbicida propanil induce en los peces hemorragia en la masa visceral incluido el hígado, además de disfunción y disgregación de las células hepáticas, como observaron Call y cols. (1983) en el pez dulceacuícola *Phimephales promelas*. También las anguilas mostraron un aspecto hemorrágico generalizado, con hemorragias en el hígado además de otros órganos internos, como consecuencia de la exposición a concentraciones tanto agudas como subagudas de este herbicida.

Un aumento del **índice hepatosomático (HSI)** es indicativo de un aumento del tamaño hepático. Resulta un fácil y rápido biomarcador de la intoxicación por la presencia de

xenobióticos en el medio, ya que las alteraciones en esta relación son indicativas de posibles lesiones en el tejido hepático debido a la exposición de los peces a sustancias tóxicas (Heath, 1995). Las diferencias determinadas en el HSI de las anguilas expuestas a propanil mostró que la relación peso hígado/peso corporal aumentó en los animales como consecuencia de la presencia del herbicida en el agua, y no sólo durante la fase de exposición de los animales, ya que incluso se mantuvo elevado durante todo el experimento cuando los animales fueron expuestos a la concentración mayor de propanil. Este incremento del tamaño hepático podría relacionarse con una hipertrofia (aumento del tamaño celular) y/o hiperplasia (aumento del n° de células) hepáticas. Asimismo se podría asociar a un incremento de la capacidad de metabolizar xenobióticos, y en este sentido, podría por tanto considerarse una adaptación a la presencia de contaminación en el medio más que a una disfunción del tejido (Heath, 1995; Karels y cols., 2001).

Otros trabajos señalan el incremento en el HSI de los peces expuestos a plaguicidas de diversa naturaleza. Así, la exposición al organoclorado PCP (Holmberg y cols., 1972), al organofosforado fenitrotión (Sancho y cols., 1997) o a otro herbicida, el tiocarbamato tiobencarb (Fernández-Vega, 1999), provocaron un aumento del tamaño hepático en *A. anguilla*. Gill y cols. (1991) encontraron igualmente una moderada hepatomegalia en el pez de agua dulce *Barbus conchoniuss* al insecticida organoclorado endosulfan. Leadley y cols. (1998) calcularon el índice hepatosomático en individuos de la especie *Ameiurus nebulosus* procedentes de áreas contaminadas con plaguicidas organoclorados y otros tóxicos orgánicos. Este índice reveló un aumento significativo del tamaño relativo del hígado en estos individuos respecto a los peces de esta misma especie procedentes de áreas no contaminadas. Los estudios histopatológicos mostraron graves lesiones en el tejido hepático de estos animales.

La determinación del **contenido en agua** tisular es técnicamente sencilla y muestra gran estabilidad en los resultados, lo que avala su utilización como método rápido y sencillo para el estudio preliminar de los efectos causados por la intoxicación con contaminantes liberados al medio ambiente (Heath, 1984).

El contenido hídrico de muestras de hígado, branquias y musculatura esquelética, en general, aumentó como consecuencia de la exposición de las anguilas a agua contaminada con el herbicida, y además de una forma concentración dependiente. En el hígado, el contenido hídrico aumentó hasta un 60% durante la exposición a 0.63 mg/L de propanil, recuperándose después de 8 h de eliminado el producto del medio. Cuando se empleó una concentración de herbicida superior, el aumento fue aún mayor, hasta del 98%, y no se recuperaron los niveles normales hasta después de 6 días de permanencia en agua limpia. El contenido hídrico branquial mostró un incremento a partir de las 48 h en el experimento con la concentración de propanil más baja, y aún antes, desde las 12 h con la más alta, siendo necesarios 4 días en

---

agua limpia para observar la recuperación de los niveles normales independientemente de la concentración empleada. El máximo incremento observado fue a las 72 h durante el tratamiento de las anguilas con la concentración de propanil más baja (131%) y aún antes, a las 48 h, con la más alta (144%). El tejido más afectado fue el músculo esquelético, mostrando unos mayores porcentajes de aumento, hasta un máximo del 135% (a las 96 h) en el experimento con 0.63 mg/L y del 225% (a las 12 h) con 3.16 mg/L, y a diferencia de lo ocurrido en el hígado y la branquia, seis días de permanencia en agua exenta de propanil no fueron suficientes para permitir la total recuperación del contenido hídrico muscular.

La distribución del contenido acuoso en tejidos u órganos está directamente relacionada con la osmolaridad de los fluidos corporales. Cualquier alteración en los distintos mecanismos que regulan la normal osmorregulación, como por ejemplo las derivadas de su exposición a plaguicidas, originarían una alteración de los gradientes osmóticos celulares que pueden traducirse en un aumento del contenido en agua en los diferentes órganos y tejidos, con la consiguiente modificación homeostática en el individuo. Así, una exposición aguda a una concentración subletal del herbicida tiobencarb, provocó en la anguila *A. anguilla* la inhibición de las actividades enzimáticas Adenosin-Trifosfatasa (ATPasas) de membrana, no sólo en las branquias sino también en el músculo esquelético, que fue acompañado de un aumento del índice de contenido hídrico medido en este último tejido durante toda la fase de exposición. Esta inhibición de la actividad ATPasa fue observable no sólo durante la fase de exposición sino también hasta 8 días después de la finalización de la misma (Sancho y cols., 2003).

Las ATPasas están implicadas en los procesos de osmorregulación así como en las reacciones metabólicas productoras de energía, desempeñando un papel esencial en las funciones fisiológicas del organismo. Estas enzimas hidrolizan la molécula Adenosina Trifosfato (ATP) y la energía liberada en este proceso es empleada para el transporte activo de cationes ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) a través de las membranas celulares, necesario para el mantenimiento de los requerimientos fisiológicos de las células. El gradiente de estos iones controla entre otras funciones, el volumen celular. En los peces dulceacuícolas, se sabe que las ATPasas desempeñan un papel significativo en la regulación iónica y en la incorporación de sales desde el medio acuático. Los peces dulceacuícolas regulan la osmolaridad de sus fluidos corporales mediante la excreción del exceso de agua por vía renal y la recuperación de sales desde el agua hacia la sangre mediante el transporte activo de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a través de las células de cloruro branquiales. El aumento del volumen hídrico observado en los diferentes tejidos de la anguila como consecuencia de su exposición al herbicida podría ser parte del resultado de una disrupción en el movimiento de los iones a través de las membranas, alterando sus características de permeabilidad. Cabe recordar que este herbicida provocó desórdenes en los niveles de un componente esencial de las membranas plasmáticas, como es el colesterol, implicado en la regulación de la fluidez de las membranas biológicas,

---

conjuntamente con desórdenes en el metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos, que entre otras funciones, forman parte de fosfolípidos, lipoproteínas y glucoproteínas, componentes esenciales a su vez de las membranas celulares. Todo ello podría traducirse en lesiones tanto estructurales como funcionales de las membranas. Algunos herbicidas, además de otros plaguicidas, han sido citados con capacidad de alterar la integridad de las membranas biológicas, lo que permite la salida del contenido intracelular, como diversas enzimas, al exterior de la célula (Poleksić y Karan, 1999; Hoff y cols., 2003; Jiraungkoorskul y cols., 2003; López-López y cols., 2003). En este sentido, un aumento de la actividad de enzimas como la ALP, ALT o AST ( como el observado en el presente trabajo) podría ser atribuible a trastornos en los sistemas membranosos celulares con los consiguientes deterioros en la permeabilidad de las membranas y en el metabolismo intercelular (Karan y cols., 1998; Hoff y cols., 2003). La existencia de alteraciones en las membranas plasmáticas en los diferentes tejidos de la anguila permitiría el flujo pasivo de iones y la entrada de agua a los tejidos a favor del gradiente osmótico; lo que traería como resultado un aumento de su volumen, como ha sido previamente citado en otros peces como consecuencia directa de la exposición a diferentes plaguicidas (Heath 1984; Gopal y cols., 1993; De la Torre y cols., 1999).

Neškovic y cols. (1996) describieron la formación de edemas, además de otros importantes cambios histopatológicos, en las branquias y el hígado de *Cyprinus carpio*, junto con el aumento de las actividades ALT y AST, como consecuencia de la exposición subletal al herbicida glifosato, indicativos del importante daño estructural y funcional en estos órganos, estudio apoyado por Jiraungkoorskul y cols. (2003), que observaron alteraciones similares en el pez dulceacuícola *Oreochromis niloticus*, como consecuencia de la exposición al mismo herbicida. También Poleksić y Karan (1999) relacionaron la aparición de edema en el epitelio branquial y el aumento concomitante de la actividad AST branquial en *Cyprinus carpio* con la exposición de los peces a concentraciones subletales del herbicida dinitroanilina trifluralin.

La respuesta de estrés supuso la movilización de las reservas energéticas de los animales (carbohidratos, lípidos y proteínas), con la merma e incluso el agotamiento de las mismas. El deterioro del metabolismo intermediario, como consecuencia del desvío de energía para la situación de estrés podría llevar a ocasionar el agotamiento de las reservas y, en última instancia, afectar la biología del individuo o la población por influir tanto en el crecimiento, como en la supervivencia y la capacidad reproductiva de los animales. El **contenido calórico** refleja el efecto global que la intoxicación con el herbicida propanil causó sobre las reservas energéticas de los organismos expuestos con el consiguiente coste en términos de energía fisiológicamente disponible.

Durante la fase de exposición se produjo una movilización importante de las reservas energéticas en el hígado que fue función de la concentración utilizada. Esta movilización de

las reservas hepáticas en forma de proteínas totales, glucógeno y lípidos, se tradujo en un descenso de la energía fisiológicamente disponible, medida como cal/mg, desde primeras horas de exposición y se prolongó durante los 9 días que duró la experiencia, independientemente de la concentración utilizada. El hígado constituye el principal órgano de almacenamiento de las reservas energéticas en *A. anguilla* (Van der Thillart, 1986), además de ser un órgano diana para la acumulación de plaguicidas. En el presente trabajo se ha comprobado que la carga energética que suponen las proteínas, el glucógeno y los lípidos representan respectivamente el 50, 36 y 14% del contenido calórico total del hígado de las anguilas tomadas como control. Tras 72 h de exposición a concentraciones subletales de propanil, la fuente energética más utilizada fue el glucógeno, seguido de los lípidos, y por último las proteínas hepáticas.

También se produjo una importante movilización de los recursos energéticos en la musculatura estriada como consecuencia de la exposición al herbicida. El descenso en el contenido calórico muscular vino determinado fundamentalmente por la disminución de las reservas proteicas, de hecho, el componente proteico supone un 83% del contenido calórico total en la musculatura estriada de los animales control. Los porcentajes de reducción de las proteínas musculares fueron del 60-70%. Paralelamente y al igual que en el hígado, se observó una drástica movilización de las reservas glucogénicas, con unos porcentajes de reducción incluso superiores al 70%. El catabolismo lipídico también contribuyó, si bien en menor medida, al descenso del contenido calórico muscular, a diferencia de lo ocurrido en el hígado, donde las reservas proteicas y lipídicas, estuvieron mermadas prácticamente en la misma medida.

A diferencia de los mamíferos, la principal fuente de energía fisiológicamente disponible en los peces la constituyen el componente proteico del músculo estriado, seguido de los depósitos grasos de otras partes del cuerpo (Heath, 1995). El descenso generalizado del contenido proteico en el músculo como principal recurso energético bajo una situación de estrés, es un mecanismo comúnmente observado en este grupo animal (Singh y Sharma, 1998; Vutukuru, 2003; Begum, 2004; David y cols., 2004; Singh y cols., 2004). El estrés promueve también una rápida utilización de las reservas de glucógeno, principalmente en el hígado y en la musculatura estriada (Heath, 1995).

La disminución de las reservas energéticas en diferentes órganos y tejidos como consecuencia de la exposición a distintos tipos de sustancias tóxicas, desde metales a herbicidas, está ampliamente documentada en los peces dulceacuícolas (Vutukuru, 2003; Barcarolli y Martínez, 2004; De Aguiar y cols., 2004; Singh y cols., 2004). Los resultados obtenidos en este estudio corroboran los aportados por Sancho y cols. (1998b) y Fernández-Vega (1999), cuando estudiaron las variaciones en el contenido calórico muscular y hepático

de *A. anguilla* como consecuencia de su exposición subaguda a concentraciones subletales tanto del insecticida organofosforado fenitrotión como del herbicida tiobencarb.

Sin embargo, los datos bibliográficos sobre el contenido calórico de los animales una vez desaparecido el agente estresante del medio, durante una fase de recuperación, son escasos. En el presente trabajo se observó una ligera tendencia a la recuperación de las reservas glucogénicas en el hígado en la experiencia con la concentración de propanil más baja, mientras que las proteínas y los lípidos hepáticos se mantuvieron mermadas durante toda la experiencia, lo que, conjuntamente, se tradujo en una incapacidad para la recuperación del contenido calórico en este tejido, con valores no superiores al 50% durante toda la fase en agua exenta de propanil. En el experimento con la concentración más alta de propanil no hubo tendencia a la recuperación de ninguna de las variables energéticas, lo que supuso que la energía fisiológicamente disponible en individuos pre-expuestos a 3.16 mg/L no superara el 34% durante la fase de recuperación.

En anguilas pre-tratadas con el herbicida tiobencarb durante 4 días, sí se consiguió una recuperación total de las proteínas y el glucógeno hepáticos, y aunque las reservas lipídicas se mantuvieron mermadas durante toda la experiencia, sí se vio una tendencia a la recuperación del contenido calórico hepático, que si bien no llegó a ser del 100%, probablemente con un seguimiento superior a 8 días de permanencia de los individuos en agua no contaminada, se hubiera alcanzado la recuperación total de este parámetro (Fernández-Vega, 1999). Sancho y cols. (1998b) observaron igualmente una tendencia a la recuperación del contenido calórico hepático en anguilas previamente expuestas a fenitrotión tras 8 días en agua exenta del mismo.

En la musculatura estriada sólo hubo una ligera tendencia a la recuperación en el contenido glucogénico (un 20%) en las anguilas pre-expuestas a 0.63 mg/L de propanil, mientras que el resto de variables no se recuperaron en absoluto, lo que se tradujo en una merma de la carga energética en el músculo esquelético superior al 50% incluso una vez desaparecido el agente tóxico del medio, independientemente de la concentración utilizada.

Sancho y cols. (1998b) observaron que el efecto producido por el fenitrotión sobre el contenido calórico muscular de la anguila, estuvo relacionado con la concentración del plaguicida a la que previamente se habían expuesto los animales. Y en anguilas pre-tratadas con el herbicida tiobencarb tampoco se produjo una recuperación completa del contenido calórico muscular a lo largo de la fase de recuperación (Fernández-Vega, 1999). En cualquier caso, tras 192 horas en agua exenta de contaminante, los individuos no recuperaron el 100% del contenido calórico en este tejido, con lo que hubiera sido necesario un periodo de recuperación más largo para observar la completa recuperación de la carga energética muscular.

La información sobre la capacidad de recuperación de los parámetros fisiológicos de aquellos individuos expuestos a algún tipo de contaminante una vez eliminado éste del medio se hace necesaria para comprender las consecuencias de las exposiciones puntuales a plaguicidas y para poder deducir cual va ser la probable consecuencia en el animal una vez desaparecido aquél del medio. Esta información resulta especialmente importante para determinar y evaluar las consecuencias del impacto que la aplicación de un compuesto químico (un plaguicida, por ejemplo) tenga sobre aquellas especies no-diana que habitan el área a tratar u otros hábitats a los que pudiera llegar accidentalmente el producto o concentraciones subletales de éste.

