

UCH-FC
B. Ambiental
N 238
C-1
01



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

Variabilidad interespecífica de esterases y lipasas de interés ecotoxicológico en aves passeriformes de Chile

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Biólogo con mención en Medio Ambiente

Por

Cristóbal Arturo Fabián Narváez Ordóñez

Director del Seminario de Título: Pablo Sabat Kirkwood
Co-director del Seminario de Título: Juan Carlos Sánchez Hernández

Agosto de 2011
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por

CRISTÓBAL ARTURO FABIÁN NARVÁEZ ORDÓÑEZ

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente.

Dr. Pablo Sabat Kirkwood
Director Seminario de Título

Comisión Revisora

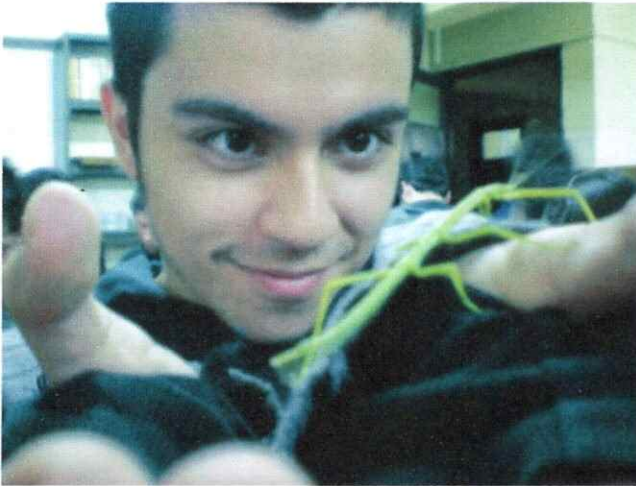
Dr. Hugo Torres Contreras
Presidente Comisión

Dr. Rigoberto Solís Muñoz
Evaluador

Santiago, 25 de agosto de 2011

Biografía

Cristóbal nace el 18 de agosto de 1987, en Quinta Normal. Siempre se interesó en las ciencias y en la música, pero es en la enseñanza media en el Instituto Nacional donde se



da cuenta de que su interés y aptitudes en las ciencias son mayores. No muy convencido decide hacer ingreso a la carrera de Biología Ambiental de la Universidad de Chile, pero durante su primer año se da cuenta que es la

carrera que desea estudiar. En los primeros años muestra aptitudes para la zoología en general, lo que lo lleva a trabajar al laboratorio de Ecofisiología Animal, donde realiza varios proyectos, principalmente en aves, bajo la tutela del Dr. Pablo Sabat. La investigación y paralelamente su grupo musical, son las actividades que más lo satisfacen.



Dedicado a mis padres, Mary y Juan.





Agradecimientos

Me gustaría comenzar agradeciendo a mi tutor, Pablo Sabat, por haberme permitido trabajar junto a él, por su buena disposición, su gran apoyo y por haberme permitido trabajar en uno de sus proyectos, que llegó a ser este seminario de título que acá presento. También agradezco a Juan Carlos Sánchez por aceptar ser mi cotutor en este seminario, por la buena disposición para enseñarme la metodología necesaria para ello y por su constante apoyo y confianza.

El agradecimiento también va para las personas que fueron de gran ayuda a la hora de realizar este proyecto, Natalia Ramírez; por la ayuda con los datos y algunos conceptos, Hugo Torres y Claudio Reyes; por la ayuda estadística e Irina Toro, por la revisión y corrección del abstract.

Además agradezco a Claudio Veloso, Fernanda Valdés, Grisel Cavieres, Andrés Sazo y Carmen Alfaro por los buenos momentos compartidos en el laboratorio. El agradecimiento incluye también a mis amigos de la vida Christofer Oros, Luis Ramírez y Cecilia Baeza, a todos los que se interesaron en el desarrollo de este seminario, mis amigos y compañeros, y especialmente mi familia. A Paulina y Javier, por la última alegría.

Este seminario va en memoria de Sandra González y Jonathan Salinas.

Este seminario fue financiado gracias al FONDECYT N° 1080077.



Índice De Contenidos

ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
Pesticidas.....	1
Carboxilesterasas: actividad y función fisiológica.....	4
Lipasas: actividad y función fisiológica.....	4
Una visión comparada de las carboxilesterasas y lipasas en los organismos animales.....	6
Contribución de las carboxilesterasas y lipasas en toxicología ambiental.....	8
Factores ambientales y biológicos que modifican las actividades carboxilesterasa y lipasa.....	9
OBJETIVOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Reactivos.....	14
Captura de aves y preparación de las muestras.....	14
Determinación de la actividad Carboxilesterasas.....	15
Determinación de la actividad de Lipasa.....	16
Análisis estadísticos.....	16
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	26

Análisis comparativo.....	26
Efecto de la dieta en las actividades enzimáticas.....	27
Efecto del tamaño corporal en las actividades enzimáticas.....	28
Carboxilesterasas y lipasas en aves chilenas: una perspectiva ecotoxicológica...29	
CONCLUSIONES.....	31
REFERENCIAS.....	34



Índice De Tablas

Tabla 1. Nombre común, nombre científico, dieta, número de individuos y lugar de recolección correspondiente a las 6 especies estudiadas.....15

Tabla 2 Nombre común, dieta, masa corporal y actividad masa-específica de CbEs y lipasa.....25





Índice De Figuras

Figura 1. Relación entre masa corporal y actividad de esterasa y lipasa en seis especies de passeriformes.....	18
Figura 2. Relación entre la actividad específica de lipasa y la actividad específica de CbE- α NA.....	19
Figura 3. Relación entre la actividad específica de CbE- α NA y la actividad específica de CbE-4NPA.....	20
Figura 4. Relación entre los residuos de la actividad total de CbE- α NA y la actividad total de CbE-4NPA.....	21
Figura 5. Promedio de actividad específica (U mg ⁻¹ proteína) de CbE- α NA y CbE-4NPA en seis especies de aves passeriformes.....	22
Figura 6. Promedio de actividad específica (U g ⁻¹ tejido) de CbE- α NA y CbE-4NPA en seis especies de aves passeriformes.....	22
Figura 7. Promedio de actividad específica (mU g ⁻¹ tejido) de lipasa en seis especies de aves passeriformes.....	23
Figura 8. Promedio de actividad total de CbE- α NA y CbE-4NPA en función de la dieta de aves passeriformes.....	24
Figura 9. Promedio de actividad total de lipasa en función de la dieta de aves passeriformes.....	24
Figura 10. Diagrama de flujo con las principales conclusiones de este estudio, la información descrita en la literatura y los correlatos sugeridos para estudios futuros.....	32

Resumen

Los pesticidas son utilizados, muchas veces sin ningún control, para combatir las plagas agrícolas. A pesar de que presentan características que los hacen populares en el control de las plagas, son muy perjudiciales para los organismos no diana. Las Carboxilesterasas (CbE) son enzimas claves en la detoxificación de pesticidas, ya que presentan una mayor sensibilidad a estos que la acetilcolinesterasa (AChE). La inhibición de la AChE es el biomarcador más utilizado para determinar la exposición a los pesticidas. La lipasa es otra esterasa que puede tener un potencial uso como biomarcador, ya que su inhibición podría interrumpir la homeostasis lipídica. La mayoría de los estudios, han documentado los niveles de CbEs en el plasma sanguíneo. En este estudio se midieron los niveles de CbEs y lipasas en el tracto gastrointestinal de aves passeriformes de Chile y se realizaron comparaciones interespecíficas con respecto a la dieta y a la masa corporal. Se encontró que los niveles de CbE del intestino fueron mucho mayores que los de cualquier tejido no digestivo y que los niveles de CbE y lipasa fueron mayores en aves con dietas más diversas (omnívoros). Se observó una correlación positiva y significativa de las actividades CbE y lipasa con la masa corporal. La dieta y la masa corporal afectan los altos niveles de actividad CbE y lipasa intestinal, y estos podrían actuar como una barrera bioquímica frente a la acción de los pesticidas.

Abstract

Pesticides are used, many times without any control, to combat crop plagues. Although they have characteristics which make them popular in pest control, they are very harmful to non-target organisms. Carboxylesterases (CbE) are the key enzymes in the detoxification of pesticides because they are more sensitive to them than acetylcholinesterase (AChE). Inhibition of AChE is the most widely used biomarker to assess pesticide exposure. Lipase is another esterase that could have potential use as a biomarker, because its inhibition could disrupt lipid homeostasis. Most studies have documented CbEs levels in blood plasma. In this study, CbE and lipase levels were measured in the gastrointestinal tract of passerines birds from Chile, and interspecific comparisons were made in regards to diet and body mass. It was found that levels of intestinal CbE were much higher than those of any non-digestive tissue and the CbE and lipase levels were higher in birds with diverse diets (omnivorous). A positive and significative correlation of CbE and lipase activities with body mass was observed. Diet and body mass affect the high levels of intestinal CbE and lipase activity, and these could act as a biochemical barrier against the action of pesticides.

1. Introducción

1.1 Pesticidas

Las plagas agrícolas son uno de los factores limitantes en la producción de alimentos. En el control de las plagas, se utilizan pesticidas, muchas veces sin ningún tipo de control (Leite et al., 2010). Durante 3 décadas se usó el DDT, un insecticida organoclorado que ha sido llamado “el contaminante global más dañino y amplio”. El uso de este pesticida causó efectos devastadores y notorios en las aves rapaces (Hartley & Douthwaite, 1994; García-Fernandez et al., 2008). A pesar de que el DDT fue prohibido en la década de los 70's, los pesticidas utilizados después y hasta hoy en día continúan afectando a las aves (Cox 1991; Walker 2003; Boatman et al., 2004). Estos pesticidas, en especial los organofosforados (OFs) y los carbamatos (CBs), presentan una serie de características que han llevado a su popularidad como tratamiento químico en el control de las plagas. Entre otras peculiaridades, destacan su baja persistencia en el ambiente y su baja tasa de bioacumulación. Sin embargo, estos grupos de agroquímicos muestran una elevada toxicidad aguda e inespecífica que llevan a ser una amenaza para los organismos no objetivo (Laguerre et al., 2009). Los compuestos OFs son la clase de insecticida que más se usa en el mundo (Sánchez et al., 1997).

