

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
INSTITUTO DE ACUICULTURA DE LOS LLANOS -IALL
PROGRAMA DE POSTGRADO EN ACUICULTURA**

**Efecto de una presentación comercial de glifosato en
alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)**

EDWIN GÓMEZ RAMÍREZ

**Villavicencio, Meta - Colombia
2013**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
INSTITUTO DE ACUICULTURA DE LOS LLANOS –IALL
PROGRAMA DE POSTGRADO EN ACUICULTURA**



**Efecto de una presentación comercial de glifosato en
alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)**

EDWIN GÓMEZ RAMÍREZ BSc, Esp.

Tesis presentada como requisito parcial
para la obtención del título de Magister en
Acuicultura- Aguas continentales

Director
Pedro René Eslava Mocha MV, MSc.
Profesor IALL

Codirector
Hernán Hurtado Giraldo Ph.D.
Docente Investigador.
Universidad Militar Nueva Granada

**Villavicencio, Meta - Colombia
2013**

COMISIÓN EVALUADORA

Ramón Anadon, Ph.D.

Departamento de Biología Celular y Ecología
Universidad de Santiago de Compostela – España

Bernardo Baldisseroto, Ph.D.

Departamento de Fisiología y Farmacología
Universidad Federal de Santa Maria – Brasil



Maurício Laterça Martins, Ph.D.

Departamento de Acuicultura – Patología de Peces.
Universidad Federal de Santa Catarina – Brasil

Pedro René Eslava Mocha MV, MSc.
Universidad de los Llanos, Colombia
Director

Hernán Hurtado Giraldo Ph.D.
Docente Investigador.
Universidad Militar Nueva Granada
Codirector

DEDICATORIA

- A Dios.
- A mi esposa Leslie Guzmán Beltrán por su constante apoyo emocional e intelectual en la ejecución y redacción del documento.
- A mis padres; Dídimo Gómez Ramírez y Natividad Ramírez Luna quienes siempre me apoyan de manera incondicional, al igual que a mis hermanos (Dídimo, Mercedes, Laura, Fabio y Lizeth) y a todos mis tíos.
- A mis grandes amigos Oswaldo Tovar y Alexander Torres.



AGRADECIMIENTOS

- A mis directores; Pedro R. Eslava Mocha y Hernán Hurtado Giraldo, quienes siempre estuvieron dispuestos a transmitir sus conocimientos y apoyarme incondicionalmente para llevar a feliz término la investigación, pues lastimosamente en Colombia siempre es difícil la consecución de recursos y equipos para la investigación básica y aplicada.
- Al todo el grupo de Ictiología de la Universidad Militar Nueva Granada: Hernán Hurtado, Oswaldo Tovar, Martha Obando, María L. Caldas, Ana Torres, Laura Rincón, Liliana Cifuentes, Sheryll Corchuelo, Diana Castañeda, Tatiana Peña, Estefany García, Edna Riaño, Laura Cotrino, Giovanni Muñoz, por quienes siempre he luchado y apoyado incondicionalmente.
- Al grupo de Sanidad de organismos Acuáticos de la Universidad de los Llanos.
- A Henry Acuña por su silencioso pero eficiente trabajo cuando se desempeñó como director de investigaciones de la Universidad Militar Nueva Granada



MACT
00010
Ej1

INDICE DE TABLAS



Página

Tabla 1. Proporciones de resina Poli/Bed®812 – óxido de propileno...21	
Tabla 2. Parámetros productivos.....24	
Tabla 3. Variables de crecimiento de alevinos de <i>P. brachypomus</i> expuestos a diferentes concentraciones de Roundup Activo®.....26	
Tabla 4. Parámetros productivos de los alevinos de <i>P. brachypomus</i> expuestos a diferentes concentraciones de Roundup Activo®.....27	
Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos en las unidades experimentales.....28	
Tabla 6. Morfometría de las neuronas de los GRDs y sus núcleos...57	

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Alevino de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>).....	19
Figura 2. A y B. Panorámica de branquia de alevinos de cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T1.....	30
Figura 3. Detalle de branquia de alevinos de cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T2.....	31
Figura 4. A y B. Panorámica de branquia de alevinos de cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T2.....	32
Figura 5. A y B. Detalle de branquia de alevinos de cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T2.....	32
Figura 6. A, B y C. Detalle de branquia de alevino de cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T2.....	33
Figura 7. A y B. Panorámica de branquias de alevinos de cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T3.....	33
Figura 8. A. Panorámica de branquia de alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T3.....	34
Figura 9. A y B. Panorámica y detalle de branquia de alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T3.	34
Figura 10. A y B. Detalle de los hemisferios telencefálicos de los alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T1.....	40
Figura 11. A y B. Detalle de los hemisferios telencefálicos de los alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T2.....	40
Figura 12. A, B, C y D. Detalle de los hemisferios telencefálicos de los alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T3.....	41

Figura 13. Cerebro de alevinos Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>). Se puede observar un esquema de los diferentes niveles de los hemisferios telencefálicos ilustrando la posición de las CSMP....	42
Figura 14. GRDs en alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) un corte transversal del T1.....	49
Figura 15. GRDs en alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) en corte longitudinal del T1.....	50
Figura 16. Detalle de un GRD en alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T1 en corte longitudinal.....	51
Figura 17. GRD en alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T2 en corte longitudinal.....	51
Figura 18. GRD en alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T2 en corte longitudinal.....	52
Figura 19. GRD en alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T3 en corte longitudinal.....	52
Figura 20. Neuronas sensoriales de los GRDs en alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T3 evidenciando vesículas citoplasmáticas y CSMP.....	53
Figura 21. GRD en alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T3 en corte longitudinal.....	54
Figura 22. Neuronas sensoriales de los GRDs en alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T3 evidenciando CSMP..	55
Figura 23. CSMP en el torrente sanguíneo en alevinos de Cachama blanca (<i>P. brachypomus</i>) del T3.....	56
Figura 24. Porcentaje de vesículas citoplasmáticas de las neuronas tipo A.....	58
Figura 25. Porcentaje de vesículas citoplasmáticas de las neuronas tipo B.....	59
Figura 26. Porcentaje de neuronas dependiendo de las características morfológicas de las neuronas tipo A.....	59



Figura 27. Porcentaje de neuronas dependiendo de las características morfológicas de las neuronas tipo B.....60

Figura 28. Hígado de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T1.....68

Figura 29. Detalle del hígado de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T1.....68

Figura 30. Detalle del hígado de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T2.....69

Figura 31. Detalle del hígado de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T3.....70

Figura 32. Riñón de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T1.....75

Figura 33. Riñón de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T2 y T3.....76

Figura 34. Riñón cefálico de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T3.....77



TABLA DE CONTENIDO

	<i>Página</i>
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
<i>1.1. Implicaciones y situación actual del uso del GP en Colombia.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2. Glifosato (GP) Roundup® naturaleza y efectos.....</i>	<i>7</i>
<i>1.3. Efecto del GP y del Roundup® sobre organismos y ecosistemas acuáticos.....</i>	<i>9</i>
<i>1.4. Efectos del GP y del Roundup® sobre peces.....</i>	<i>10</i>
<i>1.5. Efectos del GP sobre el Sistema Nervioso de peces.....</i>	<i>13</i>
<i>1.6. Ganglios de la raíz dorsal (GRDs) y sus neuronas sensoriales.....</i>	<i>13</i>
<i>1.7. Clasificación morfológica de las neuronas sensoriales de los GRDs.....</i>	<i>14</i>
<i>1.8. Hallazgos en el estudio de los GRDs en Cachama blanca (P. brachypomus).....</i>	<i>16</i>
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....	17
<i>II.1. Objetivo general.....</i>	<i>17</i>
<i>II.2. Objetivos específicos.....</i>	<i>17</i>



CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
<i>III.1. Comité de ética.....</i>	18
<i>III.2. Material biológico.....</i>	18
<i>III.3. Sustancia experimental.....</i>	20
<i>III.4. Diseño experimental.....</i>	20
<i>III.5. Procesamiento de los tejidos para microscopia óptica de alta resolución (MOAR).....</i>	21
<i>III.6. Estudio histopatológico.....</i>	22
<i>III.7. Estudio morfométrico de las neuronas sensoriales de los GRDs....</i>	23
<i>III.8. Área, diámetro y perímetro de las neuronas tipo A y B de los GRDs.</i>	23
<i>III.9. Parámetros productivos.....</i>	24
<i>III.10. Análisis estadístico.....</i>	25
 CAPÍTULO IV. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y CALIDAD DE AGUA....	26
IV. 1. RESULTADOS.....	26
<i>IV.1.1. Variables de crecimiento.....</i>	26
<i>IV.1.2. Parámetros productivos.....</i>	27
<i>IV.1.3. Parámetros de calidad de agua.....</i>	27
IV. 2. DISCUSIÓN.....	28
<i>IV.2.1. Parámetros de crecimiento.....</i>	28
 CAPÍTULO V. BRANQUIAS.....	30

V.1. RESULTADOS.....	30
V.1.1. <i>Branquias</i>	30
V.2. DISCUSIÓN.....	35
V.2.1. <i>Branquias</i>	35
CAPÍTULO VI. HEMISFERIOS TELENCEFÁLICOS.....	39
VI.1. RESULTADOS.....	39
VI.1.1. <i>Hemisferios telencefálicos</i>	39
VI. 2. DISCUSIÓN.....	43
VI.2.1 <i>Hemisferios telencefálicos</i>	43
CAPÍTULO VII. GANGLIOS DE LA RAÍZ DORSAL (GRDs) Y SUS NEURONAS.....	48
VII. 1. RESULTADOS.....	48
VII.1.1. <i>GRDs y sus neuronas</i>	48
VII.1.2. <i>Morfometría de las neuronas de los GRDs</i>	56
VII.2. DISCUSIÓN.....	60
VII.2.1. <i>Neuronas sensoriales de los GRDs</i>	60
CAPÍTULO VIII. HÍGADO.....	67
VIII.1. RESULTADOS.....	67
VIII.1.1. <i>Hígado</i>	67
VIII.2. DISCUSIÓN.....	70

<i>VIII.2.1. Hígado</i>	70
CAPÍTULO IX. RIÑÓN	74
IX. 1. RESULTADOS	74
<i>IX.1.1. Riñón</i>	74
IX. 2. DISCUSIÓN	77
<i>IX.2.1. Riñón</i>	77
CAPÍTULO X. CONCLUSIONES, CONSIDERACIONES FINALES	79
X.1. CONSIDERACIONES FINALES	79
X.2. CONCLUSIONES	81
CAPÍTULO XI. BIBLIOGRAFÍA	82



RESUMEN

En Colombia el glifosato es usado para el control de malezas, maduración de caña, desecante de granos y erradicación de cultivos ilícitos. Este producto es aplicado principalmente bajo la presentación comercial Roundup®. Además se ha encontrado un efecto nocivo de este producto en ecosistemas acuáticos afectando una amplia variedad de organismos incluyendo peces. Se planteó determinar el efecto de una presentación de GP en varios órganos de interés histopatológico (branquias, cerebro, neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal, hígado y riñón) en alevinos de cachama blanca (*P. brachypomus*) expuestos a concentraciones subletales. Se evaluaron tres tratamientos: T1 0 mg/L, T2 0.1 mg/L y T3 1.0 mg/L de glifosato diluido a partir de la concentración inicial presente en el producto Roundup® Activo. Los peces se mantuvieron en acuarios de 40 L, a una densidad de 20 peces/acuario (2.5 g/L). Se alimentaron tres veces al día (9:00, 12:00 y 16:00 h) con alimento comercial al 35% de proteína bruta ajustada al 5% de la biomasa total. La exposición al glifosato fue de 30 días. Semanalmente se midieron parámetros de calidad de agua: oxígeno disuelto, pH, amonio, dureza (GH y KH) y temperatura. Quincenalmente se registraron variables de crecimiento (peso, longitud total y estándar) y se estimaron algunos parámetros productivos (GP, FCA, TCA, TCE y sobrevivencia). Se sacrificaron 22 peces por tratamiento y se disectaron para la extracción de los órganos de interés. Las muestras se fijaron en Karnovsky, se postfijaron en tetraóxido de osmio al 2%, se deshidratarán en concentraciones ascendentes de etanol y se incluyeron en Poli/Bed® 812. Se obtuvieron cortes de 1 µm y se tiñeron con azul de toluidina. Se realizó una descripción histológica de los controles no expuestos, y con base en esto, se describieron las alteraciones encontradas en los órganos provenientes de los peces expuestos al glifosato. No se encontraron diferencias en el crecimiento y parámetros productivos. En branquias se evidenciaron alteraciones en T2 y T3 siendo más acentuadas en T3; se caracterizaron por edemas, desarreglo de células pilares, aneurismas, leve desprendimiento epitelial, hipertrofia e hiperplasia de células de cloro y moco. Se identificaron Células Similares a Mastocitos en Peces (CSMP) en los hemisferios telencefálicos del T2 y T3,



siendo más abundantes en este último, estas células también se hallaron en los ganglios de la raíz dorsal, asociadas a neuronas tipos A y B, y también a haces nerviosos. La principal alteración en las neuronas sensoriales de los ganglios fue la presencia de vesículas citoplasmáticas y núcleos migrados. Las neuronas más susceptibles fueron las tipo B, presentando disminución de tamaño. El hígado presentó alteraciones histopatológicas leves, en el T2 se encontró un ligero desplazamiento de núcleos en los hepatocitos y algunas vacuolas picnóticas, mientras que el T3 adicionalmente hubo cambios microcirculatorios e incremento en la heterogeneidad de los hepatocitos. El riñón no exhibió alteraciones considerables en ninguno de los tratamientos evaluados. El GP bajo la presentación de Roundup® Activo produce alteraciones histopatológicas diferenciales siendo mayor en el T3, los principales órganos afectados fueron branquias, GRDs, cerebro, e hígado. Lo anterior demuestra que concentraciones subletales de Roundup® Activo alteran histológicamente varios órganos en los alevinos de Cachama blanca.



Palabras claves: Roundup® Activo, histopatología, toxicología acuática, peces, concentraciones subletales.

ABSTRACT

In this work the effect of a commercial GP presentation over several histopathologically relevant organs (gills, brain, sensory neurons of dorsal root ganglia, liver and kidney) were determined in Cachama blanca (*P. brachypomus*) fry exposed to sublethal doses. Three treatments were evaluated: T1 0 mg/L, T2 0.1 mg/L and T3 1.0 mg/L of glyphosate diluted from the initial concentration present in Roundup® Activo. Fishes were kept in 40L aquaria, at 20/fishes per aquarium (2.5 g/L), and feed thrice a day (9:00, 12:00 y 16:00 h) with 35% protein commercial pellets at 5% of total biomass. Exposition to glyphosate last for 30 days. Weekly, water quality parameter like dissolved oxygen, pH, ammonia, hardness (GH and KH) and temperature were

determined. Every 15 days growth variables (weight, total and standard length) were taken, and some productive parameters (WG, FCR, AGR, SGR and survival) were calculated. Twenty two fishes were sacrifice for organ extraction. Samples were fixed in Karnovsky, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated with ethanol, and embedded in Poli/Bed® 812. One micrometer sections were obtained and stained with toluidine blue. A histological description on non-exposed controls was carried out, and used for describing histological alterations in organs from glyphosate exposed fishes. No differences were found in growth or productive parameters. Gills in T2 and T3 show some alterations, as edema, broken pillar cells, aneurism, simple squamous epithelium slight, chloride a goblet cells hypertrophy and hyperplasia. Mast like cells were identified in T2 and T3 telencephalic hemispheres, with more cells in T3. These cells were also observed in dorsal root ganglia, associated to types A and B sensory neurons, as well as in nerve fascicles. Main alterations in these sensory neurons were cytoplasmatic vesicles and migrated nuclei. B neurons were more susceptible, and did show a diminished size. Liver only presents slight alterations. In T2 some displacement of hepatocytes nuclei, and pyknotic vacuolaes, while in T3 there were also microcirculatory changes and increasing hepatocyte heterogeneity. No alterations were observed in kidneys.



Keywords: Roundup® Active, histopathology, aquatic toxicology, fish, sublethal concentrations.

INTRODUCCIÓN

El GP es un herbicida de amplio espectro usado comúnmente para el control de malezas en una gran variedad de cultivos agrícolas (Modesto y Martínez, 2010). Este herbicida es aplicado mundialmente bajo varias presentaciones comerciales siendo una de las más usadas el Roundup®. Según William *et al.*, (2000) no presenta riesgo para humanos, mamíferos y aves en las concentraciones recomendadas por el fabricante. En Colombia este producto también es usado para maduración de caña y desecante de granos (Nivia, 2001). Adicionalmente, en el marco del Plan Colombia se ha utilizado en aspersión aérea para el control de cultivos ilícitos de coca y amapola. Esta última actividad se a adelantando con el producto Roundup® Ultra en combinación con otras sustancias surfactantes siendo aplicado alrededor de 4.330.738 litros entre los años 2004- 2008 (Díaz, 2009), lo cual ha generado polémica por el posible efecto negativo en los ecosistemas.

En la actualidad se dispone de evidencias muy importantes que demuestran como las poblaciones naturales de peces pueden ser afectadas por la aplicación de sustancias para el control de plagas y malezas en los sistemas agropecuarios (Gluszczak *et al.*, 2007; Eslava *et al.*, 2007; Kreutz *et al.*, 2011). En Colombia se ha documentado información concerniente a alteraciones histopatológicas en especies nativas de peces como es el caso de la Cachama blanca (Eslava *et al.*, 2007). Esta última especie fue elegida como modelo de estudio por los Grupos de Sanidad de la Universidad Llanos y de Ictiología de la Universidad Militar Nueva Granada por varias razones: se conocen varios aspectos de su biología básica, es una especie endémica de las regiones sometidas a las fumigaciones y es la segunda especie de interés comercial en la acuicultura Colombiana. Estos grupos han concentrado esfuerzos para evaluar el efecto del comúnmente usado Roundup® Activo en algunos órganos blanco, los cuales cumplen funciones vitales en los peces (branquias, cerebro, ganglios de la raíz dorsal, hígado y riñón). Aunque se cuenta con estudios en algunos de los órganos antes mencionados, estos fueron realizados con histología convencional, lo cual dificulta la observación en más detalle de los

daños celulares. De ahí, la necesidad e importancia de estudios que permitan comprender el efecto del GP en peces. Por consiguiente, se plantea un estudio en microscopía óptica de alta resolución de estos órganos en alevinos de Cachama blanca para determinar las alteraciones histológicas producidas por concentraciones subletales de Roundup® (0,1 y 1 mg/L), las cuales son más probables de encontrar en un ecosistema acuático, debido a la fumigación con el producto en zonas aledañas o distantes, ya sea por escorrentía o por acción del viento.

Estudiar el efecto de estas sustancias es de gran importancia en Sanidad pública y en el ámbito ambiental pues estos hallazgos pueden ser utilizados para regular el uso y concentraciones de este herbicida con el fin de proteger las especies nativas de peces y la salud de la población Colombiana.

I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Implicaciones y situación actual del uso del glifosato (GP) en Colombia

En Colombia el Roundup®, es el principal producto usado en la agricultura para el control de malezas en los cultivos tradicionales. Así mismo, se usa como desecante de granos y por vía aérea como madurante en los cultivos de caña de azúcar (Nivia, 2001). Hace dos años Monsanto desarrolló la presentación comercial de Roundup Activo® para el uso en los países del área andina (Venezuela, Perú, Ecuador y Colombia) con la particularidad que no revela el tipo y concentración del surfactante (MONSANTO, 2011).

Adicionalmente, en las prácticas de erradicación química de cultivos de coca y amapola se ha venido utilizando otra presentación comercial de GP denominada Roundup® Ultra la cual difiere en la concentración de sus componentes con respecto Roundup Activo®, presentando 41,5% de GP y 16% de POEA (MONSANTO, 2005; citado en Eslava *et al.*, 2007).

La utilización del Roundup® Ultra mediante aspersión aérea de cultivos ilícitos dificulta su aplicación en áreas específicas, posibilitando su llegada hasta cultivos lícitos, fauna silvestre y cuerpos de agua por acción del viento, siendo altamente dependiente de las condiciones meteorológicas, la altura de aspersión y dispersión de la solución (WHO, 1994; Eslava *et al.*, 2007). Estos aspectos agravan el panorama pues no se conocen claramente los efectos de este herbicida, además varios investigadores afirman que el GP puede ser fácilmente desorbido o liberado en algunas clases de suelos, es decir que se



puede soltar de las partículas de suelo pudiendo ser muy móvil (Eslava *et al.*, 2007). Cox (1995) demostró que el 80% del GP adicionado se libera en un período de dos horas lo que podría generar contaminación de otras regiones del suelo o alcanzar cuerpos de agua por medio de la escorrentía.

Si se considera que un avión de 300 galones (1137 litros) deposita 40 L/ha de la mezcla, con una descarga efectiva de 23.4 L/ha de Roundup® Ultra, esta descarga equivale a 10.3 L/ha de GP en forma de sal ácida isopropilamina de GP (IPA). Teniendo en cuenta la ficha técnica de este producto implica que el Roundup® Ultra se aplica al 58.5% en la mezcla y el GP al 26%, y no al 1% recomendado en Estados Unidos para aplicaciones terrestres, con equipos de protección y dirigido a las malezas agrícolas (Nivia, 2001).

Por tanto, los conceptos sobre seguridad para el ambiente y la salud, emitidos con base en la caracterización y evaluación de riesgos, calculados para las "condiciones normales recomendadas de uso" en Estados Unidos, no son comparables con los sistemas de aspersión que se utilizan en nuestro medio, porque en Colombia se está aplicando el GP sobre los cultivos ilícitos y todo lo que lo circunde, por vía aérea y en una concentración hasta 26 veces mayor, con el agravante de que se está adicionando el surfactante Cosmo-Flux 411F, el cual puede hasta cuadruplicar la acción biológica del Roundup®. Esto es particularmente serio ya que los principales efectos de las diferentes presentaciones de Roundup® se deben al efecto de los surfactantes (Tsui y Chu, 2003; Giesy *et al.*, 2000).

1.2. Glifosato (GP) Roundup® naturaleza y efectos

Aparte de los usos antes mencionados para Colombia en otros países es también usado para el control de malezas acuáticas (Olaleye y Akinyemiju *et al.*, 1996), control de algas en estanques de peces, lagos, canales y drenajes (Peluso *et al.*, 1998).

El GP es el principio activo del herbicida comercial Roundup® el cual está constituido de 48% de sal ácida isopropilamina de GP (IPA), 15% de surfactante polioxietilamina (POEA) y 37% de agua (Tsui y Chu, 2003; Oldham *et al.*, 2002). Es importante mencionar que aunque hay estudios acerca de las propiedades físicas, químicas y toxicológicas del GP (WHO, 1994), aun es escasa la información en cuanto a las diferentes formulaciones usadas de este herbicida (Tsui y Chu, 2003, Salazar-Lugo *et al.*, 2011).

Marc *et al.*, (2004) reportaron que el GP bajo la presentación comercial de Roundup® (0.1%) retrasa los tiempos de eclosión de los erizos de mar. Además el surfactante POEA es altamente tóxico en los embriones de esta especie, inclusive puede inhibir la eclosión, y la transcripción necesaria para los procesos de desarrollo (Marc *et al.*, 2005). Si tenemos en cuenta que estos efectos se presentaron con concentraciones entre 0.01 a 0.12 mM, y la concentración recomendada por la casa comercial es de 40 mM y la aplicada en Colombia para la aspersion de cultivos ilícitos es de 234 mM (Eslava *et al.*, 2007) es preocupante el posible efecto sobre nuestros organismos acuáticos en sus primeras etapas de desarrollo como es el caso de los alevinos de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), ya que en este período de su ciclo vital podrían ser más sensibles a cualquier agente tóxico (Dinehart *et al.*, 2010).

Estudios realizados en humanos expuestos a aspersiones aéreas con GP en Ecuador indican un posible efecto genotóxico del herbicida al realizar pruebas de cometa, las cual es una herramienta que muestra daños del DNA y posibles riesgos genéticos al ser expuestos los organismos a ciertos químicos (Paz-y-Miño *et al.*, 2007). Se reporta también que el surfactante POEA causa daño gastrointestinal, al sistema nervioso central, problemas respiratorios y destrucción de glóbulos rojos. El POEA al estar constituido por 1-4 dioxano, puede causar cáncer en animales, además de daños del hígado y riñón en humanos (Nivia, 2001).



La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos ha encontrado que, exposiciones a residuos de GP en aguas de consumo humano por encima del límite máximo autorizado de 0.7 mg/L, pueden causar respiración acelerada y congestión pulmonar, daño renal y efectos reproductivos en seres humanos (Dinham, 1999). Walsh *et al.*, (2000) reportan que exposiciones a Roundup® afectan la expresión de una proteína reguladora del ciclo esteroideogénico (StAR) la cual media el paso inicial de la síntesis de hormonas esteroideas como los andrógenos. También hay evidencia que el herbicida reduce los niveles de ARNm y la actividad de la enzima aromatasas (Richard *et al.*, 2005). Estudios realizados en patos de la especie *Anas platyrhynchos* encontraron alteraciones morfofisiológicas representadas en daños en los testículos y la región epidídimal como también cambios en los niveles de testosterona y estradiol (Oliveira *et al.*, 2007).

1.3. Efecto del GP y del Roundup® sobre organismos y ecosistemas acuáticos

El GP se ha encontrado contaminando aguas superficiales (Richard *et al.*, 2005) y subterráneas (Dinham, 1999). Por ejemplo, contaminó por escorrentía dos estanques en granjas de Canadá, uno por un tratamiento agrícola y el otro por un derrame; contaminó aguas superficiales en Holanda; y siete pozos en Estados Unidos (uno en Texas y seis en Virginia). En el Reino Unido, la Welsh Water Company ha detectado niveles de GP en aguas desde 1993, por encima de los límites permisibles fijados por la Unión Europea (Dinham, 1999). Esta situación es más complicada si se tiene en cuenta que los organismos acuáticos son más susceptibles al herbicida que otras especies terrestres (Tsui y Chu, 2003).