De cualquier modo, y teniendo presentes todos los parámetros analizados en este estudio, se observó que los individuos de la especie *Anguilla anguilla*, cuando fueron expuestos a la concentración más baja de propanil, mostraron una moderada tendencia a la recuperación de su equilibrio homeostático tras permitírsele un periodo de permanencia de 6 días en un medio libre del herbicida, observándose una mayor capacidad de recuperación fundamentalmente de las actividades enzimáticas; mientras que los que fueron expuestos a 3.16 mg/L no recuperaron su homeostasis en absoluto tras el mismo periodo. En cualquier caso, la respuesta desencadenada por la presencia del propanil fue tan intensa, incluso en los que fueron expuestos a la concentración más baja, que serían necesarios periodos de recuperación más largos para permitir el restablecimiento del equilibrio fisiológico de los animales intoxicados.



## **6. CONCLUSIONES**

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

**1°.** El herbicida propanil resultó letal para la anguila *Anguilla anguilla* en concentraciones agudas, existiendo tanto una correlación positiva con la concentración de herbicida en el agua experimental como con el tiempo de exposición de los animales al mismo.

**2°.** El herbicida propanil en las concentraciones subletales ensayadas, indujo rápidamente una respuesta de estrés en la anguila, caracterizada por hiperglucemia y descenso de los niveles de glucógeno, proteínas totales, triglicéridos y colesterol en la mayoría de los tejidos analizados. En general, no se observó tendencia a la recuperación de los parámetros estudiados una vez eliminado el herbicida del medio, independientemente de la concentración de propanil utilizada.

**3°.** Las anguilas necesitaron utilizar una gran cantidad de energía extra para hacer frente a la situación de estrés, como se deduce por la práctica desaparición de las reservas de glucógeno tanto hepáticas como musculares, no sólo durante la fase de exposición sino incluso durante la posterior fase de recuperación.

**4°.** Se observó una severa hiperlactemia además del aumento importante de lactato en todos los tejidos, probablemente como consecuencia de una activación del catabolismo anaerobio habitual en situaciones de estrés e hipoxia, apoyado por el aumento de la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa en los tejidos estudiados. Este efecto fue más acusado en los animales expuestos a la concentración más elevada de propanil.

**5°.** El herbicida propanil, a las concentraciones subletales ensayadas, resultó muy tóxico para la anguila, puesto que los animales necesitaron movilizar sus reservas energéticas, como puso de manifiesto el descenso del contenido calórico en órganos de

reserva como el hígado y el músculo. El periodo de recuperación estipulado fue insuficiente para la restauración del contenido calórico tanto hepático como muscular.

**6°.** El hígado resultó un órgano muy “extenuado” durante la exposición de los animales a propanil en las concentraciones utilizadas, como se deduce del descenso observado de los niveles plasmáticos de albúmina y proteínas totales, junto con el aumento de las actividades aminotransferasas, Fosfatasa alcalina y Lactato deshidrogenasa hepáticas, y el descenso de la actividad  $\gamma$ -Glutamyl transferasa hepática, apoyado por el aumento del índice hepatosomático, y del contenido hídrico de este órgano. Este deterioro hepático fue más acusado en los animales expuestos a la concentración de herbicida más alta.

**7°.** La actividad Fosfatasa alcalina mostró una gran sensibilidad a la presencia de propanil en el medio. Su actividad en general aumentó en todos los órganos y tejidos analizados, indicativo de lesiones en los tejidos y necrosis celular. Su grado de alteración fue mayor con la concentración más elevada de herbicida y su posterior recuperación fue función del tejido u órgano, de la concentración de herbicida y del tiempo de exposición.

**8°.** La función  $\gamma$ -Glutamyl transferasa respondió a la intoxicación de las anguilas por propanil, de modo que se observó una disminución de esta actividad en el hígado paralela a su aumento en el músculo esquelético y el corazón, durante la exposición al tóxico. Tras la transferencia a agua libre de propanil, la actividad se “normalizó” en el corazón; mientras que continuó alterada en el músculo y en el hígado.

**9°.** El periodo de recuperación de seis días fue suficiente para observar la tendencia al restablecimiento de la mayoría de las actividades enzimáticas medidas en las anguilas expuestas a la concentración menor de propanil. Sin embargo, en los animales expuestos a la concentración más elevada, el periodo de recuperación estipulado (el doble que el periodo de exposición) no fue suficiente. Así que podemos concluir que se requerirá de un periodo de recuperación más prolongado para poder concluir si existe o no tendencia a la normalización en los parámetros seleccionados.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- 
- ALEXANDRATOS, N. 1995. **Agricultura mundial: hacia el 2010, un estudio de la FAO.** Ediciones mundi-Prensa, Madrid, pp: 125-136.
- ALMAR, M.; OTERO, L.; SANTOS, C.; GONZALEZ, G.J. 1998. Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. **J. Environ. Sci. Health 33B**: 769-783.
- ANAND, M.; MEHROTRA, S.; GOPAL, K.; SUR, R.N.; CHANDRA, S.V. 1985. Role of neurotransmitters in endosulfan induced aggressive behaviour in normal and lesioned rats. **Toxicol. Lett. 24**: 79-84.
- ASTORGA RAMÍREZ, F. 2001. **Comercialización del arroz y la Política Agraria Comunitaria. El arroz: su entorno y su futuro.** Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Valencia, pp: 75-81.
- ASZLATOS, B.; NEMCSOK, J. 1985. Effect of pesticides on the LDH activity and isoenzyme pattern of carp (*Cyprinus carpio L.*) sera. **Comp. Biochem. Physiol. 82C**: 217-219.
- BÁLINT, T.; SZEGLETES, T.; SZEGLETES, Z.; HALASY, K.; NEMCSÓK, J. 1995. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. **Aquat. Toxicol. 33**: 279-295.
- BÁLINT, T.; FERENCZY, J.; KATAI, F.; KISS, I.; KRACZER, L.; KUFCAK, O.; LANG, G.; POLYHOS, C.; SZABO, I.; SZEGLETES, T.; NEMCSÓK, J. 1997. Similarities and differences between the massive eel (*Anguilla anguilla L.*) devastations that occurred in Lake Balaton in 1991 and 1995. **Ecotox. Environ. Saf. 37**:17-23.
- BARCAROLLI, I.F.; MARTÍNEZ, C.B.R. 2004. Effects of Aluminium in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). **Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72**: 639-646.
- BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. 1995a. Carbohydrate metabolism in hepatic tissue of freshwater catfish *Clarias batrachus* during dimethoate exposure. **Food Chem. Toxicol. 33**(5): 423-426.
- BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. 1995b. In vivo toxicity of dimethoate on proteins and transaminases in the liver tissue of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn). **Bull. Environ. Contam. Toxicol. 54**: 370-375.
- BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. 1996. Alterations on protein metabolism of muscle tissue in the fish *Clarias batrachus* (Linn) by commercial grade dimethoate. **Bull. Environ. Contam. Toxicol. 57**: 223-228.
- BEGUM, G.; VIJAYARAGHAVAN, S. 1999. Effects of acute exposure of the organophosphate insecticide Rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). **Environ. Res. A 80**: 80-83.
-

- BEGUM, G.; 2004. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (Linn.) and recovery response. **Aquat. Toxicol.** **66**: 83-92.
- BERGMEYER, H.U.; SCHEIBE, P.; WAHLEFELD, A.W. 1978. Optimization of methods for Aspartate Aminotransferase and Alanine Aminotransferase. **Clin. Chem.** **24**(1): 58-73.
- BLYLER, G.; LANDRETH, K.S.; LILLIS, T.; SCHAFER, R.; THEUS, S.A.; GANDY, J.; BARNETT, J. B. 1994. Selective myelotoxicity of Propanil. **Fundam. Appl. Toxicol.** **22**: 505-510.
- BOLUDA, R.; QUINTANILLA, J.F.; BONILLA, J.A.; SÁEZ, E.; GAMÓN, M. 2002. Application of the Microtox® test and pollution indices to the study in the Albufera Natural Park (Valencia, Spain). **Chemosphere** **46**: 355-369.
- BORAH, S.; YADAV, R.N.S. 1996. Effect of rogor (30% w/w dimethoate) on the activity of lactate dehydrogenase, acid and alkaline phosphatase in muscle and gill of a fresh water fish, *Heteropneustes fossilis*. **J. Environ. Biol.** **17**(4): 279-283.
- BRETT J.R.; GROVES, D.D. 1979. **Physiological energetics**. En: **Fish Physiology. Bioenergetics and Growth**. Vol. III. Eds. Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Brett, J.R., Academic Press Inc., Orlando, Florida, pp: 280-344.
- BRUSLE, J. 1991. **Anguila y Anguicultura**. En: **Acuicultura**. Vol. II. Gilbert Bernabé. Eds. Omega, S.A., pp: 679-707.
- CALL, D. J., BROOKE, L.T., KENT, R. J., KNUTH, M. L., ANDERSON, C.; MORIARTY, C. 1983. Toxicity, bioconcentration and metabolism of the herbicide Propanil (3',4'-dichloropropionanilide) in freshwater fish. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** **12**: 175-182.
- CALL, D. J., POIRIER, M. L., KNUTH, M. L., HARTING, S. L.; LINDBERG, C.A. 1987. Toxicity of 3,4-dichloroaniline to fathead minnows *Pimephales promelas*, in acute and early life-stage exposures. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **38**: 352-358.
- CARDONA, L. 1993. **Cultivo intensivo de la anguila europea (*Anguilla anguilla*)**. En: **Acuicultura marina. Fundamentos Biológicos y Tecnología de la Producción**. F. Castelló Orvay. Univ. de Barcelona, pp: 425-428.
- CASTELLÓ, F. 1993. **Biología de los teleósteos más interesantes en piscicultura marina: Anguila**. En: **Acuicultura marina. Fundamentos Biológicos y Tecnología de la Producción**. F. Castelló Orvay. Univ. de Barcelona, pp: 65-67.
- CERÓN, J.J.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; GUTIÉRREZ, C.; ANDREU, E. 1996. Metabolic effects of diazinon on the European eel *Anguilla anguilla*. **J. Environ. Sci. Health** **B31**(5): 1029-1040.
- CERÓN, J.J.; SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; GUTIÉRREZ, C.; ANDREU, E. 1997. Changes in carbohydrate metabolism in the eel *Anguilla anguilla*, during short-term exposure to diazinon. **Toxicol. Environ. Chem.** **60**: 201-210.

- CHAND, N. 1973. Acute toxicity of 3,4-dichloropropionanilide in rats. **Indian Vet. J.** **50**: 1122-1125.
- CHOW, A.Y.K.; MURPHY, S. D. 1975. Propanil (3,4-dichloropropionanilide)-induced methemoglobin formation in relation to metabolism *in vitro*. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **33**(1): 14-20.
- CONSELLERÍA DE MEDIO AMBIENTE. 1991. **Plan especial de protección del Parque natural de la Albufera**. Generalitat Valenciana, 148 pp.
- COOPER, A.J.; KRISTAL, B.S. 1997. Multiple roles of Glutathione in the central nervous system. **Biol. Chem.** **378**(8): 793-802.
- CROSSLAND, N. O. 1990. A review of the fate and toxicity of 3,4-dichloroaniline in aquatic environments. **Chemosphere** **12**: 1489-1497.
- CUFF, C. F., ZHAO, W., NUKUI, T., SCHAFER, R.; BARNETT, J. B. 1996. 3',4'-dichloropropionanilide-induced atrophy of the thymus: Mechanisms of toxicity and recovery. **Fundam. Appl. Toxicol.** **33**: 83-90.
- DAVID, M.; MUSHIGERI, S.B.; SHIVAKUMAR, R.; PHILIP, G.H. 2004. Response of *Cyprinus carpio* (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterations in protein metabolic profiles. **Chemosphere** **56**: 347-352.
- DE AGUIAR, L.H.; MORAES, G.; MARCHIONI, I.; ALTRAN, A.E.; FERRO, C. 2004. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environ. Res.** **95**: 224-230.
- DE LA TORRE, F.; SALIBIÁN, A.; FERRARI, L. 1999. Enzyme activities as biomarkers of freshwater pollution: responses of fish branchial (Na+K)-ATPase and liver transaminases. **Environ. Toxicol.** **14**: 313-319.
- DEZFULI, B.S.; GIARI, L.; SIMONI, E.; PALAZZI, D.; MANERA, M. 2003. Alteration of rodlet cells in chub caused by the herbicide Stam®M-4 (Propanil). **J. Fish Biol.** **63**:232-239.
- DOUMAS, B.T.; WATSON, W.A.; BIGGS, H.G. 1971. Albumin standards and the measurements of serum albumin with bromocresol green. **Clin. Chim. Acta** **31**:87-96.
- DUFFUS, J.H. 1983. **Toxicología ambiental**. Eds. Omega, S.A. Barcelona, 173 pp.
- EDDLESTON, M.; RAJAPAKSHE, M.; ROBERTS, D.; REGINALD, K.; REZVI SHERIFF, M.H.; DISSANAYAKE, W.; BUCKLEY, N. 2002. Severe propanil [N-(3,4-dichlorophenyl) propanamide] pesticide self-poisoning.. **J. Toxicol.-Clin. Toxicol.** **40**(7): 847-854.
- EL-DEMERDASH, F.M.; YOUSEF, M.I.; KEDWANY, F.S.; BAGHDADI, H.H. 2004. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and b-carotene. **Food Chem. Toxicol.** **42**: 1563-1571.

- 
- EVERAARTS, J.; SHUGART, L.; GUSTIN, M.; HAWKINS, W.; WALKER, W. 1993. Biological markers in fish: DNA, integrity, hematological parameters and liver somatic index. **Mar. Environ. Res.** **35**: 101-107.
- EVERSE, J.; KAPLAN, N.O. 1973. **Lactate dehydrogenases: Structure and function**. En: **Advances in Enzymology**. Eds. S.P. Colowick; O. Kaplan. Vol. 27. Wiley, New York, pp: 61-113.
- EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK. (EXTOXNET). 1996. **Pesticide Information Profile: Propanil**. Oregon State University, Cornell University, University of Idaho, University of California, USA, 5 pp.
- FAVARI, L.; LÓPEZ, E.; MARTÍNEZ-TABCHE, L.; DÍAZ-PARDO, E. 2002. Effect of insecticides on plankton and fish of Ignacio Ramírez reservoir (Mexico): a biochemical and biomagnification study. **Ecotox. Environ. Saf.** **51**: 177-186.
- FERNÁNDEZ-VEGA, C. 1999. **Toxicidad y alteraciones fisiológicas producidas en la anguila europea, *Anguilla anguilla*, por la presencia del herbicida tiobencarb en el medio**. Tesis de Licenciatura. Universitat de València, 144 pp.
- FERNÁNDEZ-VEGA, C; SANCHO, E; FERRANDO, M.D.; ANDREU-MOLINER, E. 1999. Thiobencarb toxicity and plasma Acetylcholinesterase inhibition in the European eel. **J. Environ. Sci. Health B**, **34**(1): 61-73.
- FERNÁNDEZ-VEGA, C; SANCHO, E; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. 2002a. Physiological effects of Thiobencarb stress in the eel *Anguilla anguilla*. **J. Pest. Sci.** **27**: 31-38.
- FERNÁNDEZ-VEGA, C; SANCHO, E; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. 2002b. Thiobencarb induced changes in AChE activity of the fish *A. anguilla*". **Pest. Biochem. Physiol.** **72**: 55-63.
- FERRANDO, M.D.; ANDREU, E.; CEBRIÁN, C.; ALARCÓN, V.; ALMAR, M. 1989. Short-term lindane effects on gill tissue metabolism of the eel. **Toxicol. Environ. Chem.** **24**: 17-23.
- FERRANDO, M.D. 1990. **Toxicidad de pesticidas organoclorados y organofosforados en la *Anguilla anguilla* (L.). Alteraciones fisiológicas producidas tras la intoxicación con Lindano**. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, 301 pp.
- FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. 1991a. Metabolic levels in the eel blood after lindane treatment. **Toxicol. Environ. Chem.** **31-32**: 329-333.
- FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. 1991b. Changes in selected biochemical parameters in the brain of the fish, *Anguilla anguilla* (L.) exposed to lindane. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **47**: 459-464.
- FERRANDO, M.D.; ANDREU-MOLINER, E. 1992. Lindane-induced changes in carbohydrate metabolism in *Anguilla anguilla*. **Comp. Biochem. Physiol.** **101C**(2): 437-441.
-



