

UCH-FC
MAG-B
N 238
C.1



**EFECTO DEL CLORPIRIFÓS EN EL
DESARROLLO DE CODORNICES (*Coturnix
c.japonica*): ASPECTOS ENZIMÁTICOS Y DEL
METABOLISMO ENERGÉTICO.**

TESIS
ENTREGADA A LA
UNIVERSIDAD DE CHILE
EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS
PARA OPTAR AL GRADO DE

MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

POR

CRISTÓBAL NARVÁEZ ORDÓÑEZ

MAYO, 2014

DIRECTOR DE TESIS: DR. PABLO SABAT KIRKWOOD
CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN CARLOS SÁNCHEZ HERNÁNDEZ



INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

CRISTÓBAL NARVÁEZ ORDÓÑEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 30 de abril de 2014.

Dr. Pablo Sabat Kirkwood
Director de Tesis

Dr. Juan Carlos Sánchez Hernández
Co-director de Tesis

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Claudio Veloso Iriarte
Presidente Comisión

Dr. Rigoberto Solís Muñoz
Evaluador

Santiago, 5 de Junio de 2014

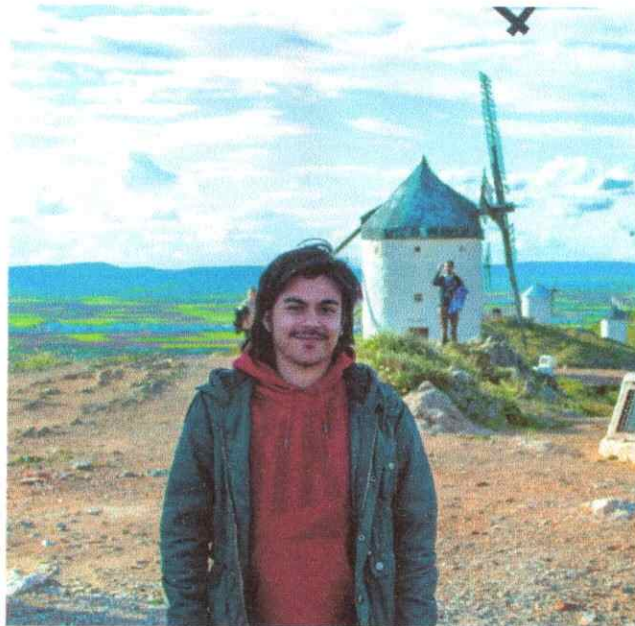




Christina María García

...a la memoria de mis padres, quienes me enseñaron a amar y a luchar por mis sueños. Gracias por ser mi ejemplo y mi apoyo incondicional. Este libro es dedicado a ustedes, porque sin ustedes no hubiera sido posible este camino. Les quiero dedicar este libro porque ustedes son mi inspiración y mi fuerza. Gracias por enseñarme que con esfuerzo y dedicación se puede lograr todo. Este libro es un homenaje a su amor y a su sabiduría. Les quiero dedicar este libro porque ustedes son mi orgullo y mi alegría. Gracias por ser mi refugio y mi apoyo incondicional. Este libro es un homenaje a su amor y a su sabiduría. Les quiero dedicar este libro porque ustedes son mi inspiración y mi fuerza. Gracias por enseñarme que con esfuerzo y dedicación se puede lograr todo. Este libro es un homenaje a su amor y a su sabiduría. Les quiero dedicar este libro porque ustedes son mi orgullo y mi alegría. Gracias por ser mi refugio y mi apoyo incondicional. Este libro es un homenaje a su amor y a su sabiduría.

...a la memoria de mis padres...



Cristóbal Narváez Ordóñez

Nació en Santiago, Chile en 1987. Desde pequeño fue muy tranquilo y se caracterizaba porque le gustaba mucho estudiar y leer. Durante su estadía en el Instituto Nacional se da cuenta de su creciente gusto por las ciencias y por la música. En 2006 hace ingreso a la carrera de Biología Ambiental en la Universidad de Chile. Mientras cursa esta carrera es cuando comienza a trabajar en el laboratorio de Ecofisiología Animal en distintos proyectos del Dr. Pablo Sabat. En 2011 realiza su seminario de título y además hace ingreso al programa de Magíster en Ciencias Biológicas, bajo la tutoría del Dr. Sabat y la co-tutoría del Dr. Juan Carlos Sánchez, de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad de Castilla-La Mancha.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mi tutor, Pablo Sabat, por su constante apoyo en el desarrollo de esta tesis, desde la concepción de la idea, hasta las conclusiones finales. Agradezco su buena disposición para resolver cualquier duda, por haber depositado su confianza en que este proyecto saldría adelante a pesar de ser "novedoso" y por proveer todo lo necesario para el desarrollo de éste. También agradezco a mi cotutor, Juan Carlos Sánchez, por su confianza, buena disposición frente a mis dudas y principalmente por haberme recibido en su laboratorio y su valiosa ayuda durante mi estadía allá.

Agradezco al Doctor Claudio Veloso y al Doctor Rigoberto Solís por aceptar formar parte de la comisión evaluadora de esta tesis.

Agradezco también a quienes participaron activamente de este proyecto y a quienes aportaron ideas y ayudaron a resolver dudas, a Grisel Cavieres por tener paciencia a la hora de explicarme el proceso de la medición del consumo de oxígeno, a Andrés Sazo por ayudarme a conseguir las codornices y poder establecerlas en el vivero, a Mónica Núñez por la ayuda con las codornices durante las mediciones, ya que de alguna forma, siempre coincidían nuestros calendarios de mediciones, a Natalia Ramírez por siempre estar dispuesta a ayudarme con mis dudas, a Karin Maldonado por su gran

ayuda y su compañía en el cuidado de los animales en el vivero, a Juan Manuel Ríos por su ayuda y principalmente sus consejos y su apoyo, a Gonzalo Barceló por su gran ayuda, a Isaac Peña por su ayuda a la hora de la extracción de los órganos de los animales y a Gabriela Píriz por su gran ayuda otorgada al secar los órganos de las codornices.

Tampoco me olvido de los amigos que he hecho durante mi estadía en la Universidad de Chile, Cecilia Baeza, Irina Toro, Fernanda Valdés, Claudio Reyes y David Uribe. A mis amigos de mi época escolar que aún siguen a mi lado, Luis Ramírez, Camilo Céspedes, Camilo Barriga, Francisco Riveros, Eduardo Flores y Christiansen Oros. Agradezco también a mi amigo/hermano Christofer Oros por siempre apoyarme, aconsejarme y por compartir juntos nuestro proyecto, vía de escape y terapia llamada Ground Meat.

Finalmente agradezco a todos aquellos quienes se interesaron y me apoyaron en el transcurso de mi estadía en el magíster, especialmente a mi familia, Mary, Juan, Paulina, Flo, Javier y Arturo.

Esta tesis de magíster fue financiada gracias a CONICYT y al FONDECYT N°1120276.

Índice de Materias

Índice de Tablas.....	iv
Índice de Figuras.....	v
Índice de Abreviaturas.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Pesticidas.....	1
1.2 Esterasas.....	7
1.2.1 Actividad y función fisiológica.....	7
1.2.2 Contribución de las esterazas en toxicología ambiental.....	9
1.2.3 Inhibiciones esterásicas mediadas por pesticidas organofosforados.....	10
1.3 Metabolismo energético y detoxificación.....	11
2 HIPÓTESIS.....	15
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetios generales.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1 Reactivos.....	18
4.2 Tratamientos.....	19
4.3 Consumo de oxígeno.....	20
4.4 Determinación de la actividad carboxilesterasa.....	21
4.5 Determinación de la actividad butirilcolinesterasa.....	22
4.6 Análisis estadísticos.....	22
5 RESULTADOS.....	24
5.1 Masa corporal.....	24
5.2 Tasa metabólica de reposo y M_{sum}	25
5.3 Expansión metabólica.....	27
5.4 Efecto sobre los órganos.....	28
5.5 Esterasas.....	34
6 DISCUSIÓN.....	41
6.1 Efecto del clorpirifós sobre las tasas de gasto de energía.....	41
6.2 Efecto del clorpirifós sobre la masa corporal y el desarrollo de los órganos.....	44
6.3 Efecto del clorpirifós sobre las esterazas.....	45

7 CONCLUSIONES.....	. 49
8 REFERENCIAS.....	. 51

Índice de Tablas

Tabla 1: Propiedades físicas y químicas del clorpirifós.....	3
Tabla 2: LC ₅₀ /LD ₅₀ para distintos grupos de vertebrados.....	4
Tabla 3: Promedio (±EE) de tasa metabólica de descanso, metabolismo cumbre y expansión metabólica.....	27
Tabla 4: ANOVA de 2 vías (semana y tratamiento) para la masa de los órganos de codornices expuestas a clorpirifós.....	29
Tabla 5: ANCOVA para la masa de órganos de codornices expuestas a clorpirifós... .	33
Tabla 6: ANOVA de 2 vías (semana y tratamiento) para la actividad esterásica de codornices expuestas a clorpirifós.....	35
Tabla 7: Costos energéticos de producción de huevos en diversas especies de aves... .	44

Índice de Figuras

Figura 1: Variación de la masa corporal durante las 4 semanas del experimento para los tres tratamientos a los que fueron sometidos las codornices.....	25
Figura 2: Promedio de la tasa metabólica de descanso.....	26
Figura 3: Promedio del metabolismo cumbre.....	26
Figura 4: Porcentaje de la masa del hígado en relación a la masa corporal total en codornices expuestas a tres tratamientos de pesticida durante 4 semanas.....	30
Figura 5: Porcentaje de la masa del intestino delgado en relación a la masa corporal total en codornices expuestas a tres tratamientos de pesticida durante 4 semanas.....	30
Figura 6: Porcentaje de la masa del intestino grueso en relación a la masa corporal total en codornices expuestas a tres tratamientos de pesticida durante 4 semanas.....	31
Figura 7: Porcentaje de la masa de la molleja en relación a la masa corporal total en codornices expuestas a tres tratamientos de pesticida durante 4 semanas.....	31
Figura 8: Porcentaje de la masa del corazón en relación a la masa corporal total en codornices expuestas a tres tratamientos de pesticida durante 4 semanas.....	32
Figura 9: Porcentaje de la masa corporal de la cloaca en relación a la masa corporal total en codornices expuestas a tres tratamientos de pesticida durante 4 semanas.....	32
Figura 10: Promedio de actividad específica de CbE-4NPA en el intestino delgado de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas.....	36
Figura 11: Promedio de actividad específica de CbE- α NA en el intestino delgado de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas.....	36
Figura 12: Promedio de actividad específica de BChE en el intestino delgado de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas.....	37
Figura 13: Promedio de actividad específica de CbE-4NPA en el hígado de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas.....	37
Figura 14: Promedio de actividad específica de CbE- α NA en el hígado de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas.....	38

Figura 15: Promedio de actividad específica de BChE en el hígado de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas..... 38

Figura 16: Promedio de actividad específica de CbE-4NPA en el plasma sanguíneo de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas..... 39

Figura 17: Promedio de actividad específica de CbE- α NA en el plasma sanguíneo de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas..... 39

Figura 18: Promedio de actividad específica de BChE en el plasma sanguíneo de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas..... 40

Índice de Abreviaturas

4-NPA:	4-naftil acetato
α -NA:	α -naftil acetato
AChE:	Acetilcolinesterasa
BChE:	Butirilcolinesterasa
BMR:	Basal metabolic rate (tasa metabólica basal)
CB:	Carbamato
CbE:	Carboxilesterasa
LC50:	Concentración letal media
LD50:	Dosis letal media
ME:	Metabolic expansibility (expansión metabólica)
M_{sum} :	Summit metabolism (metabolismo cumbre o metabolismo máximo de termoregulación)
OF:	Organofosforado
ppm:	Partes por millón
RMR:	Resting metabolic rate (tasa metabólica de reposo)

RESUMEN

El principal uso de los pesticidas es combatir las plagas agrícolas, aumentar el rendimiento de las cosechas y disminuir el riesgo de pérdida. A pesar de esto, muchos de los pesticidas, tales como los organofosforados y carbamatos, presentan una elevada neurotoxicidad aguda e inespecífica. Las esterasas son enzimas de gran importancia en la detoxificación de plaguicidas debido a su mayor sensibilidad a estos que la acetilcolinesterasa. La exposición a pesticidas es un estresor energéticamente costoso para los animales ya que deben destinar parte de su presupuesto energético hacia la detoxificación de tales compuestos. Muchos estudios han documentado el rol de las esterasas en la detoxificación de pesticidas en diversas especies animales, y otros han documentado los costos energéticos asociados a estresores como el frío y el parasitismo, entre otros. Hasta donde conocemos, no existen estudios que relacionen la exposición a pesticidas con el metabolismo energético y sus consecuencias sobre la expresión de esterasas y el consumo de oxígeno en animales. En este estudio se analizó el efecto de la exposición a dos concentraciones subletales de un pesticida organofosforado durante cuatro semanas sobre el desarrollo de la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*). Se encontró que la exposición a una dosis subletal del pesticida, produce un aumento en los costos energéticos de mantención y una disminución de la capacidad termogénica en el ave. Hacia el final del experimento se observó la inhibición de la actividad esterásica, lo que sugiere que estas enzimas desempeñan un rol tamponeador o *buffer*, para así disminuir la concentración del pesticida en el organismo.

ABSTRACT

The main use of pesticides is to control crop plagues, increase crop yields and reduce the risk of loss. Despite this, many of the pesticides, such as organophosphates and carbamates, have high acute and nonspecific neurotoxicity. Esterases are important enzymes in the detoxification of pesticides because its higher sensitivity to these that acetylcholinesterase. Pesticide exposure is an energetically costly stressor for animals because they have to use part of its energy budget in the detoxification of such compounds. Many studies have documented the role of esterases in the detoxification of pesticides in various animal species, and others have documented the energy costs related to stressors such as cold and parasitism, among others. To our knowledge, there are no studies linking pesticide exposure to energy metabolism and its impact on the expression of esterases and oxygen consumption in animals. In this study the effect of exposure to two sublethal concentrations of an organophosphate pesticide was analyzed for four weeks on the development of the japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). It was found that exposure to a sublethal dose of the pesticide, produces an increase in energy maintenance costs and a decreased thermogenic capacity in the bird. Towards the end of the experiment the inhibition of esterase activity was observed, suggesting that these enzymes are fulfilling their role of buffer, thus decreasing the pesticide concentration in the organism.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Pesticidas

Durante décadas se han utilizado pesticidas para combatir las plagas agrícolas, aumentar el rendimiento de las cosechas y disminuir el riesgo de pérdida de éstas. En un principio los organoclorados fueron los pesticidas de mayor uso, principalmente el DDT. Su uso fue prohibido en la década de los 70's debido a que mostraba una elevada tasa de acumulación en los organismos no objetivo y una elevada persistencia ambiental. Los pesticidas usados hoy en día presentan una elevada neurotoxicidad aguda e inespecífica, causan efectos en el comportamiento animal y pueden reducir el éxito alimenticio o reproductivo y su habilidad para evitar la depredación (Walker 2001). Entre estos, los compuestos organofosforados (OFs) y carbamatos (CBs) son la clase de insecticidas más usados en el mundo (Sánchez et al., 1997).

