

VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL.LULAR, BIOLOGIA
FUNCIONAL I ANTROPOLOGIA FÍSICA

Programa de Doctorado en Contaminación,
Toxicología y Sanidad Ambiental



“Efectos de piretroides utilizados para el control del piojo de mar en la práctica de la salmonicultura sobre invertebrados no diana”

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:
Diego Ortiz Cañete

Dirigida por:
Dra. Amparo Torreblanca Tamarit
Dra. Inmaculada Varó Vaello

Valencia, mayo 2019

Esta Tesis se acoge al Reglamento sobre depósito, evaluación y defensa de la Tesis Doctoral de la Universitat de València y ha sido realizada dentro del Programa de Doctorado en Contaminación, Toxicología y Sanidad Ambiental.

Memoria presentada por Diego Ortiz Cañete para optar al grado de Doctor por la Universitat de València.

Firmado: ***Diego Ortiz Cañete***

Valencia, 14 de marzo del 2018

TESIS DOCTORAL DIRIGIDA POR:

Dra. Amparo Torreblanca Tamarit

Catedrática de Fisiología

Facultad de Biología
Universitat de València

Dra. Inmaculada Varó Vaello

Científico Titular

Instituto de Acuicultura de
Torre de la Sal- CSIC

A la Memoria de Mi Madre...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi directora de Tesis, Dra. Amparo Torreblanca Tamarit y a mi Co-directora, Dra. Inmaculada Varó por aceptar ser las conductoras de este trabajo doctoral. A la Dra. Amparo Torreblanca en forma especial por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación facilitándome todas las herramientas e infraestructura para el término de esta investigación doctoral y a la vez por su aporte constante al trabajo investigativo y experiencia tanto en mi formación como su contribución al mismo. A la Dra. Inmaculada Varó por su experiencia entregada en el desarrollo y conducción de la tesis junto a su disposición a representar parte de la investigación en algunos congresos de importancia.

En forma muy especial un gran agradecimiento a la Dra. María Dolores Garcerá por su preocupación constante en todos nosotros y en la implementación de los laboratorios para llevar a cabo de la forma más óptima nuestros experimentos. Al Dr. José del Ramo y Dr. José Pertusa por su ayuda en todos los ámbitos técnicos que uno necesitaba, especialmente en el área informática.

Agradecimientos a aquellos compañeros de oficina y laboratorio, que de una manera u otra me han ayudado durante este tiempo al cumplimiento de los objetivos especialmente a Mariam, Bea, Mara, Amparo e Irene y todos aquellos que compartimos espacios comunes, por su constante colaboración y ayuda durante los 4 años de investigación.

Reconocimiento de forma muy especial a todo el grupo del Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física, especialmente recordando las inolvidables comidas realizadas todos los fines de año en Navidad.

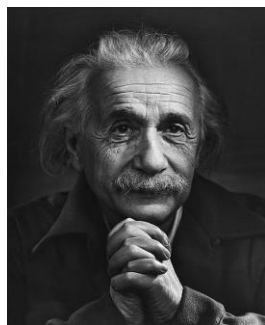
Quisiera de igual forma agradecer al Dr. Mario Sendra Piña, por su gran ayuda desinteresada en estadística aplicada para la ejecución correcta en el análisis de información. Al Dr. Iker Uriarte Merino, quien fue uno de los gestores que apoyaron a que yo ganara esta Beca de Doctorado.

Agradecimientos a la Universidad de Valencia, la Facultad de Biología y en especial al Dpto. de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física que permitieron el desarrollo de este proyecto Doctoral gracias a la infraestructura facilitada. Agradecimiento a Becas Chile, Organización de Capital Humano Avanzado del Gobierno de Chile, Institución que financió durante 4 años mi estadía y plan de Doctorando.

Agradecimientos a Mi Nana Mary, quien siempre me apoyó directamente para ir perfeccionándome cada vez más en mis estudios. A mi primo Enrique por su ayuda y gestiones. Por último, quisiera agradecer a Todas aquellas personas e Instituciones que directamente o indirectamente colaboraron para el buen término de este trabajo.

*Educación es lo que queda después de olvidar lo que se ha
aprendido en la escuela.*

“La alegría de ver y entender es el más perfecto don de la naturaleza”



Albert Einstein (1879-1955)

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada gracias a fondos del Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física de la Universitat de València y a la Beca de Doctorado de Capital Humano Avanzado Becas Chile, otorgada al Doctorando por el Ministerio de Educación del Gobierno de Chile (CONICYT).

RESUMEN

En la actualidad el mayor problema que enfrenta la industria salmonera a nivel mundial es la alta proliferación y diseminación del piojo de mar, un copépodo ectoparásito que alcanza altas densidades poblacionales en los centros de cultivo intensivo de salmónidos. Los insecticidas piretroides cipermetrina y deltametrina se han estado utilizado para bajar las cargas parasitarias mediante tratamientos periódicos. Los organismos marinos no diana pueden estar expuestos a estos piretroides a través del agua, los sedimentos o la ingestión de partículas orgánicas contaminadas. Los moluscos bivalvos y los anélidos poliquetos han sido ampliamente utilizados como organismos centinela de contaminación por su amplia distribución geográfica y representatividad de los compartimentos que habitan (agua y sedimento). Los efectos tóxicos de los piretroides y su repercusión fisiológica se pueden determinar en estos organismos no diana mediante biomarcadores de contaminación a través de alteraciones cuantificables de algunas actividades enzimáticas. Por otro lado, y en un contexto de calentamiento global, y especialmente cuando se estudian animales ectotermos, la temperatura del agua es un factor importante que puede afectar la toxicidad de los piretroides. El objetivo de esta Tesis ha sido evaluar en el laboratorio los efectos de concentraciones ambientalmente realísticas de piretroides comúnmente utilizados en salmonicultura sobre invertebrados marinos no diana utilizando las actividades de las enzimas catalasa (CAT), glutatión transferasa (GST), acetilcolinesterasa (AChE) y carboxilesterasa (CbE) como biomarcadores y las especies *Mytilus galloprovincialis* y *Perinereis vancaurica* como organismos centinela.

El estudio de la influencia de la temperatura sobre la respuesta de los biomarcadores se ha llevado a cabo en *M. galloprovincialis* aclimatados durante una semana a 17 °C, 22 °C y 27 °C y posteriormente expuestos en un sistema semi-estático a 15 µg/l y 25 µg/l de cipermetrina utilizando acetona como disolvente. La actividad catalasa (CAT) en las branquias se vió significativamente modificada por la exposición de los individuos al piretroide mostrando un incremento inicial (24 horas a 22 °C), y una inhibición posterior a las 96 horas de exposición. La determinación de la CAT en las branquias de mejillones aclimatados a 17 °C, 22 °C y 27 °C a una temperatura normalizada (25 °C) y a las temperaturas de aclimatación evidenció una compensación térmica total en esta enzima.

La exposición a cipermetrina incrementó las actividades musculares de las enzimas catalasa (CAT), carboxilesterasa (CbE) y glutatión transferasa (GST) en forma dependiente de la temperatura de aclimatación.

Se evaluó el efecto de la exposición aguda (24 y 96 h) a cipermetrina (15 µg/l) y deltametrina (3µg/l) utilizando como biomarcador las actividades de las enzimas CAT, GST, AChE y CbE presentes en la cabeza y el cuerpo del poliqueto *P. vancaurica*. Las actividades de las enzimas se ven alteradas tras exposición a los piretroides cipermetrina y deltametrina, siendo la cabeza el órgano más sensible y la deltametrina el piretroide que provocó mayores efectos.

El gusano poliqueto *P. vancaurica*, organismo marino bentónico, resultó ser más sensible que el molusco bivalvo *M. galloprovincialis*, representante de procesos ocurridos en la columna de agua, en cuanto a la respuesta de los biomarcadores seleccionados frente a la presencia de cipermetrina a concentraciones ambientalmente realísticas en el contexto de las prácticas de la salmonicultura.

ABSTRACT

At present, the biggest problem facing the salmon industry worldwide is the high proliferation and spread of sea lice, an ectoparasite copepod that reaches high population densities in marine intensive salmon farming. The pyrethroid insecticides cypermethrin and deltamethrin have been used to lower parasitic loads through periodic treatments. Non-target marine organisms can be exposed to these pyrethroids through water, sediments or by ingestion of contaminated organic particles. Bivalve mollusks and polychaete annelids have been widely used as sentinel organisms of contamination because of their wide geographical distribution and representativeness of compartments (water and sediment) that they inhabit. The toxic effects of pyrethroids and their physiological repercussion can be determined in these non-target organisms by means of contamination biomarkers through quantifiable alterations of some enzymatic activities. On the other hand, and in a global warming context, and especially when ectothermal animals are studied, water temperature is an important factor that can affect pyrethroids toxicity. The objective of this thesis has been to evaluate in the laboratory the effects of environmentally realistic concentrations of pyrethroids commonly used in salmon farming on non-target marine invertebrates with the activities of the enzymes catalase (CAT), glutathione transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE) and carboxylesterase (CbE) as biomarkers utilizing the species *Mytilus galloprovincialis* and *Perinereis vancaurica* as sentinel organisms.

The temperature influence on the biomarkers response has been carried out in *M. galloprovincialis* acclimated for one week at 17 °C, 22 °C and 27 °C and subsequently exposed in a semi-static system to 15 µg /l and 25 µg /l of cypermethrin using acetone as solvent. The catalase activity was significantly modified in gills of individuals exposed to the pyrethroid, showing an initial increase (24 hours at 22 °C) and a subsequent inhibition after 96 hours of exposure. CAT activity in gills from mussels acclimated at 17 °C, 22 °C and 27 °C measured at a normalized temperature (25 °C) and at acclimation temperature showed a total thermal compensation of this enzyme. Cypermethrin exposure increased the muscle activities of the enzymes catalase (CAT), carboxylesterase (CbE) and glutathione transferase (GST) that depends on the temperature acclimatization.

The acute exposure effect (24 and 96 h) to cypermethrin (15 µg/l) and deltamethrin (3µg/ l) was evaluated in the head and in the body of the worm *P. vancaurica* using the activities of CAT, GST, AChE and CbE as biomarkers. The enzymes activities were modified after exposure to cypermethrin and deltamethrin, with the head being the most sensitive organ and deltamethrin the pyrethroid insecticide that produced the greatest changes.

The marine benthic polychaete worm *P. vancaurica* proved to be more sensitive to pyrethroids than mollusk bivalve *M. galloprovincialis*, representative of processes occurring in the water column, in terms of its responses of the selected biomarkers against the presence of cypermethrin at environmentally realistic concentrations in the context of salmon farming practices.

ÍNDICE

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Salmonicultura y el problema de la parasitación por el piojo de mar.....	3
1.2. Características de los tratamientos en las jaulas, formulaciones y principios activos utilizados	3
1.3. Tratamientos mediante piretroides: cipermetrina y deltametrina.....	4
1.4. Impacto de los pesticidas sobre los ecosistemas: empleo de organismos centinela para su monitorización	6
1.4.1. <i>Mytilus galloprovincialis</i>	8
1.4.2. <i>Perinereis vancaurica</i>	10
1.5. Bioensayos y Biomarcadores.....	12
1.6. Biomarcadores enzimáticos utilizados.....	13
1.6.1. Catalasa (CAT).....	13
1.6.2. Glutación-S-transferasa (GST).....	14
1.6.3. Esterasas.....	14
1.7. Influencia de la temperatura sobre la respuesta de las actividades enzimáticas a la exposición a piretroides.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Efectos de la cipermetrina en <i>M. galloprovincialis</i> : mantenimiento y aclimatación de los ejemplares.....	23
3.2. Preparación de muestras biológicas y análisis enzimáticos.....	23
3.2.1. Medición de proteína total.....	24
3.2.2. Determinación de Catalasa (CAT).....	24
3.2.3. Determinación de Glutación-S-Transferasa (GST).....	25

3.2.4. Determinación de Acetilcolinesterasa (AChE).....	25
3.2.5. Determinación de Carboxilesterasa (CbE).....	26
3.3. Respuestas en las actividades enzimáticas en <i>M. galloprovincialis</i> expuestos a cipermetrina y mantenidos a diferentes temperaturas.....	26
3.3.1. Experimento I: Respuestas en branquias.....	26
3.3.1.1. Diseño experimental y exposición a cipermetrina.....	26
3.3.1.2. Análisis enzimáticos.....	28
3.3.2. Experimento II: Estudio de la existencia de compensación térmica en la actividad enzimática de CAT y GST en branquias de <i>M. galloprovincialis</i> expuestos a cipermetrina y mantenidos a diferentes temperaturas.....	28
3.3.3. Experimento III: Respuestas en músculo abductor.....	29
3.3.4 Análisis estadísticos.....	30
3.4. Efectos de la cipermetrina y la deltametrina en el poliqueto <i>Perinereis vancaurica</i>	31
3.4.1. Mantenimiento y aclimatación de los organismos experimental.....	31
3.4.2. Diseño experimental y exposición a piretroides.....	31
3.4.3. Análisis enzimáticos.....	32
3.4.4 Análisis estadísticos.....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1. Respuestas en <i>M. galloprovincialis</i> expuestos a cipermetrina a diferentes temperaturas.....	37
4.1.1 Experimento I: Respuesta fisiológica en branquias de <i>M. galloprovincialis</i> expuestos a cipermetrina a diferentes temperaturas.....	37
4.1.1.1. Catalasa	40

4.1.1.2. Glutación-S-transferasa.....	45
4.1.1.3. Acetilcolinesterasa.....	46
4.1.1.4. Carboxilesterasa.....	48
4.1.2. Compensación térmica en la actividad de enzimas antioxidantes en branquias de <i>M. galloprovincialis</i> expuestos a cipermetrina.....	49
4.1.2.1. Catalasa.....	51
4.1.2.2. Glutación-S-transferasa.....	52
4.1.3. Efecto de la temperatura sobre biomarcadores de exposición en músculo de <i>M. galloprovincialis</i> expuestos a cipermetrina.....	54
4.1.3.1. Catalasa.....	56
4.1.3.2. Glutación-S-transferasa.....	57
4.1.3.3. Acetilcolinesterasa.....	59
4.1.3.4. Carboxilesterasa.....	59
4.1.3.5. Principales correlaciones entre biomarcadores.....	60
4.2. Efectos de la cipermetrina y la deltametrina en el poliqueto <i>Perinereis vancaurica</i>	61
4.2.1. Catalasa.....	64
4.2.2. Glutación-S-transferasa.....	65
4.2.3. Acetilcolinesterasa.....	66
4.2.4. Carboxilesterasa.....	68
4.2.5. Correlaciones entre las actividades enzimáticas.....	70
4.3. Discusión general.....	71
5. CONCLUSIONES.....	75
6. BIBLIOGRAFÍA.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1.- Concentración Letal de cipermetrina para el 50% en diferentes animales acuáticos.....7

Tabla 1.2.- Concentración Letal de deltametrina para el 50% en diferentes animales acuáticos.....8

*Tabla 1.3.- Clasificación Taxonómica del mitílido *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819).....9*

*Tabla 1.4. Clasificación Taxonómica del anélido poliqueto *Perinereis vancaurica* (Ehlers, 1868).....11*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Tabla 4.1.- Anova de 3 factores (concentración de cipermetrina (C), tiempo de exposición (t), temperatura (T^a)) y sus interacciones de las actividades enzimáticas en branquias *M. galloprovincialis*.....38*

*Tabla 4.2.- Análisis post hoc, de las actividades enzimáticas para diferentes niveles entre los factores y sus interacciones en branquias de *M. galloprovincialis*.....39*

Tabla 4.3.- Efectos sobre biomarcadores provocados por piretroides en moluscos bivalvos43

Tabla 4.4.- Efectos sobre biomarcadores provocados por temperatura y/o diferentes agentes estresantes en moluscos bivalvos.....44

Tabla 4.5.- Anova de dos factores: concentración de cipermetrina, temperatura y efecto de su interacción sobre los biomarcadores medidos a temperatura normalizada y temperatura real.....50

Tabla 4.6.- Anova de 2 factores (concentración de cipermetrina (C) y temperatura (T^a)) y sus interacciones de las actividades enzimáticas en músculo abductor de M. galloprovincialis.....55

Tabla 4.7.- Análisis post hoc de las actividades enzimáticas para diferentes niveles entre los factores y sus interacciones en músculo abductor de M. galloprovincialis.....55

Tabla 4.8.- Matriz de correlación de Pearson (coeficiente r de producto-momento) de las actividades determinadas en el músculo abductor de M. galloprovincialis.....60

Tabla 4.9.- ANOVA de 2 factores (tipo de piretroide, tiempo de exposición (t)) y su interacción de las actividades enzimáticas en la cabeza de P. vancaurica.....62

Tabla 4.10.- ANOVA de 2 factores (tipo de piretroide, tiempo de exposición (t)) y su interacción de las actividades enzimáticas en el cuerpo de P. vancaurica.....62

Tabla 4.11.- Análisis post hoc, con su respectiva significación estadística de las actividades enzimáticas para los diferentes niveles entre los factores y sus interacciones en la cabeza del P. vancaurica.....63

Tabla 4.12.- Análisis post hoc, con su respectiva significación estadística de las actividades enzimáticas para los diferentes niveles entre los factores y sus interacciones en el cuerpo del P. vancaurica.....63

Tabla 4.13.- Matriz de correlación de Pearson (coeficiente r de producto-momento) en las actividades determinadas en cabeza y cuerpo de P. vancaurica.70

Tabla 4.14.- Resumen de todos los biomarcadores y factores medidos en los experimentos realizados en M. galloprovincialis y P. vancaurica ordenados por tejido.....71

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.1.- Estructura molecular de la deltametrina..... 5

Figura 1.2.- Estructura molecular de la cipermetrina..... 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 4.1.- Actividad CAT en las branquias de M. galloprovincialis expuestos a cipermetrina.....40

Figura 4.2.- Actividad GST en las branquias de M. galloprovincialis expuestos a cipermetrina.....45

Figura 4.3.- Actividad AChE en las branquias de M. galloprovincialis expuestos a cipermetrina.....47

Figura 4.4.- Actividad CbE en las branquias de M. galloprovincialis expuestos a cipermetrina.....48

Figura 4.5.- Actividad CAT en las branquias de M. gallopronvicialis aclimatados a tres temperaturas y determinada a temperatura normalizada (25 °C) y temperatura real (aclimatación).....51

Figura 4.6.- Actividad CAT en las branquias de M. gallopronvicialis aclimatados a tres temperaturas y expuestos a cipermetrina. Actividad determina a temperatura normalizada (25 °C) y temperatura real.....52

Figura 4.7.- Actividad GST en las branquias de M. gallopronvicialis aclimatados a tres temperaturas y determinada a temperatura normalizada (25 °C) y temperatura real (aclimatación).....53

Figura 4.8.- Compensación parcial de la temperatura en branquias de M. galloprovincialis para la actividad GST por tratamientos.....53

Figura 4.9.- Actividad CAT en el músculo abductor de M. galloprovincialis expuestos a cipermetrina durante 96 h y a diferentes temperaturas de aclimatación.....57

Figura 4.10.- Actividad GST en músculo abductor del mejillón M. galloprovincialis expuestos a cipermetrina durante 96 h y a diferentes temperaturas de aclimatación.....58

Figura 4.11. Actividad CbE en músculo abductor del mejillón M. galloprovincialis expuestos a cipermetrina durante 96 h y a diferentes temperaturas de aclimatación.....60

Figura 4.12.- Actividad de la enzima CAT en la cabeza y el cuerpo de P. vancaurica después de la exposición durante 24 y 96 h a diferentes piretroides (cipermetrina y deltametrina).....65

Figura 4.13.- Actividad de la enzima GST en la cabeza y el cuerpo de P. vancaurica después de la exposición durante 24 y 96 h a diferentes piretroides (cipermetrina y deltametrina).....66

Figura 4.14.- Actividad de la enzima AChE en la cabeza y el cuerpo de P. vancaurica después de la exposición durante 24 y 96 h a diferentes piretroides (cipermetrina y deltametrina).....67

Figura 4.15.- Actividad de la enzima CbE en la cabeza y el cuerpo de P. vancaurica después de la exposición durante 24 y 96 h a diferentes piretroides (cipermetrina y deltametrina).....69

ABREVIATURAS

ACh: Yoduro de acetiltiocolina.

AChE: Acetilcolinesterasa.

ANOVA: Análisis de varianza.

AOX: Enzimas antioxidantes.

BSA: Albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumin).

CAT: Catalasa.

CbE: Carboxilesterasa.

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.

Conc.: Concentración.

DTNB: Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico.

EC₅₀: Concentración Efectiva del 50% (Half Maximal Effective Concentration).

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

g: Constante de gravitación universal.

GSH: Glutación Reducido.

GST: Glutación S-transferasa.

h: Horas.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

HSP: Proteínas de choque térmico.

KCl: Cloruro de potasio.

Kg.: Kilogramo.

K_m: Constante de Michaelis-Menten.

Km²: Kilómetros cuadrados.

LC₅₀: Concentración Letal que produce la mortalidad del 50% (Lethal Concentration).

LT₅₀: Tiempo Letal del 50% (Lethal Time).

l: Litros.

m: Metros

mg/l: Miligramo por litro.

mg/ml: Miligramo por mililitro.

min: Minutos.

mm: Milímetros.

mM: Milimolar.

N: Tamaño de la muestra total.

Na⁺: Ión sodio.

ng/l: Nanogramo por litro.

Ni: Niquel.

nm: Nanómetro.

n: Tamaño muestral por tratamiento experimental.

N: Número total de muestras de experimentación.

O₂⁻: Anión superóxido.

OH⁻: Radical hidroxilo.

p: Probabilidad estadística.

PI-PLC: Fosfatidilinositol-fosfolipasa específica C (Phosphatidylinositol-specific phospholipase C).

ROS: Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species).

S.E.M.: Error estándar.

S9: Fracción sobrenadante obtenido del centrifugado de un órgano.

SOD: Superóxido dismutasa.

t: Toneladas.

T_c: Temperatura crítica.

T^a: Temperatura.

Tp: Temperatura de pejus.

USEPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency).

ϵ : Coeficiente de extinción molar.

μmol : Micromolar.

$\mu\text{g/l}$: Microgramo por litro.

μl : Microlitro.

$^{\circ}\text{C}$: Grados Celsius.

€: Euros.

% w/w: Porcentaje peso en peso (% weight per weight).

% p/v: Porcentaje peso en volumen.

‰: Partes por mil.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Salmonicultura y el problema de la parasitación por el piojo de mar

La acuicultura es el sector de más rápido crecimiento de la industria pesquera y representará el 62% de la producción mundial de peces en 2030 (Informe del Banco Mundial, 2013). La acuicultura de salmónidos en el año 2014, con una producción total aproximada de 3.417.000 t. en todo el mundo, representa uno de los más importantes cultivos de peces marinos (FAO, 2016). Sin embargo, el cultivo de salmónidos en condiciones intensivas propicia las epidemias de enfermedades bacterianas, virales, parasitarias e infecciosas (Burridge et al., 2014). Una de las más importantes amenazas para esta industria a nivel mundial es la parasitación de los peces por el piojo de mar (*Lepeophtheirus salmonis* y *Caligus rogercresseyi*) (Hamilton et al., 2012). Estos copépodos ectoparásitos causan grandes pérdidas económicas a la industria (Yatabe et al., 2011) debido al efecto negativo sobre la salud de los peces, e indirectamente a los altos costes de tratamiento (Costello, 2009). El impacto económico ha sido recientemente cuantificado en Noruega como de una pérdida de 0,46 US por kg de biomasa cultivada, lo que representó unas pérdidas anuales de 436 millones de dólares en 2011 (Abolofia et al., 2017).

1.2. Características de los tratamientos en las jaulas, formulaciones y principios activos utilizados

En Noruega en 2014 se utilizaron varios tratamientos antiparasitarios que incluyen pesticidas de diferentes grupos como organofosforados (Azametifos), inhibidores de la síntesis de quitina (diflubenzurón y teflubenzurón) y piretroides (cipermetrina y deltametrina) (NVI, 2013); mientras que en Chile el control de los piojos de mar se realizó en gran medida en uso los piretroides sintéticos (Arriagada et al., 2014), aunque se está produciendo un cambio hacia el uso de azametifos como producto principal. Los pesticidas son administrados mediante baños en cada jaula individual con ayuda de lonas que rodean e impermeabilizan la jaula, para reducir el volumen de agua en el tratamiento y aumentar la eficiencia del tratamiento y de la aplicación de oxígeno durante el mismo. Estas lonas se retiran al final del tratamiento con la liberación de la solución insecticida en el agua circundante, que se dispersa en la dirección de flujo de corriente prevaleciente formando una pluma contaminante de piretroides que cubre una superficie de aproximadamente 1 km² alrededor de cada jaula (Ernst et al. 2001, Robertson et al., 2009). A partir de los datos

de Sernapesca (2012) y Sernapesca (2014), se puede estimar que en Chile en 2013 se derramó en el medio marino 943 Kg. de sustancia activa de los piretroides cipermetrina y deltametrina.

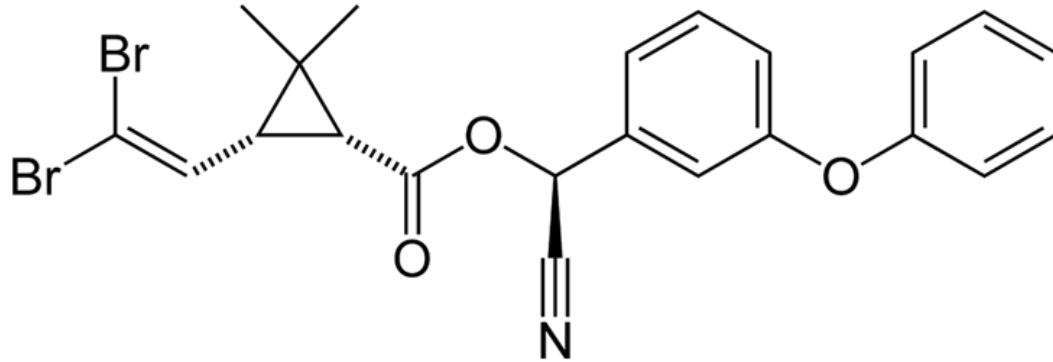
1.3. Tratamientos mediante piretroides: cipermetrina y deltametrina

El tratamiento recomendado contra los piojos de mar mediante piretroides en salmonicultura consiste en un baño de 30 min con 15 µg/l de cipermetrina, o de 40 min con 2,0 -3,0 µg/l de deltametrina (SEPA, 1998). Ambos piretroides son eficaces contra todos los estadios del ciclo de vida del piojo de mar, incluyendo los adultos. Los nombres con los que se comercializan los piretroides de uso en salmonicultura son AlphaMax® (deltametrina) y Excis® (cipermetrina). Aunque cada piretroide constituye el 1% de sus respectivas formulaciones, los disolventes, tensioactivos y otros productos que forman parte de su composición restantes no son públicos, lo cual puede hacer más complejos los estudios de toxicidad y de efectos al medioambiente. Por otra parte, el tratamiento periódico con piretroides a altas concentraciones ha generado un aumento de la resistencia del piojo de mar de la especie *L. salmonis* en Noruega (Sevatdal y Horsberg, 2003; Sevatdal et al., 2005) y de *C. rogercresseyi* en Chile (Arriagada et al., 2014).

Los piretroides son un grupo de pesticidas sintéticos desarrollados a principios de los años 1960 para mejorar la actividad insecticida y ser más persistentes que sus predecesores naturales, las piretrinas (Barthel, 1961). Las piretrinas son los componentes activos de un extracto de flores de crisantemo, mientras que los piretroides sintéticos se han desarrollado con el fin de mejorar la especificidad y la actividad de las piretrinas las cuales se descomponen fácilmente, ya que son susceptibles a enzimas catabólicas y a la luz solar. La baja degradabilidad y toxicidad para los mamíferos junto con su efectividad contra crustáceos propició el interés inicial en el uso de piretroides en el tratamiento de las infestaciones por piojos de mar.

