



CARRERA DE LICENCIATURA EN KINESIOLOGÍA Y FISIATRÍA
TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

**TEMA: Análisis del Carbaril y su relación con el
desarrollo de la obesidad**

Alumno: Ochoa Ezequiel

Director: Pamela Pamer

Co-Director: Barrios Daniel

Río Negro - Año 2022

Contenido

INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	5
GENERAL	5
ESPECÍFICOS.....	5
PERSONALES	5
HIPÓTESIS	5
MARCO TEÓRICO	6
METODOLOGÍA	17
1. Estudios de toxicidad y disrupción endocrina del Carbaril.....	17
1.1. Mantenimiento de peces cebra.....	18
1.2. Evaluación de la toxicidad del carbaril en huevos y juveniles de pez cebra. .	18
1.3. Carbaril suministrado en las peceras con peces adultos.....	19
1.5. Obtencion de plasma a partir de peces cebra adultos.....	20
1.6. Análisis histopatológico	20
1.7 Visualización de los adipocitos con microscopio	21
1.8. Método enzimático para la determinación de colesterol en plasma.....	21
1.9 Método enzimático para la determinación de triglicéridos en plasma.....	21
2.0 Tratamiento de los resultados.....	22
RESULTADOS.....	23
Toxicidad aguda en huevos del pez cebra. Curva dosis-respuesta.....	23
Toxicidad aguda en juveniles del pez cebra. Curvas dosis-respuesta	25
Evaluación de efectos adversos crónicos de dosis subletales de Carbaril	26
CONCLUSIÓN	31
DISCUSIÓN	31
BIBLIOGRAFÍA	33

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a mi equipo de trabajo que siempre estuvo al pie del cañón para todo. Pame, profe, kine mentora, amiga, por ratos madre y compañera de horas lerdas, donde el mate era un buen aliado, después de que las pestañas quemaran y que las neuronas estuvieran en corto. Gracias de corazón por todo.

Dani, un tipazo como pocos, hombre del bien que siempre está de buen humor y dispuesto a ayudar, admiro mucho tu paciencia pesquera (jaja), gracias por tanto.

Agradecimiento especial para mi querida familia que siempre me acompañó y sostuvo todo este tiempo, "mi pequeña manada" como me gusta decirle (viejito y hermano) gracias infinitas siempre, los quiero mucho, esto es para ustedes.

A mis abuelitos también agradezco y dedico esta investigación, ahora si los voy a poder atender sin hacer curanderismo (jaja)

A mis compas y amigos universitarios que estuvieron conmigo desde el principio y aun siguen estando firmes, gracias especiales, sin ustedes no hubiera sido posible esto, les debo muchísimo, siempre en mi cora(Lara, Fabi, Cami, Fede, Lucas y Rocio) Gracias al resto que se fue sumando con el tiempo y brindando buenos momentos en mi instancia universitaria (Matuche, Gonza, Jere, Agos) los aprecio un montón.

Gracias a las prácticas que me permitieron conocer a Cotita la cual me hizo ver la otra cara de la kinesiología. La parte emotiva, contenedora y amorosa que también resulta terapéutica. Y por supuesto la parte de Respi que tanto maneja (jaja)

Agradecer a cada Profe por brindar su granito de Arena en esta instancia, me llevo un poco de cada uno en especial de Gonza Negro, su dedicacion y compromiso al Igual que Vero Cevoli, dos fanaticos de su profesion, Pame su templanza, seguridad y conocimiento. Capaccioni gracias por cuidar y adorar tanto a la profesión.

Y al resto por forjar parte de mi formación, admiro mucho a cada uno de ustedes, gracias totales.

Gracias a las chicas del laboratorio de la uni que me dieron una re mano.

Y por último y no menos importante a Sherrington, mi fiel compañero.

ANÁLISIS DEL CARBARIL Y SU RELACIÓN CON LA OBESIDAD

INTRODUCCIÓN

La OMS define a la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud, con el potencial de causar diversas discapacidades físicas y problemas psicológicos, a su vez el exceso de peso aumenta drásticamente el riesgo de que una persona desarrolle una serie de enfermedades no transmisibles (ENT), incluidas las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y la diabetes, permitiéndola contemplar como el quinto factor principal de riesgo de defunción en el mundo (2.8 millones de adulto/año). Según estimaciones más recientes propuestas por la OMS informan que en 2016 había más de 340 millones de niños y adolescentes (de 5 a 19 años) con sobrepeso u obesidad; y más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos. (Villalobos, 2010; WHO, 2020).

Por su parte López Chicharro define en su libro, “fisiología clínica del ejercicio 2008”, (Chicharro, L. J, 2008) a la obesidad como una enfermedad crónica, multifactorial y compleja, que implica aspectos ambientales (sociales, culturales) genéticos, fisiológicos, metabólicos, psicológicos y de comportamiento. Convirtiéndose en uno de los más grandes retos para la salud pública a partir de todas las complicaciones que esta acarrea afectando a todos por igual (independientemente del sexo, la etnia, la edad, la nacionalidad, el nivel educativo y/o los recursos económicos) (WHO,2020) Tratándose de una enfermedad multifactorial, podríamos decir que existe una variabilidad interindividual que justifica el diagnóstico y tratamiento personalizado.

Tradicionalmente, el Kinesiólogo no ha sido un miembro indispensable del equipo de salud para trabajar en el tratamiento de patologías como la obesidad, no por falta de incumbencia sino por falta de participación.

En los últimos años, nuestra profesión se ha diversificado en un gran abanico de abordajes para tratar las causas y consecuencias que derivan de este diagnóstico, donde la elección de los objetivos terapéuticos planteados por el profesional se inclinarán de acuerdo a las características que presenta el pacientes con respecto a dicha enfermedad, que van desde el tratamiento estético empleado para las imperfecciones abocadas a la piel, trastornos venolinfática y postquirúrgicos (ej.

Bypass gástrico, liposucción). Los trastornos de la motilidad, motricidad y movilidad visceral pueden ser afrontados con las herramientas que la osteopatía proporciona. Es usual encontrar pacientes que padecen como consecuencia de esta patología, alteraciones osteoarticulares pudiendo abordarlas desde la traumatología.

Teniendo cuenta los pilares de la kinesiología: Kinesiterapia, Fisioterapia y Kinefilaxia, el abordaje de esta última plantearía como objetivo limitar el desarrollo e instalación de la enfermedad, haciendo hincapié en la prevención, alertando en la adquisición de malos hábitos alimenticios, higiénicos, culturales y en la concientización para la aceptación de su patología. Por lo tanto es imprescindible instrumentar la cooperación entre diferentes disciplinas para lograr una mirada más amplia, que permita organizar estrategias que se adecuen para abordar a estos pacientes, considerando la parcialidad que suele imponer el saber especializado, debido al recorte de la realidad, específico de cada campo disciplinar, asistiendo día a día a la creciente atomización del saber en general y del hombre en particular, por parte del personal de salud.

Desde principios de la década pasada se ha invocado la posibilidad de que agentes químicos tóxicos ambientales como *pesticidas* pudiesen contribuir al aumento de la frecuencia de la obesidad en la población (Baillie-Hamilton, PF, 2002). La hipótesis clínica sugiere que la exposición humana a contaminantes ambientales, con actividad disruptiva endocrina del tipo "obesogénica", interfiere de forma inapropiada sobre el metabolismo lipídico y la adipogénesis, afectando rutas de señalización, tanto hormonales como neurológicas, entre otros mecanismos, promoviendo el sobrepeso y la obesidad, no solo de las personas expuestas, sino también de su descendencia. (Fernandez et al. 2017)

El catálogo completo de residuos químicos que pueden contribuir a esta hipótesis ambiental no está aún establecido, aunque ya se conocen algunos compuestos obesógenos, tales como ciertos *Pesticidas* (Fernandez et al, 2017).

Un informe de los últimos años del ministerio de producción de Río Negro pone a los Carbamatos como uno de los 10 *pesticidas* más empleados, hallando como una subclasificación de estos, al Carbaril. Con lo cual resulta interesante poder conocer si existe alguna relación entre este *pesticida* y el desarrollo de obesidad.

Por otra parte, existe escasa información sobre investigaciones que asocien la obesidad con el Carbaril, resultando significativo el aporte del estudio de Martínez et al. (1996) donde introduce esta hipótesis, utilizando como modelo de estudio a las microalgas (*Ankistrodesmus falcatus*) pudiendo observar un aumento en la

concentración de lípidos dependiendo la concentración de Carbaril empleada (Martinez, et al, 1996).

Por consiguiente resulta enriquecedora la adquisición e interiorización del concepto de “DISRUPTORES ENDOCRINOS” como posibles agravantes o contribuyentes de la obesidad, brindándonos herramientas kinofilaxticas en nuestra capacidad para prevenir la obesidad y sus consecuencias asociadas, lo cual traería beneficios en el impacto del costo de salud y mejoraría el bienestar de la población.

OBJETIVOS

GENERAL

- Generar nuevos conocimientos sobre los efectos tóxicos y nocivos del Carbaril en la contribución de la obesidad en un modelo animal.

ESPECÍFICOS

- Evaluar la toxicidad del carbaril en el modelo del pez cebra.
- Determinar si el carbaril es un DE en el pez cebra.
- Estudiar los efectos crónicos (toxicidad, obesidad y lípidos plasmáticos) de dosis subletales de Carbaril en peces cebra adultos
- Determinar la dosis letal 50 en huevos y juveniles de pez Cebra

PERSONALES

- Generar en la comunidad información para reconocer el problema de la obesidad como pandemia y que les permita comprometerse dentro de sus posibilidades y realizar los cambios necesarios.
- Deconstruir las barreras dentro del equipo interdisciplinario de salud, para favorecer la atención de la comunidad.

HIPÓTESIS

- El Carbaril en concentraciones no tóxicas es capaz de contribuir al desarrollo de la obesidad.

MARCO TEÓRICO

Se ha acuñado el término de Disruptores Endocrinos para referirse a toda sustancia química exógena con actividad hormonal, con capacidad de alterar la homeostasis endocrina por similitud, por afinidad hormonal, por antagonismo, por interferencia fisiológica o por modificación de receptores específicos, que ocasione efectos adversos a la salud del organismo o a su progenie (Román González et al 2005). Según Chacón et al (2007), estas sustancias pueden actuar por medio de diferentes mecanismos de acción ya sea de forma conjunta o aislada: Mimetizando la acción de las hormonas confundiendo a sus receptores celulares. Antagonizando la acción de las hormonas. Alterando el patrón de síntesis, transporte y metabolismo hormonal. y/o Modulando los valores de los receptores hormonales correspondientes.

Se ha indicado que aún en dosis extremadamente bajas, como son los niveles en que se encuentran los contaminantes medioambientales, sumado a la peculiaridad de ser ubicuas en nuestro entorno, estamos expuestos en mayor o menor grado a sufrir de alteraciones en el sistema hormonal y tener consecuencias neurológicas, reproductivas, inmunológicas y metabólicas, y lo que es más importante, la exposición ha aumentado en los últimos años en paralelo con la epidemia de obesidad (McAllister (2009); Morales Ovalles 2014).