El mecanismo de toxicidad aguda de estos pesticidas es la inhibición irreversible de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en el sistema nervioso y neuromuscular (Maxwell, 1992; Sánchez et al., 1997; Chanda et al., 1997). Esta es responsable de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en las sinápsis colinérgicas. Ello causa una acumulación del neurotransmisor en el espacio sináptico que puede causar una

despolarización continua de la célula postsináptica. Esta acumulación lleva a una variedad de manifestaciones clínicas (temblores, salivación excesiva, convulsiones) que pueden culminar en la muerte del organismo por un paro cardio-respiratorio (Maxwell, 1992). La inhibición de la actividad AChE cerebral ha sido el biomarcador más ampliamente usado para diagnosticar el envenenamiento o la simple exposición a OFs y CBs en una amplia variedad de organismos acuáticos y terrestres (Domingues et al., 2010; Fulton & Key, 2001; van der Oost et al., 2003).

De acuerdo con los resultados de Ludke et al. (1975), la inhibición de la actividad AChE cerebral por sobre el 20% de la actividad normal en aves es un índice de estrés, y una inhibición mayor al 50% causa una muerte 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). Como consecuencia de lo anterior, el grado de inhibición asociado a la toxicidad es altamente variable (Lundebye et al., 1997).

La determinación de la actividad de AChE cerebral implica sacrificar al organismo. En algunos casos tal enfoque metodológico no es viable debido al estado de protección de algunas especies o simplemente por el bajo número de individuos disponibles en el sitio de interés. Esta limitación ha llevado a explorar las respuestas de otros biomarcadores a los pesticidas, tales como las enzimas butirilcolinesterasa (BChE), carboxilesterasa (CbE) y AChE en la sangre de los animales (Leite et al., 2010). Todas ellas son usadas como biomarcadores no destructivos y pertenecen al grupo de las

esterasas del tipo-B clasificadas por Aldridge (1953). Estas esterasas son inhibidas por compuestos OFs, a diferencia de las esterasas tipo-A, que son capaces de hidrolizar los compuestos OFs y esterasas tipo-C, que no interactúan con tales compuestos (Lajmanovich et al., 2008; Laguerre et al., 2009).

Muchos estudios han reportado que las esterasas BChE y CbE son más sensibles a la acción inhibitoria de los insecticidas OFs que la propia AChE cerebral (Wogram et al., 2001; Fourcy et al., 2002; Galloway et al., 2002; Sánchez-Hernández & Wheelock 2009). Este hallazgo ha llevado a desarrollar modelos para estimar la inhibición de la AChE cerebral a partir del nivel de actividad de las esterasas plasmáticas (o séricas). Por ejemplo, en reptiles ha sido posible establecer una relación no lineal entre la inhibición de la actividad colinesterásica plasmática y aquella del sistema nervioso central (Bain et al., 2004; Sanchez-Hernandez et al., 1997). Recientemente, se ha atribuido un papel “buffer” a las esterasas sanguíneas. Debido a su mayor sensibilidad a los efectos inhibitorios de los insecticidas OFs, estas enzimas actúan como carroñeros que secuestran las moléculas de OF circulantes, reduciendo así la concentración del insecticida en el objetivo molecular (AChE cerebral). Ello ha llevado a considerar las esterasas sanguíneas como indicadores de susceptibilidad; su sensibilidad a 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).

1.2 Carboxilesterasas: actividad y función fisiológica

Las carboxilesterasas (EC, 3.1.1.1), denominadas también aliesterasas, son un grupo de enzimas hidrolasas que rompen 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). También hidrolizan ésteres del ácido fosfórico, tioésteres y anhídridos. Su sustrato de referencia es la tributirina (Jaeger et al., 1999; Fojan et al., 2000). Este grupo de enzimas juega un importante papel en el metabolismo de lípidos, esteroides y un amplio grupo de drogas como cocaína, procaína, entre otras. Estas esterazas son importantes en la detoxificación de pesticidas OFs, CBs y piretroides (Sánchez-Hernández & Wheelock 2009). También activan la prodroga terapéutica para el cáncer CPT-11 a través de su conversión a SN-38 (Wadkins et al., 2001). 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 los riñones, intestino delgado, corazón, músculos, pulmones, cerebro, testículos, tejido nasal y respiratorio, tejido adiposo y leucocitos (Sato & Hosokawa, 1998).

1.3 Lipasas: actividad y función fisiológica

Las lipasas son otro tipo de enzimas hidrolasas que también rompen enlaces ésteres de ácidos alifáticos de cadena larga (≥ 10 átomos de carbono) mediante la adición de una molécula de agua, para generar una molécula altamente energética (triacilglicerol) y moléculas de señalización celular (2-araquidonilglicerol) (López-López et al., 2003). En los ensayos enzimáticos, la trioleína es el sustrato de referencia

para la medida de la actividad lipasa (Jaeger et al., 1999; Fojan et al., 2000). Las lipasas son enzimas muy versátiles, ya que pueden catalizar reacciones de hidrólisis sobre un amplio rango de lípidos. En presencia de disolventes orgánicos, son también capaces de catalizar reacciones de síntesis o intercambio de grupos (transesterificación e interesterificación) entre diferentes moléculas, incluyendo lípidos, glúcidos y aminoácidos (Goujard et al., 2009). Además, estas enzimas pueden realizar todas estas reacciones con una elevada especificidad de sustrato, así como de forma regio o enantioespecífica, lo que hace de ellas unas de las enzimas más importantes en el campo de la biotecnología (Gunstone, 1999; Bornscheuer, 2002). Las lipoproteínas lipasas (LPL) y la triacilglicerol lipasa hepática (H-TGL) son las enzimas con mayor participación en el metabolismo lipídico (Quistad et al., 2006a). Con ello, la inhibición de la actividad de lipasas por pesticidas OFs podría perturbar la homeostasis lipídica (Quistad et al., 2006a).

A pesar de que la especificidad del sustrato es el único criterio completamente válido hoy en día para distinguir a las lipasas de las CbEs, también se pueden diferenciar en base a otras características, varias de ellas relacionadas directamente con especificidad de sustrato (Schmidt & Bornscheuer, 2005; Singh et al., 2005). Las lipasas muestran preferencia por sustratos altamente hidrofóbicos, insolubles y agregados y presentan sitios de unión largos para acomodar al ácido graso a escindir, mientras que las CbEs actúan sobre sustratos más solubles y con un grado de hidrofobicidad más variable, mostrando sitios de unión para el ácido graso a escindir, más cortos. Además las lipasas muestran un mayor número de aminoácidos no polares pequeños localizados

en las zonas expuestas al solvente y en la región del centro activo que las CbEs, así como un rango de sustratos más amplio, una mayor regio y estereoespecificidad, una mayor estabilidad en solventes orgánicos, y un potencial electrostático en el centro activo más básico que las CbEs (Fojan et al., 2000; Bornscheuer, 2002).

1.4 Una visión comparada de las carboxilesterasas y lipasas en animales

La actividad específica de CbEs ha sido medida en varias especies animales (vertebrados e invertebrados), y se ha documentado principalmente sus niveles en hígado y plasma. El hígado posee la mayor actividad específica de CbEs (Chanda et al., 1997). Se han descrito los niveles de la actividad específica de CbE en ratas "Long-Evans" encontrándose que el hígado posee una actividad mucho mayor que el cerebro y el plasma. Además, los machos presentan aproximadamente el doble de actividad que las hembras. Laguerre et al. (2009) propusieron que el caracol terrestre *Xeropicta derbentina* es una especie que puede ser candidato para analizar la exposición y los efectos tóxicos de los agroquímicos en el mediterráneo debido a su actividad durante el verano y su resistencia a las condiciones cálidas. Uno de los análisis que realizaron estos autores fue la medición de la actividad máxima específica de CbE en el extracto crudo usando 4-NPA y α -NA como sustratos. Los resultados fueron 192 mU/mg y 1095 mU/mg de proteína, respectivamente. Al tratarse de un grupo de isoenzimas hidrolasas, los parámetros cinéticos de la actividad CbE fueron diferentes dependiendo del sustrato utilizado. En el trabajo de Lajmanovich et al. (2008) se dieron a conocer los niveles basales de la actividad específica de CbE en tres especies de sapos sudamericanos: *Bufo fernandezae* 621.49 nmol min⁻¹ ml⁻¹, *B. arenarum* 270.07 nmol min⁻¹ ml⁻¹ y *B.*

schneideri 301.95 nmol min⁻¹ ml⁻¹. En reptiles también se han medido estas enzimas. Un ejemplo es el estudio de Sánchez-Hernández et al. (1997), donde se analizaron los niveles de CbE en el suero del lagarto *Gallotia galloti* y se observó un promedio de 11.00 ± 2.81 μmol/min ml. Finalmente, Lajmanovich et al. (2008), realizaron una comparación de la actividad de CbE del plasma de varios grupos de vertebrados, donde se observó que paseriformes y lagartos tienen los mayores niveles de actividad enzimática. Los autores argumentaron que el tamaño corporal y/o la dieta serían los factores biológicos que explican la enorme variación interespecífica de los niveles de actividad CbE plasmática. Este aspecto ha sido también un argumento comúnmente utilizado en aves para explicar la correlación negativa entre la actividad CbE plasmática y el tamaño corporal de los organismos (Thompson, 1993; Thompson et al., 1995).

