UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

TESIS DOCTORAL

Papel de las enzimas B-esterasa en Salud Pública y Animal: monitorización y detoxificación de plaguicidas organofosforados

María Salomé Martínez Morcillo

Doctorado en Salud Pública y Animal

Directores:

Dr. D. Marcos Pérez López

Dr. D. Francisco Soler Rodríguez

Dra. Dña. Mª Prado Míguez Santiyán

"La conformidad del director/es de la tesis consta en el original en papel de esta Tesis Doctoral"

2020

A mi familia

ÍNDICE

Pág.

Resumen **1**

Abstract **1**

Presentación de la Tesis como Compendio de Publicaciones **3**

1. Introducción General **7**

1.1. Compuestos organofosforados **9**

1.1.1. Evolución histórica y aplicaciones 9

1.1.2. Estructura química y propiedades fisicoquímicas 12

1.2. Toxicidad de los plaguicidas organofosforados **13**

1.2.1. Absorción, distribución y excreción 14

1.2.2. Principales mecanismos de acción tóxica 15

1.2.3. Biotransformación 17

1.3. Biomarcadores de efecto: enzimas B-esterasas **19**

1.3.1. Colinesterasas (ChEs) 21

1.3.1.1. Acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) 22

1.3.1.2. Butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8) 24

1.3.2. Carboxilesterasa (CbE, EC 3.1.1.1) 24

1.3.3. Análisis bioquímicos 25

1.3.2.1. Preparación de las muestras 25

1.3.2.2. Caracterización enzimática: parámetros cinéticos 26

1.3.2.3. Determinación de la actividad colinesterasa (AChE y BChE) 27

1.3.2.4. Reactivación de la actividad AChE 28

1.3.2.5. Determinación de la actividad carboxilesterasa 28

1.3.2.6. Estudio de la interacción de las B-esterasas con plaguicidas OFs 29

1.4. Riesgos para la Salud Pública y Animal **30**

1.4.1. Monitorización de la toxicidad 30

1.4.1.1. Aves silvestres 33

1.4.1.2. Peces silvestres 35

1.4.2. Ensayos de Toxicidad 37

1.4.2.1. Ensayos *in vitro*: cultivos celulares 39

1.4.2.2. Ensayos *in vivo*: lombriz de tierra 41

OBJETIVOS 43

Bibliografía 45

2. Reference intervals for B-esterases in gull, *Larus michahellis* (Nauman, 1840) from Northwest Spain: influence of age, gender and tissue 55

2.1. Abstract 58

2.2. Introduction 59

2.3. Material and Methods 60

2.4. Results 62

2.5. Discussion 64

2.6. References 69

3. Comparative study of esterase activities in different tissues of marine fish species *Trachurus trachurus*, *Merluccius merluccius* and *Trisopterus luscus*.....75

3.1. Abstract 78

3.2. Introduction 79

3.3. Material and Methods 81

3.4. Results 84

3.5. Discussion 91

3.6. References 96

4. The organophosphorus pesticide dimethoate decreases cell viability and induces changes in different biochemical parameters of rat pancreatic stellate cells.....105

4.1. Abstract 108

4.2. Introduction 109

4.3. Material and Methods 110

3.7. Conclusions 114

4.4. Results 116

4.5. Discussion 121

4.6. References 125

5. Desarrollo del ensayo de toxicidad estandarizado OECD nº 207 en lombriz de tierra expuesta al pesticida organofosforado Dimetoato 129

5.1. Resumen 132

5.2. Abstract 133

5.3. Introducción 134

5.4. Materiales y Métodos 136

5.5. Resultados 138

5.6. Discusión 141

5.7. Bibliografía 143

6. Conclusiones generales.....147

Agradecimientos 153

Afiliación de los Co-Autores 157

Resumen

La evaluación de los efectos de los plaguicidas organofosforados (OFs) desde el punto de vista toxicológico tiene especial importancia en Salud Pública y Animal. Como biomarcadores de exposición a OFs se distinguen las B-esterasas. A este grupo de enzimas pertenecen la acetilcolinesterasa (AChE), la butirilcolinesterasa (BChE) y la carboxilesterasa (CbE). La inhibición de la actividad AChE es uno de los mecanismos primarios de toxicidad aguda en el tejido nervioso y su papel fisiológico está perfectamente definido en las transmisiones nerviosas. Sin embargo, la contribución de las actividades CbE y BChE en las rutas del metabolismo de los OFs necesitan, todavía, ser objeto de estudios más profundos. El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido evaluar y caracterizar la actividad de las enzimas B-esterasas, asociadas a los mecanismos de toxicidad de los OFs, en diferentes especies animales. Dicho objetivo ha sido abordado mediante: 1) monitorización en poblaciones silvestres de aves y peces, estableciendo datos basales y proponiendo tejidos y especies como potenciales bioindicadores; 2) bioensayos *in vitro* de exposición al OF dimetoato en cultivos primarios de células estrelladas pancreáticas de rata *Wistar*, obteniéndose respuestas dependientes de la concentración en las actividades esterasas; 3) ensayo *in situ* de exposición a dimetoato en lombrices de tierra (*Eisenia foetida*), evaluando los efectos tanto de toxicidad aguda sobre la especie de estudio (según el ensayo OECD, n207) como sobre la actividad de las B-esterasas, habiéndose obtenido como principal resultado que la CL_{50} (concentración letal para la mitad de la población) es la recomendada por el fabricante (CRF) y la NOEC (concentración más alta sin efecto) 10 veces inferior a la CRF.

Palabras clave: B-esterasas, plaguicidas organofosforados, ensayos de toxicidad

Abstract

Toxicological assessment of organophosphorus pesticides (OPs) effects is especially important of Public and Animal Health. B-esterases are biomarkers of exposure to OPs. Enzymes belong to this group are acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE) and carboxylesterase (CbE). The physiological role of AChE is perfectly defined in nerve transmissions, and inhibition of their activity has been identified as one of the primary mechanisms of acute toxicity to the exposition to chemical nerve agents, including OPs pesticides. However, the contribution of CbE and BChE activities are also increasingly approached in metabolic pathways of OPs. The principal aim of the thesis is analyse and characterize the B-esterase activity as biomarker of exposure to OPs pesticides, as well as to study their contribution in detoxification mechanisms of these substances in different animal species. The goal has been achieved by 1) monitoring in wild populations of birds and fish, establishing baseline data and propose tissues and species as bioindicators; 2) exposure *in vitro* bioassays to dimetoate in primary cultures of *Wistar* rat pancreatic stellate cells, which has allowed evidence of induced a concentration-dependent inhibition of B-esterase activities; 3) *in situ* assay of exposure to dimethoate on earthworms (*Eisenia foetida*), evaluation of the acute effect (according OECD test n207) and on the activity of B-esterases, the main result has been that the LC_{50} (lethal concentration for half of the population) was that recommended by the manufacturer (MRC) and, the NOEC (highest concentration without effect) 10 times lower than the MRC.

Key words: B-esterases, organophosphorus pesticides, toxicity tests

Presentación de la Tesis como Compendio de Publicaciones

El uso actual más generalizado de los compuestos organofosforados (OFs) es como plaguicidas en agricultura, principalmente y de forma muy extendida como insecticidas, debido a su acción neurotóxica. Por ello, la evaluación de los efectos de estos plaguicidas desde el punto de vista toxicológico tiene especial importancia en Salud Pública y Animal. Como consecuencia de la exposición a estos compuestos, se han identificado diversos riesgos, entre otros, aquellos relacionados con efectos genotóxicos y neurológicos durante el desarrollo, manifestados por datos epidemiológicos en humanos que indican graves efectos, principalmente en niños. Una vez son introducidos en los ecosistemas, se produce una distribución de los plaguicidas a través de diferentes organismos no diana de la cadena trófica, soliendo ser estas exposiciones a bajas concentraciones y de carácter crónico. Por tanto, el estudio y desarrollo de herramientas de alerta temprana de la presencia de OFs para detectar efectos producidos en diferentes niveles de organización biológica, queda justificado.

Como biomarcadores de exposición a OFs se destacan las B-esterasas. A este grupo de enzimas pertenecen la acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7), la butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8) y la carboxilesterasa (CbE, EC 3.1.1.1). Específicamente, el papel fisiológico de la AChE está perfectamente definido en las transmisiones nerviosas, y la inhibición de dicha actividad enzimática se ha identificado como uno de los mecanismos primarios de toxicidad aguda generado por un gran número de agentes químicos, entre los que se encuentran los OFs. Conjuntamente, la contribución de las otras dos actividades enzimáticas, BChE y CbE, son cada vez más reconocidas y abordadas en las rutas del metabolismo de los OFs, por lo que el estudio de la inhibición de estas actividades enzimáticas en diferentes especies se utiliza como biomarcador de la presencia de OFs. Además, su relevancia es aún mayor, ya que se estudia también su implicación en la hidrólisis de una amplia gama de plaguicidas.

El objetivo principal de la tesis es analizar y caracterizar la actividad B-esterasa en diferentes especies animales y tejidos, como biomarcadores del efecto tóxico de diferentes plaguicidas OFs, así como estudiar los mecanismos a través de los cuales participarían en la detoxificación de estas sustancias. La tesis doctoral se presenta como compendio de publicaciones, para lo cual se ha dividido en seis Capítulos. En el Capítulo 1 se ha desarrollado una introducción general, en la que se contextualiza y justifica la coherencia e importancia unitaria de la tesis, así como los objetivos específicos planteados para la consecución de la misma. Los Capítulos 2 y 3 se han centrado en las publicaciones de monitorización en poblaciones de animales de aves y peces silvestres, respectivamente. Estas especies se pueden utilizar en Salud Pública y Animal como centinelas para detectar riesgos al poder proporcionar una alerta anticipada de exposición a OFs mediante el análisis de biomarcadores como las B-esterasas. Por otro lado, se ha estudiado el efecto de la exposición a dimetoato, un OF ampliamente utilizado, sobre las actividades B-esterasas bajo condiciones controladas de laboratorio, usando cultivos primarios de células de rata como modelo *in vitro* y lombrices de tierra como modelo *in situ* (Capítulos 4 y 5, respectivamente). A través de estos estudios ecotoxicológicos se

pretende generar información que pueda ser usada en las Evaluaciones de Riesgo Ambiental de plaguicidas OFs. Por último, en el Capítulo 6 se presentan las principales conclusiones de la tesis.

En el estudio de monitorización en gaviotas patiamarillas *Larus michahellis* (Capítulo 2 publicado como "Reference intervals for B-esterases in gull, *Larus michahellis* (Nauman, 1840) from Northwest Spain: influence of age, gender and tissue") la actividad de las enzimas B-esterasas ha sido analizada comparando individuos de una misma área de distribución procedentes de campañas de control de población (vinculados a entornos urbanos gallegos) y de un centro de recuperación de fauna silvestre (relacionados principalmente con entornos naturales) evaluando, además del origen, las diferencias observadas atendiendo a los factores género y edad. La actividad AChE, además de en músculo, ha sido cuantificada en el hígado, tejido donde tendría una función diferente a la clásica relacionada con la neurotransmisión. La posible exposición a OFs se ha estimado mediante la reactivación con 2-PAM de la actividad AChE. Entre los resultados obtenidos, la actividad AChE y su mayor reactivación en el hígado, junto con las actividades BChE y CbE en el sistema hepático, podrían relacionarse con el importante papel toxicológico de estas B-esterasas hepáticas en la detoxificación de OFs. La menor actividad ChE en gaviotas muestreadas en ambientes urbanos (campañas de control de población) respecto a las de ambientes naturales (animales remitidos al centro de recuperación de fauna silvestre) se ha podido relacionar con la mayor inhibición específica relacionada a la exposición a OFs en ambientes urbanos. Por tanto, la biomonitorización utilizando estos animales como especies centinela dentro del medio ambiente urbano representa una herramienta útil para investigar el impacto de las actividades humanas derivados del uso de OFs en organismos no diana.

En el estudio en peces (Capítulo 3 publicación "Comparative study of esterase activities in different tissues of marine fish species *Trachurus trachurus*, *Merluccius merluccius* and *Trisopterus luscus*") se han caracterizado y determinado las actividades B-esterasas en muestras de cerebro, músculo e hígado de individuos de tres especies de peces representativas del Atlántico: jureles (*Trachurus trachurus*), merluzas (*Merluccius merluccius*) y fanecas (*Trisopterus luscus*). Para el diagnóstico de la posible inhibición de la actividad AChE por la exposición a OFs, se usó la incubación con 2-PAM. En este estudio se ha evaluado además la sensibilidad de las actividades B-esterasas en cerebro, músculo e hígado, en presencia del plaguicida OFs clorpirifos y de su metabolito clorpirifos-oxon. Los resultados muestran que la actividad AChE es la principal colinesterasa encontrada en todos los tejidos analizados de las tres especies marinas. Dado que el cerebro exhibe una alta actividad de AChE, parece ser el tejido más apropiado para fines de biomonitorización del efecto neurotóxico de OFs. Los altos niveles de actividad CbE en músculo y particularmente en el hígado, además de su alta sensibilidad en las exposiciones *in vitro* a los insecticidas OFs clorpirifos y clorpirifos-oxon de los extractos de estos tejidos, contribuyen eficazmente a combatir el efecto tóxico y, por tanto, serían útiles en el estudio de los procesos de detoxicación de pesticidas OFs.

En el bioensayo *in vitro* con cultivos primarios de células estrelladas pancreáticas de rata *Wistar* (Capítulo 4 publicación titulada "The organophosphorus pesticide dimethoate decreases cell viability and induces changes in different biochemical parameters of rat pancreatic stellate cells"), además de la caracterización y determinación de B-esterasas, tras la exposición al plaguicida OFs dimetoato sobre los cultivos celulares, se ha estudiado la viabilidad celular, la generación de especies reactivas de oxígeno, y la movilización de calcio intracelular. Los resultados relativos a las B-esterasas evidencian la inhibición de las actividades enzimáticas lo que demuestra la existencia de mecanismos de toxicidad del dimetoato en el páncreas. Además, la incubación con dimetoato sobre las preparaciones de los extractos citosólicos sin exposición previa (una vez despegadas, tras el proceso de lisis y centrifugación), las actividades AChE y BChE no se inhiben, mientras que sí lo hace la actividad CbE, lo que demuestra que en las células del páncreas íntegras hay mecanismos de biotransformación que hacen más tóxico al dimetoato en cuanto a su acción tóxica frente a las AChE, y que podrían relacionarse con la movilización de calcio intracelular y la disminución de la viabilidad celular. Por ello, el uso de estos cultivos podría contribuir, entre otros fines, al estudio toxicológico *in vitro* del efecto de OFs en el páncreas.

En el Capítulo 5 de la publicación "Desarrollo del ensayo de toxicidad estandarizado OECD nº 207 en lombriz de tierra expuesta al pesticida organofosforado Dimetoato" se ha realizado un bioensayo *in vivo* con lombriz de tierra de exposición a dimetoato mediante el ensayo estandarizado de toxicidad aguda de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE n207). Los resultados han permitido confirmar que la CL_{50} (concentración letal para la mitad de la población expuesta) se corresponde con la dosis de aplicación recomendada por el fabricante (DRF), siendo la NOEC (concentración más alta sin efecto observable) 10 veces inferior a la DRF. El uso de estos animales en estudios de evaluación del impacto de los OFs en el suelo, así como la contribución de las B-esterasas, pueden tener una gran relevancia toxicológica con posibles aplicaciones en biorremediación enzimática.

En definitiva, la caracterización y determinación de las actividades B-esterasas analizadas, así como los cambios producidos en las diferentes actividades enzimáticas tras exposiciones a los plaguicidas OFs clorpirifos y dimetoato, contribuirán a aportar valores basales y parámetros enzimáticos muy útiles como referencia en futuros estudios de monitorización de la presencia y/o contaminación de OFs en diferentes matrices ambientales.

Los resultados obtenidos han permitido evaluar los efectos de insecticidas OFs en distintos niveles de organización biológica, por lo que se propone un uso racional y responsable de estas sustancias. Además, se concluye que ampliar el uso de las actividades enzimáticas B-esterasas como complemento metodológico analíticamente sencillo, rápido, barato y reproducible, a la cuantificación química sería muy relevante en las Evaluaciones de Riesgo Ambiental y de gran interés toxicológico a bajas dosis y exposiciones crónicas a plaguicidas OFs.

JUNTA DE EXTREMADURA
UNIÓN EUROPEA
JUNTA DE EXTREMADURA
JUNTA DE EXTREMADURA

1. Introducción General

1.1. Compuestos organofosforados

1.1.1. Evolución histórica y aplicaciones

En el año 1820, Lassaigne estudió las reacciones entre el ácido ortofosfórico y el alcohol, siendo el punto de partida del desarrollo de los compuestos organofosforados (OFs). La síntesis del primero de ellos se remontaría a 1854, cuando Philippe de Clermont en Francia sintetizó el tetraetilpirofosfato (TEPP), cuya acción insecticida no fue reconocida hasta décadas después (Gallo y Lawryk, 1991). En 1932, Lange y Krueger sintetizaron dimetil y dietil fosfofluoridatos y describieron, por primera vez, el efecto nocivo de los OFs sobre los seres vivos. Estos autores observaron que la inhalación de los vapores de estos compuestos causaba una persistente sensación de ahogo y visión borrosa, lo que condujo a Schrader y sus colaboradores Ambros, Rüdiger y Van de Linde a investigar, en 1937 en Alemania, la actividad biocida de estos compuestos sintetizando, entre otros, potentes plaguicidas como el paratión (Gupta, 2011). Sin embargo, en la Segunda Guerra Mundial, tras comprobarse sus efectos tóxicos, se priorizó su producción para su uso como armas químicas y surgirían así, entre otros, los potentes agentes nerviosos tabún, somán, sarín y VX (Baños y Bosch, 1992).

El uso de compuestos químicos con fines armamentísticos se intentó restringir a través del acuerdo de la Convención de Ginebra en 1925, ratificado por 149 países en la Conferencia de París de 1989. Sin embargo, no fue hasta 1993 cuando se firmó el primer acuerdo multilateral de desarme del mundo, en la *Convención de Prohibición del Desarrollo, la Producción, el Almacenamiento y el Empleo de Armas Químicas, y sobre su Destrucción* de la Organización de las Naciones Unidas (ONU, 1993) y, a pesar de que entró en vigor en 1997, en las últimas décadas son numerosos los ataques terroristas y los conflictos armados en los que estos compuestos han sido utilizados. Grupos terroristas japoneses utilizaron gas sarín en junio de 1994 en la ciudad de Matsumoto (Yanagisawa y col., 2006) y en marzo de 1995 en el metro de Tokio (Suzuki y col., 1995). En agosto de 2013 en Damasco (Siria) murieron 1400 civiles debido a un ataque con gas sarín (Rosman y col., 2014). En 2017, Kim Jong-Nam, hermano del dictador norcoreano Kim Jong-Un, fue asesinado con el agente nervioso VX en el aeropuerto internacional de Kuala Lumpur, en Malasia. En marzo de 2018, Sergei Skripal y su hija fueron envenenados en Reino Unido con *Novichok*, un agente nervioso OF de cuarta generación desarrollado por la Unión Soviética (Vale y col., 2018). Estos y otros muchos casos similares, por tanto, evidencian el riesgo potencial de ataques con este tipo de productos, siendo una de las razones importantes que justifican la investigación acerca de los mecanismos de toxicidad y los medios de protección frente a los compuestos OFs. No obstante, desde su síntesis, diferentes formulaciones de compuestos OFs han sido utilizadas en diversas aplicaciones industriales, tales como plastificantes y aditivos del petróleo. Sus propiedades como estabilizantes térmicos le proporcionan resistencia al calor y a las presiones extremas por lo que se usan como aditivos en aceites lubricantes industriales y fluidos hidráulicos (Marklund y col., 2003). En medicina humana, debido

a su acción anticolinesterasa, se está desarrollando su aplicación en tratamientos de enfermedades como el glaucoma y el Alzhéimer, en tratamientos de cáncer, osteoporosis y como agentes antivirales (Demkowicz y col., 2016). En medicina veterinaria suelen usarse como antiparasitarios externos (McKellar y Jackson, 2004).

Sin embargo, actualmente, su uso en agricultura es el más extendido, principalmente como insecticidas, debido, precisamente, a su acción neurotóxica, inhibiendo la actividad enzimática acetilcolinesterasa (AChE). El mayor desarrollo de la industria de plaguicidas OFs (junto a los carbamatos-CBs) comenzó a partir de la mitad del siglo XX. Paralelamente, también en esta época, y tras la publicación del libro de Rachel Carson titulado *Primavera Silenciosa* (*Silent Spring*, en su forma original) en 1962, se plantearon por primera vez los posibles impactos y consecuencias, en la salud humana y el medio ambiente, ocasionados por el uso de estos productos como plaguicidas.

No obstante, la necesidad de disminuir el uso de plaguicidas organoclorados (entre otras razones por su elevada persistencia), unido a factores como los bajos costes de producción, alta efectividad por la capacidad sistémica y de contacto de amplio espectro y una menor persistencia en el medio (Satoh y Hosokawa, 2000), han favorecido durante décadas que los OFs sean los agentes insecticidas más extendidos y consumidos a nivel mundial (FAOSTAT, 2019).

En 2017, el consumo total de plaguicidas de uso agrícola fue de 4 millones de toneladas, siendo China (1,76 millones de toneladas) seguida de EE.UU. (407,78 mil toneladas) y Brasil (377,17 mil toneladas), los principales países consumidores a nivel mundial (FAOSTAT, 2019). Estos países están entre los 5 primeros de mayor extensión del mundo, después de Rusia y Canadá, con 9,6, 9,5 y 8,5 millones de km^2, respectivamente. Sin embargo, España, con una superficie de 506030 km^2, ocupa el décimo lugar de la lista de los 10 países con mayor consumo de plaguicidas del mundo, con 60896,4 toneladas de las 476138,2 toneladas consumidas en Europa en 2017 (FAOSTAT, 2019). Aunque, según la FAO, a nivel europeo desde 1990 hasta 2017 hay un descenso de un 2,92% en el consumo de fitosanitarios, en España ha aumentado un 53,93% ocupando el segundo lugar tras Francia. Ambos países, junto con Italia, Alemania y Reino Unido, consumen el 50% del total de Europa (Fig. 1.1).