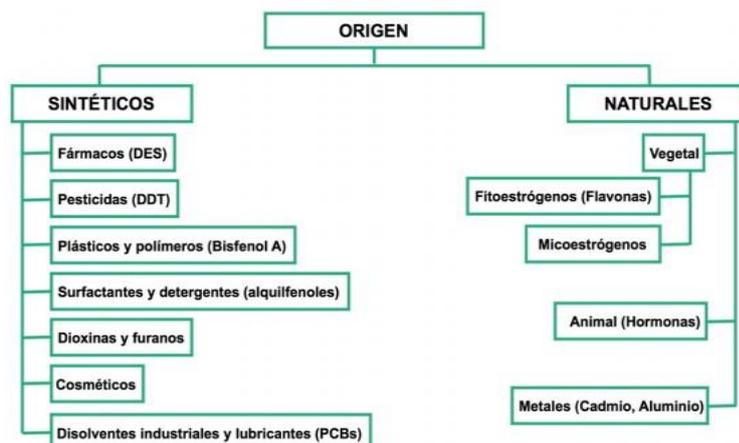
Característicamente según Iribarne-Durán (2020), pueden actuar a concentraciones bajas y de forma combinada con las hormonas endógenas, por lo que es difícil establecer un nivel umbral de no efecto, lo que confiere a los DE una especial peligrosidad ya que no existen dosis seguras. Cuando la exposición ocurre durante periodos del desarrollo del individuo con especial vulnerabilidad a la disrupción endocrina –embarazo, lactancia, pubertad- provocan daños que pueden manifestarse más tarde a lo largo de toda la vida. Resulta ser clínicamente más relevante ya que en estas etapas los organismos son extremadamente vulnerables a sustancias químicas con efecto similar a las hormonas. Se ha demostrado que el efecto de los DE es más intenso, pronunciado y con concentraciones menores en las primeras etapas del desarrollo (Talero, A. P. 2020). Ya que los sistemas protectores que se encuentran en la etapa adulta, tales como, reparación del ADN, un sistema

inmunológico competente, enzimas hepáticas desintoxicantes, y la barrera hematoencefálica no están completamente funcionales en las etapas fetal y neonatal. Además en la época fetal y prenatal el metabolismo está aumentado en comparación con los periodos posteriores del desarrollo, lo que puede potenciar el efecto de los DE. (García-Mayor, et al, 2012)

Como resultado de la exposición a DE en un determinado individuo se pueden observar consecuencias tras largos periodos de latencia o en generaciones posteriores ya sea por afectación genómica o mecanismos epigenéticos. Lo que distancia la exposición del efecto consecuente, y dificulta en gran medida el establecimiento de una asociación causal.

Generalmente, los individuos no están expuestos a un solo tipo de compuesto DE, sino a las mezclas de ellos (cóctel), por lo que los efectos son difícilmente predecibles dadas las posibles acciones sinérgicas, aditivas o antagónicas entre residuos químicos y por otro lado las curvas que relacionan dosis de exposición con el efecto adverso no son lineales, es decir, la respuesta no siempre aumenta en la misma proporción que la dosis de exposición.

No hay una clasificación precisa pero es posible agruparlos de la siguiente manera de acuerdo a su origen (Díaz González, L. 2018)



Hasta la fecha, la comunidad científica dentro de los DE ha identificado 20 obesógenos, una subclasificación de DE se emplea para aquellos xenobióticos que pueden estar presentes en el medio ambiente y/o en los alimentos, y que regulan y promueven de forma inapropiada la acumulación de lípidos y la adipogénesis. (García-Mayor, et al 2009; DE, PÚBLICO Y LOS RESPONSABLES.). En la lista de

obesogenos se incluyen sustancias liposolubles que pueden ser almacenadas dentro de los adipocitos, lo que alteraría la función del tejido graso, como por ejemplo algunos plaguicidas organoclorados (OC), bifenilos-policlorados (PCB), difeniléteres-polibromados (PBDE), compuestos químicos perfluorados (PFC), organotinoides como el tributiltin (TBT) y compuestos organoestánicos.

Otros Obesógenos no persistentes, acceden al organismo a diario y de manera cotidiana, y aunque son rápidamente excretados, su exposición continuada hace que contribuyan igualmente a la dosis interna. (Izaola, et al 2005)

Todas estas sustancias tienen la particularidad de generar sobrepeso u obesidad mediante el aumento en el número y tamaño de los adipocitos por la interferencia con los reguladores transcripciones del tipo PPAR (Receptores activados por proliferadores peroxisómicos), que favorecen la diferenciación de preadipocitos a adipocitos; Interfiriendo sobre los receptores esteroideos, alterando el almacenamiento lipídico; Alterando la sensación de hambre/saciedad moviendo el balance energético a favor del almacenamiento calórico o Inhibiendo la liberación de adiponectina por parte de los adipocitos ((2014; Talero, A. P. 2020):

Dentro del abanico de los Obesógenos se encuentran algunos Plaguicidas, considerados sustancias o mezclas de sustancias, naturales o sintéticas, formuladas para eliminar o para repeler plagas que afectan a cultivos de alimentos para el consumo humano, vida animal, o que transmitan enfermedades tanto a seres humanos como animales (Bateman 2017; Tadeo, J. L. 2019)

Durante los últimos 50 años, los plaguicidas (insecticidas, herbicidas y fungicidas) se han convertido en uno de los componentes principales de la agricultura y, aunque su uso es considerado económicamente rentable para la mayoría de los sistemas, los efectos secundarios que tienen sobre el ambiente y las personas son frecuentemente negativos. Se estima que únicamente el 10 % de los plaguicidas aplicados es absorbido por el organismo blanco, la resultante de estos compuestos pueden llegar a zonas más alejadas del área de aplicación arrastrados por el viento, cursos de aguas continentales, corrientes marinas y a través de las cadenas biológicas, afectando a un sin fin de especies entre ellas los seres humanos (Ferraro, 2005; Boland et al. 2007; Linney, 2005)

La evolución del uso de agroquímicos durante las últimas tres décadas en Argentina, presenta ciertos datos relevantes, es importante aclarar que la labor estatal ha sido pobre a la hora de recabar dichos datos, que en general están desactualizados y las

omisiones estatales no han podido ser suplidas con datos de fuentes privadas. (Paz Belada, 2017).

En el año 2011 la cantidad de herbicidas comercializada en el mercado argentino ascendió a 335,83 millones de Kg, lo que representó 1215,4 millones de dólares según Moltoni, L. (2012). Convirtiendo a la Argentina en uno de los países con el mayor consumo de agroquímicos del mundo, y paradójicamente sin contar con un debido control del uso y la aplicación de éstos productos, de ahí que en el país 12 millones de personas están expuestas a potenciales aplicaciones defectuosas de agroquímicos efectuadas por aplicadores que en muchos casos están insuficientemente capacitados, operando maquinaria y manipulando productos tóxicos sin el debido equipamiento de seguridad (Paz Belada, 2017). Pudiendo estar expuestos a algunos de los 127 plaguicidas (organofosforados, carbamatos y organoclorados fundamentalmente) que presentan actividad disruptora endocrina.(Schock 2012). Formando parte de los Carbamatos se halla el Carbaril el cual es empleado como insecticida y acaricida de amplio espectro de uso agrícola y pecuario. Es utilizado para el control de 100 especies de insectos en frutas cítricas, algodón, bosques, césped, ornamentales y otras cosechas.

Su nombre químico asignado por la IUPAC es 1-naftilmetilcarbamato (Iturra Moreno, F. J. (2012); Arias, H. P. (2003)). Con fórmula molecular $C_{12}H_{11}NO_2$, cuya formulación comercial es Se-vin® (Rozo et al, 2015). Presentando un tiempo de degradación relativamente corto, pudiendo verse afectada por factores extrínsecos como la temperatura, pH, anoxia y alto contenido de materia orgánica. En aguas y suelos cuyo pH es básico, la degradación de carbaril es rápida: de 1,8 días a pH 8 comparada con la degradación a pH neutro o ácido (10,5 días a pH 7-7,4). (Boburg Castroconde, B. 2017) En experimentos de laboratorio su tiempo de vida es de tres a ocho días, mientras que ecosistemas acuáticos puede persistir durante más de un año. (Lin, et al, 2007)

En cuanto a su mecanismo de acción, resulta ser un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que es responsable de convertir la acetilcolina (ACh), un neurotransmisor, en acetato y colina en la sinapsis.(Linney,2005). Si no se produce la degradación de la ACh, el neurotransmisor permanece unido al receptor de acetilcolina (AChR) y la estimulación muscular persiste, lo que eventualmente conduce a la parálisis. (Behra 2002) .También se ha demostrado que este pesticida interactúa con los receptores de hidrocarburos de arilo (AhR) . Las funciones de AhR

son amplias e incluyen ayudar en la diferenciación celular, la proliferación celular y la regulación de las enzimas metabólicas. En términos de interacciones del Carbaril con AhR, se pueden clasificar como agonistas (desencadenando una respuesta celular) y antagonistas (bloqueando las respuestas agonistas), lo que implica que el Carbaril puede afectar a la expresión de los genes de manera positiva o negativa. (Schock 2012)

En condiciones de uso defectuoso o masivo este pesticida puede ingresar al organismo, a través de diferentes vías de entrada, pudiendo ser aisladas o simultáneas: las más comunes son la vía dérmica, la digestiva y la respiratoria. Una vez en el organismo se distribuye por el torrente sanguíneo. Por su parte los compuestos liposolubles se unen a las lipoproteínas, mientras que las moléculas hidrosolubles lo hacen a las proteínas plasmáticas o permanecen disueltas en la sangre. Para posteriormente ser metabolizados por dos reacciones: las reacciones de primera fase (oxidación, reducción e hidrólisis), que generalmente son catalizadas por enzimas hepáticas, y las de segunda fase, que son la conjugación y la síntesis. Los metabolitos resultantes de la primera fase son ligados a moléculas endógenas, sintetizándose componentes solubles en agua y fácilmente eliminables por bilis y orina. La biotransformación de los plaguicidas puede dar como resultado sustancias de reducida toxicidad o químicamente inactivas. Por el contrario, pueden generarse sustancias tóxicamente más activas que el compuesto original.

