

# Toxicocinética del metilazinfos e inhibición *in vitro* de la actividad colinesterásica por metilazinfos-oxón en los invertebrados *Biomphalaria glabrata* y *Lumbriculus variegatus*

Luis Claudio Cacciatore, Noemí Rosario Verrengia Guerrero y Adriana Cristina Cochón

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Nuñez, 1428, Buenos Aires, Argentina.

Recibido:

**Recibido en:** 25/10/2013

| Aceptado:

**Aceptado en:** 29/10/2013

Contacto: Adriana Cristina Cochón - [adcris@qb.fcen.uba.ar](mailto:adcris@qb.fcen.uba.ar)

## Resumen

Los pesticidas organofosforados ejercen su toxicidad por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, causando neurotoxicidad. La presencia de esta enzima en invertebrados y vertebrados confiere a esta clase de pesticidas una enorme toxicidad hacia blancos no deseados. El metilazinfos es un insecticida organofosforado que debe sufrir una activación metabólica a metilazinfos-oxón para poder inhibir la actividad colinesterasa. En trabajos anteriores se había demostrado que el oligoqueto *Lumbriculus variegatus* es mucho más sensible a la exposición *in vivo* a metilazinfos que el gasterópodo *Biomphalaria glabrata*. En el presente trabajo se investigó si esa sensibilidad diferencial se debía a diferencias en las cinéticas de absorción y/o eliminación del pesticida o a diferencias en la sensibilidad *in vitro* de las colinesterasas de ambos invertebrados al oxón derivado. Utilizando un modelo unicompartimental de primer orden se pudo comprobar que la absorción y eliminación del pesticida son muy rápidas en ambas especies con factores de bioconcentración muy similares. Por el contrario, se necesitó una concentración 1500 veces mayor de metilazinfos-oxón para inhibir un 50% la actividad colinesterasa en los extractos del gasterópodo que en el oligoqueto. Estos resultados estarían indicando que la diferente sensibilidad de ambas especies a la inhibición de la actividad colinesterasa por metilazinfos se debería más a factores toxicodinámicos que a factores toxicocinéticos.

Palabras clave: metilazinfos, invertebrados, toxicocinética, colinesterasa

# Toxicokinetics of azinphos-methyl and *in vitro* inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl-oxon in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*

## Abstract

Organophosphate pesticide toxicity occurs through inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, resulting in neurotoxicity. The presence of this enzyme in invertebrates and vertebrates confers to this class of pesticides a great toxicity to non target organisms. Azinphos-methyl is an organophosphate insecticide that must undergo metabolic activation to azinphos-methyl-oxon in order to inhibit cholinesterase activity. In a previous study, a greater sensitivity of *Lumbriculus variegatus* when comparing with *Biomphalaria glabrata* following in vivo exposure of the organisms to azinphos-methyl has already been observed. In the present study, it was investigated whether the inter-species difference in sensitivity to cholinesterase inhibition was due to: (a) differences in the uptake and elimination rates of the pesticide, or (b) differences in the in vitro sensitivity of the cholinesterases to de oxon derivative. Employing a first order mono compartmental model, it was found that the uptake and elimination rates were very fast in both species, with very similar bioconcentration factors. In contrast, a concentration of azinphos-methyl-oxon 1500 times higher was needed to inhibit 50% cholinesterase activity in the gastropod than in the oligochaete extracts. These results indicate that the different sensitivity of both species to cholinesterase inhibition would be more related to toxicodynamic than to toxicokinetic processes.

Keywords: azinphos-methyl, invertebrates, toxicokinetics, cholinesterases.

## Introducción

Los pesticidas organofosforados se utilizan en la agricultura moderna en todo el mundo. Aunque estos pesticidas persisten en el ambiente por un período relativamente corto de tiempo, presentan una alta toxicidad aguda que puede representar un serio peligro para los ecosistemas (1). La toxicidad primaria aguda de los organofosforados se debe a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), una enzima crítica en la función normal del sistema nervioso. Por ello, la evaluación de la actividad de esta enzima ha sido uno de los criterios de valoración más utilizado para evaluar la exposición de la vida silvestre a estos pesticidas (2).