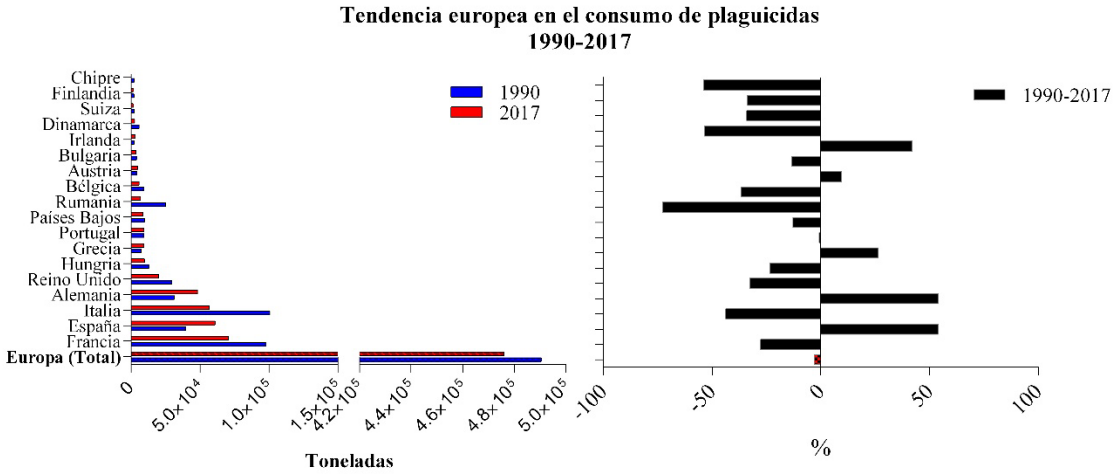


Figura 1.1. Consumo en Europa de plaguicidas (FAOSTAT, 2019).

De hecho, España es el país que comercializa las mayores cantidades de todos los grupos de plaguicidas, representando en el caso de los insecticidas el 36,2% del consumo a nivel europeo (Eurostat, 2017). De acuerdo con la Asociación Europea de Protección de Cultivos y Eurostat, en 2007 los insecticidas más utilizados en la Unión Europea fueron los OFs (Fig. 1.2a) siendo clorpirifos, dimetoato, metomilo, metidation y metil clorpirifos las sustancias activas que más se aplicaron en agricultura (Fig. 1.2b).

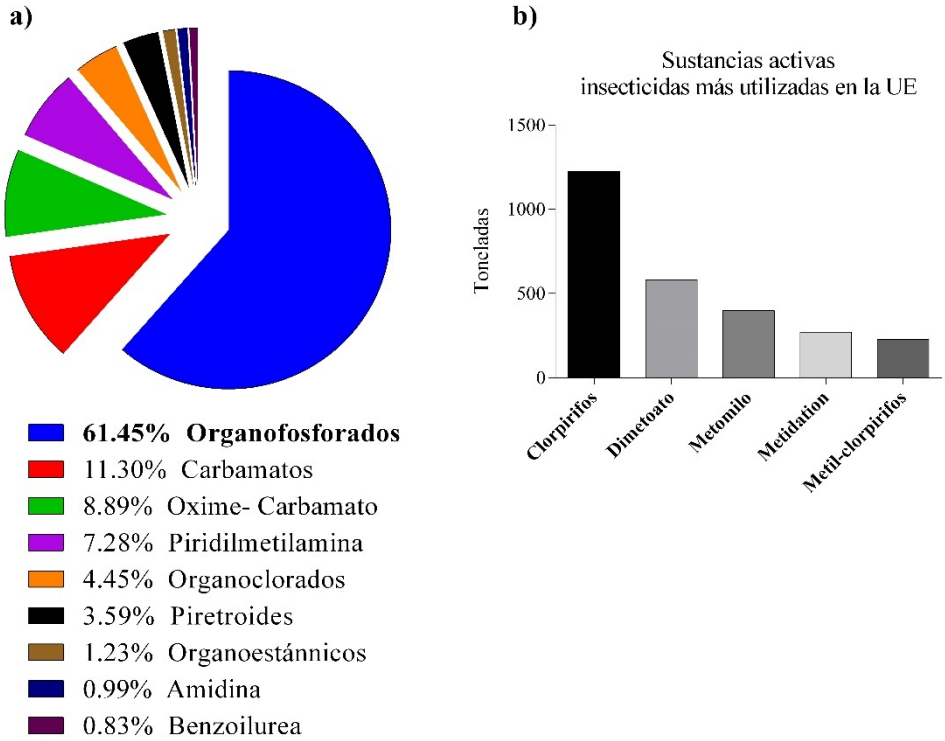


Figura 1.2. Principales grupos de insecticidas (a) y sustancias activas (b) usados en la Unión Europea (Eurostat, 2007).

1.1.2. Estructura química y propiedades fisicoquímicas

Los plaguicidas OFs conforman un amplio grupo de compuestos de síntesis: amidas, ésteres y derivados tiólicos del ácido fosfórico, fosfónico, fosforotioico o fosforoditioico. La estructura química general de estos plaguicidas (Fig. 1.3) se caracteriza por un átomo de fósforo pentavalente unido por un enlace simple a tres sustituyentes orgánicos: dos grupos R, que generalmente son grupos alquilo o arilo simples, que pueden estar unidos ambos directamente al átomo de fósforo (fosfinatos) o a través de un átomo de oxígeno o de azufre (fosfatos o fosforotioatos, respectivamente). El grupo X, denominado "grupo saliente" puede tener diversas estructuras, dando lugar al menos a trece grupos diferentes (Tabla 1.1). Es el sustituyente que se elimina cuando el compuesto fosforila la enzima diana o cuando el compuesto es hidrolizado o se escinde oxidativamente (Chambers y col., 2010; Gupta 2011).

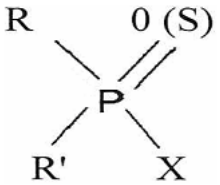


Figura 1.3. Estructura básica de un organofosforado.

Tabla 1.1. Clasificación general de los compuestos organofosforado (Gupta, 2011).

Tipo	Estrutura química	Ejemplos
Fosfatos		Diclorvos
Fosfonatos		Triclorfón
Fosfinatos		Glufosinato
Fosforotioatos (S =)		Clorpirifos Paration Fention
Fosfonotioatos (S =)		Leptofos
Fosforotioatos (S sustituidos)		Demeton-*S*-metil
Fosfonotioatos (S sustituidos)		VX
Fosforoditioatos		Dimetoato Malation
Fosforotritioatos		DEF (tributos)
Fosforamidatos		Fenamifos
Fosforamidotioatos		Metamidofos
Fosforofluoridatos		Disopropil Fosforafluridatos (DFP)
Fosfonofluoridatos		Sarín Somán

A la forma P=O del éster se le denomina forma “oxo” y a veces se incorpora al nombre común: por ejemplo, el paraoxón es la forma oxo del paratión. La forma P=S es más estable, por lo que muchos OFs se sintetizan en esta forma y mediante reacciones metabólicas se transforman en la forma “oxo”, que es potencialmente más tóxica (Eleršek y Filipič, 2011).

Aunque sus propiedades fisicoquímicas pueden variar considerablemente entre unos tipos y otros, las características comunes son alta liposolubilidad, estabilidad a pH neutro (a pH inferiores a 2 y superiores a 9 pierden estabilidad y se hidrolizan rápidamente) y una naturaleza electrofílica que favorece reacciones de sustitución (fosforilaciones y alquilaciones) con reactivos nucleofílicos. Por lo general, son solubles en disolventes orgánicos, especialmente en los aromáticos, como benceno o xileno y, en menor medida en alifáticos como hexano y pentano. El coeficiente de partición octanol/agua es muy alto y la presión de vapor muy baja. Por esta razón, la formulación comercial de estos compuestos se suele presentar concentrada en aceite o emulsionados en xileno, en disolventes miscibles con agua o absorbidos sobre gránulos de material inerte para su aplicación directa (Fest y Schmidt, 2012).

1.2. Toxicidad de los plaguicidas organofosforados

Los riesgos en Salud Pública y Animal relacionados con el uso de plaguicidas OFs tienen carácter interdisciplinar, describiéndose efectos en la salud de las personas y el medio ambiente, incluidos animales, pudiendo comprometer también la seguridad alimentaria.

Las intoxicaciones por OFs son especialmente frecuentes en las zonas agrícolas, donde se usan de forma habitual, aunque debido a su progresivo uso en los hogares o en pequeños jardines, cada vez son más frecuentes las intoxicaciones domésticas. Actualmente, se estima que más de 3 millones de personas en todo el mundo están expuestas a OFs cada año, lo que representa aproximadamente 300000 muertes (Robb y Baker, 2019). Por otro lado, cada vez más se asocia la exposición a estos productos con desordenes psiquiátricos y de comportamiento como la depresión, la ansiedad o trastornos del sueño (Stallones y Beseler, 2016).

Según la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social en España (http://www.aecosan.msssi.gob.es), como estado miembro de la Unión Europea (UE), no pueden autorizarse sustancias activas en la composición de productos fitosanitarios a menos que se haya probado científicamente antes que: 1) no producen efectos perjudiciales en los consumidores, los agricultores ni terceros, 2) no provocan efectos inaceptables en el medio ambiente, y 3) son suficientemente eficaces. Sin embargo, dado que la utilización de los plaguicidas en las cosechas puede conllevar la presencia de residuos, incluidos sus metabolitos y otros productos resultantes, con el fin de asegurar

que la utilización de estas sustancias químicas es segura para los consumidores, se establecen Límites Máximos de Residuos (LMRs).

En el último informe sobre residuos de plaguicidas en alimentos elaborado por la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA, 2019a) en 8247 muestras de diversos alimentos procedentes de los países miembros de la Unión Europea, se detectaron residuos de hasta 230 plaguicidas distintos en ellos. Si bien el 42% de los alimentos contenían residuos por debajo o igual al LMR, 3529 muestras incumplían la legislación superando los límites establecidos. En matrices vegetales los plaguicidas más frecuentemente detectados fueron el organoclorado metoxicloro, algunas piretrinas y los OFs diazinón, clorpirifos y pirimifos metil. Y pese a su prohibición hace más de 40 años (en España en 1977), residuos de DDT (dicloro difenil tricloroetano), calculados como la suma del mismo y sus productos de su degradación [DDD (dicloro difenil dicloroetano) y DDE (dicloro difenil dicloroetileno)], son los que siguen apareciendo en mayor medida en productos de origen animal. Aunque este informe concluía que los niveles suponían un riesgo bajo, recomendaba la monitorización de los alimentos mediante métodos analíticos de tipo multiresiduos.

Debido a que la intensificación de los sistemas productivos promueve el aumento en el consumo de plaguicidas, especialmente a través de su uso en agricultura, el suelo es la matriz ambiental que acumula mayor cantidad (Khöne y col., 2009). Por tanto, es una fuente secundaria de contaminación con efectos a nivel ecológico y agronómico, sobre organismos no diana en ecosistemas terrestres (Arias-Estevez y col., 2008; Juraske y col., 2009). Además, una vez en el suelo, una amplia variedad de procesos fisicoquímicos y biológicos contribuyen al transporte y distribución a otros compartimentos ambientales, y en el caso de los OFs, procesos tales como la escorrentía y lixiviación son las principales fuentes de contaminación de los ecosistemas acuáticos (Gavrilescu, 2005; Arias-Estevez y col., 2008). En este sentido, un estudio reciente sobre la contaminación en ambientes acuáticos concluye que en todos los ríos españoles hay presencia de plaguicidas (PAN, 2018). Entre ellos, destaca la presencia de clorpirifos en 8 de las 10 cuencas analizadas y subraya una alta incidencia de este OF en muestras de agua procedentes de Galicia.

1.2.1. Absorción, distribución y excreción

La liposolubilidad de los OFs facilita la rápida absorción en los sistemas biológicos a través del tracto intestinal y respiratorio, el tejido mucoso y la piel, siendo a través de la inhalación cuando la aparición de los síntomas es más rápida. El paso del xenobiótico a través de la piel, mediante difusión simple, es un proceso lento que se produce tras largas exposiciones y depende tanto de la formulación del compuesto, como de la especie o de la edad de los individuos afectados, además de la temperatura o la presencia de afecciones en la piel (Vale, 1998; Riviere, 2011).

A través de la sangre, los OFs se distribuyen rápidamente por todos los órganos y tejidos, acumulándose en el tejido adiposo, hígado, riñones, músculo y glándulas salivares

y debido a su naturaleza lipofílica pueden permanecer en tejidos grasos y tejido nervioso lo que ralentiza la eliminación en los mismos, que ocurre a través de la orina y en menor medida, por heces y aire expirado (Vale, 1998). De hecho, investigaciones recientes apuntan la posibilidad de que los OFs sean más persistentes en los organismos de lo que se había admitido hasta el momento. Se afirmaba que la mayor parte de sus residuos eran eliminados transcurridas unas 48 horas desde la exposición, excepto en aquellos tejidos de mayor liposolubilidad. Sin embargo, algunos estudios han aportado datos sobre la permanencia de éstos en el organismo durante días y/o semanas (Mangas y col., 2016).

En el medio ambiente, la degradación depende de otros factores, tales como la microbiota, el pH, la temperatura y la disponibilidad de luz, aunque su uso en cultivos y animales se considera relativamente seguro debido a sus velocidades de degradación estimadas como altas (Sparling, 2016). Debido a los bajos coeficientes de partición octanol/agua y, a que su solubilidad en agua varía entre moderada y alta (10-10000 mg/L), la hidrólisis suele ser la principal vía de degradación, con un tiempo de vida medio que suele oscilar desde 1,3 días (disulfotón), a entre 30 y 156 días (dimetoato) y hasta un máximo de 230 días (clorpirifos). Tanta variabilidad depende de las condiciones favorables en el agua tanto de temperatura como de pH (25ºC y 7, respectivamente), si bien, en algunos compartimentos ambientales, en determinadas situaciones climáticas y bajo otras condiciones fisicoquímicas, la persistencia de los OFs puede ser muy alta, con vidas medias estimadas en el agua de incluso varios años (Ragnarsdottir, 2000). En el suelo también hay una amplia variabilidad de tiempos de vida media dependiendo del compuesto y de condiciones tales como las tasas de precipitación y de la carga microbiana edáfica (aeróbica o anaeróbica). Como ejemplo está el caso del ya prohibido metamidofos, que tiene una vida media de tan sólo 1 día, mientras que el dimetoato y el clorpirifos, ambos muy empleados actualmente, tienen una vida media de entre 4-22 y 60-120 días, respectivamente (Solomon y col., 2014; Zaranyika y Mlilo, 2014; Sparling, 2016).

1.2.2. Principales mecanismos de acción tóxica

En todos los animales el mecanismo bioquímico diana (y, por tanto, donde se asocian los efectos tóxicos más característicos) de los plaguicidas OFs, implica principalmente la inhibición de la actividad de la enzima AChE, mediante su fosforilación. Esta enzima pertenece al grupo de las esterasas, que son enzimas hidrolasas (EC 3.1.: clasificación de la Unión Internacional de Bioquímica, IUB) que catalizan reacciones de hidrólisis de ésteres. Todas ellas son inhibidas en presencia de OFs. El mecanismo de toxicidad y las distintas reacciones en la interacción entre los OFs y las enzimas esterasas, representadas en la Figura 1.4 son: formación del complejo enzimático *Michaeliano* (1), fosforilación de la enzima (2), reactivación (3) y/o envejecimiento de la enzima (4).

Desde el punto de vista toxicológico, las esterasas se clasifican en función a su reactividad a plaguicidas OFs (Aldridge, 1953) en:

- A-esterasas: hidrolizan OFs y los pueden utilizar como sustrato, biotransformándolos (liberación de un grupo saliente y un ácido).
- B-esterasas: son inhibidas por OFs y los usan como sustrato (complejo enzima-sustrato irreversible).
- C-esterasas: no interaccionan con OFs.

A las esterasas tipo B pertenecen la acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7), la butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8) y la carboxilesterasa (CbE, EC 3.1.1.1). En presencia de OFs, el grupo -OH de la serina interactúa formando un enlace P-O que no es hidrolizado por el agua, de forma que el enlace estequiométrico provoca una inhibición irreversible (al contrario de lo que ocurre con los plaguicidas CBs) de la actividad de estas enzimas, por lo que la reactivación espontánea de la enzima (reacción 3, Fig. 1.4) no se produce.

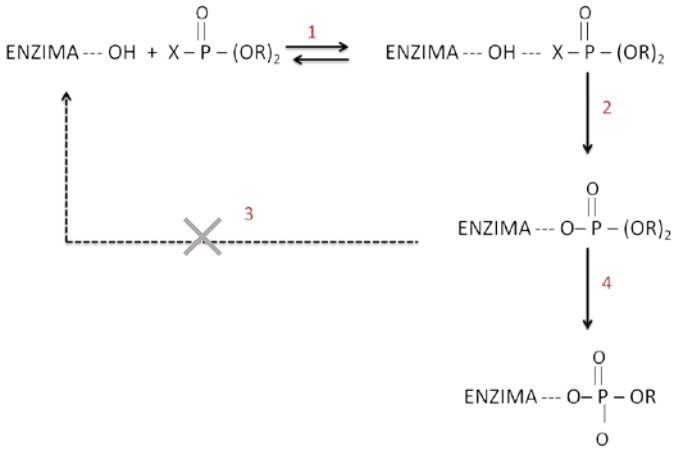


Figura 1.4. Mecanismos de reacción de los OFs y enzimas esterasas: 1 formación del complejo enzimático *Michaeliano;* 2 fosforilación de la enzima; 3 reactivación; 4 envejecimiento de la enzima (Rubio, 2015).

Los efectos tóxicos más característicos de los OFs están relacionados con este enlace covalente OF-AChE, que dificulta la participación de la enzima en las transmisiones nerviosas y cuya inhibición es uno de los mecanismos primarios de toxicidad aguda en el tejido nervioso. La actividad catalizadora de la enzima en la hidrólisis de la acetilcolina (ACh) permite que el ácido acético liberado pase a la sangre y la colina sea recuperada por las neuronas para la síntesis de nuevas moléculas de este neurotransmisor. La inhibición de la AChE provoca la acumulación del neurotransmisor, induciendo respuestas en los receptores muscarínicos y nicotínicos, y en el sistema nervioso central (Sparling, 2016).

La presencia de niveles de inhibición de la enzima por encima del 70% pueden provocar una acumulación de la ACh en las hendiduras sinápticas de uniones neuromusculares, lo que en casos severos causa bloqueo neuromuscular e insuficiencia respiratoria. La acumulación masiva del neurotransmisor ACh en la región sináptica y la sobreestimulación de los receptores postsináptico de las células, provocada por

exposiciones agudas a OFs, dan lugar al conocido como síndrome colinérgico, cuya sintomatología se caracteriza por un cuadro con lagrimeo, miosis, diarrea, emesis, broncoespasmo, hipotermia, ansiedad, ataxia, abolición de reflejos, cefaleas, mioclonías y debilidad muscular, llegando incluso a la parálisis y depresión respiratoria, lo que en conjunto configuran el cuadro clínico de la intoxicación aguda que, sin tratamiento, puede derivar en estados de coma y muerte (Thompson y Richardson, 2004).

Además, los OFs causan otros trastornos neurotóxicos, como es el síndrome intermedio, la polineuropatía retardada y el trastorno neuropsiquiátrico inducido por exposición crónica. En un estudio reciente de Jokanovic (2018), se comparó el síndrome colinérgico, que causa millones de casos de intoxicación y más del 15% de muertes al año, con los otros trastornos que involucran un número mucho menor de pacientes. Justamente este estudio abordó el posible vínculo de exposición a pesticidas OFs con enfermedades neurodegenerativas, como la demencia, trastornos por déficit de atención e hiperactividad, Alzhéimer o Parkinson.

Por tanto, es fundamental la investigación de los posibles efectos neurotóxicos que aparecen después de exposiciones tanto agudas como crónicas a los OFs, poniendo especial énfasis en el conocimiento de los mecanismos toxicológicos y biológicos que determinan la presencia y distribución de estos plaguicidas en los distintos compartimentos ambientales y en diferentes niveles de organización biológica.

1.2.3. Biotransformación

Las hidrolasas A y B-esterasas (AChE, BChE, CbE), junto a las enzimas que conforman el citocromo P450, las oxidasas de función mixta (MFOs) y las glutatión-S-transferasas, forman parte de las principales enzimas que participan en los procesos de biotransformación de los compuestos OFs. Las reacciones implicadas en estos procesos pueden dividirse en reacciones de activación (cuyos productos son más solubles en agua y más reactivos) y reacciones de detoxificación (que generan productos que serán menos tóxicos) (Jokanovic, 2001).

Existen algunos plaguicidas OFs, como el diazinón o el profenofos, que son directamente tóxicos y no necesitan ningún proceso de transformación en la estructura química para favorecer su efectividad. Sin embargo, tras reacciones de activación, algunos OFs pueden experimentar modificaciones en la estructura química que pueden aumentar su toxicidad. En estos mecanismos están implicadas principalmente reacciones de oxidación e hidroxilación. Esta conversión puede darse en la naturaleza, pero una vez incorporados a los tejidos, algunas enzimas relacionadas con el citocromo P450 catalizan estas reacciones. Esta transformación provoca que la afinidad en la unión con la AChE sea mayor, y por eso el efecto mucho más tóxico (Sparling, 2016).

La forma P=O (“oxo”) es biológicamente más activa, en cuanto a su efecto sobre la AChE, que la forma P=S, antes de la transformación (Fig. 1.5a). Entre los pesticidas que se convierten a la forma “oxo” y aumentan su efectividad, están los fosfotionatos:

paratión, fonofós y clorpirifos. En la Figura 1.5b se puede observar que la DL_{50} en ratas después de la activación a las formas oxo del paratión, malatión y fonofós, es respectivamente 10, 15 y 5 veces más baja.