- 
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. (F.A.O.). 1999. **Manual on Development and Use of FAO Specifications for Plant Protection Products**. 5<sup>th</sup> Ed, 175 pp.
- FOLMAR, L.C. 1993. Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: a bibliography and synopsis of selected effects. **J. Appl. Toxicol.** **4**: 246-248.
- FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clin. Chem.** **28**: 2077-2080.
- GALLAGHER, E.P.; DI GIULIO, R.T. 1992. A comparison of glutathione-dependent enzymes in liver, gills and posterior kidney of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Comp. Biochem. Physiol. C** **102**(3): 543-547.
- GAU, N. 1984. **Lactic acid**. En: **Clinical Chemistry**. Ed. A. Kaplan. The C.V. Mosby Co. St. Louis. Toronto. Princeton, pp: 1040-1042.
- GHOSH, T.K. 1987. Toxic impact of three organophosphate pesticides on carbohydrate metabolism in a freshwater Indian catfish, *Clarias batrachus*. **Proc. Indian. Natl. Sci. Acad.** **53**: 135-142.
- GILL, T.S.; PANDE, J.; TEWARI, H. 1990a. Sublethal effects of organophosphorus insecticide on certain metabolite levels in a freshwater fish *Punthius conchonius*. **Pest. Biochem. Physiol.** **36**: 290-296.
- GILL, T.S.; PANDE, J.; TEWARI, H. 1990b. Enzyme modulation by sublethal concentrations of aldicarb, phosphamidon and endosulfan in fish tissues. **Pest. Biochem. Physiol.** **38**: 231-244.
- GILL, T.S.; PANDE, J.; TEWARI, H. 1991. Effects of endosulfan on the blood and organ chemistry of freshwater fish *Barbus conchonius* Hamilton. **Ecotox. Environ. Saf.** **21**: 80-91.
- GIMENO, L.; FERRANDO, M.D.; SANCHEZ, S.; ANDREU, E. 1994. Endosulfan effects on liver and blood of the eel, *Anguilla anguilla*. **Comp. Biochem. Physiol.** **108C**: 343-348.
- GIMENO, L.; FERRANDO, M.D.; SANCHEZ, S.; GIMENO, L.O.; ANDREU, E. 1995. Pesticide effects on eel metabolism. **Ecotox. Environ. Saf.** **31**: 153-157.
- GINGERICH, W.H. 1982. **Hepatic toxicology of fishes**. En: **Aquatic Toxicology**. Ed. L.J. Weber, Raven Press, New York, pp: 55-105.
- GÓMEZ DE BARREDA, D.; GAMÓN, M.; LORENZO, E.; LLEÓ, C.; TEN, A.; MILLÁN, M<sup>a</sup> R.; PEREZ, M<sup>a</sup>.T. 2002. Contaminación de canales por herbicidas en el Parque Natural de la Albufera. **Actas de la XXI Reunión del Grupo de Trabajo de Malas Hierbas y Herbicidas**, pp: 50-58.
- GÓMEZ DE BARREDA, D.; SABATER, C.; CARRASCO, J.M. 2004. Effects of propanil, tebufenozide and mefenacet on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. **Chemosphere**, **56**: 315-320.
-

- GOPAL, K.; RAM, M.D.; AGARWAL, D. 1993. Some physiological consequences to freshwater fish *Channa punctatus*, after exposure to lindane. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **60**: 187-191.
- GUPTA, R.C.; GOAD, J.T.; KADEL, W.L. 1991. In vivo alterations in lactate dehydrogenase (LDH) and LDH isoenzymes patterns by acute carbofuran intoxication. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** **21**: 263-269.
- GUYTON, A.C. 1996. **Tratado de Fisiología médica.** 9ª Ed. McGraw Hill Interamericana. Copyright by W.B. Saunders Company, 1262 pp.
- HASSOUN, E.; D'ARGY, R.; DENCKER, L.; SUNDSTROEM, G. 1984. Teratological studies on the TCDD congener 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzene in sensitive and nonsensitive mouse strains: Evidence for direct effect on embryonic tissues. **Arch. Toxicol.** **55**: 20-26.
- HEATH, A. G. 1984. Changes in tissue adenylates and water content of bluegill, *Lepomis macrochirus*, exposed to copper. **J. Fish Biol.** **24**: 299-309.
- HEATH, A. G. 1995. **Water pollution and fish physiology.** 2<sup>nd</sup> Ed. (Lewis Publishers), CRC Press, Inc., New York, 359 pp.
- HOFF, P.T.; VAN DOGEN, W.; ESMANS, E.L.; BLUST, R.; DE COEN, W.M. 2003. Evaluation of the toxicological effects of perfluorooctane sulfonic acid in the common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquat. Toxicol.** **62**:349-359.
- HOLMBERG, B.; JENSEN, S.; LARSSON, A.; LEWANDER, K.; OLSSON, M. 1972. Metabolic effects of technical pentaclorophenol (PCP) on the eel *Anguilla anguilla* L. **Comp. Biochem. Physiol.** **43B**: 171-183.
- HONTELA, A. 1997. Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: Role of glucocorticoesteroid hormones. **Rev. Toxicol.** **1**:1-46.
- HUGON, J.; BOGERS, M. 1966. Ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in the absorbing cells of the duodenum of mouse. **J. Histochem. Cytochem.** **14**:629-640.
- HUNTER, W.J.; SMEETS, J.G.M. 1977. **The Evaluation of Toxicological Data for the Protection of Public Health.** Pergamon. Oxford, 132 pp.
- HUPPATZ, J.L. 1996. Quantifying the inhibitor-target site interactions of photosystem II herbicide. **Weed Sci.** **44**:743-748.
- IBRAHIM, A.M.; HIGAZI, M.G.; DEMIAN, S.S. 1974. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in the alimentary tract of the snail, *Marisa conuarietis* (L.). **Zool. Soc. Egypt. Bull.** **26**:94-105.
- INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. (I.P.C.S.). 1999. **International Chemical Safety Cards: Propanil.** International Programme on Chemical Safety and the European Commission, pp: 198-201.

- JENKINS, F.; SMITH, J.; RAJANNA, B.; SHAMEEM, U.; UMADEVI, K.; SANDHYA, V.; MADHAVI, R. 2003. Effects of sub-lethal concentrations of endosulfan on hematological and serum biochemical parameters in the carp *Cyprinus carpio*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **70**: 993-997.
- JIRAUNGKOORSKUL W.; UPATHAM, E.S.; KRUAETRACHUE, M.; SAHAPHONG, S.; VICHASRI-GRAMS, S.; POOKETHITIYOOK, P. 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environ. Toxicol.** **18**: 260-267.
- JOHNSON, W.W.; FINLEY, M.T. 1980. **Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates**. United States Department of Interior. Fish and Wildlife Service/Resource publication 137, 98 pp.
- JYOTHI, B.; NARAYAN G. 1999. Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus*. **Food. Chem. Toxicol.** **37**: 417-421.
- KARAN, V.; VITOROVIC, S.; TUTUNDZIC, V.; POLEKSIC, V. 1998. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotox. Environ. Saf.** **40**:49-55.
- KARELS, A.; MARKKULA, E.; OIKARI, A. 2001. Reproductive, biochemical, physiological, and population responses in perch (*Perca fluviatilis* L.) and roach (*Rutilus rutilus* L.) downstream of two elemental chlorine-free pulp and paper mills.. **Environ. Toxicol. Chem.** **20**(7): 1517-1527.
- KAUR, K.; DHAWAN, A. 1996. Effect of carbaryl on tissue composition, maturation, and breeding potential of *Cirrhina mrigala* (Ham.). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **57**: 480-486.
- KAWATSU, H. 1980. Haematological characteristics of molinate anaemia in common carp. **Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.** **46**: 1103-1107.
- KONSTATINOU, I.K.; ZARKADIS, A.K.; ALBANIS, T.A. 2001. Photodegradation of selected herbicides in various natural waters and soils under environmental conditions. **J. Environ. Qual.** **30**:121-130.
- KRETZSCHMAR, M. 1996. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Exp. Toxicol. Pathol.** **48** (5):439-446.
- LARSSON, P.; HAMRIN, S.; OKLA, L. 1991. Factors determining the uptake of persistent pollutants in an eel population (*Anguilla anguilla*). **Environ. Toxicol. Chem.** **10**: 81-90.
- LEADLEY, T.A.; BALCH, G.; METCALFE, C.D.; LAZAR, R.; MAZAK, E.; HABOWSKY, J.; HAFFNER, D. 1998. Chemical accumulation and toxicological stress in three brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) populations of the Detroit River, Michigan, USA. **Environ. Toxicol. Chem.** **17**(9): 1756-1766.

- 
- LECOMPTE-FINIGER, R. 1981. Etude expérimental de la résistance thermique des civelles de Gironde et du Méditerranée. **Cahiers du laboratoire de Montereau 12**: 17-22.
- LI, W.; YIN, D.; ZHANG, A.; WANG, L. 2002. Toxicity of chloroanilines and effects on superoxide dismutase activities in serum of crucian carp (*Carassius auratus*). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **68**: 630-636.
- LI, W.; YIN, D.; ZHOU, Y.; HU, S.; WANG, L. 2003. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). **Ecotox. Environ. Saf.** **56**: 251-255.
- LICHTENFELS, A.J.; LORENZI-FILHO, G.; GUIMARAES, E.T.; MACCHIONE, M.; SALDIVA, P.H. 1996. Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. **J. Comp. Path.** **115**: 47-60.
- LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. 1948. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharm. Exper. Therap.** **96**: 99-113.
- LOCKHART, W.L.; METNER, D.A. 1979. Biochemical test for fish. En: Toxicity test for freshwater organisms. **Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.** **44**: 194 pp.
- LOHNER, T.W.; REASH, R.J.; WILLET, V.E.; FLETCHER, J. 2001. Assessment of tolerant sunfish populations (*Lepomis* sp.). inhabiting selenium-laden coal ash effluents. 3. Serum Chemistry and Fish Health Indicators. **Ecotox. Environ. Saf.** **50**: 225-232.
- LÓPEZ-LÓPEZ, E.; FAVARI, L.; MARTÍNEZ-TABCHE, L.; MADRIGAL, M.; SOTO, C. 2003. Hazard assessment of a mixture of pollutants from a sugar industry on three fish species of western Mexico by the responses of enzymes and lipid peroxidation. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **70**: 739-745.
- LORENZO, E.; GÓMEZ DE BARREDA, D. 2001. Toxicidad del propanil en *Lebias ibera*. **Congreso 2001 de la Sociedad Española de Malherbología**, pp: 327-329.
- LOZANO, L. 1947. **Peces ganoideos y fisóstomos**. En: **Ictiología ibérica**. Tomo II. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Madrid, 427 pp.
- MAÑOSA, S.; MATEO, R. GUITART, R. 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. **Environ. Monit. Assess.**, **71**(2): 187-205.
- MAYER, F.L.; VERSTEEG, D.J.; MCKEE, M.J.; FOLMAR, L.C.; GRANEY, R.L.; McCUME, D.C.; RATTNER, B.A. 1992. **Physiological and nonspecific biomarkers**. En: **Biomarkers, Biochemical physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Vol I. Hugget, R.J.; Kimerle, R.A.; Mehrle, P.M.; Bergman, H.L. Eds. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp: 5-85.
- MCCORKLE, F.M.; CHAMBERS, J.E.; YARBROUGH, J.D. 1977. Acute toxicities of selected herbicides to fingerling channel catfish *Ictalurus punctatus* **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **18**: 267-271.
-

- McMILLAN, D. C., FREEMAN, J. P.; HINSON, J. A. 1990a. Metabolism of the arylamide herbicide Propanil. I. Microsomal metabolism and *in vitro* methemoglobinemia. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **103**: 90-101.
- McMILLAN, D. C., LEAKEY, J.E.A.; ARLOTTO, M.P.; McMILLAN, J.M., HINSON, J. A. 1990b. Metabolism of the arylamide herbicide Propanil. II. Effects of Propanil and its derivatives on hepatic microsomal metabolism drug-metabolizing enzymes in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **103**: 102-112.
- McMILLAN, D. C., MCRAE, T. A.; HINSON, J. A. 1990c. Propanil-induced methemoglobinemia and hemoglobin binding in the rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **105**: 503-507.
- McMILLAN, D. C., BRADSHAW, T. P., HINSON, J. A.; JOLLOW, D. J. 1991. Role of metabolites in Propanil-induced hemolytic anaemia. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **110**: 70-78.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. 1983. Glutathione. **Ann. Rev. Biochem.** **52**(1): 711-760.
- MEISTER, R.T. (Ed.). 1992. **Farm Chemical Handbook. '92**. Meister Publisher Company, Willoughby, OH., USA, 256 pp.
- MOORE, M.T.; FARRIS, J.L. 1997. Acute and Chronic toxicity of the herbicide Stam® M-4 in field and laboratory exposures. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** **33**: 199-202.
- MUSTAFA, T. 1997. **Animal Biomarkers as Environmental Stress Indicators: Assessing the Health of Organisms in the Environment**. En: **Coastal Systems and Margins**, Vol. 3, B.U. Haq et al. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp:181-197.
- MUUS, B.J. 1981. **Anguila**. En: **Los peces de agua dulce de España y Europa. Pesca, Biología, Importancia económica**. 2<sup>a</sup> Ed. Bent J. Muus, Preben Dahlström, Eds. Omega, S.A., pp: 148-152.
- NEMCSÓK, J.; BOROSS, L. 1982. Comparative studies on the sensitivity of different fish species to metal pollution. **Acta Biol.** **33**(1): 23-27.
- NEŠKOVIC, N.K.; POLEKSIC, V.; ELEZOVIC, I.; KARAN, V.; BUDIMIR, M. 1996. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp *Cyprinus carpio* L. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **56**: 295-302.
- OOKHTENS, M.; KAPLOWITZ, N. 1998. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cysteine. **Semin. Liver Dis.** **18** (4): 313-329.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (O.E.C.D.). 1998. **Guidelines for Testing of Chemicals**. OECD. París (Francia), 305 pp.
- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (O.M.S.). 2003. **Guidelines for drinking-water quality**. 3<sup>th</sup> Ed. Vol. 2. **Health criteria and other supporting information: Propanil**. WHO, Genova, Suiza, pp: 744-748.

- ORUÇ, E. Ö.; ÜNER, N. 1998. Effects of azinphosmethyl on some biochemical parameters in blood, muscle, and liver tissues of *Cyprinus carpio*. **Pest. Biochem. Physiol.** **62**: 65-71.
- PADMAJA RAMBABU, J.; BALAPARAMESWARA RAO, M. 1995. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Muller). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **53**: 142-148.
- PELLETIER, D.; GUDERLEY, H.; DUTIL, J.D. 1993. Effects on growth rate, temperature, season and body size on glycolytic enzyme activities in the white muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **J. Exp. Zool.** **256**: 477-487.
- PEÑA, S.; PEÑA, J.B.; RÍOS, C.; SANCHO, E.; FERNANDEZ, C.; FERRANDO, M.D. 2000. Role of Glutathione in Thiobencarb resistance in the European eel, *Anguilla anguilla*. **Ecotox. Environ. Saf.** **46**: 51-56.
- PEÑA-LLOPIS, S.; PEÑA, J.B.; SANCHO, E.; FERNANDEZ-VEGA, C.; FERRANDO, M.D. 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide Molinate. **Chemosphere** **45**: 671-681.
- PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M.D.; PEÑA, J.B. 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on Glutathione metabolism and enhanced by *N*-acetylcysteine. **Aquat. Toxicol.** **65**: 337-360.
- PERSICHINO, J.; CHRISTIAN, E.; CARTER, R. 1998. Short-term effects of Bolero on the gill apparatus of a small number of mosquitofish (*Gambusia affinis*). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **61**:162-168.
- PETERS, G.; DEVANTHAL, H.; KLINGER, H. 1980. Physiological and morphological effects of social stress in the eel (*Anguilla anguilla* L.). **Arch. Fisch. Wiss.** **30**: 157-180.
- PETERS, G.; HONG, L.Q. 1985. **Gill structure and blood electrolyte levels of European eels under stress**. En: **Fish and Shellfish pathology**. Academic Press, London, pp: 183-198.
- PICKERING, A.D. (Ed.), 1981. **Stress and Fish**. Academic Press, New York, 231 pp.
- PILLAY, T.V.R. 1997. **Eels**. En: **Aquaculture. Principles and Practiques**. Fishing News Book. Blackwell Scientific Publications, LTD, pp: 433-443.
- PILO, B.; ANSARI, M.V.; SHAH, R.V. 1972. Studies on wound healing and repairs in pigeon liver: III. Histochemical studies on acid and alkaline phosphatase during the process. **J. Anim. Morphol. Physiol.** **19**: 205-212.
- PLANAS, J. 1993. **El Estrés en los Peces**. En: **Acuicultura Marina. Fundamentos biológicos, y Tecnología de la Producción**. F. Castelló Orvay. Univ. de Barcelona, pp: 563-573.