Mientras que sus desechos van a ser eliminados en la orina, las heces fecales y el aire exhalado. (Sampedro Martillo, K. D. R. 2013)

Según la F.A.O (2021) la ingesta Diaria Admisible (IDA) de Carbaril puede estimarse en un valor basado en la salud de 50 µg/l a partir de la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre residuos de plaguicidas de 0 a 0,008 mg/kg de peso corporal, suponiendo un adulto de 60 kg que bebe 2 litros de agua por día. En caso de exceder estos valores o incluso valores por debajo, pero si expuesto a un coctel de sustancias con capacidad disruptiva, es cuando aparecen una diversidad de enfermedades o alteraciones sobre el organismo. De las cuales resaltamos a la Obesidad, enfermedad de etiología multifactorial de curso crónico en la cual se involucran aspectos genéticos, ambientales y de estilo de vida que conducen a un trastorno metabólico. Se caracteriza por un aumento en los depósitos de la grasa corporal y por lo tanto ganancia de peso. Resultando en una gran heterogeneidad de expresiones clínicas. (García, E. 2004) Es importante comprender la importancia que entraña un

diagnóstico temprano, para evitar las complicaciones que esta acarrea, existiendo varios métodos de para poder identificarla, de los cuales destacamos:

- **IMC:** (Índice de masa corporal) se calcula dividiendo el peso (kg) por la altura en metros al cuadrado. Actualmente es el método de referencia más utilizado en los estudios clínicos. Es válido para personas adultas entre los 20 y los 65 años, independientemente del sexo. Además de establecer si un individuo es obeso o no, el IMC permite clasificar la magnitud de la obesidad del adulto en los grados. (Perea, et al. 2014)

Grado de obesidad	Índice de masa corporal
Individuo sano	18.50 a 24.99
Sobrepeso	25.0 a 29.99
Obesidad grado I	30.0 a 34.99
Obesidad grado II	35.0 a 39.99
Obesidad grado III	Superior a 40.0

- **DEXA** (Absorciometría con rayos X de doble energía), evalúa la densidad mineral ósea, la cantidad y distribución de la grasa corporal. A partir de un escáner central y dos tipos de rayos X a dosis bajas. Es considerada una técnica no invasiva y muy precisa que dura entre 10 a 20 min.
- **DENSITOMETRÍA** se basa en el principio de Arquímedes. Considera al organismo como un modelo formado por masa grasa y masa libre de grasa. En este hallamos dos métodos, el pesaje hidrostático y la pletismografía por desplazamiento.
- **BIOIMPEDANCIA ELÉCTRICA** es una técnica simple, rápida y no invasiva que permite la estimación del agua corporal total, basándose en la estrecha relación que hay entre las propiedades eléctricas del cuerpo humano, la composición corporal de los diferentes tejidos y del contenido total de agua en el cuerpo.
- **ANTROPOMETRÍA** es un método que requiere un material especial de precisión asequible (cálipers, balanzas y cintas métricas que producen estimaciones bastante validas y fiables del grado de obesidad). Permite estimar la cantidad de tejido adiposo en forma indirecta, aceptando el inconveniente de que no pueden distinguir entre masa grasa y masa libre de grasa (Krebs 2007).

Estos métodos diagnóstico se diferencian en la precisión y/o estimación para determinar la Masa Grasa; Entendemos por Masa Grasa o Tejido Adiposo (TA) a un órgano dinámico y metabólicamente activo, formando parte de una variedad especializada de tejido conectivo, cuya principal función es el almacenamiento de lípidos en forma de triacilglicéridos (Lafontan et al, 2009). Además de estar compuesto de lípidos, el TA también cuenta con fibroblastos, preadipocitos, pericitos, mastocitos, células endoteliales, una diversidad de células inmunes y entre estas células se disponen abundantes vasos sanguíneos, que en conjunto conforman la fracción estromal del TA. (Levin Ferreyra, F. 2019;Izaola 2015) Organizada inicialmente a partir de múltiples moléculas de señalización y una red de factores de transcripción que se regulan de forma secuencial e impulsan el proceso terminal de diferenciación, derivando de las células madre mesenquimáticas indiferenciadas (CMM). En una primera etapa del proceso la CMM converge en un pre-adipocito que no se diferencia morfológicamente de su célula precursora, pero en el que ocurren procesos de activación que involucran factores de transcripción. Posteriormente se inicia una etapa de diferenciación terminal donde el adipocito resultante adquiere el equipamiento especializado para la secreción y síntesis de proteínas y lípidos específicos del linaje al cual se ha diferenciado. PPAR γ (Receptores activados por proliferadores peroxisómicos gamma) es considerado el factor de transcripción maestro del proceso de diferenciación de los adipocitos, ya que al activarse por la unión a su ligando se inducen cambios morfológicos y la expresión de todos los genes específicos de los adipocitos maduros (González-Casanova. 2018;Levin Ferreyra, F. 2019; Ross, et al 2007) y a su vez la cantidad de este en una persona va a estar regulada por dos sistemas fisiológicos. Uno de los sistemas se asocia con la regulación del peso del individuo en el corto plazo, controla el apetito y el metabolismo de manera cotidiana. Este sistema está determinado por la actividad de dos hormonas peptídicas antagónicas que se sintetizan en el aparato digestivo; una de ellas es activadora del apetito, la ghrelina sintetizada y liberada por las células del estómago y la otra es el péptido YY secretada en el intestino, inhibidora del apetito. El otro sistema es el regulador del peso a largo plazo. Éste controla el apetito y el metabolismo de manera continua por meses y años. En este sistema la leptina y la insulina son las hormonas encargadas de modular el apetito y el metabolismo de grasas y carbohidratos. A estas señales hormonales y nerviosas interconectadas que surgen del tejido adiposo, del tubo digestivo y del sistema nervioso central forman el

eje “encefaloenteroadiposo”(Ross, et al 2007; Montalvo Arenas et al 2010) presentando la capacidad de proveer al organismo una reserva energética de 85%; función de protección y aislante, Regulador metabólico: comprende la captación de ácidos grasos de la sangre y su conversión en triacilgliceroles dentro del adipocito. Los triacilgliceroles se almacenan luego en la inclusión lipídica de la célula. Cuando el tejido adiposo es estimulado por mecanismos nerviosos u hormonales, los triacilgliceroles se desdoblan en glicerol y ácidos grasos, un proceso denominado movilización. Los ácidos grasos atraviesan la membrana celular del adipocito para introducirse en un capilar. Aquí se unen a la proteína transportadora albúmina y son transportados a otras células que utilizan los ácidos grasos como combustible metabólico; Órgano Endocrino que reacciona generando lipólisis o lipogénesis. De las numerosas sustancias secretadas, los ácidos grasos son cuantitativamente las moléculas más importantes y son liberados en periodos de balance energético negativo, como en el ayuno. Otras moléculas de naturaleza lipídica son también secretadas, incluyendo Prostanoides sintetizados por el propio tejido, Colesterol y Retinol que se almacenan para ser liberados posteriormente y hormonas esteroideas (esteroides sexuales y glucocorticoides). Secreta además un número considerable de factores proteicos (se han descrito más de 50) que se designan bajo la denominación común de “adipocinas” muchas de ellas están relacionadas con el sistema inmunitario, incluyendo citocinas clásicas. Las adipocinas también incluyen proteínas que intervienen en la regulación de la ingesta y del balance energético (leptina), en la regulación de la presión sanguínea (angiotensinógeno), en la hemostasia vascular (PAI-1), en el metabolismo lipídico (RBP-4, CETP), en la homeostasis glucídica (adiponectina, resistina, visfatina), en la angiogénesis (VEGF), así como factores de crecimiento (TGF) y proteínas de fase aguda y respuesta al estrés (haptoglobina, alfa1-acid glycoprotein) (Dr. Claudio De Paulis. 2017;Ràfols, M. E. 2014;Ross, et al 2007)

Podemos considerar que, sumada a sus otras funciones metabólicas y endocrinas, el TA además tiene una identificada y diversa función toxicológica, dado que es el blanco de varios químicos que alteran sus funciones, incrementan la inflamación y/o modulan la diferenciación de células precursoras. Por ejemplo, los obesógenos, que directa o indirectamente incrementan la obesidad a través de disruptores metabólicos, hormonales o procesos de desarrollo.(Barouki 2015)

Clasificación del tejido adiposo

- *Pardo* (multilocular): contiene adipocitos con pequeñas gotas lipídicas multiloculares, tiene la función fisiológica de metabolizar los ácidos grasos produciendo calor, gracias al alto contenido de mitocondrias.
- *Blanco* (unilocular): sus células se caracterizan por contener una única gota lipídica, es el principal tejido de almacén de energía del organismo, además de atribuírsele la función de aislamiento y protección mecánica para algunos órganos vitales (Ràfols, M. E. 2014; Levin Ferreyra, F. 2019).

De acuerdo a la distribución corporal que predomine se lo puede catalogar como:

- ***Ginoide***: Cuando se acumula preferentemente en la región fémoro-glútea , dando un aspecto en forma de "pera" (femenina). Genera con frecuencia problemas circulatorios, con dificultades en el retorno venoso y edemas de miembros inferiores, también suelen aparecer estrías y paniculopatía edemato-fibro -esclerosa (PEFE) . El adipocito es un estrógeno sensible, los estrógenos regulan el metabolismo y la distribución del tejido adiposo. Existe un receptor alfa 2 adrenérgico en el adipocito que es estimulado por los estrógenos dando este patrón de adiposidad en pera. Importante en la edad fértil para ser utilizada como reservorio de energía para la lactancia.
- ***Androide***: La grasa se localiza en el tronco y en el abdomen y presenta un aspecto en forma de "manzana" (hombre). Conlleva un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, hipertensión, daño endotelial o diabetes tipo 2, en caso de que la circunferencia de la cintura supere los 95 cm en hombres y los 83 cm en mujeres.

Existen dos subtipos:

- 1) *Obesidad abdominal subcutánea* (OAS): el depósito de grasa se encuentra en el tejido celular subcutáneo.
 - 2) *Obesidad abdominal visceral* (OAV): predomina sobre todo en la zona abdominal central y bajo vientre, llegando hasta cubrir la zona lumbar
- ***Obesidad de distribución homogénea***: Es aquella en la que el exceso de grasa no predomina en ninguna zona del cuerpo (Álvarez Castro, P. 2005; Rico, J. J. D. 2016; Dr. Claudio De Paulis. 2017).

Por otra parte se clasifica de acuerdo al aspecto fisiológico del mismo:

- **Hiperplásica:** Se caracteriza por el aumento del número de células adiposas. Donde se distinguen tres períodos:
 - El primero se da en el último trimestre del embarazo.
 - El segundo, durante el primer año de vida.
 - El tercero, durante el estirón o pico de crecimiento en altura (PHV), asociado a la pubertad.
- **Hipertrófica:** Por el aumento del volumen de los adipocitos. Este proceso prevalece durante toda la vida. Los adipocitos son la única célula que poseen la capacidad de hipertrofiarse más de 10 veces su diámetro (Dâmaso, et al 1994; Rico, J. J. D. 2016; Dr. Claudio De Paulis. 2017)

Con respecto a la consecuencias que su exceso de almacenamiento representa, Rico, J. J. D. (2016) las describe de acuerdo a su ubicación o mecanismo fisiopatológico implicado (Rico, J. J. D. 2016).

Alteraciones cardiovasculares

- Estasis venoso; taquicardia de esfuerzo; hipertensión arterial; insuficiencia cardiaca; angina de pecho; infarto de miocardio; varices; tromboflebitis; úlceras varicosas; paniculopatía edematofibroesclerosa (celulitis); arteriosclerosis.

Alteraciones metabólicas

- Hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina; hipercolesterolemia; hipertrigliceridemia; hiperuricemia; diabetes tipo II.

Alteraciones respiratorias

- Hipoventilación alveolar, EPOC, neumonía; Síndrome de Pickwick (cuadro de insuficiencia cardio-respiratoria); apnea nocturna.