La deltametrina y la cipermetrina son piretroides sintéticos tipo II que se sintetizaron en 1974 y se comercializaron por primera vez en 1977 (Leahey, 1985), siendo utilizados inicialmente en la lucha contra las plagas de insectos. También tienen una alta potencia insecticida de amplio rango (Casida y Quistad, 1998), siendo utilizados en las últimas décadas para combatir ectoparásitos en acuicultura.

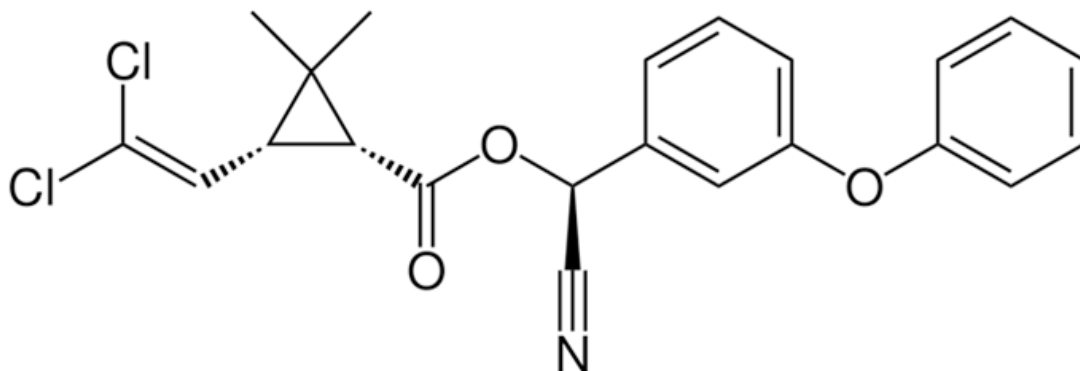
Su estructura molecular se puede ver en la figura 1.1 y su fórmula es $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ y su nombre IUPAC es (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato de (S)-alfa-ciano-3-fenoxibencilo.



(Fuente: Mills, 2006)

Figura 1.1.- Estructura molecular de la deltametrina.

La estructura molecular de la cipermetrina se presenta en la figura 1.2, su fórmula es $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ y su nombre IUPAC es (1RS)-cis,trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato de (RS)-ciano-3-Fenoxibencilo.



(Fuente: Derksen, 2007)

Figura 1.2.- Estructura molecular de la cipermetrina.

El mecanismo de acción de los piretroides consiste en la interferencia en la función de la membrana nerviosa, principalmente por su interacción con los canales de sodio (Na^+), lo que da lugar a la despolarización de la terminación nerviosa (Denac et al., 2000). Los piretroides muestran una alta afinidad por dichos canales y producen sus efectos tóxicos a través de cambios en las funciones de los mismos. La unión de los piretroides a los canales de Na^+ provoca su apertura prolongada (Narahashi, 1996). A altas concentraciones de piretroides el bloqueo de la corriente de la cola de inactivación puede causar una despolarización completa de la membrana nerviosa con bloqueo de la excitabilidad neuronal (Narahashi, 1992). Estudios recientes, recogidos en la revisión de Field et al. (2017), han encontrado que la unión del piretroide al canal es dependiente de algunos aminoácidos que forman parte su secuencia, de forma que su sustitución altera dicha unión. Apoyándose en los citados estudios, Field et al (2017) proponen que las diferencias en sensibilidad a los piretroides entre los mamíferos y los artrópodos, además de por la mejor absorción del pesticida a través de la cutícula de los mismos, viene determinada en gran medida por la diferente secuencia aminoacídica del canal que favorece su unión.

1.4 Impacto de los pesticidas sobre los ecosistemas: empleo de organismos centinela para su monitorización

El aumento en el uso y aplicación de insecticidas piretroides, y el consiguiente mayor riesgo en el ecosistema marino en las inmediaciones de los centros de cultivo, ha originado una preocupación creciente acerca de los efectos potenciales de dichos pesticidas sobre los ecosistemas acuáticos, y en particular sobre los organismos sensibles no diana que están expuestos a estos agentes antiparasitarios (Burrige et al., 2014; Van Geest et al., 2014). Los organismos marinos no diana están expuestos a los piretroides a través de la columna de agua, los sedimentos o la ingestión de partículas orgánicas contaminadas. Se sabe que organismos no diana, como algunas especies de invertebrados marinos y de peces, son extremadamente sensibles a los efectos neurotóxicos de los piretroides (Reddy et al., 1991; Philip et al., 1995). La cipermetrina y la deltametrina, debido a su naturaleza lipofílica, se adhieren con facilidad a partículas orgánicas y se decantan en los sedimentos (Sánchez y Barahona, 2005). La vida media de la deltametrina en los sedimentos marinos se ha estimado en 140 días (Gross et al., 2008), mientras que la cipermetrina puede persistir de 35 a 80 días (SEPA, 1998).

El impacto de los piretroides en los animales acuáticos no diana, especialmente invertebrados fueron sido revisados por Mian y Mulla (1992) y Haya et al. (2005). No es sorprendente encontrar que, en los estudios basados en laboratorio, los artrópodos son más sensibles a estos compuestos que los moluscos, equinodermos y peces (McLeese et al., 1980; Burridge et al., 2010). En las tablas 1.1 y 1.2 se muestra las CL₅₀ o EL₅₀ para la cipermetrina y deltametrina en diferentes especies de animales acuáticos.

Tabla 1.1.- Concentración Letal de cipermetrina para el 50% en diferentes animales acuáticos.

Especies	Taxa	CL_{50-96h} (µg/L)	Referencias
<i>Polydora cornuta (adulto)</i>	Anélido	27,8	Ernst et al., 2001
<i>Crassostrea virginica*</i>	Molusco Bivalvo	370	Hill, 1985
<i>Crassostrea gigas*</i>	Molusco Bivalvo	2300	Hill, 1985
<i>Unio elongatulus eucirrus</i>	Molusco Bivalvo	59,2	Kroprucu et al., 2010
<i>Gammarus spp.(adulto)</i>	Crustáceo	0,36	Ernst et al., 2001
<i>Mysidopsis bahia (adulto)</i>	Crustáceo	0,005	Hill, 1985
<i>Palaemonetes pugio</i>	Crustáceo	0,016	Clark et al., 1987
<i>Crangon septemspinosa</i>	Crustáceo	0,01	McLeese et al., 1980
<i>Uca pugilator (adulto)</i>	Crustáceo	0,2	Hill, 1985
<i>Acartia tonsa (nauplio)</i>	Crustáceo	0,005	Medina et al., 2002
<i>Acartia tonsa (adulto)</i>	Crustáceo	0,142	Medina et al., 2002
<i>Tisbe battagliai (adulto)</i>	Crustáceo	0,052	Barata et al., 2002
<i>Americamysis bahia</i>	Crustáceo	0,005	USEPA, 2013
<i>Mysidopsis bahia</i>	Crustáceo	0,006	Boyle et al., 1995
<i>Crangon crangon</i>	Crustáceo	0,034	Boyle et al., 1995
<i>Corophium volutator</i>	Crustáceo	0,213	Boyle et al., 1995
<i>Asterias rubens</i>	Equinodermo	1000	Knigh et al., 1995
<i>S. droebachiensis</i>	Equinodermo	50	Ernst et al., 2001
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Pez	8,1	Ernst et al., 2001
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Pez	1	Hill, 1985
<i>Salmo salar</i>	Pez	2	McLeese et al., 1980
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Pez	80	Altinok et al., 2011

*EC_{50-96h}.

Tabla 1.2.- Concentración Letal de deltametrina para el 50% en diferentes animales acuáticos.

Especies	Taxa	CL_{50-96h} (µg/L)	Referencias
<i>Unio elongatulus eucirrus</i> (adulto)	Molusco Bivalvo	6600	Koprucu et al., 2008
<i>Homarus americanus</i> (Stage IV)	Crustáceo	0,0282	Fairchild et al., 2010
<i>Palaemon serratus</i> (adulto)	Crustáceo	0,048	Oliveira et al., 2012
<i>Paratya australiensis</i>	Crustáceo	0,035	Thomas et al., 2008
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Crustáceo	0,02	Thomas et al., 2008
<i>Palaemon serratus</i> (adulto)	Crustáceo	0,048	Oliveira et al., 2012
<i>Eohaustorius estuarius</i>	Crustáceo	0,00166	Fairchild et al., 2010
<i>Crangon septemspinosa</i>	Crustáceo	0,0453	Fairchild et al., 2010
<i>Tisbe battagliai</i> (Adulto)	Crustáceo	0,0106	Barata et al., 2002
<i>Americamysis bahia</i>	Crustáceo	0,037	USEPA, 2013
<i>Melanotaenia duboulayi</i>	Pez	0,135	Thomas et al., 2008
<i>Poecilia reticulata</i> (Adulto)	Pez	0,02	Mittal et al., 1994
<i>Cyprinodon macularius</i>	Pez	0,60	Mulla et al., 1978
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Pez	20	Velisek et al., 2007

Es habitual en los estudios de monitorización ambiental elegir especies centinela que puedan aportar información relevante de los impactos de los contaminantes ambientales sobre el ecosistema. En el caso de estudios en el medio marino es importante escoger como organismos centinelas de contaminación a aquellos géneros taxonómicos que sean representativos en una distribución horizontal y vertical del mismo, es decir, tanto de la columna de agua como de los sedimentos marinos, y que posean además una distribución a nivel mundial, de manera que se puedan poder comparar resultados de una amplia gama de zonas geográficas (Dean, 2008).

1.4.1 *Mytilus galloprovincialis*

En relación con la columna de agua, las especies del género *Mytilus* han sido ampliamente utilizadas como indicador biológico de la contaminación en los programas de seguimiento ambiental en medio marino. El mejillón es un organismo sésil, filtrador, lo cual facilita la acumulación dentro de sus tejidos de los contaminantes de la columna de agua. Tienen varias ventajas, como son la amplia distribución geográfica, el muestreo fácil, la resistencia al estrés a una amplia gama de productos químicos (Baumard et al., 1998, Chase et al., 2001).

La bioacumulación de los compuestos depende de los parámetros biológicos del mejillón, como el contenido de lípidos y el índice de condición. Estos factores están relacionados con las condiciones fisiológicas y reproductivas que varían según los sitios geográficos y las estaciones del año (Hummel et al., 1990). *Mytilus* sp ha sido propuesto como organismo centinela en seguimiento de los potenciales efectos ambientales del uso de piretroides en las granjas de peces (Davies et al., 2001). Todo lo anteriormente expuesto motivó la selección de *M. galloprovincialis* como organismo de interés en este estudio.

Tabla 1.3.- Clasificación Taxonómica del mitílido *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819).

Reino	Animalia
Filo	Mollusca
Clase	Bivalvia
Subclase	Lamellibranchia (Pteriomorpha)
Superorden	Filibranchia
Orden	Mytiloida
Familia	Mytilidae
Género	<i>Mytilus</i>
Especie	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
Nombre Común:	Mejillón mediterráneo

Fuente: NCBI Taxonomy Database; ID: 29158.

1.4.2 *Perinereis vancaurica*

Los sedimentos marinos constituyen un importante reservorio de almacenamiento de contaminantes persistentes en entornos acuáticos y por lo tanto una fuente potencial para las aguas intersticiales y las especies bentónicas que las habitan (Chapman et al., 1998; Simpson y Batley, 2007). Los organismos bentónicos son componentes clave de los ecosistemas costeros, ya que desempeñan un papel importante en la descomposición de detritos, el ciclo de nutrientes y el flujo de energía a niveles tróficos y comunidades superiores (Levin et al., 2001; Serrano et al., 2003). Además, las especies de macroinvertebrados bentónicos pueden acumular grandes cantidades de contaminantes, ya que viven en estrecho contacto con el sedimento durante largos períodos, y presentan estrategias de alimentación que implican la ingestión de partículas de sedimento, lo que da lugar a una exposición máxima a los contaminantes tanto en el sedimento como en el agua (Dean, 2008). Estas características permiten que los invertebrados macrobentónicos puedan proporcionar una indicación de la contaminación ambiental (de acumulación y de impactos) integrada en el tiempo, y ofrecer la posibilidad de ser utilizados como bioindicadores de la contaminación en las zonas costeras (Langston et al., 2012). Entre todos los taxones macrobentónicos, los poliquetos son frecuentemente el grupo taxonómico más abundante en los ecosistemas estuarinos, y son elementos clave en las redes alimenticias estuarinas y costeras, constituyendo una importante fuente de alimento para muchas especies de peces y de crustáceos comerciales, lo que les convierte en vectores de transferencia de contaminantes a los niveles tróficos superiores (Lewis y Watson, 2012, Serrano et al., 2003).

Por otro lado, los gusanos poliquetos han sido objeto de amplias investigaciones y se han recomendado para estudios de toxicidad subletal de sedimentos por su poca movilidad, estar íntimamente asociados al sedimento donde se acumulan los contaminantes, así como su relativa resistencia a concentraciones altas de contaminantes orgánicos permitiendo evaluar la biodisponibilidad de estos (Van Geest et al., 2014, Solé et al., 2009, Gomes et al., 2013).

En cuanto a la monitorización del sedimento, el uso de poliquetos marinos de la familia Nereidae ha sido propuesto en los procedimientos oficiales de la USEPA (1995) como indicadores de bioacumulación, debido a su amplia distribución espacial, variado rango de alimentación y ciclo de vida relativamente largo.

Esta familia de poliquetos son animales detritívoros altamente eficientes que a menudo dominan la comunidad bentónica en las zonas de alta carga orgánica (Mirto et al., 2012). De hecho, se han utilizado para biorremediar sedimentos orgánicos enriquecidos situados bajo las piscifactorías (Kinoshita et al., 2008). En este contexto, la utilización de los poliquetos como bioindicador es particularmente interesante ya que también pueden ser útiles en la evaluación de la transferencia de contaminantes a niveles más altos de la cadena trófica teniendo en cuenta su papel como presas principales de varias especies de peces bentónicos (Ruus et al., 2005).

El género *Perinereis* presenta una amplia distribución a nivel mundial y es utilizado como cebo de pesca (Arias et al., 2013). En este estudio utilizamos la especie *Perinereis vancaurica* (Ehlers, 1868) por su fácil obtención y mantenimiento en laboratorio.

Tabla 1.4.- Clasificación Taxonómica del anélido poliqueto *Perinereis vancaurica* (Ehlers, 1868).

Reino	Animalia
Filo	Annelida
Clase	Polychaeta
Subclase	Errantia
Orden	Phyllodocida
Suborden	Nereidiformia
Familia	Nereididae
Subfamilia	Nereidinae
Género	<i>Perinereis</i>
Especie	<i>Perinereis vancaurica</i>

Fuente: WORMS (2008). *Perinereis vancaurica*. G.; Fauchald, K. (Ed.) (2017). World Polychaeta.

1.5 Bioensayos y biomarcadores

Los ensayos biológicos de toxicidad son herramientas de diagnóstico ambiental adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos centinelas, y complementarios a los análisis fisicoquímicos. Estos pueden llevarse a cabo bajo condiciones experimentales específicas y controladas en laboratorio o en el campo (Castillo, 2004). El bioensayo es un experimento para estimar la naturaleza, constitución o efecto de una muestra mediante las respuestas que puedan registrarse en el organismo o en un conjunto de ellos (Castillo, 2004). Un bioensayo uniespecífico típico involucra un estímulo o dosis absorbible que es aplicada a un individuo cuya respuesta es estimada mediante la detección y evaluación de cambios en algunas características biológicas o del estado, que hayan ocurrido tras un determinado tiempo de exposición (Castillo, 2004). El objetivo de un bioensayo de toxicidad es determinar la toxicidad de una sustancia, una mezcla de ellas, o una muestra ambiental, que son objeto de examinación. Los bioensayos siempre incluyen en su diseño la determinación de la toxicidad de un patrón toxicológico conocido o de referencia (Ronco et al., 2004).

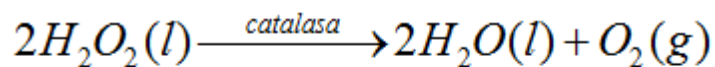
El término biomarcador se define como cambios en las respuestas biológicas en relación con la exposición a los efectos tóxicos de sustancias químicas ambientales (Van der Oost et al., 2003). Estos cambios pueden ocurrir desde el nivel molecular al celular incluyendo también respuestas fisiológicas y etológicas. Los biomarcadores se han utilizado en programas de seguimiento (Solé et al., 2009). Su uso en organismos centinela de una o más zonas sospechosas de contaminación, y confrontados con organismos procedentes de una zona control, permite establecer el peligro potencial al que están sometidas las comunidades objeto de estudio. Los biomarcadores han sido utilizados también ampliamente en el laboratorio para documentar y cuantificar tanto la exposición como los efectos de los contaminantes ambientales sobre los organismos. El mayor obstáculo para desarrollar un buen biomarcador está en medir una respuesta selectiva en un sólo organismo representante, y poder extrapolar un ligero incremento o disminución del parámetro medido (un simple cambio bioquímico) a un nivel superior de organización y comprender su significado ecológico (Weeks, 1998).

1.6 Biomarcadores enzimáticos utilizados

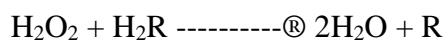
En diferentes estudios se han utilizado con éxito una serie de biomarcadores que responden a la exposición a piretroides. Así la cipermetrina induce estrés oxidativo y cambios en varias actividades enzimáticas (Khazri et al., 2015). Las actividades de los enzimas catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST) participan en la mitigación y la reparación del daño oxidativo causado por especies reactivas del oxígeno o ROS (Manduzio et al., 2005; Almeida et al., 2005). Por otro lado, la actividad acetilcolinesterasa (AChE) ha mostrado ser un biomarcador útil para la exposición a cipermetrina y deltametrina (Davies et al., 2001; Ren et al., 2008). También, se ha descrito una alta actividad de esta enzima en branquias del mejillón *M. galloprovincialis* (Escartín y Porte, 1997) y en poliquetos expuestos a pesticidas (Drouot et al., 2007). Una de las principales rutas de detoxificación para piretroides son la oxidación y la hidrólisis de los enlaces éster por las carboxilesterasas (CbE), que son la vía de desintoxicación más eficiente (Sogorb y Vilanova, 2002).

1.6.1. Catalasa

Las catalasas (CAT, EC 1.11.1.6) son enzimas antioxidantes que catalizan la conversión del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado en el metabolismo celular en H_2O y O_2 .



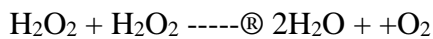
Se caracteriza por su alta capacidad de reacción, pero relativamente poca afinidad por el sustrato. Presenta 2 funciones: la catalítica y la peroxidativa; y ambas se pueden representar por la ecuación:



sustrato donador CAT

La reacción general se efectúa mediante la reducción del sustrato tomando los átomos de hidrógeno aportados por el donador, y los productos finales serían el sustrato reducido y el donador oxidado.

En la función catalítica, el donador es otra molécula de H₂O₂. Esta función sólo puede ser realizada por la enzima en su forma tetramérica (Srivastava et al.,1980).



1.6.2. Glutación-S-transferasa (GST)

Las glutación-S-transferasa (EC 2.5.1.18) constituyen una superfamilia de isoenzimas multifuncionales que catalizan la conjugación de diversos compuestos electrofílicos, que incluyen ROS, con el tripéptido glutación (Clark, 1989; Eaton y Bammler, 1999; Hayes et al., 2005), participando en su desintoxicación. Las glutación S-transferasas constituyen una de las vías de desintoxicación de los productos generados durante el daño celular, tales como lipoperóxidos (Awasthi et al., 2004; Hayes et al., 2005). La desintoxicación se consigue principalmente a través de la conjugación de glutación con xenobióticos y/o endobióticos, convirtiéndolos en compuestos más solubles capaces de ser eliminados por el organismo (Sheehan et al., 2001; Oakley, 2011). De hecho, la actividad GST se ve inducida tras la exposición a cipermetrina en crustáceos (Gowlan et al., 2002).

1.6.3. Esterasas

Las esterazas (EC 3.1) son enzimas que hidrolizan preferentemente enlaces éster. Se clasifican generalmente en dos subgrupos, carboxilesterasa (CbE; EC 3.1.1.1) y colinesterasas (ChE; EC 3.1.1.7), dependiendo de su especificidad de sustrato y su comportamiento hacia algunos inhibidores. Dentro de las colinesterasas se pueden distinguir varios subtipos. Las acetilcolinesterasas (AChE), que participan en la neurotransmisión colinérgica, y representan un biomarcador de neurotoxicidad ampliamente utilizado para identificar la exposición a los productos químicos anticolinesterásicos.

Las AChEs disocian la acetilcolina terminando el proceso de neurotransmisión (Ballard et al., 2005). Pueden ser moduladas por un amplio espectro de xenobióticos en invertebrados (Minier et al., 2008).

Las carboxilesterasas (CbE) son serinas hidrolasas que catalizan la hidrólisis de ésteres, amidas, tioésteres y carbamatos (Laizure et al., 2013). Estas enzimas presentan poca especificidad por el sustrato, por lo que están involucradas en diversos procesos fisiológicos y toxicológicos (Wheelock y Nakagawa, 2010). Participa en la biotransformación de diferentes tipos de tóxicos ambientales y endógenos, incluyendo los piretroides sintéticos (Sogorb y Vilanova, 2002). El hecho de que algunos piretroides pueden llegar a inhibir las CbE (Lei, 2017), da lugar a que estas enzimas sean doblemente interesantes para estudiar los efectos de este tipo de pesticidas puesto que participan en su biotransformación y son además inhibidos por ellos.

1.7. Influencia de la temperatura sobre la respuesta de las actividades enzimáticas a la exposición a piretroides

El cambio climático resulta en una mayor intensidad y frecuencia de eventos extremos de estrés abiótico y biótico (Carmody et al., 2016). Existe la preocupación de que el calentamiento de los océanos debido al cambio climático cause que muchos organismos marinos estén expuestos a condiciones térmicas que son estresantes o letales para ellos (Gibson et al., 2011; Niehaus et al., 2012).

Los invertebrados marinos son animales ectotermos, lo cual significa que dependen del calor externo para su equilibrio térmico puesto que el calor generado por su propio metabolismo es muy bajo. Esto lleva asociado la dificultad para mantener un gradiente de temperatura con el exterior dando lugar a que sean termoconformadores, y que su temperatura fluctúe siguiendo a la temperatura ambiental (poiquiloterma). En los organismos poiquiloterms, como son los moluscos bivalvos y los anélidos poliquetos, la temperatura ambiental es uno de los principales factores físicos que influyen sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos. De acuerdo con los textos clásicos de Fisiología Animal Comparada (Hill et al. 2006; Willmer et al. 2000; Withers 1992), en los animales ectotermos ante un aumento en la temperatura ambiental se da una respuesta inmediata, que provoca un aumento multiplicativo en la velocidad metabólica del organismo, de forma cuasiexponencial.

Esto se debe a que cualquier reacción está sujeta a su dependencia de la temperatura, y esta tenderá a acelerarse a medida que se incrementa la temperatura (ley de Arrhenius).

El fenómeno de la aclimatación a la variación de temperatura, que se produce a medio plazo (días o semanas), comprende mecanismos mediante los cuales los animales ectotermos amortiguan las respuestas agudas a los cambios de temperatura. Estos mecanismos incluyen un proceso denominado “compensación enzimática” tendente a restaurar las velocidades metabólicas alteradas por el cambio de temperatura. Dado que las enzimas son un componente limitante de la velocidad de las reacciones metabólicas, la respuesta más habitual de los organismos ectotermos es la modificación de la cantidad de enzimas que sintetizan, y de esta forma, si el metabolismo se acelera a causa del incremento de la temperatura, la síntesis de enzimas (generalmente a través de su transcripción) se reduce para lograr compensar la actividad y devolverla a su nivel original (Crawford y Powers, 1992). Otra forma de contribuir al proceso de aclimatación es la expresión de alozimas e isozimas con diferentes sensibilidades térmicas (Fields y Somero, 1997). Además, la temperatura puede afectar directamente la función de las enzimas cambiando su estructura física, su capacidad catalítica o su capacidad de unión (Hochachka y Somero, 2014).

Añadido a todo lo anterior, el aumento de la temperatura ambiental se ha propuesto como un factor importante en el impacto de los contaminantes tóxicos ambientales sobre los ecosistemas (Noyes et al, 2009). Por una parte, la temperatura puede influir en aspectos fisicoquímicos de las sustancias químicas contaminantes, determinando su degradación, su destino y su biodisponibilidad. Además, la temperatura puede ser un factor relevante en la respuesta de los seres vivos a dichas sustancias tóxicas, como ya se ha visto en algunos estudios (González-Mira et al 2018, Serra-Compte et al, 2018).

En el caso concreto de los pesticidas piretroides, la temperatura ambiental ha cobrado recientemente un gran interés, un factor determinante en la susceptibilidad de los insectos a estas sustancias (Glunt et al, 2018) y se ha mostrado tener un importante efecto en la toxicidad letal para los peces (Saha y Kaviraj, 2009).

2. OBJETIVOS

HIPOTESIS

- 1) La exposición a cipermetrina o deltametrina a las concentraciones presentes en el agua marina tras su aplicación como antiparasitario en salmonicultura produce efectos medibles sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y de biotransformación en los organismos no diana *Mytilus galloprovincialis* y *Perinereis vancaurica*.
- 2) La temperatura de aclimatación modifica los efectos por cipermetrina anteriormente descritos en *Mytilus galloprovincialis*.
- 3) En *Mytilus galloprovincialis* existen mecanismos de compensación térmica para los enzimas antioxidantes y de biotransformación.

OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es evaluar los efectos de piretroides comúnmente utilizados en salmonicultura sobre invertebrados marinos no diana mediante la determinación de biomarcadores enzimáticos teniendo en cuenta la influencia de la temperatura.

Los objetivos específicos son:

- 1) Evaluar la toxicidad a la exposición sub-aguda de cipermetrina sobre el mejillón *Mytilus galloprovincialis* utilizando biomarcadores enzimáticos de exposición en branquias, a diferentes tiempos y temperaturas de aclimatación.
- 2) Evaluar la compensación térmica de enzimas antioxidantes y de biotransformación durante la aclimatación a temperatura en branquias de *Mytilus galloprovincialis* expuestos a cipermetrina.
- 3) Evaluar el efecto de la temperatura de aclimatación y exposición a cipermetrina en el músculo abductor del mejillón *Mytilus galloprovincialis* mediante enzimas antioxidantes y de biotransformación.
- 4) Evaluar los efectos subletales a diferentes tiempos de exposición con los piretroides cipermetrina y deltametrina mediante enzimas antioxidantes y de biotransformación en dos regiones anatómicas del poliqueto *Perinereis vancaurica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Efectos de la cipermetrina en *M. galloprovincialis*: mantenimiento y aclimatación de los ejemplares

Se adquirieron ejemplares vivos de mejillones *M. galloprovincialis* (longitud de concha $8,0 \pm 1,20$ cm) procedentes de Galicia (España), de proveedores locales. Antes de iniciar los experimentos de exposición al pesticida, los mejillones fueron sometidos a una limpieza epífita suave de la concha y se transfirieron a acuarios de 96 l de capacidad que contenían agua de mar artificial recirculada, filtrada y aireada permanentemente. Los mejillones permanecieron en estos acuarios durante la aclimatación a las condiciones de temperatura experimentada.