Otro problema adicional ocasionado en los sistemas acuáticos, es que los surfactantes son fácilmente adsorbidos por los organismos filtradores (Penry, 1998) y otra parte son acumulados en el sedimento (McWilliams y Payne,

2001) prueba de ello fue el estudio realizado por Christy *et al.*, (1981; citado en Tsui y Chu, 2003) en *Ceriodaphnia dubia* hallando residualidad del surfactante debido a que esta especie filtraba *Selenastrum capricornutum* una alga común en su dieta, sin embargo, los investigadores no lograron establecer una correlación entre la cantidad de algas consumidas y la bioacumulación del surfactante Christy *et al.*, (1981; citado en Tsui y Chu, 2003). Por otro lado, en renacuajos de *Spea bombifrons* y *Spea bombifrons* con concentraciones bajas de Roundup® WeatherMAX de 2 y 2.8 mg/L de GP se producía la muerte del total de la población experimental evidenciando la susceptibilidad de especies de ranas en especial en sus primeras etapas de desarrollo (Dinehart *et al.*, 2010).



1.4. Efecto del GP y del Roundup® sobre peces.

Aunque los estudios del efecto del GP en peces son pocos, estos han venido en aumento en los últimos 10 años (Gluszczak *et al.*, 2007; Eslava *et al.*, 2007; Modesto y Martínez, 2010; Kreutz *et al.*, 2011; Shiogiri *et al.*, 2012). Se han realizado pruebas estableciendo la CL₅₀, con intoxicaciones agudas (Ramírez-Duarte, 2004; Eslava *et al.*, 2007) y actualmente se ha realizado más énfasis en los posibles efectos de concentraciones sub-letales en intoxicaciones crónicas (Gluszczak *et al.*, 2007; Kreutz *et al.*, 2011; Shiogiri *et al.*, 2012), pues se considera que serían más cercanas a la realidad en el caso que se presentara contaminación de los cuerpos de agua por escorrentía o por acción del viento de los cultivos asperjados.

Efectos sub-letales del GP ocurren a bajas concentraciones. En trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*, CL₅₀ 8.0 mg/L) y tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, CL₅₀ 16.8 juveniles y 36.8 adultos), concentraciones de cerca de la mitad o tercera parte de la CL₅₀ (respectivamente) causan nado errático y dificultad respiratoria (Cox, 2000; Jiraungkoorskul *et al.*, 2002; Ramírez *et al.*, 2003). Estos efectos pueden incrementar el riesgo de que el pez sea predado y a su

vez alterar los patrones de alimentación, migración, y reproducción (Morgan, *et al.*, 1991; citado en Eslava *et al.*, 2007).

Ensayos realizados por Jiraungkoorskul *et al.*, (2003) demuestran que la exposición a concentraciones sub-letales de 5 y 15 mg/L de Roundup® durante periodos prolongados causa una reducción en la tasa de crecimiento de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Nescovik *et al.*, (1996), reportan desarrollo de hiperplasia epitelial y edema subepitelial branquial en carpas expuestas a 5 mg/L de GP. Cambios similares, pero más pronunciados, seguidos de infiltración linfocitaria, hipertrofia leve de las células de cloro, separación y ruptura del epitelio respiratorio (Gómez *et al.*, 1998: citado en Eslava *et al.*, 2007) al igual que denudación y fusión de lámelas secundarias han sido reportados por otros autores (Jiraungkoorskul *et al.*, 2003).

En el hígado, se han descrito congestión sinusoidal leve y signos de fibrosis incipiente, a concentraciones de 10 mg/L (Nescovik *et al.*, 1996). Otros hallazgos consistentes en incremento en el tamaño de los hepatocitos con núcleos picnóticos y la presencia de vacuolas han sido reportados por Jiraungkoorskul *et al.*, (2003) en tilapias (*O. niloticus*) expuestas a concentraciones de 5 y 15 mg/L.

En un estudio ultraestructural del hígado de carpa (*Ciprinus carpio*), Szarek *et al.*, (2000) evaluaron Roundup® a concentraciones de 205 y 410 mg/L, las cuales son concentraciones 20 y 40 veces más bajas que las usadas generalmente en Polonia para el control de malezas. En estas concentraciones se producían lesiones agudas en hepatocitos, las cuales se describían como estructuras semejantes a mielina, tumefacción mitocondrial y desaparición de la membrana mitocondrial interna, lo cual generaba la muerte de los peces.

Estudios en juveniles del Silúrido *Rhamdia quelen* en concentraciones de 0.2 y 2 mg/L de Roundup® expuestos durante 96 horas evidenciaron varios efectos negativos como: incremento del glicógeno hepático, reducción del glicógeno muscular, disminución de glucosa en el hígado, incremento de los niveles de lactato en el hígado y en el músculo blanco, incremento en el nivel de proteínas del hígado y disminución en el musculo blanco, de igual manera se presentó aumento de los niveles de amonio en ambos órganos y una reducción de la actividad colinesterasa en el cerebro (Gluszczak *et al.*, 2007). En estudios posteriores en la misma especie (*R. quelen*) se evaluó el efecto de una concentración sub-letal de Roundup® del 10% de la CL_{50-96h} (0.73 mg/L) determinando su efecto en células sanguíneas y algunos parámetros inmunológicos. Como hallazgos importantes se puede mencionar: una significativa reducción en los eritrocitos, trombocitos, linfocitos y conteo total de leucocitos y un aumento significativo en células inmaduras circulantes. Así mismo, se presentó un reducción significativa en el índice fagocítico, en el suero de aglutinación bacterial, y en la actividad total de peroxidasa (Kreutz *et al.*, 2011).

Estudios de toxicidad aguda en Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) determinando el efecto del nuevo Roundup® Ready genera preocupantes resultados. La CL₅₀ fue establecida en tan solo 3.74±0.2 mg/L. El principal daño fue encontrado en el hígado, clasificado de moderado a severo, las principales alteraciones histopatológicas fueron descritas como: vacuolización citoplasmática, acumulación lipídica, alteraciones en las membranas de los hepatocitos y disminución en la concentración de glicógeno. Los daños observados en branquias fueron considerados leves caracterizándose por hiperplasia y alargamiento del sistema de células pilares y edemas (3.0 mg/L). En las concentraciones más altas (3.5 y 4.0 mg/L) se encontró hiperplasia e hipertrofia del epitelio lamelar (Shiogiri *et al.*, 2012).

Estos estudios demuestran que las concentraciones usadas comercialmente pueden causar alteraciones histopatológicas, metabólicas y enzimáticas en los peces, quizás estos efectos no causen la muerte inmediata pero si dejan susceptibles a los peces frente a alguna enfermedad o patógeno (Kreutz *et al.*, 2011).

1.5. Efectos del GP sobre el Sistema Nervioso de peces

Los efectos reportados del GP están especialmente enfocados en las colinesterasas las cuales son particularmente importantes ya que se sabe que estas enzimas juegan un papel vital en el desarrollo de sistema nervioso, participando en el control de la proliferación celular, la formación de neuritas y la apoptosis neuronal (Kaczmar, 2010).



Para el caso de la especie objeto de este estudio, Cachama blanca (*P. brachypomus*), Eslava *et al.*, (2007) realizó el primer reporte de daños del Roundup® y surfactantes en encéfalo, observando lesiones que indicaban procesos degenerativos y muerte neuronal. Ellos consideran que el Roundup® y el surfactante Cosmoflux® 411F pueden estar accediendo al sistema nervioso central a través de dos vías. La primera a través del epitelio olfatorio y de allí hasta el área del bulbo olfatorio, y/o a través de la barrera hematoencefálica en donde el surfactante por su carácter anfifílico podría incorporarse dentro de membranas biológicas facilitando la penetración del GP y auto habilitar el paso del surfactante hacia el sistema nervioso central (Stock y Holloway, 1993: citado en Eslava *et al.*, 2007).

1.6. Ganglios de la raíz dorsal (GRDs) y sus neuronas sensoriales.

Así mismo, es de gran importancia determinar el efecto del Roundup Activo® en el sistema nervioso periférico (SNP) especialmente en los ganglios de la raíz

dorsal (GRDs) y sus neuronas sensoriales. Los GRDs, también llamados ganglios espinales o sensitivos, son protuberancias ubicadas en la raíz dorsal de la médula espinal y están formados por células neuronales y no neuronales localizándose en los agujeros intervertebrales. Las neuronas que los forman son exclusivamente sensitivas, de tipo bipolar o pseudomonopolar (Martínez *et al.*, 2000).

Los GRDs contienen cuerpos celulares de aferentes primarios del sistema somatosensorial, estas neuronas son funcionalmente heterogéneas en la señalización de estímulos de diversas modalidades sensoriales, que pueden ir desde el tacto, la temperatura, el dolor, hasta la propiocepción (Namaka *et al.*, 2001). La principal función de las neuronas del GRD es convertir los estímulos sensoriales ya sean cutáneos, musculares o viscerales en señales nerviosas y transmitir las hasta el sistema nervioso central, en donde son integradas y se efectúa una respuesta voluntaria o involuntaria (Martínez *et al.*, 2000).

Histológicamente, las poblaciones celulares más comunes en el GRD son las neuronas, los fibroblastos, las células satélite o células de soporte y las células de Schwann (Jaramillo *et al.*, 2009). La población neuronal de los GRDs es heterogénea en muchos aspectos, lo que permite clasificarlas en poblaciones y eventualmente en subpoblaciones de acuerdo a su morfología, bioquímica y fisiología, lo que hace que cada subpoblación se comporte de manera diferente frente a estímulos externos e internos (Jaramillo *et al.*, 2009).

1.7. Clasificación morfológica de las neuronas sensoriales de los GRDs.

Al tratarse de un estudio histopatológico se hizo énfasis en la clasificación morfológica pues es de gran relevancia en la interpretación de los resultados obtenidos. La primera clasificación neuronal fue realizada en ratas y se basó en el tamaño de los somas al ser vistos en el microscopio de luz, dividiéndolas en

dos categorías principales las neuronas; neuronas tipo A (grandes y claras) y tipo B (pequeñas y oscuras) (Martínez *et al.*, 2000).

Unos años más tarde, utilizando microscopia de contraste de fases y electrónica, se confirmaron estos hallazgos y se pudo hablar de subpoblaciones, basadas solamente en la apariencia de la sustancia de Nissl (cúmulos de retículo endoplasmático rugoso). Así, se demostró que las neuronas tipo A presentaban cúmulos de esta sustancia en la periferia del pericarión, separados por hilos angostos de neuroplasma, mientras que en las tipo B se encontraba relativamente compacta y libre de separaciones citoplasmáticas (Martínez *et al.*, 2000).



El diámetro neuronal es otro criterio utilizado para clasificar las neuronas de los GRDs. Basados en este criterio se encuentran tres tipos neuronales A, B y C que corresponden por tamaño a las neuronas grandes, intermedias y pequeñas, los cuales varían según la especie, la edad y las condiciones (*in vivo* e *in vitro*) y son clasificados por cada autor dependiendo de los tamaños encontrados en cada estudio. Sin embargo, todos coinciden en afirmar que la población más abundante en los GRDs corresponde a las de neuronas de diámetro pequeño e intermedio (tipo B y C), debido, a que durante el desarrollo los precursores de las neuronas grandes (tipo A) detienen su división mucho antes que los de neuronas pequeñas (Kitao *et al.*, 2002).

El calibre de las aferencias sensoriales y la velocidad de conducción del impulso nervioso dependen del tamaño neuronal. Las neuronas más grandes en los GRDs (tipo A) tienen fibras mielínicas y las más pequeñas tienen fibras amielínicas (tipo B y C), esto a su vez se relaciona con la velocidad de conducción la cual es mayor en fibras mielínicas que en las amielínicas (Lawson y Waddell, 1991; Lawson, 1992). Adicionalmente las neuronas tipo A

poseen aferencias principalmente a blancos musculares, mientras que los blancos de las neuronas tipo B, son generalmente cutáneos y viscerales (Jaramillo *et al.*, 2009).

1.8. Hallazgos en el estudio de los GRDs en Cachama blanca (*P. brachypomus*).

Jaramillo *et al.*, (2009), adelantaron una investigación en el estudio de los GRDs y sus neuronas en alevinos de *P. brachypomus* de diferentes edades (20 y 30 días después de la eclosión) convirtiéndose en el cuarto trabajo en peces y el primero en un pez de crecimiento indeterminado que se estudia esta parte del SNP. Entre los hallazgos más importantes se destacan:

-Histológicamente, las poblaciones celulares presentes en los GRDs son similares a las encontradas en otros vertebrados (anfibios, reptiles, aves, mamíferos y otras especies de peces).

-Se presentan dos subpoblaciones neuronales: neuronas tipo A y neuronas tipo B siendo más abundantes estas últimas (Tipo B 70% y Tipo A 30%).

-El volumen de los GRDs y el número de neuronas especialmente tipo B se incrementa significativamente con el crecimiento de los alevinos.

-Se presenta un aumento en el diámetro y área de los dos tipos neuronales al aumentar de tamaño los alevinos.

Los hallazgos en este estudio permiten proponer a los alevinos de *P. brachypomus* como un buen modelo de estudio de neuronas sensoriales ya que se conoce su morfología, diámetro, área y número neuronal en organismos sanos. Por ello, al plantearse estudios en los cuales estos organismos son expuestos a un xenobiótico se podría obtener información no solo cualitativa del daño histopatológico sino que además permitiría determinar cuantitativamente un daño en las neuronas (área, diámetro y número) de los GRDs. Las neuronas sensoriales de los GRDs han demostrado ser un

excelente modelo en estudios del dolor (Kuniyoshi *et al.*, 2007), virus como la rabia (Pérez, 1999; Martínez *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000), en organismos con hiperglicemia crónica (Kishi *et al.*, 2002), y en estudios de axotomía y regeneración neuronal (Lekan *et al.*, 1997).

CAPÍTULO II

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general:

Determinar el efecto de exposición crónica a concentraciones subletales del Roundup® Activo en órganos de importancia toxicológica de alevinos Cachama blanca (*P. brachypomus*).

II.2. Objetivos específicos:

1- Establecer los cambios histopatológicos de las células de hígado, riñón, branquias y cerebro en alevinos Cachama blanca (*P. brachypomus*) expuestos a concentraciones subletales de Roundup® Activo.

2- Evaluar el crecimiento y los parámetros productivos en alevinos Cachama blanca (*P. brachypomus*) expuestos a concentraciones subletales de Roundup® Activo.

3- Determinar variaciones morfológicas en las subpoblaciones de neuronas sensoriales diferenciadas y sus núcleos de los ganglios de la raíz dorsal en alevinos Cachama blanca (*P. brachypomus*) expuestos a concentraciones subletales de Roundup® Activo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de patología de la Universidad de los Llanos y Embriología de la Universidad Militar Nueva Granada.

III.1. Comité de ética

En este proyecto se siguieron los lineamientos para el manejo ético de peces en investigación (American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH), American Fisheries Society (AFS), American Institute of Fisheries Research Biologists (AIFRB), 1988; Report of the AVMA Panel on Eutanasia, 2000; CCAC guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing, 2003).

III.2. Material biológico.

En esta investigación se trabajó con alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) de 30 días después de la eclosión (dde) de un mismo desove. Los peces fueron adquiridos en la estación piscícola del Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL), teniendo en cuenta que los peces no presentarán aletas en mal estado, nado errático, manchas algodonosas, tendencia a frotarse con piedras u otros objetos, ojos opacos y lesiones externas (Ostrow, 1995). Así mismo, se realizó un estudio histopatológico preliminar a la llegada de los peces como a los ocho días de cuarentena, esto con el fin de asegurarnos de trabajar con peces clínicamente sanos y que las alteraciones observadas sean efecto de los tratamientos.

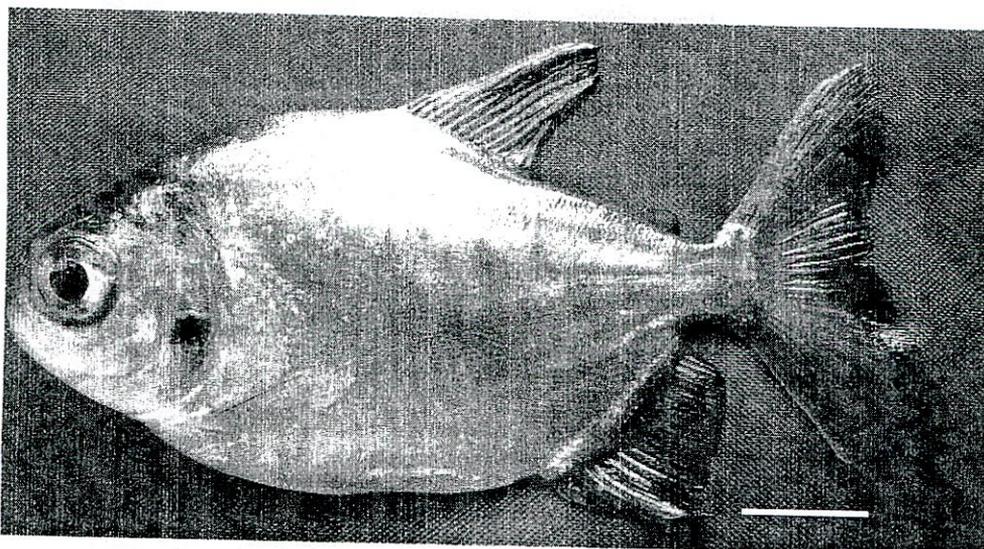


Figura 1. Alevino de Cachama blanca (*P. brachypomus*). Barra= 1 cm.

Los peces fueron mantenidos en acuarios de vidrio de 40 L de agua, acondicionados con aireación constante, sin filtro. Los alevinos se alimentaron tres veces al día (9:00, 12:00 y 16:00 horas) con alimento comercial "Mojarra®" con 35% de proteína bruta ajustada al 5% de la biomasa total. Fotoperiodo de 12:12 h (luz/oscuridad). Diariamente se midieron parámetros de calidad de agua como: oxígeno disuelto (OD), pH, temperatura (Sonda Extech® DO 700) y nitrógeno amoniacal total (NAT) (Espectrofotómetro de alta sensibilidad Multy Espectroquant Merck®). Semanalmente se registraron las dos durezas: general (GH) y de carbonatos (KH) con kits Tetra® test. Los peces fueron mantenidos durante 15 días previos al experimento con el fin de acondicionarlos a las unidades experimentales.

El experimento de toxicidad subletal fue un diseño de sistema semiestático con recambio diario del 50% del volumen de agua con mantenimiento de la concentración mediante la adición de la mitad de la concentración de Roundup® Activo (Rondón-Barragán *et al.*, 2007).

III.3. Sustancia experimental

El experimento se realizó con el herbicida GP bajo la marca comercial Roundup® Activo el cual está constituido por 363 g/L de ácido GP de formulación, equivalente a 446 g/L de sal potásica de N-(fosfometil)-glicina, la casa comercial Monsanto no reporta que tipo de surfactante usa ni la concentración del mismo. Para evitar efectos deletéreos del GP en el ambiente por contaminación de los cuerpos de agua, el agua usada en el experimento fue mantenida en tanques plásticos por un periodo de 30 días para permitir la transformación del herbicida; después de este tiempo el agua fue percolada en el suelo (Soso *et al.*, 2007).

III.4. Diseño experimental

Se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA) efecto fijo balanceado con tres replicas por tratamiento. Se evaluaron los siguientes tratamientos: tratamiento 1 (0 mg/L de GP), tratamiento 2 (0.1 mg/L de GP) y el tratamiento 3 (1 mg/L de GP) diluido a partir de la concentración inicial de GP presente en el producto Roundup® Activo. En cada unidad experimental (acuario 40 L) se manejó una densidad de 20 peces/acuario alrededor de 2.5 g/L. Las concentraciones sub-letales para los tratamientos se tomaron a partir de pruebas piloto realizadas en el Laboratorio de Bioensayos del IALL donde ya se habían observado daños celulares a dichas concentraciones en alevinos de Cachama blanca (Ramírez y Eslava, 2009).

Los peces fueron expuestos al Roundup® Activo durante 30 días. Este periodo se estableció a partir de los reportes de Giesy *et al.*, (2000) los cuales hallaron una vida media para el GP en el agua de 1-2 semanas, y de 3-4 semanas para el surfactante.

A los peces se les registró algunas variables de crecimiento (peso, longitud total y estándar) al inicio y al final del experimento (30 días). Transcurrido este tiempo los peces fueron anestesiados y sacrificados conforme a los criterios éticos para el sacrificio de animales propuesto por Beaver *et al.*, (2001), para lo

cual se usó una sobredosis de benzocaína (0.1g/L) (Gómez *et al.*, 2010).

III.5. Procesamiento de los tejidos para microscopia óptica de alta resolución (MOAR).

Se tomaron aleatoriamente 22 peces por tratamiento para los cortes y su posterior descripción histopatológica. Cuatro para hígado, riñón, branquias y hemisferios telencefálicos (16 peces) y seis para estudiar las neuronas sensoriales de los GRDs. Esto se realizó con el fin de disminuir el tiempo entre la muerte y la fijación y así lograr una mejor conservación de las estructuras estudiadas. Las muestras, de tamaño no mayor a 3 mm, fueron fijadas durante dos horas, en una solución de Karnovsky, preparada con formaldehído al 2% y glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato, con pH ajustado entre 7.2 y 7.4. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos con buffer fosfato. Para la postfijación se utilizó tetraóxido de osmio al 2% con buffer fosfato durante dos horas y se realizaron nuevamente tres lavados de 10 minutos con buffer fosfato. Los tejidos se deshidrataron en concentraciones ascendentes de alcohol preparado a partir de etanol absoluto y diluido en agua destilada. Alcohol al 70% tres lavados de 5 minutos, alcohol al 90% un lavado de 5 minutos, alcohol al 95% dos lavados de 10 minutos y finalmente dos lavados de 10 minutos en alcohol al 100% (Caldas *et al.*, 1993).

Luego del proceso de deshidratación, las muestras fueron impregnadas en resina Poli/Bed®812 con óxido de propileno en diferentes proporciones (Tabla 1).

Tabla 1. Proporciones de resina Poli/Bed®812 – óxido de propileno.

Proporción	Tiempo
Poli/Bed®812 1:2 óxido de propileno	30 minutos
Poli/Bed®812 1:1 óxido de propileno	30 minutos
Poli/Bed®812 2:1 óxido de propileno	30 minutos
Resina Poli/Bed®812	1 hora

Para el proceso de polimerización se utilizó resina Poli/Bed®812 pura en una incubadora Fisher-Scientific a 60°C durante 16 horas. Se ubicaron las muestras para obtener cortes en diferentes orientaciones (transversal y longitudinal). Se realizaron cortes semiseriados de 1µm de espesor en un micrótopo rotatorio CUT SLEE 4060 y se tiñeron con azul de toluidina (Caldas *et al.*, 1993).



III.6. Estudio histopatológico.

Las eventuales alteraciones del hígado, riñón, branquias, hemisferios telencefálicos y GRDs se describieron a partir de los siguientes parámetros:

Hígado: aumento en el número y tamaño de las gotas lipídicas, contenido de vacuolas con material granular, proliferación de lisosomas y formación de cuerpos de "mielina", hipertrofia de células sinusoidales y de células epiteliales de los ductos hepáticos, formación de centros melanomacrófagos (Li *et al.*, 2004; Eslava *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Rondón-Barragán *et al.*, 2007).

Riñón: aparición de células epiteliales con procesos digitiformes en el glomérulo, células con núcleos elípticos y ricos en mitocondrias en las células tubulares proximales, aparición de células tubulares necróticas con núcleos picnóticos, proliferación de lisosomas, dilatación de la capsula de Bowman, aparición de células epiteliales con procesos digitiformes, formación de centros melanomacrófagos y degeneración de epitelio tubular (Eslava *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Rondón-Barragán *et al.*, 2007).

Branquias: células apoptóticas, acentuada separación de la superficie epitelial, secreción abundante de mucus, irregular forma de las lamelas, hipertrofia en la superficie del epitelio tanto en los filamentos como en las lamelas, hiperplasia de las lamelas secundarias y primarias, fusión de las lamelas secundarias adyacentes, hiperplasia de las células de cloro, metaplasia de las células caliciformes y telangiectasia; degeneración de las células pavimentosas, necrosis del tejido hematopoyético e infiltración lamelas por células mononucleares (Randi *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2004; Rondón-Barragán *et al.*, 2007; Brunelli *et al.*, 2011).

Hemisferios telencefálicos y neuronas sensoriales de los GRDs: deformación de núcleo y nucléolo, presencia y morfología de vesículas, infiltraciones eosinofílicas, formación de centros melanomacrófagos, lesiones difusas, eventos de cromatolisis de somas neuronales, apoptosis neuronal, células granulares eosinofílicas/ células similares a mastocitos en peces (CSMP), núcleos migrados, varios nucléolos y vesículas citoplasmáticas (Eslava *et al.*, 2007; Ramírez-Duarte y Eslava, 2009; Jaramillo *et al.*, 2009).

En los hemisferios telencefálicos se identificaron los principales núcleos cerebrales a partir de atlas de otros teleósteos; Neón cardenal, *Paracheirodon axelrodi* (Obando, 2006), pez cebra, *Danio rerio* (Wullimann *et al.*, 1996) y medaka *Oryzias Latipes* (Anken y Bourrat, 1998). Identificados los núcleos se procedió a ubicar neuroanatómicamente las CSMP.