Alteraciones osteoarticulares

- Aplanamiento de la bóveda de la planta del pie; aplanamiento de los cuerpos vertebrales de la columna, con neuralgias y espondilitis deformante; artrosis generalizada especialmente en rodillas, caderas y columna lumbar; atrofia muscular; gota. En niños: pie plano, genu valgum, desplazamiento de la epífisis de la cabeza femoral.

Alteraciones digestivas

- Dispepsia gástrica, con acidez, flatulencia, digestiones pesadas; Dispepsia biliar, con colecistitis y colelitiasis; Úlcera gastroduodenal; Estreñimiento, con

frecuentes hemorroides; Insuficiencia hepática en grado variable por infiltración grasa; Aumento de la frecuencia de cirrosis hepática; Insuficiencia pancreática.

Alteraciones renales

- Nefroesclerosis con hipertensión arterial; albuminuria y cilindruria; retención líquida con edemas.

Alteraciones cutáneas

- Cianosis por estasis vascular y telangiectasias; estrías cutáneas; lesiones por rozaduras; lesiones por maceración cutánea Intertrigo; mayor frecuencia de forúnculos; caída de pelo e hirsutismo; exceso de sudoración, úlceras y celulitis.

Alteraciones gestacionales

- Mayor incidencia de toxemia preeclampsia; malposiciones fetales y partos prolongados.

Alteraciones gonadales

- Alteraciones menstruales variables; hipo e hipermenorrea; amenorrea.

Alteraciones sexuales

- Disminución de la libido, frigidez e impotencia (frecuentemente psicológica); compulsividad e impulsividad sexual; problemas de orden físico para realizar el acto sexual.

Alteraciones oncológicas

- Aumento general de la mortalidad por cáncer; aumenta estadísticamente el riesgo de cáncer de próstata y colon en hombres; aumenta estadísticamente el riesgo de cáncer de endometrio, ovario y mama en la mujer.

Alteraciones psicológicas

- Miedo e inseguridad personal; pérdida de la autoestima; desorden de conductas alimentarias; perturbación emocional por hábitos de ingesta erróneos; distorsión de la imagen corporal; tristeza e infelicidad; ansiedad, frecuentemente en niños, por pseudomicropene y pseudoginecomastia; depresión; frigidez e impotencia.

METODOLOGÍA

1. Estudios de toxicidad y disrupción endocrina del Carbaril

El pez cebra es ampliamente utilizado como modelo vertebrado de estudio en diferentes áreas del conocimiento, el screening y la toxicología. Las ventajas del modelo son la simplicidad y economía de mantenimiento y reproducción del mismo, la posibilidad de contar con un número importante de embriones (alrededor de 200 embriones semanales por hembra), los ensayos pueden realizarse en platos de 96 pocillos siendo necesaria poca cantidad de extracto o pesticida para el estudio. Es un modelo muy utilizado en el mundo pudiendo disponer de un importante número de publicaciones, modelos transgénicos, mutantes, anticuerpos y metodología desarrollada para el estudio de pesticidas, entre otros.

Además en lo que a la investigación respecta, resulta ser un ejemplar similar a los mamíferos, a pesar de la falta de tejido adiposo marrón en los poiquiloterms, el pez cebra almacena triglicéridos neutros en los depósitos de adipocitos visceral, intramuscular y subcutáneo, lo que brinda la oportunidad de comprender la regulación de la distribución de la grasa corporal (Behra, et al 2002; Schock, et al 2012; Lin et al, 2007; Díaz González, L. 2018; Martínez, 1996) . Por otra parte, la absorción, el transporte, el almacenamiento y el metabolismo de los lípidos en los peces se logran mediante procesos biológicos y moleculares que se asemejan a los de las especies de mamíferos (Levin Ferreyra, F. 2019). Los primeros adipocitos, que pueden observarse a los 12 días después de la fecundación (dpf), o con un tamaño mínimo de unos 5 mm , aparecen en la región pancreática, luego en las vísceras (17 dpf) y más tarde, en las regiones subcutánea (20 dpf) y craneal (20 dpf) (Lafontan, 2009; Imrie et al, 2010).

1.1. Mantenimiento de peces cebra

Los peces cebra reproductores fueron mantenidos de acuerdo a lo descrito por Westerfield (1997). Brevemente, peces cebra de 4 a 12 meses de edad fueron mantenidos en peceras con agua desionizada libre de cloro a una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ con sistema de burbujeo de aire para mantener una saturación de O_2 del 80 %. Los reproductores fueron criados en una relación de 1 hembra cada 2 machos en una pecera con 1 pez por litro de agua con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Los peces fueron alimentados 2 a 3 veces por día con alimento balanceado comercial "Shulet". El agua de la pecera se renovó en un 50 % cada dos días y completamente una vez a la semana. Para la recolección de huevos la noche anterior al inicio del ensayo se separaron hembras y machos en una relación 1:2 en una pecera más pequeña con una malla en el fondo para evitar el canibalismo de los huevos.

1.2. Evaluación de la toxicidad del carbaril en huevos y juveniles de pez cebra.

Huevos fertilizados o juveniles (7 dpf) fueron expuestos en platos de 48 ó 24 pocillos en un rango definido de 5 concentraciones de Carbaril . El ensayo se inició dos horas luego de la fertilización y a los 7 dpf, según correspondía, y se continuó por 48hs. Se determinaron 4 estadios característicos del desarrollo de los embriones o juveniles y fueron comparados con los controles, los cuales no son expuestos al carbaril. Este modelo permite detectar si se produjo la inhibición o retardo del crecimiento celular, efectos letales o embriotóxicos en función de la concentración. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Murphey y Zon (2006). Brevemente, en un plato multipocillo se agregaron las diferentes diluciones de Carbaril. Se reservaron pocillos para los controles sin el agregado de ninguna sustancia. Los huevos fertilizados o juveniles se colocaron en los pocillos del plato con la asistencia de una pipeta Pasteur. Luego, a las 24 y 48 h de exposición de los huevos se evaluaron las siguientes características (apical endpoints): número de huevos coagulados, irregularidades en la formación de somites, no despegado de la cola y la ausencia del corazón latiendo (este último solo a las 48 h). En los pocillos de control a las 48 h debió haber más del 90 % de las larvas vivas para que el ensayo sea válido. Las parvas fueron consideradas muertas si una de las características descritas es observada. Para el

caso de los juveniles (7 dpf) se evaluó el % de muertos, problemas de nado, respuesta a estímulos y capacidad para alimentarse.

1.3. Carbaril suministrado en las peceras con peces adultos

Con el objetivo de estudiar los potenciales efectos adversos crónicos de dosis subletales de Carbaril se utilizaron peces cebra adultos en edad reproductiva (1 año) distribuidos entre machos y hembras. Se utilizó este modelo dado que el pez cebra se utiliza para evaluar el efecto obesogénico y toxicidad crónica de drogas con especial énfasis en disruptores endocrinos (Segner, H. Zebrafish, 2009). Dado que los DE pueden producir alteraciones crónicas del desarrollo y la reproducción el pez cebra representa una ventaja importante como especie animal experimental (Bresch et al,1990). Las cantidades de alimento y droga a utilizar son muy pequeños comparados con otras especies o modelos. Hay suficiente evidencia científica de modelos, parámetros y experimentos diseñados que convierten al pez cebra en una herramienta valiosa para realizar estudios de toxicidad y evaluar mecanismos de acción. Sobre la base de los resultados obtenidos con el estadio juvenil de peces cebra se seleccionó la concentración de 1 µg/ml de Carbaril. Los ensayos se realizaron con una renovación de 1/3 del volumen de agua cada 48 h conteniendo la dosis mencionada del pesticida. En cada condición se utilizaron 6 individuos, dado que es el número mínimo de especímenes que pueden usarse para obtener resultados estadísticamente significativos reduciendo el uso de animales de experimentación (OECD Guidelines).

Fueron alimentados con alimento balanceado para peces "Shulet" y/o Colesterol (4 % de colesterol adicional en el alimento comercial) con 400 micrones según lo establecido por Avdesh (2012)

Grupo A: Grupo control, su alimentación diaria constaba de alimento balanceado.

Grupo B: fueron alimentados con alimento balanceado más Colesterol.

Grupo C: Se agregaron las dosis no tóxicas establecidas de Carbaril 1 µg/ml a su pecera. Dia por medio se le cambio 1 litro de agua con la solución por 1 litro de agua nueva desclorada mas 1 µg/ml de Carbaril, fueron alimentados con alimento balanceado más Colesterol.

Grupo D: Se agregaron las dosis no tóxicas establecidas de Carbaril 1 µg/ml a su pecera. Dia por medio se le cambio 1 litro de agua con la solución por 1 litro de agua nueva desclorada mas 1 µg/ml de Carbaril, fueron alimentados solo con alimento balanceado.

1.5. Obtencion de plasma a partir de peces cebra adultos

La obtención de plasma se realizó de acuerdo al método propuesto por Pedroso y colaboradores (2012). Brevemente, los peces se introducen en agua con hielo y una vez que dejan de moverse se escurren en papel absorbente y se corta la cola con ayuda de un bisturí entre la aleta caudal y anal. El pez se coloca con la cola hacia abajo en un tubo de plástico de 1,5 ml perforado en el fondo y se coloca sobre otro entero que contiene 2,5 µl de heparina. El conjunto se centrifuga por 5 minutos a 1000 rpm. La sangre recolectada (50 µl aproximadamente) se centrifuga 10 min a 2500 rpm y se conserva el sobrenadante (plasma) para determinar colesterol y triglicéridos. El método de eutanasia en agua con hielo es el recomendado para el pez cebra por las Guías OECD (OECD Guidelines).

1.6. Análisis histopatológico

A continuación con el objetivo de poder analizar la morfología de los adipocitos y establecer una relación causal con el crecimiento de la obesidad , se llevó a cabo el proceso de fijación-lavado y deshidratación- aclarado-inclusión y corte según lo descrito por Cardiff et al.(2014) Brevemente, se colocó la muestra en una solución de Formaldehído al 4%, luego a dosis creciente de alcohol (70%, 96% y 100%), después a Xilol, posteriormente se la incluyó en parafina, a continuación se obtuvieron los tacos y por ultima instancia se llevó a cabo el corte con el Microtomo.

Por último, se acometió a la tinción de los cortes histológicos, efectuándose según lo detallado por Strittmatter, C. D. (2000) . Brevemente, se inició con Xilol, luego con concentraciones decreciente de alcohol (100% , 96%), posteriormente se la sumergió en agua, para continuar con Hematoxilina, volviendola a sumergir en agua y finalmente se repitió el proceso alcohol, agua, Eosina, alcohol 96%, alcohol 100% y Xilol.