Las lipasas han sido utilizadas principalmente en el campo de la biotecnología. Se han realizado mediciones de sus niveles en organismos que son de interés para este campo, como, por ejemplo, bacterias y levaduras. La gran mayoría de los estudios acerca de las lipasas son netamente de caracterización molecular (secuencias aminoacídicas, estructura tridimensional, secreción, plegamiento, mecanismos catalíticos, unión a sustrato, selectividad enantiomérica, entre otros). Al momento de realizar esta investigación, no se disponía de publicaciones relevantes acerca de los niveles basales de lipasas en vertebrados e invertebrados.

1.5 Contribución de las carboxilesterasas y lipasas en toxicología ambiental

Las CbEs no son una herramienta nueva en la ecotoxicología, pero sí poco usada. La interacción de la CbE con los insecticidas OFs resulta en una inhibición irreversible de la actividad esterásica con la consecuente disminución de la concentración del insecticida biológicamente activo (Chanda et al., 1997). Si bien la inhibición de las CbEs por los insecticidas no causa manifestaciones tóxicas en el organismo, las interacciones anteriormente mencionadas han llevado a considerar estas estererasas como un biomarcador de sensibilidad a pesticidas (Rodríguez-Castellanos et al., 2007; Lajmanovich et al., 2008). Como se mencionó anteriormente, estas estererasas son importantes en la detoxificación de pesticidas OFs, CBs y piretroides (Sánchez-Hernández & Wheelock, 2009) y esto lo logran mediante dos vías principales: hidrólisis del enlace éster (CBs, piretroides y los OFs que presenten este tipo de enlace, como el malatión) y por unión irreversible del pesticida (OFs) al sitio activo de la CbE (Maxwell 1992; Wheelock et al., 2005; Crow et al., 2007). La literatura propone dos principales hipótesis acerca de los factores que determinan la efectividad de la CbE al detoxificar cualquier pesticida inhibitorio de la AChE en algún tejido: (1) actuando como un mecanismo de detoxificación estequiométrico, es decir, la efectividad se debe esencialmente al número de moléculas de CbE relativo al número de moléculas del pesticida (Maxwell, 1992) y (2) determinado por la afinidad de las CbEs hacia el pesticida (Chambers and Carr 1993).

Sin embargo, son escasos los estudios acerca de la interacción de las lipasas con los pesticidas. Debido a esto, Quistad et al. (2006a) realizaron un estudio de inhibición de distintas hidrolasas serinas (incluyendo lipasas) con ocho OFs. Concluyeron que cada lipasa tiene un espectro diferente de sensibilidad a OFs. Algunos de ellos causan cambios en el metabolismo lipídico. Por ejemplo, la degradación de 2-araquidonilglicerol en el sistema cannabinoide, se ve interrumpida por la inhibición de la MAG (monoacilglicerol) lipasa gracias a clorpirifos, llevando a una hipomotilidad, causada por la interferencia con esta vía de transducción de señales (Quistad et al., 2006b). En términos generales, las altas dosis de pesticidas OFs, causan un aumento de los triacilgliceroles de la sangre, lo que puede ser contraproducente para la salud, pero el impacto total de la inhibición de las lipasas probablemente es mínimo comparado con la inhibición de AChE. Las lipasas son mucho más sensibles que la AChE cerebral, lo que podría neutralizar los pesticidas OFs y, por lo tanto, reducir la inhibición de la AChE; lo cual constituye un mecanismo similar al propuesto para las esterasas sanguíneas (Masson & Lockridge, 2010; Maxwell 1992).

1.6 Factores ambientales y biológicos que modifican las actividades carboxilesterasa y lipasa

Existen numerosos estudios que han documentado variaciones en los niveles de la actividad de las CbEs, las que son atribuidas a diversos factores. Por un lado, los diversos tejidos no presentan los mismos niveles de actividad CbE. Según Chanda et al. (1997), el hígado posee la mayor capacidad detoxificadora debido a que presenta la mayor cantidad de moléculas de CbE, exhibiendo más actividad que el plasma y el

cerebro. Además, estos autores encontraron en ratas de laboratorio diferencias relacionadas con el sexo. El macho posee el doble de actividad CbE en el hígado, y un 15% menos de actividad CbE cerebral que la hembra. El tamaño corporal, es un factor que también genera variación en la actividad CbE. Bush et al. (1973) encontraron que las aves con mayor tamaño corporal, poseían los mayores niveles de actividad de las esterasas hepáticas. Sin embargo, algunos estudios muestran lo contrario. En tres especies de bufo de Sudamérica, se observó una correlación negativa y significativa entre la CbE plasmática y el tamaño corporal, es decir, los individuos más pequeños, poseen mayor actividad de CbE plasmática (Lajmanovich et al., 2008). Roy et al., (2005) y Sogorb et al. (2007) también documentaron esta variación de las CbEs en aves. Las especies de aves más pequeñas poseen los mayores niveles de actividad CbE. En el trabajo de Lajmanovich et al. (2008) se realizó una comparación de los niveles de actividad CbE plasmática de varios grupos de vertebrados, y en ella, se puede ver que independiente de la especie, siempre hay una relación negativa entre la actividad de la CbE y el tamaño corporal. La dieta, también parece producir una variación en los niveles de la actividad CbE. Así que varios investigadores han señalado que, las aves que tienen dietas más diversas (omnívoro o herbívoro), presentan mayores niveles de actividad CbE (Bush et al., 1973; Roy et al., 2005). Durante el período diurno, también se pueden observar variaciones en los niveles de la actividad CbE. Por ejemplo, Thompson et al. (1988), demostraron que la actividad CbE sérica en estorninos aumenta un 150% durante el período de actividad. Se sugirió que esta gran variación estaba relacionada con los patrones de alimentación.

Como se mencionó anteriormente, hasta donde conocemos, no existen estudios acerca de los niveles basales de las lipasas en vertebrados e invertebrados. Debido a esto tampoco hay estudios que registren variaciones en los niveles de actividad lipasa en función de factores ambientales y/o biológicos. Esta ausencia de información, junto con la importancia de las lipasas en la absorción y metabolismo de los lípidos, determina el estudio de este grupo de enzimas en esta investigación.

A modo de hipótesis, esperamos encontrar que las especies de aves con dietas más diversas, posean mayores niveles de actividad de CbE. También esperamos que la actividad de lipasa siga este comportamiento. Con respecto a la masa corporal, esperamos que los individuos con menor masa corporal, presenten mayores niveles de actividad de CbE y de lipasa.

2. Objetivos

2.1 Objetivos generales

La mayoría de los estudios ecotoxicológicos que han involucrado el uso de CbEs en los estudios de aves, ha utilizado el plasma como fuente de la enzima. Sin embargo, el tracto gastrointestinal es el principal epitelio de absorción de pesticidas en estos vertebrados. La existencia de CbEs en los enterocitos del intestino delgado podría actuar como una barrera bioquímica reduciendo en paso de pesticidas al medio interno del animal (Sánchez-Hernández et al., 2009). En este estudio se analizó los niveles de actividad de CbEs y lipasas en el intestino delgado de 48 individuos representantes de seis especies y dos subórdenes de aves paseriformes que presentan diferentes hábitos alimentarios. Como las CbEs se componen de múltiples isoenzimas inespecíficas, se usarán dos sustratos distintos para la caracterización de la actividad de esta hidrolasa. Así mismo y por la repercusión en el metabolismo lipídico, consideramos a las lipasas intestinales un potencial biomarcador frente a la exposición de pesticidas OFs. Al usar distintas especies de paseriformes con dietas contrastantes se persigue establecer los valores estándares de CbEs y lipasas en dichos individuos, y en un futuro poder utilizar este tipo de información para evaluar el efecto de los pesticidas anti-AChE, y/o regular el uso de los pesticidas en Chile en base a sus efectos colaterales como, por ejemplo, el impacto sobre organismos no diana frecuentes en el agrosistema.

2.2 Objetivos específicos

1. Examinar el efecto de la dieta en la variación interespecífica de las CbEs y lipasas.
2. Examinar el efecto del tamaño corporal en la variación interespecífica de las CbEs y lipasas

3. Materiales y Métodos

3.1 Reactivos

Los reactivos químicos que fueron utilizados para los ensayos de CbE y lipasas fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Santiago, Chile) y son los siguientes: α -naftil acetato (α -NA), 4-nitrofenil acetato (4-NPA), 4-nitrofenil palmitato (4-NPP), 4-nitrofenol y sal de diazonio Fast Red ITR que es un cromóforo usado para la detección de naftoles. Las soluciones de los sustratos α -Na y 4-NPA fueron preparadas en etanol, y la de 4-NPP en propanol, conservándose a 4-5°C en un congelador durante varias semanas.

3.2 Captura de aves y preparación de las muestras

Se capturaron individuos de 6 especies de passeriformes (tabla 1) mediante redes niebla en dos localidades de la zona central de Chile: Estación de Investigaciones Ecológicas Mediterráneas en San Carlos de Apoquindo (33°23'S, 70°30'W) y en el fundo Quebrada de la Plata (33°30' S, 70°54' W). Las capturas fueron realizadas durante las primeras horas del día, en los meses de verano en 2008 y 2009 y trasladadas al laboratorio de Ecofisiología Animal en Santiago. Los animales fueron inmediatamente sacrificados mediante exposición a CO₂, se les midió la masa corporal (mb), fueron disectados abdominalmente y sus órganos extraídos y pesados. El intestino de cada individuo fue lavado con solución de NaCl (0,9% p/v), medido (cm) y pesado ($\pm 0,0001$ g), y posteriormente homogenizado en 0.9% NaCl en una relación 1:20 utilizando un Ultraturrax T25 a velocidad máxima (24.000 rpm). El extracto fue centrifugado a 5.000 rpm durante 10 minutos. Finalmente el sobrenadante fue congelado y conservado a -50°C en un congelador.