- 
- PLISETSKAYA, E. 1980. Fatty acids levels in blood of cyclostomes and fish. **Env. Biol. Fish.** **5**: 273-290.
- POLEKSIĆ, V.; KARAN, V. 1999. Effects of trifluralin on carp: biochemical and histological evaluation. **Ecotox. Environ. Saf.** **43**: 213-221.
- POPOVA, G. V. 1973. Change in the morphophysiological indices of some fish caused by Stam F-34 (Propanil). **Eksp. Vod. Toksikol.** **4**: 38-49.
- POTHULURI, J.V.; HINSON, J.A.; CERNIGLIA, C.E. 1991. Propanil: Toxicological characteristics, metabolism, and biodegradation potential in soil. **J. Environ. Qual.** **20**: 330-347.
- PRIMO, E.; CARRASCO, J.M. 1990. **Química agrícola II: Plaguicidas y fitorreguladores**. Eds. Alhambra Longman S.A. Madrid, 639 pp.
- RADHAIAH, V.; JAYANTHA RAO. K. 1991. Toxicity of the pyrethroid insecticide fenvalerate to a freshwater fish *Tilapia mossambica* (Peters): Changes in glycogen metabolism of muscle. **Ecotox. Environ. Saf.** **19**: 116-122.
- RADHAIAH, V.; JAYANTHA RAO. K. 1992. Fenvalerate toxicity to the liver in a freshwater fish *Tilapia mossambica* (Peters). **Comp. Physiol. Ecol.** **17**(2): 48-53.
- RAMBABU, J.P.; RAO. M.B. 1994. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Muller). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **53**: 142-148.
- RAND, G.M. 1995. **Introduction**. En: **Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**. 2<sup>nd</sup> Ed. Ed. Gary M. Rand, Ph.D. Taylor & Francis Publishers. Ecological Services, Inc. Florida, 1125 pp.
- REDDY, D.S.; GHANATHAY, V.V.; REDDY, S.L.N.; SHANKARIAH, K. 1994. Hepatotoxic effects of hexachlorocyclohexane on carbohydrate metabolism of a freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **53**: 733-739.
- ROHM, J.P.; HAAS, M.B. 1961. **Product: STAM Tech 98% DCA Herbicide (Key 904399-2)**. Rohm & Haas Company, Philadelphia, PA, pp: 25-29.
- SANCHO, E. 1991. **Toxicidad, acumulación y eliminación del diazinón en la anguila (*Anguilla anguilla* L.) de la Albufera de Valencia**. Tesis de licenciatura. Universidad de Valencia, 101 pp.
- SANCHO, E. 1996. **Respuesta fisiológica inducida en la anguila europea (*Anguilla anguilla*) por la presencia de fenitrotión en el medio**. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, 228 pp.
- SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. 1996. Physiological stress responses of *Anguilla anguilla* to fenitrothion. **J. Environ. Sci. Health B31**(1): 87-98.
-

- SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. 1997. Sublethal effects of an organophosphate insecticide on the european eel, *Anguilla anguilla*. **Ecotox. Environ. Saf.** **36**: 57-65.
- SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; FERNÁNDEZ-VEGA, C.; ANDREU, E. 1998a. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. **Ecotox. Environ. Saf.** **41**: 168-175.
- SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. 1998b. Effects of sublethal exposure to a pesticide on levels of energetic compounds in *Anguilla anguilla*. **J. Environ. Sci. Health B33**(4): 411-424.
- SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. 1999. Metabolic disorders on skeletal muscle of the European eel, *Anguilla anguilla*, as response to fenitrothion. **Fresenius Environ. Bull.** **8**: 416-427.
- SANCHO, E.; CERÓN, J.J.; FERRANDO, M.D. 2000. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. **Ecotox. Environ. Saf.** **46**(1): 81-86.
- SANCHO, E.; FERNÁNDEZ-VEGA, C.; FERRANDO, M.D.; ANDREU-MOLINER, E. 2003. "Eel ATPase Activity as Biomarker of Exposure". **Ecotox. Environ. Saf.** **56**: 434-441.
- SANTILLO, M.; RIPPA, C.; DELLA MORTE, R.; VILLANI, G.R.D.; SANTANGELO, F.; STAIANO, N.; MONDOLA, P. 1995. Enhancement of tissue lipoperoxidation in propanil-treated rats. **Toxicol. Letters** **78**: 215-218.
- SANTOS, M.A.; PIRES, F.; HALL, A. 1990. Metabolic effects of kraft mill effluents on the eel *Anguilla anguilla* L. **Ecotox. Environ. Saf.** **20**: 10-19.
- SANTOS, T.C.R., ROCHA, J.C., ALONSO, R.M., MARTINEZ, E., IBAÑEZ, C.; BARCELÓ, D. 1998. Rapid degradation of propanil in rice crop fields. **Environ. Sci. Technol.** **32**: 3479-3484.
- SANZ, P.; REPETTO, M. 1995. **Toxicología avanzada**. M. Repetto. Eds. Díaz de Santos, S.A. Madrid, pp: 117-145.
- SCHLENK, D.; MOORE, T. 1993. Distribution and elimination of the herbicide propanil in the Channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Xenobiotica** **23**: 1017-1024.
- SEIFTER, S.; DAYTON, S.; NOVIC, B.; MUNTWYLER, I. 1950. Estimation of glycogen with the anthrone reagent. **Arch. Biochem.** **25**: 191-200.
- SELYE, H. 1973. The evolution of stress concept. **Am. Sci.** **61**: 692-698.
- SHAKOORI, A.R.; MUGHAL, A.L.; IQBAL, M.J. 1996. Effects of sublethal doses of Fenvalerate (a sintetic pyretroid) administered continuously for four weeks on the blood, liver, and muscles of a freshwater fish, *Ctenopharyngodon idella*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **57**: 487-494.



- 
- SHAW, I.C; CHADWICK, J. 1998. **Principles of Environmental Toxicology**. Taylor & Francis Ltd., England, 216 pp.
- SIES, H.; GRAF, P. 1985. Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenaline. **Biochem. J.** **226** (2): 545-549.
- SIES, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic. Biol. Med.** **27** (9-10): 916-921.
- SINDERMANN, C.J. 1996. **The role of stress in marine animals**. En: **Ocean Pollution Effects on Living Resources and Humans**. CRC Press, pp: 9-17.
- SINGH, P.B. 1992. Impact of malathion and Y-BHC on lipid metabolism in the freshwater female catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Ecotox. Environ. Saf.** **23**: 22-26.
- SINGH, S.; BHATI, D.P.S. 1994. Evaluation of liver protein due to stress under 2,4-D intoxication in *Channa punctatus* (Bloch.). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, **53**: 149-152.
- SINGH, N.N.; DAS, V.K.; SINGH, S. 1996. Effect of aldrin on carbohydrate, protein, and ionic metabolism of a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **57**: 204-210.
- SINGH, R.K.; SHARMA, B. 1998. Carbofuran-induced biochemical changes in *Clarias Bratrachus*. **Pest. Sci.** **53**: 285-290.
- SINGH, D.; SINGH, A. 2004. Influence of alphamethrin on oxidative metabolism of the freshwater fish *Catla catla*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **73**: 161-166.
- SINGH, S.K.; TRIPATHI, P.K.; YADAV, R.P.; SINGH, D.; SINGH, A. 2004. Toxicity of malathion and carbaryl pesticides: effects on some biochemical profiles of the freshwater fish *Colisa fasciatus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **72**: 592-599.
- SINGLETON, S. D.; MURPHY, S. D. 1973. Propanil (3,4-dichloropropionanilide)-induced methaemoglobin formation in mice in relation to acylamidase activity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **25**: 20-29.
- SPRAGUE, J.B. 1973. The ABC's of pollutant bioassay using fish. Biological Methods for assessment of water quality. ASTM STP 528. **Am. Soc. Test. Mat.:** 6-30.
- STRAYER, L. 1996. **Bioquímica**. J.M. Maraculla. Ed. Reverté., S.A. Barcelona, 871 pp.
- SZASZ, G. 1969. A kinetic photometric method for serum  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. **Clin. Chem.** **15**: 124-136.
- SZEGLETES, T.; POLYHOS, C.S.; BALINT, T.; RADY, A.A.; LANG, G. KUFCSAK, O.; NEMSOCK, J. 1995. In vivo effects of deltamethrin on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Environ. Monit. Assess.** **35**: 97-111.
- THANGAVEL, P.; NIVEDHITHA, H.; RAMASWAMY, M. 2004. Comparative study on individual and combined effects of dimecrom and ziram on carbohydrate metabolites in
-

- liver muscle, heart and blood of a freshwater teleost, *Sarotherodon mossambicus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **72**: 365-372.
- THEUS, S.A.; TABOR, D.R.; GANDY, J.; BARNETT, J.B. 1993. Alteration of macrophage cytotoxicity through endogenous interferon and tumor necrosis factor  $\alpha$  induction by Propanil. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **118**: 46-52.
- TJEERDEMA, D.S.; CROSBY, D.G. 1988. Comparative biotransformation of molinate (Ordram®) in the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). **Xenobiotica** **18**(7): 831-838.
- TOMLIN, C.D.S. 1997. **The pesticide manual. Vol 11.** British Crop Protection Council, Surrey, UK, 1250 pp.
- TRINDER, P. 1969. Determination of Glucose in blood using Glucose Oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.** **6**: 24-27.
- TRIPATHI, P.K.; SINGH, A. 2003. Toxic effects of dimethoate and carbaryl pesticides on reproduction and related enzymes of the freshwater snail *Lymnaea acuminata*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **71**: 535-542.
- TUCKER, C.S. 1987. Short-term effects of propanil on oxygen production by plancton communities from catfish ponds. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **39**: 245-250.
- TUGIYONO, M.; GAGNON, M. 2002. Metabolic enzymes as biochemical markers of effect following exposure of fish to Sodium Pentachlorophenate (Na-PCP). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **69**: 570-575.
- UHLIG, S.; WENDEL, A. 1992. The physiological consequences of glutathione variations. **Life Sci.** **51**(14): 1083-1094.
- VALENTOVIC, M.A.; BALL, J.G.; ANESTIS, D.K.; RANKIN, G.O. 1995. Comparison of the in vitro toxicity of dichloroaniline structural isomers. **Toxicol. In Vitro** **9**: 75-81.
- VAN BIRGELEN, A.P.J.M.; HÉBERT, C.D.; WENK, M.L.; GRIMES, L.K.; CHAPIN, R.E.; MAHLER, J.; TRAVLEOS, G.S. BUCHER, J.R. 1999. Toxicity of 3,3',4,4'-Tetrachloroazobenzene in rats and mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **156**: 147-159.
- VAN DER OOST, R.; GOKSOYR, A.; CELANDER, M.; HEIDA, H.; VERMEULEN, P.E. 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. **Aquat. Toxicol.** **36** (3-4): 189-222.
- VAN DER OOST, R.; VINDIMIAN, E.; VAN DER BRINK, P.J.; SATUMALAY, K.; HEIDA, H.; VERMEULEN, P.E. 1997. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. **Aquat. Toxicol.** **39**: 45-75.
- VAN DER THILLART, G. 1986. Energy metabolism of swimming trout (*Salmo gairdneri*). Oxidation rates of palmitate, glucose, lactate, alanine, leucine y glutamate. **J. Comp. Physiol. B** **156**: 511-520.

- 
- VAN WAARDE, G.; VAN DER THILLART, G.; KESBEKE, F. 1983. Anaerobic energy metabolism of the european eel *Anguilla anguilla*. **J. Comp. Physiol.** **149**: 469-475.
- VASSAULT, A. 1983. **Lactate dehydrogenase**. En: **Methods of Enzymatic Analysis. Enzymes: Oxireductases, transferases**. Vol. III. 3<sup>rd</sup> Ed. Ed. H.U. Bergmeyer. Academic Press, New York, USA, pp: 118-126.
- VUTUKURU, S.S. 2003. Chromium induced alterations in some biochemical profiles of the Indian major carp *Labeo rohita* (Hamilton). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **70**: 118-123.
- WARE, G.W. 1983. **Modes of action for herbicides**. En: **Pesticides. Theory and Application**. Ed. W.H. Freeman and Company. San Francisco, USA, 308 pp.
- WEDEMEYER, G.A.; McLEAY, D.J. 1981. **Methods of determining tolerance of fishes to environmental stressors**. En: **Stress and Fish**. Ed. A.D. Pickering. Academic Press New York, USA, pp: 247-275.
- WEICHSELBAUM, T.E. 1946. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. **Am. J. Clin. Pathol.** **16**: 40-49.
- WELLBORN, T.L.; MORGAN, R.; GUYTON, G.W. 1984. **Agriculture Chemical Toxicity to Selected Aquatic Animal: Bluegill, Channel Catfish, Rainbow Trout, Crawfish, and Freshwater Shrimp**, Publication 1455 (MS: Mississippi Cooperative Extension Service).
- WENGER, C. 1984. **Alkaline phosphatase**. En: **Clinical Chemistry**. Ed. A. Kaplan. The C.V. Mosby Co. St. Louis. Toronto. Princenton, pp: 1094-1098.
- WORTHING, C.R.; 1987. **The pesticide manual. A world compendium** 8<sup>th</sup> Ed. Eds Charles R. Worthing, B.Sc., M.A., D. Phil., Lavenham Press Ltd., Lavenham, 1081 pp.
- ZHAO, W.; SCHAFER, R.; CUFF, C.F. 1995. Changes in primary and secondary lymphoid organ T-cell subpopulations resulting from acute *in vivo* exposure to Propanil. **J. Toxicol. Environ. Health** **46**: 171-181.
- ZHAO, W.; SCHAFER, R.; BARNETT, J.B. 1999. Propanil affects transcriptional and posttranscriptional regulation of IL-2 expression in activated EL-4 cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** **154**: 153-159.