Los organofosforados que presentan un átomo de oxígeno unido a un átomo de fósforo son altamente reactivos y no necesitan ningún tipo de activación para inhibir la actividad de las colinesterasas (ChE). Por otro lado, aquellos que poseen un átomo de azufre unido al átomo de fósforo, deben ser metabólicamente activados a través de una desulfuración oxidativa a los correspondientes oxones para ejercer su acción inhibitoria (3).

El metilazinfos (MAZ) (Figura 1) es un insecticida organofosforado del tipo fosforoditioato que debe ser metabolizado al oxón derivado (MAZ-oxón) para ejercer su acción anticolinesterásica. En nuestro país, este

insecticida es utilizado en el Norte de la Patagonia para el control de *Carpocapsa pomonella*. Eventualmente, el MAZ alcanza, por escorrentía superficial, a los cursos de agua ejerciendo su efecto tóxico en los ecosistemas acuáticos (4).

cochon1.gif

Figura 1: Estructura molecular del metilazinfos

*Lumbriculus variegatus* es un oligoqueto de agua dulce que ha sido recomendado y ampliamente adoptado como un organismo estándar para estudios de bioacumulación y ensayos de toxicidad (5,6). *Biomphalaria glabrata* es un gasterópodo pulmonado que vive en aguas dulceacuícolas tropicales, principalmente en canales, valles de irrigación y en pequeños cursos de agua. *B. glabrata* es uno de los gasterópodos más estudiados por ser huésped intermediario del parásito *Schistosoma mansoni*, que produce en el ser humano la enfermedad denominada esquistosomiasis (7). Se ha demostrado que *L. variegatus* es más sensible que *B. glabrata* a la inhibición de la actividad ChE por exposición in vivo a MAZ. Así, la exposición por 48 horas a 0,006  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de MAZ inhibió un 50% la actividad ChE de *L. variegatus* mientras que para obtener el mismo grado de inhibición en *B. glabrata* se necesitaron 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> (8). Con el objetivo de ahondar en los mecanismos involucrados en la diferencia de sensibilidad de ambas especies, en el presente trabajo se procedió a: (1) calcular distintos parámetros toxicocinéticos del MAZ (las constantes de absorción y de eliminación, el factor de bioconcentración y el tiempo de vida media) en los organismos expuestos in vivo por 48 h al pesticida y (2) estudiar el efecto in vitro del metabolito biológicamente activo del MAZ, el MAZ-oxón sobre las ChEs de *L. variegatus* y *B. glabrata*. La hipótesis de trabajo fue que la diferencia de sensibilidad al MAZ entre *L. variegatus* y *B. glabrata* podría deberse a diferencias en la sensibilidad del blanco molecular y/o a diferencias en factores toxicocinéticos.

## Materiales y Métodos

### Reactivos

Los organofosforados MAZ Pestanal®, pureza >98%, y MAZ-oxón Supelco® y los reactivos ioduro de acetiltiocolina (AsCh) y 5,5'-ditio-2-bis-nitrobenzoato (DTNB) se compraron a Sigma Aldrich de Argentina S.A. El agua y el acetonitrilo, calidad HPLC, se adquirieron a Sintorgan S.A. (Buenos Aires, Argentina). Los otros reactivos utilizados en el trabajo fueron de grado analítico, marca Carlo Erba, Mallinckrodt o Merck.

### Organismos seleccionados

El oligoqueto *L. variegatus*, fue inicialmente obtenido de los cultivos del Prof. K. Simkiss, Universidad de Reading,

Reino Unido. Una vez en el laboratorio, los organismos se cultivaron en peceras de plástico de 12 litros con aireación como se describe en (9). Para todos los bioensayos se utilizaron organismos adultos de  $2,5 \pm 0,5$  cm de largo.

Los cultivos de *B. glabrata* fueron obtenidos inicialmente del Laboratorio de Invertebrados, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Los organismos fueron luego cultivados en nuestros laboratorios en peceras de vidrio aireadas (9). En todos los experimentos, se emplearon organismos adultos de tamaño similar ( $18 \pm 2$  mm de diámetro).