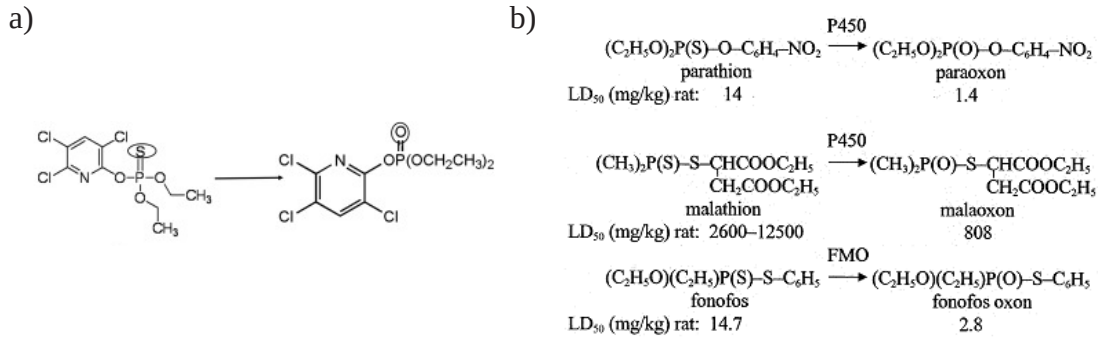


Figura 1.5. Activación de plaguicidas OFs. a) Fórmula estructural que muestra la transformación a la forma oxon (Mangas y col., 2016). b) Activación metabólica del paratión, malatión y fonofós a través de reacción de oxidación (P450: citocromo P450, FMO: oxidasas de función mixta; DL_{50}: dosis letal media) (Jokanovic, 2001).

En el caso del clorpirifos, los efectos tóxicos de su metabolito en forma "oxo" (clorpirifos-oxon), pueden ser hasta 1000 veces más potentes (David y col., 2008). Además, se ha demostrado que las formas "oxo" tienen una alta afinidad por otro tipo de B-esterasas como la BChE, y especialmente por las CbEs. La mayor afinidad por la unión a las CbEs se ha descrito como uno de los mecanismos de neuroprotección, ya que la unión del OF al sitio activo de esta enzima impediría la inhibición de la actividad AChE protegiendo del efecto tóxico sobre sus funciones vitales (Wheelock y col., 2008).

En las reacciones de detoxificación o desactivación, los OFs pueden convertirse en compuestos más hidrosolubles y ser excretados. En este proceso, entre otras, participan las enzimas CbEs, que catalizan la ruptura del enlace éster del fósforo, produciendo una carga negativa en la molécula. La unión del OF con el centro activo de las enzimas CbEs actúa como un mecanismo de detoxificación (Fig. 1.6) y aunque su papel fisiológico no está perfectamente definido en las funciones vitales, participa en la adquisición de resistencias, ya que impide que el OF sea activo como agente anticolinesterásico (Vilanova y Sogorb, 1999; Sogorb y Vilanova, 2002).

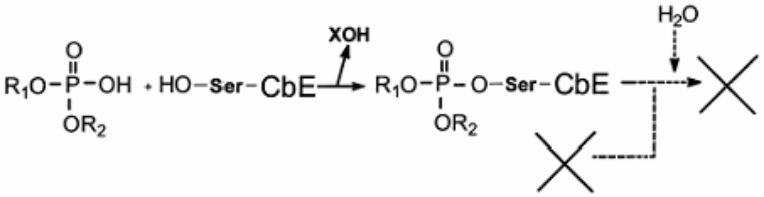


Figura 1.6. Mecanismo de detoxificación de OF mediante la fosforilación del residuo de serina situado en el centro activo de la CbE produciéndose una inhibición irreversible (×) de la enzima (Sogorb y Vilanova, 2002).

En el siguiente esquema (Fig. 1.7) se representa, de forma sintetizada, la funcion de las B-esterasas en los procesos de toxicidad y biotransformación de plaguicidas OFs. Las reacciones de biotransformación de los OFs pueden causar dos tipos de consecuencias: (i) activación tóxica, cuando el producto de la reacción es más soluble en agua y más reactivo; (ii) reacción de desintoxicación, cuando los productos son menos tóxicos. Como se ha comentado, la mayoría de los insecticidas están formulados en forma de fosforotionatos porque son más estables que las formas de oxon correspondientes. Una vez que el tiofosfato (con capacidad reducida para fosforilar esterasas) ha sido absorbido por el organismo, se bioactiva por oxidación desulfurativa y se convierte en la forma "oxo" correspondiente, con una alta capacidad de fosforilar esterasas (bioactivación tóxica) (Sogorb y col., 2014; Mangas y col., 2016). La mayor parte de estas reacciones de activación metabólica y de desintoxicación ocurren en el hígado en vertebrados.

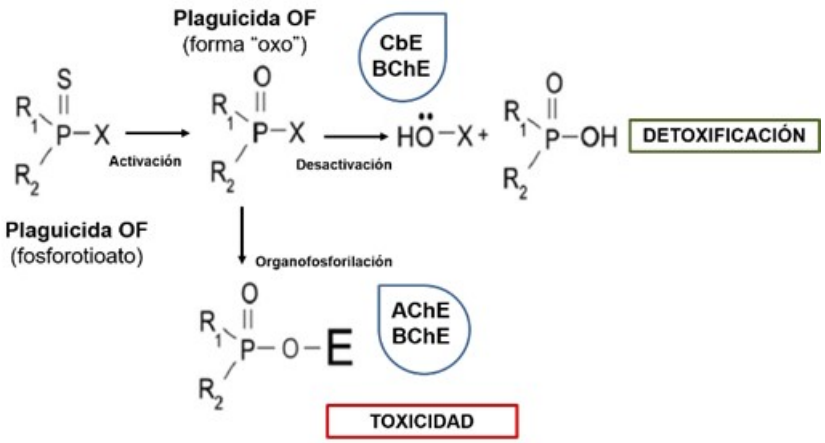


Figura 1.7. Esquema de la participación de las B-esterasas (CbE, BChE y AChE) en las rutas de toxicidad y detoxificación de plaguicidas OFs (modificado de Mangas y col., 2016).

1.3. Biomarcadores de efecto: enzimas B-esterasas

Debido a su papel en los mecanismos de toxicidad y detoxificación de plaguicidas, las B-esterasas tienen especial interés y un amplio uso como biomarcadores[1] del efecto de plaguicidas OFs y, por tanto, en la evaluación de los riesgos asociados a la exposición a este tipo de plaguicidas.

La importancia del uso de biomarcadores en Toxicología radica en las limitaciones de los análisis químicos para evaluar la distribución de los contaminantes en diversas matrices. Por un lado, los análisis químicos son difícilmente extrapolables a criterios

[1] El concepto "*biomarcador*" hace referencia a cualquier cambio biológico cuantificable que se manifiesta a nivel sub-individuo (molecular, bioquímico, fisiológico, histológico) o en el organismo como indicador de la exposición y/o efecto a uno o más contaminantes químicos o físicos (Huggett y col., 2018).

toxicológicos, dado que no permiten determinar los efectos biológicos y, por tanto, dificultan conocer el grado de exposición y susceptibilidad de ciertas especies. Además, hay determinadas sustancias que son dificiles de determinar o están en cantidades dificilmente cuantificables. Por otro lado, para estos análisis es necesario saber el producto que se pretende analizar, lo que dificulta la evaluación real, dada la alta diversidad de productos que pueden resultar tóxicos y estar presentes en los ecosistemas a concentraciones relevantes (Huggett, 2018). Ante estas limitaciones, el empleo de biomarcadores permite evaluar el impacto de un tóxico sobre los organismos de un ecosistema. Y más especificamente, la identificación y determinación de biomarcadores fuertemente específicos, como es el caso de las B-esterasas que detectan exposición a sustancias químicas concretas (Chambers y col., 2002). Por tanto, la caracterización y establecimiento de rangos de referencia en organismos modelo, podría ser una herramienta complementaria muy útil a considerar para su implementación en las Evaluaciones de Riesgo Ambiental causadas por sustancias contaminantes como los OFs, que son consideradas en la gestion, manejo y revisión de autorizaciones, por las autoridades competentes, de este tipo de productos.

Aunque la principal acción tóxica es sobre la AChE, la determinación de la actividad de las BChE y CbE, que forman parte del mismo grupo de enzimas, podría contribuir a predecir la sensibilidad de diferentes especies a través de la determinación de los puntos finales bioquímicos (índice de la tolerancia a plaguicidas), y de los efectos a nivel individual (identificando las especies susceptibles) sin olvidar, en todo ello, la importancia de su contribución en la biotransformación mediante las rutas de metabolismo y detoxificación de insecticidas.

Realizando una búsqueda de resultados publicados procedentes de investigaciones científicas, usando para ello la base de datos del buscador *Scopus* (www.scopus.com), se observa que en la última década existe un número creciente tanto de estudios sobre la presencia de plaguicidas en el medio ambiente (Fig. 1.8a) como acerca de la monitorización de estos empleando las enzimas B-esterasas (Fig. 1.8b). En la búsqueda se han filtrado los trabajos diferenciando entre ecosistemas acuáticos (gráficos a la izquierda) y terrestres (gráficos a la derecha).

Los principales ámbitos de estudio que las abordan son las ciencias ambientales, agrícolas, biológicas, químicas, bioquímicas y médico-veterinarias. Entre los 10 países que mayor desarrollo científico ofrecen en este sentido están China, Estados Unidos, India y Brasil, aunque España, junto a Italia, Francia, Alemania y Reino Unido, están investigando cada vez más sobre estos aspectos (Fig. 1.8). Figuran aquí los países que, como se ha comentado en apartados anteriores, también tienen mayores consumos en la aplicación de plaguicidas (Fig. 1.1). Por tanto, hay una preocupación real y creciente en el desarrollo del conocimiento toxicológico de los mismos.

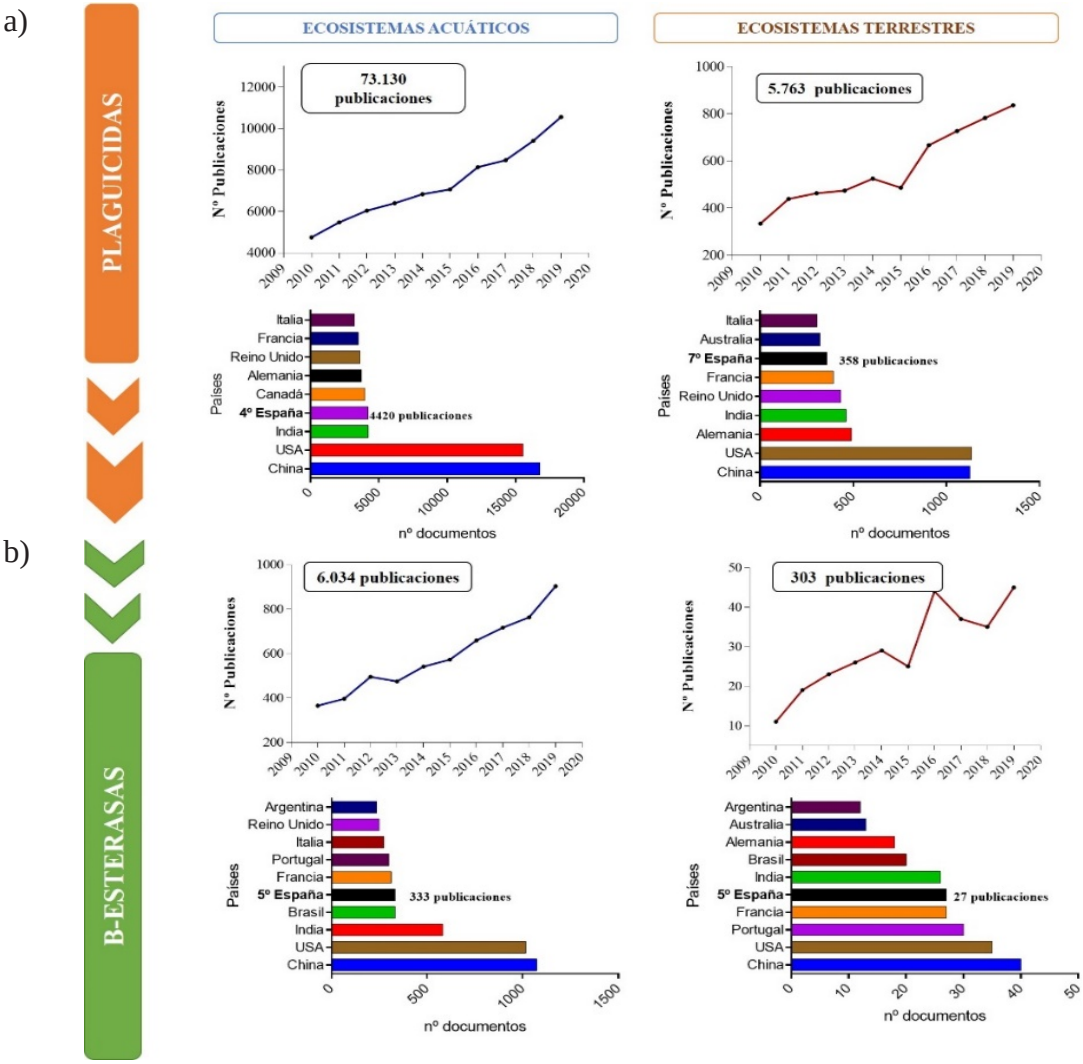


Figura 1.8. Número de publicaciones y países con mayor desarrollo científico en ecosistemas terrestres y acuáticos entre 2009 y 2020. Los gráficos muestran a) el número de trabajos que consideran a los plaguicidas y los b) los que usan para su monitorización las enzimas B-esterasas. Gráficos elaborados con datos de Scopus, en enero de 2020.

1.3.1. Colinesterasas (ChEs)

El grupo de las colinesterasas (ChEs) incluye enzimas altamente polimórficas que, dependiendo de la especie y el tejido, se expresan como AChE (Fig. 1.9a) o BChE (Fig. 1.9b). Ambas enzimas son codificadas por genes distintos y en vertebrados superiores, peces, insectos y nemátodos pueden existir múltiples genes que las codifican (Taylor y Radic, 1994). En todos los grupos animales se han estudiado enzimas capaces de hidrolizar la ACh (Myer y col., 1988), observándose que determinados organismos poseen una sola ChE con una preferencia de sustrato intermedia entre la AChE y la BChE (Sánchez-Hernández, 2007).

En caso de intoxicación por OFs uno de los antídotos utilizados en la terapia son las oximas. Su principal función es la reactivación de la actividad AChE mediante la eliminación del grupo fosforilo. La pralidoxima es la oxima más utilizada a nivel mundial y está disponible en cuatro presentaciones: cloruro de pralidoxima (2-PAM; utilizado a

nivel mundial), mesilato de pralidoxima (P2S; utilizado en Reino Unido), metilsulfato de pralidoxima y yoduro de pralidoxima (utilizados en Japón, India y Australia) (Buckley y col., 2011). En Ecotoxicología, esta reactivación mediante 2-PAM es una técnica muy valiosa, particularmente cuando se trabaja con animales salvajes, debido a la gran variabilidad existente entre animales y especies, lo que dificulta la identificación de la exposición individual, ya que no se suelen tener animales control o datos de referencia perfectamente establecidos. Por esta razón, la determinación de la actividad AChE antes y después de la incubación con 2-PAM permite evaluar el grado de inhibición de la enzima y, con los límites establecidos, diagnosticar los efectos de una exposición (letal o subletal) a OFs (Stanley, 1993).

a) b)

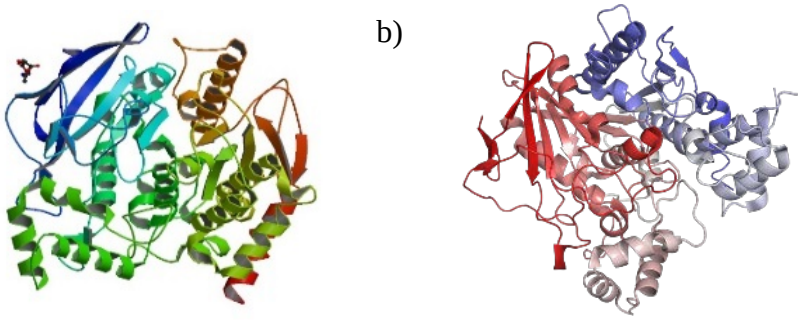


Figura 1.9. Diagramas de cintas tridimensional: a) AChE de *Torpedo californica;* b) BChE humana. Fuente: Protein Data Bank (https://www.rcsb.org/).

1.3.1.1. Acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7)

Además de su principal función en las transmisiones nerviosas ya descrita, se le atribuye la participación en la proliferación y diferenciación de las células nerviosas (Brimijoin, 2005) y en el desarrollo y mantenimiento de la retina (Layer y col., 2005). Concretamente en el campo de la Toxicología, durante décadas el análisis de su inhibición ha sido ampliamente reconocido y utilizado en el diagnóstico clínico de exposición a pesticidas anticolinesterásicos como los OFs y CBs (ver Panel 1).

Sin embargo, debido a la selectividad de los OFs en cuanto a las diferencias en la especificidad en las enzimas diana (AChE) y la capacidad de detoxificación entre especies (más rápida, por ejemplo, en mamíferos que en insectos), sigue siendo un desafío el establecimiento de la relación entre el grado de inhibición a nivel cerebral y la mortalidad. Sin embargo, se dispone ya de algunos datos concluyentes y, por ejemplo, a través de diferentes estudios se ha establecido que la inhibición por encima del 20% en aves indica exposición, mientras que niveles por encima del 50% serían causa de mortalidad por OFs. De forma similar, en reptiles, el 40% de inhibición supone la exposición, y sobrepasar el 50% supondría la mortalidad. En mamíferos hasta un 50% sugiere daños subletales y la mortalidad se asociaría a niveles por encima del 80%. Sin embargo, en invertebrados, debido a una alta variabilidad de respuestas, no se han podido aún establecer estos límites (Sánchez-Hernández, 2007).

Panel 1. Laboratorio de **Toxicología Clínica**

Área de Toxicología.
Facultad de Veterinaria de Cáceres
Universidad de Extremadura.
https://www.eweb.unex.es/eweb/toxicologia/

A través del **Servicio de Toxicología** existente en el Hospital Clínico de la Facultad de Veterinaria en Cáceres, en el laboratorio de la Unidad de Toxicología (Fig. 1.10), se reciben aquellos casos sospechosos de intoxicación en animales domésticos. Tras las pertinentes analíticas, se emite el correspondiente informe, que es referido a los clientes (exclusivamente veterinarios) que lo hayan solicitado. De igual manera, mediante un Convenio de Colaboración firmado con la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Extremadura, se reciben casos relacionados con fauna salvaje, para identificar procesos toxicológicos que afecten al Medio Ambiente.

Entre las distintas determinaciones que se realizan de forma rutinaria, cuando se reciben muestras de animales con signos de intoxicación, el personal de este departamento lleva más de 20 años determinando la inhibición de la actividad AChE en el diagnóstico de la posible exposición o envenenamiento por insecticidas OFs y CBs. El número de muestras remitidas anualmente con signos de intoxicación ronda las 150. Los casos con diagnóstico positivo de envenenamiento, el 40% son mamíferos y el 60% aves, lo que coincide con otros trabajos publicados (Soler y col., 2006). Los animales más afectados son: perro, zorro, milano real y lechuza, así como ejemplares de especies tan emblemáticos como buitre leonado, águila real, alimoche y buitre negro. En los cebos remitidos con sospechas de contener veneno, el 80% resultan positivos y, entre las 5 sustancias más usadas se encuentra el plaguicida OF clorpirifos. De forma genérica, los plaguicidas OFs, son causa de más del 10% de los casos de envenenamiento, principalmente en aves.

Cabe destacar que pese a la prohibición de algunas sustancias como el aldicarb (prohibido en la Unión Europea desde 2003) o el carbofurano (prohibido desde 2007), se siguen usando como venenos, lo que indica que existen remanentes de estas sustancias que no han sido retirados a pesar de estar prohibidas por la legislación, o por un comercio clandestino que abastece al posible delincuente y que, al menos en el área de influencia de este Servicio, se concentra en zonas eminentemente agrícolas y/o ganaderas, precisamente por la facilidad de acceso a este tipo de productos .

Figura 1.10. Laboratorio en la Unidad de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Cáceres.

1.3.1.2. Butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8)

Esta enzima es también conocida como colinesterasa plasmática o pseudocolinesterasa. Se encuentra en sangre y tejidos de muchos organismos del reino animal, aunque es particularmente abundante en la sangre de vertebrados (Sánchez-Hernández, 2007). En mamíferos es sintetizada en el hígado, por lo que la disfunción hepática cursa con niveles bajos de actividad BChE.

Aunque se le atribuyen una diversidad de funciones en el organismo que continúan siendo discutidas, existen evidencias de su participación, junto a la AChE, en la proliferación y diferenciación celular (Brimijoin, 2005). En la sangre, su actividad se ha relacionado con la regulación de la hormona de crecimiento grelina (Müller y col., 2015). A nivel del SNC, en condiciones de inhibición o ausencia de la actividad AChE, puede hidrolizar también la ACh (Li y col., 2000; Soreq y Seidman, 2001). La expresión anómala de ambas enzimas ChE se ha relacionado con mecanismos de generación de tumores, siendo, los valores cuantificables de estas enzimas, diferentes en función del tipo de cáncer (Vidal, 2005), habiéndose relacionado, además, con exposiciones a OFs (Eaton y col., 2008). Hidroliza algunos ésteres de colina, entre los que se encuentran algunos medicamentos y drogas como cocaína, heroína y aspirina (Anderson y col., 2019; Pohanka, 2019). Además, su actividad es inhibida en presencia de OFs, lo que como se ha comentado, puede ser considerado un mecanismo de defensa ante los efectos neurotóxicos.