El mecanismo de toxicidad aguda de los pesticidas OFs y CBs es la inhibición irreversible de la enzima acetilcolinesterasa (AChE EC 3.1.1.7) en el sistema nervioso y neuromuscular (Maxwell, 1992; Chanda et al., 1997). Ésta cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis colinérgicas causando una despolarización permanente de la membrana de la célula postsináptica. Las manifestaciones clínicas de estos eventos moleculares reflejan un cuadro de respuestas propias del sistema nervioso

autónomo donde este tipo de sinapsis son abundantes produciéndose temblores, salivación, convulsiones, e incluso la muerte del organismo por paro cardio-respiratorio (Maxwell, 1992). Ludke et al. (1975), establecieron un porcentaje de inhibición de la actividad AChE cerebral del 20 % de la actividad normal en la aves como un índice de estrés frente a la exposición a pesticidas OFs, mientras que un porcentaje del orden del 50 % o superior sería responsable de la muerte del animal atribuible al OF. Por otro lado, las AChEs presentan polimorfismos genéticos y moleculares y sus distribuciones y papeles fisiológicos difieren entre las especies (Forget et al., 2002). En consecuencia existe una amplia variabilidad interindividual de la actividad AChE en organismos no expuestos a pesticidas, lo que dificulta la identificación de individuos expuestos a pesticidas a través de la comparación de sus niveles de actividad AChE (Lundebye et al., 1997).

En Chile, en el año 2008, se vendieron casi 55 millones kg/l de plaguicidas (SAG, Informe de venta de plaguicidas de uso agrícola, 2008, Chile), del cual un 20 % corresponde a insecticidas, rodenticidas y acaricidas (serie 1000). Dentro de esta serie, el más vendido es el Aceite Parafinico y en segundo lugar, el clorpirifós. El clorpirifós [Ácido fosforotioico O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)ester] es un insecticida organofosforado de amplio espectro, que se usa para combatir las plagas de Escama de San José (*Diaspidiotus perniciosus*, *Quadraspidotus perniciosus*), Escama blanca (*Hemiberlesia rapax*), Huevos de arañita roja (*Tetranychus urticae*), Chanchitos Blancos (*Pseudococcus sp.*), Conchuela grande café (*Parthenolecanium persicae*), Conchuela café europea (*Parthenolecanium corni*), entre otras (Dow AgroSciences). Hay una gran

variedad de pruebas para comparar las distintas toxicidades de los productos químicos, pero el LC₅₀ (líquidos) o LD₅₀ (sólidos) (LC₅₀ median lethal concentration, LD₅₀ median lethal dose) son los más ampliamente utilizados en los experimentos de dosis-respuesta. El LC₅₀/LD₅₀ representa la concentración (LC₅₀) o la dosis (LD₅₀) a la cual el 50 % de la población presenta una respuesta, en este caso, la muerte. En la tabla 2 se muestran los valores de LC₅₀ o LD₅₀ para el clorpirifós en distintos grupos de vertebrados.

Tabla 1: Propiedades físicas y químicas del Clorpirifós

Punto de ebullición	74 °C, 165 °F
Presión de vapor	Aprox. 46 mmHg a 20 °C
Densidad de vapor	No determinada
Solubilidad en agua	Se emulsifica
Gravedad específica	1,18 (68/68 F)
Apariencia	Líquido color rojo
Aroma	Tipo solvente
Punto de ignición (solvente)	41 °C, 96 °F
Método usado	TCC

(Lorsban 4E, Hoja de seguridad, Dow AgroSciences Chile S.A.)

Tabla 2: LC₅₀/LD₅₀ para distintos grupos de vertebrados.

Grupo animal	LC ₅₀ /LD ₅₀
Peces - agua fría	LC ₅₀ : 3,0 ppb
Peces - agua tibia	LC ₅₀ : 3,3 ppb
Peces - estuario	LC ₅₀ : 0,42 ppb
Pulga de agua	LC ₅₀ : 1,7 ppb
Ostra	LC ₅₀ : 34 ppb
Camarón	LC ₅₀ : 0,035-0,11 ppb
Aves	LD ₅₀ : 8,4 - 112 mg/kg LC ₅₀ : 136 - 423 ppm
Ratas	LD ₅₀ : 137 mg/kg
<i>Coturnix c. japonica</i> (14 días)	LC ₅₀ : 492 ppm*

Chlorpyrifos Pesticide Fact Sheet, Prepared for the U.S. Department of Agriculture, Forest Service by Information Ventures, Inc.

*Hill & Camardese, 1986. Lethal Dietary Toxicities of Environmental Contaminants and Pesticides to *Coturnix*

Una de las metodologías comúnmente utilizadas para estimar el grado de exposición a compuestos OFs, es mediante biomarcadores. Los biomarcadores son respuestas biológicas a un nivel sub-individual que reflejan la exposición a, y los efectos tóxicos de, uno o más contaminantes (Peakall, 1992; van Gestel & van Brummelen, 1996). La inhibición de la actividad AChE cerebral ha sido el biomarcador más ampliamente usado para diagnosticar el envenenamiento o la simple exposición a OFs en una amplia variedad de organismos acuáticos y terrestres (Domingues et al., 2010; Fulton & Key, 2001; van der Oost et al., 2003). Sin embargo, una limitación en el uso de

la AChE cerebral se encuentra en la naturaleza de su medida. Es necesario sacrificar al animal para acceder a la determinación enzimática, lo que en muchas ocasiones no es posible debido al estado de protección de algunas especies o simplemente debido al bajo número de individuos disponibles en el sitio de estudio.

Este problema ha llevado a buscar índices de exposición a pesticidas alternativos, como es el caso de las enzimas butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8), carboxilesterasa (CbE, EC 3.1.1.1) así como la misma actividad AChE pero en tejidos que no supongan un riesgo para la salud del organismo (Leite et al., 2010). Estos ejemplos son utilizados como biomarcadores no destructivos y se clasifican en el grupo de las esterasas del tipo-B. Según esta clasificación tenemos las esterasas tipo-A, las cuales son capaces de hidrolizar los compuestos OFs; las esterasas tipo-B que son inhibidas por compuestos OFs, y finalmente las esterasas tipo-C, que no interactúan con dichos compuestos (Aldridge, 1953).

Varios estudios han reportado que las CbEs y BChE poseen una mayor sensibilidad que la AChE cerebral frente a la acción inhibitoria de los insecticidas OFs (Wogram et al., 2001; Fourcy et al., 2002; Galloway et al., 2002; Wheelock et al., 2008; Sánchez-Hernández & Wheelock 2009), y además se le ha atribuido un rol de "buffer" a estas esterasas sanguíneas (Russel & Overstreet, 1987, Sanchez et al., 1997). Gracias a esta mayor sensibilidad a los pesticidas OFs, estas enzimas actúan como "bioscavengers" que capturan las moléculas de OF circulantes, reduciendo la concentración del insecticida en el objetivo molecular, que en este caso es la AChE cerebral. Esta particularidad, hace que las esterasas sanguíneas sean consideradas como indicadores de

susceptibilidad; su alta sensibilidad hacia los insecticidas OFs y sus niveles de actividad contribuyen a la tolerancia de los organismos al impacto agudo de los insecticidas OFs (Masson & Lockridge, 2010; Wheelock et al., 2008). A pesar de que las esterasas se encuentran en muchos tejidos, se sintetiza principalmente en el hígado y luego se secreta hacia la circulación a través del aparato de Golgi (Medda & Proia, 1992; Robbi & Beaufay, 1991 & 1992; Murakami et al., 1993; Yan et al., 1995). Debido a su gran importancia en la detoxificación, el hígado es un biomarcador muy popular a la hora de evaluar la exposición a pesticidas. Otro tejido importante frente a la acción de sustancias tóxicas es el intestino delgado, ya que el tracto gastrointestinal es el principal epitelio de absorción de pesticidas. Se ha postulado que la presencia de esterasas en los enterocitos del intestino delgado podría actuar como una barrera bioquímica reduciendo el paso de pesticidas al medio interno del animal (Sánchez-Hernández et al., 2009).

Otro aspecto que también es considerado, es la duración de la exposición al plaguicida. Ésta puede ser aguda (efectos adversos que ocurren dentro de un tiempo corto -hasta 14 días- después de la administración de una sola dosis o después de múltiples dosis -dentro de 24 horas) o crónica (efectos que persisten por un largo período de tiempo cuando se expone a un individuo a un tóxico de forma constante o repetidamente) (IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2da ed. "Gold Book" 1997. Versión online 2006). La duración de la exposición varía la intensidad de los efectos y la potencial recuperación del individuo (Domingues et al., 2010). Se ha descrito la toxicidad aguda del clorpirifós en ratas, con un LD₅₀ oral que va desde 69 a 276 mg/kg (Gaines 1969). Los principales efectos observados debido a toxicidad

subcrónica corresponden a síntomas colinérgicos y depresión de las actividades colinesterásicas del plasma y de glóbulos rojos (Cochran et al. 1995). Dow (1964) observó que el nivel donde no se observan efectos (NOEL, "no-observed-effect level") para síntomas colinérgicos debido a exposición oral en perros fue de 1,8 mg/kg/día durante 90 días. El NOEL subcrónico para la inhibición de la actividad esterásica en plasma y glóbulos rojos en ratas fue de 1 mg/kg/día (Szabo et al., 1988). La toxicidad crónica en ratas causa una significativa reducción de la masa corporal cuando se le administró una dosis durante toda su vida de 10 mg/kg/día. También se pudo observar depresión en la actividad colinesterásica del plasma, glóbulos rojos y del cerebro (Young & Grandjean, 1988).

1.2 Esterasas

1.2.1 Actividad y función fisiológica

Las carboxilesterasas (EC, 3.1.1.1), llamadas también aliesterasas, corresponden a un grupo de enzimas hidrolasas que se caracterizan principalmente por romper ésteres carboxílicos de cadena corta (< 10 átomos de carbono) para obtener el correspondiente alcohol y ácido carboxílico (Leite et al, 2010; Sánchez-Hernández & Wheelock 2009), pero también hidrolizan ésteres del ácido fosfórico, tioésteres y anhídridos. Las CbEs

juegan un papel importante en el metabolismo de lípidos, esteroides y un amplio grupo de drogas. Este grupo de enzimas son importantes en la detoxificación de pesticidas OFs, carbamatos y piretroides (Sánchez-Hernández & Wheelock 2009). Las CbEs son sintetizadas principalmente en el hígado y posteriormente son liberadas al torrente sanguíneo, donde permanecen como enzimas solubles. Se encuentran en otros tejidos como el intestino delgado, riñones músculos, corazón, cerebro, pulmones, testículos, tejido nasal y respiratorio, tejido adiposo y leucocitos (Satoh & Hosokawa, 1998).

La butirilcolinesterasa (EC, 3.1.1.8) actúa como un refuerzo para la AChE y además como "bioscavengers" que capturan los tóxicos que puedan inhibir la actividad acetilcolinesterásica, ya sean fabricados por el hombre o de origen natural. Los compuestos formulados por el hombre incluyen agentes nerviosos OFs, pesticidas OFs, carbamatos y las drogas donepezil y rivastigmina (Duysen et al., 2007; Casida & Quistad, 2004). Entre los compuestos de origen natural se encuentran la physostigmina (también llamada eserina) en el haba de Calabar, cocaína de la planta *Erythroxylum coca*, solanidina en las papas verdes, huperzina A del musgo *Huperzia serrata*, y la anatoxina-a(S), un OF en algas verdeazules (Mahmood & Carmichael, 1987). La BChE hidroliza una variedad de esteres como la acetilcolina, propionilcolina y butirilcolina, la cual ha sido encontrada en el epitelio corneo bovino (Reubsaet & Ringvold, 2005), y en el cerebro bovino (Henschler & Hoppe Seylers, 1956) pero con una función desconocida. La aplicación local de butirilcolina en neuronas cardíacas intrínsecas aumenta la actividad neuronal (Darvesh et al., 1998), sugiriendo que puede actuar como un neurotransmisor. La BChE ha sido encontrada en casi todos los tejidos incluyendo el

plasma, hígado, cerebro, músculo, saliva, riñones, corazón, recubrimiento de vasos sanguíneos, piel, colon, intestino delgado, bazo, y pulmones (ver AceView en NCBI database).

1.2.2 Contribución de las esterasas en toxicología ambiental

Las CbEs son una herramienta que ha ido ganado terreno en la ecotoxicología gracias a su uso como biomarcador no destructivo de exposición a pesticidas. Al interactuar la CbE con el OF, se produce una inhibición irreversible de la actividad esterásica además de una disminución de la concentración del pesticida biológicamente activo (Chanda et al., 1997). La inhibición de la CbE debido a pesticidas no causa manifestaciones tóxicas en el organismo, por lo que se considera a estas esterasas como un biomarcador de sensibilidad a pesticida (Rodríguez-Castellanos et al., 2007; Lajmanovich et al., 2008). Estas hidrolasas llevan a cabo la detoxificación de pesticidas mediante dos vías principales: hidrólisis del enlace éster (CBs, piretroides y los OFs que presenten este tipo de enlace) y por unión irreversible del pesticida (OFs) al sitio activo de la CbE (Maxwell 1992; Wheelock et al., 2005; Crow et al., 2007).

La BChE también se ha transformado en un biomarcador de gran interés para evaluar la exposición a plaguicidas. Tal como sucede con las CbEs, al unirse con el tóxico, se produce una inhibición de la BChE. La inactivación de éstos tóxicos por parte de la BChE ocurre por hidrólisis o por unión reversible o irreversible. Al unirse a la

BChE, ésta se inhibe, pero esta inhibición no produce efectos adversos conocidos (Masson & Lockridge, 2010).

1.2.3 inhibiciones esterásicas mediadas por pesticidas organofosforados

Diversos estudios han documentado el efecto y la inhibición sufrida por las esterasas a raíz de la exposición a pesticidas. Por ejemplo, Laguerre et al., (2009) observaron como los insecticidas organofosforados inhibían significativamente las CbEs de los homogenados del caracol *Xeropicta derbentina* (además de observar una mayor sensibilidad a tales pesticidas comparadas con la AChE). La inhibición de CbEs también ha sido observada en vertebrados. Sánchez-Hernández et al. (1997) observaron una inhibición de >40 % en BChE y <50 % en CbE en el suero de *Gallotia galloti* en la isla de Tenerife (Islas Canarias) después de estar expuestos a paratión. También observaron inhibición de estas esterasas en 2 especies de aves expuestas al pesticida en la misma isla. Además, se ha observado que en renacuajos desarrollados, el diazinón inhibe la actividad CbE (Leite et al., 2010). En el estudio de Fossi et al. (1992) se expusieron codornices japonesas (*Coturnix c. japonica*) a dos dosis de pesticidas, un OF y un CB. Después de 24 hrs de la administración se observaron inhibiciones casi de un 100 % en BChE del plasma y de entre 40 % y 80 % en CbE plasmática. Cabe destacar que la actividad esterásica es muy importante en las primeras etapas del desarrollo de los organismos. Algunos estudios han documentado que las actividades CbE y BChE

exhiben mayores niveles durante las primeras semanas de vida. En un estudio con embriones del pez *Danio rerio* se muestra que la actividad CbE es elevada desde edades tempranas del animal en comparación con la actividad colinesterásica, otorgándole lo que puede ser un rol exclusivo en la detoxificación de pesticidas durante el desarrollo embrionario del pez (Kuster, 2005). En codornices se observa algo similar, ya que durante las dos primeras semanas de vida, el tejido intestinal presenta una actividad esterásica mayor que la detectada a partir de la tercera semana de vida del ave (González-Vejares, datos no publicados).