Para los cultivos y los bioensayos se utilizó agua de red, declorada por al menos 24 horas, con las siguientes propiedades físico-químicas: dureza total =  $67 \pm 3$  mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>; alcalinidad =  $29 \pm 2$  mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>; pH =  $7,0 \pm 0,2$ ; y conductividad =  $250 \pm 17$   $\mu$ S cm<sup>-1</sup>. Para los bioensayos, el agua declorada fue filtrada por una columna de carbón a fin de eliminar la materia orgánica que pudiera estar disuelta.

#### Ensayos de toxicocinética

Los experimentos de absorción se llevaron a cabo bajo condiciones estáticas, sin aireación y sin suministrar alimento, en peceras de 3 L conteniendo 600 ml de solución de pesticida en agua declorada y filtrada. La concentración de MAZ fue de  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Esta concentración se corresponde con el nivel de exposición que produce, en *B. glabrata*, un 50 % de inhibición sobre la actividad de ChEs a las 48 h (8). Las soluciones acuosas conteniendo el pesticida se prepararon a partir de una solución concentrada de MAZ en acetona, siendo la concentración final de acetona en las peceras de exposición de 0,05 %. Los caracoles y las lombrices se expusieron en forma independiente por 0, 20, 40 minutos y 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de exposición, cada caracol o una muestra de 10 a 15 lombrices se retiraron de las peceras, se enjuagaron con agua destilada para eliminar cualquier resto de MAZ procedente de la solución acuosa y se secaron con papel absorbente. En el caso de los caracoles, se les retiró el caparazón. Las muestras se pesaron ( $187 \pm 62$  mg/caracol y  $245 \pm 67$  mg/muestra de lombrices), se homogeneizaron en 1,5 ml de agua destilada, se desproteinizaron y se sometieron a extracción con acetato de etilo y análisis químico.

Para determinar los parámetros toxicocinéticos se utilizó un modelo unicompartmental, en el cual la concentración de un xenobiótico en un organismo acuático es descripta como el resultado de una cinética de primer orden tanto en la absorción como en la eliminación (10):

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_1 \cdot C_W - k_2 \cdot C_{org}$$

En esta ecuación,  $k_1$  es la constante de velocidad de absorción ( $\text{ml g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) y  $k_2$  es la constante de velocidad de eliminación ( $\text{h}^{-1}$ );  $C_W$  es la concentración de exposición en el agua del xenobiótico ( $\text{g ml}^{-1}$ ) y  $C_{org}$  es la

concentración del compuesto en el organismo acuático ( $\text{?g g-1}$ ). Frente a una concentración de exposición constante, esta ecuación puede ser integrada como:  
cochon2.jpg

En una situación de estado estacionario ( $d\text{Corg}/dt = 0$ ) esta ecuación se puede simplificar a  
cochon3.jpg

Las constantes  $k_1$  y  $k_2$  pueden determinarse a través del ajuste matemático por iteraciones múltiples a la ecuación (1) de los datos obtenidos durante la fase de absorción.

A partir del valor de  $k_2$  se puede obtener el tiempo de vida media de un xenobiótico, esto es, el tiempo necesario para que la concentración de dicho compuesto descienda hasta alcanzar un valor igual a la mitad de su concentración inicial.

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_2 = 0,693 / k_2$$

#### Separación y cuantificación del MAZ

La separación y cuantificación del MAZ en muestras de agua y en el material biológico se realizó en un cromatógrafo líquido de alta performance, Class-VP Shimadzu, con columna de fase reversa C18, Supelcosil LC 18, 5  $\text{?m}$ , con dimensiones de 25 cm por 4,6 mm, y guarda columna Supelguard LC-18 de 2 cm, bomba de flujo isocrático, detector UV-visible, perteneciente al Laboratorio de Control de Calidad, Servicio de Farmacia, Hospital Nacional Prof. Dr. Alejandro Posadas. Las corridas se desarrollaron en todos los casos a una temperatura del horno de 40 °C. La columna se equilibró con una fase móvil compuesta por acetonitrilo-agua (45:55 V/V) previamente a la inyección de la muestra. El flujo de la corrida fue de 1ml min-1 y la detección se realizó con un detector UV-Visible a 220 nm. La respuesta fue lineal en el rango de concentraciones comprendido entre 0,17-54,6  $\text{?g ml-1}$  y la recta de regresión lineal fue  $y = 118.736,73x$  (mg L-1) + 974,10. El límite de cuantificación fue de 0,17  $\text{?g ml-1}$ .