III.7. Estudio morfométrico de las neuronas sensoriales de los GRDs

Para este análisis se trabajó con los seis especímenes de cada tratamiento tomando un par de GRDs de la región anterior de los alevinos de Cachama blanca (Jaramillo *et al.*, 2009). A cada uno de los cortes se les realizó captura y digitalización de imágenes. Luego estas imágenes se procesaron para mejorar el contraste, eliminar el ruido de fondo y así crear los montajes. Este procedimiento se llevó a cabo con el Software Image J (2011) de libre distribución en internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

III.8. Área, diámetro y perímetro de las neuronas tipo A y B de los GRDs

A partir de las imágenes procesadas de las neuronas de los GRDs con el Software Image J (2011), se procedió a calibrar el software y se midió el área, diámetro y perímetro de las neuronas diferenciadas de cada tipo (A y B) como de sus núcleos. Es importante aclarar que únicamente se contaron y midieron neuronas diferenciadas, es decir las que presentaban el núcleo bien definido, el cual se debe observar más claro que el citoplasma circundante, en las

neuronas sensoriales el núcleo tiende a ubicarse centralmente (Jaramillo *et al.*, 2009). Las medidas fueron tomadas en un corte seccional en donde el núcleo presentaba su máxima extensión y/o el nucléolo.

Adicionalmente se estimó el área ocupada por vesículas citoplasmáticas expresada en porcentaje del total del área neuronal. Cada medida tenía registro del número correspondiente a la neurona y su núcleo (enumerada en cada imagen). Lo anterior se realizó con el fin de evitar medir más de una vez la misma neurona.

A partir de las principales alteraciones neuronales reportadas por (Eslava *et al.*, 2007; Ramírez-Duarte y Eslava, 2009) se estimó el porcentaje de neuronas por tipo (A y B) que presentaban alguna de las siguientes características: vesículas citoplasmáticas (V), núcleo migrado (NM), dos nucléolos (DN), vesículas y núcleo migrado (V-NM), neuronas presentaban otra característica (OC).

III.9. Parámetros productivos

Los parámetros productivos se calcularon a partir de las formulas propuestas por; Pineda (1999), Salazar y Ocampo (2002) y Mercado *et al.*, (2006) (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros productivos.

Parámetro	Formula
<i>Ganancia de peso</i>	$GP = \text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}$
<i>Factor de conversión alimenticia</i>	$FCA = \text{alimento consumido (g)} / (\text{peso inicial} - \text{peso final (g)})$
<i>Tasa de crecimiento absoluto</i>	$TCA = [(\text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)}) / (\text{tiempo final} - \text{tiempo inicial})]$
<i>Tasa de crecimiento específico</i>	$TCE = 100 * [(\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial}) / \text{tiempo}]$
<i>Supervivencia</i>	$S = 100 * (\text{número de peces inicial} / \text{número de peces final})$

III.10. Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar efecto fijo balanceado, donde se implementó la técnica MANOVA para evaluar en forma conjunta las variables respuesta: peso, longitud total, estándar, diámetro, perímetro y área de las neuronas sensoriales y sus núcleos. De igual manera, se evaluaron los parámetros productivos y algunos fisicoquímicos (NAT, temperatura y pH). Es importante señalar que la técnica MANOVA genera ANOVAS y pruebas de Tukey individuales para cada variable al nivel de significancia del 5% ($P < 0.05$ error tipo I) (Zar, 2006).

Para el análisis del porcentaje ocupado por vesículas citoplasmáticas del total del área neuronal, como para los porcentajes de las variables de las alteraciones histopatológicas (V, NM, DN, V-NM, OC), se realizó por medio de una prueba de Kruskal-Wallis (Zar, 2006). Se empleó el paquete estadístico R versión 2.15.1 (<http://www.r-project.org/>)

CAPÍTULO IV

IV. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y CALIDAD DE AGUA

IV.1. RESULTADOS.

IV.1.1. Variables de crecimiento.

Los resultados de las variables de crecimiento de los alevinos de *P. brachypomus* son presentados en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3. Variables de crecimiento de alevinos de *P. brachypomus* expuestos a diferentes concentraciones de Roundup Activo®. T1: 0 mg/L, T2: 0,1 mg/L y T3: 1 mg/L. Peso, longitud total (LT) y longitud estándar (LE). Cada valor representa el promedio +/- la desviación estándar, letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

		PESO	LT	LE
Inicio	T1	2,30±0,51 ^a	5,12±0,40 ^a	3,98±0,31 ^a
	T2	2,28±0,57 ^a	5,06±0,42 ^a	3,95±0,32 ^a
	T3	2,28±0,56 ^a	5,06±0,40 ^a	3,92±0,31 ^a
15 días	T1	4,03±1,06 ^b	-	-
	T2	4,23±1,04 ^b	-	-
	T3	4,72±1,11 ^b	-	-
30 días	T1	6,30±1,80 ^c	7,13±0,72 ^b	5,64±0,72 ^b
	T2	6,20±1,64 ^c	7,07±0,62 ^b	5,51±0,50 ^b
	T3	6,48±1,72 ^c	7,11±0,63 ^b	5,56±0,48 ^b



IV.1.2. Parámetros productivos.

A partir de los datos de crecimiento se calcularon algunos parámetros productivos los cuales son presentados en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros productivos de los alevinos de *P. brachypomus* expuestos a diferentes concentraciones de Roundup Activo®. T1: 0 mg/l, T2: 0,1 mg/l y T3: 1 mg/l. Ganancia en peso (GP), factor de conversión alimenticia (FCA), tasa de crecimiento absoluto (TCA), tasa de crecimiento específico (TCE) y sobrevivencia. Cada valor representa el promedio +/- la desviación estándar, letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

	T1	T2	T3
GP (g)	4,01±0,45 ^a	3,94±0,41 ^a	4,19±0,36 ^a
FCA	1,01±0,13 ^{ab}	0,98±0,09 ^a	1,24±0,13 ^b
TCA (g/día)	1,13±0,01 ^a	1,13±0,01 ^a	1,14±0,01 ^a
TCE (%/día)	4,61±0,36 ^a	4,56±0,35 ^a	4,76±0,28 ^a
Supervivencia	93,33±5,77 ^a	90,00±5,00 ^a	96,67±2,89 ^a

IV.1.3. Parámetros de calidad de agua.

En la tabla 5 se muestra el comportamiento de los parámetros fisicoquímicos durante el periodo de experimentación.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos en las unidades experimentales. Temperatura en grados Celsius (T °C), Nitrógeno amoniacal total en mg/L (NAT), Oxígeno disuelto en mg/L (OD), Dureza de carbonatos en unidades Alemanas (KH), Dureza de general en unidades Alemanas (GH). Cada valor representa el promedio +/- la desviación estándar, letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$). Aunque el las durezas se expresan valores absolutos en unidades Alemanas.

		SEMANAS			
		1	2	3	4
pH	T1	7,4±0,1 ^a	6,9±0,2 ^a	7,3±0,1 ^a	7,1±0,2 ^a
	T2	7,4±0,1 ^a	7,1±0,1 ^a	7,2±0,2 ^a	7,1±0,2 ^a
	T3	7,4±0,1 ^a	7,2±0,1 ^a	7,1±0,2 ^a	7,1±0,2 ^a
T°C	T1	26,6±0,8 ^a	27,4±0,7 ^a	27,3±1,1 ^a	28,8±1,2 ^a
	T2	26,6±0,6 ^a	29,4±0,7 ^a	27,4±0,9 ^a	26,6±0,8 ^a
	T3	26,2±0,3 ^a	27,6±1,1 ^a	28,3±0,5 ^a	26,9±0,8 ^a
NAT	T1	0	0,19±0,07 ^a	0,12±0,04 ^a	0,15±0,11 ^a
	T2	0	0,38±0,21 ^b	0,36±0,22 ^b	0,34±0,10 ^b
	T3	0	0,38±0,10 ^b	0,31±0,21 ^b	0,37±0,02 ^b
OD	T1	7	7	7	7
	T2	7	8	7	7
	T3	7	8	7	7
KH	T1	1	2	2	2
	T2	1	2	2	2
	T3	1	2	2	2
GH	T1	3	4	4	4
	T2	3	4	4	4
	T3	3	4	4	4

IV.2. DISCUSIÓN.

IV.2.1. Parámetros de crecimiento.

Los alevinos de *P. brachypomus* del control (T1) como los expuestos a las concentraciones subletales de Roundup® Activo (T2 y T3) presentaron un

crecimiento similar (peso, longitud total y estándar) durante todo el periodo de experimentación. Se puede decir que los alevinos ganaron un poco más del doble de su peso inicial, sin embargo comparar su desempeño productivo es complicado pues los productores empiezan con tamaños mayores, al inicio de sus ciclos productivos. No obstante, al comparar con las tablas de crecimiento reportadas por González (2001) en un tiempo similar los alevinos de *P. brachypomus* alcanzan alrededor de 28 g. La explicación a este hecho es que en producciones comerciales en estanque los peces son alimentados a un mayor nivel de proteína (45-38%) ajustada al 10% de su peso promedio, mientras que en este trabajo al tratarse de una investigación toxicológica se usaron dietas de mantenimiento (35% proteína ajustada al 5% del peso) con el fin de no alterar considerablemente los parámetros fisicoquímicos del agua. Además es una práctica común el abonamiento de los estanques en tierra y como *P. brachypomus* en sus primeros meses de desarrollo posee un número notable de branquiespinas le permite filtrar y alimentarse de los organismos plantónicos del estanque (Vásquez, 2004).

Los parámetros productivos de la especie en general fueron buenos, siendo similares a los presentados en sistemas de recirculación (Casas, 2008; Poleo *et al.*, 2011; Mondragón, 2012) y en estanques en tierra (Rebaza *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2009). Es importante aclarar que la mortalidad presentada no se debe atribuir al hecho del herbicida pues los peces que murieron se debieron a fugas, al saltar de las unidades experimentales, aun así, la mortalidad fue menor al 10% como ocurre en producciones comerciales (González, 2001).

Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron dentro de los rangos adecuados para la especie (González, 2001). Aunque, se presentaron diferencias significativas en el nitrógeno amoniacal total (NAT), siendo mayor en el T2 y T3, aunque estas concentraciones fueron bajas y se considera que no afectan el crecimiento normal de la especie (González, 2001; Poleo *et al.*, 2011).

V. BRANQUIAS

V.1. RESULTADOS.

V.1.1. Branquias.

En todos los tratamientos las lamelas branquiales se alineaban perpendiculares a los filamentos cubriéndolos en ambos costados. Estas estructuras estaban cubiertas por un epitelio plano simple o escamoso. En la región basal de los espacios interlamelares se encontraban varios tipos celulares: células de moco las cuales se tiñen más intensamente, células de cloro las cuales son más pálidas y un grupo de células indiferenciadas. Los filamentos estaban soportados por un cartílago hialino.

En el tratamiento control (T1) se observó un arreglo normal de células pilares las cuales estaban espaciadas por eritrocitos, la región basal interlamelar era delgada con pocas células de cloro y moco (Figura 2 y 3).

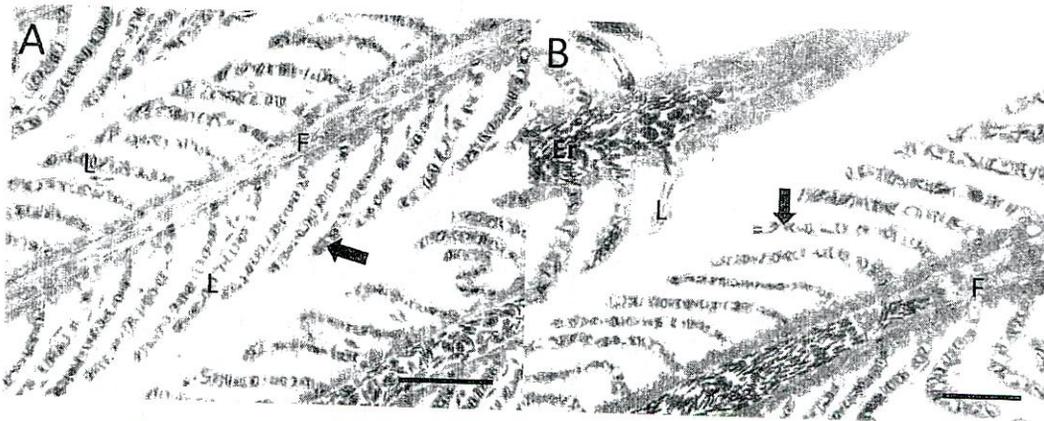


Figura 2. A y B. Panorámica de branquia de alevinos de cachama blanca (*P. brachypomus*) del T1. Filamento (F), lamela (L), eritrocitos (Er) y células pilares (➡ flecha negra). Barra=50 μ m.



Figura 3. A. Detalle de branquia de alevinos de cachama blanca (*P. brachypomus*) del T2. Célula epitelial (▲ cabeza de flecha negra), cartilago (CA). B, C y D. Detalle de branquia T2. Eritrocito (Er), célula pilar (→ flecha negra) y desorganización lamelar (★ estrella negra). Barra=20 μm.

En el tratamiento 2 (T2) se observaron lesiones leves como: daño lamelar por hiperplasia de las células interlamelares, desprendimiento de células epiteliales, cambios vasculares (aneurismas) con rompimiento y congestión de células pilares (Figuras 4-6).

En el tratamiento 3 (T3) se observaron cambios degenerativos y proliferativos de las células apicales, desarreglos de las células pilares, hiperplasia interlamelar, edema y festoneado del epitelio lámelar, además una leve hipertrofia e hiperplasia de las células de moco y cloro en el espacio interlamelar (Figuras 7-9).



Figura 4. A y B. Panorámica de branquia de alevinos de cachama blanca (*P. brachypomus*) del T2. Filamento (F), lamela (L) e hiperplasia e hipertrofia de células interlamelares (→ flecha negra). Barra= 50 μ m.

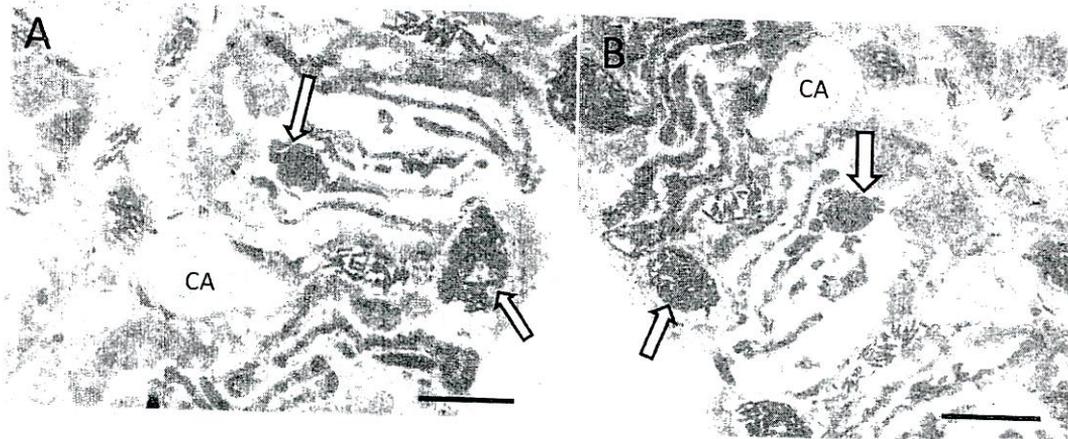


Figura 5. A y B. Detalle de branquia de alevinos de cachama blanca (*P. brachypomus*) del T2. Cartílago (CA), telangiectasia (⇒ flecha blanca). Barra= 50 μ m.

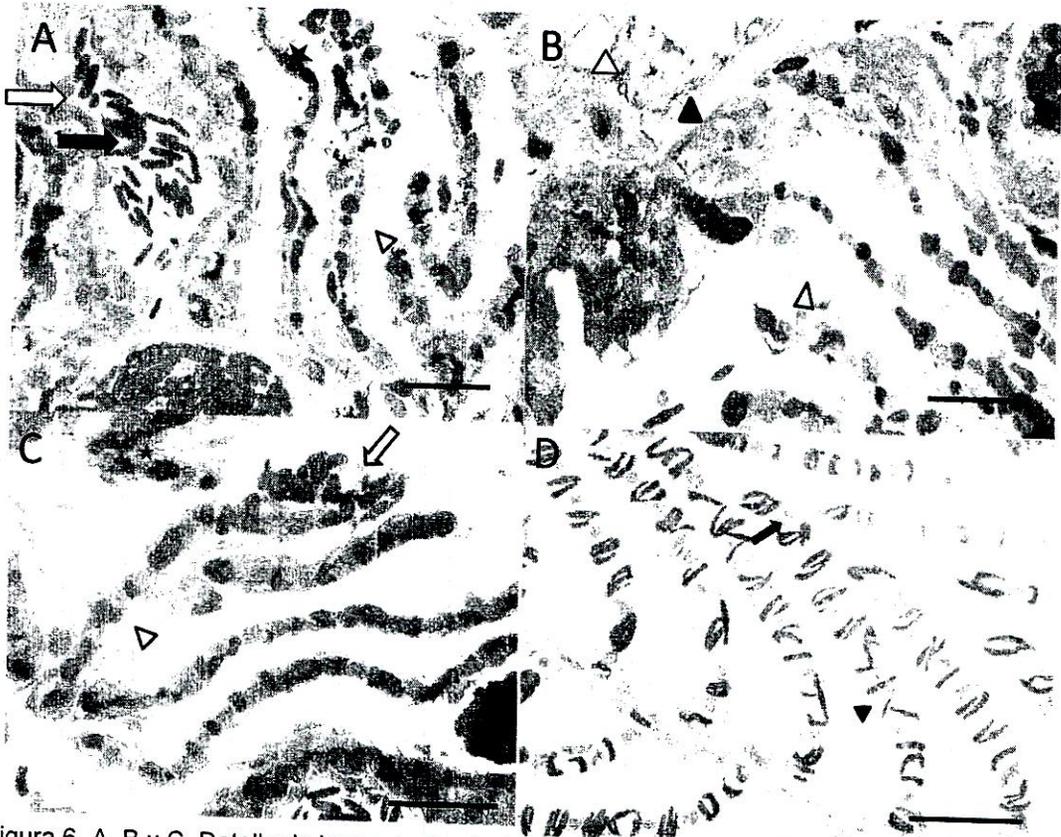


Figura 6. A, B y C. Detalle de branquia de alevino de cachama blanca (*P. brachypomus*) del T2. Desorganización lamelar (★ estrella negra), edema (△ cabeza de flecha blanca), telangiectasia (⇔ flecha blanca). D. Detalle de branquia, célula epitelial (▲ cabeza de flecha negra), célula pilar (➡ flecha negra). Barra = 20 μ m.

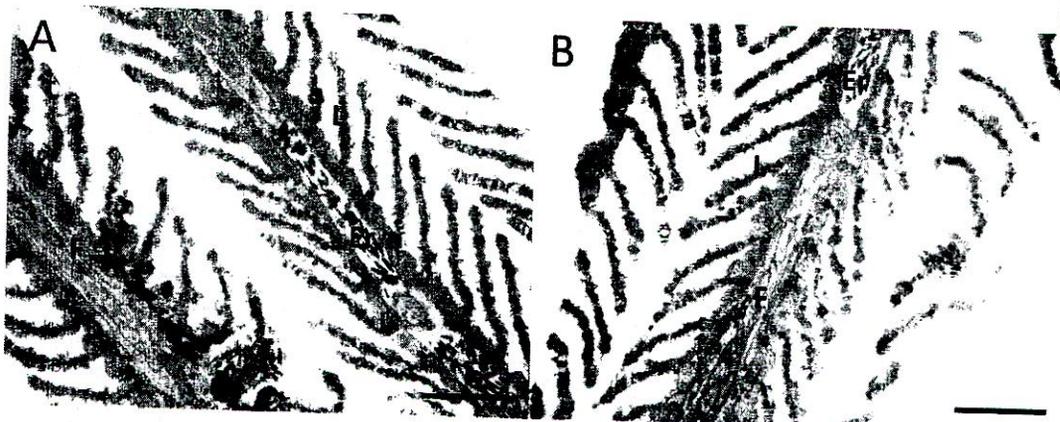


Figura 7. A y B. Panorámica de branquias de alevinos de cachama blanca (*P. brachypomus*) del T3. Lamela (L), filamento (F) y eritrocitos (Er). Barra = 50 μ m.



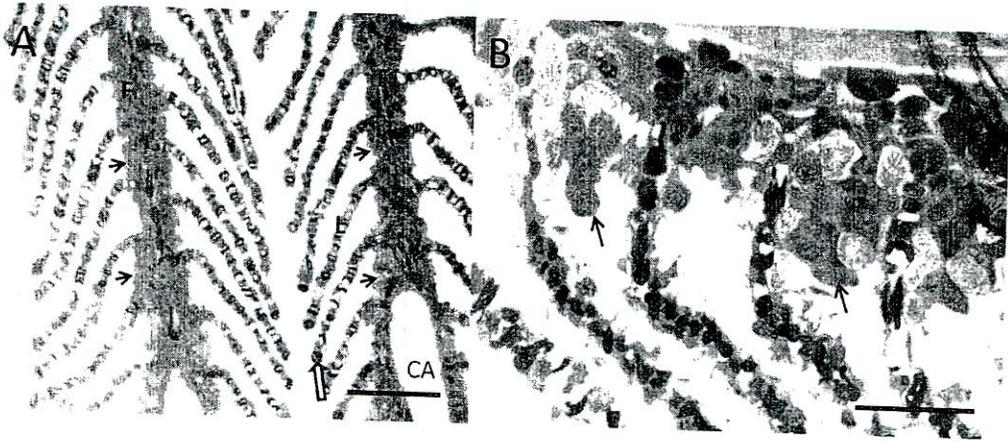


Figura 8. A. Panorámica de branquia de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T3. Lamela (L), filamento (F), cartílago (CA), hiperplasia e hipertrofia (→ flecha negra), telangiectasia (⇨ flecha blanca) B. Detalle de branquia T3. Hiperplasia e hipertrofia (→ flecha negra). Barra = 50μm y barra 20 μm.

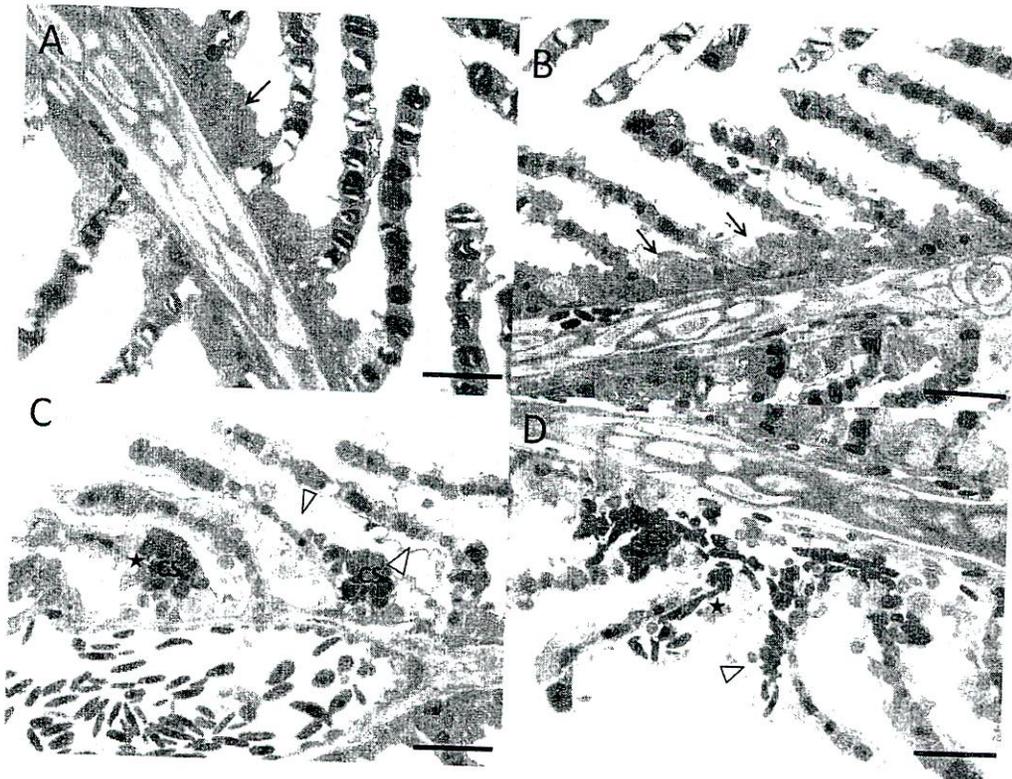


Figura 9. A y B. Panorámica y detalle de branquia de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T3. Hiperplasia e hipertrofia del epitelio lamelar (→ flecha negra), hipertrofia de células epiteliales (☆ estrella blanca). C y D. Detalle de branquia. Edema (△ cabeza de flecha blanca), desorganización lamelar (★ estrella negra) y congestión sanguínea (CS). Barra= 20 μm.

V.2. DISCUSIÓN

En esta investigación se encontró que la severidad de los daños histopatológicos dependía especialmente de la concentración de la sustancia tóxica, en este caso el herbicida Roundup® Activo (Eslava *et al.*, 2007). Puesto que una de las principales rutas de entrada del herbicida son las branquias se tratarán éstas en primera instancia y después se explicara el efecto en los hemisferios telencefálicos y los GRDs. Finalmente se discutirá hígado y riñón los cuales fueron los órganos que presentaron las más leves alteraciones histopatológicas.