Tabla 1: Nombre común, nombre científico, dieta, número de individuos y lugar de recolección correspondiente a las 6 especies de aves paseriformes estudiadas.

Nombre común	Nombre científico	Dieta	n	Lugar de recolección
Diuca	<i>Diuca diuca</i>	Granívoro	5	Quebrada; San Carlos
Jilguero	<i>Carduelis barbata</i>	Granívoro	9	Quebrada
Canastero	<i>Asthenes humicola</i>	Insectívoro	6	San Carlos
Chercán	<i>Troglodytes aedon</i>	Insectívoro	11	Quebrada; San Carlos
Chincol	<i>Zonotrichia capensis</i>	Omnívoro	7	Quebrada; San Carlos
Zorzal	<i>Turdus falklandii</i>	Omnívoro	10	San Carlos

3.3 Determinación de la actividad Carboxilesterasa

La actividad CbE fue determinada espectrofotométricamente mediante un lector de microplacas Asys HiTech UVM340 y a la temperatura corporal promedio de las aves (41°C, Sabat et al 2010), utilizando los sustratos α -NA y 4-NPA. La actividad específica fue expresada como U mg⁻¹ proteína total (1U = 1 μ mol/min en las condiciones experimentales descritas), U g⁻¹ tejido y μ mol min⁻¹. La proteína total fue cuantificada siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albúmina bovina sérica como estándar. La actividad de 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 0.1M (pH 7.6) y 20mM de α -NA, y fue incubada durante 10 minutos a 40°C con la muestra. La formación de α -naftol fue detenida añadiendo 50 μ L de SDS 5% en 0.1% Fast Red ITR/5% Triton X-100. Las soluciones se mantuvieron durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La absorbancia del complejo naftol-Fast Red ITR fue leída a 530nm. La actividad de CbE usando 4-NPA fue determinada siguiendo el método de Chanda et al. (1997). El medio de reacción (200 μ L, volumen final) contenía Tris-HCl 0.1M (pH 8.0) con EDTA 1mM y la muestra de intestino. Se

inició la reacción añadiendo 10 μ L de 4-NPA 20mM. La formación de 4-nitrofenol fue monitoreada a 405nm y cuantificada utilizando una curva estándar de 4-nitrofenol.

3.4 Determinación de la actividad de lipasas

La actividad de las lipasas fue determinada mediante espectrofotometría utilizando el lector de microplacas antes mencionado. La actividad fue expresada como mU mg⁻¹ de proteína total y nmol min⁻¹, utilizando 4-NPP como sustrato de la reacción (Gupta et al., 2002). El medio de reacción (250 μ L, volumen final) contenía tampón Tris 50mM (pH 8.0) con Tritón X-100 al 0.4% y la muestra de intestino. Se inició la reacción añadiendo 20 μ L de 4-NPP 16.5mM. El producto final fue monitoreado a 410nm durante 8 minutos.

3.5 Análisis estadísticos

Para comprobar si la distribución de nuestros datos se ajusta o no a una distribución normal, se realizó la prueba de Kolmogorov-smirnov, seguida de la prueba de Lilliefors. Al no seguir una distribución normal, nuestros datos fueron transformados a logaritmo natural (ln), ya que al realizar esta transformación, es posible interpretar los resultados de los análisis estadísticos en los datos sin transformar. La dependencia de las actividades enzimáticas de la masa corporal, se analizó utilizando regresiones lineales con ajuste logarítmico. Cuando la relación resultó significativa, se calcularon los residuos del modelo lineal y se observó la relación entre los tres sustratos. Diferencias en la actividad de CbE y lipasa entre especies y dietas fueron obtenidas utilizando la prueba de ANOVA de una vía. Cuando las diferencias fueron significativas (P<0.05), se realizó

una prueba a posteriori de Tukey para efectuar las comparaciones entre tratamientos. Cuando las actividades totales de CbEs y lipasa se correlacionaron significativamente con la masa corporal, se realizó una prueba de ANCOVA para comparar las actividades totales de las enzimas utilizando la masa corporal como covariable y las especies como factor independiente. Los análisis estadísticos y representaciones gráficas fueron realizados utilizando los programas Statistica 7.0 y SigmaPlot 11.0, respectivamente.

4. Resultados

La actividad total de las CbEs y las lipasas se correlacionó positiva y significativamente con la masa corporal (CbE- α NA: $r = 0.898$, $p = 0.015$; CbE-4NPA: $r = 0.897$, $p = 0.015$; lipasa: $r = 0.936$, $p = 0.006$, figura 1). A partir de las ecuaciones de estas regresiones se obtuvieron los exponentes alométricos para cada una de las enzimas (actividad CbE- α NA = $1.05 \cdot mb^{1.87}$; actividad CbE-4NPA = $1489.36 \cdot mb^{1.43}$; actividad lipasa = $0.56 \cdot mb^{1.41}$).

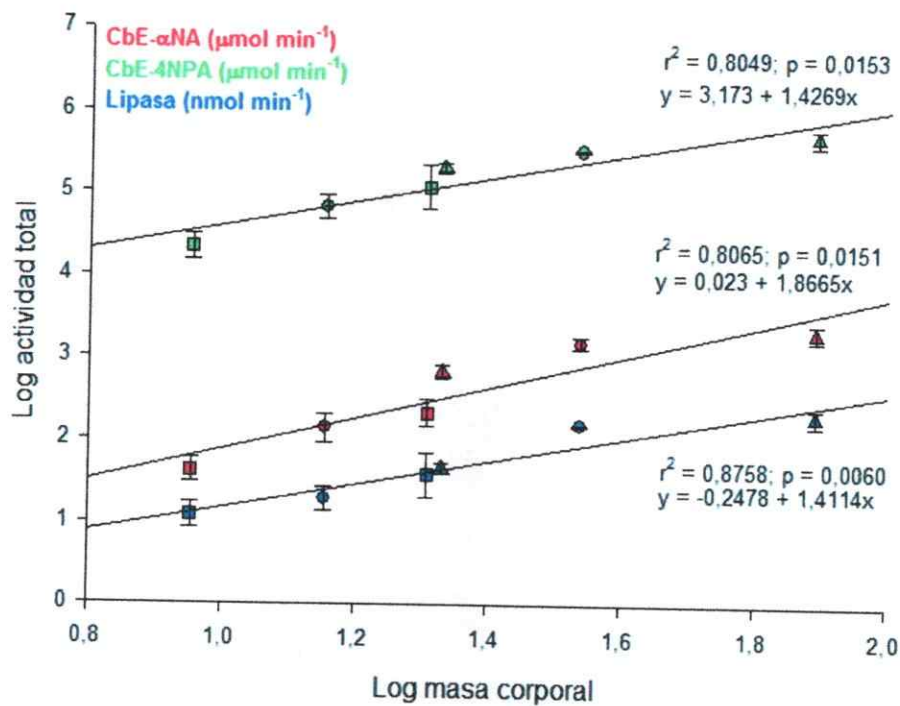


Figura 1: Relación entre masa corporal y actividad de esterasa y lipasa en seis especies de paseriformes (promedio \pm EE, $n_{\text{total}} = 48$). Los símbolos \circ , \square y Δ representan a especies de aves que exhiben dietas granívoras, insectívoras y omnívoras, respectivamente.

La actividad específica de la lipasa arrojó una tendencia de asociación positiva con la actividad de CbE-4NPA, aunque ésta no fue significativa ($p = 0.098$). La actividad de CbE- α NA se correlacionó positiva y significativamente con la actividad de lipasa y con la actividad de CbE-4NPA ($r = 0.82$, $p = 0.045$ y $r = 0.953$, $p = 0.032$ respectivamente, figuras 2 y 3).

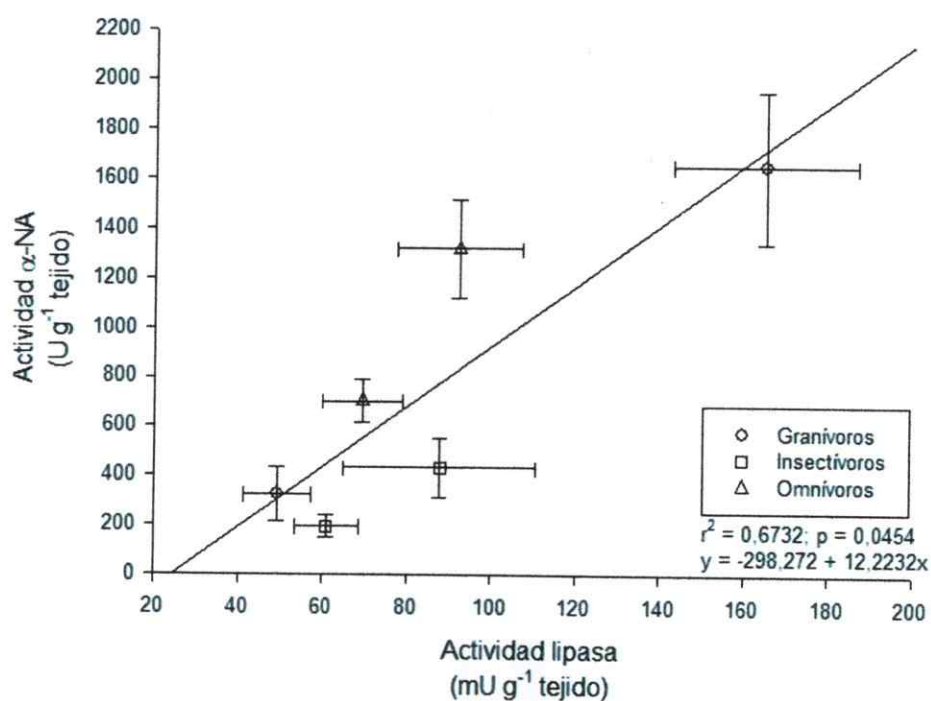


Figura 2: Relación entre la actividad específica de lipasa y la actividad específica de CbE- α NA (promedio \pm EE, $n_{\text{total}} = 48$).