Los mejillones se distribuyeron al azar en los acuarios a una densidad de 0,8 ejemplares /l, y mantenidos a 3 temperaturas (17 °C, 22 °C y 27 °C) y un fotoperíodo de 12 h:12 h (luz: oscuridad) utilizando luces fluorescentes durante 7 días. Durante este periodo los ejemplares fueron alimentados con una mezcla de las microalgas *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*, y se controlaron los parámetros físico-químicos del agua. Se midió la salinidad con un refractómetro, el oxígeno disuelto con un medidor de oxígeno digital (YSI Environmental 556, EE.UU.) y el pH mediante pH-metro (Crison micro ph 2002). Los parámetros de calidad media del agua de mar medidos fueron: salinidad $33 \pm 0,5$ ‰, pH $7,5 \pm 0,5$ y oxígeno disuelto $7,3 \pm 0,2$ mg /l (17 °C), $6,4 \pm 0,4$ mg /l (22 °C) y $5,6 \pm 0,5$ mg /l (27 °C). El agua fue renovada completamente cada dos días para mantener la calidad del agua.

3.2. Preparación de muestras biológicas y análisis enzimáticos

Una vez finalizado cada bioensayo de experimentación específico se procedió a disectar los tejidos de los animales. Tras la disección, se eliminó el exceso de agua del tejido con ayuda de papel secante, se pesó e inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido. Se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis bioquímico.

La preparación de los tejidos se realizó de acuerdo con la metodología descrita en Faria et al. (2009). Las muestras se homogeneizaron en tampón fosfato frío (100 mM, pH 7,4) que contenía KCl 100 mM y EDTA 1 mM, usando un homogeneizador ultraturrax.

Las proporciones utilizadas en los diferentes experimentos % p:v fueron 1: 4 en branquias de mejillón, 1: 9 en músculo de mejillón y 1: 5 en cabeza y cuerpo de anélidos poliquetos. Los homogeneizados se centrifugaron a 10.000 g a 4 °C durante 30 min. y los sobrenadantes obtenidos (S10) se alicuotaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

El contenido en proteína total y las actividades enzimáticas se determinaron por absorbancia en un lector de microplacas TECAN TM (Spectra fluor multifunction fluorescence) utilizando microplacas de 96 pocillos, y por triplicado.

3.2.1. Medición de proteína total

El contenido de proteína total de las muestras se determinó según el método de Bradford (Bradford, 1976) adaptado a microplaca (Varó et al., 2015) a partir de una fracción diluida y usando el reactivo de BioRad (Bio-Rad Proein assay) y albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Tras añadir 200 µl del reactivo de Bradford diluido a 10 µl de muestra diluida y mantener 15 minutos de incubación en oscuridad) se midió la absorbancia a 595 nm. La cantidad de proteína total de las muestras, expresada en mg/ml, se estimó por interpolación a partir de la curva patrón (0,1-0,5 mg/ml).

3.2.2. Determinación de Catalasa (CAT)

La actividad de CAT se estimó espectrofotométricamente según el método de Aebi (1974) adaptado a microplaca siguiendo el procedimiento descrito por Koenig y Solé (2012), utilizando el peróxido de hidrógeno (H₂O₂; 50mM) como sustrato. La CAT se cuantificó siguiendo la disminución de la absorbancia durante 1 min (a intervalos de 10 segundos por 1 minuto, 6 ciclos) a 240 nm, en placas multipocillo UV-transparente (Greiner UVStar ®). En el ensayo se usaron 10 µl de muestra diluida en un volumen total de 210 µl. La actividad se expresó en micromoles por minuto y por miligramo de proteína (µmol /min/mg prot).

Para evaluar la compensación enzimática por temperatura producida durante la aclimatación de los mejillones a las diferentes temperaturas se utilizó un espectrofotómetro agilent previamente a un baño térmico a todos los reactivos con el equipo (Pharmacia Biotech, Muti Temp III) para conservar la temperatura de aclimatación. Los ensayos se

realizaron en cubeta de cuarzo (Aebi, 1974). El procedimiento fue el mismo al descrito anteriormente para microplaca, utilizando 20 μl de muestra en un volumen total de 3 ml.

3.2.3. Determinación de Glutación-S-Transferasa (GST)

La actividad de GST se determinó usando el método desarrollado por Habig et al. (1974), adaptado a la microplaca. La actividad se determinó espectrofotométricamente a 340 nm durante 5 min. ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). En el ensayo se utilizaron 10 μl de muestra y una mezcla de la solución de reacción formada por 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB, 1mM) como sustrato, y glutatión reducido (GSH, 1 mM) hasta un volumen total de 300 μl . La actividad se expresó en nanomoles por minuto y por miligramo de proteína (nmol /min/mg prot).

Para evaluar la compensación enzimática de la actividad GST debido a la temperatura y por la razón anteriormente descrita, los ensayos se hicieron en cubeta de cuarzo (Habig et al., 1974) y las determinaciones espectrofotométricas se realizaron mediante un espectrofotómetro (Agilent 8453 UV-Visible.). El procedimiento fue el mismo al descrito anteriormente para microplaca, y para ello se ha utilizado 20 μL de muestras diluida y una mezcla de la solución de reacción que contenía tampón fosfato (880 μL , 100 mM pH 7,4), CDNB (50 μL , 1mM) y GSH (50 μL , 1 mM) hasta un volumen total de 1 ml. La absorbancia se midió a 340 nm durante 3 min., y la actividad se expresó en nanomoles por minuto y por miligramo de proteína (nmol /min/mg prot).

3.2.4. Determinación de Acetilcolinesterasa (AChE)

La actividad de AChE se determinó de acuerdo con el método descrito por Ellman et al. (1961) adaptado a microplaca por Galloway et al. (2002). Para determinar la actividad AChE se utilizaron 100 μL de muestra diluida y 200 μL de una solución de reacción compuesta por tampón fosfato (0,1 M, pH 7.4), ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB 0,33 mM) y acetiltiocolina (ACh 2 mM) como sustrato.

La actividad de AChE se determinó a 415 nm cinéticamente durante 15 min. ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron como nmol/min/mg de proteína.

3.2.5. Determinación de Carboxilesterasa (CbE)

La actividad CbE se midió usando el método de Ellman (Ellman et al., 1961) adaptado a microplaca por Galloway et al. (2002). Para ello se emplearon 50 µl de muestra y 200 µl de DTNB (0,33 mM) y después de 5 min. de incubación se añadieron 50 µl de tioacetato de S-fenilo (3 mM) como sustrato en un tampón de fosfato (0,1 M a pH 7,4). A continuación, se midió la absorbancia a 415 nm ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante 5 min. La actividad CbE se expresó en nmol/min/mg de proteína.

3.3. Respuestas en las actividades enzimáticas en *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina y mantenidos a diferentes temperaturas

El estudio de las respuestas a la temperatura en el mejillón *M. galloprovincialis* expuesto a cipermetrina se llevó a cabo mediante tres experimentos que se describen a continuación. Estos se realizaron en organismos aclimatados a tres temperaturas (17 °C, 22 °C y 27 °C) y a dos concentraciones realistas de cipermetrina durante 24 y 96 h, utilizando un diseño factorial. Para evaluar éstas repuestas se determinaron en branquia y músculo abductor la actividad de enzimas relacionadas con sistema de biotransformación (GST y CbE) de defensa antioxidante (CAT) y de la actividad nerviosa (AChE).

3.3.1 Experimento I: Respuestas en branquias

3.3.1.1. Diseño experimental y exposición a cipermetrina

Para este estudio se utilizó un diseño experimental de tipo factorial considerando 3 factores: la concentración de cipermetrina (15 y 25 µg/l), y que incluía un grupo control (C, agua de mar), y otro grupo con el disolvente utilizado para preparar la solución madre de cipermetrina (CA, acetona); el tiempo de exposición (24 y 96 h) y la temperatura de aclimatación (17 °C , 22 °C y 27°C), obteniéndose un total de 24 tratamientos con tres replicas cada uno.

Se evaluaron en branquias las respuestas determinando las actividades enzimáticas GST, CAT, CbE y AChE. Un enfoque factorial en el diseño experimental es más eficaz y

eficiente que el enfoque unifactorial en el que se contempla la variación de un sólo factor a la vez, al considerar todas las interacciones entre ellos.

Los ensayos de exposición a la cipermetrina se realizaron en acuarios de 20 l de capacidad en los que se colocaron 10 mejillones procedentes cada una de las temperaturas de aclimatación, y considerando cada acuario como replica independiente. Las dos concentraciones nominales de cipermetrina ensayadas se corresponden una a la utilizada en la industria del salmón para los baños estándar antiparasitarios (15 µg/l; Burrige et al. 2010), y la otra ligeramente superior (25 µg/l). Las concentraciones se prepararon disolviendo la cipermetrina (Alphamethrin, Sigma-Aldrich) en acetona, dada su baja solubilidad en agua de mar. En todos los acuarios, excepto los correspondientes a los controles, la concentración de acetona más alta fue de 49 mg/l.

Antes de introducir los mejillones en los acuarios experimentales se procedió a poner la concentración de cipermetrina correspondiente en un volumen total de 16 l. Cada acuario se dotó con un venturi de burbuja suave para mantener la recirculación horizontal y vertical del agua y la homogenización de la cipermetrina en el medio evitando su sedimentación y volatilización, así como una buena oxigenación del medio. El agua de los acuarios se renovó completamente cada 48 h para asegurar una buena calidad de agua y mantener concentraciones de cipermetrina en el medio.

Los mejillones se mantuvieron en ayuno las 24 h previas a la experimentación y durante el tiempo de exposición a la cipermetrina. La mortalidad se evaluó a 1, 24, 48, 72 y 96 h y los mejillones muertos fueron eliminados inmediatamente. Para cada temperatura experimental se realizó una prueba separada, controlándose además la temperatura ambiental de la sala con un regulador de temperatura (termostato). Tras un periodo de exposición a cipermetrina de 24 y 96 h, se sacrificaron 5 mejillones por acuario (15 por condición experimental) y se diseccionaron las branquias que fueron congeladas instantáneamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su análisis bioquímico.

3.3.1.2. Análisis enzimáticos

El contenido de proteína total en las muestras de las branquias (S10) se midió en una fracción diluida de las muestras en una ratio 1:20 siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en el apartado correspondiente (ver 3.2.1. Medición de proteína).

Para la determinación de las actividades CAT y CbE las muestras se diluyeron en una ratio de 1:10 y 1:20 respectivamente; mientras las actividades AChE y GST se determinaron en las muestras sin diluir. Todas las determinaciones se llevaron a cabo según los procedimientos descritos anteriormente en el apartado correspondiente (apartado 3.2. Preparación de muestras biológicas y análisis enzimáticos).

3.3.2. Experimento II: Estudio de la existencia de compensación térmica en la actividad enzimática de CAT y GST en branquias de *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina y mantenidos a diferentes temperaturas

En este experimento se analizó la existencia de compensación enzimática a la temperatura en las enzimas CAT y GST en las branquias de mejillones aclimatados a tres temperaturas diferentes y expuestos durante 96 h a cipermetrina. La compensación térmica que se da durante la aclimatación a una variación de la temperatura en los animales ectotermos, como se ha comentado en la introducción comprende, entre otros mecanismos, una variación en la cantidad de enzima presente en las células de forma que el aumento de velocidad de las reacciones como consecuencia de la temperatura elevada queda “compensado” con una disminución de la cantidad de enzima. Para poner de manifiesto este mecanismo y teniendo en cuenta que cuando se determinan actividades enzimáticas en condiciones de sustrato saturante la velocidad de la reacción es proporcional a la cantidad de enzima presente, se ha determinado la actividad enzimática a una misma temperatura de reacción de 25 °C (temperatura normalizada). Estas determinaciones se han realizado en un lector de placas TECAN termostaticado a 25 °C. La compensación daría lugar a un aumento de velocidad de reacción a las temperaturas más bajas.

Para comprobar el grado de compensación se determinaron las actividades enzimáticas a las temperaturas a las que los mejillones estaban aclimatados, y dado que el lector de placas no permite trabajar a temperaturas por debajo de la ambiental se ha utilizado un espectrofotómetro con una cubeta termostatazada (temperatura real o de aclimatación).

En resumen, las actividades de las enzimas CAT y GST se midieron en dos condiciones de temperatura diferentes: a una temperatura común de 25 °C para todos los grupos experimentales, y a la temperatura de aclimatación de cada uno de ellos (17 °C, 22 °C y 27 °C).

Las condiciones de mantenimiento, aclimatación, exposición a la cipermetrina y toma de muestras, ya se han descrito en los apartados correspondientes (3.1, 3.2 y 3.3.1.1). En ese experimento se aplicó un diseño factorial con 2 factores (concentración de cipermetrina y temperatura de aclimatación), y cada factor con los niveles de: concentración de cipermetrina (25 µg/l, 15 µg/l, carrier (acetona) y control (agua marina)) y de temperatura: (17 °C, 22 °C y 27 °C), con un total de 12 tratamientos con tres repeticiones. En este ensayo una réplica consistió en un acuario (volumen total de agua de 16 l) con 5 mejillones cada uno.

Las determinaciones de las actividades CAT y GST, así como el contenido de proteína total se llevaron a cabo según se describe en apartado 3.2.2, 3.2.3 y 3.2.1, respectivamente.

3.3.3. Experimento III: Respuestas en músculo abductor

En este ensayo se evaluó el efecto de temperatura en los biomarcadores (GST, CAT, AChE y CbE) en músculo abductor de mejillones expuestos durante 96 h a cipermetrina, utilizando los mismos ejemplares de mejillones del Experimento I (ver detalles en el apartado 3.3.1.1. Diseño experimental y exposición a cipermetrina). Las condiciones de mantenimiento, aclimatación, exposición a la cipermetrina, y toma de muestras ya se han descrito en los apartados correspondientes (3.1.1 y 3.2.2.1).

3.3.4 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS 22 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.). El nivel de significación estadística que se estableció para todos los análisis fue de $p < 0,05$, y los resultados se expresan como media \pm error estándar (S.E.M). En todas las variables consideradas en este estudio se analizó la condición de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). En aquellas variables que no cumplían con los requisitos del análisis se realizaron las transformaciones matemáticas mas apropiadas (Sokal y Rohlf, 1995).

En el Experimento I para analizar las diferencias en las respuestas bioquímicas o biomarcadores (CAT, GST, AChE y CbE) entre los grupos experimentales se procedió a realizar un análisis estadístico ANOVA de tres factores (concentración de cipermetrina, temperatura y tiempo de exposición), y sus interacciones. Para cumplir con los requisitos del análisis las variables se transformaron previamente con $\text{Log}_{10}(X+1)$ para GST, CAT y CbE, y $1/X$ para AChE. Posteriormente, para determinar las diferencias significativas entre las medias de las variables se aplicó la prueba *post hoc* de Tukey para varianzas homogéneas (GST y AChE), o de Games-Howell para las varianzas heterogéneas (CAT y CbE).

Para analizar las interacciones de los factores, estos se transformaron a ANOVA de un factor, creando grupos formados por la combinación entre los niveles de los diferentes factores, y posterior pruebas *post hoc* de Tukey o Games-Howell, según la homogeneidad de las varianzas. Así, por ejemplo, para transformar la interacción de los 3 factores: concentración de cipermetrina (4 niveles) * tiempo (2 niveles) * temperatura (3 niveles) se procedieron a crear $(4*2*3)$ 24 grupos o niveles para poder aplicar un ANOVA de 1 factor. Para los 2 factores: concentración (4 niveles) * temperatura (3 niveles) se crearon 12 grupos para aplicar un ANOVA de 1 factor, y así sucesivamente con el resto de las interacciones.

En los experimentos II y III, las diferencias en los biomarcadores analizados se determinaron con una ANOVA de 2 factores (concentración de cipermetrina y temperatura junto con su interacción), cumpliéndose con los requisitos del análisis (normalidad y homogeneidad de varianzas) con la transformación matemática $\text{Log}_{10}(X+1)$ en todas las variables. En experimento II, las diferencias significativas entre las medias de las variables se determinaron con la prueba de *post hoc* de Tukey para varianzas homogéneas (CAT y GST), mientras que en el experimento III las diferencias se determinaron con la prueba de *post hoc* de Tukey para varianzas homogéneas (CAT, AChE y CbE) o de Games-Howell para las varianzas heterogéneas (GST).

3.4. Efectos de la cipermetrina y la deltametrina en el poliqueto *Perinereis vancaurica*

El efecto de la cipermetrina y deltametrina en el poliqueto *Perinereis vancaurica* tras una exposición aguda (24 y 96 h) a concentraciones realísticas, se evaluó a partir de las actividades de las enzimas CAT, GST, AChE y CbE en la cabeza y el cuerpo de los poliquetos.

3.4.1. Mantenimiento y aclimatación de los organismos experimentales

Los anelidos poliquetos (peso: $4,86 \pm 1,74$ g) se compraron a un proveedor local de cebo de pesca en Valencia (España). Antes de iniciar los bioensayos de exposición a los piretroides, los poliquetos se aclimataron a 17 °C en acuarios de 96 l con agua de mar durante 1 semana, y con un fotoperiodo de 12h L:12h O, utilizando luces fluorescentes. Los poliquetos fueron alimentados con una mezcla de las microalgas *I. galbana* y *T. suecica*. La salinidad se midió con un refractómetro y se determinó el oxígeno disuelto y el pH mediante un medidor digital de oxígeno (YSI Environmental 556, EE.UU.) y un medidor de pH (Crison micro ph 2002). Los parámetros de calidad media del agua de mar medidos fueron: salinidad $33 \pm 0,7$ ‰, pH $7,3 \pm 0,6$ y oxígeno disuelto $6,8 \pm 0,5$ mg /l a 17 °C). El agua se renovaba completamente cada cuatro días.

3.4.2. Diseño experimental y exposición a piretroides

Se realizó un diseño experimental de tipo factorial considerando 2 factores: tipo de piretroide (cipermetrina y deltametrina), con un grupo control con acetona (CA, disolvente utilizado para preparar la solución madre de los piretroides) y tiempo (24 h y 96 h). Cada tratamiento estaba compuesto por tres réplicas independientes, consistentes en un acuario de 20 l (capacidad máxima) con 15 placas Petri con arena en su interior y un poliqueto, cubiertas con una red fina. La arena se lavó previamente con ácido nítrico.

Las concentraciones nominales de piretroide usadas en este experimento corresponden a la utilizada en la industria del salmón en un baño antiparasitario estándar de acuerdo con Burridge et al. (2010), cipermetrina (15 µg/l) y deltametrina (3 µg/l).

Las dos soluciones se prepararon disolviendo los compuestos en acetona, dada su baja solubilidad en agua de mar, con una relación de cipermetrina: acetona de 1: 4 para una concentración de 15 µg/l y de deltametrina: acetona de 1: 12 para 3 µg/l, respectivamente, más el CA que contiene el volumen máximo de acetona utilizado en los tratamientos experimentales. Antes de introducir a los poliquetos en los acuarios experimentales dentro de las placas de Petri, se procedió a introducir la concentración de cipermetrina y deltametrina correspondiente. Cada acuario contenía 6 l de agua y un venturi para recircular el agua. El agua se renovó completamente cada 48 h para asegurar una buena calidad de agua y la disponibilidad de los piretroides. Los poliquetos no fueron alimentados durante las 24 h previas al ensayo ni durante el tiempo de exposición. Tras 24 y 96 h de exposición se procedió a sacrificar a los poliquetos, y se separaron las cabezas y los cuerpos que fueron congelados instantáneamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta su análisis bioquímico.

3.4.3. Análisis enzimáticos

Los tejidos (cabeza y cuerpo) para determinaciones enzimáticas se prepararon de acuerdo a la metodología de Faria et al. (2009), tal y como se describe el apartado 3.2. Preparación de muestras biológicas y análisis enzimáticos.

El contenido de proteína total y de las actividades enzimáticas, excepto GST, se determinaron en una fracción diluida de las muestras siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en el apartado correspondiente (ver 3.2. Preparación de muestras biológicas y análisis enzimáticos). Para proteína la dilución fue de 1:40, para la actividad CAT se utilizó 1:10 en la cabeza y 1:20 en el cuerpo, mientras que para las actividades AChE y CbE fue de 1:20 en ambos tejidos.

3.4.4. Análisis estadísticos

En este estudio se realizó un ANOVA de dos factores para determinar las diferencias significativas en los biomarcadores analizados en cada tejido estudiado (CAT, GST, AChE y CbE). Los factores fueron: el tipo de piretroides y el tiempo de exposición, junto a sus interacciones. Previamente se determinaron para cada variable la normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene).

Los requisitos del análisis se cumplieron en la cabeza con la transformación $\text{Log}_{10}(X + 1)$ para CAT y GST, mientras que AChE y CbE no necesitaron transformaciones previas. Para el cuerpo los requisitos del análisis se cumplieron con la transformación $\text{Log}_{10}(X + 1)$ para CAT y CbE, mientras que GST y AChE no necesitaron transformaciones. Posteriormente, para determinar las diferencias significativas entre las medias de las variables se aplicó la prueba *post hoc* de Tukey para varianzas homogéneas (CAT, GST, AChE y CbE) en cuerpo y en la cabeza a todos los biomarcadores a excepción de CbE en cabeza donde se aplicó la prueba para varianzas heterogéneas de Games-Howell.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Respuestas en *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina a diferentes temperaturas

En los experimentos de exposición a cipermetrina llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral no se ha producido mortalidad a ninguna temperatura. Mesas y Tarifeño (2017) analizaron la tolerancia térmica (17 °C-33 °C) en adultos de *M. galloprovincialis* durante 96 h encontrando entre 17 °C y 28 °C no se producía mortalidad mientras que a 30 °C se producía el 55 % de mortalidad tras 48 h y del 100% tras 72 h. Esto demuestra que la temperatura de 27 °C se encuentra por debajo de la temperatura crítica de esta especie. Sin embargo, no se puede afirmar si esta temperatura sobrepasa la denominada temperatura pejus (T_p) (Pörtner) que marca los límites de la oxigenación óptima de los fluidos internos y que está por debajo de la temperatura crítica de una especie.

4.1.1. Experimento I: Respuesta fisiológica en branquias de *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina a diferentes temperaturas

Las actividades enzimáticas analizadas en las branquias como respuesta fisiológica a la combinación de los tres factores estudiados (C, t y T^a) se muestran en las figuras 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4. Sin embargo, para la presentación e interpretación de los resultados se ha optado por comenzar con el análisis de la varianza. En la tabla 4.1, se muestran los resultados del ANOVA de los valores de las actividades enzimáticas analizadas considerando la significancia de los tres factores estudiados y de sus interacciones. El ANOVA se ha interpretado teniendo en cuenta primero la importancia de los efectos de las interacciones para posteriormente tener información adicional de los efectos simples de cada factor atendiendo las recomendaciones de León y Montero (2001). De acuerdo con la interpretación anterior, encontramos que la mayor significación estadística se observa en la interacción C x t x T^a para las actividades CAT, GST y AChE, mientras que en el caso de CbE, la interacción C x T^a es la más significativa (Tabla 4.1). El análisis post hoc y la significación estadística de cada factor y sus interacciones entre los diferentes niveles se muestran en la tabla 4.2, excepto para la interacción C x t x T^a que se pueden ver en las Figuras 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.1.- Anova de 3 factores (concentración de cipermetrina (C), tiempo de exposición (t), temperatura (T^a) y sus interacciones de las actividades enzimáticas en branquias *M. galloprovincialis*.

	CAT				GST				AChE				CbE			
	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F
Modelo corregido	11,36	23	0,494	7,031***	4,194	23	0,182	9,743***	0,042	23	0,002	4,827***	1,649	23	0,072	3,990***
Intercepto	493,7	1	493,7	7026***	723,9	1	723,9	38681***	0,874	1	0,874	2286***	782,1	1	782,1	43511***
C	0,956	3	0,319	4,535**	0,163	3	0,054	2,906*	0,001	3	0,000	0,908	0,071	3	0,024	1,31
t	0,021	1	0,021	0,303	0,264	1	0,264	14,12***	0,000	1	0,000	0,747	0,285	1	0,285	15,85***
T^a	2,252	2	1,126	16,02***	1,583	2	0,791	42,29***	0,012	2	0,006	15,82***	0,011	2	0,006	0,308
C, x t	1,037	3	0,346	4,920**	0,541	3	0,180	9,64***	0,002	3	0,001	1,394	0,117	3	0,039	2,175
C, x T^a	1,427	6	0,238	3,384**	0,782	6	0,130	6,96***	0,008	6	0,001	3,352**	0,568	6	0,095	5,27***
t x T^a	0,616	2	0,308	4,380*	0,385	2	0,193	10,29***	0,006	2	0,003	7,938***	0,460	2	0,230	12,80***
C x t x T^a	2,920	6	0,487	6,925***	0,335	6	0,056	2,98***	0,014	6	0,002	5,90***	0,257	6	0,043	2,379*
Error	18,41	262	0,070		4,904	262	0,019		0,100	262	0,000		4,709	262	0,018	
Total	666,1	286			925,3	286			1,260	286			983,9	286		
Total corregido	29,77	285			9,098	285			0,143	285			6,359	285		

Nivel de significación: * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

SS: Suma de cuadrados; df: Grados de libertad; MS: Cuadrático promedio; F: Test estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.2.- Análisis post hoc, de las actividades enzimáticas para diferentes niveles entre los factores y sus interacciones en branquias de *M. galloprovincialis*.

	CAT	GST	AChE	CbE
	Diferencias en cada factor y sus interacciones	Diferencias en cada factor y sus interacciones	Diferencias en cada factor y sus interacciones	Diferencias en cada factor y sus interacciones
C	control < 25 µg/L * carrier < 25 µg/L *	_____	_____	_____
t	_____	24 h < 96 h *	_____	24 h > 96 h **
T ^a	17 °C > 22 °C ** 17 °C > 27 °C ***	17 °C < 22 °C ** 17 °C < 27 °C *** 22 °C > 27 °C ***	17 °C < 22 °C ** 17 °C < 27 °C ***	_____
C x t	control 96 h < 15 µg/L 96 h ** carrier 24 h < 25 µg/L 24 h **	control 24 h < control 96 h ** control 24 h < 15 µg/L 24 h ** control 24 h < 25 µg/L 24 h **	_____	_____
C x T ^a	15 µg/L 17 °C > 15 µg/L 27 °C *** 25 µg/L 17 °C > 25 µg/L 27 °C ***	control 17 °C < control 22 °C *** control 22 °C > control 27 °C *** control 27 °C < 15 µg/L 27 °C * control 27 °C < 25 µg/L 27 °C *** carrier 17 °C < carrier 22 °C *** carrier 22 °C > carrier 27 °C ** carrier 22 °C > 15 µg/L 22 °C * 25 µg/L 17 °C < 25 µg/L 22 °C *** 25 µg/L 17 °C < 25 µg/L 27 °C **	15 µg/L 17 °C < 15 µg/L 27 °C ** 15 µg/L 22 °C < 15 µg/L 27 °C **	carrier 17 °C < 15 µg/L 17 °C * carrier 22 °C > 15 µg/L 22 °C * 15 µg/L 17 °C > 15 µg/L 22 °C **
t x T ^a	24 h 17 °C < 96 h 17 °C ** 96 h 17 °C > 96 h 22 °C *** 96 h 17 °C > 96 h 27 °C ***	24 h 17 °C < 24 h 22 °C *** 24 h 17 °C < 24 h 27 °C *** 24 h 17 °C < 96 h 17 °C *** 24 h 27 °C > 96 h 27 °C * 96 h 17 °C < 96 h 22 °C *** 96 h 22 °C > 96 h 27 °C ***	24 h 17 °C < 24 h 27 °C *** 24 h 22 °C < 24 h 27 °C ** 96 h 17 °C < 96 h 22 °C *** 96 h 17 °C < 96 h 27 °C *	24 h 22 °C < 24 h 27 °C * 24 h 27 °C > 96 h 27 °C *** 96 h 17 °C > 96 h 27 °C *

Diferencias significativas: * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

C.: Concentración; t: Tiempo; T^a: Temperatura.