1.3.2. Carboxilesterasa (CbE, EC 3.1.1.1)

Las CbEs (Fig. 1.11) son un grupo de enzimas presentes en una amplia gama de tejidos, tanto en vertebrados como en invertebrados, que pueden hidrolizar una gran variedad de ésteres, aunque cada enzima tiene una especificidad de sustrato característica hacia los ésteres endógenos y xenobióticos (Thompson, 1999). Las interacciones en los procesos de desactivación de plaguicidas OFs que se han comentado anteriormente, generan una serie de implicaciones toxicológicas e incluso biotecnológicas. Así, los niveles de actividad de las CbEs, los tejidos donde se expresa esta enzima y la abundancia de isoenzimas parecen contribuir a la diferente sensibilidad de los organismos a los insecticidas OFs y, por tanto, a la aparición de resistencias (Sánchez-Hernández, 2007).

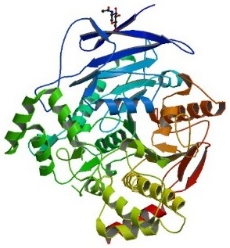


Figura 1.11. Diagrama de cintas tridimensional de CbE hepática humana. Fuente: Protein Data Bank (https://www.rcsb.org/).

Generan un creciente interés en la monitorización de plaguicidas OFs (Wheelock y Nakagawa, 2010), además de como biomarcadores del efecto de pesticidas en organismos no diana, la principal característica de la actividad CbEs en Toxicología es su participación en los mecanismos bioquímicos de detoxificación. Se ha demostrado mayor sensibilidad de las CbEs a la acción inhibitoria de los insecticidas OFs, en su forma más tóxica "oxo", lo que contribuye a que estas esterasas adquieran un cierto protagonismo en el seguimiento ambiental de la exposición de los organismos vivos a este grupo de insecticidas (Hodkinson y Jackson, 2005). Por todo lo comentado, han llegado incluso a ser aplicadas en la biorremediación de suelos contaminados por plaguicidas (Sutherland y col., 2004). En esta última aplicación, los microorganismos han sido la principal fuente de CbEs para el tratamiento bioquímico de los residuos de pesticidas en el suelo. Sin embargo, en investigaciones recientes se ha demostrado la capacidad de algunos organismos del suelo, como la lombriz de tierra, de enriquecer el suelo con este tipo de actividad CbE, con capacidad de neutralizar, en suelos agrícolas contaminados con OFs, su acción toxica sobre la actividad AChE (Sánchez-Hernández, 2019; Sánchez-Hernández y col., 2019).

1.3.3. Análisis bioquímicos

A continuación, se presentan los principales análisis bioquímicos relacionados con las actividades B-esterasas y su interacción con plaguicidas OFs realizados en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Veterinaria en Cáceres. En cada uno de los trabajos de la tesis publicados, estos análisis son desarrollados con mayor minuciosidad, en función de los objetivos de cada uno y teniendo en cuenta el tipo diferente de muestra analizada. Cabe destacar que este tipo de ensayos conlleva siempre un periodo previo de puesta a punto de los protocolos y diseños experimentales, que incluye desde la obtención y mantenimiento de las muestras, hasta la evaluación de todos los resultados analíticos.

Los resultados de las actividades enzimáticas se expresan en mili-unidades (mU) de actividad enzimática por mg de proteína total (media ± DE). Una mili-unidad (mU) de actividad enzimática se define como la cantidad de producto (en nmol) generada por minuto en la reacción enzimática. La concentración de proteína total se determina en los sobrenadantes siguiendo el método propuesto por Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

1.3.2.1. Preparación de las muestras

Aunque existe una gran diversidad de muestras con actividad B-esterasa que necesitan una preparación específica (Fig. 1.12), en el presente trabajo, de forma general, las muestras se mantuvieron siempre a -80ºC hasta la determinación enzimática. En el caso de tejidos biológicos, una vez diseccionadas las muestras de interés, se realizaba una homogenización utilizando un homogeneizador Ultra-Turra T25, en el cual la proporción (peso/volumen) con una solución reguladora o tampón, dependería del tipo de muestra,

estableciéndose en la puesta a punto preliminar de cada uno de los ensayos. Posteriormente se realizaría un centrifugado (9000-12000 x g, 20 minutos, 4ºC). El sobrenadante sería a continuación fraccionado en múltiples alícuotas y conservado a una temperatura de -80ºC hasta ser utilizado para los ensayos de caracterización y determinación enzimáticas, así como para la obtención de las cinéticas de inhibición e hidrólisis con los insecticidas.

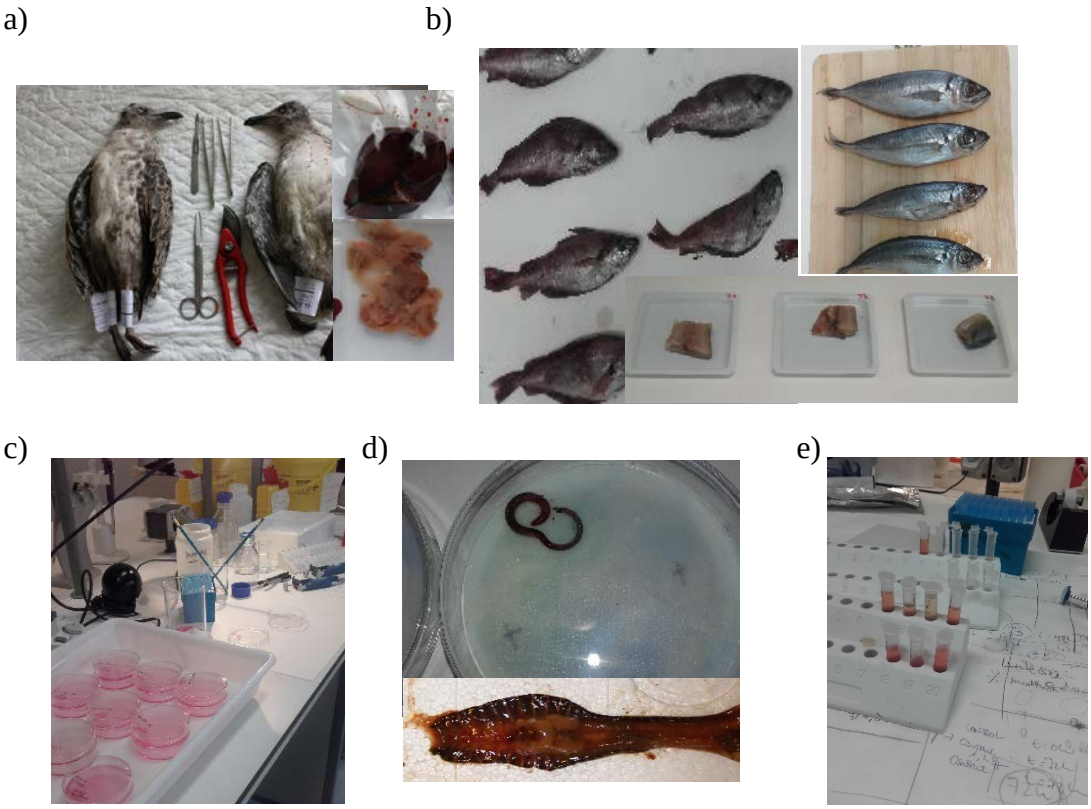


Figura 1.12. Diferentes tipos de muestras preparadas para la determinación de B-esterasas: a) hígado y músculo de gaviota; b) peces y muestra de músculo; c) cultivos celulares; d) lombriz de tierra y disección; e) alícuotas de extractos citosólicos después de homogeneizar y centrifugar.

1.3.2.2. Caracterización enzimática: parámetros cinéticos

Distinguir y caracterizar enzimáticamente ChEs es una práctica habitual previa a la determinación de la actividad enzimática, cuyos parámetros variarán, sobre todo, en función de la especie y del tejido o tipo de muestra analizados. La cinética enzimática se estudia para determinar la concentración de sustrato óptima para la posterior determinación de la actividad.

El efecto de la concentración del sustrato ([S]) sobre la velocidad de la reacción (*v*) se determina para cada tipo diferente de muestra que se necesite analizar, manteniendo la cantidad de enzima constante. Las esterasas siguen el modelo enzimático conocido como

Michaelis-Menten[2], que se ajusta a la expresión: Y= V_{max}× X / (K*m* + X), en el que a través de la representación de *v* (Y=velocidad de formación de sustrato-enzima) frente a *[S]* (X=concentración de sustrato) se obtiene una gráfica como la que muestra la Figura 1.13. Se caracteriza porque cuando [S] es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato y, por tanto, la reacción es de primer orden. A altas [S], la enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de [S]. En este punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima (V_{max}).

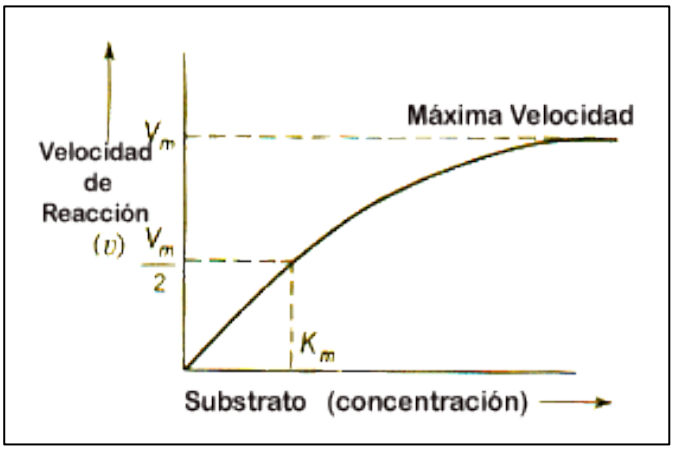


Figura 1.13. Modelo teórico de representación de la ecuación cinética enzimática de Michaelis-Menten.

Mediante este análisis, además de la V_{max}, se determina el parámetro cinético K_m, que es concentración de sustrato para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima y que da idea de la afinidad de la enzima por el sustrato (a menor valor de K_m, mayor afinidad de la enzima por el sustrato, y a mayor K_m, menor afinidad).

1.3.2.3. Determinación de la actividad colinesterasa (AChE y BChE)

En el análisis bioquímico llevado a cabo para diferenciar entre colinesterasas se aprovecha la especificidad tanto de sustratos (acetiltiocolina -actividad AChE- o butiriltiocolina -actividad BChE-) como de inhibidores genéricos (eserina, que inhibe la actividad ChE total) y selectivos (BW284c51 que inhibe la AChE o iso-OMPA que inhibe la BChE).

El método espectrofotométrico utilizado para la determinación de las actividades AChE y BChE es el descrito por Ellman (1961) adaptado a microplacas de 96 pocillos por Wheelock y col. (2005). Brevemente, el medio de reacción contiene tampón fosfato sódico 0,1 M (pH=8,0) con 320 µM DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-nitrobenzoico) y la muestra. La reacción de hidrólisis se inicia con la adición de los sustratos acetiltiocolina (actividad AChE) o butiriltiocolina (actividad BChE). La variación de absorbancia se registra a 412 nm durante 10 minutos. Los ensayos se realizan por triplicado y la actividad esterasa se calcula utilizando el coeficiente de absorción molar de 14,15 x 103 M^{-1} cm^{-1} (Eyer y col., 2003).

[2] En 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten desarrollaron el concepto del complejo enzima-sustrato como intermediario del proceso de catálisis y propusieron una ecuación de velocidad que explica el comportamiento cinético de las enzimas (Johnson y Goody, 2011).

1.3.2.4. Reactivación de la actividad AChE

Para determinar si la inhibición de la actividad AChE es producida por exposición a OFs, en las muestras de estudio se realiza una incubación con 2-PAM de acuerdo con el método descrito por Rodríguez-Castellanos y Sánchez-Hernández (2007). Las muestras se incuban durante 1h con $5x10^{-4}$ M de 2-PAM a 25ºC y posteriormente se determina la actividad AChE siguiendo la metodología descrita anteriormente. El resultado de la actividad AChE después de la incubación se compara con la actividad sin la presencia de la oxima, para determinar si hay reactivación de la actividad enzimática (Fig. 1.14).

a) b)

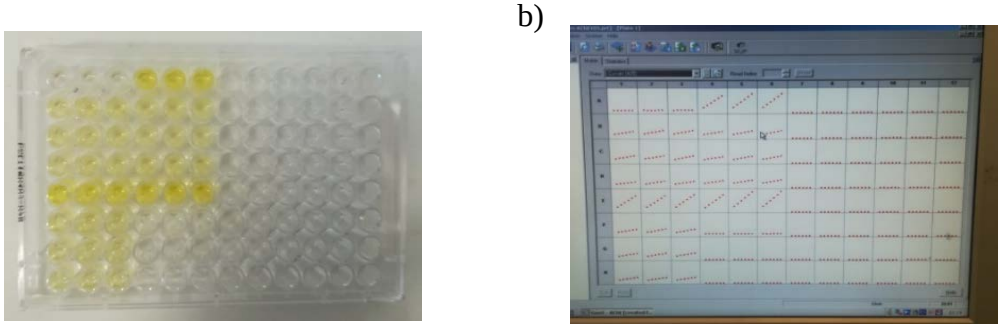


Figura 1.14. Análisis de actividad AChE: a) Placa de 96 pocillos con la formación de cromóforo con muestras reactivadas tras la incubación con 2-PAM (pocillos A4-6 y E1-6); b) salida de datos del análisis, en el lector de microplacas Asys HiTech UVM340 (Asys HiTech GmbH, Eugendorf, Austria).

1.3.2.5. Determinación de la actividad carboxilesterasa

Las actividades de las diferentes isoenzimas CbE se analizan mediante la hidrólisis de los sustratos ésteres de α-naftol (α-NA y α-NB) y 4-nitrofenol (4-NPA y 4-NPB). Para el análisis de la hidrólisis de los ésteres de α-naftol se sigue el método descrito por Thompson (1999). El medio de reacción contiene una solución Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) con los sustratos α-NA o α-NB 20 mM, que reaccionan con la muestra durante 10 minutos a 25°C. La reacción se detiene mediante la adición de 50 µL de SDS al 2,5% en 0,1% Fast Red ITR/2,5% Tritón X-100, después de 30 minutos a 22ºC en la oscuridad, la absorbancia del complejo α-naftol-Fast Red ITR se lee a 530 nm. La actividad específica se determina utilizando una curva externa hecha con α-naftol (1,5 a 100 nmol/ml). La hidrólisis de 4-NPB y 4-NPA se determina de acuerdo con Carr y Chambers (1991). La mezcla de reacción se inicia mezclando los sustratos (4-NPB o 4-NPA) 20 mM y Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5) con la muestra. Después de 10 minutos de incubación a 25ºC, la reacción se detiene mediante la adición de 50 µL de una solución que contiene SDS al 2% (p/v) y base Tris al 2% (p/v). El 4-nitrofenol formado se lee a 405 nm y se cuantifica mediante una curva de calibración (5-100 nmol/ml).

1.3.2.6. Estudio de la interacción de las B-esterasas con plaguicidas OFs

Para analizar la sensibilidad de las actividades esterasas a OFs, se incuban los sobrenadantes cerebrales, hepáticos y musculares, así como los extractos extraídos de los cultivos celulares, durante 30 minutos a 20°C en presencia de plaguicidas OFs a diferentes concentraciones. Los compuestos OFs utilizados en la tesis para estos análisis han sido el clorpirifos, el clorpirifos-oxon y el dimetoato.

Generalmente, las actividades enzimáticas se expresan como porcentaje de actividad enzimática basal sin inhibidor (media ± desviación estándar) frente a las concentraciones del OF usadas. Los resultados se ajustan a una curva de dosis-efecto[3] (Fig. 1.15) a partir de la que se puede determinar la IC_{50} de los inhibidores (concentración de inhibidor que causa el 50% de inhibición de la actividad enzimática máxima observada).

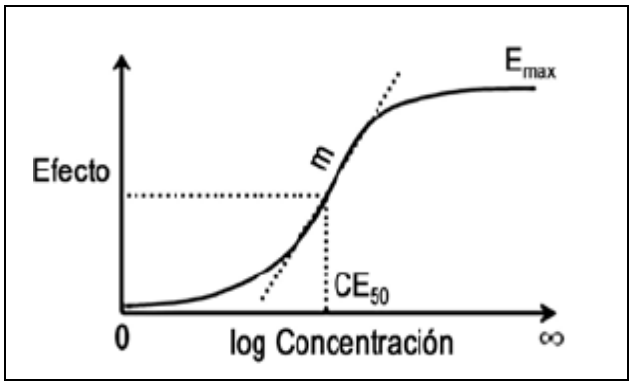


Figura 1.15. Representación gráfica sigmoidea de la curva concentración-efecto. De este tipo de representaciones se pueden extraer varios parámetros toxicológicos como la CE_{50} (concentración efectiva media), concentración que produce respuesta en el 50% de los animales (Aguirre-Crespo y Sánchez-Salgado, 2010).

[3] La relación dosis-efecto es la relación entre la dosis y el efecto a nivel individual. Un aumento de la dosis puede incrementar la intensidad de un efecto o su gravedad. Puede obtenerse una curva de dosis-efecto a nivel de todo el organismo, de la célula o de la molécula diana (Aguirre Crespo y Sánchez Salgado, 2010).

1.4. Riesgos para la Salud Pública y Animal

1.4.1. Monitorización de la toxicidad

Las estrategias de manejo integrado de plagas (MIP) se encuentran entre las acciones más respetuosas con el medio ambiente para combatir las plagas agrícolas y, por tanto, controlar el uso de plaguicidas (Devine y Furlong, 2007). Sin embargo, este enfoque no elimina completamente el uso de sustancias químicas o plaguicidas para controlar las plagas. De hecho, el Código de conducta internacional sobre la distribución y el uso de pesticidas define el MIP como "*la consideración cuidadosa de todas las técnicas de control de plagas disponibles y la posterior integración de medidas apropiadas que disminuyan el desarrollo de poblaciones de plagas y mantengan la aplicación de los pesticidas y otras intervenciones a niveles económicamente justificados y reduciendo o minimizando los riesgos para la salud humana y el medio ambiente*" (FAO, 2002). En las últimas décadas, los estados miembros de la UE han realizado un gran esfuerzo para la transformación hacia manejos agropecuarios más sostenibles, minimizando los impactos en los ecosistemas desde que se comenzaron en 1992 a introducir los programas agroambientales (Reglamento CEE nº 2078/92 del Consejo). En la última Propuesta de Reglamento de reforma de la Política Agraria Comunitaria (PAC) de la Comisión (Comisión Europea, 2018) se propone que los Estados miembros puedan "*responder de forma adecuada a las dificultades relacionadas con la salud económica del sector agrícola, la protección del medio ambiente, las medidas contra el cambio climático y el logro de un tejido económico y social sólido en las zonas rurales de la UE […]*", y que los agricultores tengan "*servicios de asesoramiento a las explotaciones con el fin de mejorar la gestión sostenible […], que deben ayudar a los agricultores y otros beneficiarios de la ayuda de la PAC a ser más conscientes por un lado, de la relación entre la gestión de la explotación y la gestión de la tierra y, por otro lado, de determinadas normas, requisitos e información, […] entre estos últimos se encuentra el uso sostenible de plaguicidas"*. Además, entre los planes estratégicos recoge "*la reducción de los riesgos e impactos de la utilización de pesticidas*" como uno de los 10 tipos prioritarios de intervención.

Pese a los esfuerzos en el control del uso de plaguicidas y la implantación de buenas prácticas agrícolas, la situación actual de los agroecosistemas sigue siendo un motivo de preocupación. Una muestra muy evidente es que, precisamente los dos plaguicidas más consumidos a nivel europeo, el clorpirifos y el dimetoato, no han renovado la aprobación de la sustancia activa en la comercialización de productos fitosanitarios. El clorpirifos ha sido prohibido en Europa el pasado 10 de enero de 2020 mediante el Reglamento de Ejecución (UE) 2020/18 de la Comisión relativo a la comercialización de productos fitosanitarios que dictamina como fecha máxima el 16 de abril de 2020 para que los estados miembros retiren las autorizaciones de los productos fitosanitarios que contengan clorpirifos. Por otro lado, el dimetoato (insecticida usado principalmente contra la mosca

del olivo en la agricultura convencional) fue prohibido el 26 de junio de 2019 en el Reglamento de Ejecución (UE) 2019/1090 de la Comisión por el que no se renueva la aprobación de la sustancia activa en la *comercialización* de productos fitosanitarios, algo que debe ser aplicado por los países miembros como máximo el día 20 de julio de 2020. Ambas prohibiciones se basan en las recomendaciones de la EFSA (2018, 2019b) que identifica, entre otros, riesgos derivados de la exposición relacionados con efectos genotóxicos y neurológicos durante el desarrollo, respaldados por datos epidemiológicos que indican graves efectos, principalmente en niños.

Pero las zonas rurales representan más del 80% del territorio de la UE, y el sector agrícola es uno de los principales productores mundiales de alimentos (Cei y col., 2018). La agricultura europea garantiza la seguridad alimentaria y la calidad, y proporciona millones de empleos para los europeos (UE, 2019). Sin embargo, la agricultura es una de las fuentes de contaminación por plaguicidas OFs más importante y pese a las restricciones y prohibición de este tipo de sustancias por determinados países, no implica su eliminación completa en el medio, ya que su presencia puede persistir tiempo después de la aplicación, o proceder de zonas en las que el uso de estos productos no tenga el mismo tipo de limitaciones.

Por tanto, el uso de las B-esterasas en la monitorización de la contaminación constituye una herramienta de alerta temprana importante para detectar exposición a OFs en determinados organismos no diana. Las principales rutas de exposición a OFs y los diferentes organismos no diana de la cadena trófica que pueden verse afectados se muestran en la Figura 1.16. Esta exposición tiene lugar a través de procesos como la lixiviación (1), la escorrentía superficial (2) y la infiltración (3), además de mediante la evaporación y volatilización, existiendo riesgos de exposición en aves, peces, en diferentes organismos del suelo e, indudablemente, en seres humanos.