## **8. ANEXO ESTADÍSTICA**

## 8.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PLASMA

### Glucosa Plasma

**Tabla 1.1.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucosa en el plasma de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Glucosa	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	459.5669	41.7788	0.2163
Error	60	11590.3852	193.1731	(p=0.9958)
0.63 mg/L	11	32131.32	2921.0291	14.4465
Error	60	12131.799	202.1697	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	74570.2559	6779.1142	43.2583
Error	60	9402.7421	156.7124	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	216	168	120	2	24	48	96	80	12	56	72
50.48	0												
82.67	216	*											
95.48	168	*											
100.39	120	*	*										
104.86	2	*	*										
106.02	24	*	*										
107.88	48	*	*										
113.96	96	*	*										
119.71	80	*	*	*	*								
124.28	12	*	*	*	*	*	*						
125.90	56	*	*	*	*	*	*						
130.65	72	*	*	*	*	*	*	*					

**Figura 1.1.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucosa en el plasma de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	12	24	216	168	120	56	2	72	80	96	48
51.68	0												
98.36	12	*											
98.71	24	*											
106.71	216	*											
108.72	168	*											
120.10	120	*	*	*									
132.58	56	*	*	*	*	*							
138.13	2	*	*	*	*	*	*						
141.81	72	*	*	*	*	*	*						
159.36	80	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
162.28	96	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
169.25	48	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 1.2.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucosa en el plasma de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Lactato Plasma****Tabla 1.2.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de lactato en el plasma de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Lactato	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	8.9014	0.8092	0.1965
Error	60	247.1392	4.119	(p=0.9973)
0.63 mg/L	11	5002.905	454.8095	25.0831
Error	60	1087.9261	18.1321	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	10156.0738	923.2794	36.1294
Error	60	1533.2865	25.5548	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	168	216	120	2	96	80	72	56	12	24	48
10.07	0												
18.37	168	*											
20.49	216	*											
26.21	120	*	*	*									
25.49	2	*	*	*									
28.18	96	*	*	*									
33.31	80	*	*	*	*	*	*						
34.87	72	*	*	*	*	*	*						
35.54	56	*	*	*	*	*	*						
35.54	12	*	*	*	*	*	*						
36.87	24	*	*	*	*	*	*						
37.30	48	*	*	*	*	*	*						

**Figura 1.3.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de lactato en el plasma de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	216	168	120	96	2	12	48	56	72	24	80
10.80	0												
21.77	216	*											
28.40	168	*	*										
35.25	120	*	*	*									
36.22	96	*	*	*									
37.40	2	*	*	*									
40.04	12	*	*	*									
42.31	48	*	*	*	*								
42.36	56	*	*	*	*								
49.79	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
51.15	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
53.38	80	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

**Figura 1.4.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de lactato en el plasma de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Proteínas Totales Plasma****Tabla 1.3.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas totales en el plasma de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Proteínas Totales	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	0.9075	0.0825	0.3145
Error	60	15.7415	0.2624	(p=0.9800)
0.63 mg/L	11	23.2730	2.1157	6.8102
Error	60	18.6403	0.3107	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	28.4282	2.5844	13.2738
Error	60	11.6819	0.1947	(p<0.0001)

Media	Grupo	56	48	12	24	2	72	216	120	168	80	96	0
2.84	56												
2.90	48												
2.92	12												
2.99	24												
3.08	2												
3.39	72												
3.89	216	*	*	*	*	*							
3.96	120	*	*	*	*	*							
3.96	168	*	*	*	*	*							
4.09	80	*	*	*	*	*							
4.18	96	*	*	*	*	*	*						
4.48	0	*	*	*	*	*	*	*					

**Figura 1.5.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de proteínas totales en el plasma de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	24	12	2	48	56	72	96	120	80	216	0	168
2.63	24												
2.75	12												
3.26	2	*											
3.43	48	*	*										
3.53	56	*	*										
3.71	72	*	*										
3.95	96	*	*	*									
4.05	120	*	*	*	*								
4.41	80	*	*	*	*	*	*						
4.43	216	*	*	*	*	*	*	*					
4.48	0	*	*	*	*	*	*	*	*				
4.48	168	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

**Figura 1.6.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de proteínas totales en el plasma de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Albúmina Plasma**

**Tabla 1.4.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de albúmina en el plasma de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Albúmina	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.3715	0.0338	0.0992
<b>Error</b>	60	20.4268	0.3404	(p=0.9999)
<b>0.63 mg/L</b>	11	19.882	1.807	9.2448
<b>Error</b>	60	11.730	0.1655	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	42.876	3.898	17.9157
<b>Error</b>	60	13.054	0.2176	(p<0.0001)

Media	Grupo	24	12	2	48	56	72	96	80	216	168	0	120
1.15	24												
1.40	12												
1.42	2												
1.54	48												
1.65	56												
1.79	72	*											
2.26	96	*	*	*	*	*							
2.28	80	*	*	*	*	*							
2.40	216	*	*	*	*	*	*						
2.45	168	*	*	*	*	*	*						
2.51	0	*	*	*	*	*	*						
2.96	120	*	*	*	*	*	*	*	*				

**Figura 1.7.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de albúmina en el plasma de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	24	12	48	56	2	72	0	80	96	120	216	168
0.88	24												
1.43	12	*											
1.76	48	*											
1.93	56	*											
2.14	2	*	*										
2.58	72	*	*	*	*								
2.72	0	*	*	*	*	*							
2.83	80	*	*	*	*	*							
3.06	96	*	*	*	*	*							
3.29	120	*	*	*	*	*	*						
3.31	216	*	*	*	*	*	*						
3.31	218	*	*	*	*	*	*						

**Figura 1.8.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de albúmina en el plasma de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.



**Colesterol Plasma****Tabla 1.5.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de colesterol en el plasma de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Colesterol	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	2798.0433	254.3676	0.2829
<b>Error</b>	60	53954.5815	899.243	(p=0.9869)
<b>0.63 mg/L</b>	11	166057.0946	15096.0995	7.7575
<b>Error</b>	60	116760.636	1946.0106	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	145205.8865	13200.5351	9.9314
<b>Error</b>	60	79750.6283	1329.1771	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	120	216	2	56	96	48	24	168	12	80	72
276.53	0												
295.58	120												
301.71	216												
317.98	2												
345.20	56	*											
346.70	96	*											
348.99	48	*											
365.08	24	*	*	*									
373.39	168	*	*	*									
378.11	12	*	*	*	*								
426.61	80	*	*	*	*	*	*	*	*				
442.30	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 1.9.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de colesterol en el plasma de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	216	2	48	12	72	80	24	56	120	96	168
267.62	0												
286.27	216												
336.31	2	*	*										
357.51	48	*	*										
358.77	12	*	*										
364.33	72	*	*										
385.44	80	*	*	*									
396.67	24	*	*	*									
396.77	56	*	*	*									
399.94	120	*	*	*									
405.41	96	*	*	*									
413.18	168	*	*	*	*	*	*						

**Figura 1.10.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de colesterol en el plasma de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Triglicéridos Plasma****Tabla 1.6.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de triglicéridos en el plasma de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Triglicéridos	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	3715.303	337.755	0.1803
<b>Error</b>	60	112369.607	1872.827	(p=0.9981)
<b>0.63 mg/L</b>	11	150653.581	13695.780	5.4931
<b>Error</b>	60	149594.848	2493.248	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	176778.799	16070.8	6.6248
<b>Error</b>	60	145551.471	2425.858	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	216	168	120	96	72	2	12	48	56	80	24
179.80	0												
260.23	216	*											
280.39	168	*											
282.72	120	*	*	*									
286.66	96	*	*	*									
299.91	72	*	*	*									
303.69	2	*	*	*	*	*	*						
312.86	12	*	*	*	*	*	*						
317.23	48	*	*	*	*	*	*						
319.04	56	*	*	*	*	*	*						
345.03	80	*	*	*	*	*	*						
373.99	24	*	*	*	*	*	*						

**Figura 1.11.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de triglicéridos en el plasma de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	168	80	216	56	120	96	12	24	2	72	48
186.52	0												
239.49	168												
299.01	80	*	*										
306.14	216	*	*										
318.22	56	*	*										
318.57	120	*	*										
334.72	96	*	*										
339.58	12	*	*										
339.90	24	*	*										
341.18	2	*	*										
349.53	72	*	*										
374.14	48	*	*	*	*								

**Figura 1.12.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de triglicéridos en el plasma de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad AST Plasma****Tabla 1.7.** Análisis de la varianza (ANOVA) para actividad AST en el plasma de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

AST	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.0007	0.0001	0.0548
<b>Error</b>	60	0.0693	0.0012	(p=1.0000)
<b>0.63 mg/L</b>	11	0.3812	0.0347	3.6942
<b>Error</b>	60	0.5628	0.0094	(p<0.001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	2.6747	0.2432	47.0598
<b>Error</b>	60	0.3100	0.0052	(p<0.0001)

Media	Grupo	216	0	2	168	120	12	96	48	80	24	72	56
0.21	216												
0.22	0												
0.27	2												
0.28	168												
0.28	120												
0.32	12												
0.33	96												
0.34	48												
0.34	80												
0.34	24	*	*										
0.44	72	*	*	*	*	*							
0.45	56	*	*	*	*	*							

**Figura 1.13.** Resultado del Test de Duncan para actividad AST en el plasma de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	12	2	24	48	120	168	216	56	96	80	72
0.21	0												
0.29	12												
0.30	2	*											
0.34	24	*											
0.37	48	*											
0.37	120	*											
0.37	168	*											
0.42	216	*	*	*									
0.61	56	*	*	*	*	*	*	*	*				
0.73	96	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
0.74	80	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
0.81	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

**Figura 1.14.** Resultado del Test de Duncan para actividad AST en el plasma de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad ALP Plasma****Tabla 1.8.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad ALP en el plasma de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

ALP	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	51.4398	4.6763	0.2029
<b>Error</b>	60	1382.5218	23.0420	(p=0.9968)
<b>0.63 mg/L</b>	11	5465.0753	496.8250	9.2564
<b>Error</b>	60	3220.4115	53.6735	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	8043.3942	731.2177	17.1222
<b>Error</b>	60	2562.3512	42.7059	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	216	120	168	96	24	56	48	2	12	72	80
41.66	0												
43.24	216												
46.64	120												
50.41	168												
50.96	96												
59.69	24	*	*	*	*	*							
61.33	56	*	*	*	*	*							
61.35	48	*	*	*	*	*							
63.88	2	*	*	*	*	*							
64.17	12	*	*	*	*	*							
64.33	72	*	*	*	*	*							
67.41	80	*	*	*	*	*							

**Figura 1.15.** Resultado del Test de Duncan para actividad ALP en el plasma de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	12	2	96	120	48	168	24	72	56	216	80
35.46	0												
39.90	12												
40.61	2												
46.89	96	*											
47.70	120	*											
50.23	48	*	*	*									
56.49	168	*	*	*	*	*							
57.83	24	*	*	*	*	*							
58.98	72	*	*	*	*	*	*						
60.94	56	*	*	*	*	*	*						
65.66	216	*	*	*	*	*	*	*					
71.48	80	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 1.16.** Resultado del Test de Duncan para actividad ALP en el plasma de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

## 8.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL HÍGADO

### Glucosa Hígado

**Tabla 2.1.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucosa en el hígado de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Glucosa	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	8.7199	0.7927	0.6375
Error	60	74.6116	1.2435	(p=0.7896)
0.63 mg/L	11	315.7859	28.7078	16.4297
Error	60	104.8385	1.7473	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	348.739	31.7035	17.7945
Error	60	106.8988	1.7816	(p<0.0001)

Media	Grupo	72	56	24	48	80	12	2	216	168	120	96	0
4.29	72												
4.85	56												
6.14	24	*											
7.01	48	*	*										
7.24	80	*	*										
8.21	12	*	*	*									
8.35	2	*	*	*									
8.86	216	*	*	*	*								
9.80	168	*	*	*	*	*							
10.20	120	*	*	*	*	*	*	*					
10.66	96	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
10.80	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 2.1.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucosa en el hígado de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	48	72	56	24	216	2	168	12	80	96	0	120
3.34	48												
4.03	72												
4.64	56												
5.09	24	*											
6.79	216	*	*	*	*								
6.99	2	*	*	*	*								
7.72	168	*	*	*	*								
7.86	12	*	*	*	*								
8.42	80	*	*	*	*								
8.87	96	*	*	*	*	*	*						
10.11	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
10.19	120	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

**Figura 2.2.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucosa en el hígado de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Lactato Hígado****Tabla 2.2.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de lactato en el hígado de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Lactato	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	0.2789	0.0254	0.6006
Error	60	2.5328	0.0422	(p=0.8208)
0.63 mg/L	11	8.5843	0.7804	13.8883
Error	60	3.3714	0.0562	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	16.4001	1.4909	19.6249
Error	60	4.5583	0.0760	(p<0.0001)

Media	Grupo	2	0	120	96	48	24	12	216	80	168	72	56
1.01	2												
1.09	0												
1.40	120	*	*										
1.45	96	*	*										
1.58	48	*	*										
1.65	24	*	*										
1.68	12	*	*										
1.69	216	*	*										
1.95	80	*	*	*	*	*	*						
1.95	168	*	*	*	*	*							
2.08	72	*	*	*	*	*	*	*	*				
2.14	56	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.3.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de lactato en el hígado de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	2	24	48	216	12	120	80	96	168	72	56
1.00	0												
1.24	2												
1.59	24	*	*										
1.66	48	*	*										
1.69	216	*	*										
1.76	12	*	*										
2.07	120	*	*	*	*	*							
2.08	80	*	*	*	*	*							
2.08	96	*	*	*	*	*							
2.20	168	*	*	*	*	*	*						
2.52	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2.74	56	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.4.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de lactato en el hígado de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Glucógeno Hígado****Tabla 2.3.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucógeno en el hígado de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Glucógeno	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	574.5654	52.2332	0.0375
<b>Error</b>	60	83629.2538	1393.8209	(p=1.0000)
<b>0.63 mg/L</b>	11	781978.1833	71088.9258	157.2604
<b>Error</b>	60	27122.7585	452.0460	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	700179.6196	63652.6927	160.1496
<b>Error</b>	60	23847.4598	397.4577	(p<0.0001)

Media	Grupo	72	48	56	80	24	96	120	216	168	12	2	0
9.23	72												
11.95	48												
20.57	56												
37.76	80	*											
67.18	24	*	*	*	*								
78.35	96	*	*	*	*								
120.20	120	*	*	*	*	*	*						
126.49	216	*	*	*	*	*	*	*					
136.77	168	*	*	*	*	*	*	*	*				
233.71	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
280.06	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
335.32	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.5.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucógeno en el hígado de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	56	48	80	120	96	168	72	216	12	24	2	0
7.30	56												
7.78	48												
13.31	80												
19.06	120												
24.22	96												
34.84	168	*	*										
36.77	72	*	*										
47.57	216	*	*	*	*								
53.54	12	*	*	*	*	*							
55.23	24	*	*	*	*	*							
229.98	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
338.57	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.6.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucógeno en el hígado de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Proteínas Totales Hígado****Tabla 2.4.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas totales en el hígado de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Proteínas Totales	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	30873.3754	2806.6705	0.3712
<b>Error</b>	60	453684.0106	7561.4002	(p=0.9624)
<b>0.63 mg/L</b>	11	457038.4262	41548.9478	12.6780
<b>Error</b>	60	196634.3402	3277.239	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	402776.4878	36616.0443	14.5604
<b>Error</b>	60	150886.2951	2514.7716	(p<0.0001)

Media	Grupo	120	96	168	24	2	48	80	216	56	72	12	0
122.17	120												
163.43	96												
167.66	168												
170.10	24												
174.67	2												
179.40	48												
228.66	80	*											
242.65	216	*	*	*									
283.49	56	*	*	*	*	*	*						
306.25	72	*	*	*	*	*	*	*					
308.44	12	*	*	*	*	*	*	*					
408.97	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.7.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de proteínas totales en el hígado de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	80	96	168	2	48	120	72	216	24	12	56	0
143.09	80												
146.41	96												
160.08	168												
164.66	2												
177.64	48												
183.83	120												
191.72	72												
198.55	216												
221.47	24	*	*										
232.05	12	*	*	*	*								
248.36	56	*	*	*	*	*							
433.17	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.8.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de proteínas totales en el hígado de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.