La exposición a cipermetrina causó diferentes efectos en los biomarcadores analizados. El aumento de la actividad enzimática CAT, AChE y CbE se observa a una temperatura dada, e inhibición de GST y CbE en otras de las condiciones de experimentación. En las figuras 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4, tal como indica en su pie se destacan aquellas diferencias significativas entre los grupos expuestos a cipermetrina y lo que se considera su control que el grupo expuesto al excipiente (acetona) que a lo largo del trabajo denominaremos carrier.

4.1.1.1. Catalasa

Respecto a la interacción $C \times t \times T^a$ es notable el aumento significativo de la actividad CAT a las 24 h en los mejillones expuestos a una concentración de cipermetrina de 25 $\mu\text{g/l}$ en comparación al carrier en los grupos experimentales mantenidos a 22 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 4.1). Por otro lado, después de 96 h de exposición, la actividad CAT disminuye con el aumento de la temperatura desde 17 $^{\circ}\text{C}$ a 22 $^{\circ}\text{C}$ en todos los tratamientos con cipermetrina, como se observa en la Fig. 4.1, (O vs S y P vs T). La actividad más alta se alcanzó después de 24 h de exposición a cipermetrina en el grupo aclimatado a 22 $^{\circ}\text{C}$, mientras que en el grupo mantenido a 17 $^{\circ}\text{C}$ el valor más alto se alcanzó después de 96 horas. Un mayor tiempo de exposición a cipermetrina aumentó significativamente la actividad CAT en mejillones mantenidos a 17 $^{\circ}\text{C}$ (O vs C y D vs P en Fig. 4.1).

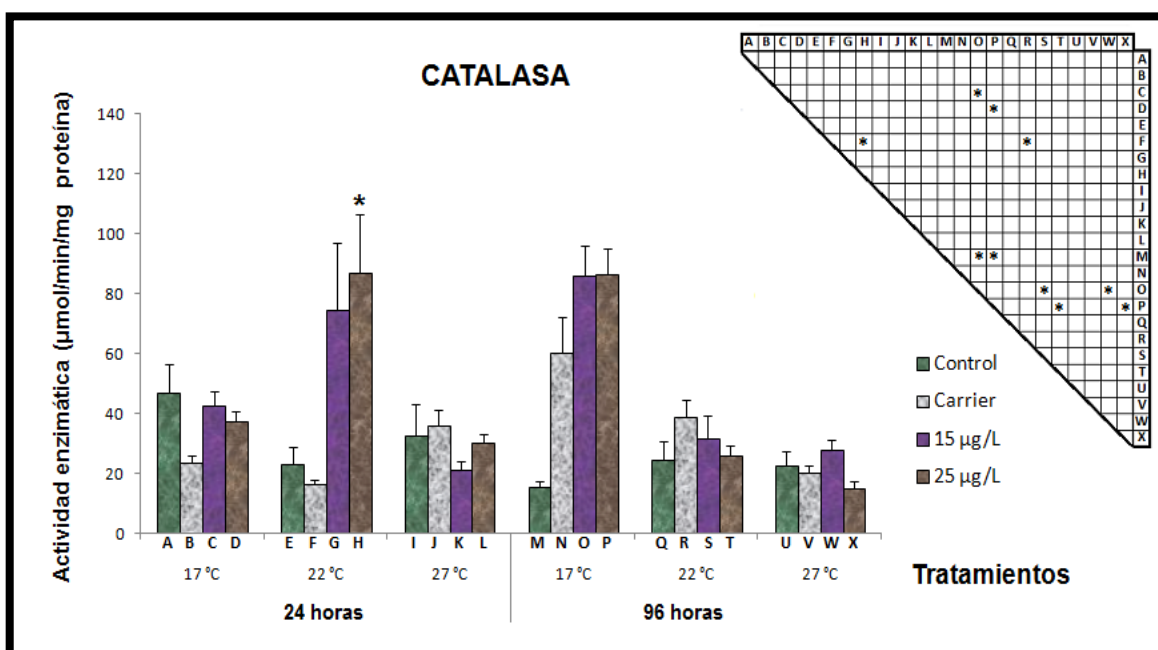


Figura 4.1.- Actividad CAT en las branquias de *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina. En ordenadas cada letra señala un tratamiento. Las barras representan la media \pm SEM (n = 15). Las diferencias significativas entre los tratamientos se indican mediante asteriscos en la tabla triangular ($p < 0,05$). El asterisco sobre las barras representa las diferencias significativas entre cada tratamiento con cipermetrina respecto al carrier a una temperatura y un tiempo específico.

Se observó un aumento de la actividad CAT después de 96 h de exposición a cipermetrina en mejillones aclimatados a 17 °C, siendo superior al control (Fig. 4.1, M vs O, P). Sin embargo, a una temperatura superior (22 °C), este efecto se produce en las primeras 24 h.

No existen estudios previos sobre el efecto simultáneo del tiempo de exposición y de la temperatura en la respuesta de la CAT a la cipermetrina en *M. galloprovincialis*. Se ha demostrado mediante estudios in vitro e in vivo en ratas que la cipermetrina y sus metabolitos producen especies reactivas de oxígeno (ROS) (Prasanthi et al., 2005). Por otra parte, la exposición subletal a cipermetrina altera el equilibrio oxidante/antioxidante en las branquias del mejillón de agua dulce *Unio gibbus*, conduciendo a la carbonilación de proteínas, a la generación de peróxido de hidrógeno y al aumento del malondialdehído (Khazri et al., 2015).

La influencia de la temperatura y la exposición a cipermetrina sobre la actividad CAT (Fig. 4.1) observada en el presente trabajo es consistente con otros estudios como se observa en las tablas 4.3 y 4.4. Se ha sugerido la liberación celular de ROS en mejillones, como consecuencia de la exposición a altas temperaturas, produciendo la disminución de la actividad de la CAT (Kefaloyianni et al., 2005, Verlecar et al., 2007 y Lockwood et al., 2010). Un aumento inicial en la actividad catalasa puede ir seguido de una disminución progresiva de las actividades enzimáticas como se observa a 27 °C en el presente trabajo (Viarengo et al., 2007). De forma similar, Attig et al. (2014) encontraron una correlación inversa entre la temperatura de aclimatación y la actividad CAT en un experimento sobre los efectos del estrés térmico y la exposición a níquel en *M. galloprovincialis*. Bocchetti et al. (2008) describieron que la actividad CAT disminuyó en las glándulas digestivas de *M. galloprovincialis* durante el período más cálido. Resultados similares en cuanto a temperatura de aclimatación, tiempo de exposición y respuesta a concentraciones subletales de cipermetrina fueron encontrados por David et al. (2012) en renacuajos de *Duttaphrynus melanostictus*. A pesar de la intensa investigación llevada a cabo en mamíferos, los mecanismos moleculares que controlan la expresión de CAT no se conocen en su totalidad (Glorieux et al., 2015). Se ha descrito una regulación negativa de CAT por ROS en células mesangiales de rata (Venkatesan et al. 2007).

No obstante, Regoli y Giuliani (2014) presentan un modelo celular para animales marinos en el que las interacciones entre los diferentes factores ambientales, la generación de ROS y el inicio del estrés oxidativo están modulados por cambios en los niveles y funciones de proteínas de señalización sensibles al estado redox y por los factores de transcripción.

Nuestros resultados junto con lo descrito en mencionados estudios llevan a la hipótesis de que el aumento de la actividad CAT al principio de la exposición en la temperatura intermedia podría ser parte de los procesos desencadenados para superar el estrés oxidativo inicial (24 h), seguido por una disminución de la misma actividad como consecuencia de las presiones oxidativas causada por el efecto combinado de la cipermetrina y la temperatura tras 96 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.3.- Efectos sobre biomarcadores provocados por piretroides en moluscos bivalvos.

Especie	Tipo	Órgano	Piretroide	Dosis	Exposición	Biomarcadores y efectos	T °	Autores
<i>Unio gibbus</i>	Mejillón de agua dulce	Branquias	Cipermetrina	100-150 µg/L	96 h	CAT ↑; MDA ↑; SOD ↑	18 °C	Khazri et al., 2015
<i>Unio elongatulus eucirrus</i>	Mejillón de agua dulce	Branquias y G. digestiva	Cipermetrina	5-160 µg/L	1, 24, 48, 72 y 96 h.	CAT↓; MDA ↑; GSH↓	12 °C	Koprucu et al., 2010
<i>Unio elongatulus eucirrus</i>	Mejillón de agua dulce	Branquias y G. digestiva	Deltametrina	25-1600 µg/L	1, 24, 48, 72 y 96 h.	CAT↓; MDA ↑; GSH↓	12 °C	Koprucu et al., 2008
<i>Ruditapes decussatus</i>	Almeja de agua salada	Tejido blando	Permetrina	50, 100 y 150 µg/L	5, 10, 15, 20 y 25 días	CAT ↑; AChE ↓	19 °C	Sellami et al., 2014
<i>Unio gibbus</i>	Mejillón de agua dulce	G. digestiva	Cipermetrina	100-150 µg/L	96 h	CAT ↑; AChE ↓; MDA ↑; SOD ↑; GSH↓	18-19 °C	Khazri et al., 2015
<i>Venerupis decussata</i>	Almeja de agua salada	G. digestiva	Permetrina	100 µg/L	48 h	CAT ↑; GST ↑; SOD ↑	19 °C	Sellami et al., 2015
<i>Ruditapes decussatus</i>	Almeja de agua salada	G. digestiva	Permetrina	100 µg/L	48 h	CAT ↑; GST ↑; SOD ↑	19 °C	Sellami et al., 2014
<i>Unio ravoisieri</i>	Mejillón de agua dulce	Tejido blando	Permetrina	50 y 100 µg/L	168 h	CAT ↑↓*; GST ↑; AChE ↓; MDA ↑; GSH↓	17 °C	Khazri et al., 2016

* Aumento de CAT con la concentración más baja e inhibición con la más alta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.4.- Efectos sobre biomarcadores provocados por temperatura y/o diferentes agentes estresantes en moluscos bivalvos.

Especie	Bivalvo	Órgano	Estresante	Exposición	Biomarcadores y efectos con Tª	Tª	Autores
<i>M. galloprovincialis</i>	Mejillón	G. digestiva	Nickel y Tª	24 y 72 h	CAT ↓; GST ↓; SOD ↓	18,22 y 26 °C	Banni et al., 2014
<i>Perna viridis</i>	Mejillón	Branquias y G. digestiva	Mercurio y Tª	72 h	CAT ↑; GST ↑; SOD ↑; TBARs ↑; LPx ↑	20,26 y 32 °C	Verlecar et al., 2007
<i>Mytilus sp.</i>	Mejillón	Branquias	Solo Tª	2, 5, 10, 24, 48, 120 y 240 h	AChE ↑	Entre 1,6 y 22,9 °C*	Pfeifer et al., 2005
<i>M. galloprovincialis</i>	Mejillón	Tejido blando	Lindano y Tª	96 h	CAT ↑	10,15 y 25 °C	Khessiba et al., 2005
<i>M. galloprovincialis</i>	Mejillón	Branquias y G. digestiva	Tª y marea	168 h	CAT (NS); GST (NS); AChE** y GPx (NS)	13,5; 15; 18,5 y 23,5 °C	Vidal-Liñán y Bellas, 2013
<i>M. galloprovincialis</i>	Mejillón	Tejidos blandos	Tª, Sal. y pH	168 h	GST (NS)	Entre 13,0 y 16,1 °C	Bebiano et al., 2007
<i>M. galloprovincialis</i>	Mejillón	Branquias y G. digestiva	Tª y pH	168 h	CAT ↑; GST ↓; SOD ↑; TBARs ↑	22 y 28 °C	Matozzo et al., 2013
<i>Chamelea gallina</i>	Almeja	Branquias y G. digestiva	Tª y pH	168 h	CAT ↑; GST ↓; SOD ↑; TBARs ↓	22 y 28 °C	Matozzo et al., 2013
<i>M. galloprovincialis</i>	Mejillón	G. digestiva	Nickel y Tª	96 h	CAT ↓; AChE ↓; MDA ↑; MT ↑	18, 20, 22,24 y 26 °C	Attig et al., 2014
<i>M. galloprovincialis</i>	Mejillón	Branquias, manto y G. digestiva	Cloro y Tª	15 y 30 días	CAT ↓; GST ↓; AChE ↓; LPO ↓	15,20 y 25 °C	López-Galindo et al., 2014
<i>Mytilus chilensis</i>	Mejillón	Branquias y G. digestiva	O2 (d) y Tª	6 semanas	CAT (NS); GST ↑; SOD ↓; LPO (NS)	Entre 4,1 y 10,5 °C	Giarratano et al., 2011
<i>Scapharca broughtonii</i>	Almeja	Branquias y G. digestiva	Tª y Sal.	3, 6, 12, 24 y 48 h	CAT ↑; SOD ↑; LPO ↑	10,20 y 30 °C	An y Choi, 2010
<i>Patinopecten yessoensis</i>	Vieira	G. digestiva	Solo Tª	0, 3, 6, 9, 12, 24, 48, y 72 h	CAT ↑; SOD ↑; ACP ↑; LSZ ↓	5,10,15 y 20 °C	Jiang et al., 2016
<i>Anodonta cygnea</i>	Mejillón	Branquias y G. digestiva	O2 (d), pH y Tª	4,6 y 8 semanas	CAT ↑; AChE ↓; GST ↑	Entre 7 y 22 °C	Robillard et al., 2003
<i>Adamussium colbecki</i>	Vieira	G. digestiva	Cu, Hg y Tª	0, 72 y 144 h	CAT ***; GST*** ↓; GR ↑	Entre 0 y 34 °C	Regoli et al., 1997

* Los mejillones se extrajeron en diferentes estaciones del año a temperaturas que fluctuaban entre 1,6 y 22,9 °C, pero se midió AChE a 14 °C.

** AChE significativo, pero sin tendencia clara.

*** CAT sin una tendencia clara aumentando y disminuyendo con la Tª. GST Aumenta entre 0 y 19 °C y luego disminuye hasta los 34 °C, similar a nuestro trabajo.

4.1.1.2. Glutación-S-transferasa

Considerando la interacción de los tres factores (C x t x T^a) se observa una disminución significativa de la actividad GST en los mejillones expuestos a 15µg/l de cipermetrina en comparación con el carrier tras 96 h en los mejillones mantenidos a 22 °C (Fig. 4.2). En mejillones aclimatados a 27 °C la actividad GST aumentó después de 24 h de experimentación en todos los tratamientos (carrier o cipermetrina) que contenían acetona en relación con el grupo control (Fig. 4.2, comparación I vs J, K y L). Considerando únicamente el factor temperatura, la actividad GST mostró un patrón en forma de campana que aumentó de 17 °C a 22 °C y luego se redujo de 22 °C a 27 °C (Tabla 4.2). Después de 96 h de experimentación, se observó la mayor actividad de GST en mejillones mantenidos a 22 °C (t x T^a, Tabla 4.2), mientras que, si sólo se considera el factor tiempo, se incrementa la actividad GST de 24 h a 96 h (Tabla 4.2).

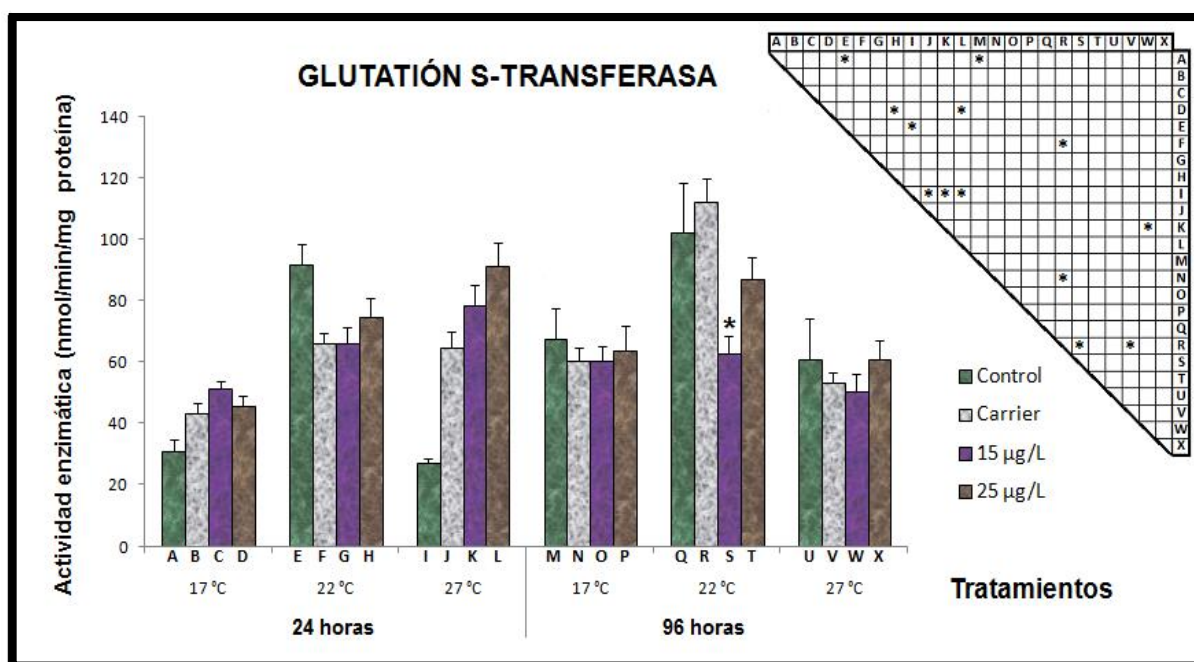


Figura 4.2.- Actividad GST en las branquias de *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina. En ordenadas cada letra señala un tratamiento. Las barras representan la media ± SEM (n = 15). Las diferencias significativas entre los tratamientos se indican mediante asteriscos en la tabla triangular (p <0,05). El asterisco sobre las barras representa las diferencias significativas entre cada tratamiento con cipermetrina respecto al carrier a una temperatura y un tiempo específico.

Las diferencias que se encuentran entre los animales mantenidos a 22 °C y expuestos durante 96 h a 15µg/l de cipermetrina con respecto al grupo expuesto al carrier en las mismas condiciones nos indica una respuesta específica al piretroide.

El papel de la actividad GST en la desintoxicación de piretroides ha sido objeto de debate. Rose et al. (1995) en un estudio en insectos sugiere que la resistencia se asocia con un aumento en la actividad GST, pero sin conferir una alta resistencia dado que su función en la desintoxicación de piretrinas y piretroides no juega un papel demasiado relevante.

En cuanto al efecto de la temperatura de aclimatación sobre la actividad GST (Tabla 4.2), tomando en conjunto todos los grupos experimentales respecto a la exposición a cipermetrina y tiempo, se observa que el valor más alto se corresponde con los animales expuestos a 22 °C respecto de la temperatura baja (17 °C) y alta (27 °C). Attig et al. (2014) y Banni et al. (2014) estudiaron la actividad GST en glándula digestiva de *M. galloprovincialis* expuestos a Ni y sometidos a diferentes temperaturas, encontrando el mismo patrón al de nuestro estudio, ya que la actividad GST aumentó de 18 °C a 22 °C para disminuir de 22 °C a 26 °C (Ver Tablas 4.3 y 4.4). De forma similar Regoli et al. (1997) observaron en la vieira antártica *Adamussium colbecki* que la actividad GST aumentaba con la temperatura hasta los 19 °C y se reducía a temperaturas mayores. A 22 °C el aumento de la actividad GST a las 24 h en las branquias de los mejillones expuestos a cipermetrina y en aquellos expuestos a carrier (acetona), en relación con el grupo control, podría estar relacionado con procesos de desintoxicación de la acetona; ya que la GST participa en la fase II de la biotransformación tanto de la cipermetrina (Gowland et al, 2002) como de la acetona (Brondeau et al, 1989), así como en la defensa frente al estrés oxidativo.

El aumento de la actividad de GST a lo largo del tiempo (Tabla 4.2) puede indicar la activación de los mecanismos protectores necesarios para la eliminación de los radicales reactivos de oxígeno producidos. En un estudio similar, David et al. (2012) encontraron que la actividad GST aumentó significativamente de 24 h a 96 h en la exposición de renacuajos (*D. melanostictus*) a la concentración subletal de cipermetrina.

4.1.1.3. Acetilcolinesterasa

La actividad AChE en branquia de animales expuestos a una concentración de 15 µg/l de cipermetrina durante 96 h y mantenidos a 27 °C fue superior a la determinada en el grupo de animales expuestos al carrier (Fig. 4.3). Como se observa en las Tablas 4.1 y 4.2 hay un aumento de la actividad de la AChE con el aumento de la temperatura.

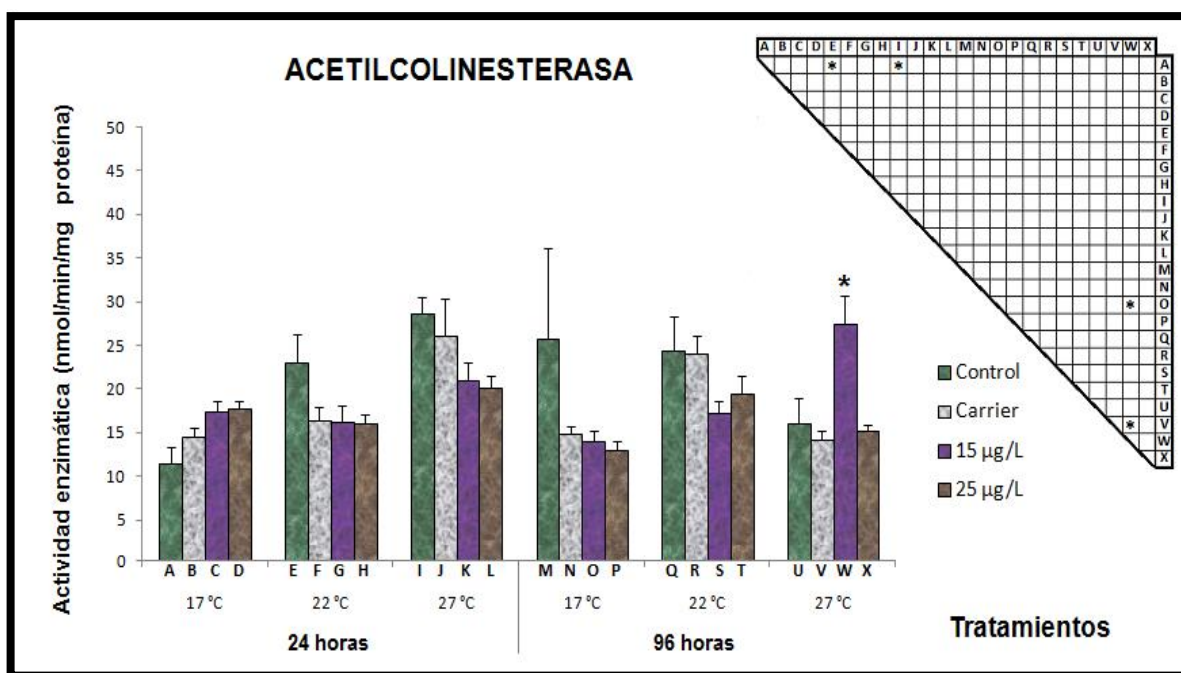


Figura 4.3.- Actividad AChE en las branquias de *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina. En ordenadas cada letra señala un tratamiento. Las barras representan la media \pm SEM (n = 15). Las diferencias significativas entre los tratamientos se indican mediante asteriscos en la tabla triangular ($p < 0,05$). El asterisco sobre las barras representa las diferencias significativas entre cada tratamiento con cipermetrina respecto al carrier a una temperatura y un tiempo específico.

Aunque no se tiene constancia de la existencia de estudios previos que consideren simultáneamente los factores concentración de cipermetrina, tiempo de exposición y temperatura en tejidos de *M. galloprovincialis*, el aumento de la actividad AChE en branquia con el aumento de temperatura que se ha encontrado (ver Tabla 4.1 y 4.2) en los resultados de otras investigaciones (Ver Tablas 4.3 y 4.4). Sin embargo, en las mismas tablas anteriores también se puede visualizar el efecto contrario y otro sin tendencia clara obtenidos por otros Autores. En *Mytilus* sp la actividad AChE en branquias se correlacionó con los cambios estacionales de temperatura en el mismo sentido que nuestros resultados (Pfeifer et al., 2005). De hecho, Bocquene y Galgani (1998) apuntaron que la temperatura es el principal factor responsable de la variabilidad natural de esta actividad en comparación con otros factores biológicos en los tejidos de esta especie.

4.1.1.4. Carboxilesterasa

Los valores de la actividad carboxilesterasa en las branquias de mejillones correspondientes a los diferentes grupos experimentales establecidos se muestran en la figura 4.4. Esta forma de mostrar los resultados no evidencia ningún patrón claro en cuanto a los efectos de los diferentes factores considerados pero la interpretación del ANOVA a través de las Tablas 4.1 y 4.2 permite detectar algunos efectos significativos de las variables consideradas. La actividad CbE aumentó en mejillones expuestos a una concentración de cipermetrina de 15 µg/L en comparación con el carrier a 17 °C, mientras ocurrió una inhibición significativa de esta actividad comparando los mismos grupos mantenidos a 22 °C. Considerando solo el factor tiempo la actividad CbE disminuye de 24 h a 96 h (Tabla 4.2).

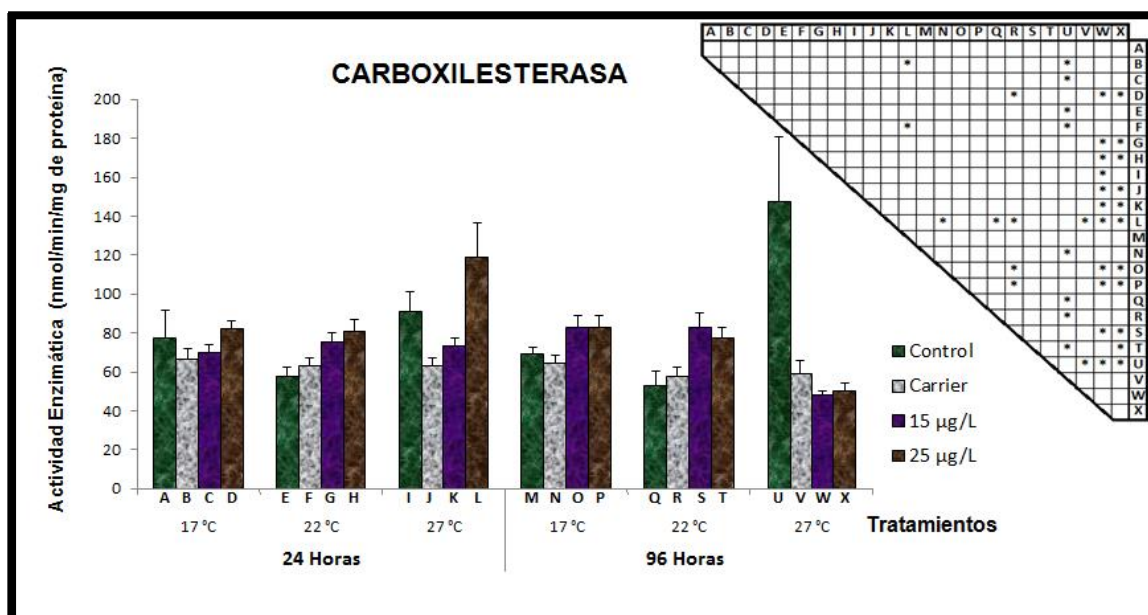


Figura 4.4.- Actividad CbE en las branquias de *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina. En ordenadas cada letra señala un tratamiento. Las barras representan la media ± SEM (n = 15). Las diferencias significativas entre los tratamientos se indican mediante asteriscos en la tabla triangular (p < 0,05).