#### Inhibición in vitro de la actividad ChE por MAZ-oxón

Los tejidos de *L. variegatus* y *B. glabrata* fueron homogenizados en buffer Tris/HCl 20 mM, pH 7,5, adicionado de 0,5 mM de EDTA. Los homogenatos se centrifugaron a 11.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. En una batería de tubos plásticos se agregaron distintas concentraciones de MAZ-oxón disuelto en etanol absoluto y se evaporó casi a sequedad en corriente de nitrógeno. A estos tubos se incorporaron, al momento de efectuar la incubación, 300  $\text{?l}$  del sobrenadante. La incubación se realizó a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente se procedió a medir la actividad ChE.

La actividad ChE se midió, por duplicado, en buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 8,0, 0,2 mM de DTNB y 0,75 mM de AsCh (9). La actividad se registró continuamente a 412 nm. La lectura cinética se efectuó cada 10 segundos desde 0 a 90 segundos. Los valores se corrigieron por hidrólisis espontánea del sustrato y por la reducción no específica del cromógeno por los extractos titulares. La concentración de proteínas se midió por el método de Lowry y col. (11) utilizando albúmina sérica bovina como estándar. La actividad enzimática se expresó como ?moles de sustrato hidrolizado min-1 mg proteína-1.

#### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valores individuales o como el promedio ± D.E. (desviación estándar). El efecto del MAZ-oxón sobre la actividad ChE se analizó utilizando ANOVA de un factor y las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando la prueba de Tukey-Kramer. Se utilizó un nivel de significación de 0,05.

#### Resultados

##### Toxicocinética del MAZ

Las Figuras 2 y 3 representan la cinética de absorción del metil azinfos por *L. variegatus* y *B. glabrata*, respectivamente, durante una exposición constante a 5 ?g ml-1 del pesticida. Los datos experimentales se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal iterativo a la ecuación  $Co = k1/k2 Cw (1 - e^{-k2t})$  y se calcularon los valores de k1 y k2. La concentración del metil azinfos en el agua, fue constante y comprobada experimentalmente ( $5,00 \pm 0,10$  ?g ml-1) durante la exposición.

cochon4.jpg

Figura 2: Cinética de absorción del MAZ por *L. variegatus* y el aparente estado estacionario alcanzado. Los datos experimentales corresponden a la fase de exposición al pesticida (5 ?g ml-1). Los mismos se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal iterativo a la ecuación  $Co = k1/k2 Cw (1 - e^{-k2t})$  utilizando el programa OriginPro versión 7.5. Cada punto representa el contenido del compuesto parental correspondiente a un pool de 10-15 lombrices. La línea continua muestra el ajuste al modelo con un coeficiente de determinación,  $R^2 = 0,82179$ .  
cochon5.jpg

Figura 3: Cinética de absorción del MAZ por *B. glabrata* y el aparente estado estacionario alcanzado. Los datos experimentales corresponden a la fase de exposición al pesticida (5 ?g ml-1). Los mismos se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal iterativo a la ecuación  $Co = k1/k2 Cw (1 - e^{-k2t})$  utilizando el programa OriginPro versión 7.5. Cada punto representa el contenido del compuesto parental correspondiente a un caracol. La línea

continua muestra el ajuste al modelo con un coeficiente de determinación,  $R^2 = 0,93568$ .

En el caso de *L. variegatus*, los resultados obtenidos fueron para la constante de absorción,  $k1 = 7,71 \pm 0,35 \text{ ml g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y, para la constante de eliminación,  $k2 = 0,70 \pm 0,10 \text{ h}^{-1}$ . Según este modelo el estado estacionario se alcanzó aproximadamente a las 5 horas de exposición. El FBC<sub>cin</sub> resultó de  $11,0 \pm 0,5 \text{ ml g}^{-1}$  y el  $t_{1/2}$  de 59 minutos.