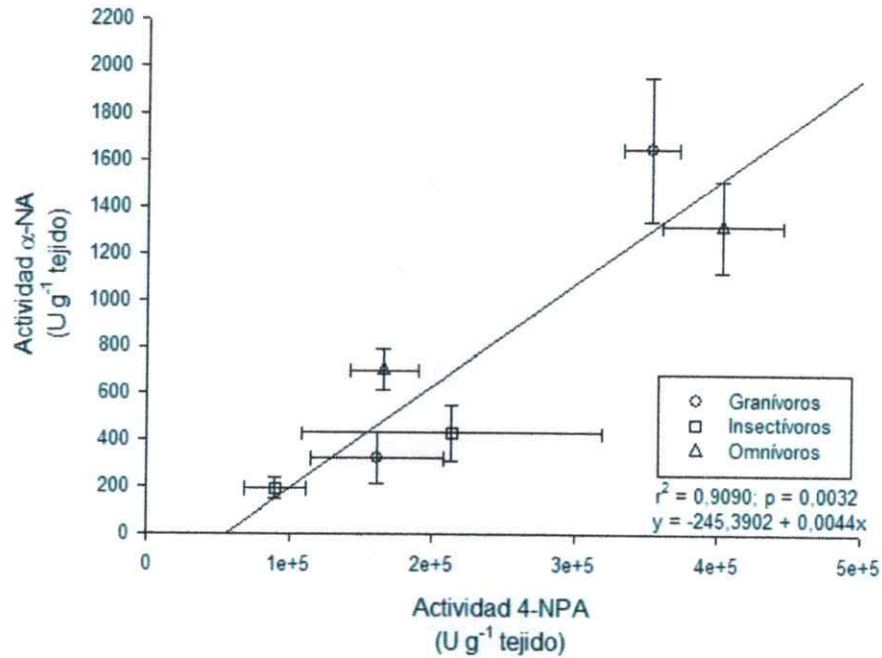


Figura 3: Relación entre la actividad específica de CbE- α NA y la actividad específica de CbE-4NPA (promedio \pm EE, $n_{\text{total}} = 48$).

Posterior a la correlación entre las actividades enzimáticas y la masa corporal, se calcularon los residuos para las tres actividades totales y se correlacionaron entre ellas. Sólo en el par CbE- α NA y CbE-4NPA se observó una asociación significativamente positiva ($r = 0.96$, $p = 0.002$, figura 4). Cuando se correlacionaron los residuos de CbE- α NA con los de lipasa, la asociación, aunque fue positiva, no fue estadísticamente significativa ($r = 0.81$, $p = 0.053$). Lo mismo sucedió con la correlación de los residuos de CbE-4NPA y los de lipasa ($r = 0.69$, $p = 0.13$).

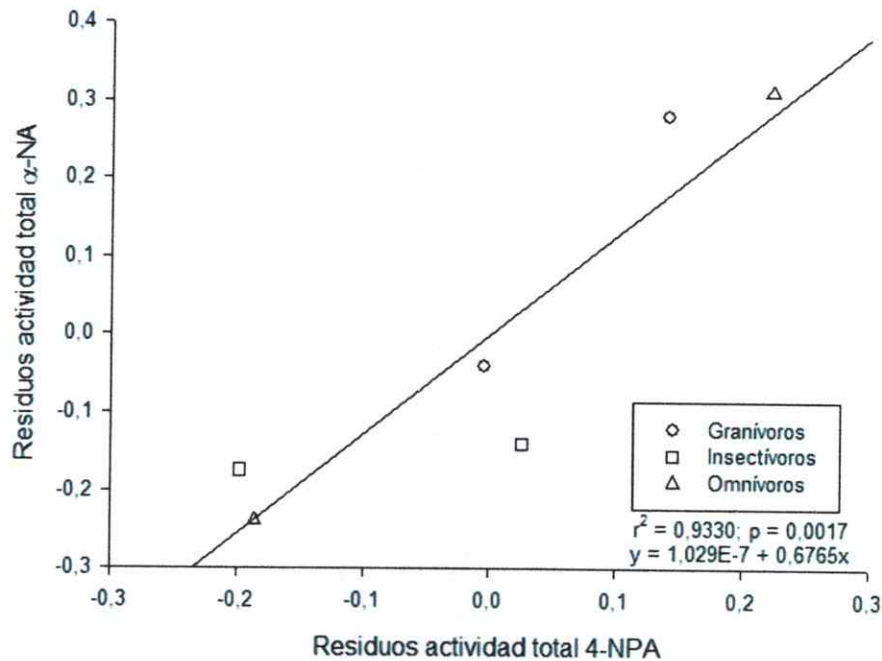


Figura 4: Relación entre los residuos de la actividad total de CbE- α NA y la actividad total de CbE-4NPA (promedio \pm EE, $n_{total} = 48$).

Al realizar un ANOVA de una vía, se observa que la actividad específica de la esterasa con ambos sustratos es afectada significativamente por el factor especie ($F_{(5,42)} = 9.60$, $p \ll 0.01$ para CbE- α NA y $F_{(5,42)} = 5.55$, $p \ll 0.01$ para CbE-4NPA; figura 5). Lo mismo sucede cuando se expresa en base a la masa de tejido ($F_{(5,42)} = 28.82$, $p \ll 0.01$ para CbE- α NA y $F_{(5,42)} = 18.4$, $p \ll 0.01$ para CbE-4NPA; figura 6). Al realizar un ANOVA, considerando la actividad específica de la lipasa, ésta no se vio afectada significativamente por las especies ($F_{(5,42)} = 1.7$, $p = 0.15$), pero la actividad específica en relación a la masa de tejido sí varió significativamente con la especie ($F_{(5,42)} = 4.75$, $p = 0.002$; figura 7).

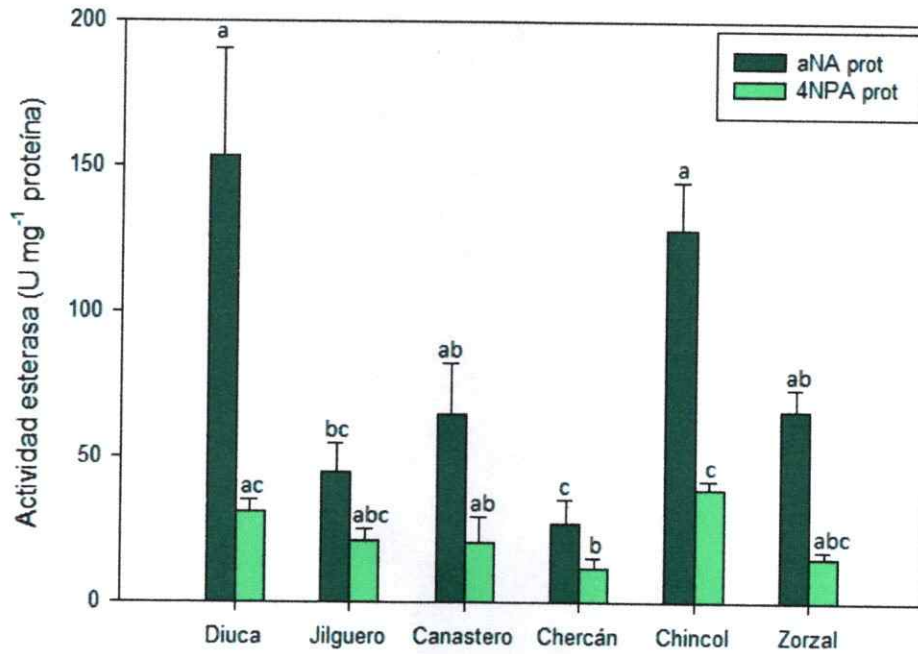


Figura 5: Promedio (\pm EE, $n_{\text{total}} = 48$) de actividad específica de CbE- α NA y CbE-4NPA en seis especies de aves passeriformes. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) después de una prueba a posteriori de Tukey.

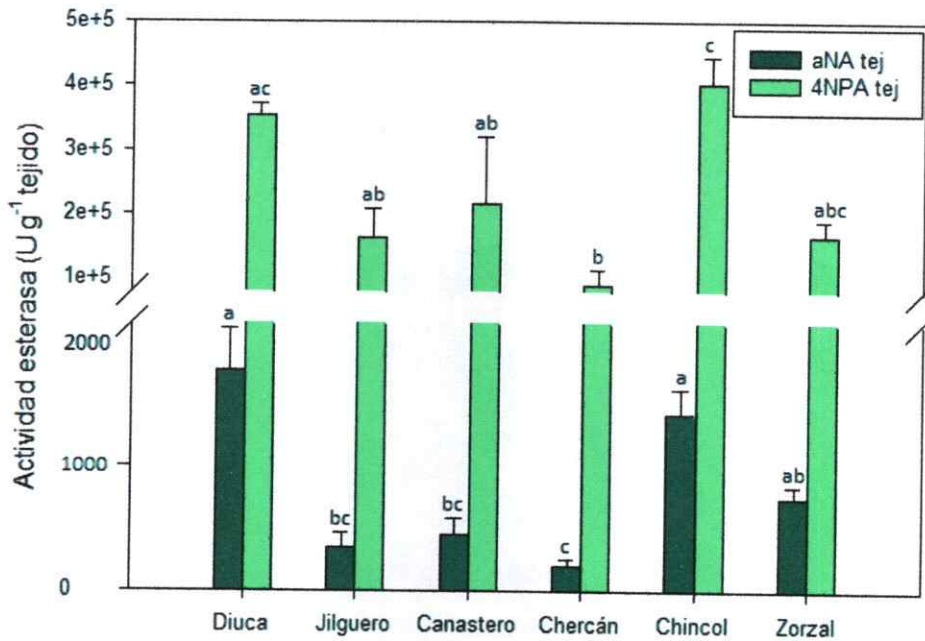


Figura 6: Promedio (\pm EE, $n_{\text{total}} = 48$ aves) de actividad específica de CbE- α NA y CbE-4NPA en seis especies de aves passeriformes. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) después de una prueba a posteriori de Tukey.