**Colesterol Hígado**

**Tabla 2.5.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de colesterol en el hígado de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Colesterol	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	11.7535	1.0685	0.5085
Error	60	126.0862		(p=0.8902)
0.63 mg/L	11	669.5197	60.8654	41.1708
Error	60	88.7018	1.4784	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	459.4636	41.7694	31.7224
Error	60	79.003	1.3167	(p<0.0001)

Media	Grupo	120	168	96	80	48	216	24	2	56	72	12	0
2.13	120												
2.92	168												
3.02	96												
4.83	80	*	*	*									
4.85	48	*	*	*									
5.11	216	*	*	*									
6.22	24	*	*	*									
6.56	2	*	*	*	*	*							
8.03	56	*	*	*	*	*	*	*	*				
8.51	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
9.21	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
13.37	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.9.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de colesterol en el hígado de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	96	168	216	80	48	120	2	72	24	12	56	0
2.54	96												
2.55	168												
3.85	216												
4.17	80	*	*										
4.36	48	*	*										
4.64	120	*	*										
4.71	2	*	*										
4.75	72	*	*										
5.43	24	*	*	*									
5.94	12	*	*	*	*	*							
7.40	56	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
12.46	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.10.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de colesterol en el hígado de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Triglicéridos Hígado****Tabla 2.6.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de triglicéridos en el hígado de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Triglicéridos	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	70.7398	6.4309	0.2783
Error	60	1386.4048	23.1067	(p=0.9877)
0.63 mg/L	11	3304.0059	300.3642	26.0475
Error	60	691.8834	11.5314	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	3417.3407	310.6673	33.4085
Error	60	557.9424	9.299	(p<0.0001)

Media	Grupo	120	96	168	80	216	48	24	2	12	56	72	0
9.89	120												
10.82	96												
13.45	168												
14.51	80	*											
15.74	216	*	*										
20.82	48	*	*	*	*	*							
21.30	24	*	*	*	*	*							
22.94	2	*	*	*	*	*							
23.98	12	*	*	*	*	*							
24.67	56	*	*	*	*	*							
25.32	72	*	*	*	*	*	*						
34.01	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.11.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de triglicéridos en el hígado de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	96	120	80	168	216	72	48	24	12	56	2	0
12.19	96												
13.09	120												
13.58	80												
14.30	168												
15.12	216												
19.69	72	*	*	*	*	*							
20.72	48	*	*	*	*	*							
21.53	24	*	*	*	*	*							
22.32	12	*	*	*	*	*							
22.58	56	*	*	*	*	*							
26.19	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
37.61	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.12.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de triglicéridos en el hígado de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad ALT Hígado****Tabla 2.7.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad ALT en el hígado de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

ALT	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	13.1384	1.1944	0.7530
<b>Error</b>	60	95.1681	1.5861	(p=0.6839)
<b>0.63 mg/L</b>	11	96.5737	8.7794	7.6739
<b>Error</b>	60	68.6440	1.1441	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	333.1718	30.2883	21.6016
<b>Error</b>	60	84.1282	1.4021	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	216	12	48	2	24	120	168	96	72	80	56
6.13	0												
6.72	216												
7.20	12												
7.23	48												
7.31	2												
7.37	24												
7.57	120	*											
7.62	168	*											
8.16	96	*	*										
8.82	72	*	*	*	*	*	*						
8.86	80	*	*	*	*	*	*						
10.74	56	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.13.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALT en el hígado de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	2	216	24	168	12	48	120	56	80	96	72
6.13	0												
6.41	2												
6.43	216												
6.71	24												
7.26	168												
8.18	12	*	*	*	*								
8.42	48	*	*	*	*								
8.80	120	*	*	*	*	*							
11.40	56	*	*	*	*	*	*	*	*				
11.51	80	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
11.55	96	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
11.67	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

**Figura 2.14.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALT en el hígado de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad ALP Hígado****Tabla 2.8.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad ALP en el hígado de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

ALP	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.2449	0.0223	0.2931
<b>Error</b>	60	4.5578	0.0760	(p=0.9849)
<b>0.63 mg/L</b>	11	16.1391	1.4672	19.3319
<b>Error</b>	60	4.5537	0.0759	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	14.3688	1.3063	15.5337
<b>Error</b>	60	5.0455	0.0841	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	12	2	24	120	48	96	168	72	56	216	80
0.88	0												
0.94	12												
1.22	2	*											
1.34	24	*	*										
1.51	120	*	*										
1.56	48	*	*										
1.65	96	*	*	*									
1.74	168	*	*	*	*								
1.95	72	*	*	*	*	*	*						
2.13	56	*	*	*	*	*	*	*	*				
2.26	216	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
2.41	80	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 2.15.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALP en el hígado de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	2	12	72	56	168	24	80	96	216	120	48
0.81	0												
1.62	2	*											
1.63	12	*											
1.92	72	*											
1.92	56	*											
1.94	168	*											
2.03	24	*	*	*									
2.10	80	*	*	*									
2.16	96	*	*	*									
2.31	216	*	*	*	*	*							
2.37	120	*	*	*	*	*	*						
2.66	48	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 2.16.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALP en el hígado de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad  $\gamma$ -GT Hígado****Tabla 2.9.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad  $\gamma$ -GT en el hígado de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

$\gamma$ -GT	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.2207	0.0201	0.6219
<b>Error</b>	60	1.9355	0.0323	(p=0.8030)
<b>0.63 mg/L</b>	11	1.4486	0.1317	3.6426
<b>Error</b>	60	2.1692	0.0362	(p<0.001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	5.0260	0.4569	16.5515
<b>Error</b>	60	1.6563	0.0276	(p<0.0001)

Media	Grupo	12	48	2	168	96	24	72	80	216	56	120	0
0.98	12												
1.07	48												
1.08	2												
1.10	168												
1.15	96												
1.17	24												
1.18	72												
1.18	80												
1.18	216												
1.29	56	*											
1.36	120	*	*	*	*								
1.54	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.17.** Resultado del Test de Duncan para la actividad  $\gamma$ -GT en el hígado de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil respectivamente.

Media	Grupo	56	2	48	72	24	80	96	12	168	216	120	0
0.80	56												
0.81	2												
0.84	48												
0.90	72												
1.08	24	*	*	*									
1.13	80	*	*	*	*								
1.22	96	*	*	*	*								
1.26	12	*	*	*	*								
1.33	168	*	*	*	*	*							
1.37	216	*	*	*	*	*	*						
1.50	120	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
1.62	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.18.** Resultado del Test de Duncan para la actividad  $\gamma$ -GT en el hígado de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad LDH Hígado****Tabla 2.10.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad LDH en el hígado de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

LDH	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	97.5660	8.8696	0.8500
<b>Error</b>	60	626.0942	10.4349	(p=0.5922)
<b>0.63 mg/L</b>	11	1199.4369	109.0397	12.6450
<b>Error</b>	60	517.3873	8.6231	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	2065.3117	187.7556	30.3650
<b>Error</b>	60	370.9974	6.1833	(p<0.0001)

Media	Grupo	2	48	0	12	72	56	24	80	96	216	120	168
14.53	2												
15.32	48												
15.83	0												
16.71	12												
16.93	72												
17.62	56												
19.14	24	*											
19.87	80	*	*	*									
24.26	96	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
24.45	216	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
25.50	120	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
26.08	168	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

**Figura 2.19.** Resultado del Test de Duncan para la actividad LDH en el hígado de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	2	0	48	24	12	168	80	72	56	120	216	96
13.56	2												
13.57	0												
14.64	48												
16.32	24												
17.86	12	*	*	*									
21.88	168	*	*	*	*	*							
24.27	80	*	*	*	*	*							
24.66	72	*	*	*	*	*							
24.72	56	*	*	*	*	*							
26.44	120	*	*	*	*	*	*						
26.49	216	*	*	*	*	*	*						
28.94	96	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 2.20.** Resultado del Test de Duncan para la actividad LDH en el hígado de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Contenido Calórico Hígado (CC)****Tabla 2.11.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico en el hígado de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

CC	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	615384.9	55944.1	0.3169
<b>Error</b>	60	10591213.9	176520.2	(p=0.9794)
<b>0.63 mg/L</b>	11	39404007.4	3582182.5	35.9891
<b>Error</b>	60	5972111.1	99535.2	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	44556304.9	4050573.2	53.8616
<b>Error</b>	60	4512204.3	75203.4	(p<0.0001)

Media	Grupo	4	9	8	3	7	10	5	6	11	1	2	0
1152.65	4												
1192.75	9												
1236.46	8												
1352.98	3												
1435.20	7												
1520.20	10												
1754.12	5	*	*	*	*								
1827.55	6	*	*	*	*								
1880.38	11	*	*	*	*	*							
2265.47	1	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
2752.28	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
3785.62	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.21.** Resultado del Test de Duncan para el contenido calórico en el hígado de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	7	8	10	4	9	6	11	5	3	2	1	0
909.07	7												
941.28	8												
1070.35	10												
1121.58	4												
1128.07	9												
1301.92	6	*	*										
1327.33	11	*	*										
1505.32	5	*	*	*	*	*							
1544.25	3	*	*	*	*	*							
1600.35	2	*	*	*	*	*							
2025.22	1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
3940.48	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 2.22.** Resultado del Test de Duncan para el contenido calórico en el hígado de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Índice Hepatosomático (HSI)****Tabla 2.12.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el índice hepatosomático de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

HSI	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	6.1446	0.5586	0.3011
<b>Error</b>	60	111.3282	1.8555	(p=0.9831)
<b>0.63 mg/L</b>	11	111.2274	10.1116	4.0593
<b>Error</b>	60	149.457	2.4909	(p<0.0005)
<b>3.16 mg/L</b>	11	127.7373	11.6125	5.3728
<b>Error</b>	60	129.682	2.1614	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	72	216	96	120	168	56	80	12	24	2	48
13.03	0												
13.22	72												
14.25	216												
14.32	96												
14.51	120												
14.78	168												
15.01	56												
15.27	80	*											
16.46	12	*	*	*	*								
16.53	24	*	*	*	*								
16.66	2	*	*	*	*	*							
16.70	48	*	*	*	*	*							

**Figura 2.23.** Resultado del Test de Duncan para el índice hepatosomático de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	216	48	96	56	72	168	24	12	120	80	2
13.06	0												
15.88	216	*											
16.12	48	*											
16.25	96	*											
16.27	56	*											
16.89	72	*											
17.01	168	*											
17.13	24	*											
17.50	12	*											
17.56	120	*											
17.85	80	*											
18.50	2	*	*	*	*	*							

**Figura 2.24.** Resultado del Test de Duncan para el índice hepatosomático de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.



## Contenido Hídrico Hígado

**Tabla 2.13.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en agua en el hígado de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Cont. Hídrico	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.0047	0.0004	0.5514
<b>Error</b>	60	0.0468	0.0008	(p=0.8596)
<b>0.63 mg/L</b>	11	0.3566	0.0324	5.3780
<b>Error</b>	60	0.3616	0.0060	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	0.4314	0.0392	3.9908
<b>Error</b>	60	0.5897	0.0098	(p<0.0005)

Media	Grupo	96	0	120	56	216	80	24	168	72	48	12	2
0.28	96												
0.28	0												
0.30	120												
0.31	56												
0.32	216												
0.36	80												
0.37	24												
0.40	168	*	*	*									
0.42	72	*	*	*	*	*							
0.46	48	*	*	*	*	*	*						
0.46	12	*	*	*	*	*	*	*					
0.48	2	*	*	*	*	*	*	*	*				

**Figura 2.25.** Resultado del Test de Duncan para el contenido en agua en el hígado de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	216	168	72	120	96	80	56	48	12	2	24
0.29	0												
0.36	216												
0.41	168	*											
0.43	72	*											
0.43	120	*											
0.43	96	*											
0.44	80	*											
0.46	56	*											
0.47	48	*											
0.51	12	*	*										
0.57	2	*	*	*	*	*	*	*					
0.58	24	*	*	*	*	*	*	*	*				

**Figura 2.26.** Resultado del Test de Duncan para el contenido en agua en el hígado de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

### 8.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA MUSCULATURA ESQUELÉTICA

#### Glucosa Músculo

**Tabla 3.1.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucosa en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Glucosa	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	0.0063	0.0006	0.0816
Error	60	0.4184	0.0070	(p=1.0000)
0.63 mg/L	11	2.1408	0.1946	12.4044
Error	60	0.9414	0.0157	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	1.9364	0.176	12.3617
Error	60	0.8544	0.0142	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	168	216	96	120	80	24	56	72	48	12	2
0.44	0												
0.53	168												
0.54	216												
0.56	96												
0.58	120												
0.62	80	*											
0.74	24	*	*	*	*	*							
0.76	56	*	*	*	*	*							
0.79	72	*	*	*	*	*	*						
0.91	48	*	*	*	*	*	*	*					
0.94	12	*	*	*	*	*	*	*	*				
0.99	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

**Figura 3.1.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucosa en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	96	216	2	168	120	80	12	56	24	72	48
0.44	0												
0.63	96	*											
0.67	216	*											
0.68	2	*											
0.69	168	*											
0.70	120	*											
0.72	80	*											
0.77	12	*											
0.77	56	*											
0.86	24	*	*	*	*	*	*						
1.10	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1.10	48	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 3.2.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucosa en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Lactato Músculo****Tabla 3.2.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de lactato en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Lactato	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	0.0091	0.0008	0.0159
Error	60	3.1123	0.0519	(p=1.0000)
0.63 mg/L	11	22.2064	2.0188	31.3096
Error	60	3.8687	0.0645	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	14.3397	1.3036	25.8813
Error	60	3.0221	0.0504	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	120	216	96	80	168	72	2	56	24	48	12
1.32	0												
1.48	120												
1.50	216												
1.51	96												
1.65	80	*											
1.74	168	*											
2.24	72	*	*	*	*	*	*	*					
2.44	2	*	*	*	*	*	*	*					
2.64	56	*	*	*	*	*	*	*	*				
2.64	24	*	*	*	*	*	*	*	*				
2.65	48	*	*	*	*	*	*	*	*				
2.92	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

**Figura 3.3.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de lactato en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	168	120	96	216	72	80	48	56	24	2	12
1.28	0												
1.68	168	*											
1.73	120	*											
1.84	96	*											
1.86	216	*											
2.12	72	*	*	*	*								
2.19	80	*	*	*	*	*							
2.32	48	*	*	*	*	*							
2.37	56	*	*	*	*	*							
2.41	24	*	*	*	*	*	*						
2.57	2	*	*	*	*	*	*	*					
3.01	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 3.4.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de lactato en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Glucógeno Músculo****Tabla 3.3.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucógeno en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Glucógeno	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	2.3331	0.2121	0.1299
Error	60	97.9981	1.6333	(p=0.9996)
0.63 mg/L	11	158.8842	14.4440	57.3073
Error	60	15.1227	0.252	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	193.5388	17.5944	71.1638
Error	60	14.8343	0.2472	(p<0.0001)

Media	Grupo	48	72	56	120	24	168	80	216	96	12	2	0
1.47	48												
1.68	72												
1.69	56												
2.08	120												
2.17	24	*											
2.52	168	*	*	*									
2.69	80	*	*	*									
2.94	216	*	*	*	*	*							
3.01	96	*	*	*	*	*							
3.86	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
3.88	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
7.18	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 3.5.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucógeno en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	80	168	48	72	120	56	216	96	24	2	12	0
0.99	80												
1.54	168												
1.63	48	*											
1.70	72	*											
1.74	120	*											
1.77	56	*											
1.99	216	*											
2.28	96	*	*										
2.42	24	*	*	*	*	*	*						
3.88	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
4.18	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
7.15	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 3.6.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucógeno en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Proteínas Totales Músculo****Tabla 3.4.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas totales en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Proteínas Totales	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	9542.2459	867.4769	0.2516
<b>Error</b>	60	206839.9218	3447.3320	(p=0.9919)
<b>0.63 mg/L</b>	11	509231.632	46293.7847	23.6537
<b>Error</b>	60	117428.7543	1957.1459	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	446217.4841	40565.2258	18.2633
<b>Error</b>	60	133268.2568	2221.1376	(p<0.0001)