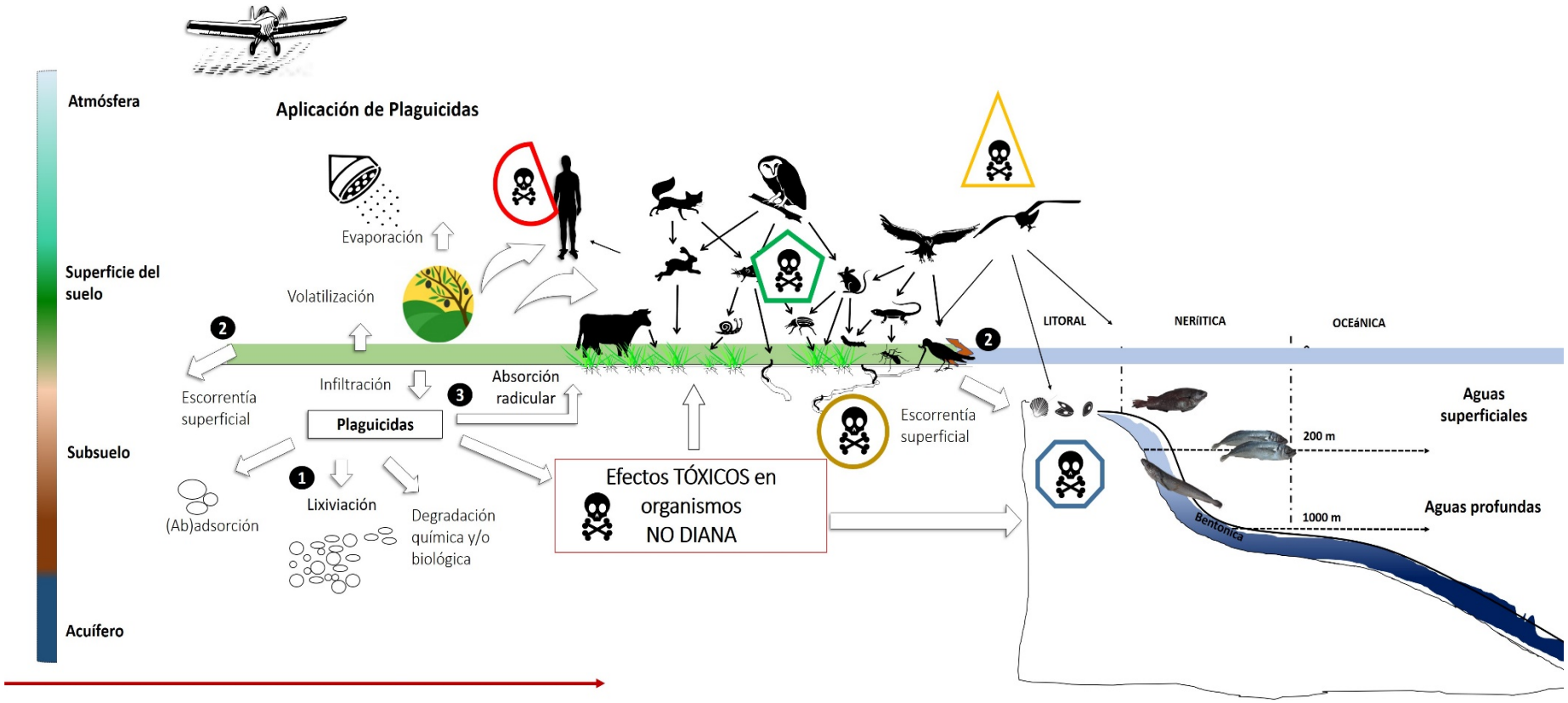


Figura 1.16. Principales procesos fisicoquímicos y biológicos que contribuyen a la distribución de los plaguicidas una vez son liberados al medio. Esquema conceptual desarrollado a partir de Bargagli (1998), Köhne y col. (2009) y Sánchez-Hernández (2011).

1.4.1.1. Aves silvestres

Las aves son organismos particularmente vulnerables a la contaminación procedente de diferentes matrices ambientales a través del agua y la comida o por contacto dérmico e inhalación (Hill, 2003; Fleischli y col., 2004). Además, son especialmente sensibles a determinados plaguicidas OFs, especialmente en la forma “oxo” (como el clorpirifos), algo que seguramente está relacionado, al contrario de lo que ocurre en mamíferos, con la presencia de bajos niveles de actividad paraoxonasa en las aves. Esta enzima hidrolasa, perteneciente al grupo de las A-esterasas, es abundante en la sangre y el hígado, y capaz de hidrolizar compuestos OFs (Sogorb y col., 2002), por lo que la actividad de otras esterasas como las CbE podría ser un mecanismo de defensa contra los plaguicidas OFs (Sogorb y col., 2007).

En aves, son especialmente relevantes las exposiciones crónicas a dosis bajas, que se han relacionado con pérdidas de peso y trastornos en hábitos alimenticios, así como en la disminución de índices reproductivos, abandono de la puesta o dificultades en el vuelo. Estos efectos podrían contribuir al declive de algunas poblaciones de aves silvestres con importante relevancia ecológica en sistemas tanto terrestres como marinos (Köhler y Triebskor, 2013). Las frecuencias de intoxicaciones más altas se dan en paseriformes y anátidas, seguidas de águilas, halcones, búhos y buitres (Friend y Franson, 1999; Pearson, 2001), habiendo diferencias dependiendo de la edad, el sexo, la dieta y la condición corporal (Hill, 2003). En España, la ocurrencia de intoxicaciones es especialmente importante en zonas rurales, en las que, además de su aplicación en prácticas agrícolas, existe un uso deliberado de OFs para matar animales silvestres debido al conflicto entre las actividades humanas y la presencia de depredadores (Soler y col., 2006; Plaza y col., 2019).

Por tanto, hay especies de aves que pueden ser unos bioindicadores[4] excelentes de contaminación por OFs. Algunas especies, como las gaviotas, con amplios espectros de alimentación, presentes en ciudades y vertederos, y sobre áreas tratadas o donde se pueden acumular plaguicidas, pueden ser usadas como bioindicadores. Un número variable de individuos de esta especie, dentro de sus áreas de distribución, es remitido con regularidad a centros de recuperación de fauna silvestre con signos de intoxicaciones o con lesiones por traumatismos graves. Además, debido a su distribución y oportunismo, también hay campañas ocasionales de control de población. En ambos casos, estos organismos son una fuente valiosa de individuos cuando no sobreviven, siendo susceptibles de ser utilizados en la monitorización de diversos contaminantes (ver Panel 2).

[4] Un organismo (o parte de un organismo o una comunidad de organismos) que contiene información sobre la calidad del medio ambiente (o de una parte del medio ambiente). Un indicador "ideal" al menos debe tener las siguientes características: (a) solidez taxonómica (fácil de reconocer por no especialistas); (b) distribución amplia o cosmopolita; (c) baja movilidad (indicación local); (d) características ecológicas conocidas; (e) abundancia numérica; (f) idoneidad para experimentos de laboratorio; (g) alta sensibilidad a la contaminación ambiental (Gerhardt, 2002).

Panel 2. Origen de las muestras de gaviota *Larus michahellis* (Nauman, 1840)

Centros de Recuperación de Fauna Silvestre (CRFS)

Figura 1.17: Centros de Recuperación de Fauna Silvestre en España (CRFS). Fuente: Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat (GREFA) www.grefa.org/

A lo largo de la geografía española, existen numerosos CRFS (Fig. 1.17). Entre las utilidades que este tipo de centros ofrecen (información epidemiológica, vigilancia de la salud pública, educación ambiental, conservación de especies amenazadas), está la de ser una valiosa fuente de información debido a la disponibilidad de animales vivos o cadáveres, que pueden ser utilizados en investigación y concretamente en biomonitorización, ya que son animales silvestres de diferentes ecosistemas que reflejan la realidad de los mismos en relación a la contaminación ambiental.

Debido a recientes estudios centrados en la aparición de exposiciones a OFs como el clorpirifos en Galicia (PAN, 2018), y gracias a la colaboración con el Centro de Recuperación de Fauna “O Veral”, perteneciente a la Conselleria de Medio Ambiente y el Servicio de Espacios Naturales y Biodiversidad, ubicado en Lugo, parte del trabajo presentado en el Capítulo 2, se ha realizado utilizando diferentes tejidos de 32 individuos de esta especie, procedentes del CRFS mencionado.

Campañas de Control de Población

Además, gracias a la colaboración con los investigadores del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Facultad de Veterinaria de Lugo Dr. D. Luis Eusebio Fidalgo y Dra. Dña. Ana López Beceiro, se ha tenido acceso a muestras de animales procedentes de campañas de control de población realizadas en las ciudades de Gijón, A Coruña y Pontevedra.

Cuando este tipo de prácticas son necesarias, también son de gran interés en investigación, debido a que proporcionan muestras de animales muy útiles como bioindicadores de contaminación. En nuestro caso, con la autorización de los Gobiernos de Galicia y Asturias, se ha podido monitorizar en 38 animales aparentemente sanos, la exposición a OFs mediante la caracterización y análisis de las actividades B-esterasas en diferentes tejidos.

1.4.1.2. Peces silvestres

A pesar de que los plaguicidas se acumulan en mayor medida en el suelo (Köhne y col., 2009), las investigaciones en los últimos años se han centrado en ecosistemas acuáticos (Fig. 1.8). En gran parte de estos estudios se evalúan efectos sobre la supervivencia, el crecimiento, comportamiento y reproducción en peces, dafnias y algas. Y, concretamente, son los sistemas de agua dulce los que más se han estudiado debido a que son los entornos donde, desde el suelo o los sistemas de depuración de las aguas residuales, se producen las primeras emisiones.

Existe un amplio número de trabajos donde se evalúa la toxicidad aguda en peces como especie modelo (OECD n203), lo que proporciona mucha información sobre los parámetros toxicológicos. En el caso de plaguicidas OFs, el clorpirifos resulta especialmente peligroso para los peces, tanto en sistemas de agua dulce como salada (Singh y col., 2009). En los ensayos de toxicidad los principales efectos subletales que se evalúan son: pérdidas de equilibrio, comportamientos anormales de los movimientos natatorios o en la respiración, cambios en la pigmentación de la piel y otros como hemorragias, agresiones o comportamientos de canibalismo (CCACG, 2005; Rufli, 2012). Dentro de estos estudios, la determinación de la actividad B-esterasa en peces como bioindicadores de exposición a OFs ha aumentado en los últimos años (Solé y col., 2010; Ribalta y col., 2015; Solé y Sánchez-Hernández, 2015; Tam y col., 2018), así como su aplicación en la monitorización de la vida silvestre en ecosistemas marinos (Crespo y Solé, 2016; Nos y col., 2017).

Aunque son menos estudiados, en este tipo de ecosistemas es donde pueden acabar la mayor parte de los metabolitos de los OFs, que son a menudo más tóxicos. Además, por la liposolubilidad de estos productos, se pueden bioconcentrar (mayor cantidad en el organismo que en el agua) y así introducirse en la cadena alimentaria, al incorporarse en organismos situados en diferentes niveles de organización biológica, formando parte algunos de ellos del consumo humano.

En este sentido, la evaluación de la posible exposición en organismos de poblaciones de peces silvestres en ecosistemas marinos puede ser más significativa desde el punto de vista ecológico que las exposiciones realizadas en el laboratorio (Connon y col., 2012). En el caso de las B-esterasas, debido a la variabilidad entre diferentes especies y la capacidad de respuesta frente a OFs, es interesante la evaluación de varias especies de peces con diferentes hábitos de alimentación, en diferentes tejidos, como el cerebro, el hígado y los músculos, y que formen parte de la dieta humana habitualmente.

Panel 3.
Origen de las muestras de Peces: Rías Baixas

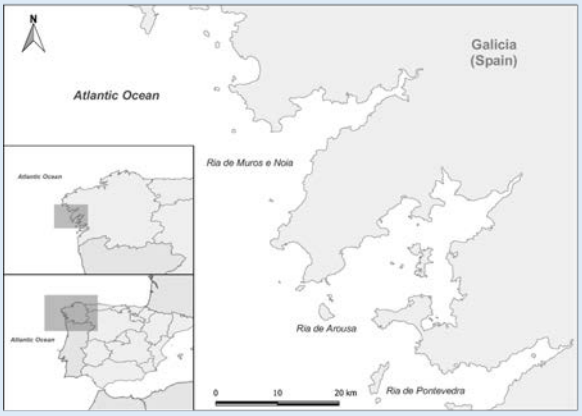


Figura 1.18. Localización de las Rías Baixas de Muros-Noia, Arousa y Pontevedra donde se obtuvieron las muestras de peces

Parque Nacional de las Islas Cíes

Galicia es una de las zonas ambientalmente más importantes de la Península Ibérica. Especialmente, por la conservación de algunos ecosistemas marinos que son una fuente de diversidad y riqueza de especies silvestres con un gran valor, tanto a nivel ecológico como económico. A ello se suma que es una zona con una gran tradición pesquera que provee de peces y marisco a todo el mundo (IGE, 2018). Sin embargo, la alta presencia de OFs, comparada con otras cuencas hídricas españolas (PAN, 2018) podría suponer un riesgo debido a la posible acumulación de metabolitos tóxicos en el mar, que afecten a especies de peces cuya presencia es habitual en las lonjas y, por tanto, en los mercados y dietas de una buena parte de la población.

Para esta parte del trabajo (Capítulo 3) en la Unidad de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de Cáceres, se ha contado con la colaboración de la Dra. Yolanda Valcárcel, del Departamento de Especialidades Médicas y Salud Pública, en la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Rey Juan Carlos, en Madrid. La participación ha estado auspiciada por la colaboración en el proyecto titulado “Los fármacos como contaminantes prioritarios: efectos toxicológicos, ambientales y para la salud humana (PI14/00516)”.

Gracias a que se recibieron muestras de diferentes especies de peces obtenidas en puertos locales de las Rías de Muros-Noia, Arousa y Pontevedra (Fig. 1.18), a partir de mercados locales donde se tomaban los peces justo después de faenar, se analizarón fármacos presentes en tejidos de varias especies (Martínez-Morcillo y col., 2020) y además se pudo caracterizar y determinar la actividad de las B-esterasas y su sensibilidad *in vitro* a plaguicidas OFs, en diferentes tejidos.

1.4.2. Ensayos de Toxicidad

Los ensayos de toxicidad constituyen la piedra angular de la Toxicología clásica y de la actual Toxicología ambiental. Resultan una herramienta extremadamente útil en el proceso de la Evaluación del Riesgo Ambiental[5] de nuevas sustancias (antes de ser comercializadas) o de matrices ambientales (suelos, agua o sedimentos) históricamente contaminadas que pueden representar un riesgo para la salud pública y animal (Callow y Forbes, 2003).

En Ecotoxicología, el uso de ensayos para evaluar los riesgos asociados a plaguicidas es de gran interés, especialmente para la evaluación de los efectos neurotóxicos. Las herramientas disponibles se basan en análisis biológicos, toxicológicos y/o ecológicos, entre los que están el uso de determinados biomarcadores que, como se ha indicado, reflejan alteraciones moleculares y/o celulares de efecto por exposición a agentes tóxicos (Legradi y col., 2018). Hoy en día se cuenta con una enorme gama de análisis de toxicidad que engloban una amplia variedad de especies animales y vegetales, así como diseños de exposición a la sustancia de ensayo (OECD: n418, n419, n424, n426; CCACG, 2005; Walker, 2003; Larsen y col., 2016; de Melo Tarouco y col., 2017; Satre y col., 2018). Tal diversidad de procedimientos experimentales es reflejo del impacto que este tipo de productos puede generar a diferentes niveles de organización biológica.

Los procedimientos en Toxicología para evaluar las relaciones concentración-efecto que se realizan en situaciones controladas a diferentes escalas en laboratorio (microcosmos *ex situ*) son mucho más habituales que los realizados en condiciones naturales (mesocosmos *in situ)* (Sánchez-Hernández, 2006). La información generada en este tipo de ensayos es de gran utilidad en las Evaluaciones de Riesgo Ambiental. Parámetros como CL_{50} (concentración letal para la mitad de la población expuesta), EC_{50} (concentración efectiva para la mitad de la población expuesta), NOEC (concentración más alta a la cual no se encuentra efecto observable), LOEC (concentración más baja a la cual no se encuentra efecto observable), CE (concentración efectiva para un determinado efecto), CL (concentración letal), son fundamentales en las fases de evaluación del riesgo y toxicidad de estos productos.

De las organizaciones de referencia, las directrices más consultadas y empleadas para realizar los ensayos en el ámbito de la Ecotoxicología son las de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos) y las emanadas de la ISO (Organización Internacional de Normalización).

Las autorizaciones de comercialización de plaguicidas conllevan un proceso científico, legal y administrativo, que debe abarcar una amplia variedad de efectos asociados con la aplicación y su efecto potencial en la salud humana y el medio ambiente (WHO, 2010). El registro de las diferentes características permite a las autoridades

[5] Proceso que evalúa y caracteriza la probabilidad de que ocurran efectos adversos en el ecosistema como consecuencia de la acción pasada, presente o futura del hombre. El proceso consta de cuatro fases: identificación del peligro, evaluación dosis-respuesta, evaluación de los efectos de la exposición, caracterización del riego y gestión del riesgo (Finizio y Vila, 2002).

competentes decidir sobre la autorización de la distribución y comercialización de sustancias activas, su utilización y dosis recomendadas, así como la información en el etiquetado y publicidad, contribuyen a un consumo responsable, atendiendo a la protección humana y ambiental.

En el caso de la toxicidad en seres humanos, en los ensayos incluidos en la regulación europea actual de productos químicos, los efectos se evalúan utilizando modelos *in vivo* (Westerink, 2013). En el marco de la UE, el Registro de sustancias y mezclas químicas (REACH) evalúa la toxicidad solo para compuestos que superan una producción superior a 10 toneladas/año (Legradi, 2018). Son ensayos de toxicidad oral estandarizados de 28 y 90 días, usando roedores. Sin embargo, en el caso de los pesticidas, es la EFSA la autoridad encargada del registro y evaluación de este tipo de sustancias por su relación con los alimentos y, en el caso de los estudios de efectos neurotóxicos, solo evalúan *in vivo* los daños en mamíferos, usando roedores (OECD n424 y n426). A pesar de que hay ensayos de toxicidad diseñados para cuantificar cualquier daño o perturbación causada por un contaminante, sorprende que los efectos neurotóxicos en especies no-diana no sean todavía evaluados por parte de la EFSA (Masjosthusmann y col., 2018). Algo similar puede indicarse de las evaluaciones *in vitro* estandarizadas, pues tampoco son tenidas en cuenta, lo que supone un desafío debido a la creciente cantidad de productos contaminantes susceptibles de ser evaluados, y para lo que se requerirían un número muy elevado de animales vivos, con las implicaciones éticas y económicas que suponen en investigación (Westerink, 2013).

Por todo ello, abordar ensayos de toxicidad, utilizando modelos alternativos con protocolos aceptados por la comunidad científica, con diseños sensibles, económicos, efectivos, reproducibles y relativamente fáciles de realizar; así como con resultados fiables, cuyos parámetros de toxicidad atiendan a bases estadísticas y modelos matemáticos establecidos, pueden contribuir al avance de la investigación e implantación de este tipo de ensayos, en los procesos de evaluación de riesgos y en la toma de decisiones de las autoridades competentes.

1.4.2.1. Ensayos in vitro: cultivos celulares

En las últimas décadas, los modelos de investigación *in vitro* han ganado importancia en la investigación en Toxicología, proporcionando herramientas avanzadas, protocolos fiables y reproducibles. Uno de los enfoques más importantes es el uso de cultivos celulares, en los que se pueden explorar las bases celulares y moleculares de la toxicidad, y estudiar los efectos que se producen en presencia de los xenobióticos en el entorno celular (Zucco y col., 2004).

Aunque el principal mecanismo de acción tóxica de los OFs ocurre principalmente en el sistema nervioso, la exposición a OFs también afecta a órganos como el pulmón, el tracto gastrointestinal y el hígado (Van Scoy y col., 2016; Wang y col., 2016). Y en el caso de algunos plaguicidas, como el dimetoato, también se han estudiado algunos aspectos de su toxicidad en el páncreas (Hsiao y col., 1996; Hanan y Azza, 2002; Kamath y Rajini, 2007).

El que en el organismo las funciones del páncreas se vean comprometidas puede tener serias implicaciones en la salud, debido al papel de esta glándula en la secreción de hormonas (como la insulina y glucagón, que juegan un papel fundamental en el metabolismo de la glucosa) y de enzimas digestivas (Karami-Mohajeri y Abdollahi, 2011). Por ello, las células pancreáticas aisladas son un modelo útil para investigar los efectos de plaguicidas OFs. Se han desarrollado técnicas de cultivo celular para estudiar el efecto de la exposición a largo plazo a xenobióticos *in vitro,* pero la mayoría de los modelos celulares disponibles para estudios sobre el páncreas exocrino derivan de tumores, es decir, se basan en células transformadas. Hasta la fecha, no ha sido posible cultivar células acinares pancreáticas o, al menos, mantener de manera confiable un cultivo viable más de 48 horas. Por eso, las células estrelladas pancreáticas (PSC) representan una población celular, no tumoral, presente en el páncreas exocrino, cuya fisiología se espera que no se transforme como ocurre en los tumores y, por lo tanto, resultan muy útiles en ensayos de toxicidad (ver Panel 4). Además de sus funciones en el mantenimiento de la matriz extracelular mediante la síntesis y secreción de proteínas (Phillips y col., 2003), también participan en la fibrosis que ocurre en la pancreatitis y el cáncer (Gryshchenko y col., 2016). Incluso se ha sugerido que las PSC de rata sintetizan AChE y secretan ACh, que podría ser liberada para enviar señales a las células pancreáticas vecinas (Phillips y col., 2010). Por tanto, la realización de estudios de la actividad de las esterasas y su caracterización resulta de gran interés porque pueden usarse como biomarcadores de exposición a OFs y los análisis de los efectos de los OFs en este tipo de modelos celulares puede ser útil para una mejor comprensión de las respuestas producidas en los organismos.

Panel 4. Cultivos celulares
Área de Fisiología. Instituto de Biomarcadores de Patologías Moleculares (IBPM). Universidad de Extremadura, Cáceres. agmateos@unex.es

Para uno de los trabajos publicados (Capítulo 4) se han utilizado muestras procedentes de cultivos primarios de células estrelladas pancreáticas (PSC) de rata *Wistar* (Fig. 1.19) cedidas por el Dr. D. Antonio González Mateos.