V.2.1. Branquias

La morfología branquial ha sido comúnmente usada como biomarcador de la toxicidad acuática debido a que es el primer órgano que responde a condiciones ambientales adversas (Bernet *et al.*, 1999) y son la principal ruta de entrada de los pesticidas (Velmurugan *et al.*, 2009, Salazar-Lugo *et al.*, 2011). Además por la naturaleza anfíllica del GP permite que en minutos sea absorbida una concentración considerable del herbicida (Eslava *et al.*, 2007).

Los edemas, desprendimiento epitelial, festoneado, hiperplasia e hipertrofia de las células de cloro y mucus en branquias de peces han sido reportados en otros daños por xenobioticos como: mercurio en *Saccobranchus fossilis* (Khangarot, 2003), deltametrina en *Cyprinus carpio* (Cengiz, 2006) y el pez *Aphanius dispar* (Al-Ghanbousi y Ba-Omar, 2011), Roundup® Ready en *Piaractus mesopotamicus* (Shiogiri *et al.*, 2012).

La separación y festoneado del epitelio lamelar hacia la región apical pueden ser atribuidas como una reacción de defensa del sistema circulatorio a los contaminantes (Koca *et al.*, 2008). Esto había sido descrito en juveniles de Cachama blanca (*P. brachypomus*) expuestos a concentraciones más altas de Roundup® Ultra (Eslava *et al.*, 2007), el surfactante Cosmoflux 411(Rondón-

Barragán *et al.*, 2007) y a la mezcla de los mismos (Eslava *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2009). Los cambios degenerativos son atribuidos a los componentes del Roundup® Activo (GP y surfactante), debido a que se crea una resistencia relativa de las células epidermales al efecto citotóxico del herbicida (Eslava *et al.*, 2007).

Varios autores coinciden en afirmar que el surfactante es más tóxico que el mismo GP (Giesy *et al.*, 2000; Eslava *et al.*, 2007; Contardo-Jara *et al.*, 2009). Shiogiri *et al.*, (2012) encontraron daños moderados en branquias en concentraciones bajas del herbicida Roundup® Ready (3.0-4.5 mg/L) inclusive la concentración letal 50 fue de 3.75 mg/L demostrando que esta formulación es más tóxica que otras presentaciones de Roundup®.

Aunque la intención del organismo es protegerse, cualquier incremento en el espesor de la superficie respiratoria ya sea por hiperplasia del epitelio lamelar, edema o hiperplasia e hipertrofia de las células de moco y cloro, resulta en un incremento de la superficie epitelial que dificulta el adecuado intercambio de gases y metabolitos con el agua (Shiogiri *et al.*, 2012). Todo esto ocasiona problemas respiratorios, osmoregulatorios y de excreción de productos nitrogenados (Ferguson, 2006). Esto último se comprobó al encontrar diferencias significativas entre el T1 con respecto al T2 y T3 en la excreción de nitrógeno amoniacal total (NAT).

El aumento en células de mucus y a su vez la secreción de mucus es considerado una respuesta de los peces a un amplio rango de estresores ambientales (Matey *et al.*, 2008). Se sugiere que la secreción de mucus en las branquias desempeña un papel importante en la protección del delgado y sensitivo epitelio branquial, brindándole protección tanto de cambios ambientales como de xenobioticos (Al-Ghanbousi y Ba Omar, 2011). Sin embargo, este mecanismo puede generar hipoxia y alteraciones respiratorias

que en casos más severos puede producir necrosis del tejido circundante o ruptura del epitelio branquial (Al-Ghanbousi y Ba Omar, 2011; Lukin *et al.*, 2011).

Se ha reportado que cuando los peces están expuestos a un agente estresor aumentan la concentración de cortisol en el torrente sanguíneo (Flores, 2002), este aumento produce la proliferación de las células de moco (Laurent y Perry, 1990) y de células de cloro (Flores, 2009) constituyéndose en una respuesta compensatoria al estrés osmótico generado por el herbicida. Al-Ghanbousi y Ba Omar *et al.*, (2011) reportan que el incremento en el número de células de cloro puede ser el inicio de un mecanismo de desintoxicación en diferentes especies de peces.

Tanto las células de cloro como las de moco se originan con el fin de cumplir funciones principalmente osmoregulatorias en respuesta al posible desbalance de electrolitos ocasionado por la mayor permeabilidad que se genera en el epitelio branquial (Lin y Randall, 1995). Por otro lado, el aumento en tamaño de los dos tipos celulares tiene funciones levemente diferentes; las células de moco pretenden reducir la posibilidad de difusión del xenobiótico al epitelio branquial (Shiogiri *et al.*, 2012), mientras que las células de cloro aumentan la actividad enzimática con el fin de restablecer las concentraciones séricas de Na^+ , Cl^- y Ca^{2+} (Perry, 1997).

La congestión vascular y los aneurismas lamelares observados especialmente en el T3, coinciden con observaciones previas en branquias de *A. dispar* expuesto a una concentración de 3.0 ug/L deltametrina y *Gnathonemus petersii* (Alazemi *et al.*, 1996). Dichos autores siguieron que estas alteraciones se deben al aumento de la presión sanguínea que deforma la región apical de las lamelas secundarias resultando en el colapso del sistema de células pilares y afectando la integridad vascular.

Según Rudnicki *et al.*, (2009) el desprendimiento de células epiteliales es un fenómeno común en branquias de peces, sin embargo es predominante en peces de agua dulce que en peces de agua salada debido a que los ecosistemas acuáticos de agua salada son más estables en cuanto a los cambios de los parámetros fisicoquímicos. El desprendimiento de células epiteliales al igual que los edemas incrementan la distancia para el adecuado intercambio del oxígeno (Al-Ghanbousi y Ba Omar *et al.*, 2011). Estos mecanismos pueden ser considerados como defensa del organismo, incrementando la distancia entre los agentes tóxicos y el torrente sanguíneo (Cengiz, 2006; Rudnicki *et al.*, 2009).

CAPÍTULO VI

VI. HEMISFERIOS TELENCEFÁLICOS



VI.1. RESULTADOS.

VI.1.1. Hemisferios telencefálicos

Las neuronas de esta región se caracterizaron por presentar un núcleo prominente que se tiñe más tenue con el colorante, uno o dos nucléolos generalmente periféricos los cuales se tiñen intensamente. El citoplasma neuronal es más oscuro que el núcleo y en algunas ocasiones se observan las prolongaciones axonales. Las células gliales poseen un núcleo y citoplasma más oscuro que las neuronas y tienen un menor tamaño. Los hemisferios telencefálicos son estructuras altamente vascularizadas por lo que fue común encontrar numerosos capilares y vasos sanguíneos.

En el tratamiento control (T1), no se observaron daños neuronales ni en las células gliales (Figura 10).

En el T2 y T3 se identificaron células similares a mastocitos en peces (CSMP), siendo más abundantes en el T3 con respecto al T2 (Figura 11-13). La mayoría de las CSMP se ubicaban hacia la periferia de los hemisferios telencefálicos, sin embargo algunas se hallaron más interiormente, la mayoría de las CSMP estaban asociadas a capilares sanguíneos. Las CSMP tenían diferentes morfologías presentando gránulos de diversos tamaños y diferentes grados de tinción (Figura 11 y 12).

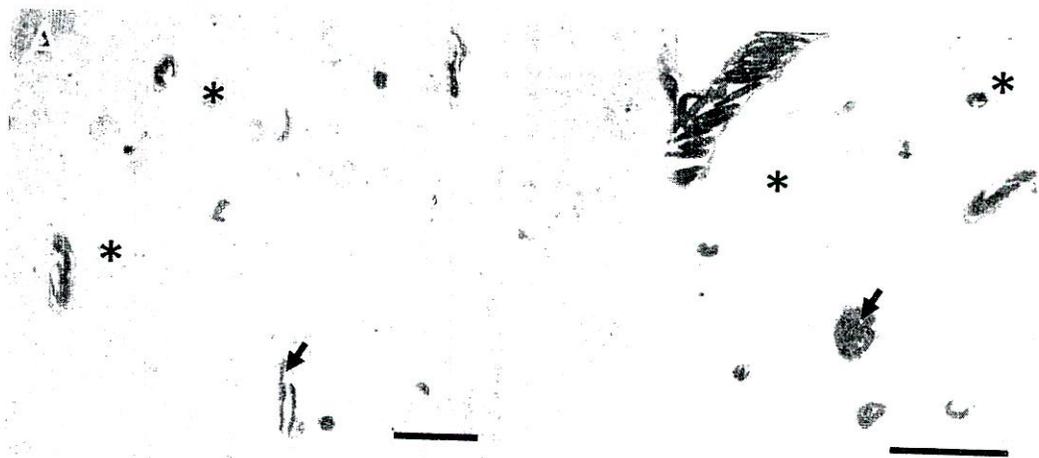


Figura 10. A y B. Detalle de los hemisferios telencefálicos de los alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T1. Neuronas (* negro), capilares (→ flechas negras). Barra= 30 μ m.

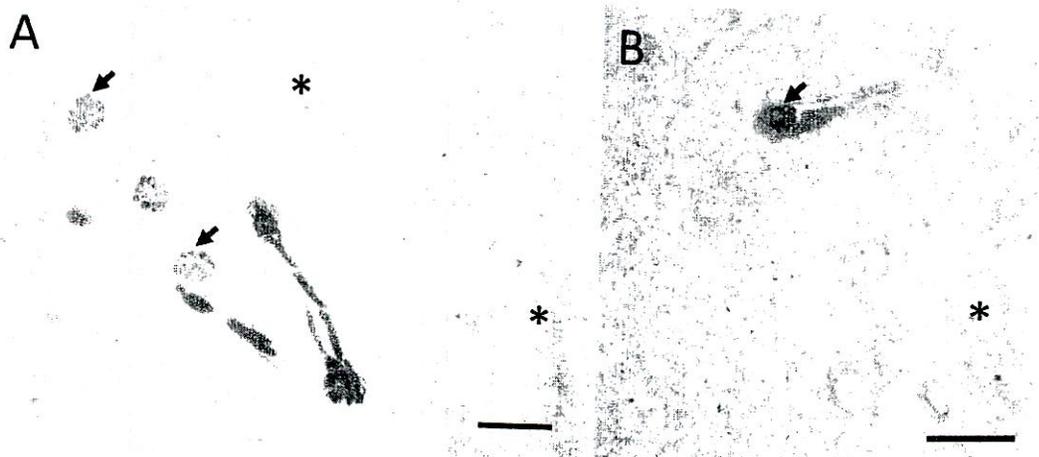


Figura 11. A y B. Detalle de los hemisferios telencefálicos de los alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T2. Neuronas (* negro), células similares a mastocitos en peces (→ flechas negras). Barra= 20 μ m.

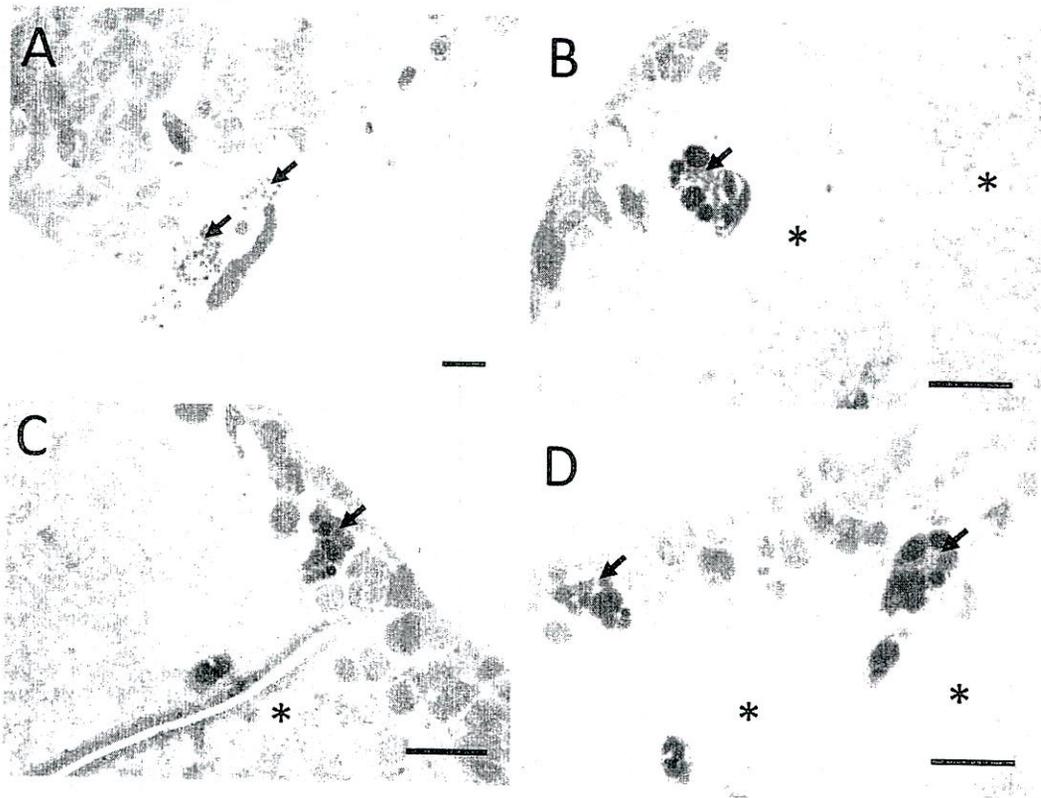


Figura 12. A, B, C y D. Detalle de los hemisferios telencefálicos de los alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T3. Neuronas (* negro), células similares a mastocitos en peces (→ flechas negras). Barra= 20 μ m.

Los hemisferios telencefálicos fueron evaluados en cuatro secciones de anterior a posterior espaciadas por alrededor de 250 μ m. En las dos primeras secciones se identificaron cuatro capas concentricas: capa interna de células (CIC), capa del nervio olfativo (CNO), capa glomerular (CGL), capa de células mitrales (CCM) (Figura 13, sección 1-2). En las siguientes secciones o niveles, se identificaron varios núcleos de la región dorsal y ventral de los hemisferios telencefálicos (Figura 13, sección 3-4).

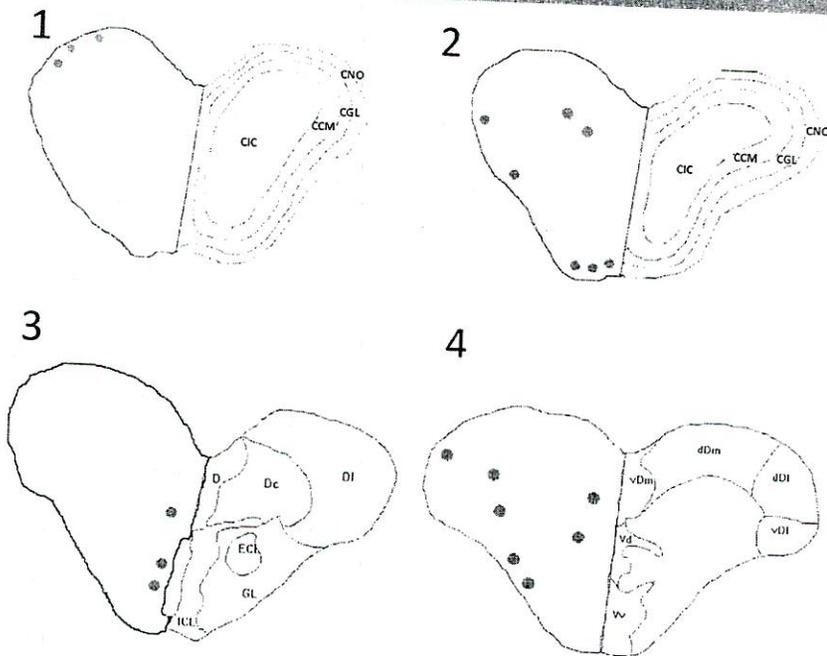
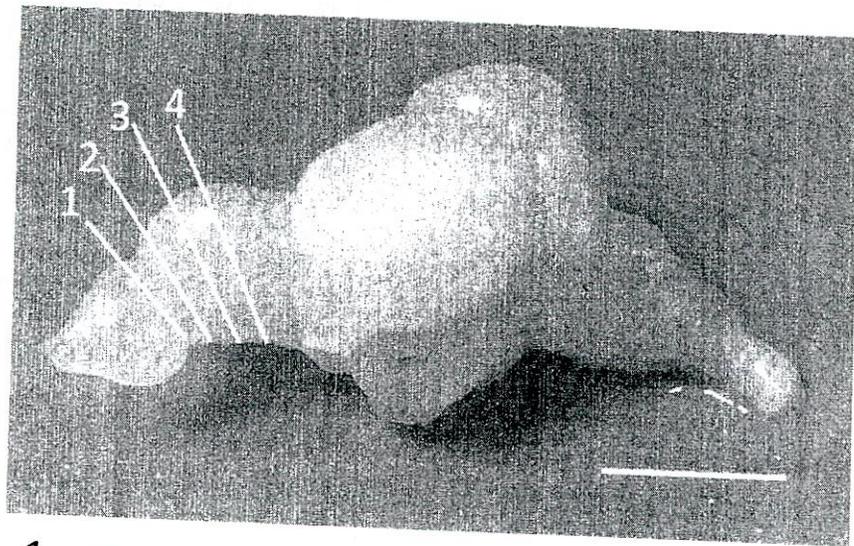


Figura 13. Cerebro de alevinos Cachama blanca (*P. brachypomus*). Se puede observar un esquema de los diferentes niveles de los hemisferios telencefálicos ilustrando la posición de las CSMP. CSMP del T2 (círculos azules), CSMP del T3 (círculos rojos). Sección 1 y 2, capa interna de células (CIC), capa del nervio olfativo (CNO), capa glomerular (CGL), capa de células mitrales (CCM). Sección 3 y 4, área dorsalis telencephali (D), área centralis de D (Dc), área dorsalis de D (Dd), área lateralis de D (DI), región dorsal de DI (dDI), región ventral de DI (vDI), área medialis de D (Dm), región dorsal de Dm (dDm), área posterioris de D (Dp), capa celular externa (ECL), capa glomerular (GL), capa celular interna (ICL), área dorsalis de V (Vd), área ventralis de V (Vv). Barra= 2 mm.

VI.2. DISCUSIÓN.



VI.2.1. Hemisferios telencefálicos.

Entre los principales hallazgos encontrados en el sistema nervioso de los alevinos de *P. brachypomus* expuestos a concentraciones subletales de Roundup Activo®, fue la presencia de las denominadas células granulares eosinofílicas/mastocitos. Estas células aparecieron en los hemisferios telencefálicos de los tratamientos T2 y T3 siendo mayor la presencia en este último, de igual manera aparecieron en los GRDs del T3.

Las mastocitos en vertebrados son considerados entidades multifuncionales que están asociadas al sistema inmune. Estas células han sido identificadas en otros vertebrados no mamíferos como: anfibios, reptiles, aves y peces, aunque en este último grupo hay pocos estudios acerca de la presencia y funcionamiento de células granulares eosinofílicas/mastocitos (Reite y Evensen, 2006; Baccari *et al.*, 2011). En peces, estas células recibieron el término de células granulares eosinofílicas debido a las propiedades de tinción de los gránulos con tinción hematoxilina eosina (H&E) (Reite, 1998), sin embargo por la heterogeneidad de los componentes que almacenan, pueden tener otras características histoquímicas presentado otros tipos de tinción (Reite y Evensen, 2006). Por ello, en la actualidad se ha empezado a manejar el término de células similares a mastocitos en peces (CSMP), el cual consideramos más apropiado, por lo que habitualmente lo usaremos en esta discusión (Baccari *et al.*, 2011).

Al igual que en mamíferos se ha reportado que estas células tienen un amplio rango de compuestos bioactivos como: histamina, heparina, neuropéptidos, factores de crecimiento tumoral (FCT), quininas, lisozimas y proteasas neutrales (Reite y Evensen, 2006; Theoharides *et al.*, 2012). Adicionalmente en

teleósteos se ha encontrado que las CSMP pueden secretar péptidos antimicrobiales (Reite y Evensen, 2006). Las CSMP tienen una amplia distribución en los organismos encontrándose en el cerebro, glándulas endocrinas, intestino, bazo, hígado, riñón y piel, sin embargo la mayor abundancia de las CSMP en un determinado órgano varía con los diferentes taxa (Baccari *et al.*, 2011).

La aparición de CSMP están asociadas como respuestas a afectaciones por agentes tóxicos o nocivos (Reite, 1997; Rondón-Barragán *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2009) parásitos, patógenos o agentes atenuados de los mismos (Lamas *et al.*, 1994; Holland y Rowley, 1998; Reite y Evensen, 2006). En el caso particular de la especie *P. brachypomus* ya se había identificado estas células al ser expuestos los peces a Roundup Ultra® (Eslava *et al.*, 2007), el surfactante Cosmoflux 411 (Rondón-Barragán *et al.*, 2007) y a la mezcla de los mismos (Eslava *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2009). Es importante resaltar que en dichos trabajos se evaluaron concentraciones más altas (7.5 a 120 mg/L) con individuos de mayor tamaño y edad, pero aun así, en esta investigación se observaron las CSMP, lo que estaría indicando un posible efecto nocivo del Roundup® Activo incluso en concentraciones subletales.

Debido a las características anfífilas del herbicida se han planteado varias rutas de entrada al cerebro de los peces, una es a través de las branquias al torrente sanguíneo y luego este pasaría la barrera hematoencefálica y entraría al cerebro. La otra ruta es vía lamelas olfatorias, tracto olfatorio, y de allí accedería al cerebro por los bulbos olfatorios (Rondón-Barragán *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2009). Para evaluar la última hipótesis, de manera paralela (en las mismas concentraciones) Castañeda, (2012) realizó un estudio de trazado neuronal con Dil en *P. brachypomus* detallando la ruta topográfica desde las narinas hacia los bulbos olfatorios, así mismo, identificó CSMP en las dos estructuras. En cuanto a los bulbos olfatorios las CSMP se ubicaron en las

capas CNO y la CG. Otra ruta de la cual se discutirá más adelante es por la piel de allí a neuronas sensoriales de los GRDs- médula espinal- cerebro.

Al igual que en trabajos anteriores en *P. brachypomus* fue mayor la presencia de CSMP en los hemisferios telencefálicos, lo cual estaría indicando que esta estructura es más sensible al herbicida. Los hemisferios telencefálicos son centros multintegrativos sensoriales, y median funciones tan importantes como aprendizaje, comportamiento reproductivo, orientación, migración entre otros (Butler, 2000; Obando, 2006). La región más anterior de los hemisferios telencefálicos exhibió una distribución laminar de cuatro capas, similar a la reportada por Castañeda (2012) para bulbos olfatorios, lo que puede estar indicando que es una región de transición. De igual manera, las CSMP se ubicaron en las mismas capas (CNO y CG).

La CNO es la que recibe las aferencias de las neuronas del epitelio olfativo, mientras la CG está compuesta por estructuras sinápticas esféricas denominadas glomérulos, estas estructuras están compuestas por las terminales axónicas de los receptores de las neuronas olfativas (Baier y Korsching, 1994; Castañeda, 2012). Por la función que cumplen estas capas es entendible que se presentará un daño en dichas poblaciones neuronales ya que son las encargadas de recibir y mediar los impulsos nerviosos relacionados con el olfato, que como reporta Castañeda (2012) las narinas y bulbos olfatorios estaban considerablemente afectados aun en las concentraciones subletales (1 y 0.1 mg/L) de Roundup Activo®.

En las secciones posteriores de los hemisferios telencefálicos también se identificaron CSMP ubicadas en núcleos sensoriales estrechamente relacionados con los bulbos olfativos. Los núcleos del diencefalo (D); area posterioris de (Dp) y el area centralis de (Dc) son los principales blancos del bulbo olfativo. De igual manera, se identificaron CSMP en los núcleos de la

región ventral (V) los cuales también reciben señales olfativas de los bulbos olfatorios. Mientras que los otros núcleos como; el área medialis de D (Dm), junto con el área dorsalis de D (Dd), el área lateralis de D (DI) y área centralis de D (Dc), reciben entradas sensoriales las cuales son retrasmittidas a varios sitios en el diencéfalo (Butler, 2000; Obando, 2007). Un ejemplo de lo anterior es lo que ocurre con las entradas sensoriales del sistema de la línea lateral vía el torus semicircularis hacia el área medialis de D (Dm) en los hemisferios telencefálicos (Butler, 2000).

Theoharides *et al.*, (2004) plantean que la aparición de las CSMP está también asociada a procesos de estrés y que la hormona liberadora de corticotrofinas (HLC) regula la función de estas células. Recientemente esta suposición es apoyada por los hallazgos de Ito *et al.*, (2010) quienes reportaron que la HLC estimula la generación de mastocitos humanos en precursores del folículo piloso.

En peces la HCL también regula procesos de estrés, mediando la síntesis de cortisol, generando un desbalance iónico, aumento en la circulación sanguínea, redistribuyendo las reservas de glucosa y aumentando la excreción de NAT (Flores, 2002). Como se discutió anteriormente en branquias el NAT fue mayor en los tratamientos T2 y T3, y un aumento en estos productos nitrogenados puede ser un indicativo de estrés. Lo anterior podría estar sugiriendo que los peces al ser expuestos a concentraciones subletales de Roundup® Activo desarrollarían un proceso de estrés el cual es mediado por la HLC, por lo cual no se descarta que esta hormona también este estimulando la producción de CSMP, para que actúen en los tejidos donde se estén presentando daños o alteraciones celulares.

Las CSMP pueden aparecer en un determinado tejido a través de dos mecanismos los cuales no son excluyentes entre sí. El primero plantea que en

todos los tejidos hay células precursoras de CSMP y cuando se presenta una alteración (patógeno, toxico etc.) estas células se diferencian y forman mastocitos *in situ* (Flaño *et al.*, 1996; Holland y Rowley, 1998). El otro mecanismo es que las CSMP son producidas en órganos especializados en la formación de células sanguíneas como el riñón, hígado y bazo posteriormente viajando por el torrente sanguíneo hasta los sitios de inflamación o de daño celular (Reite y Evensen, 2006). Lo último parece coincidir con lo observado en riñón de los peces del T3, pues se encontró formación de un gran número de CSMP, inclusive varias de ellas viajaban por la aorta neural, la cual brinda soporte metabólico y retira los desechos de la médula espinal, los GRDs y el cerebro de los peces.