Media	Grupo	210	96	72	216	168	80	24	56	2	12	48	0
109.28	210												
116.34	96												
155.65	72												
157.90	216												
173.69	168	*	*										
178.74	80	*	*										
229.60	24	*	*	*	*	*							
257.90	56	*	*	*	*	*	*						
278.35	2	*	*	*	*	*	*						
309.16	12	*	*	*	*	*	*	*					
325.80	48	*	*	*	*	*	*	*	*				
381.40	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 3.7.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de proteínas totales en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	216	72	168	80	48	96	120	56	24	2	12	0
116.78	216												
123.61	72												
160.30	168												
176.66	80	*											
195.86	48	*	*										
204.08	96	*	*										
205.11	120	*	*										
229.62	56	*	*	*									
284.37	24	*	*	*	*	*	*	*	*				
289.73	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
310.66	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
395.60	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 3.8.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de proteínas totales en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Colesterol Músculo****Tabla 3.5.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de colesterol en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Colesterol	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.2717	0.0247	0.0316
<b>Error</b>	60	46.9671	0.7828	(p=1.0000)
<b>0.63 mg/L</b>	11	191.1201	17.3746	14.6639
<b>Error</b>	60	71.0714	1.1849	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	219.2277	19.9298	20.2219
<b>Error</b>	60	59.1333	0.9856	(p<0.0001)

Media	Grupo	120	96	168	216	72	48	80	56	2	12	24	0
2.38	120												
2.40	96												
3.51	168												
3.64	216												
4.09	72	*	*										
4.46	48	*	*										
4.97	80	*	*	*									
5.27	56	*	*	*	*								
6.12	2	*	*	*	*	*	*						
6.36	12	*	*	*	*	*	*	*					
6.76	24	*	*	*	*	*	*	*	*				
7.70	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 3.9.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de colesterol en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	168	216	72	56	120	48	80	96	24	2	12	0
2.04	168												
2.20	216												
2.83	72												
3.22	56												
3.98	120	*	*										
4.33	48	*	*	*									
4.45	80	*	*	*									
4.60	96	*	*	*	*								
5.21	24	*	*	*	*								
5.35	2	*	*	*	*	*							
6.49	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
8.42	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 3.10.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de colesterol en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Triglicéridos Músculo****Tabla 3.6.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de triglicéridos en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Triglicéridos	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	20.6132	1.8739	0.1373
<b>Error</b>	60	818.939	13.649	(p=0.9995)
<b>0.63 mg/L</b>	11	5585.0381	507.7307	23.0208
<b>Error</b>	60	1323.3182	22.0553	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	1492.8742	135.7158	7.6303
<b>Error</b>	60	1067.1883	17.7865	(p<0.0001)

Media	Grupo	120	96	72	216	80	168	56	48	0	2	24	12
10.48	120												
11.13	96												
12.72	72												
17.51	216	*	*										
18.09	80	*	*										
18.78	168	*	*	*									
23.62	56	*	*	*	*								
28.25	48	*	*	*	*	*	*						
28.78	0	*	*	*	*	*	*	*					
34.03	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
34.53	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
34.84	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

**Figura 3.11.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de triglicéridos en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	216	168	120	96	80	72	48	2	24	56	12	0
12.35	216												
12.57	168												
16.25	120												
17.61	96												
18.20	80	*	*										
19.93	72	*	*										
21.97	48	*	*	*									
22.37	2	*	*	*									
22.57	24	*	*	*									
22.62	56	*	*	*									
23.94	12	*	*	*	*	*							
28.58	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 3.12.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de triglicéridos en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad ALT Músculo****Tabla 3.7.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad ALT en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

ALT	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.2396	0.0218	1.2907
<b>Error</b>	60	1.0126	0.0169	(p=0.2520)
<b>0.63 mg/L</b>	11	2.1312	0.1937	16.3011
<b>Error</b>	60	0.7131	0.0119	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	1.2804	0.1164	9.1933
<b>Error</b>	60	0.7597	0.0127	(p<0.0001)

Media	Grupo	72	56	24	2	12	48	0	80	216	120	168	96
0.38	72												
0.40	56												
0.44	24												
0.46	2												
0.50	12												
0.60	48	*	*										
0.63	0	*	*	*	*	*							
0.66	80	*	*	*	*	*							
0.66	216	*	*	*	*	*							
0.78	120	*	*	*	*	*	*	*					
0.88	168	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
0.90	96	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 3.13.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALT en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	24	72	56	168	48	12	0	2	216	120	80	96
0.44	24												
0.48	72												
0.50	56												
0.54	168												
0.57	48												
0.60	12	*											
0.61	0	*											
0.62	2	*											
0.64	216	*	*										
0.74	120	*	*	*	*	*							
0.82	80	*	*	*	*	*	*	*	*				
0.91	96	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 3.14.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALT en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.



**Actividad ALP Músculo****Tabla 3.8.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad ALP en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

ALP	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.0002	0.0000	0.0637
<b>Error</b>	60	0.0135	0.0002	(p=1.0000)
<b>0.63 mg/L</b>	11	0.0236	0.0021	4.2739
<b>Error</b>	60	0.0301	0.0005	(p<0.0005)
<b>3.16 mg/L</b>	11	0.1097	0.0100	14.4435
<b>Error</b>	60	0.0414	0.0007	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	24	216	120	12	168	96	80	72	2	56	48
0.11	0												
0.13	24												
0.13	216												
0.14	120												
0.14	12												
0.14	168	*											
0.14	96	*											
0.15	80	*											
0.16	72	*											
0.16	2	*	*	*									
0.16	56	*	*	*									
0.18	48	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

**Figura 3.15.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALP en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	120	0	216	168	96	12	80	24	72	48	2	56
0.10	120												
0.12	0												
0.12	216												
0.12	168												
0.17	96	*	*	*	*								
0.17	12	*	*	*	*								
0.18	80	*	*	*	*								
0.19	24	*	*	*	*								
0.20	72	*	*	*	*								
0.21	48	*	*	*	*	*							
0.21	2	*	*	*	*	*	*						
0.22	56	*	*	*	*	*	*	*					

**Figura 3.16.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALP en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad  $\gamma$ -GT Músculo****Tabla 3.9.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad  $\gamma$ -GT en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

$\gamma$ -GT	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.0009	0.0001	0.1607
<b>Error</b>	60	0.0289	0.0005	(p=0.9989)
<b>0.63 mg/L</b>	11	0.0318	0.0029	6.0492
<b>Error</b>	60	0.0287	0.0005	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	0.0421	0.0038	5.1361
<b>Error</b>	60	0.0447	0.0007	(p<0.0001)

Media	Grupo	120	168	0	24	216	96	12	80	2	56	72	48
0.12	120												
0.12	168												
0.13	0												
0.13	24												
0.14	216												
0.15	96												
0.16	12	*	*	*	*								
0.16	80	*	*	*	*								
0.17	2	*	*	*	*	*							
0.17	56	*	*	*	*	*	*						
0.18	72	*	*	*	*	*	*	*					
0.18	18	*	*	*	*	*	*	*	*				

**Figura 3.17.** Resultado del Test de Duncan para la actividad  $\gamma$ -GT en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	24	72	12	120	80	168	96	216	2	48	56
0.13	0												
0.16	24												
0.16	72												
0.16	12	*											
0.17	120	*											
0.18	80	*											
0.18	168	*											
0.18	96	*											
0.18	216	*											
0.20	2	*	*	*	*								
0.21	48	*	*	*	*								
0.22	56	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 3.18.** Resultado del Test de Duncan para la actividad  $\gamma$ -GT en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad LDH Músculo****Tabla 3.10.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad LDH en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

LDH	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	324.3471	29.4861	0.0810
<b>Error</b>	60	21840.9253	364.0154	(p=1.0000)
<b>0.63 mg/L</b>	11	28326.0436	2575.0949	8.5218
<b>Error</b>	60	18130.6384	302.1773	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	72987.2147	6635.2013	14.9289
<b>Error</b>	60	26667.2189	444.4536	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	216	168	2	12	80	96	120	24	48	56	72
118.17	0												
118.23	216												
138.26	168												
148.97	2	*	*										
153.90	12	*	*										
156.17	80	*	*										
156.56	96	*	*										
159.49	120	*	*										
161.32	24	*	*	*									
162.89	48	*	*	*									
172.21	56	*	*	*									
191.26	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 3.19.** Resultado del Test de Duncan para la actividad LDH en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	2	12	56	24	120	48	168	72	80	96	216
116.75	0												
123.93	2												
126.13	12												
160.74	56	*	*	*									
162.93	24	*	*	*									
172.49	120	*	*	*									
183.71	48	*	*	*									
188.15	168	*	*	*	*								
193.06	72	*	*	*	*	*							
197.71	80	*	*	*	*	*	*						
202.25	96	*	*	*	*	*	*	*					
217.85	216	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

**Figura 3.20.** Resultado del Test de Duncan para la actividad LDH en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Contenido Calórico Músculo (CC)**

**Tabla 3.11.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido calórico en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

CC	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	234430.2	21311.8	0.2641
<b>Error</b>	60	4840898.1	80681.6	(p=0.9901)
<b>0.63 mg/L</b>	11	17379411.81	1579946.6	26.7385
<b>Error</b>	60	3545334.2	59088.9	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	13662993.7	1242090.3	20.2757
<b>Error</b>	60	3675605.4	61260.1	(p<0.0001)

Media	Grupo	9	8	6	11	10	7	3	5	1	4	2	0
654.67	9												
698.60	8												
912.83	6												
969.82	11	*											
1054.67	10	*	*										
1086.93	7	*	*										
1501.05	3	*	*	*	*	*	*						
1517.92	5	*	*	*	*	*	*						
1731.38	1	*	*	*	*	*	*						
1878.93	4	*	*	*	*	*	*	*	*				
1889.27	2	*	*	*	*	*	*	*	*				
2204.67	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 3.21.** Resultado del Test de Duncan para el contenido calórico en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	11	6	10	7	9	4	8	5	3	1	2	0
706.12	11												
815.40	6												
913.82	10												
1066.08	7	*											
1182.82	9	*	*										
1195.35	4	*	*										
1198.82	8	*	*										
1353.58	5	*	*	*									
1637.42	3	*	*	*	*	*	*	*					
1668.57	1	*	*	*	*	*	*	*	*				
1795.85	2	*	*	*	*	*	*	*	*				
2277.83	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 3.22.** Resultado del Test de Duncan para el contenido calórico en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

### Contenido Hídrico Músculo

**Tabla 3.12.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en agua en la musculatura esquelética de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Cont. Hídrico	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.0514	0.0047	0.4582
<b>Error</b>	60	0.6121	0.0102	(p=0.9214)
<b>0.63 mg/L</b>	11	0.4276	0.0389	4.1103
<b>Error</b>	60	0.5675	0.0095	(p<0.0005)
<b>3.16 mg/L</b>	11	0.8979	0.0816	6.2684
<b>Error</b>	60	0.7813	0.0130	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	48	2	72	24	216	56	168	120	80	12	96
0.19	0												
0.26	48												
0.27	2												
0.31	72												
0.32	24	*											
0.34	216	*											
0.37	56	*											
0.39	168	*	*										
0.41	120	*	*	*									
0.42	80	*	*	*									
0.44	12	*	*	*	*								
0.45	96	*	*	*	*								

**Figura 3.23.** Resultado del Test de Duncan para el contenido en agua en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	56	2	24	80	72	168	48	216	120	96	12
0.20	0												
0.43	56	*											
0.44	2	*											
0.49	24	*											
0.52	80	*											
0.53	72	*											
0.53	168	*											
0.53	48	*											
0.56	216	*											
0.57	120	*											
0.63	96	*	*	*									
0.65	12	*	*	*	*								

**Figura 3.24.** Resultado del Test de Duncan para el contenido en agua en la musculatura esquelética de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

## 8.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL CEREBRO

### Glucosa Cerebro

**Tabla 4.1.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucosa en el cerebro de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Glucosa	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	0.0122	0.0011	0.2282
Error	60	0.2925	0.0049	(p=0.9947)
0.63 mg/L	11	2.6634	0.2421	13.1764
Error	60	1.1025	0.0184	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	2.1695	0.1972	26.5936
Error	60	0.445	0.0074	(p<0.0001)

Media	Grupo	2	12	120	168	216	24	96	80	0	48	56	72
0.23	2												
0.27	12												
0.32	120												
0.32	168												
0.40	216	*											
0.43	24	*											
0.44	96	*											
0.50	80	*	*	*	*								
0.57	0	*	*	*	*								
0.66	48	*	*	*	*	*	*	*					
0.73	56	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
0.90	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 4.1.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucosa en el cerebro de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	2	168	216	12	120	24	96	72	80	0	56	48
0.13	2												
0.19	168												
0.20	216												
0.21	12												
0.22	120												
0.27	24	*											
0.32	96	*	*	*	*								
0.38	72	*	*	*	*	*	*						
0.39	80	*	*	*	*	*	*						
0.40	0	*	*	*	*	*	*						
0.59	56	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
0.75	48	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 4.2.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucosa en el cerebro de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Lactato Cerebro****Tabla 4.2.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de lactato en el cerebro de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Lactato	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.2777	0.0252	1.2610
<b>Error</b>	60	1.2013	0.02	(p=0.2691)
<b>0.63 mg/L</b>	11	5.8247	0.5295	20.1661
<b>Error</b>	60	1.5755	0.0263	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	12.0179	1.0925	42.3686
<b>Error</b>	60	1.5472	0.0258	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	216	120	168	2	96	80	72	24	56	48	12
1.09	0												
1.48	216	*											
1.49	120	*											
1.49	168	*											
1.65	2	*											
1.67	96	*											
1.74	80	*	*	*	*								
1.75	72	*	*	*	*								
1.87	24	*	*	*	*	*	*						
2.01	56	*	*	*	*	*	*	*	*				
2.09	48	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
2.13	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 4.3.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de lactato en el cerebro de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	168	120	96	80	216	48	2	56	12	72	24
1.01	0												
1.59	168	*											
1.67	120	*											
1.71	96	*											
1.87	80	*	*	*									
1.99	216	*	*	*	*								
2.08	48	*	*	*	*	*							
2.13	2	*	*	*	*	*							
2.26	56	*	*	*	*	*	*						
2.33	12	*	*	*	*	*	*	*	*				
2.34	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
2.58	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 4.4.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de lactato en el cerebro de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Proteínas Totales Cerebro****Tabla 4.3.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas totales en el cerebro de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Proteínas Totales	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	232.8647	211695	0.4859
<b>Error</b>	60	2614.1431	43.5691	(p=0.9049)
<b>0.63 mg/L</b>	11	11013.0826	1001.1893	12.2521
<b>Error</b>	60	4902.9356	81.7156	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	9690.7413	880.9765	14.6385
<b>Error</b>	60	3610.9208	60.182	(p<0.0001)

Media	Grupo	72	80	216	56	168	120	96	48	0	2	12	24
37.32	72												
43.55	80												
46.46	216												
46.80	56												
47.82	168												
52.84	120	*											
54.64	96	*											
58.88	48	*	*	*	*								
67.11	0	*	*	*	*	*	*	*					
68.21	2	*	*	*	*	*	*	*					
74.29	12	*	*	*	*	*	*	*	*				
77.51	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

**Figura 4.5.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de proteínas totales en el cerebro de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	216	96	72	80	168	120	24	48	2	56	0	12
29.67	216												
30.67	96												
43.61	72	*	*										
43.88	80	*	*										
47.78	168	*	*										
49.79	120	*	*										
52.26	24	*	*										
54.13	48	*	*	*	*								
54.53	2	*	*	*	*								
56.37	56	*	*	*	*								
67.11	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
69.21	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 4.6.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de proteínas totales en el cerebro de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.