Además de los cultivos de PSC en el laboratorio con el que se ha colaborado, hay diferentes líneas de trabajo con otros tipos de cultivos celulares de rata como los astrocitos de hipocampo y las tumorales AR42J de páncreas de rata, además de líneas celulares neuronales (SK-N-B) y gliales (U-87) humanas.

Para la experimentación con este tipo de muestras se necesita el informe favorable del Comité de Ética de Experimentación Animal de la UEx a favor del Proyecto de Investigación, así como la Resolución de autorización por parte de la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Junta de Extremadura al mismo.

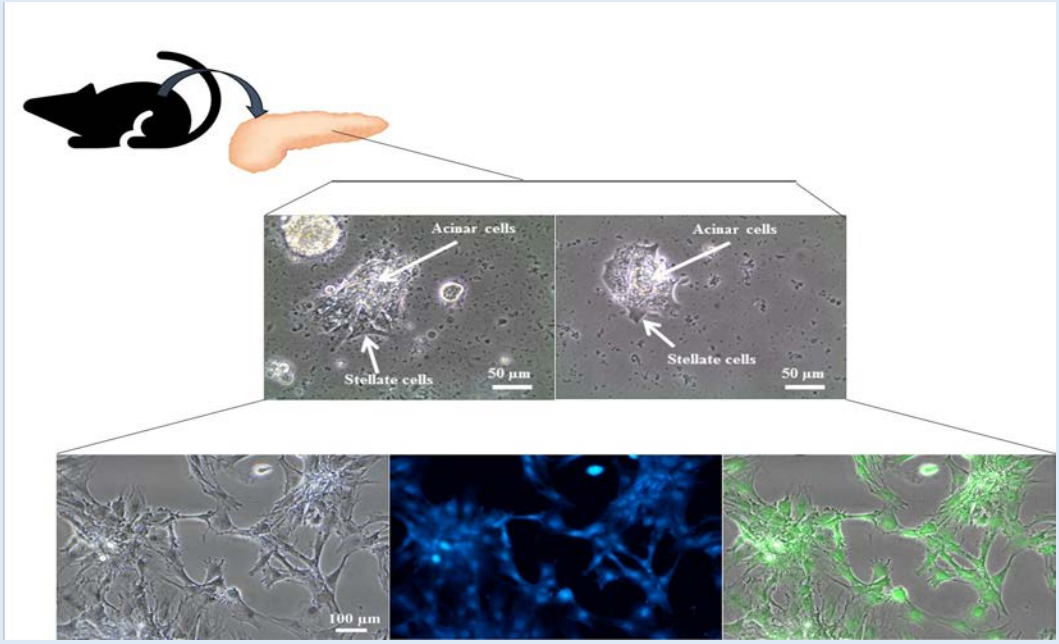


Figura 1.19. Ilustración esquemática de un cultivo primario de células pancreáticas. La parte exocrina del órgano se compone predominantemente de lóbulos acinares. Las células estrelladas pancreáticas (que se muestran en pseudocolores, panel inferior) forman una red tridimensional entre esos lóbulos.

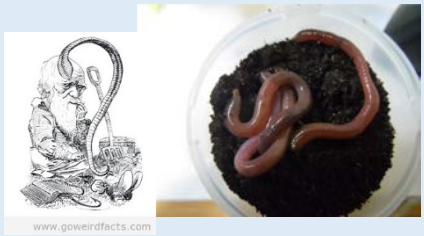
1.4.2.2. Ensayos in vivo: lombriz de tierra

El suelo es la matriz donde en primer lugar se depositan la mayoría de plaguicidas, aunque, comparado con los ecosistemas acuáticos, la monitorización de los mismos y el empleo de las B-esterasas en organismos del suelo son relativamente escasos (Fig. 1.8). Posiblemente sea debido a que la consideración del suelo, desde el punto de vista de la conservación de su calidad, sea relativamente reciente. La salud o calidad del suelo fue definida por Doran y Zeiss (2000) como "*la capacidad de un tipo específico de suelo para funcionar, dentro de los límites de los ecosistemas naturales o gestionados por el hombre, para mantener la productividad de las plantas y los animales, mantener o mejorar la calidad del agua y el aire, y favorecer la salud y el hábitat*". Atendiendo a esto, la degradación de los suelos, particularmente en sistemas agropecuarios debido al uso masivo de agroquímicos, es una realidad reconocida como una de las ocho principales causas de pérdida de los suelos por la Unión Europea (EC, 2002).

Para la evaluación del efecto de los compuestos agroquímicos en el suelo, la lombriz de tierra es uno de los organismos del medio edáfico recomendados como modelo en ensayos de toxicidad (ver Panel 5). Estos organismos consumen una importante fracción de suelo, por lo que están expuestos a través de la alimentación y por absorción a través de la piel a estos compuestos, sin ser organismos diana a plaguicidas (Pelosi y col., 2014). Aspectos de su ecología y biología, así como las repercusiones que la actividad de estos organismos tiene en el suelo, están entre los factores que han llevado a la popularidad de estos seres vivos en los ensayos de toxicidad. En las lombrices de tierra (especialmente *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*) se evalúan los efectos letales de toxicidad aguda (OECD n207) y subletales de toxicidad crónica (ISO, 2008) originados por la exposición directa o indirecta a productos químicos de diversa índole.

El uso de las B-esterasas en diferentes especies de lombriz de tierra ha sido utilizado en diferentes investigaciones: como biomarcadores de toxicidad, en la evaluación de su participación en los mecanismos de biotransformación y relacionándolas con la tolerancia de algunas especies de lombriz como *Aporrectodea caliginosa* ante la exposición a OFs como el clorpirifos (Sánchez-Hernández y col., 2014a); con la capacidad de evitar suelos contaminados con clorpirifos (Martínez-Morcillo y col., 2013), así como con la capacidad de enriquecer los suelos con CbEs capaces de, a través de su inhibición irreversible por la unión a clorpirifos, disminuir la acción tóxica del mismo en suelos contaminados por pesticidas y, por tanto, contribuir a procesos de biorremediación de suelos contaminados (Sánchez-Hernández y col., 2014b).

Panel 5. Cultivo de lombrices en laboratorio
Lombricultivos
Unidad de Toxicología.
Facultad de Veterinaria de Cáceres
Universidad de Extremadura.



Los beneficios de las lombrices de tierra en el suelo ya eran conocidos en el Antiguo Egipto, donde este animal era venerado y protegido (Medany, 2011). Aristóteles las consideraba el "intestino de la tierra" y los romanos las tenían en cuenta en el desarrollo de sus prácticas agrícolas. Sin embargo, es Darwin en 1881 en "*La formación de la tierra vegetal por la acción de las lombrices*" (Darwin, 1881) quien describe la importancia de las lombrices en la degradación de la materia orgánica de los restos vegetales y la liberación de nutrientes a través de ella. Esta obra fue el inicio de la investigación de la transformación en actividades zootécnicas para mejorar la producción agrícola a partir de conceptos como el vermicompostaje, la vermiestabilización, o la lumbricultura (Edward y Bohle, 1996). Las lombrices de tierra se clasifican taxonómicamente en el Filo Annelida, la Clase Oligochaeta, el Orden Haplotaxidae y la Familia Lumbricidae. Hay alrededor de 7000 especies, de las que aproximadamente 4400 son lombrices terrestres (Reynolds, 1994).

Están clasificadas en tres categorías ecológicas principales atendiendo básicamente a sus hábitos alimenticios y de enterramiento (Bouché, 1983): epigeas (*Eisenia andrei*), endogeicas (*Aporrectodea caliginosa*) y anécicas (*Lumbricus terrestres*). En nuestro laboratorio se han logrado mantener cultivos de las dos últimas especies de lombrices de tierra en cámaras de cultivo (Fig. 1.20). Las condiciones para conseguirlo (temperatura, humedad del suelo, densidad de organismos por caja, tipo y régimen de alimentación) son las recomendadas para cada especie (Lowe y Butt, 2005, 2007). Estos cultivos han facilitado la obtención de individuos de diferentes cohortes con características deseables controladas (edad, tamaño, estado de maduración reproductiva) en función de los objetivos del ensayo: ensayo de toxicidad aguda (Capítulo 5); cambios en el peso, crecimiento de juveniles, reproducción, efectos en la morfología, en la fisiológica, comportamiento, o diferencias en las tasas de descomposición de la materia orgánica en el suelo). El cultivo de estos animales en laboratorio facilita que estén libres de contaminación antes de su uso en los ensayos realizados.

Figura 1.20. Cámara de cultivo en el Laboratorio de Toxicología, Facultad de Veterinaria, Cáceres

OBJETIVOS

El *objetivo principal* de la tesis es caracterizar y determinar la actividad de B-esterasas en diferentes especies animales y tejidos, así como evaluar los mecanismos de toxicidad relacionados con exposiciones a plaguicidas organofosforados.

Para la consecución del mismo, la presente tesis doctoral presentada como compendio de publicaciones se ha dividido en diferentes capítulos, de los cuales, los capítulos 2, 3, 4 y 5 recogen los resultados publicados en revistas indexadas en ISI-JCR.

Los *objetivos específicos* para el desarrollo de la tesis estructurados en función de las condiciones metodológicas desarrolladas son:

- Monitorización en poblaciones silvestres: aves y peces (Capítulos 2 y 3). Contribuir al establecimiento de valores enzimáticos basales y proponer tejidos y especies como potenciales bioindicadores de la presencia de OFs.

- Bioensayo *in vitro:* cultivos celulares (Capítulo 4). Cuantificar el efecto de la exposición a dimetoato sobre las actividades B-esterasas en cultivos primarios de células estrelladas pancreáticas de rata *Wistar*.

- Bioensayo *in vivo*: lombriz de tierra (Capítulo 5). Valorar los efectos de la exposición a dimetoato mediante el ensayo estandarizado de toxicidad aguda (OECD n207).

Bibliografía

Aguirre-Crespo FJ, Sánchez-Salgado JC (2010) ¿Qué sabe Ud. acerca de la curva dosis-respuesta?. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 41(4): 57-59

Aldridge, W (1953) Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. The Biochemical Journal 53(1): 110. doi:10.1042/bj0530110

Andersson ML, Møller AM, Wildgaard K (2019) Butyrylcholinesterase deficiency and its clinical importance in anaesthesia: a systematic review. Anaesthesia 74(4): 518-528. doi.org/10.1111/anae.14545

Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Mejuto J C, García-Río L (2008) The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. Agriculture, Ecosystems and Environment 123(4): 247-260. doi.org/10.1016/j.agee.2007.07.011

Baños JE, Bosch F (1992) Aspectos históricos de los organofosforados. Medicina Clinica 99: 718-719.

Bargagli R (1998) Trace Elements in Terrestrial Plants: An Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery. Springer. Berlin.

Bouché MB (1983) The establishment of earthworm communities. En Satchell JE (ed) Earthworm Ecology (pp. 431-448). Springer, Dordrecht.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254. doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brimijoin S (2005) Can cholinesterase inhibitors affect neural development? Environmental Toxicology and Pharmacology 19(3): 429-432.

Buckley NA, Eddleston M, Li Y, Bevan M, Robertson J (2011) Oximes for acute organophosphate pesticide poisoning. Cochrane Database of Systematic Reviews (2). doi.org/10.1002/14651858.CD005085.pub2

Callow P, Forbes VE (2003) Does ecotoxicology inform ecological risk assessment? Some argue that ecotoxicology is too simplistic to do the job effectively. Environmental Science and Technology 37(7): 146A–151A. doi.org/10.1021/es0324003

Carr RL, Chambers JE (1991) Acute effects of the organophosphate paraoxon on schedule-controlled behavior and esterase activity in rats: dose-response relationships. Pharmacology Biochemistry and Behavior 40(4): 929-936. doi.org/10.1016/0091-3057(91)90108-E

Carson R (1962) Silent Spring. Bostonm Houghton Mifflin Company.

CCACG Canadian Council on Animal Care Guidelines (2005) The Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing. Canadian Council on Animal Care. Ottawa. https://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

Cei L, Defrancesco E, Stefani G (2018) From geographical indications to rural development: A review of the economic effects of European Union policy. Sustainability 10(10): 3745. doi.org/10.3390/su10103745

Chambers JE, Boone JS, Carr RL, Chambers HW, Straus DL (2002) Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. Human and Ecological Risk Assessment 8(1): 165-176. doi.org/10.1080/20028091056809

Chambers JE, Meek EC, Chambers HW (2010) The metabolism of organophosphorus insecticides. En Hayes (ed) Handbook of Pesticide Toxicology (pp. 1399-1407). Academic Press, New York. doi:10.1016/B978-0-12-374367-1.00065-3

Comisión Europea (2018) Propuesta del Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo 2018/392 por el que se establecen normas en relación con la ayuda a los planes estratégicos que deben elaborar los Estados miembros en el marco de la política agrícola común (planes estratégicos de la PAC). https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:aa85fa9a-65a0-11e8-ab9c-01aa75ed71a1.0004.02/DOC_1&format=PDF

Connon RE, Geist J, Werner I (2012) Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. Sensors 12(9): 12741-12771. doi.org/:10.3390/s120912741

Crespo M, Solé M (2016) The use of juvenile *Solea solea* as sentinel in the marine platform of the Ebro Delta: in vitro interaction of emerging contaminants with the liver detoxification system. Environmental Science and Pollution Research 23(19): 19229-19236. doi.org/10.1007/s11356-016-7146-7

Darwin C (1881) The formation of vegetable mould through the action of worms: with observations on their habits. John Murray. London.

de Melo Tarouco F, de Godoi FGA, Velasques RR, da Silveira Guerreiro A, Geihs MA, da Rosa CE (2017) Effects of the herbicide Roundup on the polychaeta *Laeonereis acuta*: cholinesterases and oxidative stress. Ecotoxicology and Environmental Safety 135: 259-266. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.014

Demkowicz S, Rachon J, Daśko M, Kozak W (2016) Selected organophosphorus compounds with biological activity. Applications in Medicine. RSC Advances 6(9): 7101-7112. doi.org/10.1039/C5RA25446A

Devine GJ, Furlong MJ (2007) Insecticide use: Contexts and ecological consequences. Agriculture and Human Values 24(3): 281-306. doi.org/10.1007/s10460-007-9067-z

Doran JW, Zeiss MR (2000) Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. Applied Soil Ecology 15(1): 3-11. doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00067-6

Eaton D L, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, Coyle J, McKhann G, Mobley WC, Nadel L, Neubert D (2008) Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. Critical Reviews in Toxicology 38(2): 1-125. doi.org/10.1080/10408440802272158

EFSA European Food Safety Authority (2018) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance dimethoate. EFSA Journal 16(10): 5454. doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5454

EFSA European Food Safety Authority (2019a) Scientific report on the 2017 European Union report on pesticide residues in food. EFSA Journal 17(6): 5743. doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5743

EFSA European Food Safety Authority (2019b) Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos. EFSA Journal 17(8):5809, 23 pp. doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5809

Eleršek T, Filipič M (2011) Organophosphorus Pesticides-Mechanisms of Their Toxicity. En Stoytcheva, M. (ed) Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure (pp. 243-260). InTech Open Access Publisher, Croatia.

European Commission (2002) Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC-General, Draft Working Document, 17 October 2002. SANCO/10329/2002 rev 2 final: 39. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_ppp_app-proc_guide_ecotox_terrestrial.pdf

European Commission (2017) The Future of Farming. European Commission, Brussels.

Eurostat (2007) The use of plant protection products in the European Union. Luxembourg, European Union.

Eurostat (2017) Pesticide Sales Statistics (Consultado en enero 2020). https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Archive:Pesticide_sales_statistics

Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. Analytical Biochemistry 312:224-227. doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00506-7

FAOSTAT (2019) http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP (consultado en enero 2020).

Fest C, Schmidt KJ (2012) The chemistry of organophosphorus pesticides. Springer Science and Business Media. Berlin. doi.org/10.1007/978-3-642-68441-8

Finizio A, Villa S (2002) Environmental risk assessment for pesticides: A tool for decision making. Environmental Impact Assessment Review 22(3): 235-248. doi.org/10.1016/S0195-9255(02)00002-1

Fleischli MA, Franson J, Thomas NJ, Findey DL, Riley WJr (2004) Avian mortality events in the United States caused by anticholinesterase pesticides: a retrospective summary of National Wildlife Health Center records from 1980 to 2000. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 46(4): 542-550. doi.org/10.1007/s00244-003-3065-y

Friend M, Franson JC, Ciganovich, EA (1999) Field manual of wildlife diseases: general field procedures and diseases of birds. US Geological Survey. Washington D.C.

Gallo MA, Lawryk NJ (1991) Organic phosphorus pesticides. Handbook of Pesticide Toxicology 2: 917-1.123.

Gavrilescu M (2005) Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. Engineering in Life Sciences 5(6): 497-526. doi.org/10.1002/elsc.200520098

Gryshchenko O, Gerasimenko JV, Gerasimenko OV, Petersen OH (2016) Calcium signalling in pancreatic stellate cells: mechanisms and potential roles. Cell Calcium 59: 140-144. doi.org/10.1016/j.ceca.2016.02.003

Gupta RC (2011) Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. Elsevier Academic Press. London. doi.org/10.1016/B978-0-12-382032-7.10037-2

Hanan HH, Azza HF (2002) A biochemical, histochemical, and ultrastructural evaluation of the effect of dimethoate intoxication on rat pancreas. Toxicology Letters 133: 161-170. doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00128-5

Hill EF (2003) Wildlife toxicology of organophosphorus and carbamate pesticides. In book: Handbook of Ecotoxicology. CRC Press 12: 281-312.

Hodkinson ID, Jackson JK (2005) Terrestrial and aquatic invertebrates as bioindicators for environmental monitoring, with particular reference to mountain ecosystems. Environmental Management 35(5): 649-666. doi.org/10.1007/s00267-004-0211-x

Hsiao CT, Yang CC, Deng JF, Bullard MJ, Liaw SJ (1996) Acute pancreatitis following organophosphate intoxication. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology 34: 343-347. doi.org/10.3109/15563659609013800

Huggett RJ (2018) Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. CRC Press. Boca Raton.

IGE (2018) Galician Statistical Office. Datos básicos de Galicia. https://www.Ige.Eu (acceso Octubre 2018).

ISO (2008) Soil quality — Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour — Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Geneva.

Johnson KA, Goody RS (2011) The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis–Menten paper. Biochemistry 50(39): 8264-8269. doi.org/10.1021/bi201284u

Jokanovic M (2001) Biotransformation of organophosphorus compounds. Toxicology 166(3): 139-160. doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00463-2

Juraske R, Castells F, Vijay A, Muñoz P, Antón A (2009) Uptake and persistence of pesticides in plants: measurements and model estimates for imidacloprid after foliar and soil application. Journal of Hazardous Materials 165(1-3): 683-689. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.043

Kamath V, Rajini PS (2007) Altered glucose homeostasis and oxidative impairment in pancreas of rats subjected to dimethoate intoxication. Toxicology 231: 137-146. doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.072

Karami-Mohajeri S, Abdollahi M (2011) Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. Human and Experimental Toxicology 30: 1119-1140. doi.org/10.1177/0960327110388959

Köhler HR, Triebskorn R (2013) Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? Science 341(6147): 759-765. doi.org/10.1126/science.1237591

Köhne J, Köhne S, Simunek J (2009) A review of model applications for structured soils: b) Pesticide transport." Journal of Contaminant Hydrology 104(1-4): 36-60. doi.org/10.1016/j.jconhyd.2008.10.003

Larsen KE, Lifschitz AL, Lanusse CE, Virkel GL (2016) The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. Environonmental Toxicology and Pharmacology 45: 41–44. doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.012

Layer PG, Allebrandt K, Andermann P, Bodur E, Boopathy R, Bytyqi AH, Paraoanu LE (2005) On the multifunctionality of cholinesterases. Chemico Biological Interactions 157: 37-41. doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.006

Legradi, J. B., Di Paolo, C., Kraak, M. H. S., Van Der Geest, H. G., Schymanski, E. L., Williams, Dingeman MML, Masse R, Brack W, Cousin X, Begout ML, van der Ost R, Carion A, Suarez-Ulloa V, Silvestre F, Escher BI, Engwall M, Nilén G, Keiter SH, Pollet, D, Waldmann P, Kienle C, Werner I, Haigis AC, Knapen D, Vergauwen L, Sperh M, Schulz W, Busch W, Leuthold D, Scholz S, vom Berg CM, Basu N, Murphy A, Lampert A, Kuckelkorn J, Grummt T, Hollert H (2018) An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. Environmental Sciences Europe 30(1): 46. doi.org/10.1186/s12302-018-0173-x

Li B, Stribley JA, Ticu A, Xie W, Schopfer LM, Hammond P, Brimijoin S, Hinrichs SH, Lockridge O (2000) Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. Journal of Neurochemistry 75(3): 1320-1331. doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.751320.x

Lowe C, Butt K (2005) Culture techniques for soil dwelling earthworms: A review. Pedobiologia 49:401-413. doi.org/10.1016/j.pedobi.2005.04.005

Lowe C, Butt K (2007) Culture of commercially obtained *Lumbricus terrestris* L.: Implications for sub-lethal ecotoxicological testing. Soil Biology and Biochemistry 39: 1674-1679. doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.01.021

Mangas I, Vilanova E, Estévez J, França TCC (2016) Neurotoxic effects associated with current uses of organophosphorus compounds. Journal of the Brazilian Chemical Society 27(5): 809-825. doi.org/10.5935/0103-5053.20160084

Marklund A, Andersson B, Haglund P (2003) Screening of organophosphorus compounds and their distribution in various indoor environments. Chemosphere 53(9): 1137-1146. doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00666-0

Martínez-Morcillo S, Rodríguez-Gil JL, Fernández-Rubio J, Rodríguez-Mozaz S, Míguez-Santiyán MP, Valdes ME, Barceló D, Valcárcel Y (2020) Presence of pharmaceutical compounds, levels of biochemical biomarkers in seafood tissues and risk assessment for

human health: Results from a case study in North-Western Spain. International Journal of Hygiene and Environmental Health 223(1): 10-21. doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.011

Martínez-Morcillo S, Yela JL, Capowiez Y, Mazzia C, Rault M, Sánchez-Hernández JC (2013) Avoidance behaviour response and esterase inhibition in the earthworm, *Lumbricus terrestris*, after exposure to chlorpyrifos. Ecotoxicology 22(4): 597-607. doi.org/10.1007/s10646-013-1051-3

Masjosthusmann S, Barenys M, El-Gamal M, Geerts L, Gerosa L, Gorreja A, Kühne B, Marchetti N, Tigges J, Viviani B, Witters H, Fritsche E (2018) Literature review and appraisal on alternative neurotoxicity testing methods. EFSA Supporting Publications 15(4): 1410E. doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1410

McKellar QA, Jackson F (2004) Veterinary anthelmintics: old and new. TRENDS in Parasitology 20(10): 456-461. doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.002

Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, Tschöp MH (2015) Ghrelin. Molecular Metabolism 4(6): 437-460. doi.org/10.1016/j.molmet.2015.03.005

Myers M, Richmond RC, Oakeshott JG (1988) On the origins of esterases. Molecular Biology and Evolution 5(2): 113-119. doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040485

Nos D, Navarro J, Barría C, Solé M (2017) Carboxylesterase activities in chondrichthyans of the western Mediterranean Sea. Marine Pollution Bulletin 119(1): 332-335. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.021

OECD n203: Fish, Acute Toxicity Testing. OECD Publishing; 2019.