Con respecto a los efectos de la cipermetrina sobre la actividad CbE en bivalvos, existen pocos estudios publicados, a pesar de que esta enzima cataliza reacciones que constituyen las principales vías de desintoxicación de los piretroides en numerosos organismos (Wheelock et al., 2008).

Los resultados hasta aquí presentados demuestran que en *M. galloprovincialis* la temperatura ambiental y el tiempo de exposición determinan la respuesta de las actividades enzimáticas branquiales estudiadas a la cipermetrina.

4.1.2. Compensación térmica en la actividad de enzimas antioxidantes en branquias de *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina

Como se ha explicado en el apartado de materiales y métodos, para poner de manifiesto la existencia del mecanismo de compensación térmica en la actividad de los enzimas antioxidantes CAT y GST se han realizado las determinaciones de actividad en dos condiciones diferentes. En un caso se han determinado las actividades de todos los grupos experimentales a la temperatura de 25 °C, con independencia de la temperatura de aclimatación. En esta situación hablaremos, de acuerdo con Abele et al (1998), de “actividades normalizadas”. La otra condición supone realizar las determinaciones a la temperatura a la que los animales han sido aclimatados y las denominaremos “actividades reales” (Abele et al, 1998). Existe compensación térmica en la actividad enzimática si al realizar las determinaciones a 25 °C existen diferencias en las velocidades de reacción entre los grupos de animales aclimatados a diferentes temperaturas de forma que los mantenidos a temperaturas más bajas manifiestan una mayor actividad. El grado de compensación se comprueba al realizar las determinaciones en cada grupo a su temperatura de aclimatación y demostrar que en esas condiciones las velocidades de reacción son similares. La implicación fisiológica de las actividades normalizadas, medidas a una temperatura estándar (es decir, normalizada) de 25 °C, permiten comparar la actividad catalítica en tejidos seleccionados y revelar cantidades cambiantes de enzima activa con temperaturas ambientales crecientes. Por lo tanto, una actividad alta normalizada refleja una mayor cantidad de enzima catalíticamente activa por unidad de tejido. Así, las actividades enzimáticas antioxidantes estándar (normalizadas) también pueden ser una medida apropiada para comparar diversos tejidos por su respuesta al estrés fisiológico, siempre que implique la producción de ROS. Por el contrario, las actividades reales reflejan las tasas reales de enzimas antioxidantes bajo condiciones ambientales específicas (Abele et al., 1998).

Los resultados del ANOVA de 2 factores para los biomarcadores enzimáticos analizados a la temperatura normalizada (25 °C) y real (aclimatación), así como su significancia estadística para cada factor e interacciones se muestran en la Tabla 4.5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.5.- Anova de dos factores: concentración de cipermetrina, temperatura y efecto de su interacción sobre los biomarcadores medidos a temperatura normalizada y temperatura real.

	CAT Temperatura real				GST Temperatura real				CAT Temperatura normalizada				GST Temperatura normalizada			
	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F
Modelo corregido	7,474	11	0,679	11,03***	1,577	11	0,143	6,529***	1,294	11	0,118	1,317	8,923	11	0,811	10,85***
Intercepto	243,2	1	243,2	3949***	375,2	1	375,2	17090***	127,2	1	127,2	1424***	242,7	1	242,7	3245***
C	0,836	3	0,279	4,525**	0,281	3	0,094	4,271**	0,301	3	0,100	1,123	0,865	3	0,288	3,853*
T^a	2,543	2	1,271	20,65***	0,830	2	0,415	18,90***	0,090	2	0,045	0,506	1,718	2	0,859	11,49***
C x T^a	2,102	6	0,350	5,690***	0,318	6	0,053	2,411*	0,875	6	0,146	1,634	5,377	6	0,896	11,98***
Error	7,821	127	0,062		2,788	127	0,022		11,34	127	0,089		9,499	127	0,075	
Total	328,5	139			460,7	139			174,3	139			319,9	139		
Total corregido	15,30	138			4,365	138			12,64	138			18,42	138		

Nivel de significación: * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

SS: Suma de cuadrados; df: Grados de libertad; MS: Cuadrático promedio; F: Test estadístico.

4.1.2.1. Catalasa

Los resultados del ANOVA de 2 factores para los biomarcadores analizados y su significancia estadística para cada factor e interacciones se muestran en la Tabla 4.5. Atendiendo a los resultados de dicho análisis y a las figuras 4.5 y 4.6 podemos proponer un mecanismo de compensación térmica total en este enzima al ser diferentes los valores de las actividades normalizadas en los factores y su interacción (todas medidas a 25 °C), de forma que menor temperatura de aclimatación corresponde una mayor actividad normalizada, mientras que las actividades reales (cuantificado a cada temperatura de aclimatación) son todas iguales.

Hay que destacar que las diferencias que observamos en las actividades normalizadas de la actividad catalasa debido a la exposición a carrier (acetona) o cipermetrina (que lleva acetona como carrier) con el control en el grupo aclimatado a 17 °C, desaparecen cuando medimos las actividades en las condiciones reales o de aclimatación. El efecto del tóxico de la cipermetrina sobre la abundancia del enzima existe, pero puede que la repercusión del piretroide sobre la fisiología del mejillón en condiciones reales no sea tan grande.

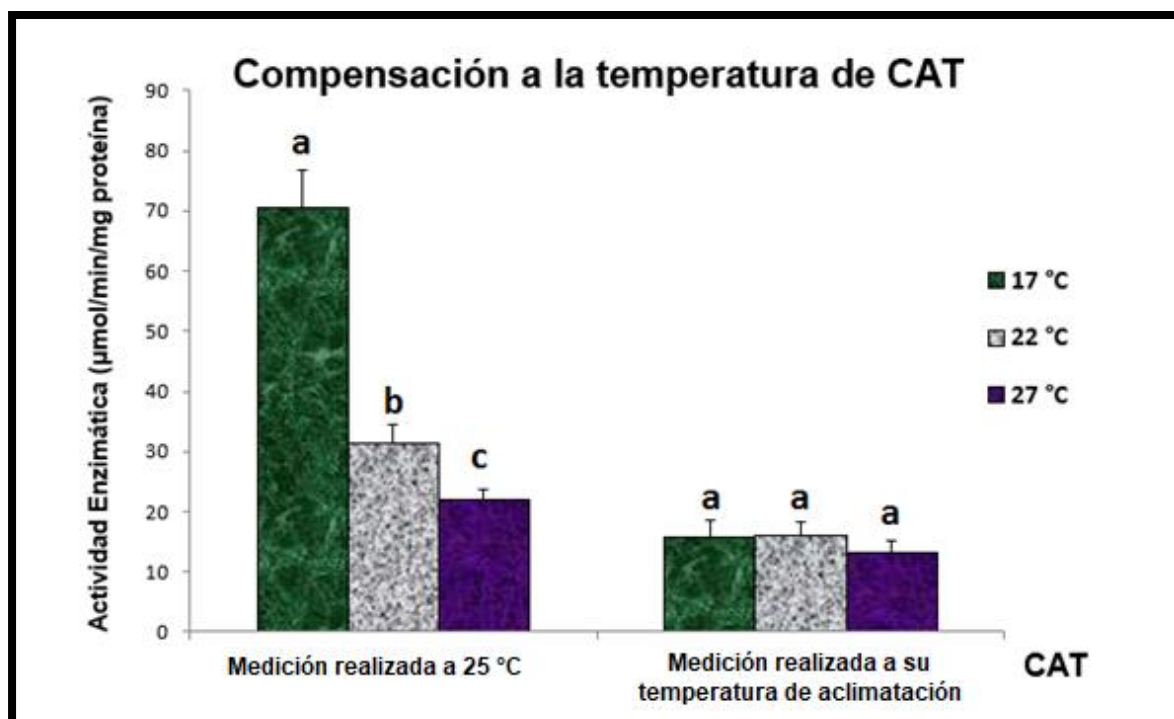


Figura 4.5.- Actividad CAT en las branquias de *M. galloprovincialis* aclimatados a tres temperaturas y determinada a temperatura normalizada (25°C) y temperatura real (aclimatación). Letras diferentes en el gráfico representan diferencias significativas. Los datos representan la media \pm SEM (n=60)

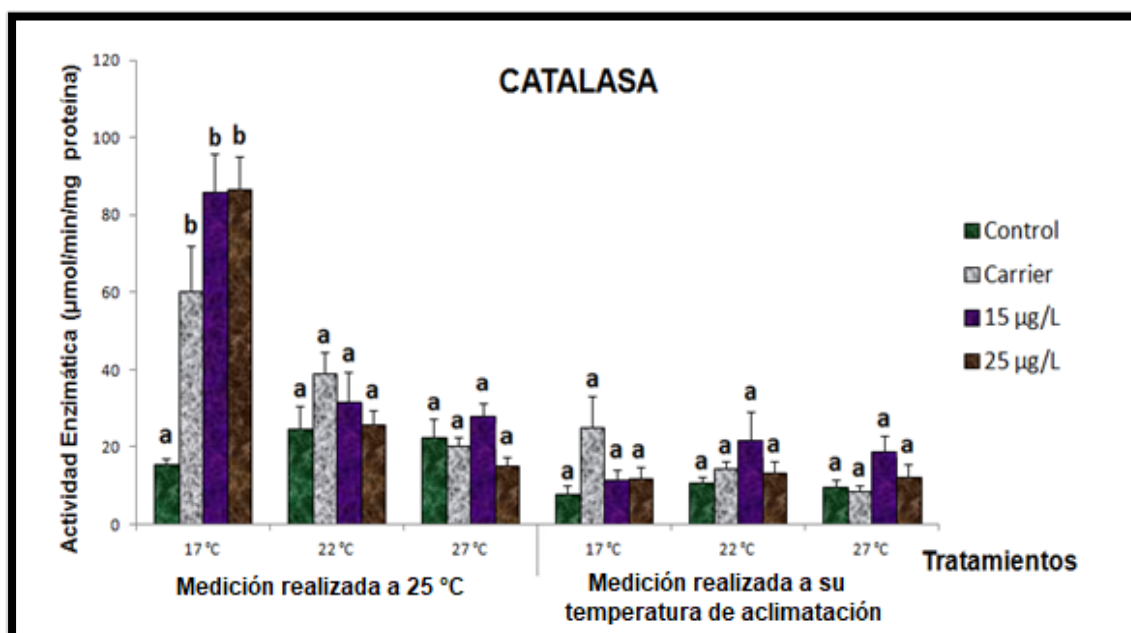


Figura 4.6.- Actividad CAT en las branquias de *M. galloprovincialis* aclimatados a tres temperaturas y expuestos a cipermetrina. Actividad determina a temperatura normalizada (25°C) y temperatura real (aclimatación). Letras diferentes en el gráfico representan diferencias significativas entre tratamientos a una misma temperatura. Los datos representan la media \pm SEM (n=15).

4.1.2.2. Glutati3n-S-transferasa

Los resultados obtenidos tras la determinaci3n de la actividad GST (Tabla 4.5, Fig. 4.7 y 4.8), son diferentes a los encontrados en la actividad CAT ya que en las actividades determinadas en condiciones reales se conservan las diferencias significativas entre temperaturas encontradas en las mediciones normalizadas, tanto a la debida a la temperatura como a la interacci3n de 3sta con el tratamiento (cipermetrina). En la Fig. 4.8 se observa que la inhibici3n de la actividad GST normalizada por cipermetrina encontrada en los animales aclimatados a 22 °C (ya descrita en un apartado anterior) no se manifiesta cuando se realiza la determinaci3n a 22 °C, mientras que en las actividades reales si se detecta una inhibici3n de la GST por cipermetrina en el grupo de animales aclimatados a 17 °C que no era evidente mediante las actividades normalizadas. Todo ello lleva a concluir que la determinaci3n de las actividades de los biomarcadores enzimáticos a la temperatura de aclimataci3n, junto con la determinaci3n a una temperatura normalizada ofrece informaci3n complementaria que permite conocer mejor la influencia de la temperatura sobre el efecto t3xico de un contaminante.

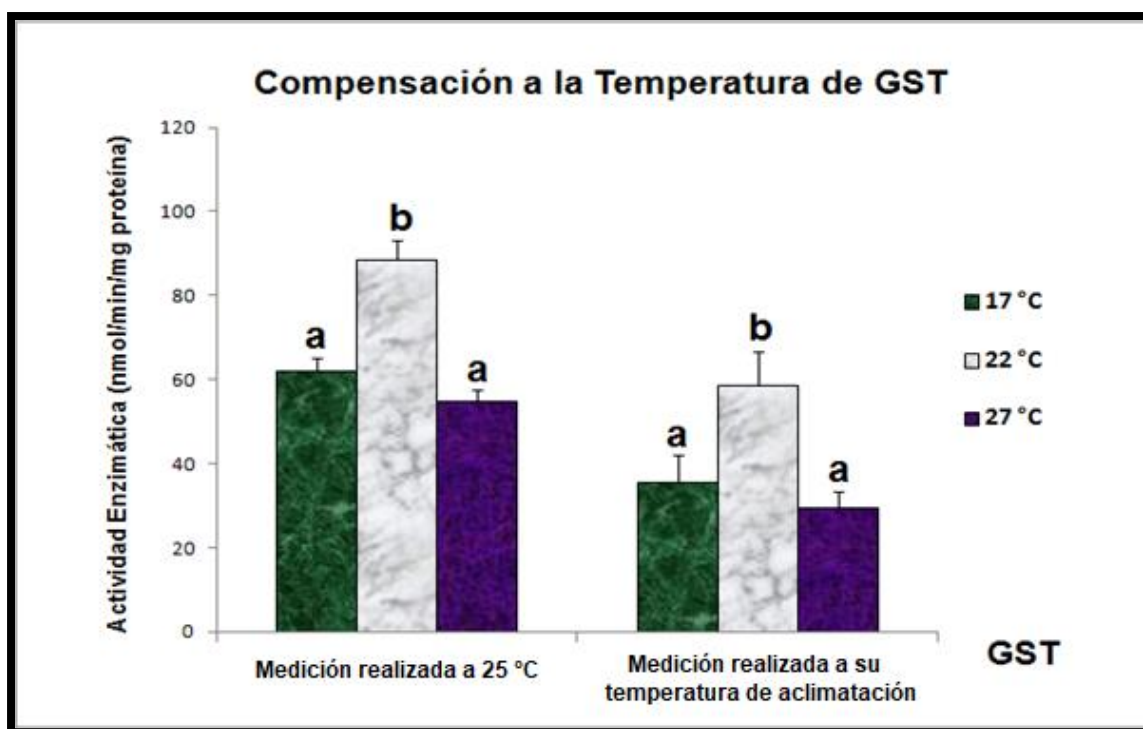


Figura 4.7.- Actividad GST en las branquias de *M. galloprovincialis* aclimatados a tres temperaturas y determinada a temperatura normalizada (25°C) y temperatura real (aclimatación). Letras diferentes en el gráfico representan diferencias significativas. Los datos representan la media \pm SEM (n=60).

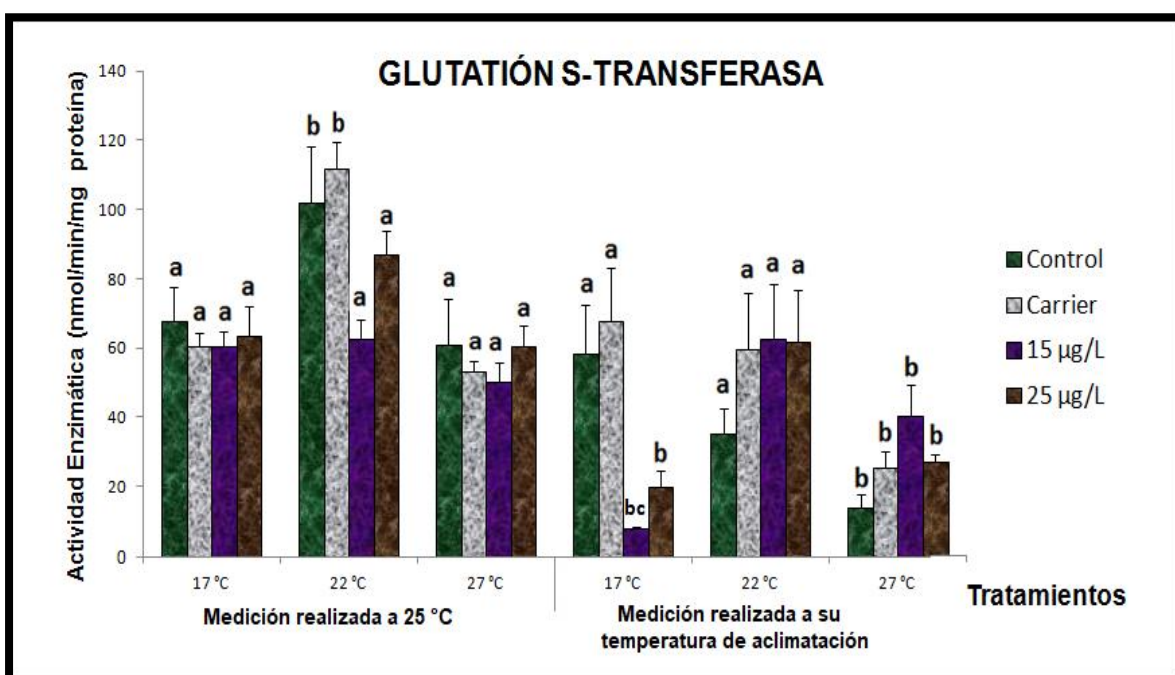


Figura 4.8.- Compensación parcial de la temperatura en branquias de *M. galloprovincialis* para la actividad GST por tratamientos. Letras diferentes en el gráfico representan diferencias significativas entre tratamientos a una misma temperatura. Los datos representan la media \pm SEM, (n=15).

4.1.3. Efecto de la temperatura sobre biomarcadores de exposición en músculo abductor de *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina

Las actividades enzimáticas analizadas en músculo abductor como respuesta a la concentración de cipermetrina y a la temperatura se presentan en las Figuras 4.9, 4.10 y 4.11. Los resultados del ANOVA de 2 factores estudiados (C y T^a) y sus interacciones se muestran en la Tabla 4.6; y tal y como se ha comentado en el primer experimento, se han interpretado analizando primero la interacción de factores y después cada factor individualmente (León y Montero 2001). Nos encontramos que en el músculo abductor la mayor significación estadística se observa en la actividad CbE, seguida de la actividad GST y por último la actividad CAT, no encontrándose ningún efecto de la concentración de cipermetrina y de la temperatura sobre actividad AChE (ver Tabla 4.6). El análisis *post hoc* de cada factor y de sus interacciones se presenta en la Tabla 4.7.

La exposición a cipermetrina en combinación con la temperatura produjo un aumento en la actividad GST y CbE en el grupo expuesto a la concentración más baja de cipermetrina (15 µg/l) y a 17 °C y 22 °C respecto al grupo control y al grupo expuesto al carrier (Fig. 4.10 y 4.11), una disminución de la actividad CAT (Fig. 4.9) solo a la temperatura más baja ensayada, y ningún cambio en la actividad AChE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.6.- Anova de 2 factores (concentración de cipermetrina (C) y temperatura (T^a)) y sus interacciones de las actividades enzimáticas en músculo abductor de *M. galloprovincialis*.

	CAT				GST				AChE				CbE			
	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F
Modelo corregido	2,244	11	0,204	3,009**	1,083	11	0,098	10,04***	0,085	11	0,008	1,422	1,488	11	0,135	15,70***
Intercepto	223,1	1	223,1	3291***	313,0	1	313,0	31917***	73,59	1	73,59	13546***	184,1	1	184,1	21370***
C	0,719	3	0,240	3,532*	0,371	3	0,124	12,61***	0,023	3	0,008	1,436	0,785	3	0,262	30,39***
T^a	0,523	2	0,262	3,858*	0,358	2	0,179	18,24***	0,021	2	0,010	1,924	0,313	2	0,156	18,14***
C x T^a	0,985	6	0,164	2,422*	0,142	6	0,024	2,420*	0,029	6	0,005	0,885	0,326	6	0,054	6,311***
Error	8,611	127	0,068		1,245	127	0,010		0,690	127	0,005		1,094	127	0,009	
Total	276,8	139			392,2	139			91,35	139			227,2	139		
Total corregido	10,86	138			2,328	138			0,775	138			2,582	138		

Nivel de significación: * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

SS: Suma de cuadrados; df: Grados de libertad; MS: Cuadrático promedio; F: Test estadístico.

Tabla 4.7.- Análisis post hoc de las actividades enzimáticas para diferentes niveles entre los factores y sus interacciones en músculo abductor de *M. galloprovincialis*.

	CAT	GST	CbE
	Diferencias en cada factor y su interacción	Diferencias en cada factor y su interacción	Diferencias en cada factor y su interacción
C	carrier < 25 µg/L*	control < 15 µg/L*** control < 25 µg/L* carrier < 15 µg/L***	control < 15 µg/L** carrier < 15 µg/L*** 15 µg/L > 25 µg/L***
T^a	22 °C > 27 °C *	17 °C > 27 °C *** 22 °C > 27 °C ***	17 °C > 22 °C *** 22 °C < 27 °C ***
C x T^a	control 17 °C > 15 µg/L 17 °C * 15 µg/L 17 °C < 15 µg/L 22 °C **	control 17 °C < 15 µg/L 17 °C ** control 22 °C < 15 µg/L 22 °C *** carrier 17 °C > carrier 27 °C ** carrier 17 °C < 15 µg/L 17 °C ** carrier 22 °C < 15 µg/L 22 °C* 15 µg/L 17 °C > 15 µg/L 27 °C *** 15 µg/L 22 °C > 15 µg/L 27 °C ***	control 17 °C < 15 µg/L 17 °C ** control 22 °C < 15 µg/L 22 °C ** carrier 17 °C > carrier 22 °C * carrier 17 °C < 15 µg/L 17 °C *** carrier 22 °C < carrier 27 °C *** carrier 22 °C < 15 µg/L 22 °C*** 15 µg/L 17 °C > 15 µg/L 27 °C ** 15 µg/L 17 °C > 25 µg/L 17 °C *** 15 µg/L 22 °C > 25 µg/L 22 °C *** 25 µg/L 17 °C > 25 µg/L 22 °C * 25 µg/L 22 °C < 25 µg/L 27 °C *

Nivel de significación: * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.1.3.1. Catalasa

La actividad CAT en el músculo abductor, considerando la interacción de los dos factores estudiados ($C \times T^a$), sólo se vio afectada de forma significativa en el grupo de mejillones expuesto a la concentración más baja de cipermetrina (15 $\mu\text{g/l}$) y de temperatura (17 °C). En la Tabla 4.9 se observa que la actividad CAT disminuyó con la T^a , presentando el grupo de mejillones aclimatado a 27 °C los valores más bajos. Considerando sólo la concentración de cipermetrina podemos ver que la actividad de CAT se incrementa con la concentración, pero solo es significativo en comparación con el grupo expuesto al carrier (Tabla 4.7, Fig. 4.9).

La disminución de la actividad CAT encontrada en el músculo abductor de *M. galloprovincialis* en respuesta a la temperatura y la cipermetrina ha sido descrita en otros tejidos de moluscos bivalvos (ver Tabla 4.3 y Tabla 4.4). Una disminución de la actividad CAT y de la GSH asociado a un incremento significativo de la peroxidación lipídica en las branquias y la glándula digestiva tras 96 h de exposición a cipermetrina y deltametrina (ver Tablas 4.3) ha sido descrita para el mejillón de agua dulce *Unio elongatulus eucirru* (Köprücü et al. 2008; 2010). Estos estudios sugieren que la correlación negativa observada entre la peroxidación lipídica y la actividad CAT o GSH estaría reflejando el papel protector de estas enzimas frente a la peroxidación lipídica, y proponen su uso como biomarcadores de toxicidad asociado a la exposición de contaminantes en mejillones de agua dulce (Köprücü et al. 2008). El aumento de la temperatura ha sido descrito como un factor abiótico de liberación celular de ROS en mejillones que puede producir una disminución en la actividad de la CAT, tal y como ocurre en el grupo expuesto a 27 °C (Kefaloyianni et al., 2005; Verlecar et al., 2007; Lockwood et al., 2010). En el presente estudio la disminución en la actividad CAT también se observó en las branquias en el grupo aclimatado a 27 °C (ver Fig. 4.1). No obstante, la disminución de la actividad CAT en el músculo abductor también podría ser debida a una mayor tasa catabólica y/o a una inhibición directa por parte de la cipermetrina (Viarengo et al., 2007).

Por otro lado, el aumento de la actividad CAT en el músculo abductor en el grupo expuesto a la concentración más alta de cipermetrina (25 $\mu\text{g/l}$) respecto al grupo expuesto al carrier, está en consonancia con los resultados observados por Khazri et al. (2015) en la glándula digestiva del mejillón de agua dulce *Unio gibbus* tras 96 h de exposición a cipermetrina (Ver Tabla 4.3). Este aumento en la actividad CAT podría ser debido a su papel como eliminadores de ROS debido a la presencia del piretroide.

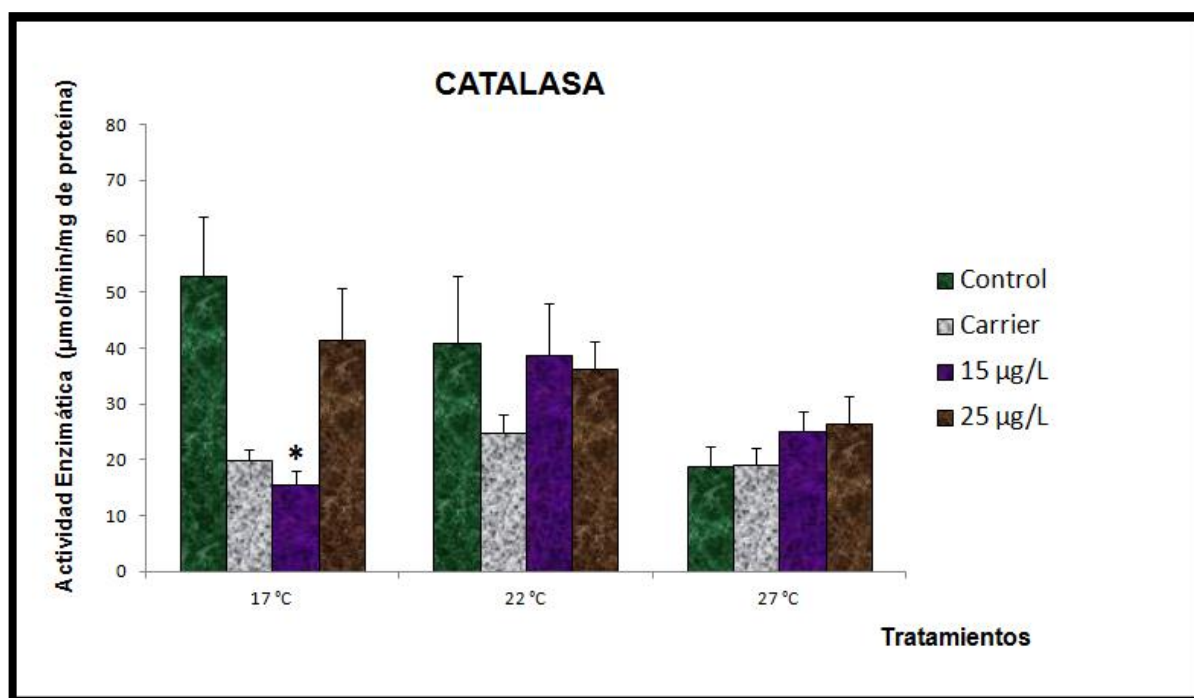


Figura 4.9.- Actividad CAT en el músculo abductor de *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina durante 96 h y a diferentes temperaturas de aclimatación. Las barras representan la media \pm SEM (n = 15). Las diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control se indican mediante asteriscos: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

4.1.3.2. Glutación-S-transferasa

La actividad GST en músculo abductor presenta un aumento significativo en el grupo de mejillones expuesto a la concentración más baja de cipermetrina (15 µg/l) y mantenidos a 17 °C y 22 °C respecto al control y carrier (Fig. 4.10 y Tabla 4.7). Por otro lado, se observa que al analizar el factor temperatura hay una disminución de la actividad GST a 27 °C en todos los grupos experimentales. Aunque el principal papel del sistema de enzimas multifuncionales GST es facilitar la conjugación de glutatión endógeno con electrófilos, dando lugar a compuestos más polares para que puedan ser excretados o metabolizados; la GST también funciona como una enzima antioxidante al conjugar los productos de descomposición de los peróxidos lipídicos a glutatión (Ketterer et al., 1983; Lee, 1991). El aumento en la actividad GST encontrada en el músculo abductor a 17 °C y 22 °C podría estar relacionado tanto con procesos de desintoxicación al ser una enzima de fase II, como con un posible papel antioxidante, tal y como se ha descrito para algunas isoenzimas GST en insectos que muestran actividad peroxidasa (Ahmad, 1992).