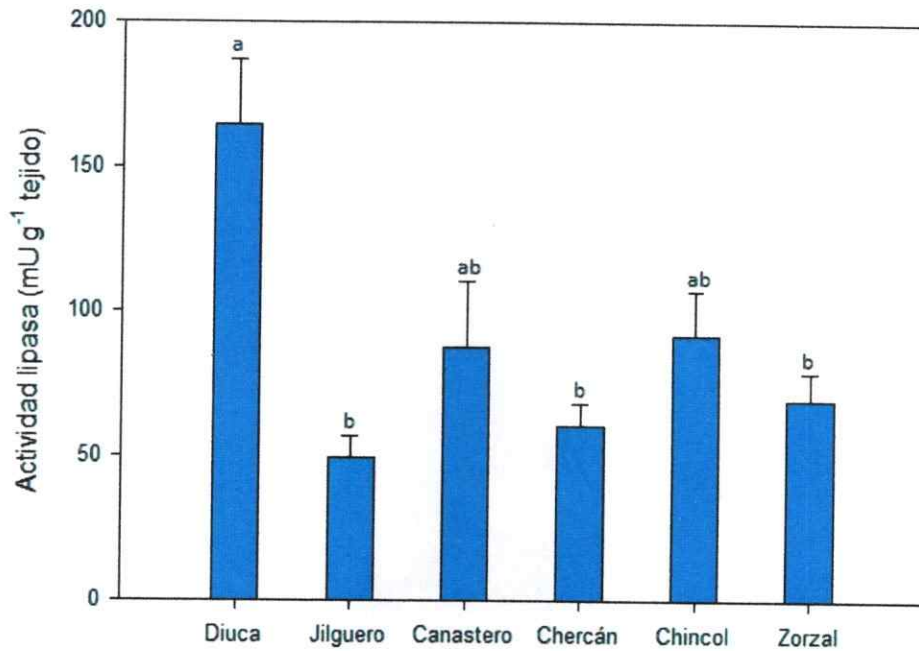


Figura 7: Promedio (\pm EE, $n_{total} = 48$) de actividad específica de lipasa en seis especies de aves passeriformes. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) después de una prueba a posteriori de Tukey.

Cuando examinamos el efecto de la dieta, las actividades totales de CbE- α NA y CbE-4NPA se ven afectadas significativamente por los tres tipos de dieta ($F_{(2,45)} = 22.61$, $p \ll 0.01$ para CbE- α NA y $F_{(2,45)} = 22.17$, $p \ll 0.01$ para CbE-4NPA; figura 8). Se observa el mismo patrón al evaluar la actividad de lipasa ($F_{(2,45)} = 13.42$, $p \ll 0.01$; figura 9).

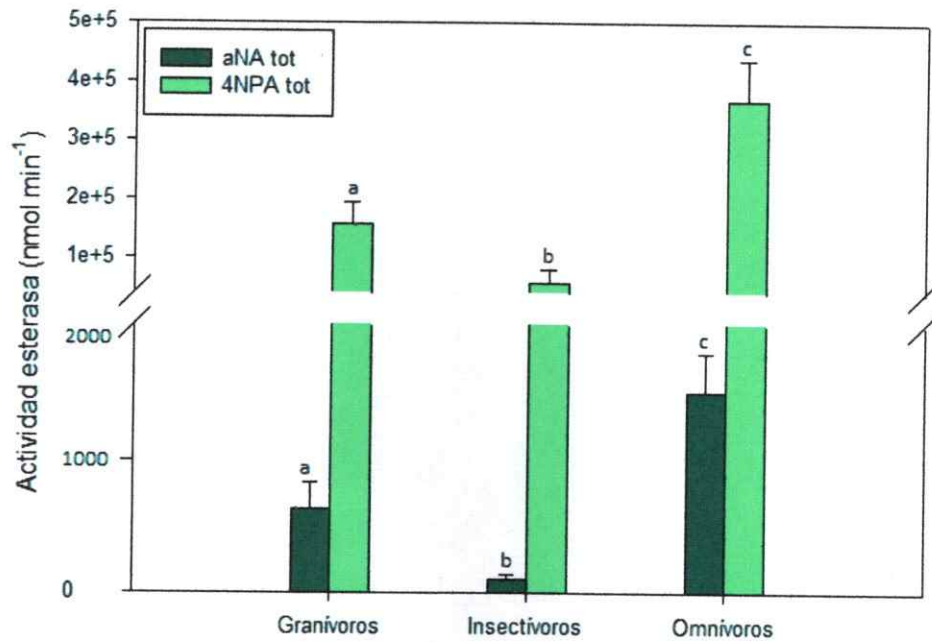


Figura 8: Promedio (\pm EE, $n_{\text{total}} = 48$) de actividad total de CbE- α NA y CbE-4NPA en función de la dieta de aves paseriformes. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) después de una prueba a posteriori de Tukey.

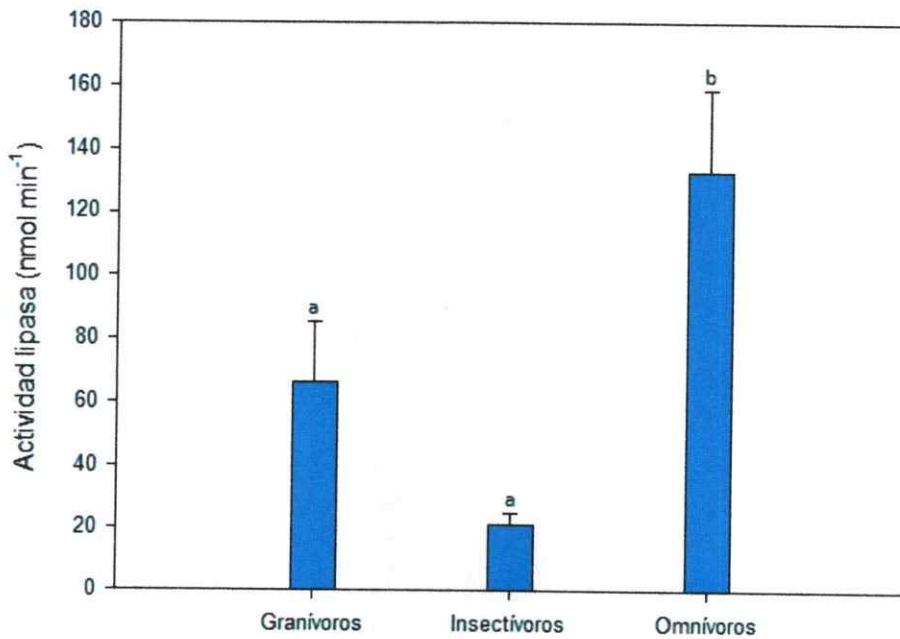


Figura 9: Promedio (\pm EE, $n_{\text{total}} = 48$ aves) de actividad total de lipasa en función de la dieta de aves paseriformes. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) después de una prueba a posteriori de Tukey.

La variación de la actividad de las CbEs y lipasa con la especie se examinó con un ANCOVA, utilizando la masa corporal como covariable puesto que esta variable se correlacionó significativamente con las actividades enzimáticas. Se observó un efecto significativo del factor especie en las actividades de CbE- α NA ($F_{(5,41)} = 10.71$, $p \ll 0.01$), CbE-4NPA ($F_{(5,41)} = 7.54$, $p \ll 0.01$) y lipasa ($F_{(5,41)} = 9.48$, $p \ll 0.01$).

Tabla 2: Nombre común, dieta, masa corporal (g) y actividad masa-específica (UI/mb) de CbEs y lipasas (estandarizadas por masa corporal). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) después de una prueba a posteriori de Tukey y un ANCOVA usando mb como covariable.

Espece	Dieta	Mb	CbE- α NA mb ⁻¹	CbE-4NPA mb ⁻¹	Lipasa mb ⁻¹
Diuca	Granívoro	34.56	43.40 ^a	9346.53 ^a	4.40 ^a
Jilguero	Granívoro	14.30	9.64 ^{bc}	4585.60 ^{bc}	1.32 ^{bc}
Canastero	Insectívoro	20.34	10.38 ^{bd}	5721.94 ^{bcd}	1.84 ^{bd}
Chercán	Insectívoro	8.98	4.74 ^c	2408.73 ^c	1.38 ^c
Chincol	Omnívoro	21.45	30.82 ^{ad}	9204.22 ^{ad}	2.07 ^d
Zorzal	Omnívoro	78.14	26.56 ^a	6240.91 ^a	2.49 ^a

5. Discusión

5.1 Análisis comparativo

La mayoría de los estudios de CbEs en vertebrados, registran los niveles de estas enzimas en plasma e hígado, lo que impide realizar una comparación interespecífica con respecto a los datos de intestino delgado de nuestro estudio con información de la literatura. No obstante, una visión comparativa con otros tejidos, revela que los niveles de CbE del intestino de nuestras aves son significativamente mayores que los de cualquier tejido no digestivo, incluso mayores que los del hígado de rata, el cual resulta ser el órgano con la mayor actividad CbE documentada en micromamíferos (Chanda et al., 1997). Los niveles de CbE del intestino de nuestras aves también resultaron ser mayores que los niveles de CbE plasmática de aves paseriformes, las que habían presentado los mayores niveles en un estudio comparativo realizado con otros grupos de vertebrados (Lajmanovic et al., 2008).