En el caso de *B. glabrata*, los resultados obtenidos fueron para la constante de absorción,  $k1 = 6,56 \pm 0,13 \text{ ml g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y, para la constante de eliminación,  $k2 = 0,76 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ . Según este modelo el estado estacionario se alcanzó aproximadamente a las 4 horas de exposición. El FBC<sub>cin</sub> resultó de  $8,6 \pm 0,2 \text{ ml g}^{-1}$  y el  $t_{1/2}$  de 55 minutos.

#### Inhibición in vitro de la actividad ChE por MAZ-oxón

Los valores de actividad ChE en el sobrenadante de los homogenatos de *L. variegatus* y *B. glabrata* incubados durante 15 minutos con distintas concentraciones de MAZ-oxón, se muestran en las Figuras 4 y 5, respectivamente. En ambos casos se observó una inhibición enzimática dependiente de la concentración de MAZ-oxón. La concentración de xenobiótico requerida para causar in vitro un 50% de la inhibición de la actividad ChE (CI<sub>50</sub>) en *L. variegatus* y el intervalo de confianza del 95% resultó ser de  $0,0025$  ( $0,0020$ - $0,0030$ )  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . En el caso de *B. glabrata* la CI<sub>50</sub> y el intervalo de confianza del 95% fueron:  $3,8$  ( $2,2$ - $10,7$ )  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .  
cochon6.jpg

Figura 4: Efecto de concentraciones crecientes de MAZ-oxón sobre la actividad de colinesterasa (ChE) en *L. variegatus*. Cada punto representa el promedio  $\pm$  D.E. de tres o más determinaciones. Las diferentes letras señalan diferencias estadísticas significativas a  $p < 0,05$   
cochon7.jpg

Figura 5: Efecto de concentraciones crecientes de MAZ-oxón sobre la actividad colinesterasa (ChE) en tejidos blandos de *B. glabrata*. Cada punto representa el promedio  $\pm$  D.E. de tres o más determinaciones. Las diferentes letras señalan diferencias estadísticas significativas a  $p < 0,05$

#### Discusión

Estudios previos realizados exponiendo a *L. variegatus* y *B. glabrata* por 48 horas a MAZ habían permitido demostrar que los oligoquetos eran unas 1000 veces más sensibles que los gasterópodos a la inhibición in vivo de la actividad ChE por este organofosforado (8). Los resultados del presente trabajo indican que tanto en *L. variegatus* como en *B. glabrata* expuestos a la concentración de  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de MAZ la absorción fue rápida, alcanzándose un estado estacionario aparente entre las 4 y 5 horas de exposición. En ambas especies, la velocidad de eliminación también fue rápida con un  $t_{1/2}$  menor a 1 hora. Por último, los FBC<sub>cin</sub> calculados utilizando el modelo

unicompartmental tampoco difirieron significativamente entre ambas especies. Estos resultados estarían indicando que la diferencia de sensibilidad entre los oligoquetos y los gasterópodos no se debería a diferencias en sus respectivas cinéticas de absorción y/o eliminación del MAZ ni en su capacidad de bioconcentrarlo.