En relación con la disminución de la GST a 27 °C obtenida en el presente trabajo podría indicar una sensibilidad térmica del músculo debido a la presencia de diferentes isoformas en el mismo (Robertson et al., 1986; Kim et al., 2009). De la misma forma, López-Galindo et al. (2014) encontraron una relación inversa entre la temperatura y la actividad GST en diferentes tejidos en la misma especie de mejillón. En relación con el efecto de la temperatura de aclimatación sobre la actividad GST, y tal y como se ha comentado en el apartado 4.1.2, diferentes estudios señalan para moluscos bivalvos un aumento de la actividad a temperaturas entre 18-22 °C, próximas a su óptimo, seguido de una disminución de la misma a temperaturas más altas (Ver Tablas 4.3 y 4.4). De hecho, las diferentes isoenzimas de GSTs son miembros de una familia multigénica presente en todos los organismos, y la diversidad estructural dentro de la familia GST de las isoenzimas proporciona la capacidad de conjugar una gama muy amplia de compuestos, lo que las hace específicas para cada especie y órgano a la tolerancia térmica (Robertson et al., 1986). Así, por ejemplo, mientras Kim et al., (2009) encontraron una inducción en la expresión de la clase pi GST por estrés térmico en las branquias y en la glándula digestiva del molusco bivalvo antártico *Laternula elliptica*; López-Galindo et al. (2014) observaron una inhibición de la GST en las branquias en *M. galloprovincialis* al aumentar la temperatura, al igual que en el presente estudio.

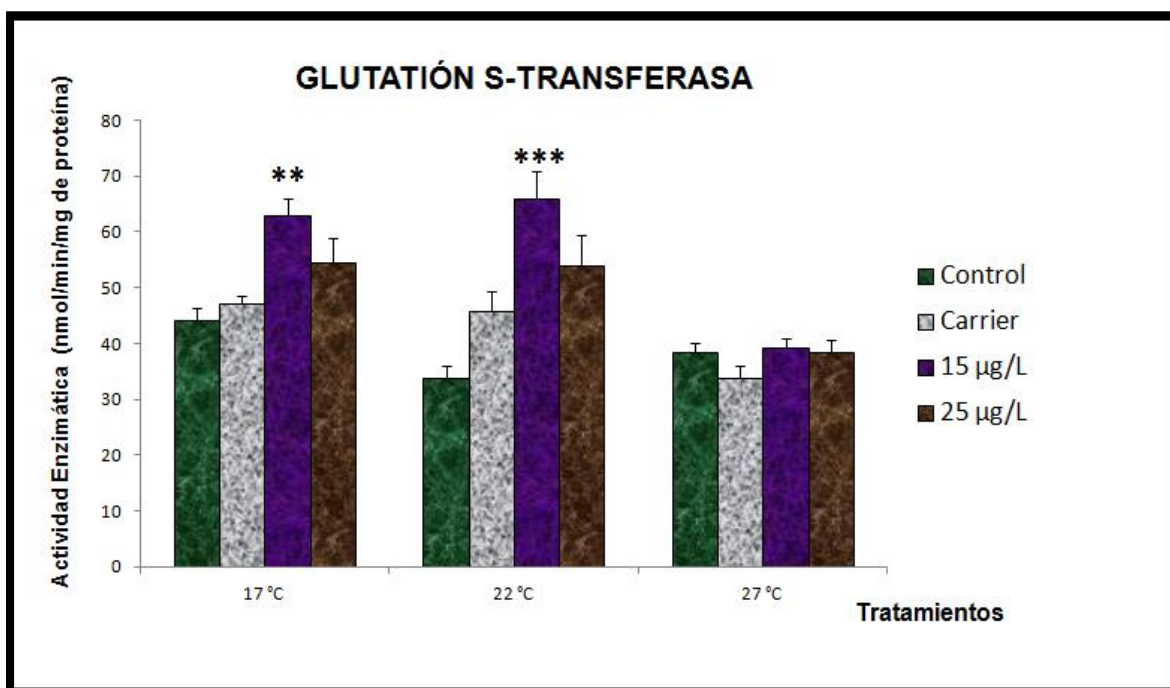


Figura 4.10.- Actividad GST en músculo abductor del mejillón *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina durante 96 h y a diferentes temperaturas de aclimatación. Los datos representan la media \pm SEM (n = 15). Las diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control se indican mediante asteriscos: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4.1.3.3. Acetilcolinesterasa

La actividad de AChE en músculo abductor no presentó cambio significativo en ningún grupo experimental (Tabla 4.6). No se tiene constancia de estudios previos que analicen el músculo abductor como tejido sensible a piretroides. La mayoría de los trabajos realizados en moluscos bivalvos sólo utilizan branquias y/o glándula digestiva como tejidos sensibles a la exposición de pesticidas, incluidos los piretroides de clase II (cipermetrina y deltametrina). Sin embargo, si hay evidencias del efecto neurotóxico de estos compuestos en diferentes tejidos en peces, incluido el músculo, asociado a una fuerte inhibición de la actividad AChE y a alteraciones del comportamiento (Singh et al., 2018). Todo esto indica poca sensibilidad del músculo de *M. galloprovincialis* en exposiciones agudas (96 h) a concentraciones realísticas de cipermetrina, frente al aumento de AChE observada en la branquia como respuesta a la temperatura y a la cipermetrina (ver apartado 4.1.3, Fig. 4.3).

4.1.3.4. Carboxilesterasa

En la Fig. 4.11 y Tabla 4.7 se observa un aumento significativo de la actividad CbE en mejillones expuestos a la concentración de cipermetrina más baja (15 µg/l) y aclimatados a 17 °C y 22 °C respecto al control y carrier. Por otro lado, se observa que al analizar solo el factor temperatura hay una disminución significativa de la actividad CbE a 22 °C.

Como ya se comentó anteriormente (apartado 4.1.4), los estudios sobre los efectos de la cipermetrina sobre las carboxilesterasa son escasos. Estas son enzimas muy eficaces en la hidrolización de piretroides a su correspondiente ácido y alcohol, lo que generalmente reduce significativamente la toxicidad observada (Wheelock et al., 2008), y produce un aumento en su actividad. Este hecho ha permitido identificar a la actividad CbE como un biomarcador muy sensible frente a piretroides en organismos acuáticos (Denton et al., 2003). En este estudio, se demuestra un aumento en la CbE en el músculo abductor de los mejillones expuestos a cipermetrina a baja temperatura, y su disminución con el incremento de temperatura, apoyando estudios previos que señalan su sensibilidad como biomarcador, no obstante, no se ha encontrado una clara relación dosis-respuesta.

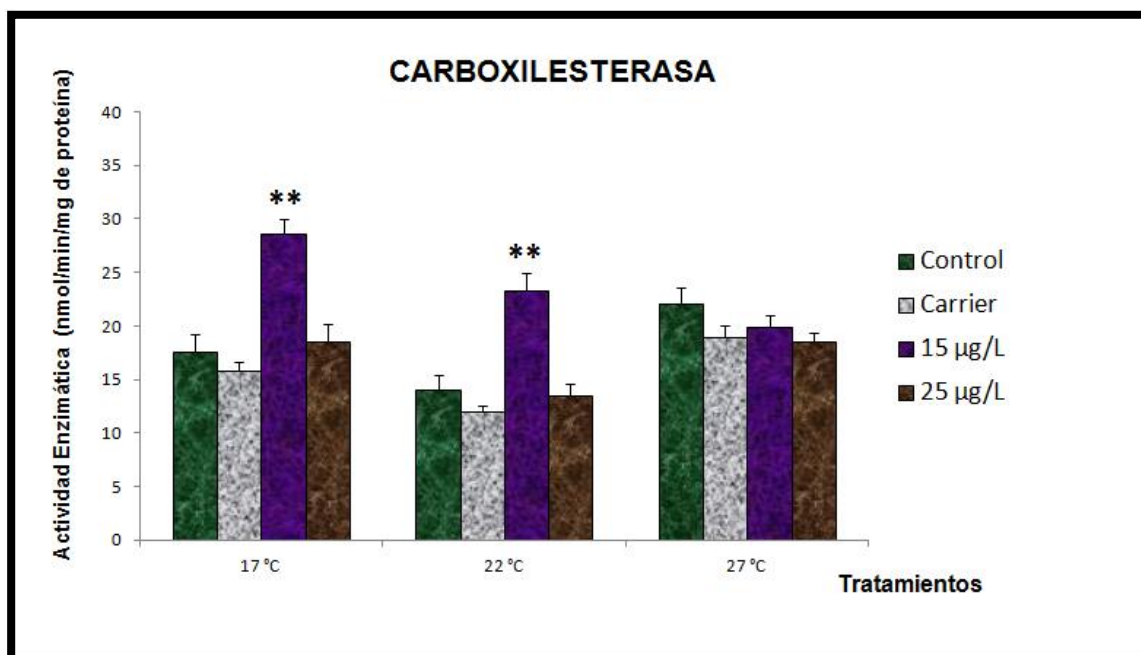


Figura 4.11. Actividad CbE en músculo abductor del mejillón *M. galloprovincialis* expuestos a cipermetrina durante 96 h y a diferentes temperaturas de aclimatación. Los datos representan la media \pm SEM (n = 15). Las diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al carrier se indican mediante asteriscos: * p < 0,05; ** p < 0,01.

4.1.3.5. Principales correlaciones entre biomarcadores

En la Tabla 4.8 se presenta la matriz de correlación de Pearson de las actividades enzimáticas determinadas en el músculo abductor de *M. galloprovincialis* con la finalidad de analizar la dependencia entre ellas.

Tabla 4.8.- Matriz de correlación de Pearson (coeficiente r de producto-momento) de las actividades determinadas en el músculo abductor de *M. galloprovincialis*.

	Músculo			
	CAT	GST	AChE	CbE
CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	1			
GST ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	0,40**	1		
AChE ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	0,20*	0,34**	1	
CbE ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	0,02	0,48**	0,20*	1
Correlaciones significativas: * P < 0,05; ** p < 0,01				

Las correlaciones lineales entre las diferentes actividades enzimáticas en el músculo abductor han sido todas positivas, presentado una mayor significación entre GST y CbE (0,48 **), GST y CAT (0,40 **) y GST y AChE (0,34 **). Estos resultados corroboran estudios anteriores que describen una buena correlación entre las actividades GST y CAT en *M. galloprovincialis* y *M. Edulis* (Borković et al., 2005; Leiniö y Lehtonen, 2005).

4.2. Efectos de la cipermetrina y la deltametrina en el poliqueto *Perinereis vancaurica*

Las exposiciones de los poliquetos a cipermetrina (15 µg/l) y deltametrina (3 µg/l) durante 24 h y 96 h no produjo mortalidad. Las actividades enzimáticas analizadas en las diferentes partes del poliqueto bajo las diferentes condiciones ensayadas (compuesto y tiempo de exposición) se muestran en las figuras 4.12, 4.13, 4.14 y 4.15. En las tablas 4.9 y 4.10 se muestran los resultados de la ANOVA de dos factores considerando sus interacciones, y en las tablas 4.11 y 4.12 se presentan los resultados del análisis pos hoc. Su interpretación se ha realizado siguiendo las recomendaciones de León y Montero (2001) tal como se ha explicado en el apartado 4.1.

No se produjo mortalidad como consecuencia de los tratamientos, pero se observaron cambios cualitativos en los mismos como alteraciones en la motilidad tras la exposición a cipermetrina y alteraciones morfológicas respecto los animales controles (peladura externa total provocada en la cabeza), faringe evaginada, coloración burdeos de parápodos y coloración marrón oscura del peristomio.

De acuerdo a lo anterior en los anélidos poliquetos la deltametrina tuvo un efecto más tóxico que la cipermetrina. Todas las actividades enzimáticas analizadas tanto en la cabeza como en el cuerpo de los poliquetos utilizados se han visto modificadas significativamente tras la exposición a piretroides (Tabla 4.9 y 4.10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.9.- ANOVA de 2 factores (tipo de piretroide, tiempo de exposición (t)) y su interacción de las actividades enzimáticas en la cabeza de *P. vancaurica*.

	CAT				GST				AChE				CbE			
	SS	df	MS	F	SS	Df	MS	F	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F
Modelo corregido	1249	5	249,7	27,28***	11062	5	2212	6,471**	7693	5	1539	54,92***	6592	5	1318	4,611**
Intercepto	3196	1	3196	349,1***	69500	1	69500	203,3***	58997	1	58997	2106***	83308	1	83308	291,4***
Piretroide	401,3	2	200,6	21,92***	7377	2	3689	10,79***	6757	2	3379	120,6***	6047	2	3023	10,58***
Tiempo	342,0	1	342,0	37,36***	2833	1	2833	8,288**	618,8	1	618,8	22,09***	28,31	1	28,31	0,099
Piretroide x Tiempo	505,3	2	252,6	27,59***	850,9	2	425,5	1,245	317,2	2	158,6	5,662*	517,1	2	258,5	0,904
Error	164,8	18	9,155		6154	18	341,9		504,3	18	28,02		5146	18	285,9	
Total	4610	24			86716	24			67194	24			95046	24		
Total corregido	1413	23			17215	23			8198	23			11738	23		

Nivel de significación: * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

SS: Suma de cuadrados; df: Grados de libertad; MS: Cuadrático promedio; F: Test estadístico.

Tabla 4.10.- ANOVA de 2 factores (tipo de piretroide, tiempo de exposición (t)) y su interacción de las actividades enzimáticas en el cuerpo de *P. vancaurica*.

	CAT				GST				AChE				CbE			
	SS	df	MS	F	SS	Df	MS	F	SS	df	MS	F	SS	df	MS	F
Modelo corregido	1,102	5	0,220	3,270*	462,2	5	92,44	4,270**	972,1	5	194,4	3,988**	0,540	5	0,108	7,090***
Intercepto	81,51	1	81,51	1209***	20649	1	20649	953,8***	27673	1	27673	567,6***	134,1	1	134,1	8805***
Piretroide	0,234	2	0,117	1,734	41,50	2	20,75	0,959	357,8	2	178,9	3,669*	0,045	2	0,022	1,465
Tiempo	0,642	1	0,642	9,515**	409,9	1	409,9	18,93***	5,427	1	5,427	0,111	0,486	1	0,486	31,89***
Piretroide x Tiempo	0,227	2	0,113	1,683	10,81	2	5,406	0,250	608,9	2	304,4	6,244**	0,010	2	0,005	0,313
Error	3,641	54	0,067		1169	54	21,65		2633	54	48,76		0,822	54	0,015	
Total	86,26	60			22280	60			31278	60			135,5	60		
Total corregido	4,744	59			1631	59			3605	59			1,362	59		

Nivel de significación: * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

SS: Suma de cuadrados; df: Grados de libertad; MS: Cuadrático promedio; F: Test estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.11.- Análisis *post hoc*, con su respectiva significación estadística de las actividades enzimáticas para los diferentes niveles entre los factores y sus interacciones en la cabeza del *P. vancaurica*.

	<u>CAT</u> Diferencias en cada factor y su interacción	<u>GST</u> Diferencias en cada factor y su interacción	<u>AChE</u> Diferencias en cada factor y su interacción	<u>CbE</u> Diferencias en cada factor y su interacción
Piretroide	control < ciper * control > delta ** ciper > delta ***	control > delta *	control > ciper *** control > delta ***	control > ciper * control > delta *
Tiempo	24 h > 96 h ***	24 h < 96 h **	24 h > 96 h ***	_____
Piretroide x Tiempo	control 24 h < ciper 24 h *** ciper 24 h > delta 24 h *** ciper 24 h > ciper 96 h ***	_____	control 24 h > ciper 24 h *** control 24 h > delta 24 h *** control 96 h > ciper 96 h *** control 96 h > delta 96 h *** control 24 h > control 96 h ** delta 24 h > delta 96 h *	control 24 h > ciper 24 h * control 24 h > delta 24 h *

Nivel de significación: * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

ciper: cipermetrina y delta: deltametrina. Factores: Piretroide (control, cipermetrina y deltametrina); Tiempo (24 h y 96 h).

Tabla 4.12.- Análisis *post hoc*, con su respectiva significación estadística de las actividades enzimáticas para los diferentes niveles entre los factores y sus interacciones en el cuerpo del *P. vancaurica*.

	<u>CAT</u> Diferencias en cada factor y su interacción	<u>GST</u> Diferencias en cada factor y su interacción	<u>AChE</u> Diferencias en cada factor y su interacción	<u>CbE</u> Diferencias en cada factor y su interacción
Piretroide	_____	_____	control > delta *	_____
Tiempo	24 h < 96 h **	24 h < 96 h ***	_____	24 h > 96 h ***
Piretroide x Tiempo	_____	_____	control 24 h > ciper 24 h *** control 24 h > delta 24 h *** control 24 h > control 96 h **	_____

Nivel de significación: * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

ciper: cipermetrina y delta: deltametrina. Factores: Piretroide (control, cipermetrina y deltametrina); Tiempo (24 h y 96 h).

Todas las actividades enzimáticas analizadas tanto en la cabeza como en el cuerpo de los poliquetos utilizados se han visto modificadas significativamente tras la exposición a piretroides (Tabla 4.9 y 4.10).

4.2.1. Catalasa

Siguiendo el orden de interpretación de la tabla de ANOVA anteriormente descrito, en las tablas 4.9 y 4.10 se puede observar la existencia de diferencias significativas en la interacción piretroide x tiempo, en el tiempo de exposición y el tipo de piretroide en actividad CAT en la cabeza. El análisis *post hoc* (tabla 4.11) mostró la significatividad en el aumento de la actividad CAT respecto al control a las 24 h de exposición a la cipermetrina, y en la figura Fig. 4.12 se observa la magnitud de la respuesta. El mismo análisis encontró significativo el efecto del factor piretroide de forma que en conjunto la cipermetrina en la cabeza produce un incremento de la actividad CAT mientras que la deltametrina produce una disminución. Ese efecto de los piretroides no se produce en el cuerpo del animal.

El aumento de la actividad CAT a las 24 h en la cabeza de los poliquetos puede interpretarse como una respuesta inmediata al estrés oxidativo producido por la exposición a cipermetrina. A las 96 h de exposición no existen efectos significativos respecto del control, aunque en todo caso el valor medio de la actividad CAT es inferior. Estos resultados parecen entrar en contradicción con los resultados de otros autores que han estudiado la interacción de la cipermetrina en otros animales encontrando una disminución de la actividad (Sharma et al., 2014). Sin embargo, dicha inhibición se encuentra en exposiciones de 96 h o más al tóxico. A pesar de que la regulación de la CAT es poco conocida en organismos marinos, según Regoli y Giuliani (2014) ante el estrés oxidativo hay una respuesta inicial de aumento de la transcripción de la catalasa debido al aumento de la producción de ROS seguida de una regulación hacia abajo a tiempos más prolongados.

Por otro lado, considerando únicamente el factor piretroide, en la tabla 4.11 se puede observar que en la cabeza la actividad CAT es significativamente menor en el grupo expuesto a deltametrina respecto al control. La deltametrina puede causar un excesivo estrés oxidativo provocando inmediatamente la inhibición de la enzima. Esta disminución de la actividad CAT podría deberse al flujo de radicales superóxidos al inhibir la CAT

(Kono and Fridovich, 1982). Otros autores también han encontrado una inhibición de CAT por deltametrina en crustáceos (Oliveira et al., 2012) y peces (Sayeed et al., 2003).

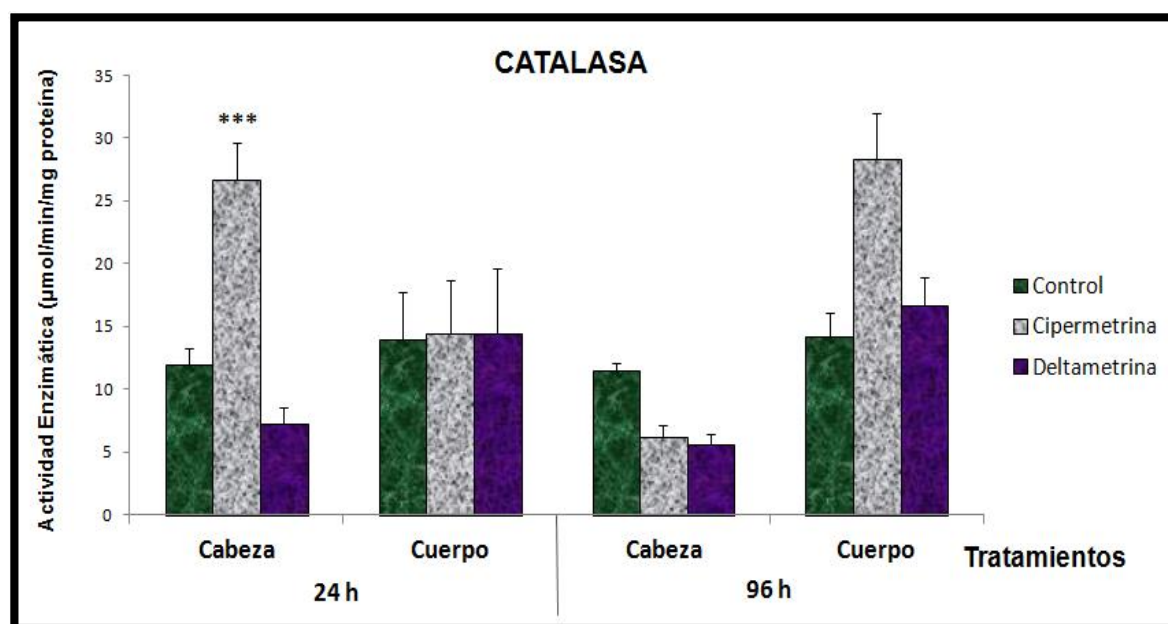


Figura 4.12.- Actividad de la enzima CAT en la cabeza y el cuerpo de *P. Vancaurica* después de la exposición durante 24 y 96 h a diferentes piretroides (cipermetrina y deltametrina). Los datos representan la media \pm SEM (n = 10; N=120). Solo se indican mediante asteriscos las diferencias significativas respecto al grupo control en cada tiempo: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4.2.2. Glutación-S-transferasa

Las actividades GST determinadas en la cabeza y cuerpo de *P. vancaurica* se muestran en la Figura 4.13. En los resultados del ANOVA de dos factores (Tab. 4.9 y 4.10) se puede observar que en la cabeza existen diferencias significativas en la actividad GST debidas a los dos factores considerados (piretroide y tiempo) de forma independiente, mientras que en el cuerpo del animal la actividad GST solo se ve afectada significativamente por el factor tiempo. Al realizar un análisis *post hoc* (Tab. 4.11) se encontró que la actividad GST es menor en la cabeza de los poliquetos expuestos a deltametrina en comparación con sus controles. Por otro lado, existen diferencias significativas debidas al tiempo al aumentar la actividad GST en la cabeza y el cuerpo (Tab. 4.9 y 4.10).

En peces existen numerosos estudios que encuentran una inducción de la GST como resultado de la exposición a insecticidas. Esta respuesta sería la esperable ya que la GST juega un papel importante en la desintoxicación de compuestos electrofílicos (Masella et al., 2005). Sin embargo, la inhibición de la actividad GST ha sido descrita en hígado de

peces expuestos a deltametrina (Pimpão et al., 2007). La disminución de la actividad GST en la cabeza del poliqueto como consecuencia de la deltametrina podría conducir a una deficiencia en el funcionamiento del sistema antioxidante.

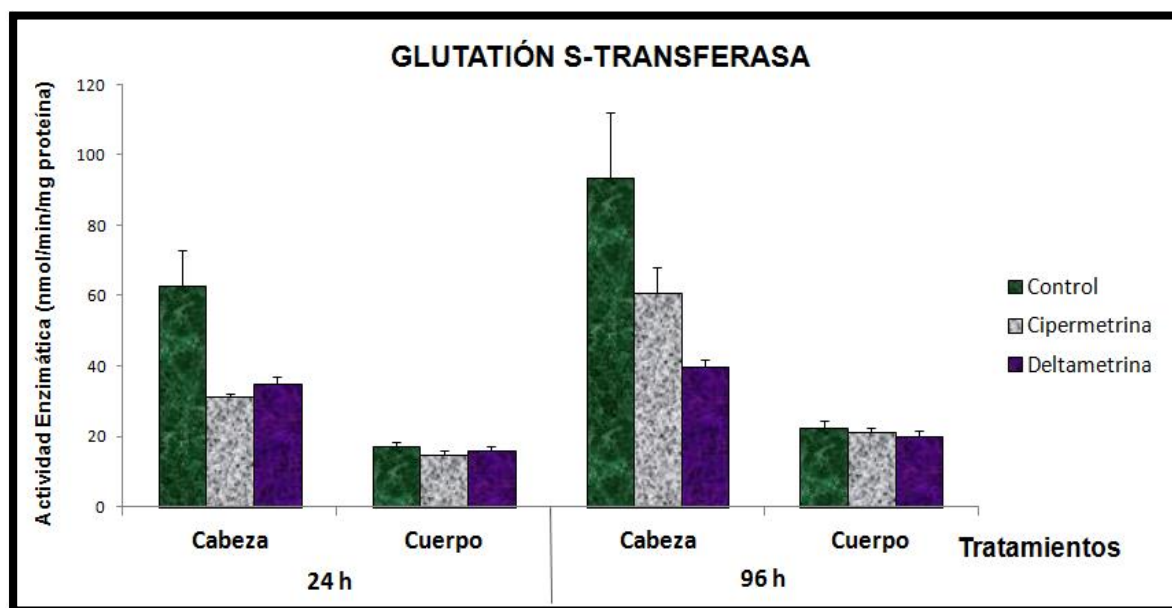


Figura 4.13.- Actividad de la enzima GST en la cabeza y el cuerpo de *P. Vancaurica* después de la exposición durante 24 y 96 h a diferentes piretroides (cipermetrina y deltametrina). Los datos representan la media \pm SEM (n = 10; N=120). Solo se indican mediante asteriscos las diferencias significativas respecto al grupo control en cada tiempo: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

4.2.3. Acetilcolinesterasa

Las actividades AChE determinadas en la cabeza y cuerpo de *P. vancaurica* se presentan en la figura 4.14. Los resultados del ANOVA de dos factores (Tab. 4.9 y 4.10) muestran que existen diferencias significativas para la actividad AChE debidas a la interacción de los dos factores considerados (piretroide x tiempo) en ambos tejidos. En las Tablas 4.11 y 4.12 se presenta los resultados del análisis *post hoc* en el que se observa la disminución de la actividad AChE en la cabeza en ambos piretroides respecto al control en los dos tiempos (24 h y 96 h), y a las 24 h en el cuerpo (Fig. 4.14). La actividad AChE es más alta en la cabeza que en el cuerpo del animal, siendo la magnitud del cambio provocado por los piretroides también mayor en la cabeza.