Recientemente, se ha documentado que en la lombriz de tierra *Lumbricus terrestris*, el tejido que presenta la mayor expresión de la actividad de CbE es el tejido gastrointestinal, además de exhibir una secreción de esterasas hacia el lumen intestinal (Sánchez-Hernández et al., 2009; González Vejares et al., 2010). Esto también fue documentado por Cook et al., (1969), Geering y Freyvogel (1974), Turunen y Chipendale (1977) y Mommsen (1978) en distintos artrópodos. Tal secreción gastrointestinal se explicaría por el papel fisiológico de las CbEs en la absorción y metabolismo lipídico. En mamíferos también se han observado altos niveles de CbEs intestinales (Sato y Hosokawa, 1998). De acuerdo con los resultados presentados en

este estudio, los altos niveles de CbEs presentes en el intestino de aves paseriformes con una dieta omnívora pueden contribuir a reducir la absorción de plaguicidas presentes en el alimento, actuando estas esterasas como una barrera bioquímica que hidroliza (caso de los insecticidas piretroides) o secuestra (caso de los insecticidas OFs y CBs) agroquímicos en el epitelio intestinal (Hänninen et al., 1987).

Lamentablemente, los niveles de actividad de lipasas obtenidos en este estudio, no pueden ser comparados con otros estudios, debido a la ausencia de investigaciones relacionadas. A pesar de esto, cabe mencionar que las lipasas, aunque hidrolizan enlaces ésteres de ácidos alifáticos de cadena larga, igualmente pueden hidrolizar naftil ésteres y nitrofenil ésteres. Ello lleva a cuestionarnos si la actividad esterásica medida en nuestras aves es debida parcialmente a la contribución de las lipasas. Aunque no hemos realizados ensayos complementarios para lograr dilucidar este posible co-metabolismo, algunos estudios realizados con *L. terrestris* (Sánchez-Hernández et al., 2009), ratas y tejido humano (Ross et al., 2006; Crow et al., 2007) muestran que la actividad hidrolítica del α -NA o 4-NPA en el intestino se debe fundamentalmente a las CbEs.

5.2 Efecto de la dieta en las actividades enzimáticas

Los niveles de actividad CbE y lipasa fueron significativamente mayores en las aves omnívoras que en las granívoras e insectívoras. Aunque estos dos últimos grupos no son significativamente distintos entre sí para el caso de la lipasa, se aprecia sin embargo que los granívoros poseen mayores niveles de actividad hidrolítica de las tres enzimas. Estos mismos resultados fueron señalados en los estudios de Bush et al. (1973)

y Roy et al. (2005), quienes observaron que las aves con una dieta más diversa, presentaban mayores niveles de actividad CbE en la sangre. Cabe destacar que aunque no se ha descrito la variación que experimentan las lipasas con la dieta, los resultados presentados en este estudio, sugieren un efecto similar del tipo de dieta con la actividad lipasa intestinal. Esta variación puede ser explicada por el hecho de que las especies carnívoras (insectívoras en este estudio) tienen dietas más especializadas que las llevan a confrontarse con una menor variedad de compuestos para detoxificar que los omnívoros y granívoros. Por lo tanto, las especies carnívoras dependerían del sistema enzimático de detoxificación de sus presas.

5.3 Efecto del tamaño corporal en las actividades enzimáticas

Se encontró una correlación positiva y significativa de las tres actividades enzimáticas intestinales totales con la masa corporal; es decir, las aves de mayor tamaño presentaron mayores niveles de actividad CbE y lipasa. En estudios previos, se encontró una relación contraria (Roy et al., 2005; Sogorb et al., 2007; Lajmanovich et al., 2008). La discrepancia entre nuestros resultados y aquéllos de la literatura pueden ser explicados atendiendo a dos razones: (i) el tejido utilizado en el análisis de las enzimas. Los datos de actividad CbE que muestra la bibliografía fueron obtenidos utilizando el plasma del individuo, mientras que nuestros resultados han sido obtenidos en el tejido intestinal. Hasta donde conocemos, no hay estudios que establezcan una correlación entre CbEs intestinales y la masa corporal. (ii) Según Ramirez-Otarola et al., (2011), el bajo rango de masas corporales debido a un pequeño tamaño muestral, puede llevar a resultados distintos a los esperados. En nuestro caso, esto puede ser posible ya que sólo

se compararon 6 especies y se trabajó con una baja cantidad de individuos por especie. Al considerar los otros estudios, donde el tamaño muestral y el rango de masa corporal son mayores (Por ejemplo, batracios, lacértidos, passeriformes y rapaces, véase Lajmanovich et al., 2008), se puede apreciar lo mencionado anteriormente. Sin embargo, esta observación no invalida nuestros experimentos de campo, aunque sí limita las deducciones que podemos derivar de ellos. La ausencia de estudios que ofrezcan una relación alométrica de las CbE intestinales no permite desarrollar una hipótesis sobre la expresión y modulación de las CbEs y lipasas con la masa corporal del individuo. Pero, por otro lado, el efecto del tamaño del ave y su dieta en las actividades de CbE y lipasas intestinales aportan un carácter novedoso a la toxicología ambiental de los fitosanitarios en organismos no objetivo como las aves.

5.4 Carboxilesterasas y lipasa en aves chilenas: una perspectiva ecotoxicológica

Las aves que habitan o frecuentan los agrosistemas están expuestas a una gran variedad de pesticidas, y la absorción intestinal es la principal ruta de exposición a éstos. Los altos niveles de actividad de CbE podrían proveer una barrera enzimática que impediría la absorción de los pesticidas anticolinesterásicos (OFs y CBs). Si bien este es un estudio preliminar que trabajó con un bajo número de individuos analizados, este documenta por primera vez los niveles de CbE y lipasa intestinales en aves chilenas, evaluando como variables del tipo masa corporal y dieta, modulan sus actividades. Nuestro estudio sirve de punto de partida para evaluar los efectos tóxicos de los pesticidas anti-AChE en aves, y se espera que llegue a convertirse en una contribución a

la regulación y toma de decisiones en relación al uso de fitosanitarios en la agricultura chilena.

6. Conclusiones

En conclusión, se puede observar que la dieta y la masa corporal se relacionan directamente con los niveles de CbEs y lipasa en el intestino de las seis especies de aves paseriformes estudiadas en este trabajo.

Sin embargo, con el fin de analizar correctamente los datos y poder realizar comparaciones interespecíficas en busca de correlatos ecológicos (e.g., dieta) es necesario descartar los efectos de la historia evolutiva. De esta manera, resaltamos la importancia de realizar una aproximación filogenéticamente explícita (véase Ramírez-Otarola et al., 2011 para un ejemplo con aves chilenas). Esta aproximación demandará considerar un mayor número de especies lo que necesariamente requerirá considerar las ventajas y desventajas de los análisis invasivos sobre la fauna, como por ejemplo, el posible impacto negativo sobre aquellas especies con una baja densidad de individuos o que se encuentren en un estatus de protección. Junto con las enzimas utilizadas en este estudio, se deben considerar otros indicadores de exposición a pesticidas como las actividades de AChE y la BChE intestinales y plasmáticas. Por otro lado, el análisis *in vitro* e *in vivo* de los efectos de los insecticidas OFs y CBs sobre la actividad lipasa intestinal resulta una aproximación de máximo interés para examinar efectos no neurotóxicos de estos grupos de insecticidas. Si bien en mamíferos, las lipasas son sensibles a la inhibición de estos insecticidas, no hay datos en la bibliografía en relación a vertebrados no mamíferos. La figura 10 da cuenta de las principales conclusiones de este estudio, los análisis sugeridos (aproximación filogenéticamente explícita y exposición de pesticidas *in vitro* e *in vivo*) y la información descrita en la literatura.

Tales estudios contribuirían a investigar el impacto de la exposición a pesticidas OFs y CBs en el crecimiento de los organismos no objetivo, un ámbito de estudio que puede ser de máximo interés en animales de corral, ganado o piscifactorías donde se utilicen tratamientos con biocidas para el control de plagas y enfermedades.

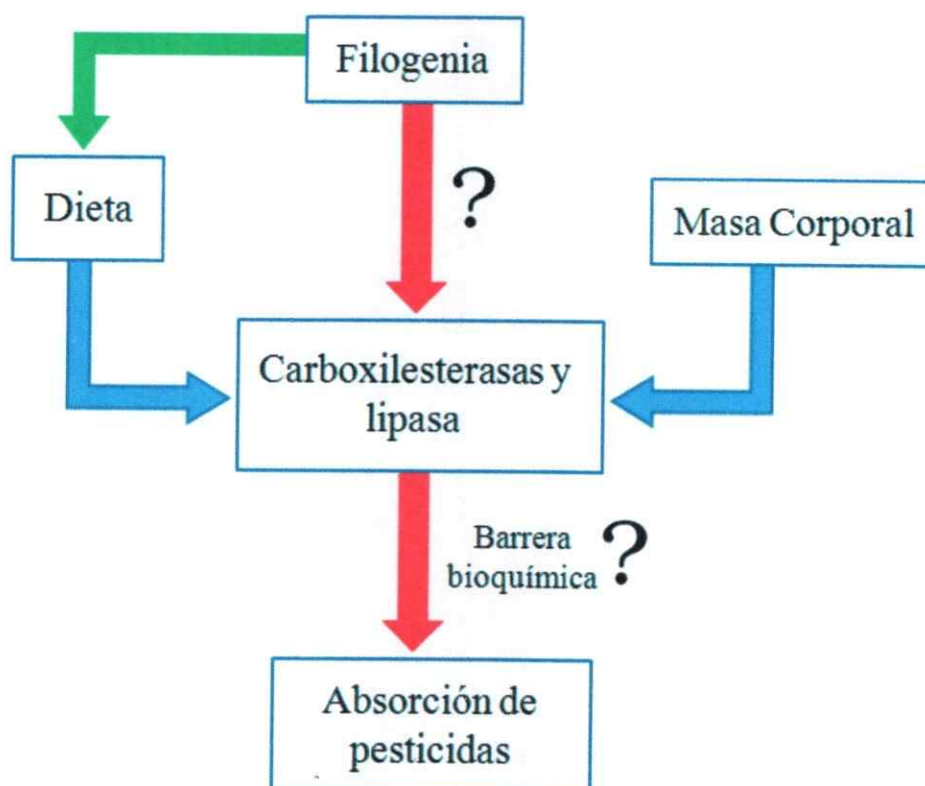


Figura 10: Diagrama de flujo con las principales conclusiones de este estudio (flechas en azul). Se destacan además, la información descrita en la literatura (flechas en verde) y los correlatos sugeridos para estudios futuros (flechas en rojo).