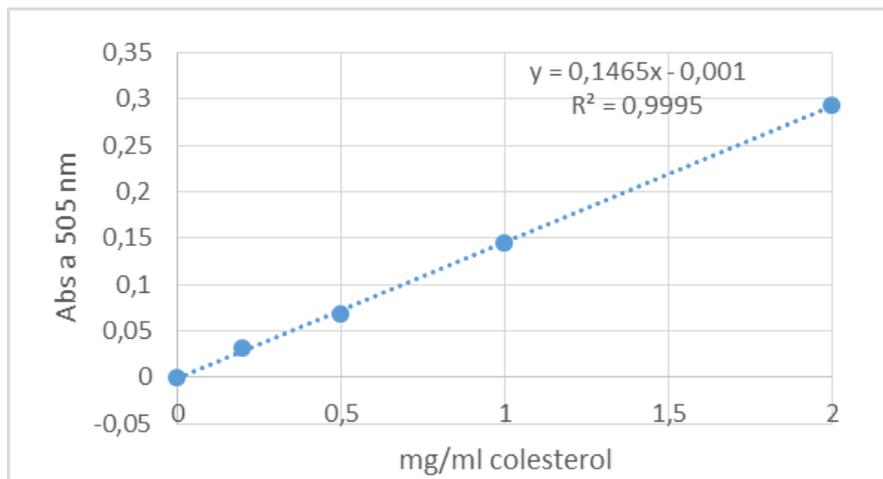
1.7 Visualización de los adipocitos con microscopio

Las imágenes se observan y registran usando un microscopio Leica DM 5000 equipado con cámara Leica.

1.8. Método enzimático para la determinación de colesterol en plasma.

El colesterol plasmático se determinó utilizando el método Colestat enzimático AA de Wiener Lab. Brevemente, se tomaron 5 µl de plasma de cada uno de los peces y se le adicionó 1 ml de reactivo provisto por el kit. Luego de 20 min a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro UV-vis. A partir de la curva de calibración (Figura 1) y la absorbancia obtenida para cada una de las muestras se calculó la concentración de colesterol total. (Colesterol [mg/ml]: (Abs + 0,001)/0,1465)). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Como estándar de colesterol se utilizó el provisto por el kit de Wiener Lab.

Figura 1

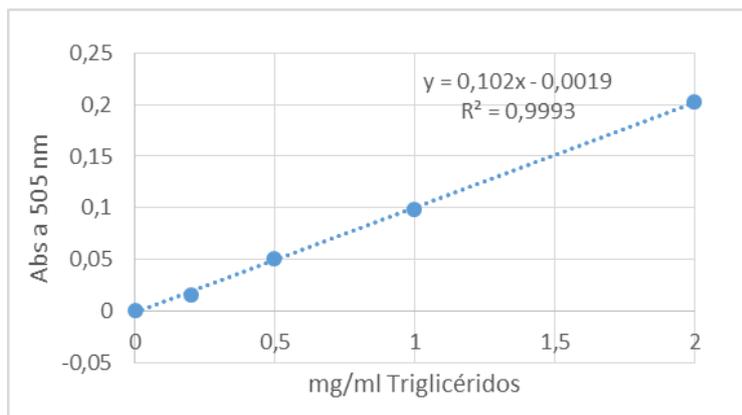


1.9 Método enzimático para la determinación de triglicéridos en plasma.

Los triglicéridos plasmáticos se determinaron utilizando el método TG Color GPO/PAP AA de Wiener Lab. Brevemente, se tomaron 5 µl de plasma de cada uno de los peces

y se le adicionó 1 ml de reactivo provisto por el kit. Luego de 20 min a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro UV-vis. A partir de la curva de calibración (Figura 2) y la absorbancia obtenida para cada una de las muestras se calculó la concentración de triglicéridos totales. (Triglicéridos [mg/ml]: $(Abs + 0,0019)/0,102$). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Como estándar de triglicéridos se utilizó el provisto por el kit de Wiener Lab.

Figura 2



2.0 Tratamiento de los resultados

Los resultados fueron evaluados mediante un análisis de ANOVA, test-t de student y el método de Probit. Para los ensayos con peces será graficado el porcentaje acumulativo de la mortalidad en función del logaritmo de la concentración. Los valores de CL50 (con un 95 % de confianza) serán calculados a partir de éste gráfico.

RESULTADOS

Inicialmente se realizó un estudio de toxicidad aguda en huevos del pez cebra que permitió conocer la dosis letal cincuenta y los efectos embriotóxicos causados por el Carbaril. Luego se utilizó el modelo de juveniles que tienen la característica de metabolizar la droga en estudio y, en particular, ya han desarrollado el eje hipotalámico - hipofisario y el sistema nervioso autónomo que utiliza la acetilcolina como uno de los neurotransmisores. La curva dosis respuesta con juveniles permitió estimar la dosis subletal con la que se realizaron los ensayos obesogénicos en peces cebra adultos.

Toxicidad aguda en huevos del pez cebra. Curva dosis-respuesta

Huevos del pez cebra de 2 hpf se incubaron a 28 °C en placas de 48 pocillos con concentraciones crecientes de Carbaril. Luego de 24 h y 48 h se evaluaron diferentes características de los huevos para determinar el % de mortalidad de acuerdo con lo descrito en la metodología.

En la figura 3 puede observarse la curva de mortalidad de los huevos frente a diferentes concentraciones de Carbaril luego de 48 h de incubación. El efecto tóxico letal muestra una forma dependiente de la dosis de pesticidas. Utilizando el método de Probit se determinó la dosis letal 50 (DL50: 2 µg/ml). Por otro lado, la observación de los embriones y larvas de los huevos tratados con dosis de 2 µg/ml (Imagen 1) muestra que el carbaril induce cambios en el tiempo de eclosión, la morfología, en particular en el tamaño y forma de los embriones y larvas. Adicionalmente, el Carbaril causa defectos cardíacos (bradicardia) y edema pericárdico. Utilizando otras líneas de pez cebra y diferentes esquemas de exposición a Carbaril se han descrito efectos tóxicos similares, sin embargo se reportó a dosis superiores a las utilizadas en esta tesis. Schock y colaboradores (2012) (54) expusieron huevos del pez cebra, en estadio previo a la gastrulación, a concentraciones de Carbaril de 20 µg/ml a 40 µg/ml y evaluaron la mortalidad a las 24 hpf (encontrando 50 % y 100% de muerte, respectivamente). Mientras que Lin y colaboradores (2007) incubaron huevos (4 hpf) con diferentes concentraciones de Carbaril (1-100 µg/ml) encontrado la dosis letal cincuenta a 44 µg/ml a las 24 h. En ambos casos fueron descritos efectos adversos en la frecuencia cardíaca. Estudios realizados en el pez *Poecilia reticulata* mostró una

DL50 de 3,28 $\mu\text{g/ml}$ a las 96 h (Hoja de seguridad de Carbaril de la empresa Arysta Life Science).

En nuestros ensayos la dosis letal cincuenta encontrada fue inferior y puede deberse a que se incluyeron más parámetros para considerar la mortalidad, diferente tiempo de exposición y se utilizó otra línea de pez cebra. El Carbaril es un pesticida inhibidor de la acetilcolinesterasa, sin embargo los embriones del pez cebra no tienen maduro el sistema colinérgico hasta los 3 dpf (Lin et al 2007) razón por la cual el mecanismo de acción utilizado por el Carbaril sería diferente. Algunos autores proponen que el Carbaril podría inhibir canales de calcio tipo L (Lin et al 2007) y de esta manera modificar la frecuencia cardíaca. Por otro lado, los efectos letales encontrados y el estadio de desarrollo de los embriones sugieren un efecto citotóxico inespecífico a concentraciones superiores a los 2 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 3. Curva dosis-respuesta de Carbaril en huevos del pez cebra

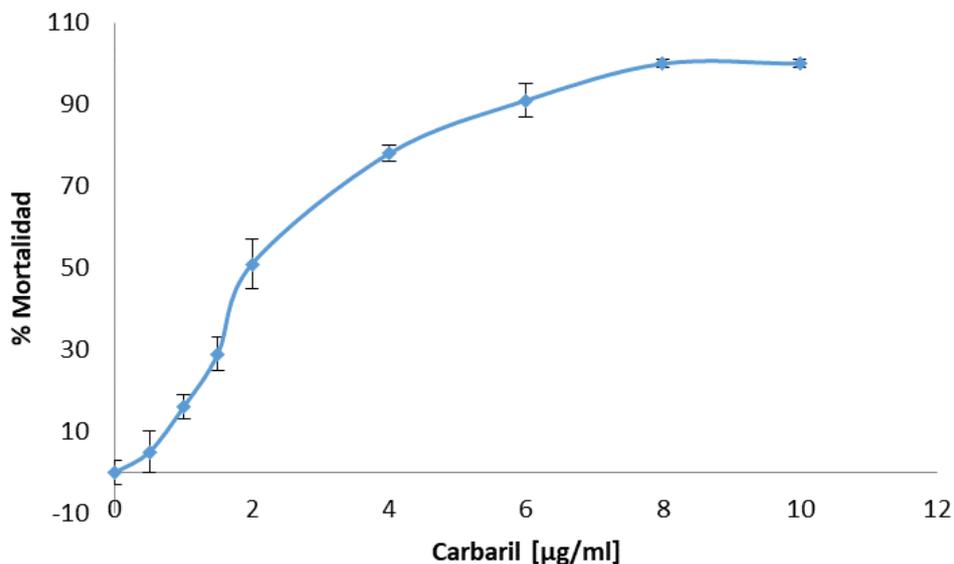
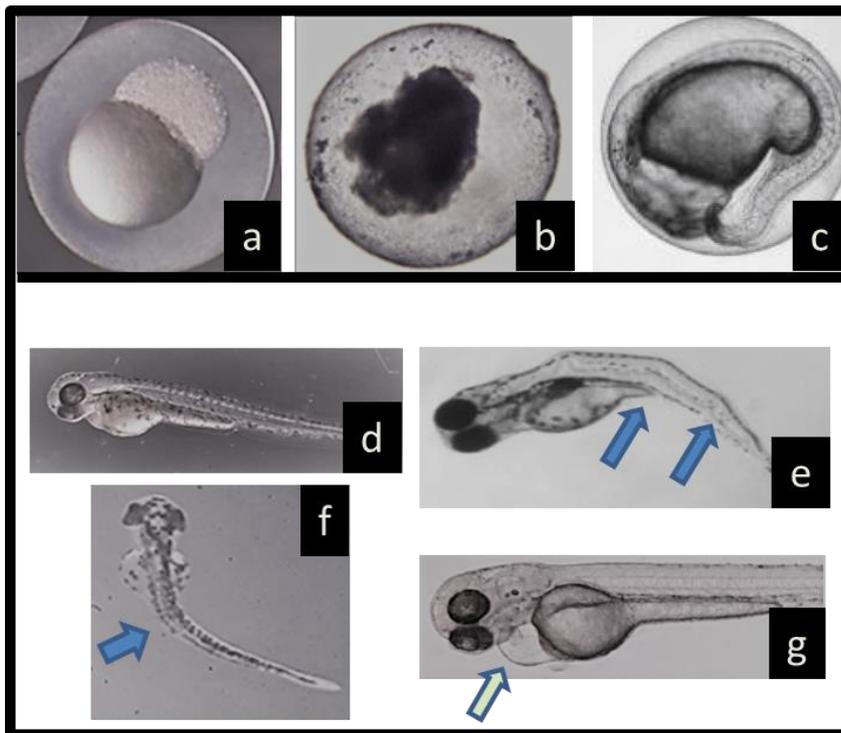