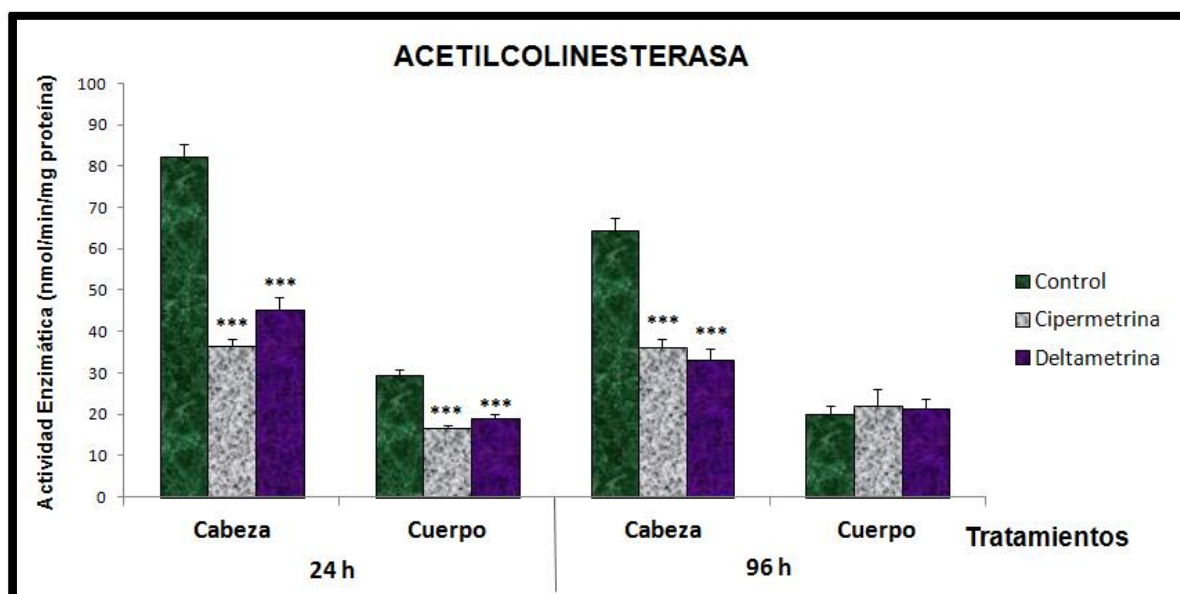


Figura 4.14.- Actividad de la enzima AChE en la cabeza y el cuerpo de *P. Vancaurica* después de la exposición durante 24 y 96 h a diferentes piretroides (cipermetrina y deltametrina). Los datos representan la media \pm SEM. (n = 10; N=120). Solo se indican mediante asteriscos las diferencias significativas respecto al grupo control en cada tiempo: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

En cuanto a los resultados encontrados, es destacable, en primer lugar, que la actividad AChE es mayor en la cabeza que en los segmentos corporales. Esto ya fue observado en *Nereis diversicolor*, un poliqueto taxonómicamente cercano al utilizado en este estudio (Scaps et al., 1996), y que puede ser debido a una mayor densidad de tejido nervioso y sinapsis colinérgicas en la cabeza del animal.

Respecto a la disminución observada de la actividad AChE por los dos piretroides en ambos órganos, y que es de mayor magnitud y más persistente en la cabeza, no se tiene constancia de trabajos anteriores en anélidos poliquetos con información sobre este hallazgo. Se dispone de información previa sobre el efecto de los piretroides tipo II (cipermetrina y deltametrina) en la actividad AChE de otros animales acuáticos, como la disminución de la AChE en peces expuestos a cipermetrina (Bonansea et al., 2016; Kumar et al., 2009), y en crustáceos expuestos a deltametrina (Velisek et al. 2007; Tu et al., 2012). Van Geest et.al. (2014) encontraron en *N. virens* que la 48-h LC₅₀ para la deltametrina fue de 16 mg/l, y que a concentraciones cercanas a las experimentadas en este trabajo (3 μ g/l) se observó un debilitamiento del organismo, mientras que a concentraciones del orden de 4,4 mg/l el movimiento era lento y tardío en el 90% de los gusanos y la mortalidad alcanzaba el 10%. Algunos autores destacan la importancia de relacionar los efectos tóxicos a nivel inferior al individuo (como la inhibición de la AChE) con alteraciones en el comportamiento (Amiard-Triquet, 2009).

Por ejemplo, Ren et al. (2008) observaron que las respuestas conductuales del crustáceo planctónico *D. magna* se vieron afectadas por el tiempo de exposición y la concentración de deltametrina. Sin embargo, en el crustáceo *Palaemon serratus* la disminución en la velocidad de nado provocada por la exposición a deltametrina parecía estar más relacionada con un problema en la asignación de energía para diferentes procesos, de forma que ésta se utilizaba en la desintoxicación y la protección antioxidante en lugar de la actividad natatoria (Oliveira et al, 2012).

4.2.4. Carboxilesterasa

La actividad carboxilesterasa determinadas en la cabeza y cuerpo de *P. vancaurica* se muestran en la figura 4.15. Los resultados del ANOVA de dos factores (Tab. 4.9 y 4.10) revelan que existen diferencias significativas para la actividad carboxilesterasa debidas a la interacción de los dos factores considerados (piretroide y tiempo) en la cabeza. En la Tabla 4.11 se presenta los resultados del análisis *post hoc* en el que se observa la disminución de la actividad CbE en la cabeza como consecuencia de la exposición a ambos piretroides respecto al control tras 24 h de exposición (Fig. 4.15). La actividad CbE es más alta en la cabeza que en el cuerpo del animal.

Se encontraron diferencias significativas para la actividad CbE (Tabla 4.10) en el cuerpo para el factor tiempo. En el análisis *post hoc* (Tab. 4.12) se observó una disminución de la actividad CbE entre 24 h y 96 h de exposición. La disminución en la actividad CbE en la cabeza del poliqueto por la exposición a los dos piretroides ensayados es compatible con la existencia de una inhibición de la enzima por los mismos. No se tiene constancia de trabajos anteriores en que se describa la inhibición de CbE por piretroides en invertebrados acuáticos.

Recientemente se ha estudiado la inhibición de carboxilesterasas humanas mediante compuestos piretroides que no incluyeron la cipermetrina, encontrando una fuerte inhibición reversible de una de las CbE humanas por la deltametrina, mediante un mecanismo de inhibición no competitiva a través de la unión a uno de los dos sitios de unión al sustrato (Lei et al., 2017).

Dado que las carboxilesterasas pueden participar en la hidrólisis de gran variedad de compuestos xenobióticos incluyendo pesticidas de diferentes grupos facilitando su eliminación (Sogorb y Vilanova, 2002), la inhibición de esas enzimas en poliquetos por los piretroides utilizados en acuicultura puede aumentar su sensibilidad hacia éstos y otros grupos de xenobióticos. Es importante indicar que la actividad CbE se ha ensayado utilizando feniltioacetato como sustrato, uno de los muchos sustratos sintéticos disponibles. De acuerdo con nuestros resultados la utilización de este sustrato ha permitido determinar la actividad, así como la inhibición de la misma por los piretroides. Dentro del phylum Anélida, se han realizado estudios para caracterizar las CbE en lombrices de tierra encontrándose muchas isoenzimas específicas de tejido (Sanchez-Hernandez y Wheelock, 2009). Algo similar es posible que ocurra en *P. vancaurica*, de forma que sea en parte la explicación de la diferente actividad y sensibilidad a los piretroides que presenta la cabeza y el cuerpo del animal.

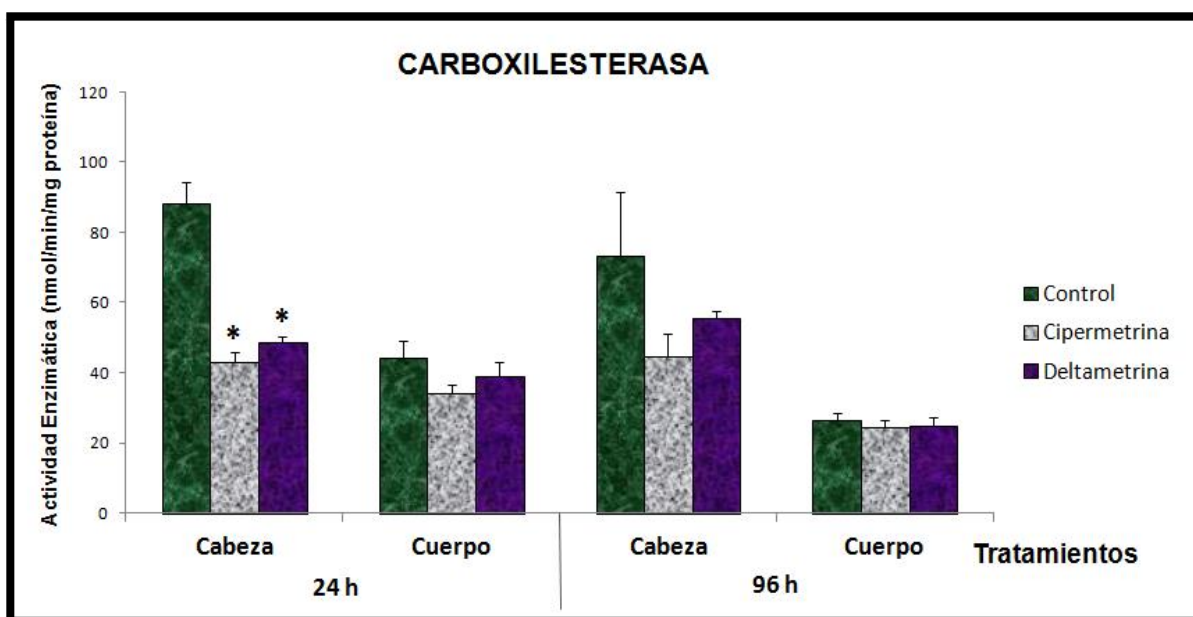


Figura 4.15.- Actividad de la enzima CbE en la cabeza y el cuerpo de *P. Vancaurica* después de la exposición durante 24 y 96 h a diferentes piretroides (cipermetrina y deltametrina). Los datos representan la media \pm SEM. (n = 10; N=120). Solo se indican mediante asteriscos las diferencias significativas respecto al grupo control en cada tiempo: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

4.2.5. Correlaciones entre las actividades enzimáticas

En la tabla 4.13 podemos ver la matriz de correlación de Pearson de las actividades enzimáticas determinadas en cabeza y cuerpo con la finalidad de analizar la dependencia entre ellas.

Tabla 4.13.- Matriz de correlación de Pearson (coeficiente r de producto-momento) en las actividades determinadas en cabeza y cuerpo de *P. vancaurica*.

		<i>Perinereis vancaurica</i>							
		Cabeza				Cuerpo			
Matriz de Correlación de Pearson		CAT	GST	AChE	CbE	CAT	GST	AChE	CbE
Cabeza	CAT (µmol/min/mg proteína)	1							
	GST (nmol/min/mg proteína)	-0,15	1						
	AChE (nmol/min/mg proteína)	0,01	0,53**	1					
	CbE (nmol/min/mg proteína)	-0,07	0,39	0,68**	1				
Cuerpo	CAT (µmol/min/mg proteína)	0,15	-0,34	-0,24	-0,08	1			
	GST (nmol/min/mg proteína)	-0,34	0,11	0,27	0,28	0,13	1		
	AChE (nmol/min/mg proteína)	-0,08	0,66**	0,28	0,11	-0,04	0,14	1	
	CbE (nmol/min/mg proteína)	-0,14	0,34	0,03	-0,02	-0,17	-0,27*	0,38**	1
Correlaciones significativas: * P<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.									

Las correlaciones lineales positivas se han dado entre AChE y CbE, y entre GST y AChE en la cabeza; entre AChE y CbE en el cuerpo y entre GST en la cabeza y AChE en el cuerpo. Entre la GST y la CbE medidas en el cuerpo del animal la correlación ha sido negativa, aunque con bajo coeficiente de correlación y baja significatividad. Las correlaciones positivas entre actividades en la cabeza son en parte consecuencia de que las tres actividades (GST, AChE y CbE) se ven afectadas en el mismo sentido (inhibición) por los piretroides, si bien no en todos los casos las diferencias alcanzan significatividad estadística.

Podemos resumir diciendo que la exposición a los piretroides cipermetrina y deltametrina a las concentraciones realísticas que se pueden llegar a alcanzar durante los tratamientos contra el piojo (*Lepeophtheirus salmonis* y *Caligus royercreseyi*) de mar en salmonicultura, provocan una fuerte inhibición de la actividad AChE en el poliqueto marino *P. vancaurica*, evidenciando su efecto neurotóxico. En consecuencia, podría comprometer la supervivencia de las poblaciones naturales de poliquetos que habitan los fondos marinos de zonas dedicadas al cultivo del salmón. Las otras actividades (CAT, GST y CbE) experimentaron también cambios, pero en menor medida para uno o ambos piretroides.

4.3. Discusión general

En la tabla 4.14 se muestra un resumen de los resultados de los experimentos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral. A la vista de la misma se pueden destacar una serie de hallazgos y se pueden hacer algunas generalizaciones.

Tabla 4.14.- Resumen de todos los biomarcadores y factores medidos en los experimentos realizados en *M. galloprovincialis* y *P. vancaurica* ordenados por tejido.

Especie	Órgano	Biomarcador	Cipermetrina	Deltametrina	Temperatura	Tiempo	Comp. Térmica
M e j i l l ó n	Branquias	CAT	↑	---	↓	SE	Total
	Branquias	GST	SE	---	↑	↑	NO
	Branquias	AChE	SE	---	↓	SE	---
	Branquias	CbE	SE	---	SE	↓	---
	Músculo	CAT	↑	---	↓ a 27 °C	---	---
	Músculo	GST	↑	---	↓ a 27 °C	---	---
	Músculo	AChE	SE	---	SE	---	---
	Músculo	CbE	↑	---	↓ a 22 °C	---	---
P o l i q u e t o	Cabeza	CAT	↑	↓	---	↓	---
	Cabeza	GST	SE	↓	---	↑	---
	Cabeza	AChE	↓	↓	---	↓	---
	Cabeza	CbE	↓	↓	---	SE	---
	Cuerpo	CAT	SE	SE	---	↑	---
	Cuerpo	GST	SE	↓	---	↑	---
	Cuerpo	AChE	↓ a 24 h	↓ a 24 h	---	SE	---
	Cuerpo	CbE	SE	SE	---	↓	---
↑: aumento actividad; ↓: disminución actividad; SE: sin efecto significativo; ---: Prueba no realizada.							

El biomarcador que mejor detectó el efecto de la cipermetrina en las dos especies estudiadas fue la actividad de la enzima CAT. En las dos especies estudiadas se observó un aumento de la actividad tanto para los mejillones (branquias y músculo abductor) como para los anélidos poliquetos (cabeza). Sin embargo, no se encontró un efecto en el cuerpo de los poliquetos. Este aumento de la actividad CAT puede ser interpretado como un mecanismo de defensa para prevenir o disminuir el estrés o daño tisular causado por los radicales libres inducidos por la cipermetrina (Maalej et al., 2017; Xu y Huang, 2017). En cuanto al efecto de la cipermetrina sobre la actividad AChE, solo se encontró inhibición de la enzima en el gusano poliqueto (cabeza y músculo), no siendo significativo su efecto en los tejidos de los mejillones. Cabe destacar que los poliquetos tratados con cipermetrina y deltametrina mostraron un movimiento lento y errático en comparación con el control.

La inhibición de AChE pudo haber causado la pérdida de coordinación, cierta parálisis y otros tipos de cambios de comportamiento descritos con anterioridad en otros grupos animales (Kuhr y Dorough, 1976).

La deltametrina solo fue experimentada en los poliquetos. Se observó una fuerte inhibición de la actividad AChE y GST en la cabeza y cuerpo. El rápido descenso de la actividad AChE experimentado a las 24 h en los tratamientos con deltametrina puede ser debido a que existen diferentes tiempos de reacción de la enzima AChE de acuerdo al tejido específico, modo de exposición y superficie de contacto con el tóxico (Zhang et al., 2017). La inhibición de GST por deltametrina puede ser debida a que actúa como defensa contra la toxicidad del piretroide. Específicamente, GST ofrece una protección pasiva contra los insecticidas piretroides al unirse a su molécula (Kostaropoulos et al., 2001).

El efecto de la temperatura solo se evaluó en los mejillones como se observa en la Tabla 5.3. Se encontró que la actividad CAT disminuía con la temperatura en las branquias. En el músculo abductor se observó esta disminución solo a temperaturas altas. Hubo una compensación térmica total de CAT en las branquias. La temperatura provocó un aumento de la actividad GST en branquias y una disminución de la actividad en el músculo a altas temperaturas. Como se comentó en el apartado correspondiente, el aumento de temperatura provocó una disminución en la actividad AChE en branquias.

La temperatura ejerce un doble efecto, sobre la conformación de la enzima y sobre la propia reacción de catalización. La velocidad de la reacción se incrementa al aumentar la temperatura dentro de un determinado rango térmico, alcanzando un valor máximo a la denominada temperatura óptima. A valores superiores de este rango, la actividad disminuye debido a que la enzima, como cualquier otra proteína, sufre procesos de desnaturalización y por lo tanto de inactivación. La tolerancia térmica limita los cambios en la actividad enzimática, especialmente aquellos relacionados con la capacidad aeróbica de las mitocondrias (Pörtner, 2002). Los niveles de oxígeno en los líquidos celulares pueden disminuir, lo que refleja la demanda excesiva de oxígeno a altas temperaturas o la insuficiente capacidad aeróbica de las mitocondrias a bajas temperaturas (Pörtner, 2001). El alcance aeróbico cae a temperaturas más allá del óptimo térmico y desaparece a temperaturas críticas bajas o altas cuando se produce la transición a un metabolismo anaeróbico mitocondrial.

El ajuste de las densidades mitocondriales por encima de los ajustes moleculares o de membrana paralelos parece crucial para mantener el alcance aeróbico y para cambiar la tolerancia térmica. En una jerarquía de causa y efecto, la limitación progresiva del oxígeno a temperaturas extremas puede incluso aumentar el estrés oxidativo y de desnaturalización, lo que justificaría la baja actividad enzimática a altas temperaturas de CAT, GST en músculo abductor, AChE en branquias y CbE.

Una forma de abordar el efecto de la temperatura sería establecer una ventana térmica de actividad enzimática por cada biomarcador y tejido estudiado. Abele y Puntarulo (2004) han adaptado un modelo basado en Pörtner (2001) sobre los umbrales de tolerancia térmica en ectotermos marinos y su implicación para el estrés oxidativo y los sistemas de defensa antioxidante. Este intervalo de tolerancia térmica se basa en un rango de temperaturas (temperatura pejus) que marca las limitaciones del alcance aeróbico y el inicio de la hipoxia en la sangre o hemolinfa que se acompaña de un aumento de la producción de ROS y la inducción de AOX (enzimas antioxidantes) hasta una temperatura crítica (Tc). El metabolismo anaeróbico es activado para apoyar la supervivencia, mientras que al menos la actividad AOX disminuye y los marcadores de estrés oxidativo se acumulan en los tejidos con desactivación por calor (desnaturalización enzimática), lo cual justifica la baja pronunciada de la actividad enzimática en casi la totalidad de los biomarcadores a altas temperaturas.

En los moluscos polares y templados, los procesos antioxidantes y pro-antioxidantes se equilibran por debajo de Tc, mientras que por encima de Tc al menos AOX se desnaturaliza y la compensación falla. En algún momento, las funciones vitales están tan deterioradas que, según el modelo de tolerancia térmica de Pörtner (2001), los animales entran en un estado de supervivencia temporal, del cual no pueden volver a su actividad normal. Mesas y Tarifeño (2017) encontraron en adultos de esta misma especie de mejillón un 55% de mortalidad en individuos expuestos por 48 h a 30 °C y el 100% a 72 h a la misma temperatura con la debilitación en la formación del biso a 27 °C, lo que justifica el límite de tolerancia enzimática. Extendemos este modelo a parámetros de estrés oxidativo, ya que los antioxidantes están claramente inducidos en el rango por encima de la temperatura de pejus (Tp), que marca los límites de la oxigenación óptima de los fluidos corporales, y por debajo de la temperatura crítica de una especie.

Mientras que las proteínas de choque térmico (HSP) pueden entrar en juego como sugirió Pörtner (2001), en un esfuerzo final para prolongar la supervivencia pasiva, que se hace inevitable por temperaturas mayores a 30 °C para esta especie de mejillón. Las especies de zona templada en particular, poseen la capacidad de cambiar los umbrales de tolerancia baja y alta (T_p y T_c) durante la aclimatación a temperaturas cambiantes, algo similar como sucedió en nuestro caso con la compensación térmica de la actividad CAT en las branquias de *M. galloprovincialis*.

Por lo tanto, las enzimas antioxidantes parecen ser biomarcadores prometedores para cuantificar un estrés térmico temprano en ectotermos marinos y ser eficaces con la compensación enzimática dentro de cierto intervalo o ventana de temperatura, antes de un daño oxidativo irreversible.

5. CONCLUSIONES

- 1.- La exposición a concentraciones de cipermetrina ambientalmente realísticas, en el contexto de las prácticas de la salmonicultura, modifican las actividades de las enzimas catalasa, acetilcolinesterasa y glutatión transferasa en las branquias de *Mytilus galloprovincialis* en forma dependiente del tiempo de exposición y de la temperatura de aclimatación.
- 2.- El aumento inicial (24 h) de la actividad CAT en las branquias a la temperatura intermedia (22 °C) es indicativo del inicio de una respuesta frente al estrés oxidativo, al que le sigue una disminución de la misma como consecuencia de las presiones oxidativas causadas por el efecto combinado de la acción de la cipermetrina y de la temperatura tras 96 h de exposición.
- 3.- La respuesta de la actividad GST en las branquias aumenta por el efecto combinado de la cipermetrina y el tiempo desde la temperatura baja (17 °C) hasta los 22 °C, y se reduce a la temperatura más alta (27 °C).
- 4.- La actividad de AChE en las branquias de mejillones expuestos a cipermetrina es dependiente de la temperatura de aclimatación.
- 5.- La actividad de CAT en las branquias de mejillones aclimatados a 17 °C, 22 °C y 27 °C manifiestan el fenómeno de compensación térmica total a tenor de los valores de actividad que presentan cuando las actividades se determinan a una temperatura normalizada (25 °C) y a las temperaturas reales o de aclimatación.
- 6.- La exposición a cipermetrina a condiciones ambientalmente realísticas incrementó las actividades musculares de las enzimas catalasa, carboxilesterasa y glutatión-s-transferasa en forma dependiente de la temperatura de aclimatación.
- 7.- Las alteraciones encontradas en la actividad de las enzimas antioxidantes y de biotransformación en branquias y músculo abductor permite identificar estas respuestas como biomarcadores sensibles frente a piretroides en *M. galloprovincialis* en un contexto de práctica de la salmonicultura.
- 8.- En el poliqueto marino *P. vancaurica*, la actividad de las enzimas antioxidantes, de neurotoxicidad y de biotransformación se ven alteradas tras exposición a los piretroides cipermetrina y deltametrina, siendo la cabeza el órgano más sensible y la deltametrina el piretroide que provocó mayores efectos.

9.- La fuerte inhibición de la actividad AChE en la cabeza y el cuerpo de *P. vancaurica*, evidencian el efecto neurotóxico de los piretroides cipermetrina y deltametrina a las concentraciones realísticas durante los tratamientos contra el piojo de mar en salmonicultura.

10.- El gusano poliqueto *P. vancaurica*, organismo marino bentónico, resultó ser más sensible que el molusco bivalvo *M. galloprovincialis*, representante de procesos ocurridos en la columna de agua, en cuanto a la respuesta de los biomarcadores seleccionados frente a la presencia de cipermetrina a concentraciones ambientalmente realísticas en la salmonicultura.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abele, D., Burlando, B., Viarengo, A., Pörtner, H., 1998. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 120, 425-435.
- Abele, D., Puntarulo, S., 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 138, 405-415.
- Aebi, H., 1974. Catalase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)*. Academic Press, pp. 673-684.
- Abolofia, J., Asche, F., Wilen, J.E., 2017. The cost of lice: quantifying the impacts of parasitic sea lice on farmed salmon. *Mar. Resour. Econ.* 32, 329-349.
- Aebi, H., 1974. Catalase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)*. Academic Press, pp. 673-684.
- Ahmad, S., 1992. Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochem. Syst. Ecol.* 20, 269-296.
- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 318, 21-30.
- Altinok, I., Capkin, E., Boran, H., 2011. Influence of Bioassay Volume, Water Column Height, and Octanol-Water Partition Coefficient on the Toxicity of Pesticides to Rainbow Trout. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86, 596-600.
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral Disturbances: The Missing Link between Sub-Organismal and Supra-Organismal Responses to Stress? Prospects Based on Aquatic Research. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 15, 87-110.
- An, M.I., Choi, C.Y., 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: effects on hemolymph and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 155, 34-42.
- Arias, A., Richter, A., Anadón, N., Glasby, C.J., 2013. Revealing polychaetes invasion patterns: Identification, reproduction and potential risks of the Korean ragworm, *Perinereis lineata* (Treadwell), in the Western Mediterranean. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 131, 117-128.
- Arriagada, G.A., Stryhn, H., Campistó, J.L., Rees, E.E., Sanchez, J., Ibarra, R., Medina, M., St-Hilaire, S., 2014. Evaluation of the performance of pyrethroids on different life stages of *Caligus rogercresseyi* in southern Chile. *Aquaculture*. 426-427, 231-237.
- Attig, H., Kamel, N., Sforzini, S., Dagnino, A., Jamel, J., Boussetta, H., Viarengo, A., Banni, M., 2014. Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). *Mar. Environ. Res.* 94, 65-71.
- Awasthi, Y.C., Yang, Y., Tiwari, N.K., Patrick, B., Sharma, A., Li, J., Awasthi, S., 2004. Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases. *Free Radical Biology and Medicine*. 37, 607-619.
- Ballard, C.G., Greig, N.H., Guillozet-Bongaarts, A.L., Enz, A., Darvesh, S., 2005. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Current Alzheimer Research*. 2, 307-318.
- Banni, M., Hajer, A., Sforzini, S., Oliveri, C., Boussetta, H., Viarengo, A., 2014. Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and heat stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 160, 23-29.