1.3 Metabolismo energético y detoxificación

Según el principio de asignación de energía, cuando ésta es asimilada por los animales adultos es destinada a dos demandas o funciones básicas, mantenimiento y producción (Congdon et al., 1982, 2001; Weiner 1992; McNab 2002). Los costos de mantenimiento son esenciales para la continuidad de la vida e incluyen el mantenimiento estándar (ej.: costos basales energéticos) y el mantenimiento de la actividad (energía necesaria para forrajeo, ritmos circadianos y digestión), mientras que la energía destinada a la producción, se puede dividir al crecimiento y reproducción (Congdon et al., 1982). Cuando la disponibilidad de energía es limitada, los costos energéticos necesarios para la vida son una prioridad, mientras que la energía destinada hacia altos niveles de actividad y reproducción se ve restringida (Lucas 1996; McNab 2002). En

este sentido, los animales se ven enfrentados regularmente a estresores y estos pueden ser energéticamente costosos debido a diversas razones que incluyen el despliegue de procesos que brindan una protección ante tales estresores o libran al cuerpo del estresor, y cambian la concentración de hormonas del estrés (Morgan & Iwama, 1996). Los estresores también pueden disminuir la eficiencia con la que se asimila la energía (Baird et al., 1990), alterar la accesibilidad a la energía en el ambiente (Hopkins et al., 2004) y afectar el gasto energético asociado con la actividad (Congdon et al., 2001). A pesar de que el costo energético de la exposición y la detoxificación de pesticidas ha sido estudiado en peces y en algunos lacértidos (Rice, 1990; Beyers & Sikoski 1994; Beyer et al., 1998; DuRant et al., 2007; McCarthy & Fuiman 2008), hasta donde sabemos, no existen estudios acerca de los costos energéticos de detoxificación en aves.

Debido a que la tasa metabólica depende de múltiples factores bióticos y abióticos en endotermos, las comparaciones entre temporadas o especies requieren de mediciones estandarizadas de las tasas de gasto de energía. La más común de estas estandarizaciones es la tasa metabólica basal (BMR) o la tasa metabólica de reposo (RMR). Generalmente sirve como una línea base para comparaciones de costos metabólicos de actividades entre especies (Kersten & Piersma 1987; Bennett & Harvey 1987; McNab 1988; Trevelyan et al., 1990; McKechnie & Wolf 2004; McKechnie et al., 2006; White et al., 2007; Wiersma et al., 2007). Teóricamente, el BMR es la tasa metabólica mínima requerida para mantención en endotermos. Se mide dentro de la zona termoneutral bajo condiciones digestivas postabsortivas durante la fase de descanso del ciclo diario en animales en reposo, sin crecimiento y no reproductivos (McNab 1997).



Cuando alguna de estas condiciones no se cumplen, es decir, el individuo es juvenil en crecimiento o se encuentra en época reproductiva, se puede utilizar el RMR.

Otra medida estandarizada de la tasa metabólica es la tasa metabólica máxima durante la actividad (MMR). Comparaciones de MMR en aves no son posible actualmente, ya que MMR durante el vuelo no ha sido convincentemente medido debido a las dificultades técnicas asociadas con la verificación de que el consumo de oxígeno durante el vuelo sostenido ha alcanzado efectivamente los valores máximos. Una medida estandarizada alternativa al MMR que ha sido más común en las comparaciones es el metabolismo máximo de termorregulación [M_{sum} ; (Swanson et al., 1996), también conocido como tasa metabólica peak inducida por el frío (PMRc), (Wiersma et al., 2007)] o máxima capacidad termogénica. M_{sum} se define como la tasa metabólica máxima alcanzada por aves sometidas a exposición al frío. Atmosferas de helio-oxígeno (helox) han sido utilizadas para generar las mediciones de M_{sum} (Saarela et al., 1995; Dawson & Carey 1976; Hart 1962) debido a que facilitan pérdidas de calor sin perjudicar las funciones metabólicas (Rosenmann & Morrison 1974).

Considerando estas dos medidas estandarizadas del consumo de oxígeno (RMR y M_{sum}) se puede obtener otro indicador del metabolismo energético: la expansión metabólica (*metabolic expansibility*, ME), que corresponde a la razón de la tasa metabólica máxima sobre la mínima (M_{sum}/RMR) (Swanson 2010; Hinds et al., 1993; Swanson et al., 2012) y se define como la capacidad de un organismo para incrementar su nivel de producción de calor para un tamaño dado de la maquinaria metabólica (Cooper & Swanson 1994; Arens & Cooper 2005). Por lo tanto, variaciones en ME

deberían entregar información para evaluar ajustes de los costos de mantención fisiológicos y de capacidad termogénica. En los mamíferos, ME es típicamente entre 4 y 8, pero puede alcanzar valores superiores a 10 (Careau 2013; Hinds et al., 1993). Para el caso de las aves, el valor de ME es parecido a los mamíferos, con valores máximos de 9 - 9.5 (Arens & Cooper 2005; Van de Ven et al., 2013). Por ejemplo, Canals et al. (2011), reportaron que la máxima capacidad metabólica en codornices (RMR y M_{sum}) se alcanza a los 10 días de vida, para luego descender hasta la adultez. Estos resultados concuerdan con los estudios previos de Freeman (1967), McNabb & McNabb (1977) y Burggren (1989).

2 HIPÓTESIS

Hasta donde conocemos, no existen estudios que relacionen la exposición a pesticidas organofosforados con el metabolismo energético y sus consecuencias sobre las esterasas y el consumo de oxígeno en algún organismo. Debido a esta ausencia de información, en esta investigación se estudiarán tales efectos.

Considerando que la exposición a pesticidas provocaría un gasto energético y de nutrientes asociado a la detoxificación, la exposición a clorpirifós provocaría un desbalance en el presupuesto de materia y energía.

Como consecuencia de dicho desbalance, esperamos encontrar i) una disminución en la masa corporal de las codornices en desarrollo debido al uso de una mayor cantidad de energía destinada a la detoxificación, ii) una menor capacidad en el consumo de oxígeno bajo dos condiciones distintas, iii) un menor tamaño en los órganos de las codornices debido a la menor cantidad de energía utilizada en la producción de tejidos, y finalmente iv) una mayor inhibición de la actividad esterásica, al capturar las moléculas de OF circulantes.

3 OBJETIVOS

Una gran cantidad de estudios dan cuenta de los efectos de la exposición a pesticidas durante la ontogenia; tales como el efecto en el desarrollo del sistema nervioso, mutaciones génicas, mutaciones cromosómicas, efectos en el comportamiento, entre otros. Sin embargo, no existen estudios que detallen los efectos sobre la maquinaria detoxificadora y el costo energético que ésta presenta. Es por ello que en esta tesis se estudió el efecto de la exposición a dos concentraciones subletales de un pesticida organofosforado durante cuatro semanas sobre el desarrollo de un modelo de ave, *Coturnix coturnix japonica*. Como las CbEs se componen de múltiples isoenzimas inespecíficas, se utilizaron dos sustratos distintos para la caracterización de la actividad de esta hidrolasa.

3.1 Objetivos específicos

1. Cuantificar el gasto energético asociado a la detoxificación de pesticidas organofosforados.
2. Observar el efecto de la exposición subcrónica sobre el desarrollo de los órganos.
3. Observar la variación de los niveles de actividad CbE y BChE en tres tejidos (intestino delgado, hígado y plasma sanguíneo) expuestos a distintas concentraciones de pesticida.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

Los reactivos químicos que fueron utilizados para los ensayos de CbEs y BChE fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Santiago, Chile) y son los siguientes: α -naftil acetato (α -NA), 4-naftil acetato (4-NPA), yoduro de butiriltiocolina (BTCl), 4-nitrofenol y sal de diazonio Fast Red ITR, el cual es un cromóforo utilizado para la detección de naftoles. Las soluciones de los sustratos α -NA y 4-NPA fueron preparadas en etanol, conservándose a 4-5 °C en un congelador. El clorpirifós fue adquirido en una de sus formas comerciales (Lorsban 4E, 48% ingrediente activo) a través de la empresa CALS (Santiago, Chile).

4.2 Tratamientos

Un total de 66 codornices de 15 días fueron adquiridas en un criadero comercial (Santiago, Chile), y separadas al azar en tres grupos experimentales (n=18 cada grupo). Cada grupo fue sometido a un tratamiento durante cuatro semanas; un grupo control, un grupo expuesto a 10 ppm del pesticida organofosforado, y el último expuesto a 20 ppm. Se escogieron estas bajas concentraciones, las cuales corresponden al 2 % y al 4 % del LC₅₀ (492 ppm) de codornices expuestas a clorpirifós (Hill & Camardese, 1986), para evitar la muerte de los individuos. Además el protocolo experimental contempló un tiempo de exposición de 30 días, debido a que esta especie alcanza la madurez sexual a los 45 días de vida, momento en el que comienza la postura de huevos. Des esta manera, se evitó trabajar con individuos que potencialmente presentaran un gasto energético extra asociado a la reproducción. Los tres grupos fueron mantenidos con agua y comida *ad libitum* y un fotoperíodo de L:D 12:12 en una habitación termorregulada (25±2 °C). El primer día fueron sacrificados 12 individuos mediante exposición a CO₂, se les midió la masa corporal, fueron disecados abdominalmente y sus órganos extraídos y pesados. El intestino de cada individuo fue lavado con una solución de NaCl (0.9 % p/v), medido (±0.5 mm), pesado (±0.0001 g) y finalmente congelado y guardado a -80 °C en un congelador. El hígado también fue pesado y guardado a -80 °C. Posteriormente, cada semana se sacrificaron 12 individuos (4 de cada tratamiento), a los cuales se les extrajeron los órganos y se congeló el hígado e intestino, siguiendo el método antes descrito. Muestras de sangre (75 µL) fueron tomadas desde la vena braquial cada

semana a individuos de los tres tratamientos, luego fueron centrifugadas a 5.000 rpm durante 5 minutos, el plasma fue separado y congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 Consumo de oxígeno

Las mediciones de consumo de oxígeno (VO_2) se realizaron mediante un sistema de respirometría de flujo abierto (Sable Systems, Nevada). La determinación individual de la tasa metabólica de reposo (RMR) fue llevada a cabo en una cámara de acero de 2 litros a $30\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. La cámara metabólica recibió aire seco a una tasa de $500\text{ mL}/\text{min}$, para asegurar una correcta mezcla de aire, el CO_2 fue removido y el aire fue secado antes de entrar y después de dejar la cámara. El oxígeno fue monitoreado cada 5 segundos. Todas las mediciones fueron realizadas durante la fase de descanso (entre las 18:00 y las 07:00 hrs). El M_{sum} fue determinado en una atmósfera de He-O_2 (80-20 %, INDURA, Chile). La cámara metabólica recibió la mezcla de gases seca a 500 mL min^{-1} y la temperatura de la cámara fue monitoreada constantemente ($-15\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). La mezcla de aire pasó a través de absorbentes de CO_2 y H_2O (Baralyme y Drierita) a la entrada y a la salida de la cámara. Las mediciones fueron detenidas cuando la reducción del consumo de VO_2 fue evidente. Para corroborar que los animales salieron hipotérmicos de la cámara metabólica, la temperatura corporal (T_c) fue medida con una termocupla intra-rectal ($\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$) después de cada medición. Sólo se consideraron las mediciones en que las aves presentaron hipotermia (i.e., $T_c < 35\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.4 Determinación de la actividad Carboxilesterasa

La actividad CbE fue determinada espectrofotométricamente mediante un lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan GO a 25 °C, utilizando los sustratos α -NA y 4-NPA. La actividad específica fue expresada como mU mg⁻¹ proteína total (1U = 1 μ mol min⁻¹ en las condiciones experimentales descritas). La proteína total fue cuantificada siguiendo el método de Bradford (1976) utilizando albúmina bovina sérica como estándar. La actividad CbE usando α -NA fue determinada según Bunyan et al. (1968) adaptado de Gomori (1953). El medio de reacción (250 μ L, volumen final) contenía Tris-HCl 0.1 M (pH 7.4) y α -NA 20 mM, y fue incubada durante 10 minutos a 25 °C con la muestra. La formación de α -naftol fue detenida añadiendo 50 mg Fast Red ITR 0,1 % en una mezcla de SDS 5 %/ Tritón X-100 5 %. Las soluciones se mantuvieron durante 30 minutos a 25 °C y en oscuridad. La absorbancia del complejo naftol-Fast Red ITR fue leída a 530 nm. La actividad de CbE usando 4-NPA fue determinada siguiendo el método de Chanda et al. (1997). El medio de reacción (250 μ L, volumen final) contenía Tris-HCl 0.1 M (pH 7.4) con la muestra de intestino. Se inició la reacción añadiendo 10 μ L de 4-NPA 20 mM. La reacción fue detenida después de 10 minutos añadiendo 50 μ L de SDS 2 % en Tris, 2 %. La formación de 4-nitrofenol fue monitoreada a 405 nm y cuantificada utilizando una curva estándar de 4-nitrofenol.

4.5 Determinación de la actividad Butirilcolinesterasa

La actividad Butirilcolinesterasa fue determinada según Wheelock et al. (2005) adaptado de Ellman et al. (1961). El medio de reacción (200 μ L, volumen final) contenía tampón fosfato 0.1 M (pH 8.0) con DTNB 10 mM y la muestra. La reacción fue iniciada con la adición de BTCI 60 mM y la formación del producto fue monitoreada durante 8 minutos a 412 nm.

4.6 Análisis estadísticos

En primer lugar se realizó una prueba de ANOVA de medidas repetidas para comprobar las diferencias entre las masas corporales de los individuos durante todo el tratamiento. Este mismo test estadístico se llevó a cabo para ver si la exposición al pesticida tenía algún efecto significativo sobre el consumo de oxígeno de las aves (RMR y M_{sum}). Para establecer la variación en el tamaño de los órganos entre los distintos tratamientos, se utilizó un ANCOVA con la masa corporal como covariable, además de un ANOVA con el peso de los órganos expresado como % de la masa corporal. Finalmente, la inhibición de las esterasas (CbE-4NPA; CbE- α NA y BChE) fue comparada entre tratamientos y semanas utilizando ANOVA de 2 vías. Para comprobar que la distribución de los datos se ajustó o no a una distribución normal, se realizó la prueba de Kolmogorov-smirnov,

seguida de la prueba de Shapiro-Wilks. Los análisis estadísticos y representaciones gráficas fueron realizados utilizando los programas Statistica 7.0 y SigmaPlot 10.0, respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 Masa corporal

Al comienzo del experimento (semana 0, edad: 15 días) la masa corporal tuvo un valor promedio de $60,79 \pm 8,9$ g, llegando a un valor de $137 \pm 8,43$ g para la última semana del experimento (edad: 45 ± 3 días). No se registraron diferencias significativas en la variación de la masa corporal a lo largo del experimento para los tres tratamientos (ANOVA 2 vías: $F_{(8,73)} = 0,23$; $p = 0,98$; figura 1).