OECD n207: Earthworm acute toxicity test. OECD Publishing; 1984.

OECD n418: Delayed neurotoxicity of organophosphorus substances following acute exposure. OECD Publishing; 1995

OECD n419: Delayed neurotoxicity of organophosphorus substances: 28-day repeated dose study. OECD Publishing; 1995

OECD n424: Neurotoxicity Study in Rodents. OECD Publishing; 1997

OECD n426: Developmental neurotoxicity study. OECD Publishing; 2007

OECD, 2009. OECD in figures 2009. Organization for Economic Cooperation and Development (Ed), Paris, France. doi:10.1787/oif-2009-en

ONU (1993) Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction, Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, The Hague.

PAN, Pesticide Action Network Europe (2018) Ríos hormonados. Amplia presencia de plaguicidas disruptores endocrinos en los ríos españoles. https://www.ecologistasenaccion.org/wp-content/uploads/adjuntos-pip/pdf/informe-rios-hormonados.pdf.

Pearson GL (2001) Field manual of wildlife diseases: general field procedures and diseases of birds. Journal of Wildlife Diseases 37(1): 208-211.

Pelosi C, Barot S, Capowiez Y, Hedde M, Vandenbulcke F (2014) Pesticides and earthworms. A review. Agronomy for Sustainable Development 34(1): 199-228. doi.org/10.1007/s13593-013-0151-z

Phillips PA, Yang L, Shulkes A, Vonlaufen A, Poljak A, Bustamante S, Warren A, Xu Z, Guilhaus M, Pirola R (2010) Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 17397-17402. doi.org/10.1073/pnas.1000359107

Plaza PI, Martínez-López E, Lambertucci SA (2019) The perfect threat: Pesticides and vultures. Science of the Total Environment 687: 1207-1218. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.160

Pohanka M (2019) Diagnoses of pathological states based on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Current Medicinal Chemistry. doi.org/10.2174/0929867326666190130161202

Ragnarsdottir KV (2000) Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. Journal of the Geological Society 157(4): 859-876. doi.org/10.1144/jgs.157.4.859

Reglamento (CEE) nº 2078/92 del Consejo, de 30 de junio de 1992, sobre métodos de producción agraria compatibles con las exigencias de la protección del medio ambiente y la conservación del espacio natural (DOCE nº 215, de 30 de julio de 1992).

Reglamento de Ejecución (UE) 2019/1090 de la Comisión, de 26 de junio de 2019, por el que no se renueva la aprobación de la sustancia activa dimetoato con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) n.° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, y se modifica el anexo del Reglamento de Ejecución (UE) n.° 540/2011 de la Comisión (DOUE nº173, de 27 de junio de 2019).

Reglamento de Ejecución (UE) 2020/18 de la Comisión de 10 de enero de 2020 por el que no se renueva la aprobación de la sustancia activa clorpirifos con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, y se modifica el anexo del Reglamento de Ejecución (UE) 540/2011 de la Comisión (DOUE nº7, de 13 de enero de 2020).

Reynolds JW (1994) Earthworms of the world. Global Biodiversity 4(1): 11-16.

Ribalta C, Sánchez-Hernández JC, Solé M (2015) Hepatic biotransformation and antioxidant enzyme activities in Mediterranean fish from different habitat depths. Science of the Total Environment 532: 176-183. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.001

Riviere JE (2011) Dermal absorption/toxicity of organophosphates and carbamates. En Gupta RC (ed) Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compound (pp. 411-422). Academic Press. London. doi.org/10.1016/B978-012088523-7/50031-4

Robb EL, Baker MB (2019) Organophosphate toxicity. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470430/

Rodríguez-Castellanos L, Sánchez-Hernández JC (2007) Chemical reactivation and aging kinetics of organophosphorus-inhibited cholinesterases from two earthworm species. Environmental Toxicology and Chemistry 26: 1992-2000. doi.org/10.1897/06-625R1.1

Rosman Y, Eisenkraft A, Milk N, Shiyovich A, Ophir N, Shrot S, Kreiss Y, Kassirer M (2014) Lessons learned from the Syrian sarin attack: evaluation of a clinical syndrome through social media. Annals of Internal Medicine 160: 644–648. doi.org/10.7326/M13-2799

Rubio M (2015) Carboxilesterasas y colinesterasas de cerebro de pollo: interacciones entre sustratos e inhibidores neurotóxicos. Tesis Doctoral, Universidad Miguel Hernández de Elche.

Rufli H (2012) Introduction of moribund category to OECD fish acute test and its effect on suffering and LC50-values. Environmental Toxicology and Chemistry 31:1107-1112. doi.org/10.1002/etc.1779

Sánchez-Hernández JC (2006) Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 188: 85-126. doi.org/10.1007/978-0-387-32964-2_3

Sánchez-Hernández JC (2007) Ecotoxicological perspectives of b-esterases in the assessment of pesticide contamination. En Plattenberg RH (ed) Environmental Pollution: New Research (pp. 1-45). Nova Science Publishers, Inc. New York.

Sánchez-Hernández JC (2011) Pesticide biomarkers in terrestrial invertebrates. En Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment. doi.org/10.5772/16644

Sánchez-Hernández JC (2019) Bioremediation of pesticide-contaminated soils by using earthworms. Bioremediation of Agricultural Soils 165-192.

Sánchez-Hernández JC, Cares XA, Pérez MA, del Pino JN (2019) Biochar increases pesticide-detoxifying carboxylesterases along earthworm burrows. Science of the Total Environment 667: 761-768. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.402

Sánchez-Hernández JC, Martinez-Morcillo S, del Pino JN, Ruiz P (2014a) Earthworm activity increases pesticide-sensitive esterases in soil. Soil Biology and Biochemistry 75: 186-196.

Sánchez-Hernández JC, Narvaez C, Sabat P, Martinez-Mocillo S (2014b) Integrated biomarker analysis of chlorpyrifos metabolism and toxicity in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. Science of the Total Environment 490: 445-455. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.037

Satoh T, Hosokawa M (2000) Organophosphates and their impact on the global environment. Neurotoxicology 21(1-2): 223-227.

Singh RN, Pandey RK, Singh NN, Das VK (2009) Acute toxicity and behavioral responses of common carp *Cyprinus carpio* (Linn.) to an organophosphate (Dimethoate). World Journal of Zoology 4: 70-75.

Sogorb MA, Estévez J, Vilanova E (2014) Biomarkers in biomonitoring of xenobiotics. En Gupta RH (ed) Biomarkers in Toxicology (pp. 965-973). Academic Press, London.

Sogorb MA, 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 organophosphorus and carbamate insecticides. Toxicology Letters 168(3): 278-285. doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.10.024

Sogorb MA, Vilanova E (2002) Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. Toxicology Letters 128 (1-3): 215-228. doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00543-4

Solé M, Sánchez-Hernández JC (2015) An in vitro screening with emerging contaminants reveals inhibition of carboxylesterase activity in aquatic organisms. Aquatic Toxicology 169: 215-222. doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.001.

Solé M, Shaw J, Frickers P, Readman J, Hutchinson T (2010) Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. Analytical and Bioanalytical Chemistry 396(2): 649-656. doi.org/10.1007/s00216-009-3182-1

Soler F, Oropesa AL, Pérez-López M (2006) Análisis de los envenenamientos en fauna silvestre. Situación en Extremadura. Revista de Toxicología 23(1): 35-38

Solomon KR, Williams WM, Mackay D, Purdy J, Giddings JM, Giesy JP (2014) Properties and uses of chlorpyrifos in the United States. En Giesy JP and Solomon KR (eds) Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States (pp. 13-34). Springer, London.

Soreq H, Seidman S (2001) Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. Nature Reviews Neuroscience 2(4): 294-302. doi.org/10.1038/35067589

Sparling DW (2016) Ecotoxicology essentials: environmental contaminants and their biological effects on animals and plants. Academic Press. London.

Stallones L, Beseler CL (2016) Assessing the connection between organophosphate pesticide poisoning and mental health: A comparison of neuropsychological symptoms from clinical observations, animal models and epidemiological studies. Cortex 74: 405-416. doi.org/10.1016/j.cortex.2015.10.002

Stansley W (1993) Field results using cholinesterase reactivation techniques to diagnose acute anticholinesterase poisoning in birds and fish. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 25: 315-321. doi.org/10.1007/BF00210723

Sutherland TD, Horne I, Weir KM, Coppin CH, Williams MR, Selleck M, Russell RJ, Oakeshott JG (2004) Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 31: 817-821. doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04088.x

Suzuki T, Morita H, Ono K, Maekawa K, Nagai R, Yazaki Y, Fujishima S (1995) Sarin poisoning in Tokyo subway. The Lancet 345(8955): 980-981. doi.org/10.5555/uri:pii:S0140673695907262

Tam NT, Berg H, Cong NV (2018) Evaluation of the joint toxicity of chlorpyrifos ethyl and fenobucarb on climbing perch (*Anabas testudineus*) from rice fields in the Mekong Delta, Vietnam. Environmental Science and Pollution Research 14: 13226-13234. doi.org/10.1007/s11356-016-6980-y

Taylor P, Radic Z (1994) The cholinesterases: from genes to proteins. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 34(1), 281-320.

Thompson HM (1999) Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. Ecotoxicology 8: 369-384. doi.org/10.1023/A:1008934505370

Thompson HM, Mackness MI, Walker CH, Hardy AR (1991) Species differences in avian serum B esterases revealed by chromatofocusing and possible relationships of esterase activity to pesticide toxicity. Biochemical Pharmacology 41(8): 1235-1240. doi.org/10.1016/0006-2952(91)90663-P

Thompson CM, Richardson RJ (2004) Anticholinesterase insecticides. En Marrs TC and Ballantyne B (eds) Pesticide Toxicology and International Regulation (pp. 89-127). John Wiley & Sons Ltd., Chichester. https://doi.org/10.1002/0470091673.ch3

UE Union Europea (2019) Declaración: "Un futuro digital inteligente y sostenible para la agricultura europea y las áreas rurales". https://ec.europa.eu/newsroom/dae/document.cfm?doc_id=58563

Vale J (1998) Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. Toxicology Letters 102: 649-652. doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00277-X

Vale J, Timothy C, Marrs OBE, Robert L, Maynard CBE (2018) Novichok: a murderous nerve agent attack in the UK. Clinical Toxicology 56(11): 1093-1097. doi.org/10.1080/15563650.2018.1469759

Van Scoy A, Pennell A, Zhang X (2016) Environmental fate and toxicology of dimethoate. In Environmental fate and toxicology of dimethoate. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 237: 53-70. doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_3

Vidal CJ (2005) Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumours. Chemico-Biological Interactions 157: 227-232. doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.035

Vilanova E, Sogorb MA (1999) The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. Critical Reviews in Toxicology 29(1): 21-57. doi.org/10.1080/10408449991349177

Walker CH (2003) Neurotoxic pesticides and behavioural effects upon birds. Ecotoxicology 12(1-4): 307-316. doi.org/10.1023/A:1022523331343

Wang J, Yu XF, Zhao JJ, Shi SM, Fu L, Sui DL (2016) Ginsenoside Rg3 attenuated omethoate-induced lung injury in rats. Human and Experimental Toxicology 35: 677-684. doi.org/10.1177/0960327115597984

Westerink RH (2013) Do we really want to REACH out to in vitro? Neurotoxicology 39: 169-172. doi.org/10.1016/j.neuro.2013.10.001

Wheelock CE, Phillips BM, Anderson BS, Miller JL, Miller MJ, Hammock BD (2008) Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 195: 117-178. doi.org/10.1007/978-0-387-77030-7_5

Wheelock CE, Nakagawa Y (2010) Carboxylesterases – from function to the field: an overview of carboxylesterase biochemistry, structure–activity relationship, and use in environmental field monitoring. Journal of Pesticide Science 35: 215-217. doi.org/10.1584/jpestics.R10-12

WHO World Health Organization (2010) International code of conduct on the distribution and use of pesticides: Guidelines for the Registration of Pesticide. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70293/WHO_HTM_NTD_WHOPES_2010.7_eng.pdf;jsessionid=28BE4C2FA92CA20A6EF5FB9A44EF8EC4?sequence=

Yanagisawa N, Morita H, Nakajima T (2006) Sarin experiences in Japan: acute toxicity and long-term effects. Journal of the Neurological Sciences 249(1): 76-85. doi.org/10.1016/j.jns.2006.06.007

Zaranyika MF, Mlilo J (2014) Speciation and persistence of dimethoate in the aquatic environment: characterization in terms of a rate model that takes into account hydrolysis, photolysis, microbial degradation and adsorption of the pesticide by colloidal and sediment particles. South African Journal of Chemistry 67(1): 233-240.

Zucco F, De Angelis I, Testai E, Stammati A (2004) Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. Toxicology in Vitro 18(2): 153-163. doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00147-4

2. Reference intervals for B-esterases in gull, *Larus michahellis* (Nauman, 1840) from Northwest Spain: influence of age, gender and tissue

Salomé Martínez-Morcillo, Maria Chiara Perego, Jorge Vizuete, Francesca Caloni, Cristina Cortinovis, Luis Eusebio Fidalgo, Ana López-Beceiro, María Prado Míguez, Francisco Soler, Marcos Pérez-López

Environmental Science and Pollution Research (2017) 25(2): 1533-1542.
DOI: 10.1007/s11356-017-0630-x

Capítulo 2: Intervalos de referencia de las B-esterasas en gaviota *Larus michahellis* (Nauman, 1840) del noroeste de España: influencia de la edad, el género y el tejido.

En este trabajo se han medido las actividades enzimáticas AChE, BChE y CbE en hígado y músculo de gaviotas (*Larus michahellis*) procedentes de Galicia y Asturias, evaluando las diferencias observadas atendiendo a los factores género, edad y método de muestreo (campañas de control de población o recepción en el centro de recuperación de Fauna Silvestre). La posible exposición a OFs se ha estimado mediante la reactivación con 2-PAM de la actividad AChE. No hubo diferencias significativas entre individuos en función del género, mientras que entre tejidos se encontraron diferencias en la actividad CbE, pero no en la actividad ChE; lo que sugiere mayor susceptibilidad de la actividad CbE en presencia de OFs que podría actuar neutralizando el efecto sobre la AChE a nivel muscular. Este hecho se relacionaría con la presencia de una reactivación en el músculo del 10,67%, mientras que en el hígado se reactivó un 31,53%, observándose una reactivación mayor en el tejido de los animales procedentes de las campañas control de población. A la vista de los resultados se propone a esta especie como bioindicador de contaminación en ciudades, preferiblemente a partir de animales muestreados en campañas de control de poblaciones. En este trabajo se proporcionan valores de referencia susceptibles de ser usados en estudios de monitorización con esta especie adaptada a vivir en núcleos urbanos y por tanto potencialmente expuesta a compuestos OFs.

Palabras clave

Inhibidor colinesterasa, carboxilesterasa, acetilcolinesterasa, biomarcador, aves marinas

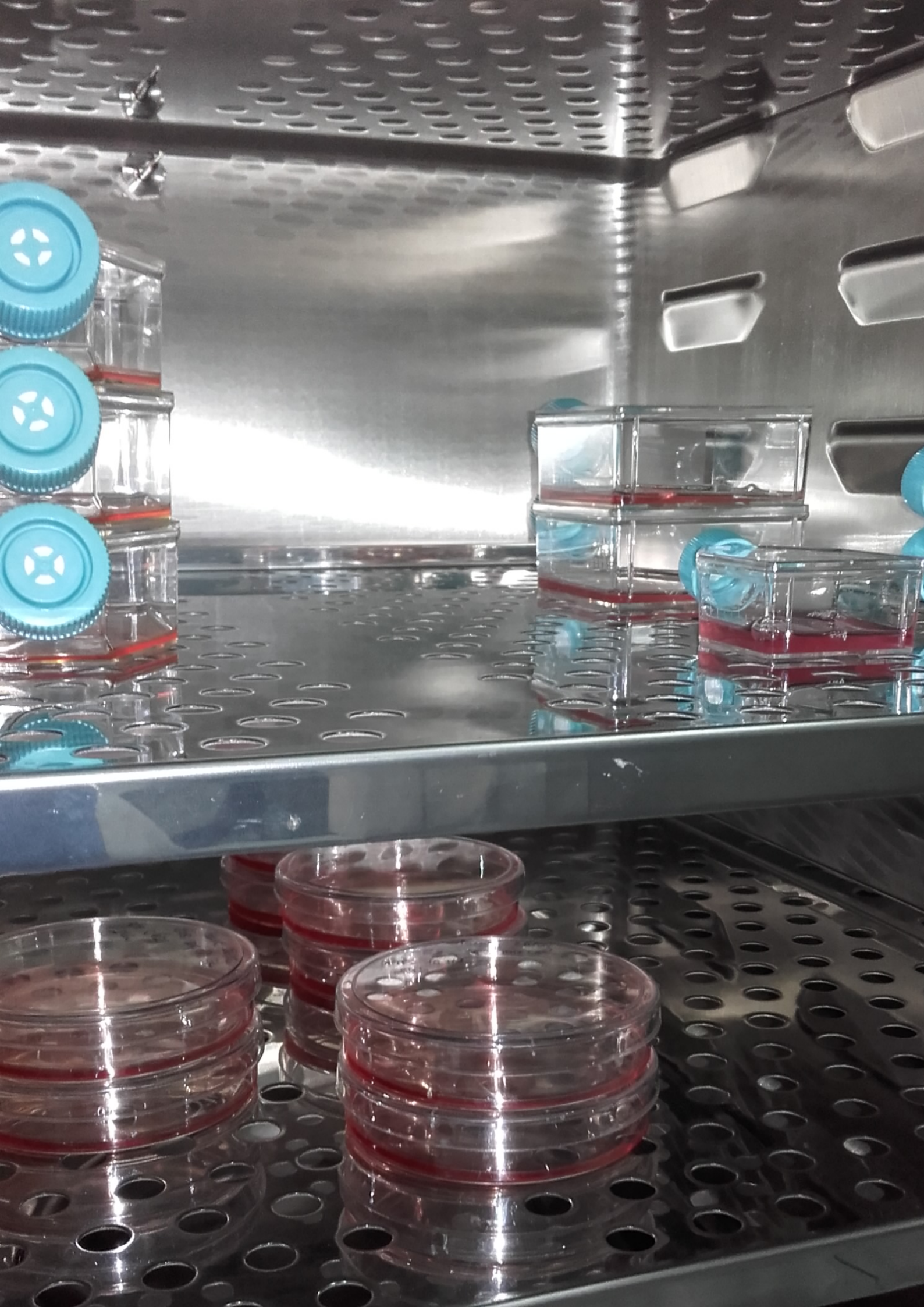
3. Comparative study of esterase activities in different tissues of marine fish species *Trachurus trachurus*, *Merluccius merluccius* and *Trisopterus luscus*

Salomé Martínez-Morcillo, Marcos Pérez-López, Yolanda Valcarcel, Mª Prado Míguez Santiyán, Francisco Soler-Rodríguez

Science of the Total Environment (2019) 679: 12-22.
DOI:10.1016/j.scitotenv.2019.05.047

Capítulo 3: Estudio comparativo de las actividades de esterasas en diferentes tejidos de especies de peces marinos *Trachurus trachurus*, *Merluccius merluccius* y *Trisopterus luscus*

En esta parte de la tesis doctoral, se han caracterizado y determinado las actividades B-esterasas por primera vez en tres especies de peces representativas del Atlántico: *Trachurus trachurus, Merluccius merluccius* y *Trisopterus luscus,* procedentes también de Galicia. Para el diagnóstico de la posible inhibición de la actividad AChE por la exposición a OFs, se usó la incubación con 2-PAM. En este estudio se evalúa además la sensibilidad de las actividades B-esterasas en cerebro, músculo e hígado, en presencia del clorpirifos y del clorpirifos-oxon. De forma general, entre las distintas actividades ChE, la AChE es la forma más abundante en el cerebro, mientras que en el músculo y el hígado la actividad pseudocolinesterasa es mayor. También en el hígado la actividad CbE es la más abundante en las tres especies de peces. Las reactivaciones en el cerebro no muestran signos de exposición de los peces a OFs. Tras la exposición a clorpirifos, la actividad AChE del cerebro es la más sensible, con IC_{50} menores. Sin embargo, frente al clorpirifos oxon, resulta ser el hígado seguido del músculo, los tejidos donde, tanto la AChE como la CbE, se inhiben a menores concentraciones de OFs. La mayor actividad de la BChE y CbE en este tejido, unido a la sensibilidad frente a la exposición a la forma oxo del clorpirifos, contribuirían frente a episodios de contaminación por OFs participando en los procesos de detoxificación, lo que neutralizaría la acción toxica en la actividad AChE.