La disposición y la estrecha relación de las CSMP con los vasos sanguíneos sugieren una interacción entre CSMP y las células endoteliales. De hecho, estudios en tilapia (*Oreochromis niloticus*) soportan esta hipótesis al encontrar que los gránulos de las CSMP liberan productos que aumentan la permeabilidad celular (Matsuyama e Iida, 2001) y regulan la adhesión y reclutamiento de neutrófilos a las células endoteliales (Matsuyama e Iida, 2002).

Tampoco descartamos el primer mecanismo de aparición de las CSMP, pues es posible que células precursoras estén en los órganos para daños locales, pero si el daño o alteración es mayor, se realiza una síntesis en los órganos hematopoyéticos y después las CSMP migran para apoyar a las otras células que actúan localmente.

VII. GANGLIOS DE LA RAÍZ DORSAL (GRDs) Y SUS NEURONAS

VII.1. RESULTADOS.

VII.1.1. GRDs y sus neuronas.

Los GRDs se encuentran ubicados adyacentes a la médula espinal, aparecen en pares tanto en cortes longitudinales como en transversales. Las aferencias de las neuronas sensoriales de los GRDs ingresan por el asta dorsal de la médula espinal y de allí derivan su nombre de estos ganglios (Figura 14).

Se identificaron dos subpoblaciones o tipos neuronales por la tinción que presentaban, las neuronas tipo A las cuales son células grandes que exhiben un citoplasma más claro, de manera contraria las neuronas tipo B, las cuales son relativamente pequeñas y su citoplasma es más oscuro por poseer mayor agregados de sustancia de Nissl. Ambos tipos neuronales presentan un núcleo de gran tamaño el cual se tiñe más claro que el citoplasma circundante, y poseen uno o dos nucléolos que se tiñen intensamente (Figura 15-23).

Otro tipo de células que se pudo distinguir en los GRDs fueron unas células pequeñas de tinción intensa, que reciben el nombre de células satélite o células de soporte (CS), las cuales se encontraban alrededor de las neuronas sensoriales (tipo A y tipo B) (Figura 16-20).

Las neuronas de los GRDs de todos los tratamientos exhibieron la morfología típica antes descrita, y ambas poblaciones neuronales presentaron vesículas

citoplasmáticas. Sin embargo, en el tratamiento 3 (T3), se identificaron CSMP, dichas células estaban asociadas tanto a neuronas tipo A como B, así mismo se encontraron unas de ellas contiguas a fibras nerviosas y viajando por el torrente sanguíneo (Figura 20-23).

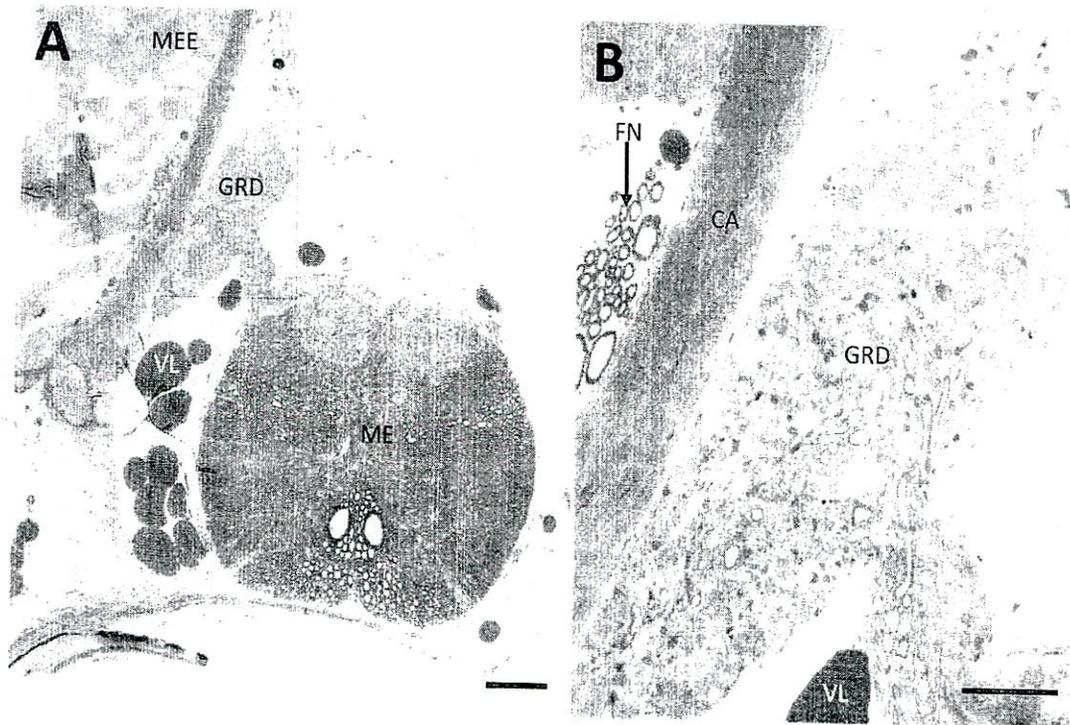


Figura 14. GRDs en alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) un corte transversal del T1. A. Panorámica de la ubicación anatómica de los GRDs en alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) un corte transversal. B. Detalle del GRD y los tejidos acompañantes. Ganglio de la raíz dorsal (GRD), médula espinal (ME), vesícula lipídica (VL), musculo estriado esquelético (MEE), fibras nerviosas (FN), cartílago (CA). Barra A= 100 μ m, barra B= 50 μ m.

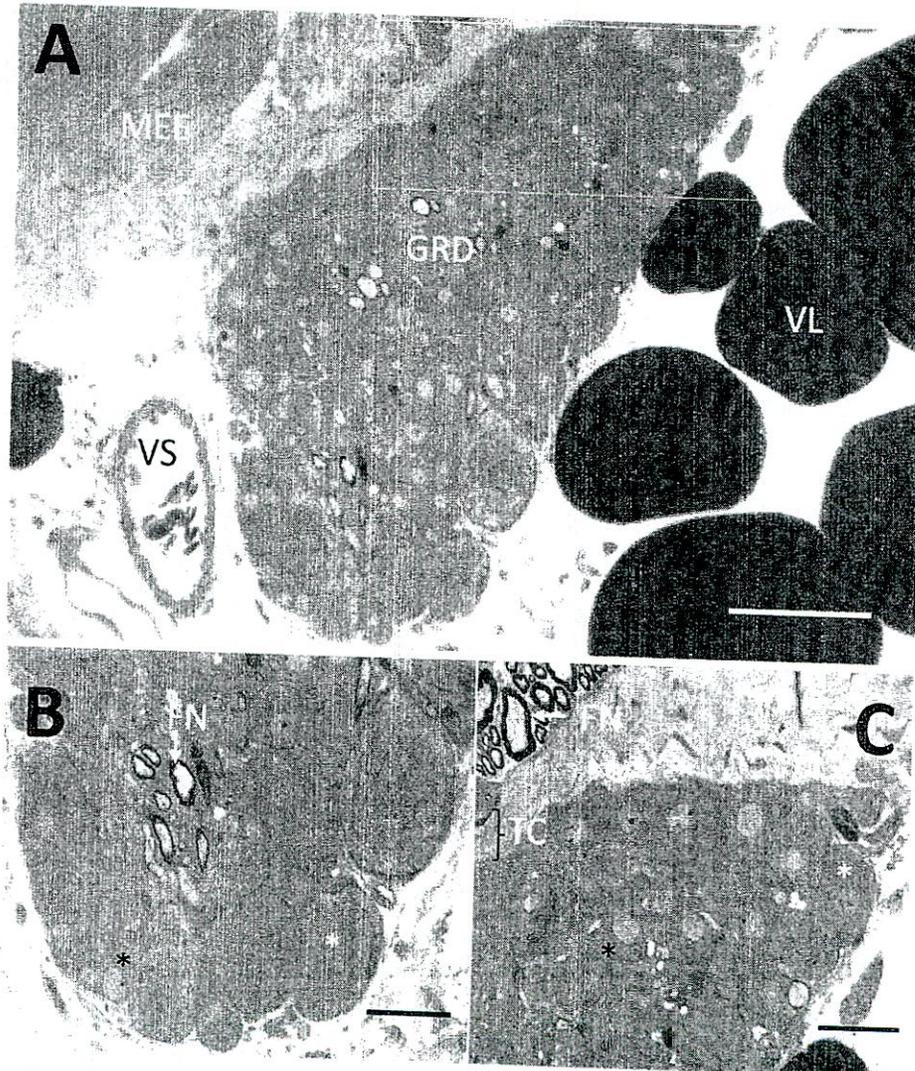


Figura 15. GRDs en alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) en corte longitudinal del T1. A. Panorámica de GRD T1 en corte longitudinal. B y C. Detalle de diferentes regiones del GRD. Ganglio de la raíz dorsal (GRD), vesícula lipídica (VL), músculo estriado esquelético (MEE), fibras nerviosas (FN), vaso sanguíneo (VS), tejido conectivo (TC), neuronas tipo A (* blanco), neuronas tipo B (* negro). Barra A= 50 μ m, barra B y C= 20 μ m.



Figura 16. Detalle de un GRD en alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T1 en corte longitudinal. Vesícula lipídica (VL), tejido conectivo (TC), vesículas citoplasmáticas (VC), neuronas tipo A (* blanco), neuronas tipo B (* negro), células satélite (→ flechas negras). Barra= 20 μ m.

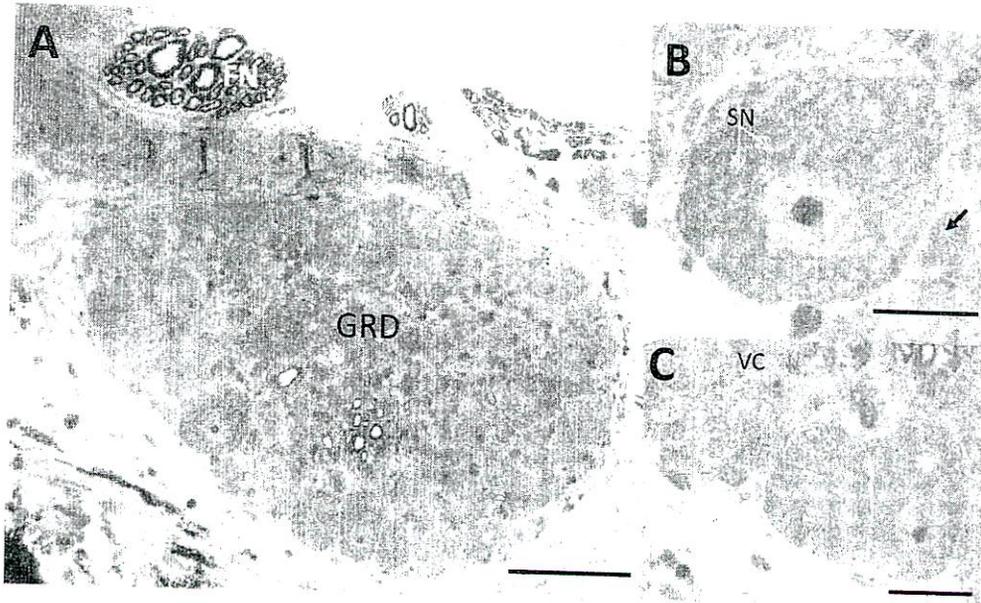


Figura 17. GRD en alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T2 en corte longitudinal. A. Panorámica de GRD T2 en corte longitudinal. B y C. Detalle de diferentes regiones del GRD. Ganglio de la raíz dorsal (GRD), fibras nerviosas (FN), neuronas tipo A (* blanco), neuronas tipo B (* negro), sustancia de Nissl (SN), células satélite (→ flechas negras). Barra A= 50 μ m, barra B y C= 10 μ m.

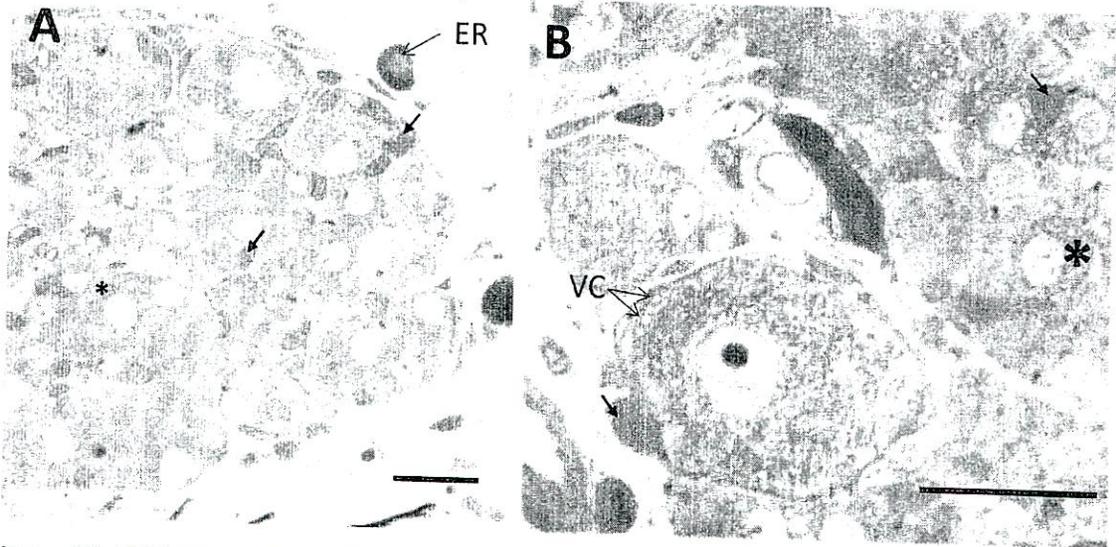


Figura 18. GRD en alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T2 en corte longitudinal
 A. Panorámica del GRD T2 en corte longitudinal. B Detalle de neuronas sensoriales. Neuronas tipo A (* blanco), neuronas tipo B (* negro), eritrocito (ER), vesículas citoplasmáticas (VC), células satélite (→ flechas negras). Barra A y B= 50 μ m.

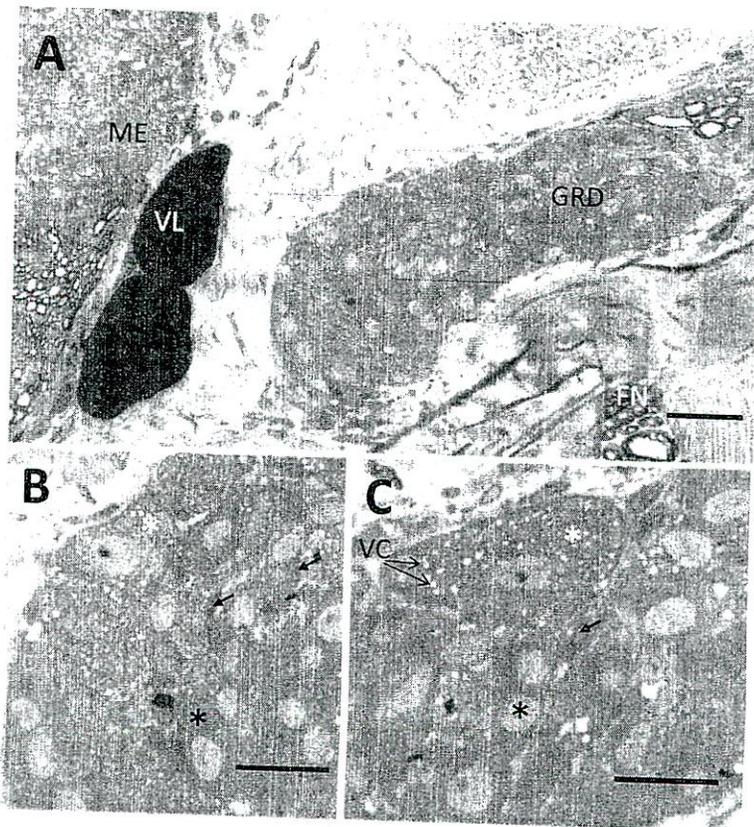


Figura 19. GRD en alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T3 en corte longitudinal.
 A. Panorámica GRD T3 en corte longitudinal. B y C. Detalle de diferentes regiones del GRD.

Ganglio de la raíz dorsal (GRD), fibras nerviosas (FN), médula espinal (ME), vesícula lipídica (VL), vesículas citoplasmáticas (VC) neuronas tipo A (* blanco), neuronas tipo B (* negro), células satélite (→ flechas negras). Barra A= 30 μm , barra B y C= 10 μm .

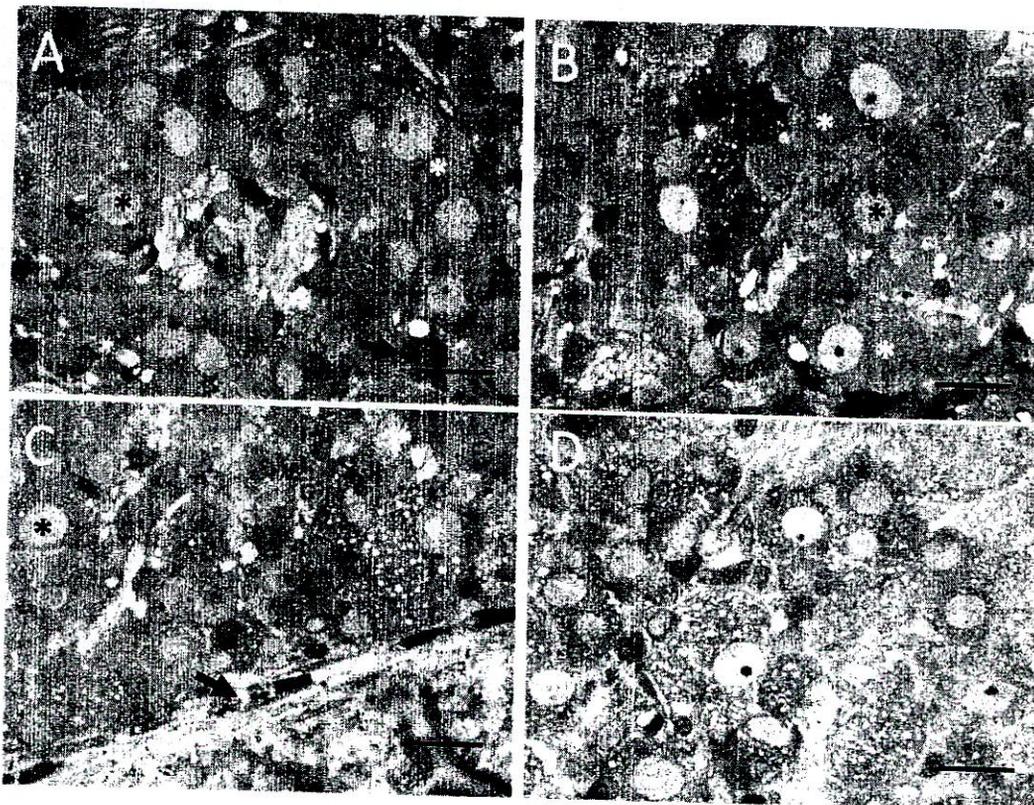


Figura 20. Neuronas sensoriales de los GRDs en alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T3 evidenciando vesículas citoplasmáticas y CSMP. A,B,C y D, detalle de las neuronas sensoriales en el T3. Vesículas citoplasmáticas (VC), neuronas tipo A (* blanco), neuronas tipo B (* negro), células satélite (→ flechas negras), células similares a mastocitos en peces (→ flechas negras gruesas). Barra A,B,C y D= 20 μm .

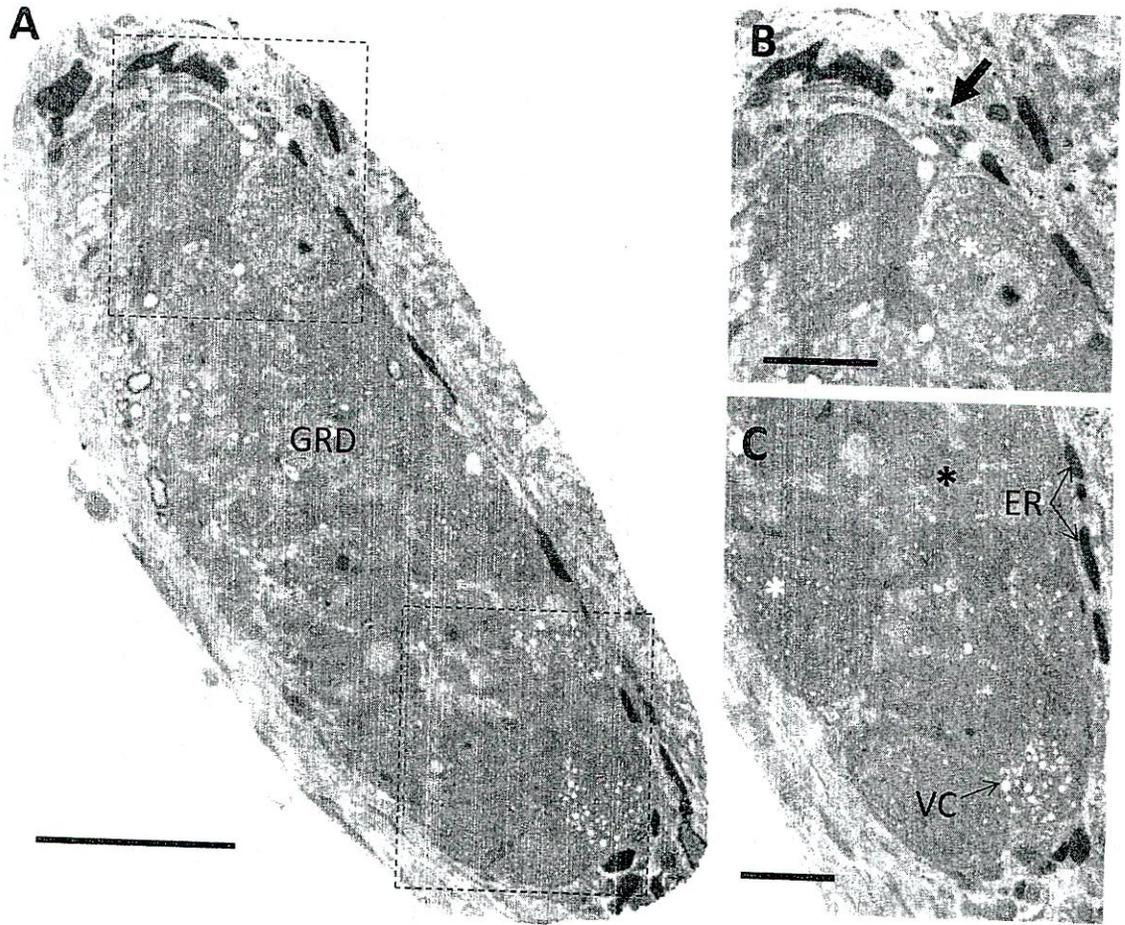


Figura 21. GRD en alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T3 en corte longitudinal. A. Panorámica del GRD T3. B y C detalle de las neuronas sensoriales. Ganglio de la raíz dorsal (GRD), vesículas citoplasmáticas (VC), eritrocitos (ER), neuronas tipo A (* blanco), neuronas tipo B (* negro), células similares a mastocitos en peces (→ flechas negras gruesas). Barra A= 50 μ m, B y C= 20 μ m.



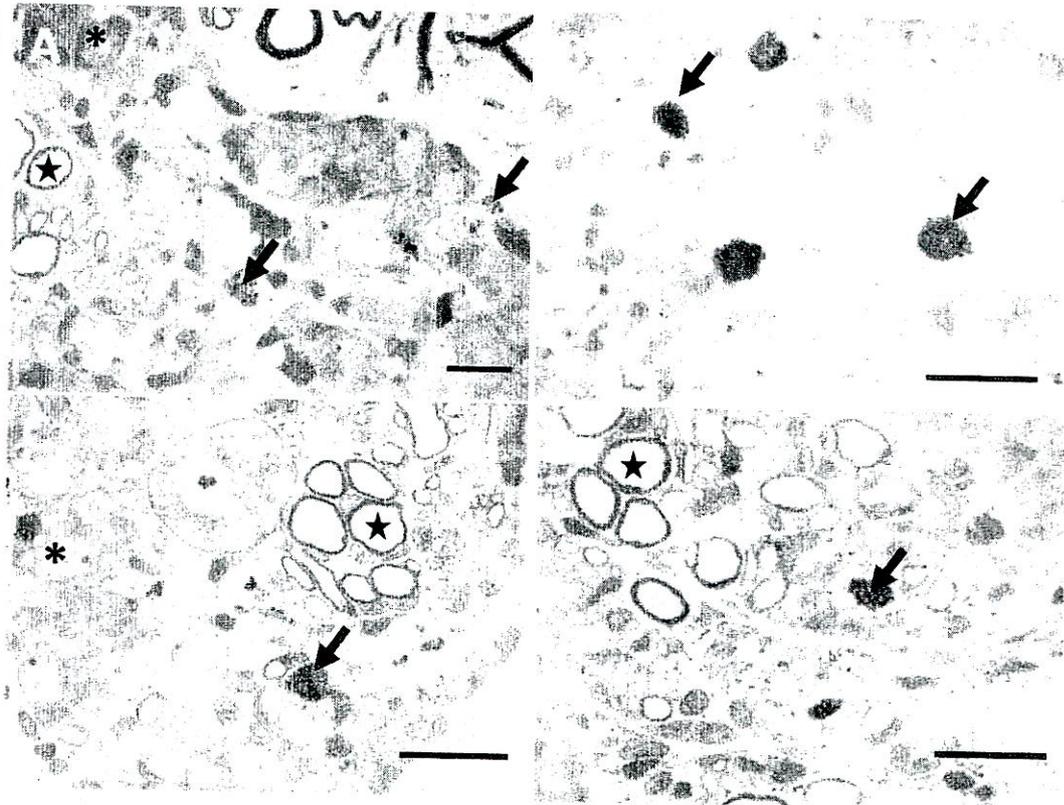


Figura 22. Neuronas sensoriales de los GRDs en alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T3 evidenciando CSMP. A, B, C y D. Células similares a mastocitos en peces en los GRDs. Neuronas tipo A (* blanco), neuronas tipo B (* negro), células similares a mastocitos en peces (→ flechas negras gruesas), fibras nerviosas (★ estrella negra). Barra A, B, C y D= 20 μ m.