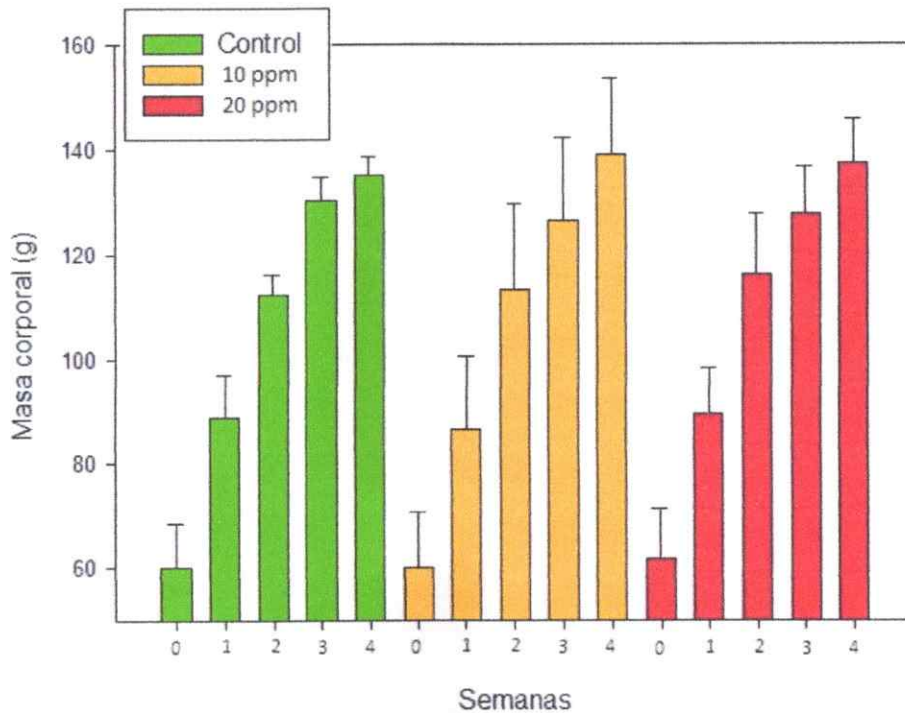


Figura 1: Variación de la masa corporal durante las 4 semanas del experimento para los tres tratamientos a los que fueron sometidos las codornices (promedio \pm DE, $n=6$ para cada tratamiento).

5.2 Tasa metabólica de reposo y M_{sum}

La tasa metabólica de reposo fue significativamente diferente cuando se midió en la semana tres con respecto a la semana uno (ANOVA medidas repetidas: $F_{(4,28)} = 2,77$; $p = 0,047$; figura 2). Específicamente se observa un mayor consumo de oxígeno después de tres semanas. Para el caso del metabolismo máximo, las diferencias no fueron significativas (ANOVA medidas repetidas: $F_{(4,4)} = 2,58$; $p = 0,19$; figura 3) pero aún así,

se puede apreciar una tendencia a la disminución del consumo de oxígeno cuando los individuos han sido expuestos al organofosforado durante cuatro semanas.

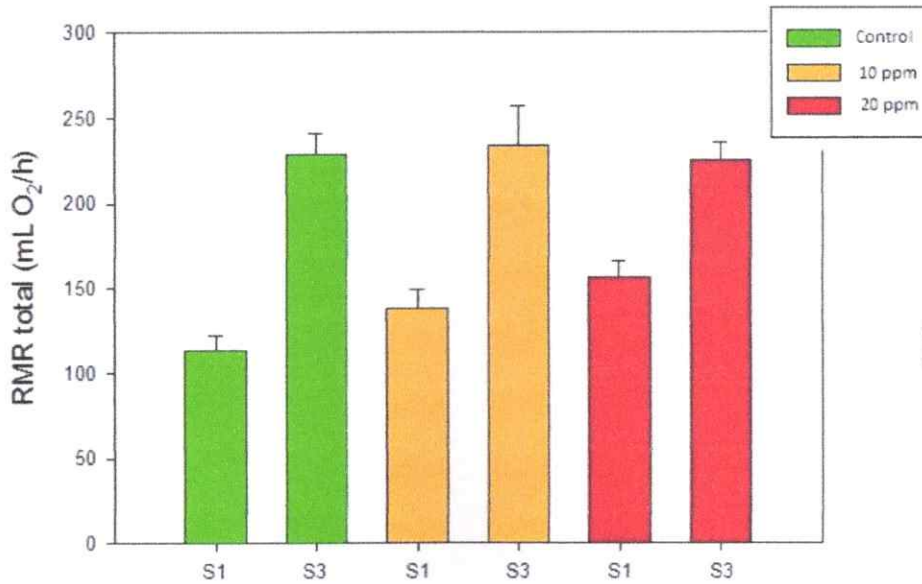


Figura 2: Promedio (\pm EE, n tratamiento = 6) de la tasa metabólica de descanso. Las mediciones fueron realizadas la primera y tercera semana desde que se inició el experimento.

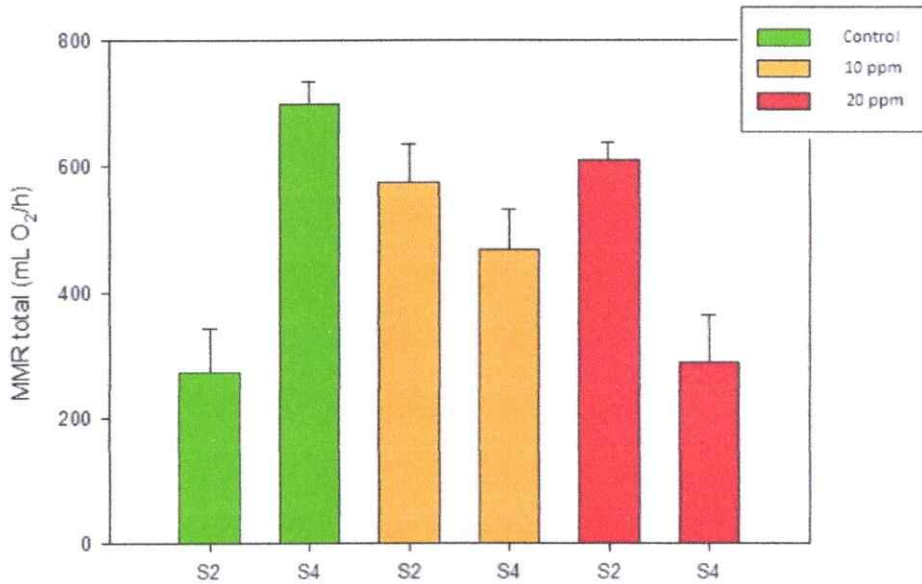


Figura 3: Promedio (\pm EE, n tratamiento = 6) del metabolismo cumbre. Las mediciones fueron realizadas la segunda y cuarta semana desde que se inició el experimento.

5.3 Expansión metabólica

Los valores de ME (M_{sum}/RMR) no presentaron diferencias significativas después de que las codornices estuvieran cuatro semanas expuestas al organofosforado (ANOVA medidas repetidas: $F_{(4,4)} = 0,36$; $p = 0,83$; tabla 3). A pesar de esto, se observa que el valor de ME, hacia el final del experimento (M_{sum4}/RMR_3), aumentó en el control y disminuyó en ambos tratamientos con el plaguicida (10 ppm: 42,7 % de disminución; 20 ppm: 67,6 % de disminución).

Tabla 3: Promedio ($\pm EE$) de tasa metabólica de descanso, metabolismo cumbre y expansión metabólica.

Los subíndices en RMR y M_{sum} , corresponden a las semanas en que fueron realizadas las mediciones.

	Control	10 ppm	20 ppm	F	gl	p
RMR ₁ (mL O ₂ min ⁻¹)	1,89 ± 0,14	2,41 ± 0,27	2,49 ± 0,19	2,46	2,15	0,12
RMR ₃ (mL O ₂ min ⁻¹)	3,70 ± 0,22	3,59 ± 1,15	3,63 ± 0,01	1,21	2,15	0,33
M_{sum2} (mL O ₂ min ⁻¹)	4,57 ± 1,16	9,57 ± 1,02	10,16 ± 0,48	3,82	2,10	0,058
M_{sum4} (mL O ₂ min ⁻¹)	11,64 ± 0,61	7,81 ± 1,04	4,84 ± 1,25	14,8	2,3	0,028
ME (M_{sum2}/RMR_1)	2,39 ± 0,60	4,05 ± 0,37	4,10 ± 0,17	3,65	2,10	0,064
ME (M_{sum4}/RMR_3)	3,15 ± 0,02	2,32 ± 0,45	1,33 ± 0,34	7,76	2,3	0,065

5.4 Efecto sobre los órganos

La variación de la masa de los órganos durante las cuatro semanas en los tres tratamientos se examinó con un ANOVA de 2 vías, con los datos expresados como % de la masa corporal. Con excepción del riñón, todos los órganos analizados presentaron diferencias significativas en al menos uno de los factores considerados (Semana, Tratamiento, Semana*Tratamiento). Los únicos órganos que sufrieron un efecto significativo a raíz de los tratamientos fueron el intestino grueso, la molleja y la cloaca. En la tabla 4 se muestran los valores de F y de p de cada órgano. Las figuras 4 a 9 muestran las diferencias obtenidas después de una prueba a posteriori de Tukey.

Tabla 4: ANOVA de 2 vías (semana y tratamiento) para la masa de los órganos de codornices expuestas a clorpirifós.

Órgano	Efecto	F	gl	p
Hígado	Semana	18,83	3,37	<0,001*
	Tratamiento	0,48	2,37	0,62
	Semana*Tratamiento	2,5	6,37	0,039*
I. D.	Semana	21,4	3,37	<0,001*
	Tratamiento	1,83	2,37	0,17
	Semana*Tratamiento	1,67	6,37	0,16
I. G.	Semana	15,02	3,37	<0,001*
	Tratamiento	5,15	2,37	0,01*
	Semana*Tratamiento	2,87	6,37	0,021*
Riñón	Semana	1,87	3,37	0,15
	Tratamiento	1,04	2,37	0,36
	Semana*Tratamiento	0,66	6,37	0,68
Molleja	Semana	14,39	3,37	<0,001*
	Tratamiento	5,94	2,37	<0,01*
	Semana*Tratamiento	1,38	6,37	0,25
Corazón	Semana	11,16	3,37	<0,001*
	Tratamiento	1,04	2,37	0,36
	Semana*Tratamiento	1,52	6,37	0,2
Cloaca	Semana	6,92	3,37	<0,001*
	Tratamiento	5,69	2,37	<0,01*
	Semana*Tratamiento	0,97	6,37	0,46

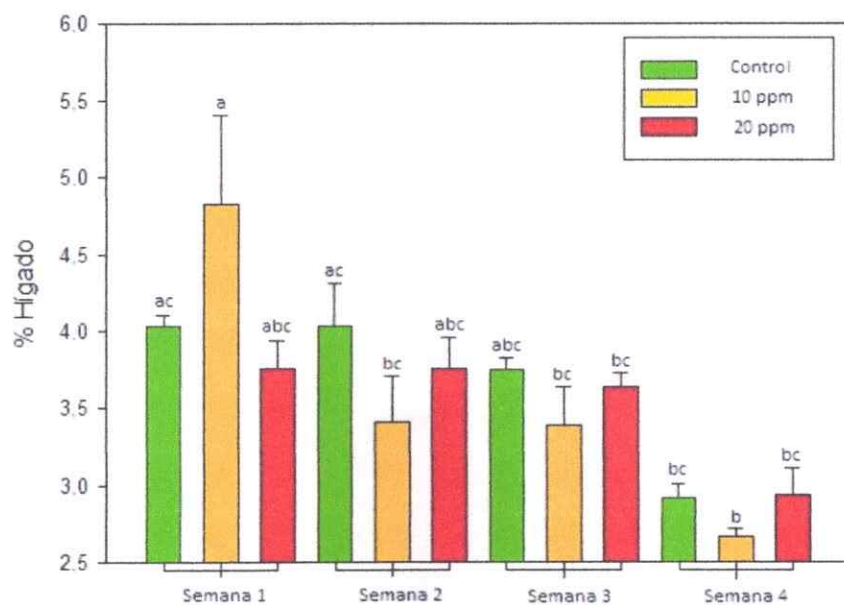


Figura 4: Porcentaje de la masa del hígado en relación a la masa corporal total (promedio \pm EE, n tratamiento = 16) en codornices expuestas a tres tratamientos de pesticida durante 4 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

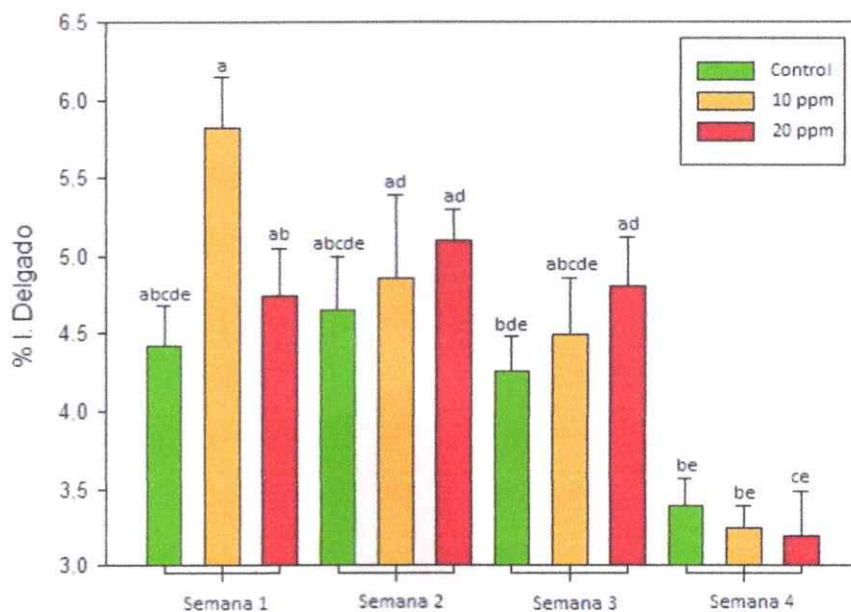


Figura 5: Porcentaje de la masa del intestino delgado en relación a la masa corporal total (promedio \pm EE, n tratamiento = 16) en codornices expuestas a tres tratamientos de pesticida durante 4 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

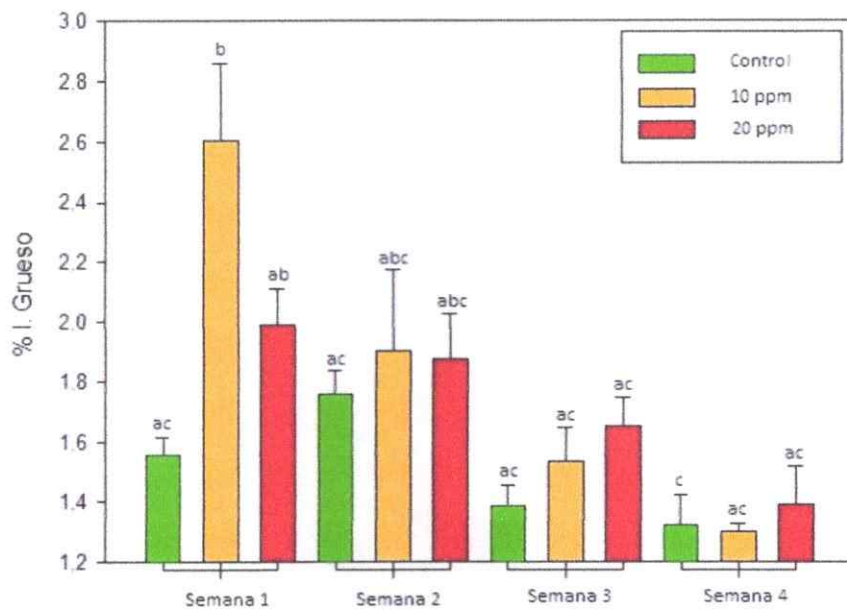


Figura 6: Porcentaje de la masa del intestino grueso en relación a la masa corporal total (promedio \pm EE, n tratamiento = 16) en codornices expuestas a tres tratamientos de pesticida durante 4 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