4. The organophosphorus pesticide dimethoate decreases cell viability and induces changes in different biochemical parameters of rat pancreatic stellate cells

Salomé Martínez-Morcillo, Marcos Pérez-López, Francisco Soler-Rodríguez, Antonio González

Toxicology in Vitro (2018) 54: 89-92.

DOI: 10.1016/j.tiv.2018.09.011

Capítulo 4: El pesticida organofosforado dimetoato disminuye la viabilidad celular e induce cambios en diferentes parámetros bioquímicos de células estrelladas pancreáticas de rata

En este trabajo hemos estudiado los efectos que tiene el dimetoato sobre cultivos primarios de células estrelladas pancreáticas de rata *Wistar*. Además de la caracterización y determinación de B-esterasas, se ha estudiado la viabilidad celular, la generación de especies reactivas de oxígeno, y la movilización de calcio intracelular. Los resultados muestran que la incubación de las células en presencia de diferentes concentraciones de dimetoato (0,1, 1 y 10 µM) reduce su viabilidad, con un efecto más claro a las 96 horas de tratamiento. La incubación con el OF induce un incremento en la concentración de calcio intracelular a las tres concentraciones probadas. No hemos encontrado cambios significativos en la generación de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, a las 24 horas de exposición, a) la actividad AChE muestra inhibición significativa, en los tres tratamientos, dependiente de la concentración, b) la BChE se inhibe de igual forma a las tres concentraciones, y c) la CbE solo se inhibe significativamente a la mayor concentración. Resulta llamativo que en las preparaciones de los extractos citosólicos (una vez despegadas, tras el proceso de lisis y centrifugación) expuestos a dimetoato, las ChEs no se inhiben, mientras que sí lo hace la actividad CbE, lo que demuestra que en las células del páncreas íntegras hay mecanismos de biotransformación que hacen más tóxico al dimetoato en cuanto a su acción tóxica frente a las AChE, y que podrían relacionarse con la movilización de calcio intracelular y la disminución de la viabilidad celular.

5. Desarrollo del ensayo de toxicidad estandarizado OECD nº 207 en lombriz de tierra expuesta al pesticida organofosforado Dimetoato

Salomé Martínez-Morcillo, José Luis Rodríguez Testón, Mª Prado Míguez Santiyán, Francisco Soler, Marcos Pérez-López

Revista de Toxicología (2019) 36: 106-110.
http://rev.aetox.es/wp/wp-content/uploads/2019/12/vol-36-2-13-17.pdf

Capítulo 5: Desarrollo del ensayo de toxicidad estandarizado OECD nº 207 en lombriz de tierra expuesta al pesticida organofosforado Dimetoato

De acuerdo con el protocolo estandarizado por contacto en papel de filtro (OECD, nº 207) se ha estudiado el efecto del dimetoato en la formulación comercial DIMAFID 40 sobre la lombriz de tierra *Eisenia foetida*. El objetivo principal es la determinación de la CL_{50}. A partir de la Dosis de aplicación Recomendada por el Fabricante (DRF: 0,10%) en el ensayo se ha realizado la exposición a 5 concentraciones (0,001, 0,01, 0,10, 1 y 10%) y a los solventes orgánicos (ciclohexanona y xileno) del preparado comercial que se compararon con un grupo control. La CL_{50} obtenida coincide con la DRF, mientras que el NOEL (nivel sin efecto observable) se sitúa 10 veces por debajo de la DRF. Este trabajo fue el punto de partida a partir de cual se ha evaluado el efecto sobre las enzimas AChE y CbE (resultados pendientes de publicar). Los resultados de los efectos enzimáticos subletales muestran la inhibición significativa de la actividad AChE a partir del 0,001% del producto, alcanzando una inhibición del 98,9±0,1% en la DRF. La actividad CbE resultó menos sensible y fue a partir de 0,01% del producto cuando se inhibió significativamente, en la DRF la inhibición fue de 93,2 ±1,1%. Además, en el grupo de animales expuestos solo a los solventes orgánicos, también hubo una inhibición de la actividad de las dos enzimas analizadas (AChE = 10,7 ±6,1%; CbE = 19,4 ±4,8%). Por lo tanto, la Dosis Recomendada por el Fabricante es letal para la mitad de la población de lombrices estudiadas y a dosis 100 veces inferiores hay efectos subletales significativos sobre las enzimas analizadas.

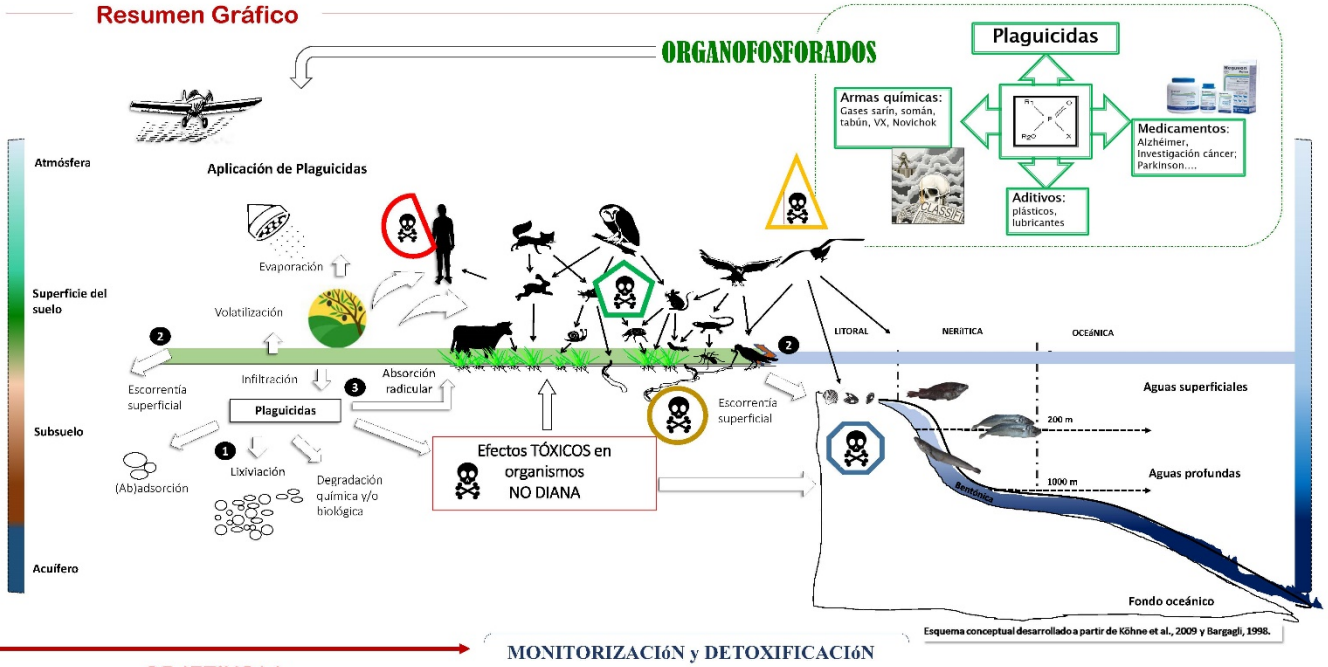
PAPEL de las ENZIMAS B-ESTERASAS en **Salud Pública y Animal:** MONITORIZACIÓN y DETOXIFICACIÓN de PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Martínez-Morcillo S, *Míguez Santiyán MP, Soler F, Pérez-López M*

Unidad de Toxicología, Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura, 10003 Cáceres

martinezmorcillo@unex.es

Resumen Gráfico



Esquema conceptual desarrollado a partir de Köhne et al., 2009 y Bargagli, 1998.

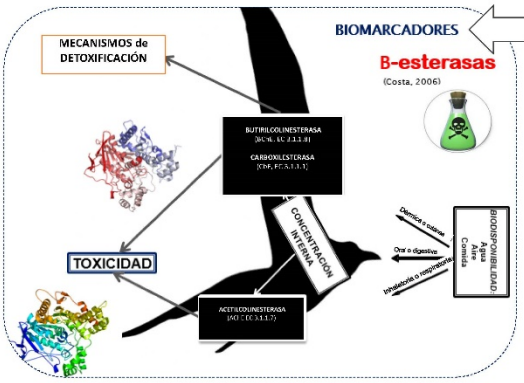
OBJETIVO(s)

Evaluar y caracterizar la actividad de enzimas B-esterasas en diferentes especies así como los mecanismos de toxicidad de plaguicidas organofosforados.

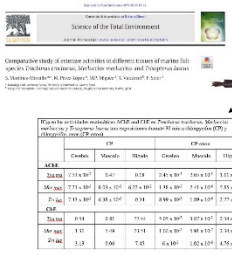
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Monitoreo de poblaciones silvestres: aves y peces.
- Ensayos *in vitro*: cultivos celulares (gliales y neuronales humanas; pancreáticas de rata).
- Ensayos estandarizados *in situ* con lombriz de tierra.

MONITORIZACIóN y DETOXIFICACIóN



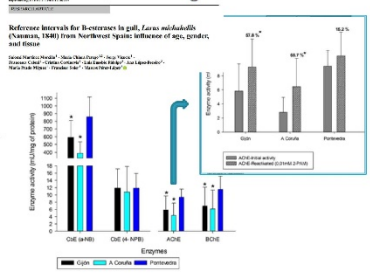
Fase 1: Biomonitorización>>



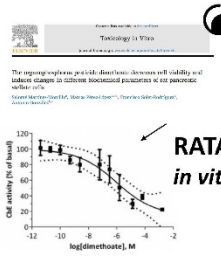
AVES

PECES

DESARROLLO y RESULTADOS



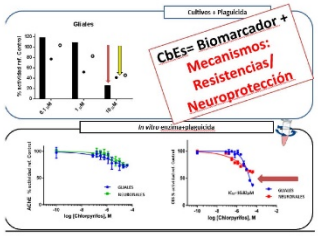
<<<Fase 2: Ensayos de Toxicidad



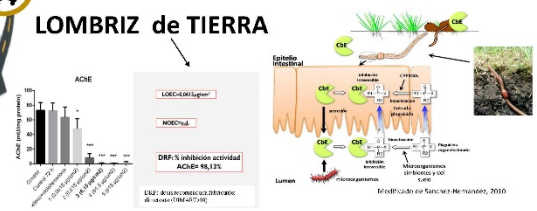
RATAS *in vitro*

HUMANOS *in vitro*

In progress



LOMBRIZ de TIERRA



Modificado de Sanchez-Hernandez, 2010

TOXICOLOGÍA
Biología
Fisiología

Agronomía
Ingeniería
Química
Bioquímica

Farmacología
Medicina
Patología
Epidemiología

Biomonitorización

Biorremediación Enzimática

Mecanismos: Resistencias Neuroprotección Detoxificación

APLICACIONES

JUNTA DE EXTREMADURA
Consejería de Economía e Infraestructuras

UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Una manera de hacer Europa

La difusión y realización del presente trabajo ha sido posible gracias a la financiación otorgada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y por la Junta de Extremadura al grupo de investigación a través de las ayudas con referencia GR 18080

6. Conclusiones generales

1. La gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*) de zonas urbanas (muestreadas en campañas de control de población) presenta menores actividades B-esterasas, y mayor inhibición y reactivación de las mismas, que los animales de zonas no urbanas (remitidos al centro de recuperación de fauna silvestre) especialmente en hígado**.** Por tanto, el uso de estos animales como especies centinela para estudios de biomonitorización en ambientes urbanos representa una herramienta útil para investigar el impacto de las actividades humanas derivados del uso de compuestos anticolinesterásicos, en organismos no objetivo.

2. En estas gaviotas, la actividad de las enzimas AChE, BChE y CbE presentes en el hígado podría relacionarse con el importante papel metabólico de estas B-esterasas en este tejido como biomarcadores de detoxificación de OFs.

3. En el jurel (*Trachurus trachurus*), la merluza (*Merluccius merluccius*) y la faneca (*Trisopterus luscus*) la actividad AChE es la principal ChE presente en los tejidos analizados, siendo el cerebro el que exhibe la mayor actividad de ChE, constituyendo, por tanto, el tejido más apropiado para fines de biomonitorización del efecto neurotóxico de anticolinesterásicos.

4. Los altos niveles de actividad CbE en el músculo y, particularmente, en el hígado en las tres especies de peces, proponen a esta enzima como biomarcador efectivo, ya que ha demostrado una alta sensibilidad en las exposiciones *in vitro* a clorpirifos y clorpirifos-oxon.

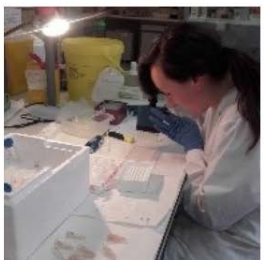
5. La exposición a dimetoato de cultivos primarios de células estrelladas pancreáticas de rata *Wistar* produce inhibición de las actividades esterasas, lo que pone en evidencia mecanismos de toxicidad del dimetoato en el páncreas, proponiéndose, por tanto, el uso de estos cultivos para el estudio toxicológico *in vitro* del efecto de OFs.

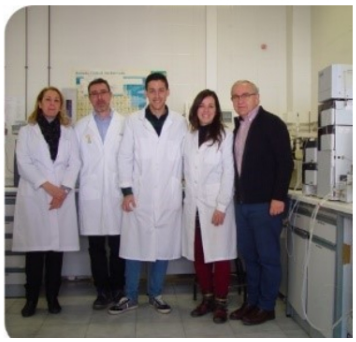
6. Utilizando el bioensayo *in vivo* con lombriz de tierra *Eisenia foetida* expuesta a dimetoato mediante el ensayo estandarizado de toxicidad aguda, la CL_{50} obtenida coincide con la dosis de aplicación recomendada por el fabricante (DRF), siendo la NOEC 10 veces inferior a la DRF, con lo que se refuerza la utilidad de estos animales en estudios de evaluación de impacto de OFs en el suelo.

7. Los datos aportados en los diferentes niveles de organización biológica incluidos en la Tesis contribuyen al aporte de valores basales y de parámetros enzimáticos, así como de los efectos producidos en las actividades B-esterasas tras las exposiciones a OFs, muy útiles como referencia en futuros estudios de la presencia y/o contaminación de OFs en diferentes matrices ambientales.

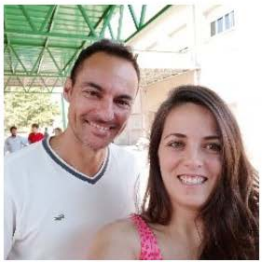
8. La aplicación de estos biomarcadores en estudios de monitorización y ensayos de toxicidad supone una metodología analíticamente sencilla, rápida, barata y reproducible, que proponemos incluir como complemento a la cuantificación química de los compuestos OFs en las Evaluaciones de Riesgo Ambiental.

9. Fomentar el uso de estos biomarcadores mejora el conocimiento de criterios toxicológicos en cuanto a los efectos biológicos, útiles para determinar el grado de exposición y la susceptibilidad de organismos diferentes. La complementación a los análisis químicos sería de especial relevancia cuando las concentraciones de los compuestos analizados se encuentren por debajo de los límites de cuantificación de las técnicas analíticas o las fuentes de exposición sean puntuales o intermitentes, siendo especialmente relevantes en exposiciones crónicas.





Happy Holidays
ABEJEO
chicas
AZIUS



Agradecimientos

Este apartado, al margen de la objetividad propia del campo de la investigación científica, supongo que generalmente es uno de los más complicados de escribir debido a la alta carga sentimental que conlleva. Pero los días en los que me toca escribirlo, resguardada de la COVID-19, dificultan más todavía hacerlo con el mimo y la atención que se merece, para no olvidarme de incluir aquí a cualquiera que haya formado parte del proceso de diseño, elaboración y presentación de esta tesis. Ante todo, en estos momentos por los que nadie hubiéramos siquiera podido imaginar vivir, y cuando el miedo y la incertidumbre acecha cualquier movimiento, acción o proyecto futuro, escribo estas líneas convencida de que lo superaremos, pero deseando con todas mis fuerzas que pueda ser un nuevo comienzo para entender la importancia de mantener los ecosistemas sanos y equilibrados, de fomentar y financiar la ciencia en todos los ámbitos, pero muy especialmente, la investigación en Salud Pública y Animal.

Precisamente por olvidar sectores estratégicos de las sociedades actuales, estamos viviendo momentos de angustia, al ver cómo el sistema de salud español enfrenta esta pandemia sin personal ni medios suficientes, por eso, incluyo aquí mi enorme agradecimiento al personal sanitario, por el compromiso y el gran esfuerzo que en estos días están llevando a cabo para salvar vidas. Esta responsabilidad y premura son con las que también trabajan algunos centros de investigación que ahora, cuando ya hay más de 300.000 fallecidos registrados en el mundo, sí reciben fondos, pero de forma urgente y con la angustia de intentar encontrar soluciones a contrarreloj para que el coronavirus no siga propagándose, así como para dar con curas efectivas para los que ya están infectados.

No me quiero olvidar de otro sector que en los últimos tiempos ha sido también muy denostado y menospreciado, el sector primario ha sido siempre vital, pero cuidarlo y mantenerlo fuerte, es fundamental para enfrentar situaciones así. Ojalá también se valore y se fomente el desarrollo de estas actividades, que en un país eminentemente agrícola y ganadero, permiten el abastecimiento de toda la población. Espero que recuperen el valor y la fuerza, se dignifiquen a nivel social y político, y que puedan formar parte de una economía que ya estaba en cuerda floja, y que ahora tendremos que coger con pinzas.

A nivel académico, agradezco que aún en tiempos de desconcierto y parálisis nacional, mis directores de tesis sigan estando al pie del cañón en todo momento, gracias a su confianza y apoyo, han sido y serán siempre, un pilar fundamental no solo en mi carrera, también en mi vida. Por todo, gracias, Marcos, Paco y Prado.

Hace unos años inicié esta aventura en Toledo y me adentré en la ciencia desde la investigación gracias a los profesores José Luis Yela y Juan Carlos Sánchez Hernández que fueron los primeros en animarme y confiar en que podría contribuir en este ámbito a través de la dedicación, vocación y formación continua, gracias. Gracias también a los compañeros de entonces, Vicente, Suraya, Kursat, Tatiana, Blanquita por las sesiones de laboratorio, de cafés de máquina a horas intempestivas, y por las cañas y vinos que se alargaban mientras intentábamos

solucionar nuestros mundos. Gracias también a mis *Tolemeños*, porque fuisteis los primeros en estar en los comienzos del inicio de una vida fuera de la familia de sangre. Con los que entendí que una vez salimos del nido, tenemos la responsabilidad de elegir a los amigos que se convertirán también para siempre, en nuestra familia.

Después de algunas vueltas y épocas de desconcierto personal, tengo que agradecer a Jesús por ponerme en contacto con el laboratorio de Toxicología en Cáceres, y a Marcos por confiar en mi desde el primer momento en el que hablamos, a todo el grupo gracias por los ánimos y darme la fuerza a pesar de la dificultad para encontrar financiación para sustentarme, para empezar y poder terminar la tesis. Gracias Cari, por las conversaciones y la ayuda en el laboratorio. Gracias, Jorge, David, Javi, Chiara, Vero, Ziani, Joaquín, Alfredo, Yolanda, Antonio y Nacho porque gracias a los ratos y conversaciones con vosotros, se han abierto nuevas líneas e inquietudes tan importantes para que nunca haya podido parar de pensar. A mis chicas del *Tatocao* Angelina, Marta y Herminia por estar siempre ahí y por volver siempre a reencontrarnos como si no hubiera pasado el tiempo, por nuestras alegrías y tristezas compartidas, por creer siempre en mí, a veces incluso más que yo misma. Y a mis grandes amigos Sara y Chema por la compañía y el apoyo en cualquier situación de las vividas y por las que vendrán, GRACIAS.

A mi familia, por el cariño, la educación y la fortaleza de mis padres que, desde un pueblo de Albacete, con vidas y profesiones muy duras, me han inculcado siempre el sentido del sacrificio y la seguridad de que con trabajo, cualquier objetivo es posible. Gracias a mis hermanos, por entenderme, valorarme y mandarme siempre vuestro cariño en todo momento a pesar de la distancia. A mis abuelos, porque sé que llegue donde llegue, estarán siempre orgullosos de mí, aunque seguro que no tanto como yo lo estaré siempre de ellos, de ser su nieta y de haberlos podido conocer y disfrutar tanto.

A la familia de Torreorgaz por acogerme y sobre todo por darme al que, aunque aún me cueste decirlo, es mi recién marido. Juanfran, gracias por matar los monstruos y acabar siempre con las dudas, por hacerme creer que somos indestructibles, y que con fuerza y optimismo ¡TODO SALDRÁ BIEN!

En definitiva, a todos los que hasta ahora habéis formado parte de esta aventura tan maravillosa, ¡¡GRACIAS!!

Afiliación de los Co-Autores

Dr. Marcos Pérez-López marcospl@unex.es
Área de Toxicología de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.

Dr. Francisco Soler Rodríguez solertox@unex.es
Área de Toxicología de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.

Dra. Mª Prado Míguez Santiyán mpmiguez@unex.es
Área de Toxicología de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.

Dr. Antonio González Mateo agmateos@unex.es
Área de Fisiología. Instituto de Biomarcadores de Patologías Moleculares (IBPM). Universidad de Extremadura, Cáceres.

Dra. Francesca Caloni francesca.caloni@unimi.it
Departamento de Medicina Veterinaria (DIMEVET), Universidad de Milán, Italia.

Dra. Cristina Cortinovis cristina.cortinovis@unimi.it
Departamento de Medicina Veterinaria (DIMEVET), Universidad de Milán, Italia.

Dr. Luis Eusebio Fidalgo luis.fidalgo@usc.es
Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.

Dra. Ana López-Beceiro ana.lopez.beceiro@usc.es
Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo.

Dra. Yolanda Valcarcel agmateos@unex.es
Grupo de Toxicología Ambiental y Evaluación de Riesgos, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid.

Jorge Vizuete jorgevizuete1@gmail.com
Área de Toxicología de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.

Maria Chiara Perego mcperego@tiscali.it
Departamento de Medicina Veterinaria (DIMEVET), Universidad de Milán, Italia.

José Luis Rodríguez Testón jrodriguov@alumnos.unex.es
Área de Toxicología de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.