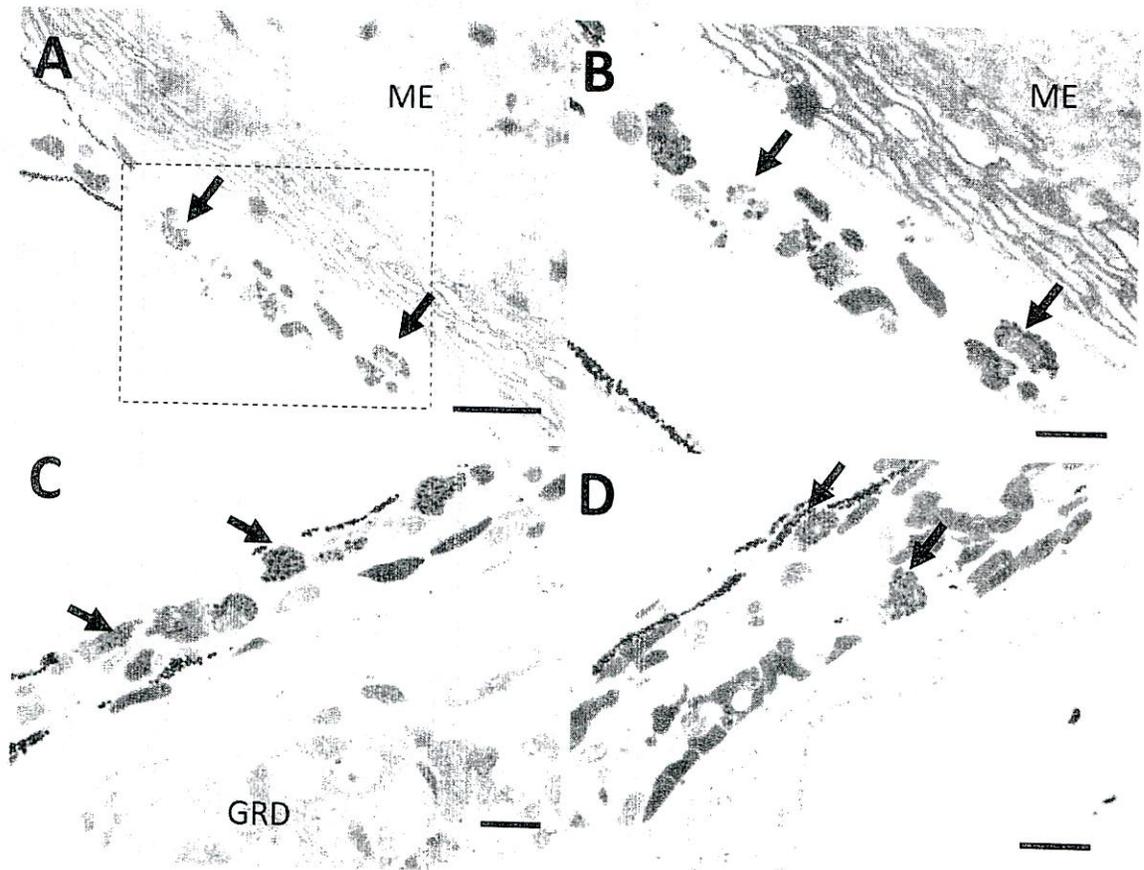


Figura 23. CSMP en el torrente sanguíneo en alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T3. A, B, C y D. Células similares a mastocitos en peces en el torrente sanguíneo asociado a los GRDs y la médula espinal. Médula espinal (ME), ganglio de la raíz dorsal (GRD), células similares a mastocitos en peces (→ flechas negras gruesas), fibras nerviosas (★ estrella negra). Barra A= 50 μ m, B, C y D= 20 μ m.

VII.1.2. Morfometría de las neuronas de los GRDs.

En las neuronas tipo A y sus núcleos no se encontraron diferencias significativas en área, perímetro y diámetro, mientras que para las neuronas y los núcleos de las neuronas tipo B, en general se presentaron diferencias significativas entre el T2 y T3 presentando neuronas y núcleos de menor tamaño con respecto al T1 (Tabla 6).

Tabla 6. Morfometría de las neuronas de los GRDs y sus núcleos. Cada valor representa el promedio +/- el error estándar, letras diferentes representan diferencias significativas ($p > 0.05$).

<i>Morfometría de las neuronas de los GRDS</i>							
<i>Neuronas Tipo A</i>				<i>Núcleos neuronas Tipo A</i>			
<i>Trat</i>	<i>Área</i>	<i>Perímetro</i>	<i>Diámetro</i>	<i>Área</i>	<i>Perímetro</i>	<i>Diámetro</i>	<i>n</i>
<i>T1</i>	2240,55±108,66 ^a	57,25±1,15 ^a	165,56±0,34 ^a	3926,00±11,13 ^a	23,82±0,31 ^a	70,17±0,09 ^a	204
<i>T2</i>	2026,96±93,99 ^a	54,38±1,08 ^{ab}	156,55±0,33 ^a	3980,35±11,10 ^a	24,18±0,32 ^a	70,86±0,09 ^a	196
<i>T3</i>	2066,65±78,45 ^a	45,41±0,88 ^b	160,49±0,27 ^a	3895,06±8,73 ^a	19,82±0,33 ^b	67,67±0,08 ^a	272

<i>Neuronas Tipo B</i>				<i>Núcleos neuronas Tipo B</i>			
<i>Trat</i>	<i>Área</i>	<i>Perímetro</i>	<i>Diámetro</i>	<i>Área</i>	<i>Perímetro</i>	<i>Diámetro</i>	<i>n</i>
<i>T1</i>	967,50±19,15 ^a	38,69±0,38 ^a	11,06±0,11 ^a	286,37±4,27 ^a	20,45±0,16 ^a	6,02±0,04 ^a	373
<i>T2</i>	831,87±14,42 ^b	35,60±0,31 ^b	10,31±0,09 ^b	259,74±3,79 ^b	19,66±0,14 ^b	5,74±0,04 ^b	397
<i>T3</i>	877,89±16,68 ^b	28,87±0,51 ^c	10,56±0,10 ^b	270,05±4,34 ^b	15,73±0,28 ^c	5,88±0,05 ^b	329

En las neuronas tipo A (Figura 24) se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el porcentaje de neuronas que poseían el área citoplasmática ocupada por vesículas en 0 y 5%. El porcentaje de neuronas tipo A que no presentaban vesículas (0%) fue similar entre el T1 y T2, pero diferentes al T3. En el porcentaje de neuronas con el 5% vesículas se presentó diferencias significativas entre T2 y T3 con respecto a T1. Después del 10% de vesículas citoplasmáticas no hubo diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Figura 24).

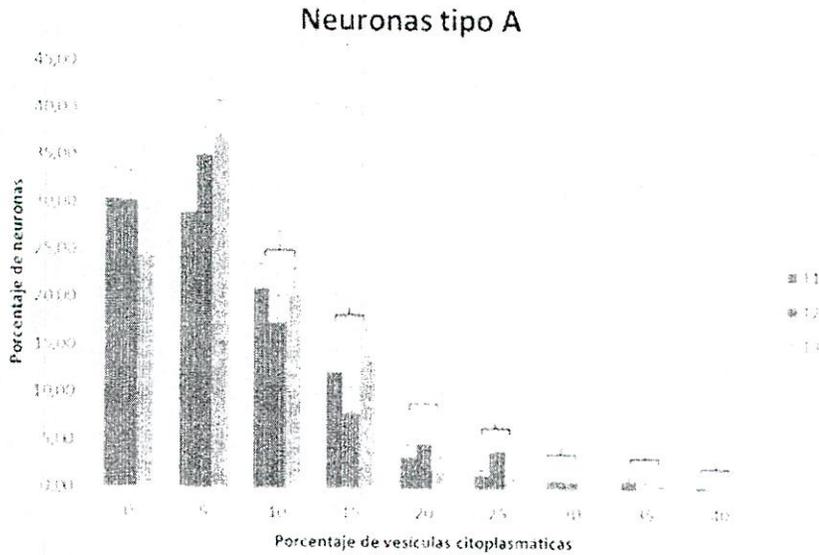


Figura 24. Porcentaje de vesículas citoplasmáticas de las neuronas tipo A. Cada valor representa el promedio +/- la desviación estándar, letras diferentes representan diferencias significativas ($p > 0.05$).

En las neuronas tipo B (Figura 25) se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el porcentaje de neuronas que poseían el área citoplasmática ocupada por vesículas en 0, 5 y 10% ampliándose un poco la diferencia en relación a las neuronas tipo A. El porcentaje de neuronas tipo B que no presentaban vesículas (0%) fue similar entre el T1 y T2, pero diferentes al T3, de igual manera ocurrió con los porcentajes de vesículas citoplasmáticas de 5% y 10%. Después del 15% de vesículas citoplasmáticas no hubo diferencias significativas en ninguno de los tratamientos (Figura 25).

Neuronas tipo B

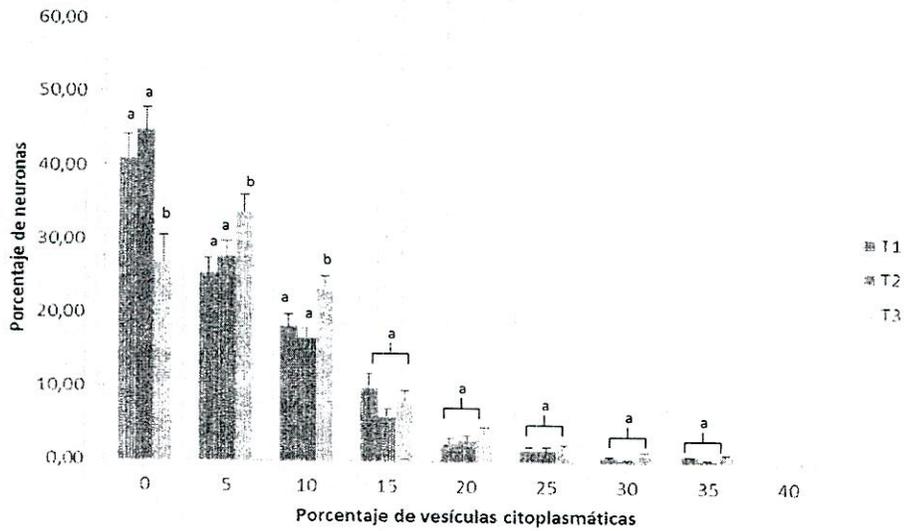


Figura 25. Porcentaje de vesículas citoplasmáticas de las neuronas tipo B. Cada valor representa el promedio +/- la desviación estándar, letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

NEURONAS TIPO A

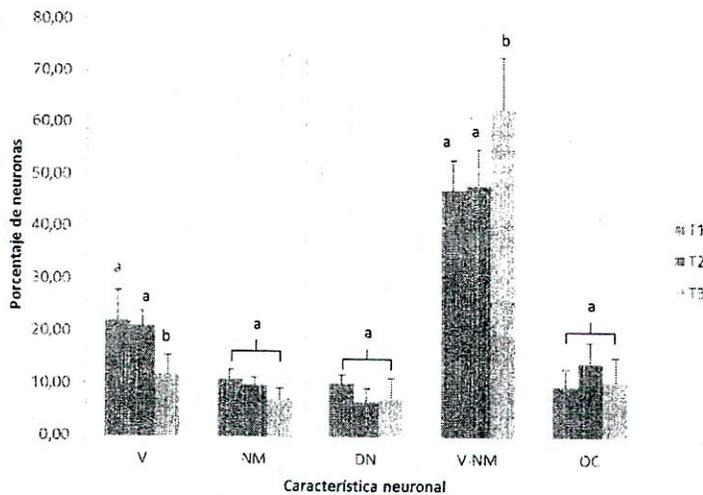


Figura 26. Porcentaje de neuronas dependiendo de las características morfológicas de las neuronas tipo A. Cada valor representa el promedio +/- la desviación estándar, letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

En cuanto al porcentaje de neuronas tipo A con los criterios morfológicos establecidos previamente se encontró diferencias significativas ($P > 0.05$) en las neuronas que presentaron vesículas (V) y las que exhibían simultáneamente la característica de vesículas y núcleo migrado (V-NM) siendo similar T1 y T2, pero diferentes al T3. No obstante, las otras características (NM, DN y OC) no presentaron diferencias significativas (Figura 26).

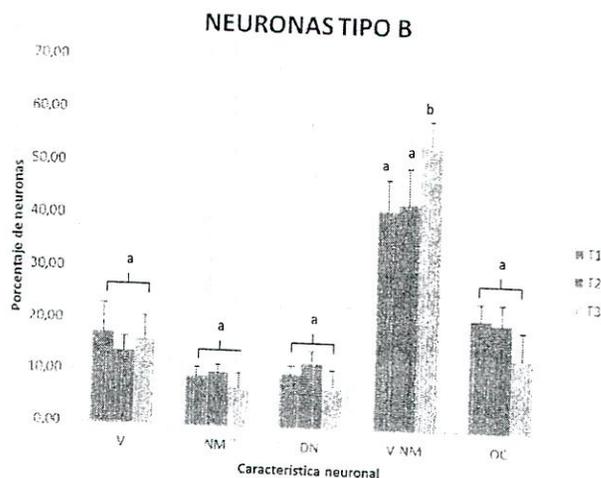


Figura 27. Porcentaje de neuronas dependiendo de las características morfológicas de las neuronas tipo B. Cada valor representa el promedio +/- la desviación estándar, letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Únicamente se presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) en las neuronas tipo B, para la característica morfológica de vesículas y núcleo migrado (V-NM), siendo similar T1 y T2, pero diferentes con respecto a T3 (Figura 27).

VII.2. DISCUSIÓN.

VII.2.1. Neuronas sensoriales de los GRDs

Las neuronas sensoriales presentaron un aumento en la proporción de vesículas citoplasmáticas en las neuronas tipo A (0-5%) y en las tipo B (0-10%) siendo mayor la alteración en el T3. Las vacuolas citoplasmáticas pueden ser

vistas histológicamente en neuronas sensoriales por varias causas, aunque los precisos mecanismos de su aparición aun no son claros (Greaves, 2007).

Prueba de ello, son las vacuolas presentadas en neuronas que experimentan apoptosis celular en GRD de ratas que han sufrido una axotomía por ligación o aplastamiento (Atlasi *et al.*, 2009), o la aparición en neuronas espinales y cerebrales de embriones de ratón en la fase temprana de la sinaptogénesis (Oppenheim *et al.*, 2001), en procesos neurodegenerativos mediados por proteínas de la familia de las caspasas (Young *et al.*, 2005), en alteraciones producidas por necrosis de neuronas del lumbar 5 (L5), en ratas que fueron expuestas al medicamento Paclitaxel (Jamieson *et al.*, 2003) y en neuronas cerebrales de ratones expuestos a altas concentraciones de etanol (Young *et al.*, 2005).

Si bien las vacuolas han sido vistas principalmente en los cuerpos neuronales y células gliales cerebrales, es evidente que esta morfología no es exclusiva de este grupo de células, sino también de neuronas de la médula espinal, de los ganglios sensoriales y simpáticos de organismos expuestos a pruebas farmacéuticas, xenobióticos, o daños físicos en nervios periféricos. Según lo reportan algunos autores de manera simplificada todo es un resultado de alteraciones de la mielina (Greaves, 2007).

Entendiendo que el proceso de esta alteración es un poco más complejo surge la pregunta si se trata de un proceso que lleva a necrosis o apoptosis. La necrosis es caracterizada por la desintegración celular, hinchamiento celular, vesículas por la desagregación de organelos y un desensamblaje celular, el cual es pasivo y poco regulado (Proskuryakov *et al.*, 2003). Posteriormente los productos citoplasmáticos activan el sistema inmune permitiendo la llegada de macrófagos provocando una inflamación localizada (Oliveira, 2001).

En contraste la apoptosis es un proceso activo, que involucra inicialmente la condensación de la cromatina seguida por clivajes del ADN, reorganización del citoesqueleto y redistribución de organelos. La apoptosis ha sido caracterizada en más detalle por microscopía electrónica de transmisión pero los tipos y clasificaciones varían dependiendo el autor. Sin embargo, a partir de los hallazgos de Oppenheim *et al.*, (2001) y Borsello *et al.*, (2002) podemos argumentar que alteración neuronal encontrada en este trabajo presenta una semejanza a la apoptosis tipo 3B; vacuolas citoplasmáticas alrededor de todo el soma neuronal, mientras el núcleo permanece conservado y solo hasta la última parte del proceso se produce una granulación y acumulación de cromatina que puede llevar a la deformación y evaginación del núcleo, es importante aclarar que estas últimas características no fueron observadas en las neuronas de los GRDs, pero este proceso pueden ocurrir varias semanas después.

Como podemos observar las neuronas de los GRDs en peces expuestos a Roundup® Activo podrían estar experimentando algunos de los dos procesos (necrosis o apoptosis) o una mezcla de ambos. Borsello *et al.*, (2002) afirma que la distinción entre la muerte celular de tipo 3B y necrosis es muy sutil y es difícil de realizar. Así mismo, manifiestan que ante una disminución de ATP intracelular o ante una exposición al químico Paclitaxel la célula puede ir hacia apoptosis o necrosis y que necesariamente no comparten rutas metabólicas diferentes, en vez de eso, se ha encontrado que ambos procesos muestran comunes mensajeros, activadores e inhibidores (Formigli *et al.*, 2000; Pei-Chin y Chien-Hui, 2005).

El Paclitaxel es un medicamento que se usa habitualmente en pacientes que son tratados con quimioterapia para cáncer de mama, ovario y pequeños cáncer de pulmón, sin embargo como vimos anteriormente este medicamento tiene un efecto adverso en el SNP ya que produce una degeneración de las neuronas sensoriales observándose inicialmente como vesículas

citoplasmáticas sin daño aparente del núcleo (Postma *et al.*, 1995). Este medicamento es un claro ejemplo de cómo un químico puede desencadenar procesos tanto de necrosis como apoptosis (Pei-Chin y Chien-Hui, 2005).

Se presume que el mecanismo de daño del Paclitaxel ocurre a nivel del transporte axoplásmico ya que impide la correcta polimerización de los microtúbulos (Authier *et al.*, 2000). Adicionalmente el medicamento causa otros daños neuronales, especialmente en las neuronas tipo A caracterizándose por; agrandamiento del núcleo de las neuronas sensoriales (Jamieson *et al.*, 2003; Jamieson *et al.*, 2007), aumento de excentricidad y multinucleolación neuronal, lo cual según Jamieson *et al.*, (2007) es un signo claro de neuropatía. De manera contraria, en esta investigación la población neuronal más afectada fue las tipos B, presentando neuronas y núcleos más pequeños en el T2 y T3.

Basados en los resultados obtenidos en el porcentaje de vesículas citoplasmáticas surge la inquietud acerca de lo que pudiera estar ocurriendo con las neuronas tipo A con porcentajes superiores al 10% y las tipo B con los porcentajes mayores del 15%, donde en adelante no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Apoyados en lo que ocurre en el desarrollo de este tipo de neuronas en mamíferos (Coggeshall *et al.*, 1994; Jackman y Fitzgerald, 2000) y aves (Eide y Glover, 1997) nos inclinamos con el proceso de apoptosis más que el de necrosis.

En tetrápodos éstas neuronas se desarrollan oscilatoriamente y el proceso es mediado por apoptosis, primero se desarrollan las tipo A seguido por las B, y este fenómeno es explicado porque los precursores de las tipo A detienen su proliferación primero que las neuronas tipo B (Coggeshall *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 2000). En peces aún no se ha comprobado que exista un proceso similar, pero trabajos como los de Jaramillo *et al.*, (2009) parecen indicarlo, además siendo *P. brachypomus* un pez de crecimiento indeterminado es probable que

haya neurogénesis y apoptosis continua en función de proveer inervación sensorial al tejido en formación (muscular, cutáneo y visceral).

El porcentaje de neuronas que presentaban únicamente la característica de vesículas citoplasmáticas (VC), núcleo migrado (NM) y otra característica (OC) en ambas poblaciones neuronales (tipo A y B) fue similar. No obstante, la característica de neuronas con vesículas y núcleos migrados (V-NM) representaba el mayor porcentaje de neuronas, siendo nuevamente el T3 el de mayor proporción en ambas poblaciones neuronales. Lo anterior es una característica morfológica que podría ser usada para determinar neuropatías en este tipo de neuronas al ser expuestas ante un agente tóxico.

Los hallazgos siguieron que diferentes poblaciones de neuronas sensoriales pueden variar en su susceptibilidad ante un agente tóxico, esto se pudo evidenciar en este estudio donde las neuronas tipo B fueron más sensibles al herbicida Roundup® Activo especialmente en la concentración más alta (T3).

Anteriormente se mencionó que otra posible entrada del Roundup® Activo sería a través de la piel, a través de los botones gustativos, neuromastos y otras células epiteliales. Si tenemos en cuenta que los principales blancos sensoriales de las neuronas tipo B son cutáneos y algunos órganos internos se entendería porque esta población neuronal se afectó en mayor proporción que las neuronas tipo A, las cuales inervan principalmente músculos (Jaramillo *et al.*, 2009).

Hu y McLachlan (2003) proveen una clara evidencia de la selectiva vulnerabilidad de las neuronas de diámetro pequeño (tipo B) en lesiones de nervio periférico en el L5 en ratas. Los autores demostraron que la muerte progresiva de las neuronas tipo B y la disminución de su diámetro se debían a la pérdida de los factores neurotróficos provenientes de los blancos cutáneos.

Eslava *et al.*, (2007) ya habían reportado daños epiteliales en juveniles de *P. brachypomus* con herbicidas similares en concentraciones más altas. Por lo anterior se puede inferir que aun en concentraciones subletales de Roundup® Activo se estarían alterando las células cutáneas y su efecto se evidencia de manera indirecta en las neuronas tipo B de los GRDs.

En los GRDs del T3 se encontraron CSMP las cuales se ubicaban de manera indistinta entre las neuronas tipo A y B, al igual que fue común hallarlas en los capilares y arterias asociadas a los GRDs. Este es el primer reporte de este tipo de células en los GRDs y especulamos que como en cerebro estén cumpliendo funciones similares.

El calibre de las aferencias sensoriales y la velocidad de conducción del impulso nervioso dependen del tamaño neuronal (Martínez *et al.*, 2000). Las neuronas tipo A, las más grandes en los GRDs tienen fibras mielínicas y las tipo B, las pequeñas tienen fibras amielínicas o con menor espesor de mielina, esto a su vez está relacionado con la velocidad de conducción la cual es mayor en fibras mielínicas que en las amielínicas (Jaramillo *et al.*, 2009).



Fisiológicamente el medicamento Paclitaxel ocasiona disminución en la velocidad de conducción y un aumento del tiempo en los periodos de latencia de los nervios sensoriales periféricos afectando principalmente las neuronas grandes o tipo A (Jamieson *et al.*, 2007). Aunque en nuestro estudio la población más susceptible fue la neuronas tipo B (pequeñas), no se debe descartar un efecto sobre las neuronas tipo A pues presentaron diferencias significativas en el porcentaje de vesículas y un aumento de neuronas con vesículas y núcleos migrados en el T3. Por este motivo, una degeneración de las neuronas tipo A puede generar ataxia es decir movimientos poco coordinados del organismo y pérdida sensorial muscular, mientras que pérdidas de neuronas tipo B, conduciría a síntomas como dolor, hiperestesia

(sensación exagerada de los estímulos táctiles) y si el efecto es prolongado podría causar degeneración de las fibras nerviosas y una posterior pérdida de sensibilidad (Sghirlanzoni *et al.*, 2005).

Es importante considerar que si los peces se encuentran en ambiente natural y son expuestos a bajas concentraciones de Roundup® Activo, pueden generar una disminución progresiva en la velocidad de reacción, lo cual puede ser decisivo para la supervivencia de la especie, ya sea para escapar de un predador, o si requiere alcanzar su alimento (Jaramillo *et al.*, 2009), además al tratarse de alevinos estas dos condiciones son más relevantes que en organismos adultos, ya que peces grandes tienen ventajas respecto a peces pequeños en que poseen menores tasas de predación y en alcanzan mayores distancias de forrajeo (Helfman *et al.*, 1997).

VIII. HÍGADO**VIII.1. RESULTADOS.*****VIII.1.1. Hígado.***

El hígado se caracterizó por poseer hepatocitos poligonales con núcleos centrales y redondeados y un prominente nucléolo densamente teñido. Estas células forman cordones o acúmulos organizados al lado de los sinusoides. Este órgano es altamente vascularizado por lo que fue común observar capilares, vasos, venas y arterias.

Para el tratamiento control (T1) no se observaron alteraciones histopatológicas (Figura 28-29).