**Actividad ALP Cerebro****Tabla 4.4.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad ALP en el cerebro de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

ALP	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	0.1129	0.0103	0.1452
Error	60	4.2407	0.0707	(p=0.9993)
0.63 mg/L	11	3.0712	0.2792	3.2229
Error	60	5.1978	0.0866	(p<0.005)
3.16 mg/L	11	3.8933	0.3539	5.0232
Error	60	4.2277	0.0705	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	56	48	72	120	216	96	80	24	168	2	12
1.61	0												
1.77	56												
1.87	48												
1.91	72												
1.95	120												
1.96	216												
2.01	96	*											
2.05	80	*											
2.07	24	*											
2.10	168	*											
2.21	2	*	*										
2.46	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 4.7.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALP en el cerebro de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	24	2	216	48	56	96	168	80	120	72	12
1.64	0												
1.84	24												
1.94	2												
1.98	216	*											
2.09	48	*											
2.17	56	*											
2.17	96	*											
2.19	168	*											
2.21	80	*	*										
2.30	120	*	*	*									
2.31	72	*	*	*									
2.57	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 4.8.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALP en el cerebro de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad LDH Cerebro****Tabla 4.5.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad LDH en el cerebro de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

LDH	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	209.8782	19.0798	0.8445
<b>Error</b>	60	1355.5331	22.5922	(p=0.5973)
<b>0.63 mg/L</b>	11	593.5927	53.963	2.8285
<b>Error</b>	60	1144.6918	19.0782	(p<0.005)
<b>3.16 mg/L</b>	11	5042.7513	458.4319	20.9977
<b>Error</b>	60	1309.9464	21.8324	(p<0.0001)

Media	Grupo	56	0	12	168	96	72	120	24	80	2	48	216
16.58	56												
17.68	0												
19.59	12												
20.20	168												
20.22	96												
21.59	72												
21.68	120												
22.69	24	*											
23.78	80	*	*										
24.54	2	*	*										
24.84	48	*	*										
26.65	216	*	*	*	*	*							

**Figura 4.9.** Resultado del Test de Duncan para la actividad LDH en el cerebro de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	96	120	168	0	80	216	2	72	56	24	12	48
13.95	96												
14.75	120	*	*										
20.30	168	*	*										
20.81	0	*	*										
21.15	80	*	*										
26.59	216	*	*	*	*	*							
30.83	2	*	*	*	*	*							
33.09	72	*	*	*	*	*	*						
35.64	56	*	*	*	*	*	*	*					
35.90	24	*	*	*	*	*	*	*	*				
36.21	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
37.61	48	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 4.10.** Resultado del Test de Duncan para la actividad LDH en el cerebro de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

## 8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA BRANQUIA

### Lactato Branquia

**Tabla 5.1.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de lactato en la branquia de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Lactato	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	0.0167	0.0015	0.3176
Error	60	0.286	0.0048	(p=0.9792)
0.63 mg/L	11	2.653	0.2412	13.7619
Error	60	1.0515	0.0175	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	4.0354	0.3669	23.4806
Error	60	0.9374	0.0156	(p<0.0001)

Media	Grupo	216	120	96	168	0	2	80	48	72	56	12	24
0.42	216												
0.42	120	*											
0.43	96	*											
0.48	168	*											
0.51	0	*											
0.68	2	*											
0.70	80	*	*	*	*								
0.82	48	*	*	*	*								
0.83	72	*	*	*	*	*	*						
0.83	56	*	*	*	*	*	*	*	*				
0.92	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
0.93	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 5.1.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de lactato en la branquia de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	120	0	168	48	216	96	2	80	72	56	12	24
0.40	120												
0.46	0												
0.48	168												
0.60	48	*											
0.63	216	*	*										
0.67	96	*	*	*									
0.75	2	*	*	*									
0.80	80	*	*	*	*	*							
0.80	72	*	*	*	*	*							
0.83	56	*	*	*	*	*	*						
0.92	12	*	*	*	*	*	*	*					
1.32	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 5.2.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de lactato en la branquia de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Proteínas Totales Branquia****Tabla 5.2.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas totales en la branquia de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Proteínas Totales	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	57.0977	5.1907	0.1183
Error	60	2631.6435	43.8607	(p=0.9997)
0.63 mg/L	11	8948.1516	813.4683	16.6012
Error	60	2940.0307	49.0005	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	9982.5506	907.5046	19.5593
Error	60	2783.8612	46.3977	(p<0.0001)

Media	Grupo	120	216	168	80	96	56	2	48	72	24	12	0
36.07	120												
36.74	216												
41.57	168												
51.72	80	*	*	*									
52.76	96	*	*	*									
54.42	56	*	*	*									
55.42	2	*	*	*									
59.90	48	*	*	*									
60.66	72	*	*	*									
64.15	24	*	*	*	*	*	*						
67.75	12	*	*	*	*	*	*	*					
72.43	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

**Figura 5.3.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de proteínas totales en la branquia de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	96	216	120	168	80	2	48	72	56	12	24	0
37.34	96												
37.76	216												
41.08	120												
41.45	168												
41.92	80												
47.25	2	*	*										
53.33	48	*	*	*	*	*							
53.85	72	*	*	*	*	*							
55.96	56	*	*	*	*	*	*						
63.60	12	*	*	*	*	*	*	*	*				
65.88	24	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
75.47	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 5.4.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de proteínas totales en la branquia de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad ALP Branquia****Tabla 5.3.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad ALP en la branquia de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

ALP	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	0.0119	0.0011	0.3054
Error	60	0.2127	0.0035	(p=0.9821)
0.63 mg/L	11	0.4413	0.0401	9.7741
Error	60	0.2463	0.0041	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	0.6395	0.0581	14.9897
Error	60	0.2327	0.0039	(p<0.0001)

Media	Grupo	216	168	120	96	72	80	48	2	24	12	56	0
0.19	216												
0.20	168												
0.29	120	*	*										
0.33	96	*	*										
0.36	72	*	*										
0.38	80	*	*	*									
0.38	48	*	*	*									
0.40	2	*	*	*									
0.40	24	*	*	*									
0.40	12	*	*	*									
0.41	56	*	*	*									
0.44	0	*	*	*	*								

**Figura 5.5.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALP en la branquia de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	96	120	72	80	56	48	2	168	216	12	24	0
0.16	96												
0.17	120												
0.19	72												
0.20	80												
0.23	56												
0.26	48	*	*										
0.31	2	*	*	*	*	*							
0.33	168	*	*	*	*	*							
0.37	216	*	*	*	*	*	*						
0.39	12	*	*	*	*	*	*						
0.42	24	*	*	*	*	*	*	*	*				
0.43	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

**Figura 5.6.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALP en la branquia de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad LDH Branquia****Tabla 5.4.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad LDH en la branquia de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

LDH	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	71.432	6.4938	0.9028
<b>Error</b>	60	431.6002	7.1933	(p=0.5432)
<b>0.63 mg/L</b>	11	339.7771	30.8888	2.0828
<b>Error</b>	60	889.8234	14.8304	(p<0.05)
<b>3.16 mg/L</b>	11	237.1455	21.5587	1.3566
<b>Error</b>	60	953.5138	15.8919	p=0.2173

Media	Grupo	168	120	0	2	216	56	24	48	96	12	80	72
12.79	168												
13.42	120												
16.00	0												
16.08	2												
16.28	216												
16.94	56												
17.25	24												
17.45	48												
18.42	96												
18.70	12	*											
19.24	80	*	*										
20.68	72	*	*										

**Figura 5.7.** Resultado del Test de Duncan para la actividad LDH en la branquia de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	168	56	24	48	96	2	80	72	120	0	12	216
11.59	168												
12.22	56												
13.03	24												
13.38	48												
13.53	96												
14.20	2												
15.10	80												
15.21	72												
15.83	120												
16.00	0												
16.21	12												
18.19	216	*	*										

**Figura 5.8.** Resultado del Test de Duncan para la actividad LDH en la branquia de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

### Contenido Hídrico Branquia

**Tabla 5.5.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido en agua en la branquia de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Cont. Hídrico	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.0072	0.0007	0.8505
<b>Error</b>	60	0.0460	0.0008	(p=0.5917)
<b>0.63 mg/L</b>	11	0.2114	0.0192	4.5455
<b>Error</b>	60	0.2537	0.0042	(p<0.001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	0.3432	0.0312	4.4820
<b>Error</b>	60	0.4177	0.0070	(p<0.0005)

Media	Grupo	0	216	2	12	24	80	96	168	56	120	48	72
0.15	0												
0.16	216												
0.21	2												
0.23	12												
0.25	24												
0.26	80	*	*										
0.26	96	*	*										
0.27	168	*	*										
0.28	56	*	*	*									
0.28	120	*	*	*									
0.28	48	*	*	*									
0.34	72	*	*	*	*	*	*	*	*				

**Figura 5.9.** Resultado del Test de Duncan para el contenido en agua en la branquia de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	216	168	96	80	120	12	56	24	72	2	48
0.16	0												
0.18	216												
0.29	168	*	*										
0.29	96	*	*										
0.30	80	*	*										
0.30	120	*	*										
0.33	12	*	*										
0.34	56	*	*										
0.34	24	*	*										
0.36	72	*	*										
0.39	2	*	*										
0.39	48	*	*										

**Figura 5.10.** Resultado del Test de Duncan para el contenido en agua en la branquia de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

## 8.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL CORAZÓN

### Glucosa Corazón

**Tabla 6.1.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de glucosa en el corazón de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Glucosa	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	0.3565	0.0324	0.2588
Error	60	7.5134	0.1252	(p=0.9909)
0.63 mg/L	11	19.1689	1.7426	12.7744
Error	60	8.185	0.1364	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	14.1549	1.2868	10.8234
Error	60	7.1335	0.1189	(p<0.0001)

Media	Grupo	24	56	48	2	12	72	120	168	96	216	80	0
0.90	24												
1.20	56												
1.27	48												
1.55	2	*											
1.62	12	*											
2.00	72	*	*	*									
2.10	120	*	*	*	*	*							
2.18	168	*	*	*	*	*							
2.24	96	*	*	*	*	*							
2.30	216	*	*	*	*	*							
2.31	80	*	*	*	*	*							
2.64	0	*	*	*	*	*	*	*					

**Figura 6.1.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucosa en el corazón de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	24	48	12	96	80	120	2	56	168	216	72	0
1.11	24												
1.18	48												
1.33	12												
1.43	96												
1.65	80	*	*										
1.66	120	*	*										
1.80	2	*	*	*									
2.03	56	*	*	*	*								
2.06	168	*	*	*	*								
2.12	216	*	*	*	*	*	*						
2.22	72	*	*	*	*	*	*						
2.64	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 6.1.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de glucosa en el corazón de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.



**Lactato Corazón****Tabla 6.2.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de lactato en el corazón de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Lactato	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	0.3258	0.0296	0.4058
Error	60	4.3797	0.073	(p=0.9481)
0.63 mg/L	11	17.5834	1.5985	10.9044
Error	60	8.7955	0.1466	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	22.4651	2.0423	13.4590
Error	60	9.1045	0.1517	(p<0.0001)

Media	Grupo	2	0	24	120	168	96	216	80	12	72	48	56
1.67	2												
1.68	0												
1.90	24												
1.92	120												
1.93	168												
1.99	96												
2.05	216												
2.06	80												
2.45	12	*	*	*	*	*							
2.69	72	*	*	*	*	*	*	*	*				
3.12	48	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
3.14	56	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

**Figura 6.3.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de lactato en el corazón de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	168	80	120	2	12	96	216	72	24	56	48
1.74	0												
2.01	168												
2.25	80	*											
2.42	120	*											
2.44	2	*											
2.78	12	*	*	*									
3.00	96	*	*	*	*	*							
3.08	216	*	*	*	*	*							
3.25	72	*	*	*	*	*							
3.31	24	*	*	*	*	*	*						
3.36	56	*	*	*	*	*	*	*					
3.54	48	*	*	*	*	*	*	*	*				

**Figura 6.4.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de lactato en el corazón de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Proteínas Totales Corazón****Tabla 6.3.** Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de proteínas totales en el corazón de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

Proteínas Totales	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	125.152	11.3775	0.0947
Error	60	7205.335	120.0889	(p=0.9999)
0.63 mg/L	11	37420.7876	3401.8898	3.4513
Error	60	59140.3632	985.6727	(p<0.005)
3.16 mg/L	11	10138.8252	921.7114	3.739
Error	60	14790.6073	246.5101	(p<0.0005)

Media	Grupo	120	2	168	216	96	0	80	12	24	48	56	72
106.56	120												
114.78	2												
117.60	168												
121.24	216												
127.74	96												
131.47	0												
132.30	80												
133.30	12												
144.10	24												
154.49	48	*											
172.82	56	*	*	*	*	*	*	*	*				
185.98	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*			

**Figura 6.5.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de proteínas totales en el corazón de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	2	12	24	80	48	72	120	56	216	0	168	96
70.64	2												
78.42	12												
87.40	24												
98.46	80	*	*										
101.35	48	*	*										
101.81	72	*	*										
102.18	120	*	*										
102.42	56	*	*										
104.30	216	*	*										
104.60	0	*	*										
107.51	168	*	*										
112.51	96	*	*	*									

**Figura 6.6.** Resultado del Test de Duncan para el contenido de proteínas totales en el corazón de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad ALT Corazón****Tabla 6.4.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad ALT en el corazón de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

ALT	G.L.	S.C.	C.M.	F
Control	11	0.3776	0.0343	0.3288
Error	60	6.2648	0.1044	(p=0.9762)
0.63 mg/L	11	61.5637	5.5967	18.6654
Error	60	17.9907	0.2998	(p<0.0001)
3.16 mg/L	11	87.6764	7.9706	45.327
Error	60	10.5508	0.1758	(p<0.0001)

Media	Grupo	168	0	216	96	120	80	12	24	2	48	56	72
1.67	168												
1.82	0												
1.87	216												
2.02	96												
2.36	120												
3.33	80	*	*	*	*	*							
3.48	12	*	*	*	*	*							
3.50	24	*	*	*	*	*							
3.59	2	*	*	*	*	*							
3.82	48	*	*	*	*	*							
4.08	56	*	*	*	*	*	*						
4.29	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 6.7.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALT en el corazón de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	120	96	168	2	12	216	24	80	72	48	56
1.55	0												
1.59	120												
1.78	96												
2.12	168	*	*										
2.55	2	*	*	*									
2.91	12	*	*	*	*								
2.98	216	*	*	*	*								
3.24	24	*	*	*	*	*							
3.33	80	*	*	*	*	*							
4.57	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
4.62	48	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
4.67	56	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 6.8.** Resultado del Test de Duncan para la actividad ALT en el corazón de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

**Actividad  $\gamma$ -GT Corazón**

**Tabla 6.5.** Análisis de la varianza (ANOVA) para la actividad  $\gamma$ -GT en el corazón de la anguila *A. anguilla* a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos.

$\gamma$ -GT	G.L.	S.C.	C.M.	F
<b>Control</b>	11	0.0027	0.0002	0.4487
<b>Error</b>	60	0.0329	0.0005	(p=0.9267)
<b>0.63 mg/L</b>	11	0.0408	0.0037	7.9053
<b>Error</b>	60	0.0282	0.0005	(p<0.0001)
<b>3.16 mg/L</b>	11	0.1084	0.0099	13.7689
<b>Error</b>	60	0.0429	0.0007	(p<0.0001)

Media	Grupo	0	48	216	12	120	96	72	56	80	24	2	168
0.11	0												
0.13	48												
0.13	216												
0.14	12	*											
0.15	120	*											
0.15	96	*											
0.15	72	*											
0.16	56	*	*										
0.16	80	*	*										
0.17	24	*	*	*									
0.17	2	*	*	*									
0.21	168	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

**Figura 6.9.** Resultado del Test de Duncan para la actividad  $\gamma$ -GT en el corazón de la anguila expuesta a 0.63 mg/L de propanil.

Media	Grupo	0	216	2	12	56	24	120	96	168	48	72	80
0.11	0												
0.13	216												
0.13	2												
0.14	12												
0.15	56	*											
0.15	24	*											
0.17	120	*	*	*									
0.20	96	*	*	*	*	*	*						
0.20	168	*	*	*	*	*	*	*					
0.21	48	*	*	*	*	*	*	*	*				
0.21	72	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
0.23	80	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

**Figura 6.10.** Resultado del Test de Duncan para la actividad  $\gamma$ -GT en el corazón de la anguila expuesta a 3.16 mg/L de propanil.