Además de procesos toxicocinéticos, procesos toxicodinámicos tales como diferencias en la sensibilidad de los enzimas blanco pueden contribuir a la diferente susceptibilidad para la inhibición de las ChEs entre las especies. En el presente trabajo se pudo establecer que la actividad ChE de *L. variegatus* fue 1500 veces más sensible al MAZ-oxón que la de *B. glabrata*. Estos resultados podrían deberse, por un lado, a las diferencias en las ChEs presentes en ambos organismos, considerando que trabajos previos han demostrado que la actividad principal en *L. variegatus* es butirilcolinesterasa y en *B. glabrata* es AChE (8). Por otro lado, también podrían deberse a la presencia en los extractos de carboxilesterasas con distinta afinidad por el MAZ-oxón. Estas enzimas juegan un rol importante en el metabolismo y subsecuente detoxificación de muchos pesticidas y drogas. Las carboxilesterasas participan en la detoxificación de los organofosforados de dos maneras: a) por hidrólisis de uniones éster de aquellos organofosforados que contienen este tipo de unión y b) por unión estequiométrica de los organofosforados en el sitio activo de la enzima produciendo su inhibición. Debido a esta unión estequiométrica, varios investigadores han postulado que las carboxilesterasas protegerían a la AChE de la toxicidad mediada por estos pesticidas (12, 13). Así, la presencia en *B. glabrata* de carboxilesterasas mucho más sensibles al MAZ-oxón que las de *L. variegatus* podrían contribuir, al menos en parte, a explicar por qué se necesita una mayor concentración de MAZ-oxón para inhibir la actividad ChE de *B. glabrata*. En este sentido, estudios in vivo mostraron que mientras las carboxilesterasas de *B. glabrata* que utilizan p-nitrofenilbutirato como sustrato son más sensibles que las ChEs a la inhibición por MAZ, en el caso de *L. variegatus* ocurre lo contrario (14,15).

## Referencias

1. Laguerre C., Sanchez-Hernandez, J., Kohler, H.R., Triebskorn, R., Capowiez, Y., Rault, M., Mazzia, C. (2009). B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure. *Environ. Poll.* 157:199-207.
2. Sanchez-Hernandez, J.C. (2007). Ecotoxicological Perspectives of B-Esterases in the Assessment of Pesticide Contamination. In: Plattenberg, R. H. (Ed.), *Environmental Pollution: New Resarch*. Nova Science Publishers, Inc. N. Y., USA, pp. 1-45.
3. Gupta, R. C.(2006). Classification and Uses of Organophosphates and Carbamates. In Gupta, R. C.(Ed), *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Elsevier Academic Press: Burlington, MA, pp 5-24.
4. Loewy, R.M., Monza, L.B., Kiers, V.E., Savini, M.C. (2011). Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. *J. Environ. Sci. Health B.* 46: 662-670.

5. USEPA, United States Environmental Protection Agency (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, 600/R-94/024. US EPA Washington, DC.
6. ASTM, American Society for Testing and Materials (1995). Standard guide for conducting sediment toxicity tests with freshwater invertebrates. E 1393-94<sup>a</sup>. En: Annual Book of ASTM Standards. Vol 11.05. Philadelphia, PA.
7. Balaban, A. E., Fried, B. (2013) Maintenance of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* in artificial spring water, deionized water, or conditioned tap water. Comparative Parasitology 80(1):118-119. 2013
8. Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N., Pechén de D'Angelo, A.M., Cochón, A.C. (2006). Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. Toxicology 222:185-194.
9. Kristoff, G., Verrengia Guerrero N.R., Cochón A.C. (2008). Effects of azinphos-methyl exposure on enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. Chemosphere 72:1333-1339.
10. Nichols, J. W., Schultz, I. R., Fitzsimmons, P.N. (2006) *In vitro*–*in vivo* extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish. I. A review of methods, and strategies for incorporating intrinsic clearance estimates into chemical kinetic models. Aquat. Toxicol. 78: 74–90.
11. Lowry, O.H., Rosebrough, Fan, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
12. Maxwell, D. M. (1992) The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. Toxicol. Appl. Pharmacol. 114:306-312.
13. Wheelock, C.E., Shan, G., Ottea, J. (2005) Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. J. Pestic. Sci. 30:75-83.
14. Kristoff, G. (2010). Estudio comparativo de biomarcadores en los invertebrados acuáticos *Biomphalaria glabrata* y *Lumbriculus variegatus* expuestos a pesticidas de relevancia ambiental. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
15. Kristoff, G., Chiny Barrionuevo, D., Cacciatore, L.C., Verrengia Guerrero, N. R., Cochón, A.C. (2012). *In vivo* studies on inhibition and recovery of B-esterase activities in *Biomphalaria glabrata* exposed to azinphos-methyl: Analysis of enzyme, substrate and tissue dependence. Aquat. Toxicol. 112-113, 19-26.

Adriana C. Cochón trabaja en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Departamento de Química Biológica, Ciudad Universitaria, Pab. II. 4to piso, 1428 Buenos Aires, Argentina.