Imagen 1. Huevos y larvas de pez cebra tratadas con 2 µg/ml de Carbaril



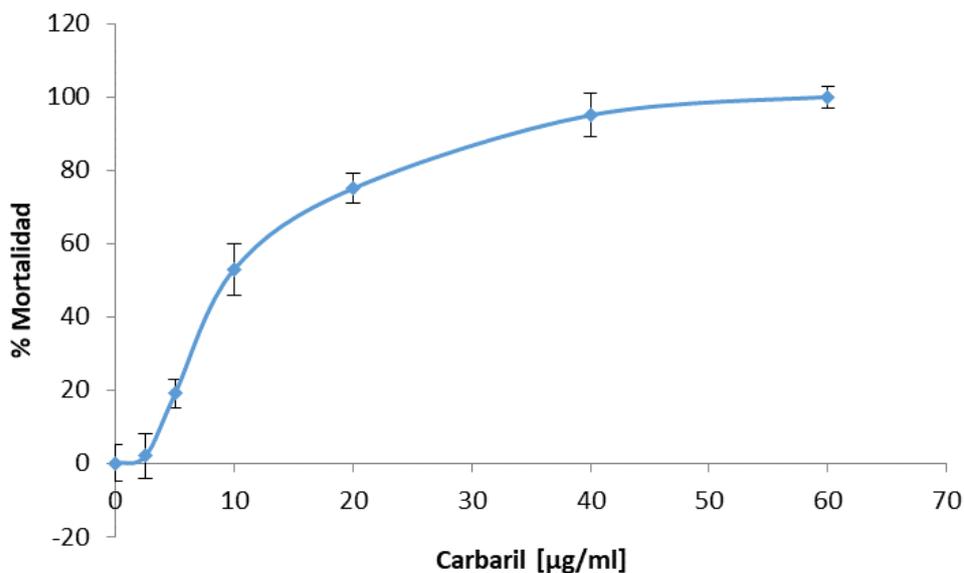
Toxicidad aguda en juveniles del pez cebra. Curvas dosis-respuesta

El modelo de juveniles del pez cebra (6dpf - 4 meses de vida) permite estudiar la toxicidad aguda de sustancias pudiendo evaluar la letalidad y toxicidad mediadas por procesos fisiológicos dado que los juveniles se alimentan y llevan a cabo reacciones de metabolismo en la droga estudiada. Las larvas del pez cebra ya poseen un hígado funcional a los 3 dpf (Isogai, et al 2001; Alderton, et al 2010). En este ensayo en particular este estadio del pez cebra ya posee un sistema nervioso autónomo desarrollado por lo que los mecanismos mediados por acetilcolina se encuentran funcionando.

La figura 4 muestra la curva de mortalidad de juveniles del pez cebra en función de la concentración de Carbaril. En este ensayo se usaron peces cebra de 7 dpf y se incubaron 48 h a 28 °C en presencia de diferentes concentraciones de Carbaril. El efecto tóxico letal muestra una forma dependiente de la dosis del insecticida. Utilizando el método de Probit se determinó la dosis letal 50 (DL50: 10 µg/ml). Otros autores han trabajado con larvas y juveniles en concentraciones similares y han observado efectos cardiotóxicos y hepatotóxicos. Lin y colaboradores (2007) utilizaron larvas de 4 dpf con dosis de 100 µg/ml por 10 minutos observando una disminución significativa de la frecuencia cardíaca, probablemente mediada por la inhibición de

canales de calcio y la inhibición de la acetilcolinesterasa. Por otro lado, Zhang y colaboradores (2017) evaluaron el efecto hepatotóxico de Carbaril utilizando dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$ a 4 $\mu\text{g/ml}$. Nuestros resultados sugieren que 10 $\mu\text{g/ml}$ de Carbaril por 48 h a 28 °C causan la muerte de al menos el 50 % de los juveniles de pez cebra. Este efecto letal podría deberse a una combinación de la disminución de la pérdida de la neurotransmisión colinérgica por inhibición de la acetilcolinesterasa, disminución de la frecuencia cardíaca y hepatotoxicidad. Por otro lado, como puede observarse en la figura 4, dosis de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de Carbaril no causaron la muerte de los juveniles de pez cebra luego de 48 h de incubación a 28 °C.

Figura 4. Curva dosis-respuesta de Carbaril en juveniles del pez cebra



Evaluación de efectos adversos crónicos de dosis subletales de Carbaril

Los resultados de la tabla 1 muestran el perfil lipídico (colesterol y triglicéridos) de los peces cebra (grupo A) alimentados con una dieta comercial y de los diferentes tratamientos de acuerdo con lo descrito en la metodología.

Los peces alimentados con una dieta rica en colesterol (4 % de colesterol adicional en el alimento comercial) (grupo B) mostraron un aumento significativo del colesterol y triglicéridos plasmáticos con respecto al perfil lipídico de los peces controles (203 % y 262 %, respectivamente). Los resultados alcanzados con la dieta rica en colesterol son similares a los descritos por Stoletov y colaboradores (2009), dado que el tiempo proyectado en nuestro ensayo fue cuatro semanas menor al utilizado por los autores,

los valores finales de colesterol no fueron tan altos, sin embargo son significativamente mayores que en los peces alimentados con la dieta control. Este experimento se realizó como control positivo del modelo de obesidad.

Por otro lado, los peces tratados con Carbaril y alimentados con una dieta comercial(grupo C) mostraron, en promedio, un aumento significativo del colesterol y triglicéridos en plasma, respecto de los controles (139 % y 200 %, respectivamente). Adicionalmente, el abdomen de los peces tratados con Carbaril fue superior a los controles como puede observarse en la imagen 2.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con la dieta rica en colesterol y dieta control con Carbaril, sin embargo se observó una tendencia positiva para el caso de los peces alimentados con colesterol adicional, respecto de los peces tratados con Carbaril.

El tercer tratamiento incluyó la combinación de alimento rico en Colesterol (4% de colesterol en el alimento comercial)(grupo D) y 1 µg/ml de Carbaril en el agua de la pecera. El perfil lipídico de los peces no se pudo evaluar dado que no sobrevivieron el tiempo del ensayo (8 semanas). Los resultados se muestran en la figura 5. A partir de la semana 2 se observó la primera muerte, mientras que los últimos dos peces murieron en la semana 7, detectando la mayor cantidad de peces muertos entre las semanas 4 y 7. Los peces muertos fueron fijados en formol e incluidos en parafina para los estudios histológicos que se muestran en la imagen 3

Estos resultados sugieren que en cuadros de obesidad dosis subletales de Carbaril de forma prolongada podrían resultar letales.

Finalmente, los peces controles y tratados fueron sacrificados en agua fría, fijados en formol al 4 % e incluidos en parafina para los estudios histológicos con Hematoxilina y Eosina. En la imagen 3 se muestran cortes de músculo esquelético, hepático y gonadal para los peces controles y los tratados con Carbaril o dieta rica en colesterol. Las imágenes de los tejidos de los peces tratados con Carbaril y una dieta rica en colesterol no se incluyeron dado que se encontraban muy deteriorados, no permitiendo sacar conclusiones. En los peces tratados con Carbaril o una dieta rica en colesterol se observa un incremento del tejido adiposo en el tejido muscular y hepático, mientras que en el ovario no se observaron cambios significativos para los peces alimentados con una dieta rica en colesterol. Por otro lado, los peces tratados

con Carbaril muestran células germinales alteradas en el ovario como se describe en la imagen 3-C sugiriendo un efecto de inhibición hormonal mediado, probablemente, por una disrupción del sistema endócrino.

Tabla 1. Lípidos plasmáticos de peces cebra

Tratamiento	Colesterol [mg/dl]	Triglicéridos [mg/dl]	Muertos (n=6)
Control	195 ± 12	125 ± 14	0
Carbaril	271 ± 19 *	250 ± 36 *	0
Colesterol	396 ± 82 *	327 ± 58 *	0
Carbaril + Colesterol	ND	ND	6

* Valores significativamente diferentes respecto del control ($p < 0,005$)

ND: Valores no determinados

Figura 5. Supervivencia de peces cebra alimentados con colesterol adicional y Carbaril

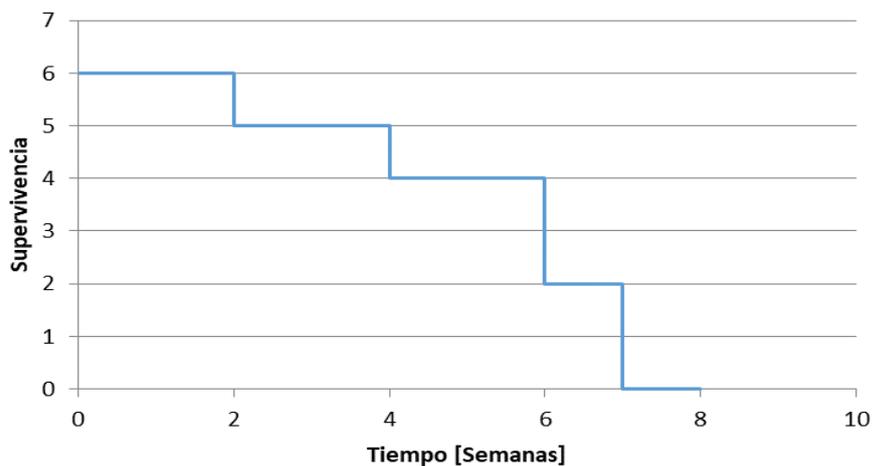


Imagen 2. Fotos de peces cebra adultos. a) Alimento comercial b) Alimento comercial con adición de Carbaril en el agua de la pecera (1 ppm).

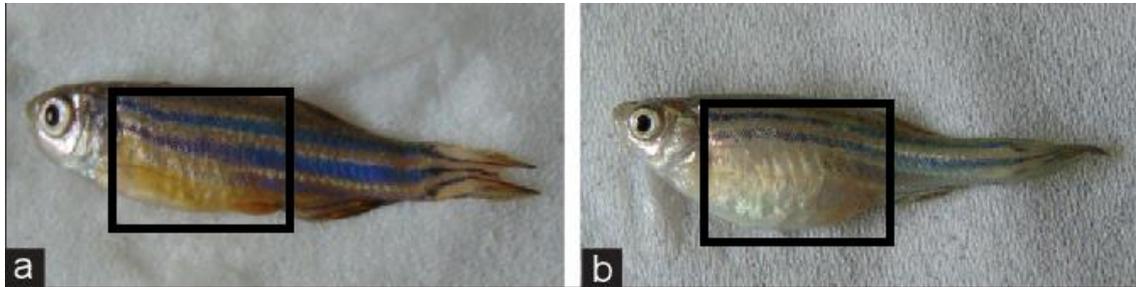


Imagen 3. Histología de peces cebra tratados y controles

Imagen 2 A. Tejido muscular y adiposo (10 X). Secciones de 5 micrones de tejido muscular de peces cebra adultos teñidas con Eosina & Hematoxilina: a) dieta control, b) dieta control con Carbaril y c) dieta rica en colesterol. Las flechas verdes indican las fibras musculares cortadas longitudinal y transversalmente, la flecha amarilla señala el tejido adiposo intramuscular. En la imagen “a” se observa el tejido muscular normal con presencia de tejido adiposo, sin embargo en las imágenes “b” y “c” se observa mayor presencia de tejido adiposo intramuscular en comparación con el control. Las imágenes muestran el incremento de tejido adiposo intramuscular provocado por el Carbaril o una dieta rica en colesterol.