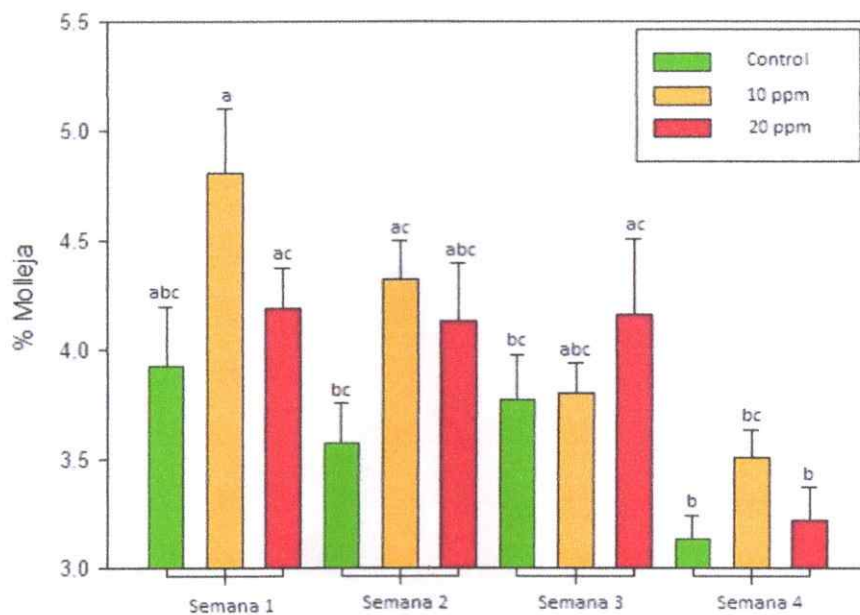


Figura 7: Porcentaje de la masa de la molleja en relación a la masa corporal total (promedio \pm EE, n tratamiento = 16) en codornices expuestas a tres tratamientos de pesticida durante 4 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

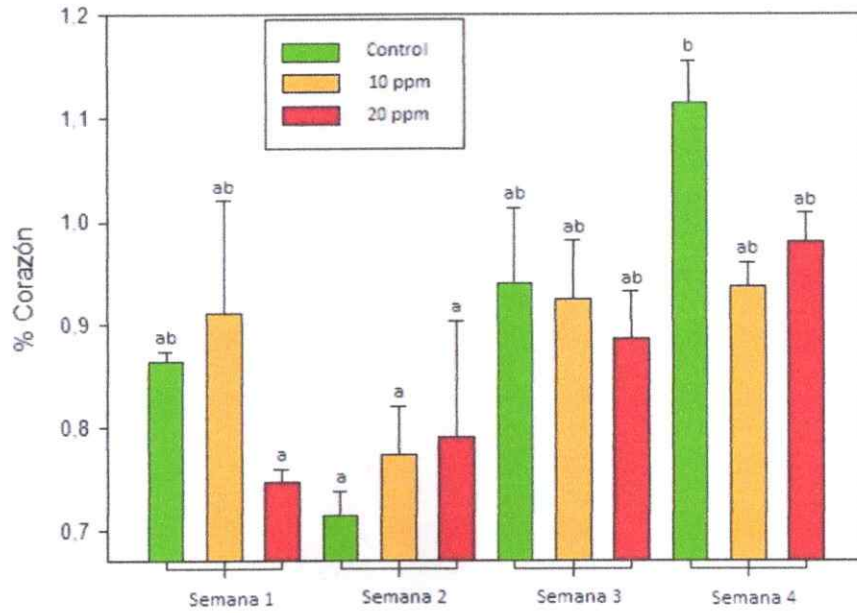


Figura 8: Porcentaje de la masa del corazón en relación a la masa corporal total (promedio \pm EE, n tratamiento = 16) en codornices expuestas a tres tratamientos de pesticida durante 4 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

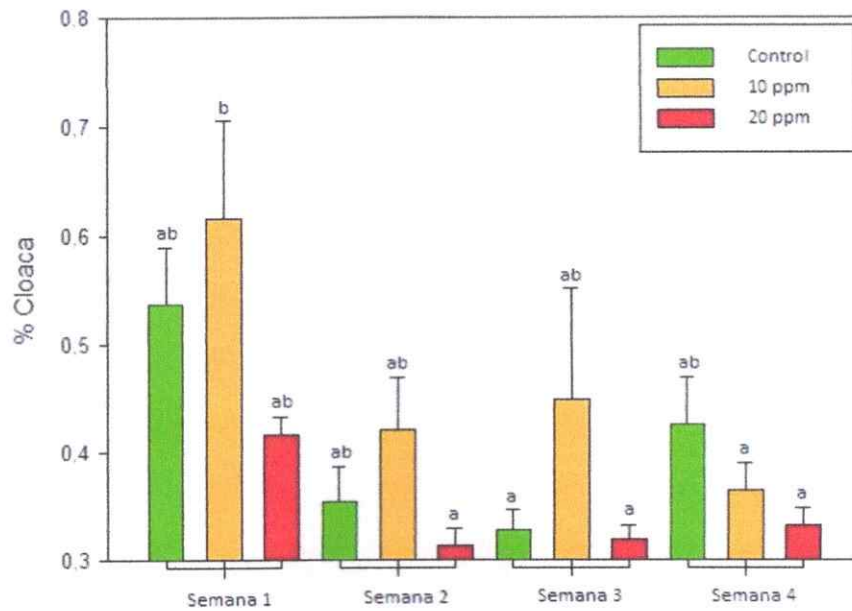


Figura 9: Porcentaje de la masa de la cloaca en relación a la masa corporal total (promedio \pm EE, n tratamiento = 16) en codornices expuestas a tres tratamientos de pesticida durante 4 semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

Además se realizó un ANCOVA con la masa de los órganos considerando la masa corporal como covariable. La cloaca es el único órgano que presenta diferencias significativas considerando el tratamiento al que fueron sometidas las codornices. En la tabla 5 se muestran los valores de F y de p de cada órgano.

Tabla 5: ANCOVA para la masa de los órganos de codornices expuestas a clorpirifós.

Órgano	Efecto	F	gl	p
Hígado	Semana	12,63	3,36	<0,001*
	Tratamiento	0,22	2,36	0,81
	Semana*Tratamiento	2,35	6,36	0,051
I. D.	Semana	12,07	3,36	<0,001*
	Tratamiento	0,14	2,36	0,87
	Semana*Tratamiento	1,15	6,36	0,35
I. G.	Semana	1,62	3,36	0,2
	Tratamiento	0,66	2,36	0,52
	Semana*Tratamiento	1,18	6,36	0,34
Riñón	Semana	2,95	3,36	0,045*
	Tratamiento	0,26	2,36	0,77
	Semana*Tratamiento	0,96	6,36	0,46
Molleja	Semana	5,04	3,36	<0,01*
	Tratamiento	1,64	2,36	0,21
	Semana*Tratamiento	0,8	6,36	0,57
Corazón	Semana	6,4	3,36	<0,01*
	Tratamiento	0,98	2,36	0,38
	Semana*Tratamiento	1,57	6,36	0,18
Cloaca	Semana	3,54	3,36	0,025*
	Tratamiento	5,72	2,36	<0,01*
	Semana*Tratamiento	0,57	6,36	0,75

5.5 Esterasas

Al realizar un ANOVA de 2 vías, se observa que para todos los casos (salvo la BChE hepática), la actividad esterásica varía significativamente con el tiempo (tabla 6). Se puede observar que las primeras dos semanas del experimento no existe un patrón claro, pero hacia la tercera y cuarta semana se ve un aumento de la actividad de las tres esterazas (figuras 10 a 18). El efecto del tratamiento también es significativo en la mayoría de los casos (con excepción de la BChE intestinal, CbE-4NPA hepática y BChE hepática), donde ambos tratamientos con pesticida (10 ppm y 20 ppm) presentan una menor actividad esterásica en comparación con el control, registrando inhibiciones hasta de un 66% para el caso de la BChE plasmática.

Tabla 6: ANOVA de 2 vías (semana y tratamiento) para la actividad esterásica de codornices expuestas a clorpirifós.

Tejido	Esterasa	Efecto	F	gl	P
I. D.	CbE-4NPA	Semana	6,31	3,36	<0,01*
		Tratamiento	4,56	2,36	0,017*
		Semana*Tratamiento	0,84	6,36	0,55
	CbE- α NA	Semana	3,19	3,36	0,035*
		Tratamiento	9,8	2,36	<0,01*
		Semana*Tratamiento	1,6	6,36	0,17
	BChE	Semana	2,98	3,36	0,04*
		Tratamiento	2,58	2,36	0,09
		Semana*Tratamiento	0,57	6,36	0,75
Hígado	CbE-4NPA	Semana	4,34	3,36	0,01*
		Tratamiento	3,07	2,36	0,058
		Semana*Tratamiento	1,09	6,36	0,38
	CbE- α NA	Semana	5,51	3,36	<0,01*
		Tratamiento	5,67	2,36	<0,01*
		Semana*Tratamiento	0,37	6,36	0,89
	BChE	Semana	1,15	3,36	0,35
		Tratamiento	2,2	2,36	0,12
		Semana*Tratamiento	0,54	6,36	0,77
Plasma Sanguíneo	CbE-4NPA	Semana	3,59	3,36	0,02*
		Tratamiento	8,02	2,36	<0,001*
		Semana*Tratamiento	2,18	6,36	0,06
	CbE- α NA	Semana	5,65	3,36	<0,01*
		Tratamiento	7,47	2,36	<0,01*
		Semana*Tratamiento	1,88	6,36	0,1
	BChE	Semana	3,08	3,36	0,035*
		Tratamiento	5,44	2,36	<0,01*
		Semana*Tratamiento	2,49	6,36	0,034*

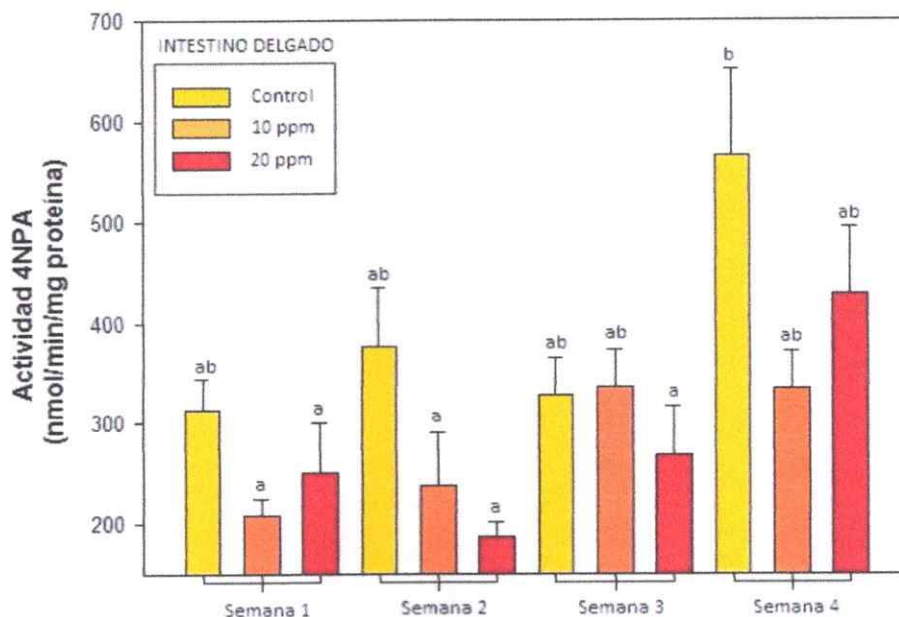


Figura 10: Promedio (\pm EE, n total = 49) de actividad específica de CbE-4NPA en el intestino delgado de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

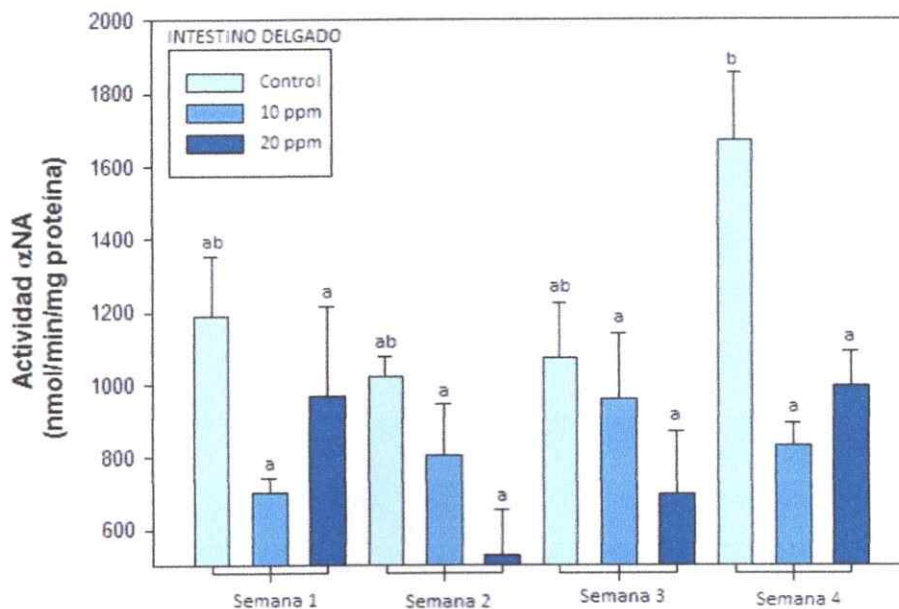


Figura 11: Promedio (\pm EE, n total = 49) de actividad específica de CbE- α NA en el intestino delgado de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

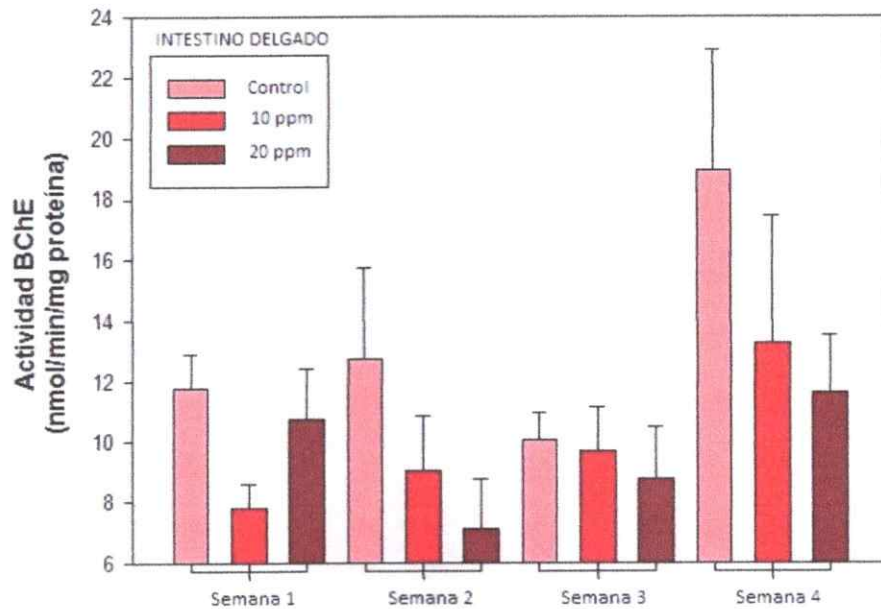


Figura 12: Promedio (\pm EE, n total = 49) de actividad específica de BChE en el intestino delgado de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

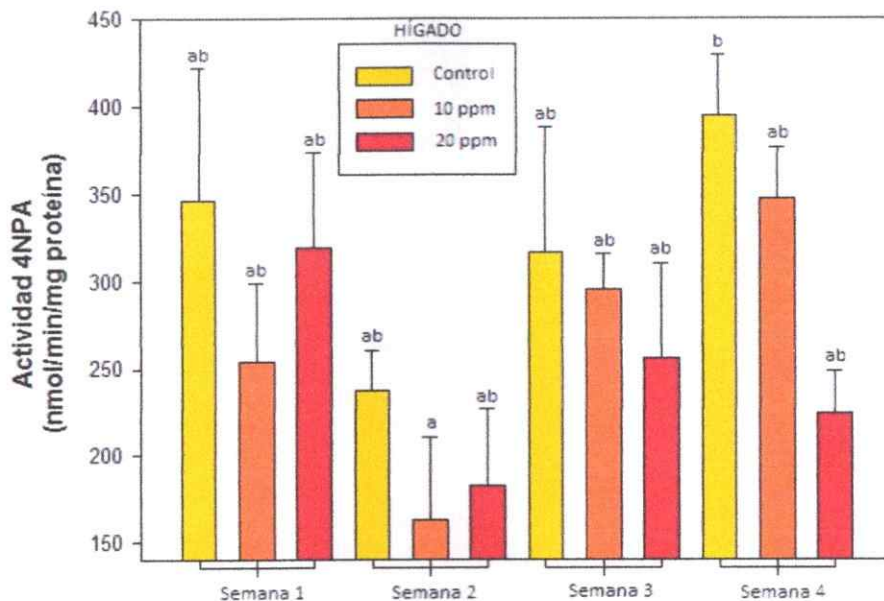


Figura 13: Promedio (\pm EE, n total = 49) de actividad específica de CbE-4NPA en el hígado de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.