Por otro lado, las ChEs constituyen excelentes biomarcadores de exposición y efectos de plaguicidas de ciertos metales pesados como el Hg, Cd o Zn. Desde esta perspectiva, por su importante desarrollo minero, nuestro país está expuesto a una

actividad altamente destructiva para el medio ambiente, con un papel importante en cuanto se refiere a la contaminación de las aguas y de los suelos.

Un importante déficit en el conocimiento de la contaminación ambiental por metales pesados está en el sesgo hacia el uso de algunas especies bioindicadoras (e.g., insectos acuáticos y peces) debido a su abundancia o facilidad de captura. Este sesgo, sin embargo, puede llevar a errores graves que afecten la toma de decisiones debido a la exclusión de especies de otros taxa, ignorando potencialmente a especies mucho más sensibles que la bioindicadora. En este sentido, las vías de exposición de los organismos a estos agentes químicos dependen en gran medida de su biología y ecología. Así, es necesario considerar el papel ecológico de las especies en el ecosistema para estimar las consecuencias negativas de la contaminación. Además, algunos metales como el Hg o el Cd pueden sufrir un proceso de magnificación por lo que el estudio de los niveles de bioindicadores tales como las ChE en especies de diferentes niveles tróficos pudiera ser útil para la caracterización del “estado de salud” del ecosistema, lo que permitiría elaborar programas de gestión con mayor información.

7. 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
- Bain D., Buttemer W.A., Astheimer L., Fildes K., Hooper M. J. 2004. 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
- Boatman N.D., Brickle N.W., Hart J.D., Milsom T.P., Morris A.J., Murray A.W.A., Murray K.A., Robertson P.A. 2004. Evidence for the indirect effects of pesticides on farmland birds. *Ibis* 146: 131-143
- Bornscheuer U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 73-81
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. *Analytical Biochemistry* 772: 248-264
- Bunyan P.J., Jennings D.M., Taylor A. 1968. Organophosphorus poisoning; some properties of avian esterase. *J. Agric. Food. Chem.* 16: 326-331
- Busch F.M., Price J.R., Townsend J.I. 1973. Avian hepatic esterases, pesticides and diet. *Comparative Biochemistry and Physiology* 44: 1137-1151
- Chambers J.E., Carr R.L. 1993. Inhibition Patterns of Brain Acetylcholinesterase and Hepatic Plasma Aliesterases Following Exposures to Three Phosphorothionate Insecticides and Their Oxons in Rats. *Fundamental and Applied Toxicology* 21: 111-119
- 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
- Cook B.J., Nelson D.R., Hipps P. 1969. Esterases and phosphatases in the gastric secretion of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of Insects Physiology* 15: 581-589
- Cox C. 1991. Pesticides and Birds: From DDT to Today's Poisons. *Journal of Pesticide Reform*. Vol. 11, n° 4: 2-6

- 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
- 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
- Fojan P, Jonson P.H., Petersen M.T.N., Petersen S.B. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* 82: 1033-1041
- 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
- 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
- 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
- Galloway T., Millward N., Browne M., Depledge M. 2002. Rapid assessment of organophosphorus/carbamate exposure in the bivalve mollusk *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 61: 169-180
- García-Fernandez A.J., Calvo J.F., Martínez-Lopez E., María-Mojica P., Martínez J.E. 2008. Raptor ecology in Spain: A review on persistent environmental contaminants. *AMBIO* 37: 432-439
- Geering K., Freyvogel T.A. 1974. The distribution of acetylcholine and unspecific esterases in the midgut of female *Aedes aegypti* L. *Comparative Biochemistry and Physiology* 49B: 775-784
- Gomori G. 1953. Human esterases. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 42: 445-453
- González Vejares S., Sabat P., Sánchez-Hernández J.C. 2010. Tissue-specific inhibition and recovery of esterase activities in *Lumbricus terrestris* experimentally exposed to chlorpyrifos. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 151: 351-359

- Goujard L., Villeneuve P., Barea B., Lecomte J., Pina M., Claude S., Lepetit J., Ferre E. 2009. A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in organic solvent. *Analytical Biochemistry* 385: 161-167
- Gunstone F.D. 1999. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1535-1549
- Gupta N., Rath P., Gupta R. 2002. Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Analytical Biochemistry* 311: 89-99
- Hänninen O., Lindström-Seppä P., Pelkonen K. 1987. Role of gut in xenobiotic metabolism. *Archives of Toxicology* 60: 34-36
- Hartley R.R., Douthwaite R.J. 1994. Effects of DDT treatments applied for tsetse-fly control on the African Goshawk in north-west Zimbabwe. *African Journal of Ecology* 32: 265-272
- Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T. 1999. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315-51
- Laguerre C., Sanchez-Hernandez J.C., Heinz R.K., Triebkorn R., Capowiez Y., Rault M., Mazzia C. 2009. B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: an enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide 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. *Environ Sci Pollut Res.* 17(8): 1411-1421
- López-López S., Nolasco H., Vega-Villasante F. 2003. Characterization of digestive gland esterase-lipase activity of juvenile redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 135: 337-347
- Ludke J.L., Hill E.F., Dieter M.P. 1975. Cholinesterase (ChE) response and related mortality among birds fed ChE inhibitors. *Archives of 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
- 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
- Mommsen T. 1978. Digestive enzymes of a spider (*Tegenaria atrica* Koch)-III. Esterases, phosphatases, nucleases. *Comp. Biochem. Physiol.* 60A: 377-382
- Quistad G.B., Liang S.N., Fisher K.J., Nomura D.K., Casida J.E. 2006a. Each Lipase Has a Unique Sensitivity Profile for Organophosphorus Inhibitors. *Toxicological sciences* 91: 166-172
- Quistad G.B., Klintonberg R., Caboni P., Liang S.N., Casida J.E. 2006b. Monoacylglycerol lipase inhibition by organophosphorus compounds leads to elevation of brain 2-arachidonoylglycerol and the associated hypomotility in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 211: 78-83
- Ramirez-Otarola N., Narváez C., Sabat P. 2011. Membrane-bound intestinal enzymes of passerine birds: dietary and phylogenetic correlates. *Journal of Comparative Physiology B* 181(6): 817-827
- Rodríguez-Castellanos L., Sánchez-Hernández J.C. 2007 Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. *J. Pestic. Sci.* 32: 360-371
- Ross M., Borazjani A., Edwards C., Potter P. 2006. Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochemical Pharmacology* 71: 657-669
- Ross M.K., Crow J.A. 2007. Human carboxylesterases and their role in xenobiotic and endobiotic metabolism. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 21: 187-196
- Roy C., Grolleau G., Chamoulaud S., Rivière J.L. 2005. Plasma B-esterase activities in European Raptors. *Journal of Wildlife Diseases* 41: 184-208
- Sabat P., Ramirez-Otarola N., Barceló G., Salinas J., Bozinovic F. 2010. Comparative basal metabolic rate among passerines and the food habit hypothesis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 157: 35-40

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

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

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

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

Satoh T., Hosokawa M. 2006. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chemico-Biological Interactions* 162: 195-211

Schmidt M., Bornscheuer U. 2005. High-throughput assays for lipases and esterases. *Biomolecular Engineering* 22: 51-56

Singh R., Gupta N., Goswami V.K., Gupta R. 2005. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 679-682

Sogorb M.A., Ganga R., Vilanova E., Soler F. 2007. Plasma phenylacetate and 1-naphthyl acetate hydrolyzing activities of wild birds as possible non-invasive biomarkers of exposure to organophosphorous and carbamate insecticides. *Toxicology Letters* 168: 278-285

Thompson H.M. 1993. Avian serum esterases: species and temporal variations and their possible consequences. *Chemical Biological Interactions* 87: 329- 338

Thompson H.M., Walker C.H., Hardy A.R. 1988. Avian Esterases as Indicators of Exposure to Insecticides-The Factor of Diurnal Variation. *Bulletin of Environmental and Toxicology* 41: 4-11

Thompson H.M., Langton S.D., Hart A.D.M. 1995. Prediction of inter-species differences in the toxicity of organophosphorus pesticides to wildlife-a biochemical approach. *Comparative Biochemistry and Physiology* 111C: 1-12

Turunen S., Chippendale G.M. 1977. Esterase and lipase activity in the midgut of *Diatrea grandiosella*: Digestive functions and distribution. *Insect. Biochem.* 7: 67-71

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* 13: 57-149

Wadkins R.M., Morton C.L., Weeks J.K., Oliver L., Wierdl M., Danks M.K., Potter P.M. 2001. Structural Constraints Affect the Metabolism of 7-Ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin (CPT-11) by Carboxylesterases. *Molecular Pharmacology* 60: 355-362

Walker C.H. 2003. Neurotoxic Pesticides and Behavioral Effects Upon Birds. *Ecotoxicology* 12: 307-316

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

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