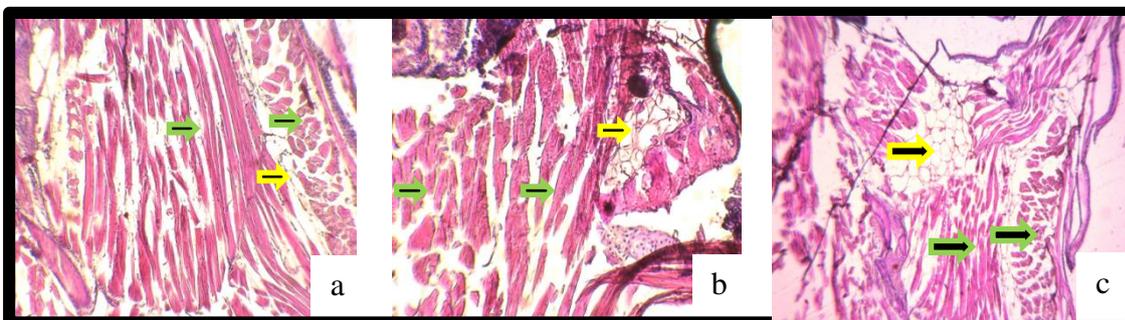


Imagen 2 B. Tejido hepático (5 X). Secciones de 5 micrones de tejido hepático de peces cebra adultos teñidas con Eosina & Hematoxilina: a) dieta control, b) dieta control con Carbaril y c) dieta rica en colesterol. En tinciones convencionales de hematoxilina y eosina, la esteatosis (hígado graso) se visualiza como la presencia de espacios circulares ópticamente vacíos de tamaño variable en el citoplasma de los hepatocitos. La imagen “a” muestra un corte de hígado normal, sin embargo en las

imágenes “b” y “c” se observa la acumulación de vesículas lipídicas en el parénquima hepático compatibles con un cuadro de esteatosis causado por el Carbaril o una dieta rica en colesterol.

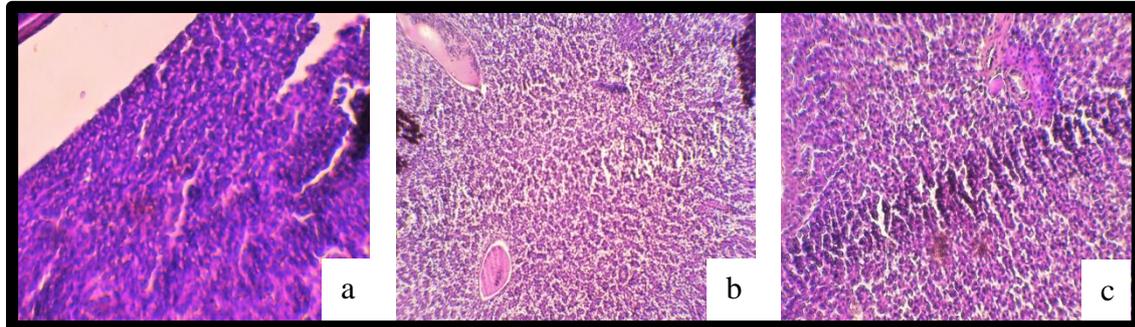
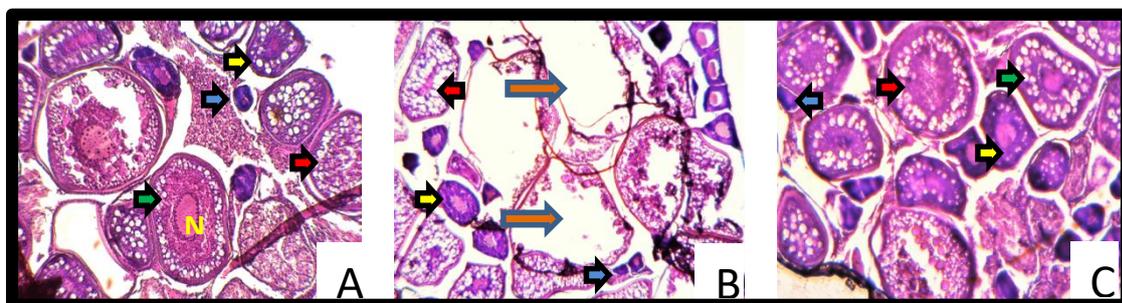


Imagen 2 C. Ovario (40 X). Secciones de 5 micrones del ovario de peces cebrá hembras adultas teñidas con Eosina & Hematoxilina: a) dieta control, b) dieta control con Carbaril y c) dieta rica en colesterol. Ovogonia (flechas azules), Folículo pre-vitelogénico (flechas amarillas), Folículo vitelogénico (flechas verdes), Folículo pre-ovulatorio (flechas roja) y Folículo anormal: pérdida de núcleo N, degradación de la testa, entre otros (flechas naranja). Las imágenes “a” y “c” muestran una sección de ovario normal donde se pueden apreciar células germinales en diferentes estadios de desarrollo (ovogonia – folículo pre-ovulatorio). En la imagen “b” se muestra una sección del ovario de peces cebrá hembra tratados con Carbaril donde se observan células germinales anormales (flecha naranja) desprovistas de núcleo, testa interna y organelas celulares.



CONCLUSIÓN

Este estudio es el primero que se lleva a cabo con el objetivo de evaluar dosis subletales de Carbaril en la inducción de obesidad. Se han realizado diferentes estudios con Carbaril y el pez cebra donde se evaluaron los efectos tóxicos inespecíficos en larvas (Schock, et al 2012) en el hígado (Zhang, et al 2017) en la frecuencia cardíaca (Lin, et al 2007) y en el desarrollo de las gónadas (Mensah. et al 2012). En este último trabajo de Mensah y colaboradores (2012) observaron efectos estrogénicos a causa de la incubación con bajas dosis de Carbaril. Adicionalmente, diferentes autores asocian la disrupción endocrina con efectos estrogénicos en el pez cebra (Weber, et al 2003; Jin Y et al 2009). Por otro lado, algunas sustancias similares al Carbaril presentan actividad disruptora endocrina en el pez cebra como es el caso de Mancozeb®, fungicida ditiocarbamato, que tiene un alto potencial como DE actuando sobre el eje hipotálamo-hipófisis-glándula tiroides (Panganiban, et al 2004) Sumado a estos hallazgos se reportó que la inhibición de la acetilcolinesterasa produjo un incremento en el consumo de alimento en peces cebra (Roex, et al 2003). Todas estas evidencias y las halladas en este trabajo sugieren que el Carbaril, en dosis subletales, promueve un efecto obesogénico que podría explicarse a través de la disrupción endocrina y el incremento en el consumo de alimento.

En cuanto al mecanismo fisiopatológico implicado, podemos dilucidar según lo mencionado por Pineda et al (2016) en su análisis del “Hipotiroidismo”, que puede llegar a existir una correlación entre el Hipotiroidismo y los resultados que obtuvimos en nuestra investigación, (Pineda, et al 2016)

Desde una perspectiva molecular, podemos suponer una explicación según lo descrito por Sanches et al. (2020) el cual introduce la relación causal entre las sustancias obesogénicas, (donde menciona a los pesticidas) y el desarrollo de la obesidad, que se da mediante la interferencia de los reguladores transcripcionales, tales como los receptores activados de proliferadores de peroxisomas (PPAR).

DISCUSIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles son la pandemia del siglo XXI, en la actualidad, nos encontramos expuestos a un ambiente hostil que vulnera nuestra salud. Los agentes químicos, denominados disruptores endocrinos, han mostrado afectar la homeostasis metabólica, lo que lleva a patologías como obesidad, no solo

de las personas expuestas, sino también su descendencia, con el uso creciente de estos agentes en diferentes industrias, como los pesticidas. Adicionalmente, con la presente investigación pretendemos se considere como un llamado de atención tanto al personal de salud y las entidades regulatorias, debiendo estar al tanto de los efectos nocivos que estos agentes pueden generar y tomar así las medidas pertinentes para la prevención de las enfermedades asociadas o, una vez que estas se presentan, realizar el diagnóstico oportuno para dar el tratamiento apropiado y evitar sus complicaciones.

Por otra parte somos conscientes de la gran variabilidad dentro del grupo empleado, en virtud de la falta de discriminación por sexo, edad cronológica de los peces y su base alimenticia.

Como también del bache que representa la explicación del mecanismo fisiopatológico implicado en cuestión. Por consiguiente, dejamos en manos de futuras investigaciones el resolver este proceso.

BIBLIOGRAFÍA

- Alderton, W., Berghmans, S., Butler, P., Chassaing, H., Fleming, A., Golder, Z., Gardner, I. (2010). Accumulation and metabolism of drugs and CYP probe substrates in zebrafish larvae. *Xenobiotica*, 40(8), 547–557
- Álvarez Castro, P. (2005). Diagnóstico y clasificación de la obesidad.
- Arias, H. P. (2003). Estudio de perturbadores del sistema endocrino en Colombia (Doctoral dissertation, Uniandes).
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, MT, Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., ... y Martins, RN (2012). Cuidado y mantenimiento regular de un laboratorio de pez cebra (*Danio rerio*): una introducción. *JoVE (Revista de experimentos visualizados)* , (69), e4196.
- Baillie-Hamilton, PF (2002). Toxinas químicas: una hipótesis para explicar la epidemia mundial de obesidad. *La revista de medicina alternativa y complementaria* , 8 (2), 185-192
- Barasona, M. I. (2018). Estudio de los efectos del bisfenol A como disruptor endocrino en la regulación iónica en zebrafish (*Danio rerio*), a través del estudio de células adenohipofisarias y branquiales.
- Barouki, R., Antignac, J. P., Emond, C., Clément, K., Birnbaum, L., La Merrill, M., & Kim, M. J. (2015). Tejido adiposo, agentes contaminantes y obesidad.
- Bateman, M. E., Strong, A. L., McLachlan, J. A., Burow, M. E., & Bunnell, B. A. (2017). The effects of endocrine disruptors on adipogenesis and osteogenesis in mesenchymal stem cells: a review. *Frontiers in endocrinology*, 7, 171.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J. L., Biellmann, D., Chatonnet, A., & Strähle, U. (2002). Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature neuroscience*, 5(2), 111-118.
- Boburg Castroconde, B. (2017). Chilina gibbosa como especie centinela de la contaminación acuática por insecticidas utilizados en Argentina (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Boland, H. P., Gil, M. I., Labollita, H. A., Laurenzano, B., Novelli, M., Ramos, J., & Reyes, P. (2007). Monitoreo de Agroquímicos en áreas bajo riego de los Ríos Limay, Neuquén y Negro. Autoridad Interjurisdiccional de las Cuencas de los Ríos Limay, Neuquén y Negro