En el tratamiento 2 (T2) se observaron alteraciones leves como: ligero desplazamiento de los núcleos de los hepatocitos hacia la periferia y aparición de algunas vacuolas picnóticas (Figura 30).

En el tratamiento 3 (T3), se observaron los mismos cambios que en el T2, adicionalmente se evidenciaron cambios microcirculatorios como congestión de algunos vasos sanguíneos y un aumento en la heterogeneidad de los hepatocitos (Figura 31).

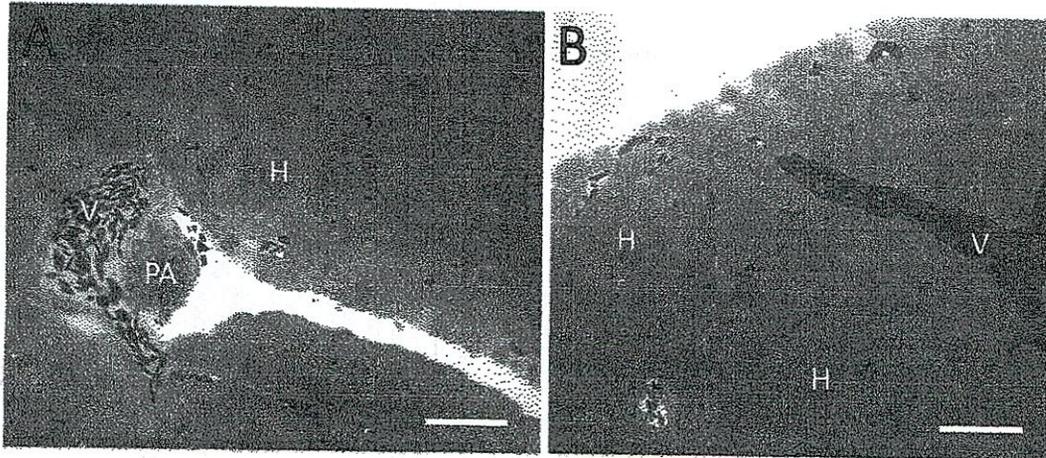


Figura 28. Hígado de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T1. A y B. Panorámica de hígado del T1. Hepatocitos (H), eritrocitos (ER), venas hepáticas (V) tejido pancreático (PA). A y B barra= 50 μ m

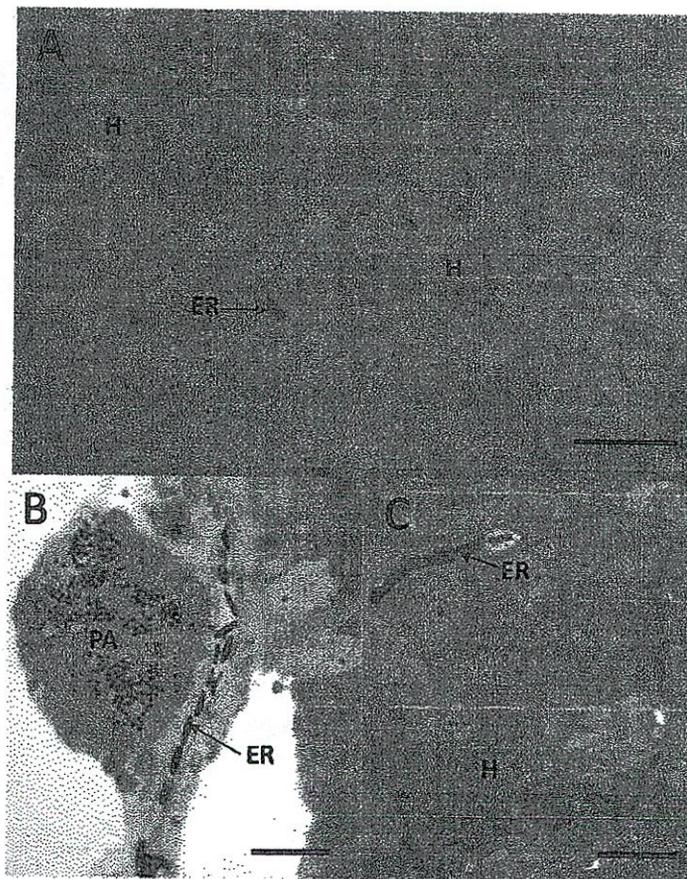


Figura 29. Detalle del hígado de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T1. A, B y C. Detalle de hígado del T1. Hepatocitos (H), eritrocitos (ER), tejido pancreático (PA). A, B y C barra= 20 μ m

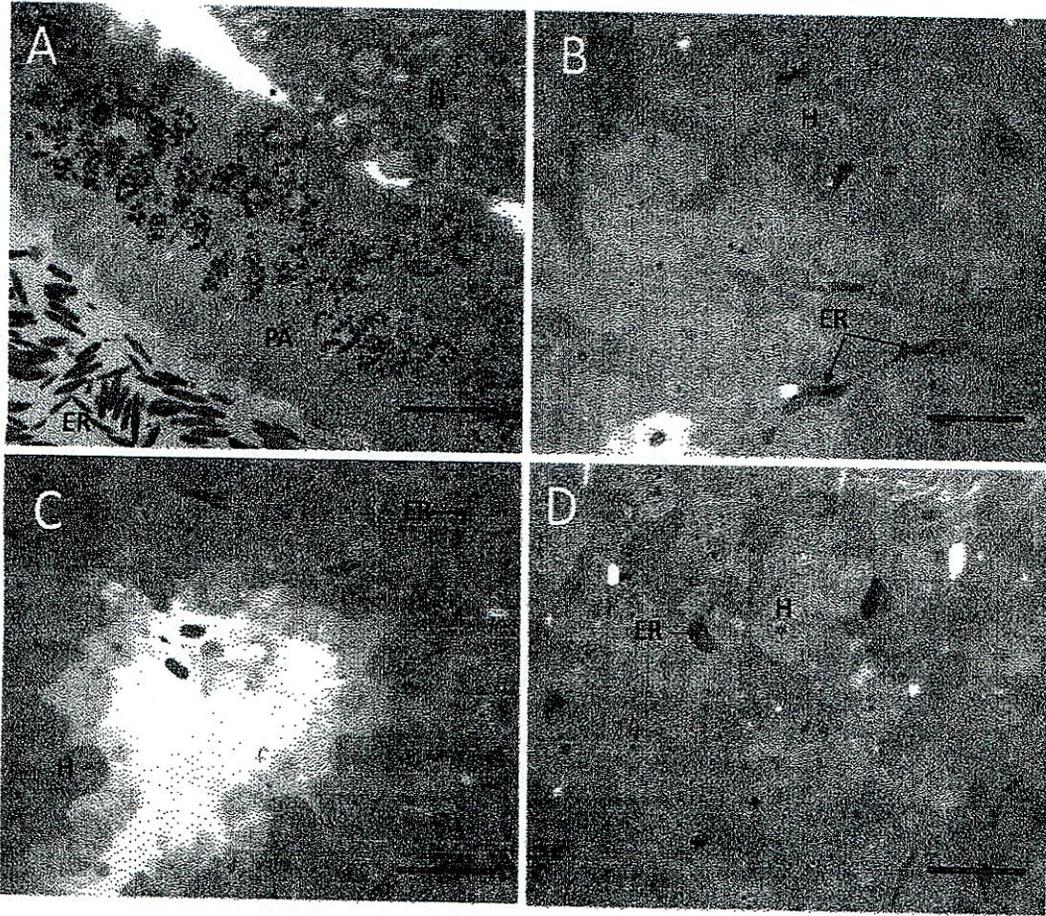


Figura 30. Detalle del hígado de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T2. A, B, C y D. Detalle de hígado del T2. Hepatocitos (H), eritrocitos (ER), tejido pancreático (PA). A, B, C y D barra= 20 μ m

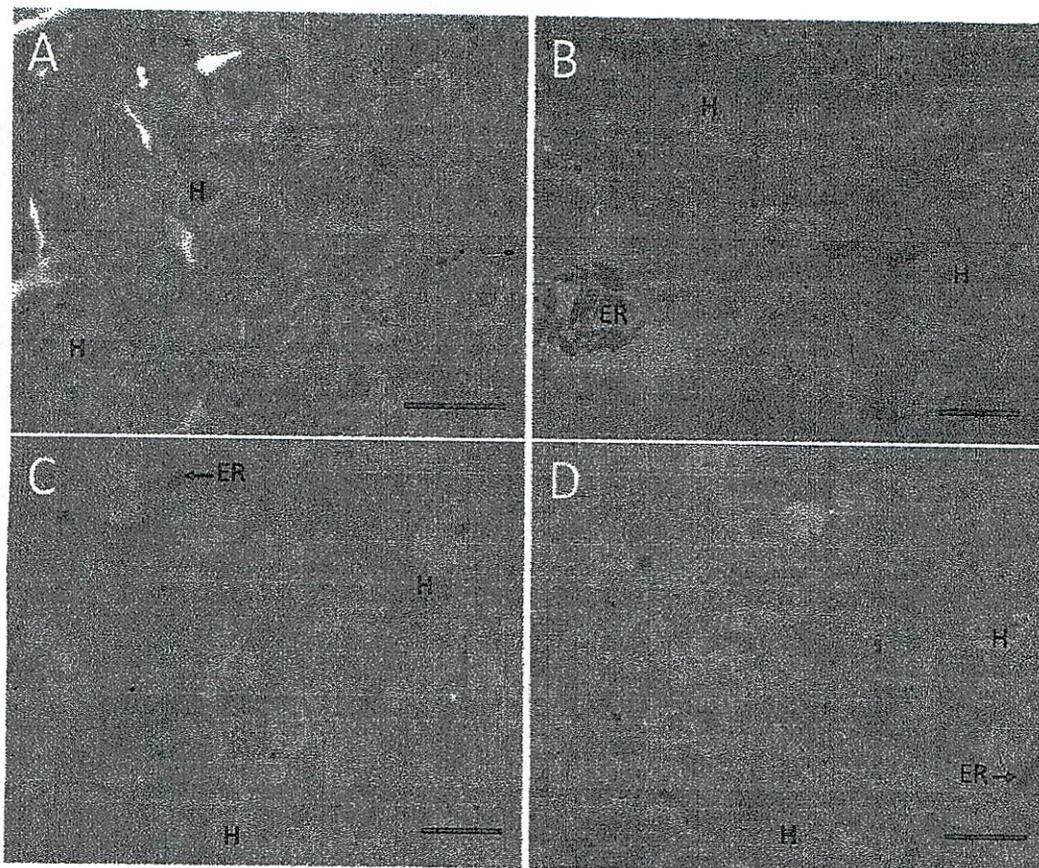


Figura 31. Detalle del hígado de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T3. A, B, C y D. Detalle de hígado del T3. Hepatocitos (H), eritrocitos (ER). A, B, C y D barra= 20 μ m

VIII.2. DISCUSIÓN.

VIII.2.1. Hígado

Fisiológicamente el hígado de los peces cumple varias funciones, incluyendo procesamiento y almacenamiento de nutrientes, la síntesis de enzimas y otros cofactores, formación y excreción de la bilis, e interviene en el metabolismo de los compuestos xenobióticos (Wolf y Wolfe, 2005). El hígado de los peces en comparación con los mamíferos tiene una menor capacidad para metabolizar sustancias xenobioticas, y esto ha sido postulado a partir del hecho de que los peces pueden eliminar gran parte de las sustancias inalteradas a través de sus branquias (Wolf y Wolfe, 2005). Lo anterior puede explicar porque las

branquias fueron más afectadas mientras las alteraciones observadas en el hígado fueron relativamente leves.

Como ocurrió en nuestra investigación y según lo observado por (Wolf y Wolfe, 2005) la respuesta del hígado de los peces tiende a ser menos severa ante un agente tóxico en comparación con los mamíferos. Una explicación a esta observación es que grandes concentraciones de un tóxico son requeridas para causar comparables cambios hepáticos en los peces. Adicionalmente, está la relativa tolerancia de los peces a hepatotóxicos, lo cual es debido a las bajas tasas de perfusión, la limitación de la exposición tóxica de la membrana basal de los hepatocitos, la distribución homogénea de las enzimas encargadas de la biotransformación y el hecho que algunas enzimas no son fácilmente inducibles (Hinton *et al.*, 2001; en: Wolf y Wolfe, 2005).

En cuanto a las leves alteraciones se podría decir que la sutil pérdida de excentricidad de los núcleos de los hepatocitos, fue similar a la identificada en hígado de larvas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) sanas y expuestas a concentraciones subletales de Lindano (1 mg/L) (Biagianti-Risbourg *et al.*, 1996) a lo observado en bocachico (*Prochilodus lineatus*) expuesto a aguas residenciales humanas (Camargo y Martínez, 2007) y a *Piaractus mesopotamicus* en la más baja concentración evaluada de 3 mg/L de Roundup Ready® (Shiogiri *et al.*, 2012).

La aparición de vacuolas es otro criterio ampliamente utilizado para describir posibles alteraciones en el hígado y es una señal de un proceso degenerativo que sugiere daños metabólicos (Pacheco y Santos, 2002). Sin embargo, hay una gran paradoja acerca de la composición de dichas vacuolas, pues pueden tener un origen lipídico, glicogénico o hidrópico (Ferguson, 2006). Incluso la discusión va más allá, ¿por qué diferentes especies de peces, al ser expuestos

a un tóxico pueden resultar en diferentes cantidades de acumulación de lípidos o glicógeno?. Al parecer la respuesta en los peces varía entre especies, el estado de desarrollo, el agente tóxico y la concentración del tóxico (Wolf y Wolfe, 2005).

Debido a que en MOAR se usa tetraóxido de osmio (OsO_4) en el proceso de postfijación se obtiene una buena fijación de lípidos, esto es particularmente importante porque permite determinar si las vacuolas presentadas en los hepatocitos son de origen lipídico o hidrópico, lo cual es difícil de determinar por medio de la técnica en parafina con tinción H&E, pues ambos tipos de vacuolas se observan como gotas hialinas citoplasmáticas. Esta alteración ha sido previamente reportada en trabajos toxicológicos en Cachama negra (*Colossoma macropomum*) (Salazar-Lugo *et al.*, 2011) y en Cachama blanca (*P. brachypomus*) (Eslava *et al.*, 2007; Rondón-Barragán *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2009) evaluando diferentes tipos de herbicidas y surfactantes, definiendo que las vesículas encontradas se trataban de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos y representaban una estrategia para reducir la disponibilidad de xenobióticos lipofílicos, aunque estos trabajos se apoyaron en histología H&E (Eslava *et al.*, 2007; Rondón-Barragán *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2009).

En esta investigación se puede decir que se presentó baja vacuolización de origen lipídico, característico de hepatocitos de peces sanos o con leve afectación a un xenobiótico (Biagianti-Risbourg *et al.*, 1996). Es importante resaltar que sería apropiado realizar otro tipo de tinción como la PAS, la cual permite teñir glicoproteínas y mucopolisacáridos, de esta manera se podría identificar vesículas de glicógeno en el interior de los hepatocitos. La cuantificación de glicógeno es importante puesto que permite estimar la movilización de estos compuestos energéticos. Shiogiri *et al.*, (2012) determinaron una reducción de los niveles de glicógeno al interior de los

hepatocitos de *P. mesopotamicus* al ser expuestos a bajas concentraciones del herbicida Roundup® Ready.

La congestión de vasos sanguíneos en el T3 se puede dar como respuesta al estrés que pudiera estar ocasionando el Roundup® Activo, al aumentarse el flujo sanguíneo para transportar más oxígeno e incrementar las concentraciones de glucosa que es movilizada desde el hígado hacia otros tejidos (Carmo y Martínez, 2008), este último mecanismo le permite responder al organismo ante un aumento en la demanda energética la cual es ocasionada por un agente tóxico (Biagianti-Risbourg *et al.*, 1996; Carmo y Martínez, 2008).

Fue posible identificar la estrecha asociación entre el hígado y el páncreas. El páncreas se observaba como pequeñas aglomeraciones al interior del hígado, poseía células acinares con núcleos situados central y basalmente, lo anterior ha reportado en otras especies de peces como bagre tigrillo (*Pimelodus pictus*) (Olaya *et al.*, 2007) y el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) (Kurokawa y Suzuki, 1996)



IX. RIÑÓN**IX.1. RESULTADOS.*****IX.1.1. Riñón.***

El riñón en todos los tratamientos se observaron normales, identificando túbulo renales compuestos de epitelio cúbico simple con núcleos redondeados y prominentes. Glomérulos distribuidos en la región intersticial del riñón cercanos a centros hematopoyéticos. También se encontraron algunos centros melanomacrofagos aunque sin diferencias cualitativas en los tratamientos evaluados, simplemente lo que se pudo evidenciar como alteración histopatológica, fue una leve expansión glomerular en el T3, resultando en una reducción del espacio de Bowman.

La región anterior del riñón denominado cefálico o craneal presentó un tejido renal hematopoyético con abundantes células de línea sanguínea.

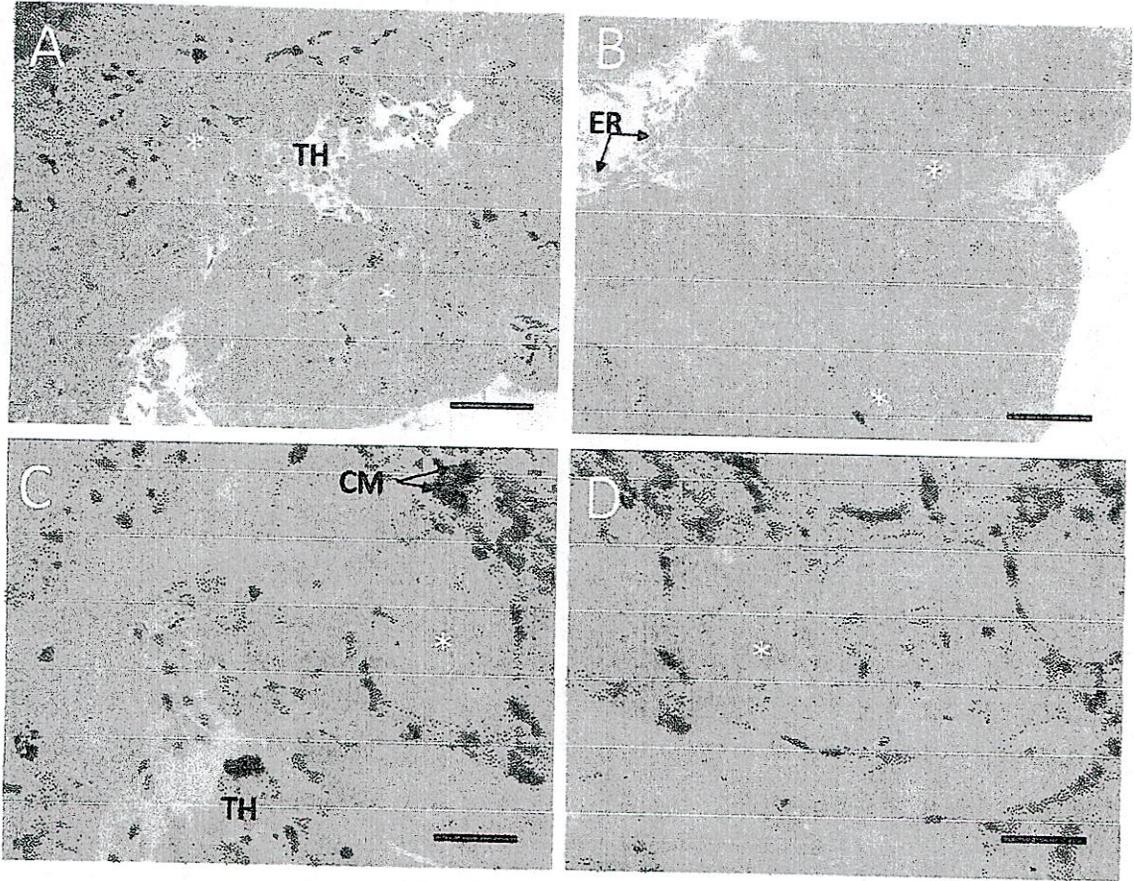


Figura 32. Riñón de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T1. A y B. Panorámica del riñón del T1. C y D. Detalle del riñón del T1. Tejido hematopoyético (TH), eritrocitos (ER), centros melanomacrofagos (CM), túbulos renales proximales (* blanco). A y B barra= 50 μ m, C y D barra= 20 μ m.

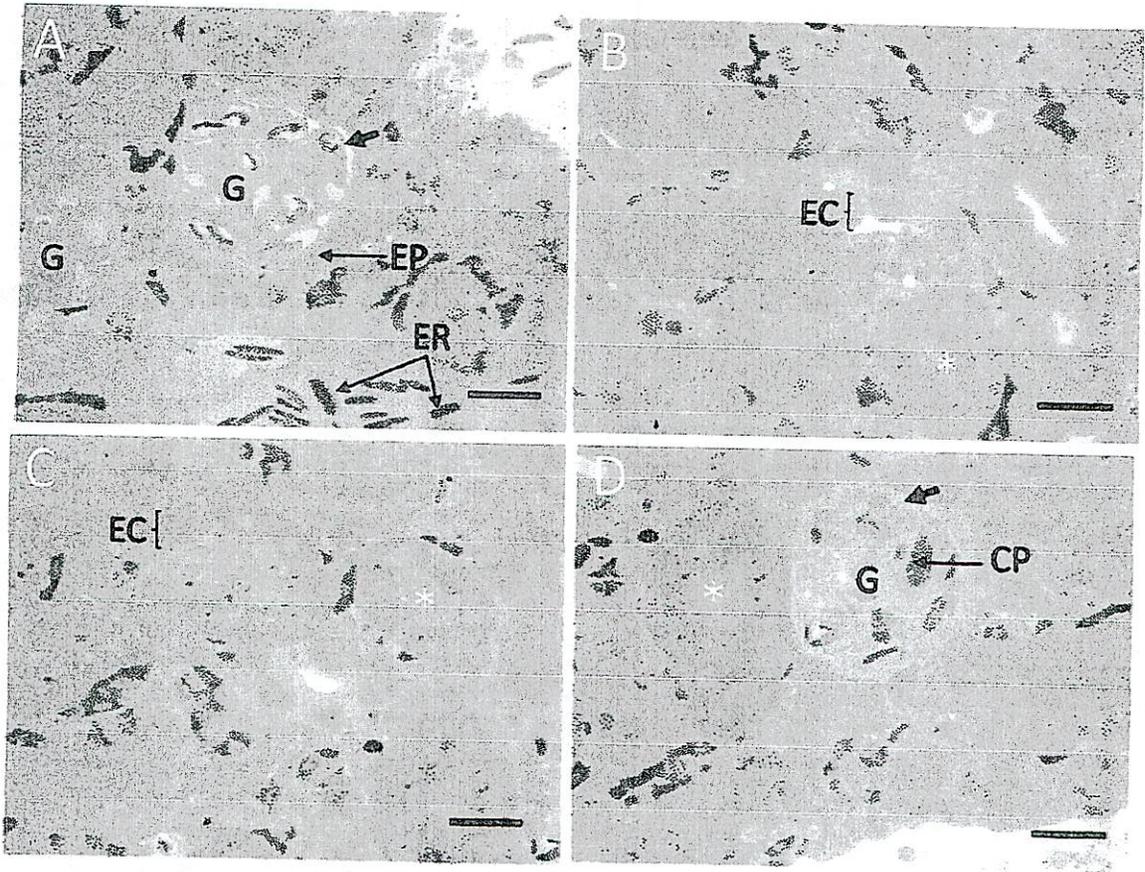


Figura 33. Riñón de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T2 y T3. A y C. detalle riñón del T1. B. detalle riñón del T2. D. Detalle del riñón del T3. Glomérulo (G), eritrocitos (ER), epitelio parietal de la capsula renal (EP), epitelio cilíndrico cúbico (EC), capilares (CP), túbulos renales proximales (* blanco) peces (→ flechas negras gruesas). A, B, C, y D barra= 20 μm.

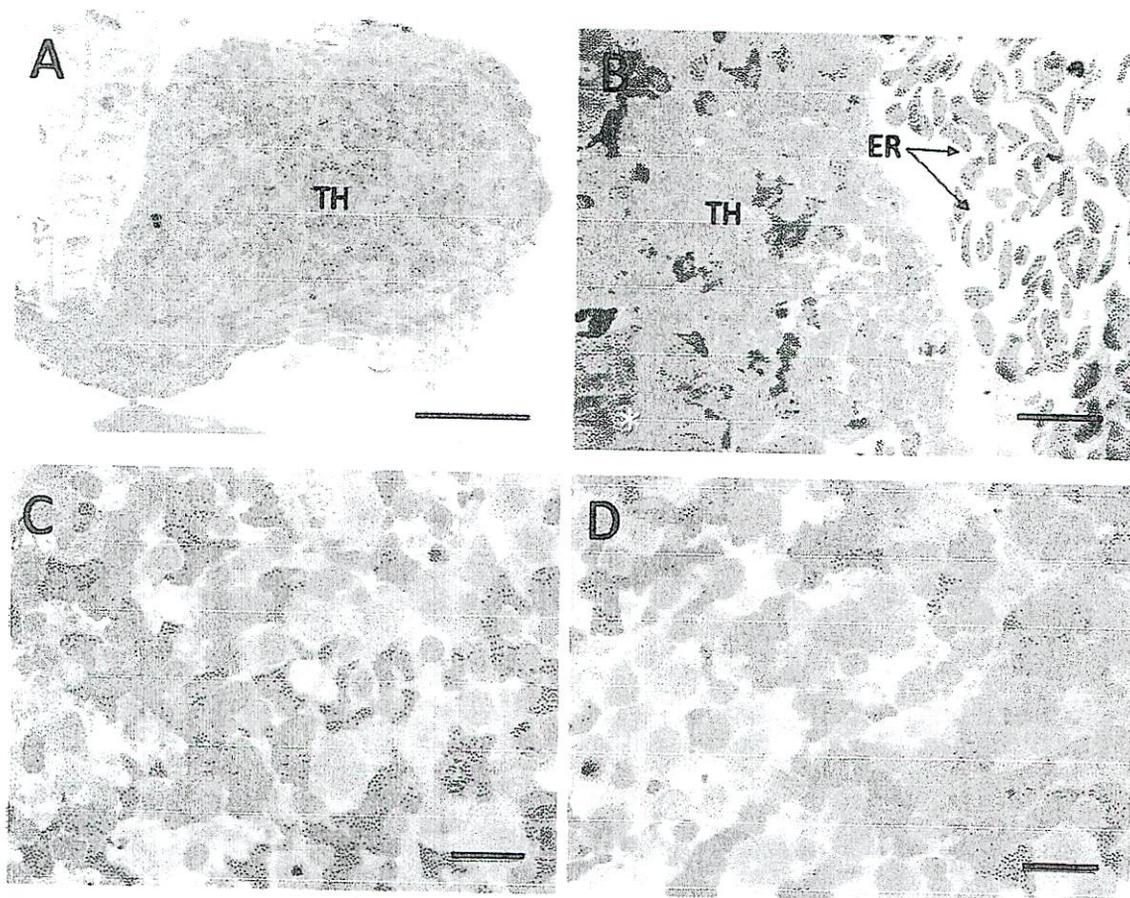


Figura 34. Riñón cefálico de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*). A. Panorámica detalle riñón del T1. B, C y D. detalle riñón del T1. Tejido hematopoyético (TH), eritrocitos (ER), túbulos renales proximales (* blanco). A barra= 50 µm, B barra= 20 µm, C y D barra= 10 µm.