- Barata, C., Medina, M., Telfer, T., Baird, D., 2002. Determining demographic effects of cypermethrin in the marine copepod *Acartia tonsa*: stage-specific short tests versus life-table tests. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 43, 0373-0378.
- Barthel W., 1961. Synthetic pyrethroids. In: Advances in Pest Control Research. Metcalf, R.L. (Ed), Vol. 4, Interscience Publishers, Inc., New York, 33-74.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1998. PAHs in Arcachon Bay, France: origin and biomonitoring with caged organisms. Mar. Pollut. Bull. 36, 577-586.
- Bebianno, M.J., Lopes, B., Guerra, L., Hoarau, P., Ferreira, A.M., 2007. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: effect of abiotic factors. Environ. Int. 33, 550-558.
- Bocchetti, R., Lamberti, C.V., Pisanelli, B., Razzetti, E.M., Maggi, C., Catalano, B., Sesta, G., Martuccio, G., Gabellini, M., Regoli, F., 2008. Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. Mar. Environ. Res. 66, 24-26.
- Bocquene, G., Galgani, F., 1998. Biological effects of contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen.
- Bonanse, R.I., Wunderlin, D.A., Amé, M.V., 2016. Behavioral swimming effects and acetylcholinesterase activity changes in *Jenynsia multidentata* exposed to chlorpyrifos and cypermethrin individually and in mixtures. Ecotoxicol. Environ. Saf. 129, 311-319.
- Borković, S.S., Šaponjić, J.S., Pavlović, S.Z., Blagojević, D.P., Milošević, S.M., Kovačević, T.B., Radojičić, R.M., Spasić, M.B., Žikić, R.V., Saičić, Z.S., 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 141, 366-374.
- Boyle, J., McHenery, J.G., 1995. Cypermethrin as GPRD01: Determination of acute toxicity (LC50) to brown shrimp (96 hour, Semi-static). Inveresk Research International, Report 12175. (after McHenery, 2000).
- Boyle, J.; Knight, B. & McHenery, J.G., 1995a. Cypermethrin as GPRD01: Determination of acute toxicity (LC50) to *Mysidopsis bahia* (96 hour, Semi-static). Inveresk Research International, Report 10535. (after McHenery, 2000).
- Boyle, J.; Knight, B., McHenery, J.G., 1995c. Cypermethrin as GPRD01: Determination of acute toxicity (LC50) to *Corophium volutator* (10 day, Static). Inveresk Research International, Report 10645. (after McHenery, 2000).
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brondeau, M., Ban, M., Bonnet, P., Guenier, J., De Ceaurriz, J., 1989. Acetone compared to other ketones in modifying the hepatotoxicity of inhaled 1, 2-dichlorobenzene in rats and mice. Toxicol. Lett. 49, 69-78.
- Burridge, L.E., Lyons, M.C., Wong, D.K.H., MacKeigan, K., VanGeest, J.L., 2014. The acute lethality of three anti-sea lice formulations: AlphaMax®, Salmosan®, and Interlox®Paramove™50 to lobster and shrimp. Aquaculture. 420–421, 180-186.
- Burridge, L., Weis, J.S., Cabello, F., Pizarro, J., Bostick, K., 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. Aquaculture. 306, 7-23.

- Carmody, M., Waszczak, C., Idänheimo, N., Saarinen, T., Kangasjärvi, J., 2016. ROS signalling in a destabilised world: A molecular understanding of climate change. *J. Plant Physiol.* 203, 69-83.
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 1-16.
- Castillo, G., 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA (México)-IDRE (Canadá).
- Chapman, P.M., Wang, F., Janssen, C., Persoone, G., Allen, H.E., 1998. Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 2221-2243.
- Chase, M., Jones, S., Hennigar, P., Sowles, J., Harding, G., Freeman, K., Wells, P., Krahforst, C., Coombs, K., Crawford, R., 2001. Gulfwatch: Monitoring spatial and temporal patterns of trace metal and organic contaminants in the Gulf of Maine (1991–1997) with the blue mussel, *Mytilus edulis* L. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 490-504.
- Clark, A.G., 1989. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry.* 92, 419-446.
- Clark, J.R., Patrick Jr, J.M., Moore, J.C., Lores, E.M., 1987. Waterborne and sediment-source toxicities of six organic chemicals to grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and amphioxus (*Branchiostoma caribaeum*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16, 401-407.
- Costello, M.J., 2009. The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *J. Fish Dis.* 32, 115-118.
- Crawford, D.L., Powers, D.A., 1992. Evolutionary adaptation to different thermal environments via transcriptional regulation. *Molecular Biology and Evolution.* 9, 806-813.
- David, M., Marigoudar, S.R., Patil, V.K., Halappa, R., 2012. Behavioral, morphological deformities and biomarkers of oxidative damage as indicators of sublethal cypermethrin intoxication on the tadpoles of *D. melanostictus* (Schneider, 1799). *Pestic. Biochem. Physiol.* 103, 127-134.
- Davies, I.M., Rodger, G.K., Redshaw, J., Stagg, R.M., 2001. Targeted environmental monitoring for the effects of medicines used to treat sea-lice infestation on farmed fish. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil.* 58, 477-485.
- Dean, H.K., 2008. The use of polychaetes (Annelida) as indicator species of marine pollution: a review. *Rev. Biol. Trop.* 56, 11-38.
- Denac, H., Mevissen, M., Scholtysik, G., 2000. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362, 453-479.
- Denton, D.L., Wheelock, C.E., Murray, S.A., Deanovic, L.A., Hammock, B.D., Hinton, D.E., 2003. Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry.* 22, 336-341.
- Durou, C., Poirier, L., Amiard, J., Budzinski, H., Gnassia-Barelli, M., Lemenach, K., Peluhet, L., Mouneyrac, C., Roméo, M., Amiard-Triquet, C., 2007. Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution.* 148, 445-458.
- Eaton, D.L., Bammler, T.K., 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.* 49, 156-164.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.

- Ernst, W., Jackman, P., Doe, K., Page, F., Julien, G., MacKay, K., Sutherland, T., 2001. Dispersion and Toxicity to Non-target Aquatic Organisms of Pesticides Used to Treat Sea Lice on Salmon in Net Pen Enclosures. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 432-443.
- Escartín, E., Porte, C., 1997. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16, 2090-2095.
- Fairchild, W., Doe, K., Jackman, P., Arsenault, J., Aubé, J., Losier, M., Cook, A., 2010. Acute and chronic toxicity of two formulations of the pyrethroid pesticide deltamethrin to an amphipod, sand shrimp and lobster larvae. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2876.
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2014. 2016.
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 149, 281-288.
- Fields, P., Somero, G., 1997. Amino acid sequence differences cannot fully explain interspecific variation in thermal sensitivities of gobiid fish A4-lactate dehydrogenases (A4-LDHs). *J. Exp. Biol.* 200, 1839-1850.
- Field, L.M., Davies, T.E., O'Reilly, A.O., Williamson, M.S., Wallace, B.A., 2017. Voltage-gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides. *European Biophysics Journal*. 46, 675-679.
- Galloway, T.S., Millward, N., Browne, M.A., Depledge, M.H., 2002. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquatic Toxicology*. 61, 169-180.
- Giarratano, E., Gil, M.N., Malanga, G., 2011. Seasonal and pollution-induced variations in biomarkers of transplanted mussels within the Beagle Channel. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1337-1344.
- Gibson, R., Atkinson, R., Gordon, J., Smith, I., Hughes, D., 2011. Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 49, 1-42.
- Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J.M., Verrax, J., Calderon, P.B., 2015. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 87, 84-97.
- Glunt, K.D., Oliver, S.V., Hunt, R.H., Paaijmans, K.P., 2018. The impact of temperature on insecticide toxicity against the malaria vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. *Malaria journal*. 17, 131.
- Gomes, T., Gonzalez-Rey, M., Rodríguez-Romero, A., Trombini, C., Riba, I., Blasco, J., Bebianno, M.J., 2013. Biomarkers in *Nereis diversicolor* (Polychaeta: Nereididae) as management tools for environmental assessment on the southwest Iberian coast. *Scientia Marina*. 77, 69-78.
- González-Mira, A., Varó, I., Solé, M., Torreblanca, A., 2016. Drugs of environmental concern modify *Solea senegalensis* physiology and biochemistry in a temperature-dependent manner. *Environmental Science and Pollution Research*. 23, 20937-20951.
- Gowland, B., Webster, L., Fryer, R., Davies, I., Moffat, C., Stagg, R., 2002. Uptake and effects of the cypermethrin-containing sea lice treatment Excis® in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution*. 120, 805-811.
- Gross, M., Maycock, P., Crane, M., 2008. Environmental assessment report for Alpha Max according to VICH Phase I and II guidance. Unpublished Report WCA Environment Ltd. Oxfordshire UK.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249, 7130-7139.

- Hamilton-West, C., Arriagada, G., Yatabe, T., Valdés, P., Hervé-Claude, L.P., Urcelay, S., 2012. Epidemiological description of the sea louse (*Caligus rogercresseyi*) situation in southern Chile in August 2007. *Prev. Vet. Med.* 104, 341-345.
- Haya, K., Burridge, L.E., Davies, I.M., Ervik, A., 2005. A Review and Assessment of Environmental Risk of Chemicals Used for the Treatment of Sea Lice Infestations of Cultured Salmon. In: Hargrave, B. (Ed.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 305-340.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88.
- Hill, I., 1985. Effects on non-target organisms in terrestrial and aquatic environments. Pyrethroid insecticides/edited by John P. Leahey.
- Hill, R. W., y Wyse, G. A. 1992. Fisiología animal (2a ed.). Madrid, España. Ediciones Akal. ISBN: 84-460-0131-4.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2014. Biochemical adaptation. Princeton University Press.
- Hummel, H., Bogaards, R., Nieuwenhuize, J., De Wolf, L., Van Liere, J., 1990. Spatial and seasonal differences in the PCB content of the mussel *Mytilus edulis*. *Sci. Total Environ.* 92, 155-163.
- Informe del Banco Mundial, 2013 (World Bank Report, 2013). World Bank Report Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture World Bank Report. 83177-GLB, p. 80
- Jiang, W., Li, J., Gao, Y., Mao, Y., Jiang, Z., Du, M., Zhang, Y., Fang, J., 2016. Effects of temperature change on physiological and biochemical responses of Yesso scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Aquaculture.* 451, 463-472.
- Köprücü, K., Seker, E., 2008. Acute toxicity of deltamethrin for freshwater mussel, *Unio elongatulus eucirrus* Bourguignat. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 1-4.
- Köprücü, S.Ş., Yonar, E., Seker, E., 2008. Effects of deltamethrin on antioxidant status and oxidative stress biomarkers in freshwater mussel, *Unio elongatulus eucirrus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 253-257.
- Köprücü K., Yonar, S., Ažeker, E., 2010. Effects of cypermethrin on antioxidant status, oxidative stress biomarkers, behavior, and mortality in the freshwater mussel *Unio elongatulus eucirrus*. *Fisheries Science.* 76, 1007-1013.
- Khessiba, A., Roméo, M., Aïssa, P., 2005. Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environmental Pollution.* 133, 275-281.
- Kefaloyianni, E., Gourgou, E., Ferle, V., Kotsakis, E., Gaitanaki, C., Beis, I., 2005. Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro- or anti-apoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *Journal of Experimental Biology.* 208, 4427-4436.
- Ketterer, B., Coles, B., Meyer, D.J., 1983. The role of glutathione in detoxication. *Environ. Health Perspect.* 49, 59-69.
- Khazri, A., Sellami, B., Dellali, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., Beyrem, H., Mahmoudi, E., 2016. Diastereomeric and enantiomeric selective accumulation of cypermethrin in the freshwater mussel *Unio gibbus* and its effects on biochemical parameters. *Pestic. Biochem. Physiol.* 129, 83-88.
- Khazri, A., Sellami, B., Dellali, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., Mahmoudi, E., 2015. Acute toxicity of cypermethrin on the freshwater mussel *Unio gibbus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 115, 62-66.

- Kim, M., Ahn, I., Cheon, J., Park, H., 2009. Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 152, 207-213.
- Kinoshita, K., Tamaki, S., Yoshioka, M., Srithonguthai, S., Kunihiro, T., Hama, D., Ohwada, K., Tsutsumi, H., 2008. Bioremediation of organically enriched sediment deposited below fish farms with artificially mass-cultured colonies of a deposit-feeding polychaete *Capitella* sp. I. *Fisheries Science*. 74, 77-87.
- Knight, B.; Boyle, J. & McHenry, J.G., 1995. Cypermethrin as GPRD01: Determination of acute toxicity (LC50) to *Asterias rubens* (96 hour, Semi-static, Limit). Inveresk Research International, Report 10531. (after McHenry, 2000).
- Koenig, S., Solé, M., 2012. Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. *Mar. Environ. Res.* 79, 122-131.
- Kono, Y., Fridovich, I., 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257, 5751-5754.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 313-319.
- Kuhr, R.J., Dorough, H.W., 1976. Carbamate insecticides: chemistry, biochemistry, and toxicology. CRC Press, Inc.
- Kumar, A., Rai, D.K., Sharma, B., Pandey, R.S., 2009. λ -cyhalothrin and cypermethrin induced in vivo alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pestic. Biochem. Physiol.* 93, 96-99.
- Laizure, C. S., Herring, V., Hu, Z., Witbrodt, K., Parker, R.B., 2013. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 33, 210-222.
- Langston, W., O'Hara, S., Pope, N., Davey, M., Shortridge, E., Imamura, M., Harino, H., Kim, A., Vane, C., 2012. Bioaccumulation surveillance in Milford Haven waterway. *Environ. Monit. Assess.* 184, 289-311.
- Leahey, J., 1985. Metabolism and environmental degradation. The pyrethroid insecticides., 263-342.
- Lee, K., 1991. Glutathione S-transferase activities in phytophagous insects: induction and inhibition by plant phototoxins and phenols. *Insect Biochemistry*. 21, 353-361.
- Lei, W., Wang, D., Dou, T., Hou, J., Feng, L., Yin, H., Luo, Q., Sun, J., Ge, G., Yang, L., 2017. Assessment of the inhibitory effects of pyrethroids against human carboxylesterases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 321, 48-56.
- Leiniö, S., Lehtonen, K.K., 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 140, 408-421.
- León, O., Montero I., 2001. Cómo explicar el concepto de interacción sin estadística: Análisis gráfico de todos los casos posibles en un diseño 2x2. *Psicothema*, 13, 159- 165.
- Levin, L.A., Boesch, D.F., Covich, A., Dahm, C., Erséus, C., Ewel, K.C., Kneib, R.T., Moldenke, A., Palmer, M.A., Snelgrove, P., 2001. The function of marine critical transition zones and the importance of sediment biodiversity. *Ecosystems*. 4, 430-451.
- Lewis, C., Watson, G.J., 2012. Expanding the ecotoxicological toolbox: the inclusion of polychaete reproductive endpoints. *Mar. Environ. Res.* 75, 10-22.

- Lockwood, B.L., Sanders, J.G., Somero, G.N., 2010. Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success. *J. Exp. Biol.* 213, 3548-3558.
- López-Galindo, C., Ruiz-Jarabo, I., Rubio, D., Nebot, E., Solé, M., Mancera, J.M., 2014. Temperature enhanced effects of chlorine exposure on the health status of the sentinel organism *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science and Pollution Research.* 21, 1680-1690.
- Maalej, A., Mahmoudi, A., Bouallagui, Z., Fki, I., Marrekchi, R., Sayadi, S., 2017. Olive phenolic compounds attenuate deltamethrin-induced liver and kidney toxicity through regulating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Food and Chemical Toxicology.* 106, 455-465.
- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *ISJ.* 2, 91-104.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C., 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 16, 577-586.
- Matozzo, V., Chinellato, A., Munari, M., Bressan, M., Marin, M.G., 2013. Can the combination of decreased pH and increased temperature values induce oxidative stress in the clam *Chamelea gallina* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Mar. Pollut. Bull.* 72, 34-40.
- McLeesc, D.W., Metcalfe, C.D., Zitko, V., 1980. Lethality of permethrin, cypermethrin and fenvalerate to salmon, lobster and shrimp. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 950-955.
- Medina, M., Barata, C., Telfer, T., Baird, D., 2004. Assessing the risks to zooplankton grazers of continuous versus pulsed cypermethrin exposures from marine cage aquaculture. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 67-73.
- Medina, M., Barata, C., Telfer, T., Baird, D.J., 2004. Effects of cypermethrin on marine plankton communities: a simulated field study using mesocosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 236-245.
- Mesas Palma, A.A., Tarifeño, E., 2017. Upper lethal temperatures for the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819), in central coast of Chile. Submission article platform-Latin American Journal of Aquatic Research. 43.
- Mian, L., Mulla, M., 1992. Effects of pyrethroid insecticides on nontarget invertebrates in aquatic ecosystems. *Journal of agricultural entomology (USA).*
- Minier, C., Forget-Leray, J., Bjørnstad, A., Camus, L., 2008. Multixenobiotic resistance, acetylcholine esterase activity and total oxyradical scavenging capacity of the Arctic spider crab, *Hyas araneus*, following exposure to bisphenol A, tetra bromo diphenyl ether and diallyl phthalate. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1410-1415.
- Mirto, S., Gristina, M., Sinopoli, M., Maricchiolo, G., Genovese, L., Vizzini, S., Mazzola, A., 2012. Meiofauna as an indicator for assessing the impact of fish farming at an exposed marine site. *Ecol. Ind.* 18, 468-476.
- Mittal, P.K., Adak, T., Sharma, V.P., 1994. Comparative toxicity of certain mosquitocidal compounds to larvivorous fish, *Poecilia reticulata*. *Indian J. Malariol.* 31, 43-47.
- Mulla, M., Navvab-Gojrati, H., Darwazeh, H., 1978. Toxicity of mosquito larvicidal pyrethroids to four species of freshwater fishes. *Environ. Entomol.* 7, 428-430.
- Narahashi, T., Frey, J., Ginsburg, K., Roy, M., 1992. Sodium and GABA-activated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. *Toxicol. Lett.* 64, 429-436.
- Narahashi, T., 1996. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* 79, 1-14.

- Niehaus, A.C., Angilletta, M.J., Jr, Sears, M.W., Franklin, C.E., Wilson, R.S., 2012. Predicting the physiological performance of ectotherms in fluctuating thermal environments. *J. Exp. Biol.* 215, 694-701.
- Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D., 2009. The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environ. Int.* 35, 971-986.
- NVI (NORWEGIAN VETERINARY INSTITUTE), 2013. Increased consumption of drugs in aquaculture in 2012. 2013.
- Oliveira, C., Almeida, J., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M., Gravato, C., 2012. Acute effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn *Palaemon serratus*. *Aquatic Toxicology*. 124–125, 209-216.
- Pfeifer, S., Schiedek, D., Dippner, J.W., 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 320, 93-103.
- Philip, G.H., Reddy, P.M., Sridevi, G., 1995. Cypermethrin-Induced in Vivo Alterations in the Carbohydrate Metabolism of Freshwater Fish, *Labeo rohita*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 173-178.
- Pimpão, C.T., Zampronio, A.R., Silva de Assis, H.C., 2007. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 122-127.
- Pörtner, H., 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*. 88, 137-146.
- Pörtner, H.O., 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 132, 739-761.
- Prasanthi, K., Rajini, P., 2005. Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. *Food and chemical toxicology*. 43, 299-306.
- Reddy, A.T., Ayyanna, K., Yellamma, K., 1991. Sensitivity of brain cholinesterase to cypermethrin toxicity in freshwater teleost *Tilapia mossambica*. *Biochem. Int.* 23, 959-962.
- Regoli, F., Nigro, M., Bertoli, E., Principato, G., Orlando, E., 1997. Defenses against oxidative stress in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* and effects of acute exposure to metals. In: Naumov, A.D., Hummel, H., Sukhotin, A.A., Ryland, J.S. (Eds.). Springer Netherlands, pp. 139-144.
- Regoli, F., Giuliani, M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 93, 106-117.
- Ren, Z., Li, Z., Ma, M., Wang, Z., Fu, R., 2008. Behavioral Responses of *Daphnia Magna* to Stresses of Chemicals with Different Toxic Characteristics. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 310-316.
- Robertson, I.G., Guthenberg, C., Mannervik, B., Jernström, B., 1986. Differences in stereoselectivity and catalytic efficiency of three human glutathione transferases in the conjugation of glutathione with 7 β , 8 α -dihydroxy-9 α , 10 α -oxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo (a) pyrene. *Cancer Res.* 46, 2220-2224.
- Robertson, P.K.J., Black, K.D., Adams, M., Willis, K., Buchan, F., Orr, H., Lawton, L., McCullagh, C., 2009. A new generation of biocides for control of crustacea in fish farms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 95, 58-63.
- Robillard, S., Beauchamp, G., Laulier, M., 2003. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 135, 49-59.

- Ronco, A., Díaz C., Pica Y., 2004. Conceptos generales. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de la calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Castillo Morales G. (Ed). IMTA (México)-IDRE (Canadá), México. pp. 17-22.
- Rose, R.L., Barbhuiya, L., Roe, R.M., Rock, G.C., Hodgson, E., 1995. Cytochrome P450-Associated Insecticide Resistance and the Development of Biochemical Diagnostic Assays in *Heliothis virescens*. Pestic. Biochem. Physiol. 51, 178-191.
- Ruus, A., Schaanning, M., Øxnevad, S., Hylland, K., 2005. Experimental results on bioaccumulation of metals and organic contaminants from marine sediments. Aquatic Toxicology. 72, 273-292.
- Saha, S., Kaviraj, A., 2009. Effect of ambient temperature and daylight on the survival of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch, 1794) exposed to cypermethrin. Environ. Eng. Sci. 26, 459-462.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Wheelock, C.E., 2009. Tissue distribution, isozyme abundance and sensitivity to chlorpyrifos-oxon of carboxylesterases in the earthworm *Lumbricus terrestris*. Environmental pollution. 157, 264-272.
- Sánchez-Fortún, S., Barahona, M.V., 2005. Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms. Chemosphere. 59, 553-559.
- Sharma, P., Firdous, S., Singh, R., 2014. Neurotoxic effect of cypermethrin and protective role of resveratrol in Wistar rats. International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases. 4, 104.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56, 295-301.
- Scaps, P., Demuynck, S., Descamps, M., Dhainaut, A., 1996. Biochemical and Enzymatic Characterization of an Acetylcholinesterase from *Nereis diversicolor* (Annelida, Polychaeta): Comparison with the Cholinesterases of *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). The Biological Bulletin. 190, 396-402.
- Sellami, B., Louati, H., Dellali, M., Aissa, P., Mahmoudi, E., Coelho, A.V., Sheehan, D., 2014. Effects of permethrin exposure on antioxidant enzymes and protein status in Mediterranean clams *Ruditapes decussatus*. Environmental Science and Pollution Research. 21, 4461-4472.
- Sellami, B., Khazri, A., Mezni, A., Louati, H., Dellali, M., Aissa, P., Mahmoudi, E., Beyrem, H., Sheehan, D., 2015. Effect of permethrin, anthracene and mixture exposure on shell components, enzymatic activities and proteins status in the Mediterranean clam *Venerupis decussata*. Aquatic Toxicology. 158, 22-32.
- SEPA, Unit, 1998, updated 2003. State Environmental Policy Act Handbook. (Inman, R. ed., Ritchie B. update ed.), Washington State Department of Ecology, Publication 98-114.
- SERNAPESCA. Servicio Nacional de Pesca Chile., 2014. Informe de actividades de fiscalización efectuadas en materia de pesca y acuicultura en el año 2013.
- SERNAPESCA. Servicio Nacional de Pesca Chile., 2012. Situación Sanitaria Salmonicultura Centros Marinos Enero – Septiembre 2012. 2014.
- Serra-Compte, A., Maulvault, A.L., Camacho, C., Álvarez-Muñoz, D., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S., Marques, A., 2018. Effects of water warming and acidification on bioconcentration, metabolism and depuration of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Environmental Pollution. 236, 824-834.

- Serrano, A., Velasco, F., Olaso, I., 2003. Polychaete annelids in the diet of demersal fish from the southern shelf of the Bay of Biscay. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. 83, 619-623.
- Sevatdal, S., Copley, L., Wallace, C., Jackson, D., Horsberg, T.E., 2005. Monitoring of the sensitivity of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) to pyrethroids in Norway, Ireland and Scotland using bioassays and probit modelling. *Aquaculture*. 244, 19-27.
- Sevatdal, S., Horsberg, T.E., 2003. Determination of reduced sensitivity in sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer) against the pyrethroid deltamethrin using bioassays and probit modelling. *Aquaculture*. 218, 21-31.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1-16.
- Simpson, S.L., Batley, G.E., 2007. Predicting metal toxicity in sediments: a critique of current approaches. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 3, 18-31.
- Singh, S., Tiwari, R.K., Pandey, R.S., 2018. Evaluation of acute toxicity of triazophos and deltamethrin and their inhibitory effect on AChE activity in *Channa punctatus*. *Toxicology Reports*. 5, 85-89.
- Sogorb, M.A., Vilanova, E., 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* 128, 215-228.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Statistical tables*. Macmillan.
- Solé, M., Kopecka-Pilarczyk, J., Blasco, J., 2009. Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, *Nereis diversicolor* and *Scrobicularia plana*, from a Marsh ecosystem in SW Spain. *Environ. Int.* 35, 523-531.
- Srivastava, S.K., Ansari, N.H., 1980. The peroxidatic and catalatic activity of catalase in normal and acatalasemic mouse liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 633, 317-322.
- Thomas, C.R., Hose, G.C., Warne, M.S., Lim, R.P., 2008. Effects of river water and salinity on the toxicity of deltamethrin to freshwater shrimp, cladoceran, and fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 610-618.
- Tu, H.T., Silvestre, F., Meulder, B.D., Thome, J., Phuong, N.T., Kestemont, P., 2012. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Chemosphere*. 86, 83-91.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) and Office of Pesticide Programs. 2013. *Pesticide Ecotoxicity Database (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB))*. Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA, Washington, D.C. Disponible en: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.
- Van Geest, J.L., Burrige, L.E., Kidd, K.A., 2014. The toxicity of the anti-sea lice pesticide AlphaMax® to the polychaete worm *Nereis virens*. *Aquaculture*. 430, 98-106.
- Varó, I., Redón, S., Garcia-Roger, E., Amat, F., Guinot, D., Serrano, R., Navarro, J.C., 2015. Aquatic pollution may favor the success of the invasive species *A. franciscana*. *Aquatic Toxicology*. 161, 208-220.
- Velíšek, J., Jurčíková, J., Dobšíková, R., Svobodová, Z., Piačková, V., Máchová, J., Novotný, L., 2007. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 297-301.

- Venkatesan, B., Mahimainathan, L., Das, F., Ghosh-Choudhury, N., Ghosh Choudhury, G., 2007. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via PI 3 kinase/Akt signaling in mesangial cells. *J. Cell. Physiol.* 211, 457-467.
- Verlecar, X., Jena, K., Chainy, G., 2007. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chem. Biol. Interact.* 167, 219-226.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 146, 281-300.
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., 2013. Practical procedures for selected biomarkers in mussels, *Mytilus galloprovincialis*—Implications for marine pollution monitoring. *Sci. Total Environ.* 461, 56-64.
- Walker, C.H., 1995. Environmental Toxicology: Hazards to the Environment and Man in the Mediterranean Region Biochemical biomarkers in ecotoxicology — some recent developments. *Sci. Total Environ.* 171, 189-195.
- Weeks, J. M., 1998. Effects of pollutants on soil invertebrates: Links between levels. En G. Schüürmann y B. Market, (Eds.), *Ecotoxicology*. New York: John Wiley & Sons, Inc. pp. 645-664.
- Wheelock, C.E., Nakagawa, Y., 2010. Carboxylesterases—from function to the field: an overview of carboxylesterase biochemistry, structure–activity relationship, and use in environmental field monitoring. *Journal of Pesticide Science.* 35, 215-217.
- Wheelock, C.E., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Miller, J.L., Miller, M.J., Hammock, B.D., 2008. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). In: Anonymous Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer, pp. 117-178.
- Willmer, P., Stone, G., y Johnston, I. 2000. *Environmental physiology of animals*. Oxford UK, Wiley-Blackwell. ISBN 0-632-03517-X.
- Withers, P. C. 1992. *Comparative Animal Physiology* (1st Ed.). Orlando FL EEUU, Saunders College Publishing. ISBN 0-03-012847-1
- Xu, P., Huang, L., 2017. Effects of α -cypermethrin enantiomers on the growth, biochemical parameters and bioaccumulation in *Rana nigromaculata* tadpoles of the anuran amphibians. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139, 431-438.
- Yatabe, T., Arriagada, G., Hamilton-West, C., Urcelay, S., 2011. Risk factor analysis for sea lice, *Caligus rogercresseyi*, levels in farmed salmonids in southern Chile. *J. Fish Dis.* 34, 345-354.
- Zhang, T., Yang, M., Pan, H., Li, S., Ren, B., Ren, Z., Xing, N., Qi, L., Ren, Q., Xu, S., 2017. Does time difference of the acetylcholinesterase (AChE) inhibition in different tissues exist? A case study of zebra fish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride and deltamethrin. *Chemosphere.* 168, 908-916.