- Bresch, H., Beck, H., Ehlermann, D., Schlaszus, H., Urbanek, M., 1990. A long-term toxicity test comprising reproduction and growth of zebrafish with 4-chloroaniline. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 419–427.
- Cardiff, RD, Miller, CH y Munn, RJ (2014). Tinción manual con hematoxilina y eosina de secciones de tejido de ratón. *Protocolos de Cold Spring Harbor* , 2014 (6), pdb-prot073411.
- Chacón, Ó., Cuevas, F., De La Fuente, C., Díaz, F., & Huaquín, L. (2007). Disrupción endocrina e imposex. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 22(1-2).
- Chicharro, L. J. (2008). *Fisiología clínica del ejercicio/ Clinical exercise physiology*. Médica Panamericana.
- Dâmaso, A. R., Teixeira, L. R. L. R., & do Nascimento, C. M. (1994). Obesity: basis for the development of motor activities. *Revista Paulista de Educação Física*, 8(1), 98-111.
- DE, P. Y. L. R. (2014). *INTRODUCCIÓN A LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS QUE PERTURBAN EL SISTEMA ENDOCRINO (EDCs)*.
- De Strittmatter, C. D. (2000). Modificación de la técnica de inclusión en parafina de Johansen. *Dominguezia*, 16(1), 55-58.
- Díaz González, L. (2018). Consecuencias de la exposición materno-infantil a disruptores endocrinos: Impacto en el ámbito de los trastornos reproductivos.
- Dr. Claudio De Paulis. (2017). *ESTÉTICA RESPONSABLE*. Corpus Editorial y distribuidora.
- Fernández, M. F., López-Medina, J. A., Mustieles, V., & Olea, N. (2017). Obesógenos ¿ Una nueva amenaza para la salud pública?. *Revista de Salud Ambiental*, 17(1), 93-99.
- Ferraro, D. O. (2005). *La sustentabilidad agrícola en la Pampa Interior (Argentina): desarrollo y evaluación de indicadores de impacto ambiental del uso de pesticidas y labranzas*. Argentina: Escuela para Graduados Alberto Soriano, Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires.
- García, E. (2004). ¿ Qué es la obesidad. *Revista de endocrinología y nutrición*, 12(4), S88-S90.
- García-Mayor, R. V., Vidal, A. L., Caamano, M. F. D., & Giménez, A. L. (2012). Disruptores endocrinos y obesidad: obesógenos. *Endocrinología y nutrición*, 59(4), 261-267.

- González-Casanova, J. E., Cruz, S. L. P., Vivas, M. C., & Rojas-Gómez, D. M. (2018). Influencia de disruptores endocrinos medioambientales sobre la adipogénesis. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 37(1), 28-36.
 - Imrie, D., & Sadler, K. C. (2010). White adipose tissue development in zebrafish is regulated by both developmental time and fish size. *Developmental Dynamics*, 239(11), 3013-3023.
 - Iribarne-Durán, L. M., Castellero-Rosales, I., & Olea, N. DISRUPCIÓN ENDOCRINA, PESTICIDAS Y ALIMENTACIÓN.
 - Isogai, S., Horiguchi, M., & Weinstein, B. M. (2001). The vascular anatomy of the developing zebrafish: An atlas of embryonic and early larval development. *Developmental Biology*, 230(2), 278–301.
 - Iturra Moreno, F. J. (2012). Determinación de residuos de metomil, carbofuran, carbarilo y profenofos en brócoli (*Brassica oleracea*) por cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS) (Bachelor's thesis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador).
 - Izaola, O., Luis, D. D., Sajoux, I., Domingo, J. C., & Vidal, M. (2015). Inflamación y obesidad (lipoinflamación). *Nutrición hospitalaria*, 31(6), 2352-2358.
 - Jin Y, Chen R, Sun L, Haifeng Qian, Weiping Liu, Zhengwei Fu. Induction of estrogen-responsive gene transcription in the embryo, larval, juvenile and adult life stages of zebrafish as biomarkers of short-term exposure to endocrine disrupting chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 150 (2009) 414–420
 - Krebs, N. F., Himes, J. H., Jacobson, D., Nicklas, T. A., Guilday, P., & Styne, D. (2007). Assessment of child and adolescent overweight and obesity. *Pediatrics*, 120(Supplement 4), S193-S228.
- dfc x
- Koul, O., & Cuperus, G. W. (Eds.). (2007). *Ecologically based integrated pest management*. CABI.
 - Lafontan, M., & Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in lipid research*, 48(5), 275-297.
 - Levin Ferreyra, F. (2019). Generación de líneas transgénicas de pez cebra como herramienta para el estudio del tejido adiposo blanco.
 - Lin, CC; Hui, MNY; Cheng SH. Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Toxicology and Applied Pharmacology* 222 (2007) 159–168

- Linney, E., Upchurch, L., & Donerly, S. (2005). Corrigendum to "Zebrafish as a neurotoxicological model"[*Neurotoxicology and Teratology* 26 (2004) 709–718]. *Neurotoxicology and Teratology*, 1(27), 175.
- MARTÍNEZ-TABCHE, L., GERMÁN-FAZ, C., GALAR-CASTELÁN, I., RAMÍREZ-MORA, B., & CARDONA-HINOJOSA, G. (1996). Efecto tóxico del carbaril y del plomo sobre los lípidos, la clorofila y los azúcares reductores de la microalga *ankistrodesmus falcatus*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 12(2), 61-67.
- Mensah, PK; Okuthe, GE; Onani, M. Sublethal effects of carbaryl on embryonic and gonadal developments of zebrafish *Danio rerio*. *African Journal of Aquatic Science* 2012, 37(3): 271–275.
- McAllister, EJ, Dhurandhar, NV, Keith, SW, Aronne, LJ, Barger, J., Baskin, M., ... y Elobeid, M. (2009). Diez contribuyentes putativos a la epidemia de obesidad. *Revisiones críticas en ciencia de los alimentos y nutrición* , 49 (10), 868-913.
- 38 Heindel, JJ, Newbold, R. y Schug, TT (2015). Disruptores endocrinos y obesidad. *Nature Reviews Endocrinology* , 11 (11), 653-661.
- Montalvo Arenas, C., Méndez, C. T., & Hernández Trujillo, R. (2010). *Biología celular e histología médica. Tejido Adiposo*. Departamento de Cirugía Celular y Tisular. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Morales Ovalles, Y., Miranda de Contreras, L., & Di Bernardo Navas, M. L. (2014). Neurotoxicidad de los plaguicidas como agentes disruptores endocrinos: Una revisión. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 45(2), 96-119.
- Murphey R.D., Zon L.I. Small molecule screening in the zebraWsh. *Methods* 39 (2006) 255–261
- Navas, J. M. (2004). Los disruptores endocrinos en la Unión Europea y la OECD. Curso de alto nivel sobre evaluación de riesgos ambientales. Módulo, 2, 3-4.
- Nusslein-Volhard, C. y Dahm, R. (Eds.). (2002). *Pez cebra* . Prensa de la Universidad de Oxford.
- Prevención, D. (2012). *Tratamiento del Sobrepeso y la Obesidad Exógena*. México, Secretaría de Salud, Actualización.
- Pedroso, GL; Hammes, TO; Escobar TD; Fracasso LB; Forgiarini LF; da Silveria TR. (2012) Blood Collection for Biochemical Analysys in Adult Zebrafish. *Journal Vis. Exp* (63) e3865.
- Perea-Martínez, A., López-Navarrete, G. E., Padrón-Martínez, M., Lara-Campos, A. G., Santamaría-Arza, C., Ynga-Durand, M. A., ... & Ballesteros-del Olmo, J. C. (2014).

Evaluación, diagnóstico, tratamiento y oportunidades de prevención de la obesidad. *Acta pediátrica de México*, 35(4), 316-337.

-Pineda, J., Galofré, J. C., Toni, M., & Anda, E. (2016). Hipotiroidismo. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(13), 722-730.

-Ràfols, M. E. (2014). Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología y Nutrición*, 61(2), 100-112.

-Rico, J. J. D. (2016). *El Libro Negro de los secretos de la obesidad*. Van Haren Publishing.

-Roex, E.W., Keijzers, R., van Gestel, C.A., 2003. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquat. Toxicol.* 64 (4), 451–460.

-Román González, A., & Alfaro Velásquez, J. M. (2005). Nuevos disruptores endocrinos: su importancia en la población pediátrica.

-Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histología: Texto y Atlas*. Ed. Médica Panamericana.

-Rozo, J. C., López, J. A. G. (2015). Rutas de degradación del plaguicida n-metil carbamato carbari. *I3+*, 2(2), 134-147.

-Sampedro Martillo, K. D. R. (2013). Factores epidemiológicos etiológicos clínicos y complicaciones relacionadas con las intoxicaciones domésticas infantiles Hospital del Niño Dr. Francisco de Ycaza Bustamante 2010-2012 (Doctoral dissertation, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Médicas. Escuela de Graduados).

1011

-Sánchez, P., Zanabria, M., Latorre, S., Calvache, J., Coy, A., & Rojas, W. (2020). Disruptores endocrinos y su camino hacia el desequilibrio metabólico. *Revista Colombiana de Endocrinología, Diabetes & Metabolismo*, 7(1), 38-42.

-Schock, E. N., Ford, W. C., Midgley, K. J., Fader, J. G., Giavasis, M. N., & McWhorter, M. L. (2012). The effects of carbaryl on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Zebrafish*, 9(4), 169-178.

-Schock. EN; Ford, WC; Midgley, KJ; Fader, JG; Giavasis, MN; and McWhorter, ML. The Effects of Carbaryl on the Development of Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *ZEBRAFISH*. Volume 9, Number 4, 2012.

-Segner, H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149 (2009) 187–195

- Sharpe, RM y Drake, AJ (2013). Obesógenos y obesidad: ¿una visión alternativa ?. *Obesidad* , 21 (6), 1081-1083.
- Stoletov, K., Fang, L., Choi, S. H., Hartvigsen, K., Hansen, L. F., Hall, C., ... & Miller, Y. I. (2009). Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. *Circulation research*, 104(8), 952-960.
- Tadeo, J. L. (2019). *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples, Second Edition (2nd ed. ed.)*. CRC Press.
- Talero, A. P. (2020). Disrupción endocrina en obesidad y diabetes. *Revista Colombiana de Endocrinología, Diabetes & Metabolismo*, 7(1), 4-4.
- Villalobos, J. Á. C., Meléndez, J. A. B., Montiel, M. E. R., Lee, G. M., & Moctezuma, C. M. (2010). Sobrepeso y obesidad. Situación actual y perspectivas. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 8(4), 202-207.
- Weber, L.P., Hill Jr, R.L., Janz, D.M., 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. *Aquat. Toxicol.* 63, 431–446.
- World Health Organization:, 1 abril). Obesidad y sobrepeso. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Xiao, X., Clark, JM y Park, Y. (2017). Contribución potencial de la exposición a insecticidas y el desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2. *Toxicología alimentaria y química* , 105 , 456-474.
- Zhang, Y; Han, L; He, Q; Chen, W; Sun, C; Wang, X; Chen, X; Wang, R; Hsiao, C; Liu, K. A rapid assessment for predicting drug-induced hepatotoxicity using zebrafish. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 84 (2017) 102–110.