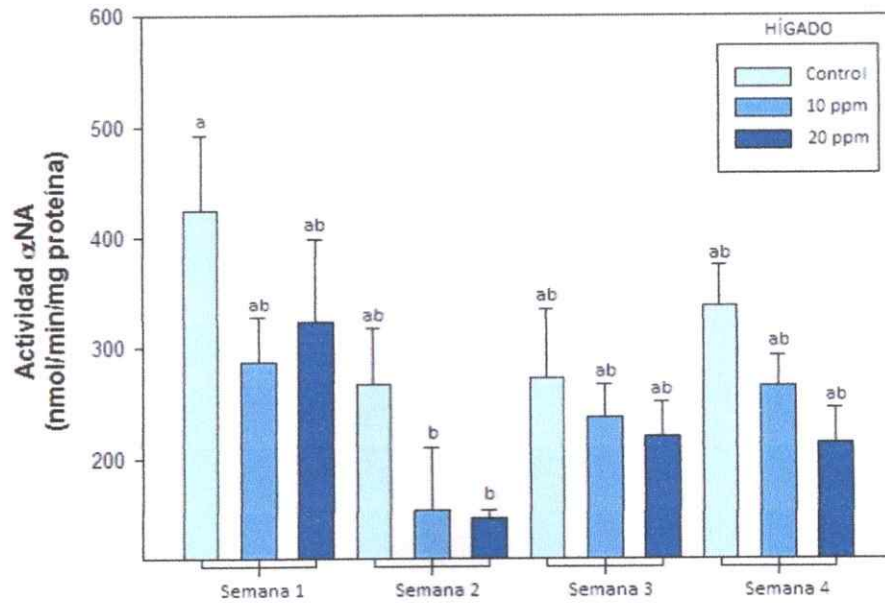


Figura 14: Promedio (\pm EE, n total = 49) de actividad específica de CbE- α NA en el hígado de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

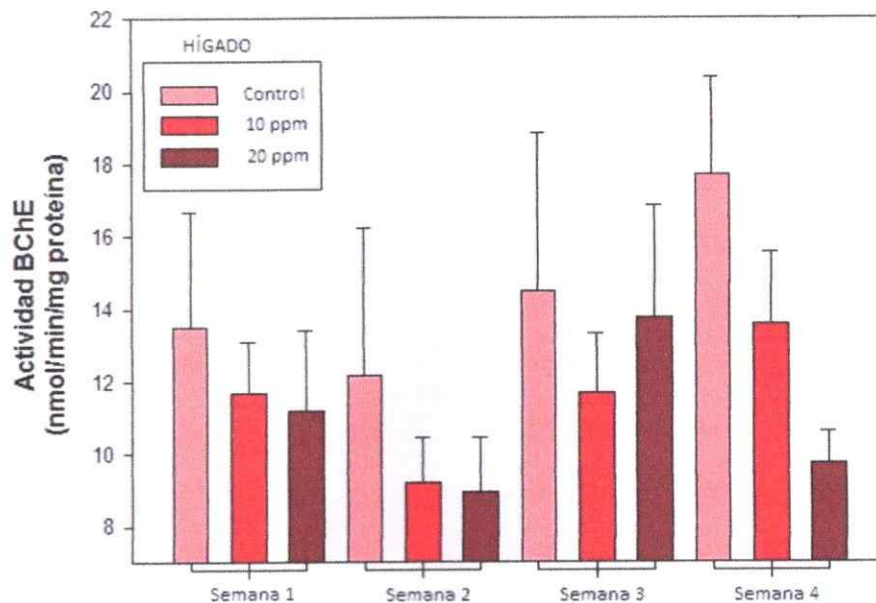


Figura 15: Promedio (\pm EE, n total = 49) de actividad específica de BChE en el hígado de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

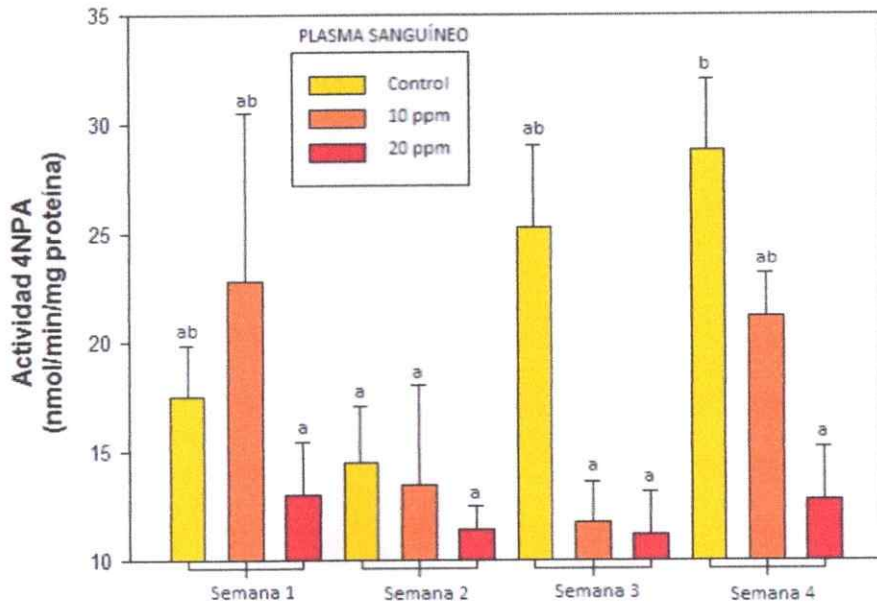


Figura 16: Promedio (\pm EE, n total = 64) de actividad específica de CbE-4NPA en el plasma sanguíneo de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

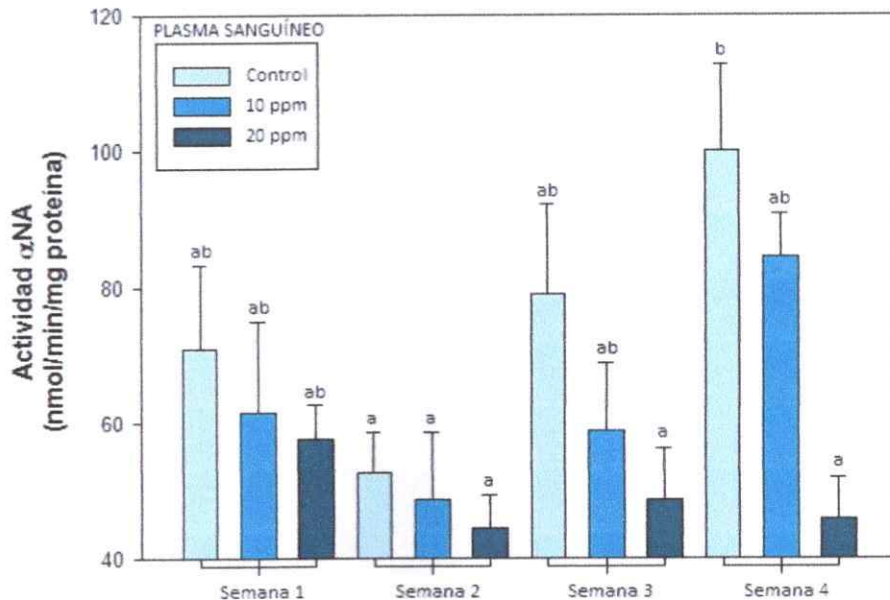


Figura 17: Promedio (\pm EE, n total = 64) de actividad específica de CbE- α NA en el plasma sanguíneo de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

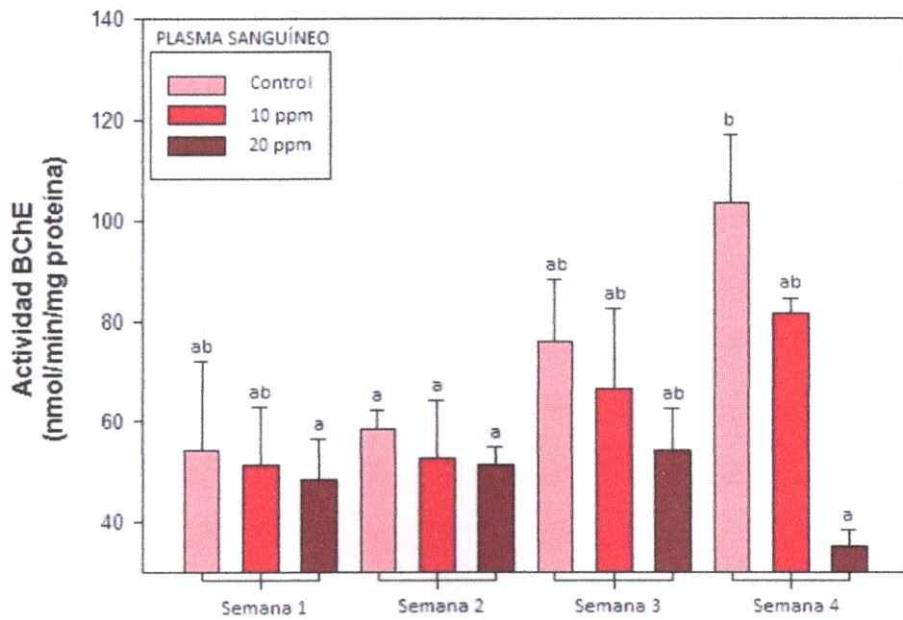


Figura 18: Promedio (\pm EE, n total = 64) de actividad específica de BChE en el plasma sanguíneo de codornices expuestas a tres tratamientos de pesticidas durante cuatro semanas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

6 DISCUSIÓN

6.1 Efecto del clorpirifós sobre las tasas de gasto de energía.

Múltiples estudios han demostrado variaciones del RMR y M_{sum} , principalmente en organismos aclimatados a diferentes temperaturas y/o de diferentes estaciones. Por ejemplo, se han documentado aumentos de hasta un 64 % del BMR en invierno en distintas especies de paseriformes (Dawson & O'Connor 1996; Cooper & Same 2000; Cooper 2002; Liknes et al., 2002; Arens & Cooper 2004), así como un aumento de hasta un 52 % de M_{sum} en el mismo grupo de aves (Cooper & Swanson 1994; Liknes & Swanson 1996; Cooper 2002; Arens & Cooper 2004). Este aumento del consumo de oxígeno puede ser atribuido a los altos costos metabólicos asociados a la termogénesis y a la tolerancia al frío durante el invierno (Swanson 1991, McKechnie & Swanson 2010). La expansibilidad metabólica (ME) en paseriformes generalmente presenta valores en un rango entre 3.3 a 9.0 (Marsh & Dawson 1986; Saarela et al., 1989; Lopez-Calleja & Bozinovic 1995; Liknes & Swanson 1996; Cooper 2002; Arens & Cooper 2004). Estos altos valores de ME demuestran que aves de verano e invierno tienen la habilidad de tolerar temperaturas extremadamente bajas a través de incrementos en el metabolismo para apoyar la termogénesis relativa a tasas metabólicas termoneutrales (Arens & Cooper 2004).

Son escasos los estudios en que se documente el efecto de estresores sobre las tasas metabólicas y hasta donde sabemos, este constituye el primer intento de estudio del efecto de la exposición a un pesticida organofosforado, y los costos metabólicos asociados a la detoxificación. Sin embargo, existen algunos estudios acerca del efecto que causan otros estresores, tales como el parasitismo sobre el desempeño metabólico. Por ejemplo, Careau et al. (2012) han documentado que la infección de larvas de dípteros éstridos (*Cuterebra emasculator*) en la ardilla del este (*Tamias striatus*) produce un aumento del RMR y una disminución en M_{sum} y ME. Tomando en cuenta que en nuestros resultados también se observa un aumento del RMR (efecto de la masa corporal principalmente) y una disminución de M_{sum} y de ME en la tercera y cuarta semana de ambos tratamientos con plaguicidas y considerando que el parasitismo tiene un impacto sobre el presupuesto energético del hospedero (e.g., efecto sobre el RMR, gasto energético diario, y MMR) (Munger & Karasov 1994; Degen 2006; Scantlebury et al., 2007; Careau et al., 2010), nuestros resultados sugieren que la exposición a pesticidas organofosforados produce un efecto equivalente al parasitismo sobre las tasas de gasto de energía.

En este sentido, los presupuestos energéticos son flexibles: en respuesta a un aumento de la energía destinada a la activación del sistema inmune, los animales pueden reducir otro componente de su presupuesto (Degen 2006). Esto implica que los efectos del parasitismo sobre el metabolismo energético del hospedero o de la exposición a un organofosforado en este caso, sean más conspicuos en animales que tienen algún desafío energético, tal como ocurre en períodos con baja disponibilidad de alimentos o en los

juveniles que deben lidiar con el costo adicional del crecimiento (Careau et al., 2010). El poseer valores menores de ME es claramente una desventaja, ya que es una combinación de altos costos de mantención y baja capacidad termogénica. También se ha descrito que el parasitismo (y el desafío energético asociado) reduce la sobrevivencia de ardillas del este juveniles durante un año de baja abundancia de alimentos (Careau et al., 2013). La exposición a plaguicidas organofosforados podría tener efectos adversos sobre individuos que se encuentren en períodos reproductivos, ya que la producción de huevos tiene un elevado costo energético y produce un aumento del RMR (tabla 7). El gasto energético asociado a la producción de huevos en codorniz japonesa también es elevado. Ward y MacLeod (1992) observaron un aumento del 49 % en el gasto energético diario en aves ponedoras comparado con aves que aún no comenzaban a poner huevos. Considerando el aumento en el RMR que observamos en este estudio y el generado solamente por la producción de huevos, las codornices adultas en etapa de reproducción y además expuestas a clorpirifós, tendrían costos de mantención demasiado elevados y probablemente se observaría una preferencia a detoxificar el compuesto en desmedro de la producción de huevos.

Tabla 7: Costos energéticos de producción de huevos en diversas especies de aves.

Especie		% aumento RMR	Referencia
Gorrión común		16	Chappell et al., 1999
<i>Passer domesticus</i>			
Carbonero común		27	Nilsson & Raberg, 2001
<i>Parus major</i>			
Estornino pinto		22	Vézina & Williams, 2002
<i>Sturnus vulgaris</i>			
Diamante mandarín		22	Vézina & Williams, 2005
<i>Taeniopygia guttata</i>			
Diamante mandarín		24	Salvante et al., 2010
<i>Taeniopygia guttata</i>			

6.2 Efecto del clorpirifós sobre la masa corporal y el desarrollo de los órganos

No encontramos diferencias significativas en la masa corporal de las codornices con respecto a los tratamientos con pesticidas, aunque sí observamos diferencias significativas en la masa cuando se compara entre semanas, lo que se debe al período de crecimiento en el cual se encontraban las codornices (15 días de vida al inicio del experimento). La ausencia de diferencias significativas en la masa corporal debido al pesticida, puede ser explicada por el tiempo de exposición. Si bien los 30 días que duró el experimento es mucho para ser considerado una exposición aguda, tampoco es suficiente para ser exposición crónica [90 días a 2 años en especies animales de uso común en laboratorios. EPA (Environmental Protection Agency)], y tal como se

mencionó anteriormente, sólo en experimentos de exposición crónica en ratas se pudo ver una pérdida significativa de la masa corporal (Young & Grandjean, 1988).

De los órganos analizados, solo tres fueron afectados significativamente por el tratamiento: el intestino grueso, la molleja y la cloaca. Para los dos primeros, su masa relativa aumentó en ambos tratamientos con respecto al control; en el caso de la cloaca, ésta disminuyó. Tal aumento de la masa en los órganos podría indicar un efecto inicial de toxicidad sistémica que probablemente facilita la remoción de eritrocitos (eritropoiesis: apoptosis de eritrocitos) por parte del sistema reticuloendotelial (macrófagos) (Mahmoud et al., 2012). Este proceso ha sido descrito en eritrocitos envejecidos, sin daño necrótico, que han sufrido estrés mecánico, depleción de energía o incremento de los procesos oxidativos que sobrepasen los sistemas de protección antioxidantes (Bratosin et al., 2001; Hermle et al., 2006; Quintanar-Escorza & Calderón-Salinas, 2006). Cabe destacar que en el estudio de Mahmoud y colaboradores (2012), tales resultados se encontraron en el hígado, riñón y en el bazo de codornices japonesas expuestas a Malatión, un pesticida organofosforado. La ausencia de estas diferencias significativas en nuestro estudio puede ser atribuido a las bajas dosis utilizadas. Mientras Mahmoud et al. (2012) utilizaron una dosis correspondiente al 20 % del LD₅₀, en esta tesis se utilizaron dosis correspondientes al 2 % y al 4 % del LC₅₀ descrito en Hill & Camardese (1986).

6.3 Efecto del clorpirifós sobre las esterasas

Los niveles de actividad de CbE (α -NA y 4-NPA) aumentaron hacia la tercera y cuarta semana del experimento para todos los tejidos, con excepción del hígado, donde se observa una disminución de la actividad. Los tratamientos tuvieron un efecto significativo sobre la actividad CbE generando una inhibición promedio de 35 % (min: 12 %; máx: 55 %). A pesar de que este efecto fue difuso durante las primeras semanas del experimento, hacia la tercera y cuarta semana se hizo más evidente. Para el caso de la BChE, sólo se observó un efecto significativo del tratamiento en el plasma sanguíneo, donde se observa una inhibición de un 66 % para el tratamiento con 20 ppm durante la cuarta semana (la mayor inhibición registrada en este estudio). Diversos estudios han documentado la inhibición de las CbEs (Sánchez et al., 1997; Laguerre et al., 2009; Lajmanovich et al., 2008; González-Vejares et al., 2009; Leite et al., 2010) y de la BChE (Sanchez et al., 1997; Bain et al., 2003; Sánchez-Hernández et al., 2004; Lajmanovich et al., 2008; Leite et al., 2010) frente a la acción de un pesticida organofosforado. Los resultados obtenidos en esta tesis son congruentes con lo reportado por Fossi et al. (1992). En dicho estudio se expuso a codornices japonesas adultas a una dosis subletal (50 mg/kg) de un pesticida organofosforado (Azamethiphos) registrándose inhibiciones de hasta un 88 % en BChE plasmática y de un 35 % en CbE plasmática. Un resultado sorprendente, fue que para la mayoría de los casos, durante las dos primeras semanas no hubieran inhibiciones significativas. Incluso, en algunos casos no hubo inhibición en absoluto y para el caso de la actividad de CbE-4NPA plasmática se observó un aumento

de la actividad en comparación con el control. Esta ausencia de inhibición durante las dos primeras semanas del experimento puede ser atribuida a la alta capacidad de regeneración de la actividad enzimática. Debido a que utilizamos dosis subletales, en las primeras dos semanas el sistema detoxificador a cargo de las esterasas funcionaría de manera óptima, pero al tratarse de una exposición subcrónica, desde la tercera semana este sistema comenzaría a fallar, dando lugar a inhibiciones de hasta un 66 % (e.g., en BChE plasmática) (Fossi et al., 1992).

Sin embargo, con el fin de establecer si las esterasas están siendo 100% efectivas, es necesario analizar otros parámetros, principalmente la AChE. Si se observa que la actividad AChE disminuye, es debido a que las esterasas están siendo sobrepasadas por la cantidad de organofosforado presente en el medio. Adicionalmente, Smith et al. (1986), Fairbrother et al. (1989) y Holmes & Boag (1990) encontraron que para dosis altas de OPs, la BChE fue la actividad enzimática más susceptible a la inhibición y por lo tanto es potencialmente el biomarcador más sensible para evaluar la presencia y los efectos tóxicos de estos pesticidas. En el estudio de Fossi et al. (1992) se encontró una correlación significativa entre la BChE plasmática y la AChE cerebral tanto en dosis letales como subletales. Con una correlación así, y que se mantenga constante incluso en bajas dosis, se podría predecir el porcentaje de inhibición de AChE midiendo el biomarcador no-destructivo, la BChE plasmática. Además, junto con el análisis de la actividad AChE, se debe considerar el análisis de otros biomarcadores presentes en la fase I de detoxificación, tal como el sistema de la citocromo P450 (CYP450), que en el caso del clorpirifós, es la encargada de bioactivarlo a su forma altamente tóxica "oxon",

la que es "secuestrada" por las esterasas con el fin de proteger la actividad AChE. La bioactivación del pesticida produce una serie de especies de oxígeno reactivas (ROS) que producen daños a nivel de DNA, lípidos y proteínas. El estrés oxidativo que produce la presencia de ROS en las células puede ser cuantificado con la relación Glutación Reducido/Glutación Oxidado (GSH/GSSG), mientras que la conversión de estos oxidantes a especies menos reactivas puede ser observada midiendo la actividad de la Glutación reductasa (GR) y de la Glutación peroxidasa (GPx). Finalmente, se debiera considerar el daño que recibe la membrana lipídica gracias a la peroxidación lipídica, midiendo la concentración de uno de los productos finales, el malondialdehído.

7 CONCLUSIONES

En conclusión, la exposición sub-crónica a una dosis subletal de clorpirifós correspondiente al 4 % de la LC_{50} en codornices en desarrollo, causa un efecto adverso sobre el desempeño aeróbico, ya que produce un aumento en los costos de mantención (tasa metabólica de descanso alta) y una disminución en la capacidad termogénica (metabolismo máximo bajo). La combinación de estos efectos produce una baja expansión metabólica, lo que probablemente se traduce en individuos con una menor capacidad de tolerar bajas temperaturas, y en un menor desempeño reproductivo. Hacia la segunda mitad del experimento se pudo observar la inhibición que produce el organofosforado sobre las esterasas en los tres tejidos analizados. Esto significa que las esterasas están cumpliendo su rol de *buffer*, uniéndose al pesticida para disminuir su concentración.

Estos resultados sugieren que para tener una imagen más amplia y detallada del efecto que causan los plaguicidas en los organismos no objetivo, es necesario analizar más de un biomarcador y en más de un tejido, ya que algunos pueden presentar una mayor actividad en un tejido específico (e.g., BChE en el plasma sanguíneo). Como se mencionó anteriormente, hay una gran variedad de biomarcadores y muchos de ellos son "no destructivos", lo que representa una ventaja en el caso que la especie estudiada presente algún estado de protección según su estado de conservación. Estudios posteriores, que incluyan los análisis sugeridos contribuirían a investigar el impacto de

los pesticidas OFs sobre el crecimiento y las funciones biológicas de los organismos no objetivo, un tema que podría ser de máximo interés en la industria avícola y en la conservación de especies nativas.

8 REFERENCIAS

Aldridge W.N. 1953. Serum esterases I: Two types of esterase (A and B) hydrolysing *p*-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochemistry Journal* 53: 110-117

Arens J.R., Cooper S.J. 2005. Metabolic and ventilatory acclimatization to cold stress in house sparrows (*Passer domesticus*). *Physiological and Biochemical Zoology* 78: 579-589

Bain D., Buttemer W.A., Astheimer L., Fildes K., Hooper M.J. 2003. Effects of sublethal fenitrothion ingestion on cholinesterase inhibition, standard metabolism, thermal preference, and prey-capture ability in the australian central bearded dragon (*Pogona vitticeps*, agamidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 109-116

Baird D.J., Barber I., Calow P. 1990. Clonal variation in general responses of *Daphnia magna* Straus to toxic stress – I: chronic life-history effects. *Functional Ecology* 4: 409-414

Bennett P.M., Harvey P.H. 1987. Active and resting metabolism in birds: allometry, phylogeny and ecology. *Journal of Zoology, London* 213: 327-363

Beyers D.W., Rice J.A., Clements W.H., Henry C.J. 1998. Estimating physiological cost of chemical exposure: integrating energetics and stress to quantify toxic effects in fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 814-822

Beyers D.W., and Sikoski P.J. 1994. Acetylcholinesterase inhibition in federally endangered Colorado squawfish exposed to carbaryl and malathion. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13: 935-939.

Bratosin D., Estaquier J., Petit F., Arnoult D., Quatannens B., Tissier J.P., Slomianny C., Sartiaux C., Alonso C., Huart J.J., Montreuil J., Ameisen J.C. 2001. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death and Differentiation* 8: 1143-1156

Bunyan P.J., Jennings D.M., Taylor A. 1968. Organophosphorus poisoning: some properties of avian esterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 16: 326-331

Burggren W.W. 1989. Developing animals flout prominent assumptions of ecological physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology, part A* 141: 430-439

Canals M., Martinez B.B., Figueroa D., Sabat P. 2011. Adjustments of the oxygen diffusing capacity to energetic demands during the development of the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 159: 339-345

Careau V., Thomas D.W., Humpries M.M. 2010 Energetic cost of bot fly parasitism in free-ranging eastern chipmunks. *Oecologia (Berl.)* 162(2): 303-312

Careau V., Garant D., Humpries M.M. 2012. Free-ranging eastern chipmunks (*Tamias striatus*) infected with bot fly (*Cuterebra emasculator*) larvae have higher resting but lower maximum metabolism. *Canadian Journal of Zoology* 90: 413-421

Careau V., Bergeron P., Garant D., Réale D., Speakman JR., Humpries M.M. 2013. The energetic and survival costs of growth in free-ranging eastern chipmunks. *Oecologia* 171: 11-23

Careau V. 2013. Basal metabolic rate, maximum thermogenic capacity and aerobic scope in rodents: interaction between environmental temperature and torpor use. *Biology Letters* 9: 20121104

Casida J.E., Quistad G.B. 2004. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chemical Research in Toxicology* 17: 983-998

Chanda S.M., Mortensen S.R., Moser V.C., Padilla S. 1997. Tissue-Specific Effects of Chlorpyrifos on Carboxylesterase and Cholinesterase Activity in Adult Rats: An *in Vitro* and *in Vivo* Comparison. *Fundamental and Applied Toxicology* 38: 148-157

Chappell M.A., Bech C., Buttemer W.A. 1999. The relationship of central and peripheral organ masses to aerobic performance variation in house sparrows. *Journal of Experimental Biology* 202: 2269-2279

Cochran R.C., Kishiyama J., Aldous C., Carr W.C., Pfeifer K.F. 1995. Chlorpyrifos: Hazard assessment based on a review of the effects of short-term and long-term exposure in animals a humans. *Food and Chemical Toxicology* 33: 165-172

Congdon J.D., Dunham A.E., Tinkle D.W. 1982. Energy budgets and life histories of reptiles. In: Gans, C. (Ed.), *Biology of Reptilia*, vol. 13. Academic Press, New York, pp. 233-271

Congdon J.D., Dunham A.E., Hopkins W.A., Rowe C.L., Hinton T.G. 2001. Resource allocation-based life histories: a conceptual basis for studies of ecological toxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1968-1703

Cooper S.J., Swanson D.L. 1994. Seasonal acclimatization of thermoregulation in the black-capped chickadee. *Condor* 96: 638-646

Cooper S.J., Same D.R. 2000. Ventilatory accommodation under cold stress in seasonally acclimatized black-capped chickadees. *American Zoologist* 40: 980A.

Cooper S.J. 2002. Seasonal metabolic acclimatization in mountain chickadees and juniper titmice. *Physiological Biochemical Zoology* 75: 386-395

Crow J.A., Borazjani A., Potter P.M., Ross M.K. 2007. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicology and Applied Pharmacology* 221: 1-12

Darvesh S., McDonald S.E., Losier A.M., Martin E., Hopkins D.A., Armour J.A. 1998. Cholinesterase in cardiac ganglia and modulation of canine intrinsic cardiac neuronal activity. *Journal of the Autonomic Nervous System* 71: 75-84

Dawson W.R., Carey C. 1976. Seasonal acclimatization to temperature in cardueline finches. I. insulative and metabolic adjustments. *Journal of Comparative Physiology* 112: 317-333

Dawson W.R., O'Connor T.P. 1996. Energetic features of avian thermoregulatory response. En C. Carey (ed). *Avian Energetics and Nutritional Ecology*. pp 85-124. Chapman & Hall, New York.

Degen A.A. 2006. Effect of macroparasites on the energy budget of small mammals. En S. Morand, B.R. Krasnov y R. Poulin (eds). *Micromammals and macroparasites: from evolutionary ecology to management*, Springer-Verlag, Tokyo, pp 371-400

Domingues I., Agra A.R., Monaghan K., Soares A.M.V.M., Nogueira A.J.A. 2010. Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29: 5-18

Dow (1964) Results of 93-dietary feeding studies of O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate in beagle hounds. DPR324-306 No. 063996

DuRant S.E., Hopkins W.A., Talent L.G. 2007. Energy acquisition and allocation in an ectothermic predator exposed to a common environmental stressor. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C*. 145: 443-448

Duysen E.G., Li B., Darvesh S., Lockridge O. 2007. Sensitivity of butyrylcholinesterase knockout mice to (--)huperzine A and donepezil suggests humans with

butyrylcholinesterase deficiency may not tolerate these Alzheimer's disease drugs and indicates butyrylcholinesterase function in neurotransmission. *Toxicology* 233: 60-69

Fairbrother A., Bennet R.S., Bennet J.K. 1989. Sequential sampling of plasma cholinesterase in mallards (*Anas platyrhynchos*) as indicators of exposure to cholinesterase inhibitors. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8: 117-122

Forget J., Livet S., Leboulenger F. 2002 Partial purification and characterization of acetylcholinesterase (AChE) from the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Comparative Biochemistry and Physiology* 132: 85-92

Fossi M.C., Leonzio C., Massi A., Lari L., Casini S. 1992. Serum esterase inhibition in birds: A nondestructive biomarker to assess organophosphorus and carbamate contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23: 99-104

Fourcy D., Jumel A., Heydorff M., Lagadic L. 2002. Esterases as biomarkers in *Nereis* (*Hediste*) *diversicolor* exposed to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* used for mosquito control in coastal wetlands of Morbihan (Brittany, France). *Marine Environmental Research* 54: 755-759

Freeman B.M. 1967. Oxygen consumption by the japanese quail *Coturnix coturnix japonica*. *British Poultry Science* 8: 147-152

Fulton M.H., Key P.B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 37-45

Gaines T.R. 1969. Acute toxicity of pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology* 14: 515-534

Galloway T., Millward N., Browne M., Depledge M. 2002. Rapid assessment of organophosphorus/carbamate exposure in the bivalve mollusk *Mytilus edulis* using combined estersase activities as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 61: 169-180

Gomori G. 1953. Human esterases. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 42: 445-453

González-Vejares S., Sabat P., Sanchez-Hernandez J.C. 2009. Tissue-specific inhibition and recovery of esterase activities in *Lumbricus terrestris* experimentally exposed to chlorpyrifos. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C* 151: 351-359

Hart JS. 1962. Seasonal acclimatization on four species of small wild birds. *Physiological Zoology* 35: 224-236

Henschler D., Hoppe Seylers Z. 1956. The problem of incidence of butyrylcholine in bovine brain. *Physiological Chemistry* 305: 97-104

Hermle T., Shumilina E., Attanasio P., Akel A., Kempe D.S., Lang P.A., Podolski M., Gatz S., Bachmann R., Bachmann C., Abele H., Huber S., Wieder T., Lang F. 2006. Decreased cation channel activity and blunted channel-dependent eryptosis in neonatal erythrocytes. *American Journal of Physiology, Cell Physiology* 291: C710-C717

Hill E.F., Camardese M.B. 1986. Lethal dietary toxicities of environmental contaminants and pesticides to *Coturnix*. Fish and Wildlife Technical Report 2, Fish and Wildlife Service, U.S. Department of the Interior: 147p

Hinds D.S., Baudinette R.V., MacMillen R.E., Halpern E.A. 1993. Maximum metabolism and the aerobic factorial scope of endotherms. *Journal of Experimental Biology* 182: 41-56

Holmes S.B., Boag P.T. 1990. Inhibition of brain and plasma cholinesterase activity in zebra finches orally dosed with fenitrothion. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9: 323-334

Hopkins W.A., Staub B.P., Snodgrass J.W., Taylor B.E., DeBiase A.E., Roe J.H., Jackson B.P., Congdon J.D. 2004. Responses of benthic fish exposed to contaminants in outdoor microcosms—examining the ecological relevance of previous laboratory toxicity tests. *Aquatic Toxicology* 68: 1–12.

Information Ventures. 1995. Chlorpyrifos Pesticide Fact Sheet, Prepared for the U.S. Department of Agriculture, under U.S. Forest Service Contract by Information Ventures, Inc.

Kersten M., Piersma T. 1987. High levels of energy expenditure in shorebirds; metabolic adaptations to an energetically expensive way of life. *Ardea* 75: 175-187

Kuster E. 2005. Cholin- and carboxyl-esterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. *Aquatic Toxicology* 75: 76-85

Laguerre C., Sanchez-Hernandez J.C., Heinz R.K., Triebkorn R., Capogiez Y., Rault M., Mazzia C. 2009. B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: an enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticides exposure. *Environmental Pollution* 157: 199-207

Lajmanovich R.C., Sánchez-Hernández J.C., Peltzer P.M., Attademo A.M., Fiorenza G.S., Cabagna M.C., Bassó A. 2008. Levels of plasma B-esterases and glutathione-S-transferase in three South American toad species. *Toxicological & Environmental Chemistry* 90: 1145-1161

Leite P.Z., Margarido T., de Lima D., Rossa-Feres D., de Almeida E. 2010. Esterase inhibition in tadpoles of *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae) as biomarker for exposure to organophosphate pesticides. *Environmental Science and Pollution Research* 17(8): 1411-1421

Liknes E.T., Swanson D.L. 1996. Seasonal variation in cold tolerance, basal metabolic rate, and maximum capacity for thermogenesis in white-breasted nuthatches *Sitta carolinensis* and downy woodpeckers *Picoides pubescens*, two unrelated arboreal temperate residents. *Journal of Avian Biology* 27: 279-288

Liknes E.T., Scott S.M., Swanson D.L. 2002. Seasonal acclimatization in the American goldfinch revisited: to what extent do metabolic rates vary seasonally? *Condor* 104: 548-557

López-Calleja M.V., Bozinovic F. 1995. Maximum metabolic rate, thermal insulation and aerobic scope in small-sized Chilean hummingbird (*Sephanoides sephanoides*). *Auk* 112: 1034-1036

Lucas A., 1996. *Bioenergetics of Aquatic Animals*. Taylor and Francis Ltd, London.

Ludke J.L., Hill E.F., Dieter M.P. 1975. Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. *Archives of Environmental and Environmental Contamination and Toxicology* Vol. 3, No. 1: 1-21

Lundebye A.K., Curtis T.M., Braven J., Depledge M.H. 1997. Effects of the organophosphorus pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (AChE) activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Aquatic Toxicology* 40: 23-36

Mahmoud N.A., Carmichael W.W. 1987. Anatoxin-a(S), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 25: 1221-1227

Mahmoud H.M., Haggag A.M.H., El-Gebaly H.S. 2012. Toxicological studies of malathion on Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Life Science Journal* 9: 1725-1732

Marsh R.L., Dawson W.R. 1986. Role of metabolic adjustments in avian survival of cold winters. *Proceedings of the International Ornithological Congress* 29: 2690-2701

Masson P., Lockridge O. 2010. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 494: 107-120

Maxwell D.M. 1992. The specificity of Carboxylesterase Protection against the Toxicity of Organophosphorus Compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology* 114: 306-312

McCarthy I.D., Fuiman L.A. 2008. Growth and protein metabolism in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae exposed to environmental levels of atrazine and malathion. *Aquatic Toxicology*. 88: 220-229

McKechnie A.E., Wolf B.O. 2004. The allometry of avian basal metabolic rate: good predictions need good data. *Physiological and Biochemical Zoology* 77: 502-521

McKechnie A.E., Freckleton R.P., Jetz W. 2006. Phenotypic plasticity in the scaling of avian metabolic rate. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 1589: 931-937

McKechnie A.E., Swanson D.L. 2010. Sources and significance of variation in basal, summit and maximal metabolic rates in birds. *Current Zoology* 56: 741-758

McNabb F.C.M., McNabb R.A. 1977. The effects of thermal history on body temperature of japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology, part A* 56: 627-629

McNabb BK. 1988. Food habits and the basal rate of metabolism in birds. *Oecologia* 77: 343-349

McNabb BK. 1997. On the utility of uniformity in the definition of basal rate of metabolism. *Physiological Zoology* 70: 718-720

McNab, B.K. 2002. *The Physiological Ecology of Vertebrates: a View From Energetics*. Cornell University Press, Ithaca New York

Medda S, Proia RL. 1992. The carboxylesterase family exhibits C-terminal sequence diversity reflecting the presence or absence of endoplasmic-reticulum-retention sequences. *European Journal of Biochemistry* 206:801-6

Morgan J.D., Iwama G.K. 1996. Cortisol-induced changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. *Fish Physiology and Biochemistry* 15: 385-394

Munger J.C., Karasov W.H. 1994. Costs of bot fly infection in white-footed mice: energy and mass flow. *Canadian Journal of Zoology* 72(1): 166-173

Murakami K., Takagi Y., Mihara K., Omura T. 1993. An isozyme of microsomal carboxyesterases, carboxyesterase Sec, is secreted from rat liver into the blood. *Journal of Biochemistry* 113:61-66

Nilson J., Raberg L. 2001. The resting metabolic cost of egg laying and nestling feeding in great tits. *Oecología* 128: 187-192

Peakall D. 1992. *Animal Biomarkers as Pollutants Indicators*. Chapman & Hall, London, U.K., 291 pp

Quintanar-Escorza M.A., Calderón-Salinas J.V. 2006. Eriptosis, la apoptosis del eritrocito. *Revista de Educación Bioquímica* 25(3): 85-89

Reubsaet J.L., Ringvold A. 2005. Identification of unknown quaternary ammonium compounds in corneal epithelium and aqueous humor. *Journal of Chromatographic Science* 43: 401-405

Rice J.A. 1990. Bioenergetics modeling approaches to evaluation of stress in fishes. *American Fisheries Society Symposium* 8: 80-92.

Rodríguez-Castellanos L., Sánchez-Hernández J.C. 2007 Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. *Journal of Pesticide Science* 32: 360-371

Robbi M, Beaufay H. 1991. The COOH terminus of several liver carboxylesterases targets these enzymes to the lumen of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 266:20498-503

Robbi M, Beaufay H. 1992. Topogenesis of carboxylesterases: a rat liver isoenzyme ending in—HTEHT-COOH is a secreted protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 183:836-41

Rosenmann M., Morrison P. 1974. Maximum oxygen consumption and heat loss facilitation in small homeotherms by He-O₂. *American Journal of Physiology* 226: 490-495

Russel R.W., Overstreet D.H. 1987. Mechanisms underlying sensitivity to organophosphorus anticholinesterase compounds. *Progress in Neurobiology* 28: 45-52

Saarela S., Klapper B., Heldmaier G. 1989. Thermogenic capacity of greenfinches and siskins in winter and summer. En C. Bech y R.E. Reinertsen (eds). *Physiology of Cold Adaptation in Birds*. Plenum, New York, pp 112-115

Saarela S., Klapper B., Heldmaier G. 1995. Daily rhythm of oxygen consumption and thermoregulatory responses in some European winter- or summer-acclimatized finches at different ambient temperatures. *Journal of Comparative Physiology B* 165: 366-376

Salvante K.G., Vézina F., Williams T.D. 2010. Evidence for within-individual energy reallocation in cold-challenged, egg-producing birds. *Journal of Experimental Biology* 213: 1991-2000

Sanchez J.C., Fossi M.C., Focardi S. 1997. Serum "B" Esterases as a Nondestructive Biomarker for Monitoring the Exposure of Reptiles to Organophosphorus Insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37: 45-52

Sánchez-Hernández J.C., Carbonell R., Henríquez Pérez A., Montealegre M., Gómez L. 2004. Inhibition of plasma butyrylcholinesterase activity in the lizard *Gallotia galloti palmae* by pesticides: a field study. *Environmental Pollution* 132: 479-488

Sanchez-Hernandez J.C., Mazzia C., Capowiez Y., Rault M. 2009. Carboxylesterase activity in earthworms gut contents: Potential (eco)toxicological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology* 150: 503-511

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

Satoh T., Hosokawa M. 1998. The Mammalian Carboxylesterases: From Molecules to Functions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38: 257-288

Scantlebury M., Waterman J.M., Hillegass M., Speakman J.R., Bennett N.C. 2007. Energetic costs of parasitism in the Cape ground squirrel *Xerus inauris*. *Proceedings of the Royal Society* 274 (1622): 2169-2177

Smith G.J., Spann J.W., Hill E.F. 1986. Cholinesterase activity in Black-crowned Night-herons exposed to Fenthion-treated water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 15: 83-86

Swanson D.L. 1991. Substrate metabolism under cold stress in seasonally acclimatized dark-eyed juncos. *Physiological Zoology* 64: 1578-1592

Swanson D.L., Drymalski M.W., Brown J.R. 1996. Sliding vs static cold exposure and the measurement of summit metabolism in birds. *Journal of Thermal Biology* 21: 221-226

Swanson D.L. 2010. Seasonal metabolic variation in birds: Functional and mechanistic correlates. En: CF Thompson. Current Ornithology Volume 17: Springer New York. pp. 75-129

Swanson D.L., Thomas N.E., Liknes E.T., Cooper S.J. 2012. Intraspecific correlations of basal and maximal metabolic rates in birds and the aerobic capacity model for the evolution of endothermy. PLOS ONE 7: e34271

Szabo J.R., Young J.T., Grandjean M. 1988. Chlorpyrifos: 13-week dietary toxicity study in Fisher-344 rats. DPR 342-306, No. 074494

Trevelyan R., Harvey P.H., Pagel M.D. 1990. Metabolic rates and life histories in birds. Functional Ecology 4: 135-141

van de Ven T., Mzilikazi N., McKechnie A.E. 2013. Phenotypic flexibility in body mass, basal metabolic rate and summit metabolism in southern red bishops (*Euplectes orix*): Responses to short term thermal acclimation. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 165(3): 319-327

van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology 60: 355-362

van Gestel C.A.M., van Brummelen T.C. 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. Ecotoxicology 5: 217-225

Vézina F., Williams T.D. 2002. Metabolic costs of egg production in the European starling *Sturnus vulgaris*. Physiological and Biochemical Zoology 75: 377-385

Vézina F., Williams T.D. 2005. The metabolic cost of egg production is repeatable. Journal of Experimental Biology 208: 2533-2538

Walker C.H. 2001. Factors determining the toxicity of organic pollutants to animals and plants. En *Organic Pollutants: An Ecotoxicological Perspective*. pp 17. London: Taylor and Francis

Ward S., MacLeod M.G. 1992. Energy cost of egg formation in quail. *Proceedings of the Nutrition Society* 51: 41A

Weiner J. 1992. Physiological limits to sustainable energy budgets in birds and mammals: ecological implications. *Trends in Ecology & Evolution* 7 (11): 384-388

Wheelock C.E., Shan G., Ottea J. 2005. Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *Journal of Pesticide Science* 30: 75-83

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 evaluation (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 195: 117-178

White CR., Blackburn TM., Martin GR., Butler PJ. 2007. Basal metabolic rate of birds is associated with habitat temperature and precipitation, not primary productivity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 287-293

Wiersma P., Muñoz-García A., Walker A., Williams JB. 2007. Tropical birds have a slow pace of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 9340-9345

Wogram J., Sturm A., Segner H., Liess M. 2001. Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1528-1531

Yan B, Yang D, Bullock P, Parkinson A. 1995. Rat serum carboxylesterase. Cloning, expression, regulation, and evidence of secretion from liver. *Journal of Biological Chemistry* 270:19128-34

Young J.T., Grandjean M. 1988. Chlorpyrifos: 2-year dietary chronic toxicity-oncogenicity study in Fisher-344 rats. Dow study No. TXT: K-044793-079 DPR 342-345. No. 072300