IX.2. DISCUSIÓN.

IX.2.1. Riñón

En los vertebrados superiores como en los peces el riñón desempeña varias importantes funciones para mantener la homeostasis del organismo, siendo uno de los primeros órganos en recibir la sangre postbranquial (Charmi *et al.*, 2010), por lo cual se esperaría que fuese uno de los primeros órganos en afectarse por algún contaminante en el agua (Mela *et al.*, 2007) lo cual no ocurrió, lo que parecería indicar que las concentraciones subletales de Roundup® Activo no afectan considerablemente a este órgano.

La leve disminución del espacio de Bowman ya había sido reportado en varias especies de peces: en *P. lineatus* al ser expuesto a aguas con desechos urbanos (Camargo y Martínez, 2007), en *Lates calcarifer* al ser expuesto a cadmio (Thophon *et al.*, 2003).

Se podría decir que el riñón de la región anterior de Cachama blanca *P. brachypomus* es exclusivamente hematopoyético presentando pocos islotes de tejido interrenal compuesto de túbulos y glomérulos, este órgano va cambiando gradualmente de hematopoyético a renal. En la región caudal aumentando considerablemente el número de túbulos y glomérulos presentando poco tejido hematopoyético, el cual estaba restringido a los espacios intersticiales.

X. CONSIDERACIONES FINALES Y CONCLUSIONES

X.1. CONSIDERACIONES FINALES.

Como se mencionó anteriormente la casa comercial del herbicida Roundup® Activo no especifica el tipo de surfactante, aunque en otras presentaciones de Roundup® se usa el POEA, el cual se ha demostrado ser más tóxico que el mismo GP (Giesy *et al.*, 2000; Eslava *et al.*, 2007; Contardo-Jara *et al.*, 2009).

De igual manera, ocurre con el nuevo herbicida Roundup® Ready producto diseñado para controlar malezas en plantas transgénicas de soya en Brasil, el cual tampoco especifica el tipo y concentración de surfactante. Este producto produjo daños moderados en branquias y daños severos en hígado, a concentraciones relativamente bajas (3.0, 3.5, 4.0, 4.5 mg/L) en el pez Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Shiogiri *et al.*, 2012). Ésta especie pertenece al mismo género de la Cachama blanca (*P. brachypomus*), pero demostró ser más susceptible al Roundup® Ready presentado un concentración letal 50 (CL₅₀) de 3.74 mg/L (Shiogiri *et al.*, 2012) mientras que la reportada para Cachama blanca es de 97.47 mg/L para Roundup® Ultra (Eslava *et al.*, 2007).

Lo anterior demuestra que cada vez que sale al mercado una nueva presentación del herbicida a base de GP es apremiante evaluar el efecto no solo sobre mamíferos sino sobre organismos acuáticos como los peces. Además con la renuencia e irresponsabilidad de las casas comerciales que no reportan el surfactante ni la concentración, bajo la excusa de que es un secreto comercial, es importante que las entidades de control Colombianas (ICA, Ministerio del Medio ambiente) exijan los componentes del mismo antes de ser aprobado su uso en los cultivos agrícolas y se deberían realizar pruebas

preliminares con especies nativas las cuales puedan ser afectadas por estos herbicidas.

Esta investigación proporciona evidencias que demuestran que en concentraciones subletales (0.1 y 1 mg/L) de Roundup® Activo, las cuales son muy probables de encontrar en cuerpos de agua cercanos a cultivos agrícolas o aledaños a zonas de fumigación de cultivos ilícitos generan alteraciones histopatológicas en varios órganos de la especie nativa Cachama blanca (*P. brachypomus*).

Aunque son importantes los hallazgos en este trabajo, son muchas las interrogantes que surgen al respecto y que promueven varias investigaciones en este tema. Conociendo la capacidad de regeneración que presentan los peces ¿serían estos capaces de revertir el efecto adverso en los órganos evaluados? si es así ¿Cuánto tiempo requieren?

En cuanto a las CSMP las cuales es la primera vez que se reportan en el sistema nervioso tras ser afectados con un herbicida, entonces surgen nuevamente algunas preguntas ¿Qué función cumplen las CSMP en el sistema nervioso en peces?, para ello se debería caracterizar inmunohistoquímicamente estas células para determinar cuál es la composición específica de los gránulos.

Por otro lado, se deberían realizar estudios complementarios evaluando actividad enzimática en órganos blanco como riñón e hígado, pues aunque no se observen cambios morfológicos considerables quizás si hay alteraciones metabólicas; por lo que sería interesante evaluar enzimas de tipo oxidativo (aspartato y alanina aminotransferasa, lactato deshidrogenasa etc.) y en sistema nervioso estudiar actividad colinesterasa.

X.2. CONCLUSIONES.

- No se presentaron diferencias entre los tratamientos para las variables de crecimiento y parámetros productivos en los alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*).
-
- La subpoblación de neuronas más susceptible al efecto de las concentraciones subletales de Roundup® Activo fue las neuronas tipo B, las cuales presentaron menores tamaños (área, diámetro y perímetro).
- Las diferencias en el porcentaje de vesículas citoplasmáticas en las neuronas sensoriales fue mayor en las tipo B (0-10%) con respecto a las tipo A (0-5%).
- La principal alteración morfológica en las neuronas sensoriales de los alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) expuestos a concentraciones subletales de Roundup® Activo fue las vesículas citoplasmáticas y los núcleos migrados.
- Se identificaron CSMP en los hemisferios telencefálicos del T2 y T3, siendo más abundantes en este último. Así mismo, se encontró este tipo de células en los ganglios de la raíz dorsal asociadas a neuronas tipo A, B y haces nerviosos.
- Las branquias de los alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) expuestos a concentraciones subletales de Roundup® Activo presentaron un mayor daño en T2 que en T3. El daño se caracterizó por edemas, desarreglo de células pilares, aneurismas, leve desprendimiento epitelial, hipertrofia e hiperplasia de células de cloro y moco.
- El hígado presentó alteraciones histopatológicas leves, caracterizadas en el T2 como un ligero desplazamiento de los núcleos de los hepatocitos y aparición de algunas vacuolas picnóticas, mientras que el T3 adicionalmente hubo cambios microcirculatorios y un incremento en la heterogeneidad de los hepatocitos.
- El riñón no exhibió alteraciones considerables en ninguno de los tratamientos evaluados.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alazemi BM, Lewis JW, Andrews EB. 1996. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Environmental Technology*, 17: 225–238.
- Al-Ghanbousi RT, Ba-Omar RV. 2011. Effect of deltamethrin on the gills of *Aphanius dispar*. A microscopic study. *Tissue Cell*, 44: 7-14.
- American Society of Ichthyologists and Herpetologists (ASIH), American Fisheries Society (AFS), American Institute of Fisheries Research Biologists (AIFRB). 1988. Guidelines for use of fishes in field research, 13: 16-23,
- Anken HR, Bourrat F. 1998. Brain Atlas of the Medaka fish: *Oryzias Latipes*. INRA ed. Paris, France.
- Atlasi MA, Mehdizadeh M, Bahadori MH, Joghataei MT. 2009. Morphological identification of cell death in dorsal root ganglion neurons following peripheral nerve injury and repair in adult rat. *Iranian Biomedical Journal*, 13: 65-72.
- Authier N, Gillet JP, Fialip J, Eschalier A, Coudore F. 2000. Description of a shortterm taxol-induced nociceptive neuropathy in rats. *Brain Research*, 887:239–49.
- Baccari GC, Pinelli C, Santillo A, Minucci S, Rastogi RK. 2011. Mast cells in nonmammalian vertebrates: an overview. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 290:1-53.
- Baier H, Korsching S. 1994. Olfactory glomeruli in the zebrafish form an invariant pattern and are identifiable across animals. *Journal Neuroscienses*, 14: 219–230.
- Beaver B, Reed W, Leary S, McKiernan B, Bain F. 2001. Report of the AVMA panel on euthanasia. *J. Am. Vet Med. Assoc.* 218: 669-696.
- Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T, 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22: 25–34.
- Biagianti-Risbourg S, Pairault C, Vernet G, Boulekbache H. 1996. Effect of lindane on the ultrastructure of the liver of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, sac-fry. *Chemosphere*, 33: 2065-2079.
- Borsello T, Mottier V, Castagné V, Clarke PG. 2002. Ultrastructure of retinal ganglion cell death after axotomy in chick embryos. *The journal of comparative neurology*, 453: 361–371.
- Brunelli E, Mauceri A, Maisano M, Bernabó I, Giannetto A, De Domenico E, Corapi B, Tripepi S, Fasulo S. 2011. Ultrastructural and immunohistochemical investigation on the gills of the teleost,

- Thalassoma pavo* L., exposed to cadmium. *Acta histochemica*, 113: 201–213.
- Butler A. 2000. Nervous System. En: Ostrander, G.; Hopkins, J.; Baltimore, MD (Eds). *The Laboratory Fish. Part 3: Gross Functional Anatomy*. Academic Press. USA. p. 331-345.
 - Caldas ML, Ricaurte O, Rodríguez G, Amaya J. 1993. *Microscopia óptica de alta resolución*: Instituto Nacional de Salud. 1 Ed. Bogota D.C, p.
 - Camargo MM, Martínez CB. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5 :327-336,
 - Carmo VL, Martínez CB. 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 147: 222–231.
 - Casas D. 2008. *Sistemas de Recirculación de Agua para la cría intensiva da Cachama Blanca (Piaractus brachypomus)*. Decanato de Agronomía. Universidad Centro-occidental Lisandro Alvarado. Cabudare-Venezuela. 3-97.
 - Castañeda DC. 2012. Descripción de las vías olfativas (roseta – bulbo olfativo) y evaluación de los efectos histopatológicos causados por el Roundup Activo® sobre el sistema olfativo de alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Tesis de pregrado biología Aplicada. Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Militar Nueva Granada.
 - Cengiz El. 2006. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22: 200–204.
 - Chami A, Parto P, Bahmani M, Kazemi R. 2010. Morphological and Histological Study of Kidney in Juvenile Great Sturgeon (*Huso huso*) and Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, 7: 505-511.
 - Christy SL, Karlander EP, Parochetti JV. 1981. Effects of glyphosate on the growth rate of *Chlorella*. *Weed Science*, 29: 5–7.
 - Coggeshall RE, Pover CM, Fitzgerald M. 1994. Dorsal root ganglion cell death and surviving cell numbers in relation to the development of sensory innervation in the rat hindlimb. *Developmental Brain Research*, 82:193-212.
 - Contardo-Jara V, Klingelmann E, Wiegand C. 2009. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*, 157: 57–63.
 - Cox C. 1995. Glyphosate, Part 2: Human exposure and ecological effects. En: *Journal of Pesticides Reform, Volume 15, Number 4*. USA. 14p.
 - Cox C. 2000. Glyphosate fact sheet part 2 of 2. *Journal Pest Reform*. 108, www.mindfully.org/pesticides/Roundup-Glyphosate-factsheet-Cox2.html.



- Díaz BM. 2009. Efecto del GP en Colombia, una visión desde la academia. XVI congreso Argentino de toxicología. Puerto Madryn, Patagonia, Argentina.
- Dinehart SK, Smith LM, McMurrya ST, Smith NP, Anderson TA, Haukos DA. 2010. Acute and chronic toxicity of Roundup Weathermax® and Ignite® 280 SL to larval *Spea multiplicata* and *S. bombifrons* from the Southern High Plains. *Environmental Pollution*, 158: 2610-2617.
- Dinham B. 1999. Resistance to glyphosate. The Pesticides Trust. PAN-Europe. London, UK.
- Eide AL, Glover, JC. 1997. Developmental dynamics of functionally specific primary sensory afferent projections in the chicken embryo. *Anatomy and Embriology*, 195: 237-250.
- Eslava P.R, Ramírez W.F, Rondón I.S. 2007. Sobre los efectos del GP y sus mezclas: impacto en peces nativos. Grupo de sanidad de peces Instituto de acuicultura de los Llanos, Universidad de los Llanos. p 15-72. Meta, Colombia.
- Ferguson HW, 2006. Systemic pathology of fish. A text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease, second ed. Scotian Press. p. 36-37.
- Flaño E, Lopez-Fierro P, Rasquin BE, Villena A. 1996. *In vitro* differentiation of eosinophilic granular cells in *Renibacterium salmoninarum* -infected gill cultures from rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, 6:173-184.
- Flores CQ. 2002. Respuestas neuroendócrinas al estrés en peces teleósteos. *Revista de Ictiología*, 10: 57-78.
- Flores CQ. 2009. Células cloro en peces teleósteos. *Revista Veterinaria*, 20: 57-60.
- Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. 2000. Apoptosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of Cellular Physiology*, 182: 41 – 49.
- Giesy JP, Dobson S, Solomon KR. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167: 35-120.
- Gluszcak L, Dos Santos DM, Silveira BM, Rodrigues RS, Chitolina RS, Morsch VM, Loro VL. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 519-524.
- Gómez E, Tovar MO, Obando MJ, Hurtado H. 2010. Estudio histológico del tracto digestivo del pez tiburoncito *Ariopsis seemanni*. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 6: 216-225
- Gomez L, Masot J, Soler F, Duran E, Roncero V. 1998. Structural and ultrastructural study of the gills of tench (*Tinca tinca* L.) after experimental poisoning with copper sulphate. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149: 387-394.
- Gonzales RA. 2001. El cultivo de la Cachama. En: Rodríguez HG, Daza PV, Carrillo MA (Editores). *Fundamentos de Acuicultura*. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). Bogotá D.C, Colombia, p. 329-

- Greaves P. 2007. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies. Ed. Elsevier. Third edition. San Diego. USA. 960p.
- Helfman GS, Collette BB, Facey DE. 1997. The diversity of fishes. Blackwell Science, Inc. Malden, Massachusetts, USA. 528p.
- Hinton DE, Segner H, Braunbeck T. 2001. Toxic responses of the liver. En: Schlenk D and Benson WH (eds.). Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts. Taylor and Francis Ed. London, p. 224–68.
- Holland JW, Rowley AF. 1998. Studies on the eosinophilic granule cells in the gills of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 120: 321–328
- Hu P, McLachlan EM. 2003. Selective reactions of cutaneous and muscle afferent neurons to peripheral nerve transection in rats. The Journal of Neuroscience, 23: 10559–10567.
- Image J. 2011. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Ito N, Sugawara K, Bodo E, Takigawa M, Van Beek N, Ito T, Paus R. 2010. Corticotropin-releasing hormone stimulates the in situ generation of mast cells from precursors in the human hair follicle mesenchyme. Journal of Investigative Dermatology, 130: 995–1004
- Jackman A, Fitzgerald M. 2000. Development of peripheral hindlimb and central spinal cord innervation by subpoblations of dorsal root ganglion cells in the embryonic rat. Journal of Comparative Neurology, 418: 281–298.
- Jamieson SM, Liu JJ, Connor B, Dragunow M, McKeage MJ. 2007. Nucleolar enlargement, nuclear eccentricity and altered cell body immunostaining characteristics of large-sized sensory neurons following treatment of rats with paclitaxel. Neurotoxicology, 28:1092-8.
- Jamieson SMF, Liu J, Hsu T, Baguley BC, McKeage MJ. 2003. Paclitaxel induces nucleolar enlargement in dorsal root ganglion neurons in vivo reducing oxaliplatin toxicity. British Journal of Cancer, 88:1942–7.
- Jaramillo J, Gómez-Ramírez E, Caldas ML, Rodríguez D, Hurtado H. 2009. Histology and morphometry of dorsal root ganglia and their neurons in a fish of indeterminate growth the white Cachama (*Piaractus brachypomus*). Actualidades Biológicas, 31: 43-52.
- Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grams S, Pokethitiyook P. 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Environmental Toxicology, 18: 260–267.
- Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grams S, Pokethitiyook P. 2002. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Science Asia, 28: 121-127
- Kaczmar AG. 2010. Cholinesterases (ChEs) and the cholinergic system in ontogenesis and phylogenesis, and non-classical roles of cholinesterases - a review. Chemico-Biological Interactions, 87:34-43.
- Khangarot BS. 2003. Mercury-induced morphological changes in the respiratory surface of an Asian freshwater catfish *Saccobranchus fossilis*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 70: 705–712.

- Kitao Y, Robertson B, Kudo M, Grant G. 2002. Proliferation patterns of dorsal root ganglion neurons of cutaneous, muscle and visceral nerves in the rat. *Journal of Neurocytology* 31: 765–776.
- Kreutz LC, Gil Barcellos LJ, Valle LF, Oliveira TS, Anziliero D, Dos Santos DV, Pivato M, Zanatta R. 2011. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish & Shellfish Immunology* 30: 51-57.
- Kuniyoshi K, Ohtori S, Ochiai N, Murata R, Matsudo T, Yamada T, Ochiai SS, Moriya H, Takahashi K. 2007. Characteristics of sensory DRG neurons innervating the wrist joint in rats. *European Journal of Pain*, 11: 323–328.
- Kurokawa T, Suzuki T. 1996. Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 141: 267–76.
- Lamas J, Santos Y, Bruno DW, Toranzo AE, Anadón R. 1994. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *Journal of Fish Biology*, 45: 839-854.
- Laurent P, Perry SF. 1990. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Research*, 259: 429-442.
- Lawson SN, Waddell PJ. 1991. Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *Journal Physiology*, 435: 41-63.
- Lawson SN. 1992. Morphological and biochemical cell types of sensory neurons. En: Scott SA, editor. *Sensory Neurons: Diversity, development, and plasticity*. New York: Oxford University Press. p 27-52.
- Lekan HA, Chung K, Yoon YW, Chung QJ, Coggeshall RE. 1997. Loss of dorsal root ganglion cells concomitant with dorsal root axon sprouting following segmental nerve lesions. *Neuroscience*, 81: 527–534.
- Li L, Xiea P, Chena J. 2007. Biochemical and ultrastructural changes of the liver and kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic *Microcystis* blooms in Taihu Lake, China, *Toxicol*, 49:1042–1053.
- Li XY, Chung IK, Kim JI, Lee JA. 2004. Subchronic oral toxicity of microcystin in common carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicol* 44: 821–827.
- Lin H, Randall D. 1995. Proton pumps in fish gills. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P. Eds, *Fish Physiology*. New York: Academic Press, pp. 229-255.
- Lukin A, Sharova J, Belicheva L, Camus L. 2011. Assessment of fish health status in the Pechora River: Effects of contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 355–365.
- Marc J, Breton ML, Cormier P, Morales J, Belle R, Mulner-Lorillon O. 2005. A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. *Toxicology and applied pharmacology*, 203: 1-8.
- Marc J, Mulner-Lorillon O, Bellé R. 2004. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biology of the Cell*, 96: 245-9.

- Martínez CB, Nagae MY, Zaia TB, Zaia DA, 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Brazilian Journal of Biology*, 64:797–807.
- Martínez M, Quiroga NY, Castellanos JE, Hurtado H. 1999. Estandarización de una técnica de doble inmunodetección para virus de la rabia y neuropéptidos en cultivos de ganglio de raíz dorsal de ratón adulto. *Biomédica VI Encuentro Científico. I.N.S. Resúmenes* 19:150.
- Martínez M, Quiroga NY, Castellanos JE, Hurtado H. 2000. Subpoblaciones neurales presentes en el ganglio de la raíz dorsal. *Biomédica*, 20:248-260.
- Matey V, Richards JG, Wang Y, Wood CM, Rogers J, Davies R, Murray BW, Chen XQ, Du J, Brauner CJ. 2008. The effect of hypoxia on gill morphology and ionoregulatory status in the Lake Qinghai scaleless carp, *Gymnocypris przewalskii*. *The Journal of Experimental Biology*, 211: 1063–1074.
- Matsuyama T, Iida T. 2001. Influence of tilapia mast cell lysate on vascular permeability. *Fish & Shellfish Immunology*, 11: 549–556.
- Matsuyama T, Iida T. 2002: Tilapia mast cell lysates enhance neutrophil adhesion to cultured vascular endothelial cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 13: 243–250
- McWilliams P, Payne G. 2001. Bioaccumulation potential of surfactants: a review. Presented at Chemistry in the Oil Industry VII, Royal Society of Chemistry & EOSCA, Manchester.
- Mela M, Randi MA, Ventura DF, Carvalho CE, Pelletier E, Oliveira Ribeiro CA. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 68: 426-435.
- Mercado B, García J, Rosado R, Olaya C, Segura F, Bru S, Tornecilla G. 2006. Cultivo de dorada (*Brycon sinuensis*, Dahl, 1955) en jaulas flotantes a diferentes niveles de proteína. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19: 204-211.
- Modesto KA, Martínez CB. 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81: 781–787
- Mondragón AM. 2012. Manejo y seguimiento de sistemas cerrados de recirculación diseñados a mínimo costo para cultivos de bagre tigrilo (*Pimelodus pictus*) y cachama blanca (*Piaractus brachipomus*). Universidad Militar Nueva Granada.
- MONSANTO.2011.http://www.monsantoandino.com/productos/agroquimicos/no_selectivos/roundup_activo.asp.
- Morgan J, Vigers G, Farrell A, Janz D, Manville J. 1991. Acute avoidance reactions and behavioral responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Garlon 40, Garlon 3A0 and Vision0 herbicides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10: 73-79.
- Namaka MP, Sawchuk M, MacDonald SC, Jordan LM, Hochman S. 2001. Neurogenesis in postnatal mouse dorsal root ganglia. *Experimental Neurology*, 172: 60-69.

- Neskovic NK, Poleksic V, Elezovic I, Karan V, Budimir M. 1996. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 56: 295-302.
- Nivia E. 2001. Las fumigaciones aéreas sobre cultivos ilícitos sí son peligrosas Algunas aproximaciones. Instituto Hemisférico de las Américas. Universidad de California, Davis.
- Obando MJ. 2006. Estudio morfométrico y anatómico del cerebro del pez Neón cardenal, *Paracheirodon axelrodi* (Characiformes: Characidae). Tesis de pregrado biología Aplicada. Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Militar Nueva Granada.
- Kishi M, Tanabe J, Schmelzer JD, Low PA. 2002. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. Diabetes, 51:819-824.
- Koca S, Koca BY, Yildiz Ş, Gürcü B. 2008. Genotoxic and Histopathological Effects of Water Pollution on Two Fish Species, *Barbus capito pectoralis* and *Chondrostoma nasus* in the Büyük Menderes River, Turkey. Biological Trace Element Research, 122: 276–291.
- Olaleye VF, Akinyemiju OA. 1996. Effect of a Glyphosate (N-(Phosphonomethyl) glycine) Application to Control *Eichhornia crassipes* Mart. on Fish Composition and Abundance in Abiala Creek, Niger Delta, Nigeria. Journal of Environmental Management, 47: 115–122.
- Olaya CM, Ovalle C, Gómez E, Rodríguez D, Caldas ML, Hurtado H. 2007. Histología y morfometría del sistema digestivo del Silúrido bagre tigrillo (*Pimelodus pictus*). Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 54: 311-23.
- Oldham J, Massey R, Cryan P. 2002. Aerial spraying in Colombia: and environmental effects. The Institute for Science & Interdisciplinary Studies. Fact Sheet, 4 .
- Oliveira AG, Telles LF, Hess RA, Mahecha GB, Oliveira CA. 2007. Effects of the herbicide Roundup on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*. Reproductive Toxicology 23: 182–191.
- Oliveira AL. 2001. Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 34: 375-380.
- Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevet D, Kuan CY, Rakic P. 2001. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. Journal of Neuroscience, 21: 4752– 4760.
- Ostrow M. 1995. Goldfish. 2 ed. Barron's Educational Series, Inc.
- Pacheco M, Santos MA. 2002. Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety, 53: 331-347.
- Paz-y-Miño C, Sánchez ME, Arévalo M, Muñoz MJ, Witte T, Oleas De-la-Carrera G, Leone PE. 2007. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. Genetics and Molecular Biology, 30: 456-460.

- Pei-Chin L, Chien-Hui L. 2005. Cell cycle specific induction of apoptosis and necrosis by paclitaxel in the leukemic U937 cells. *Life Sciences*, 76: 1623–1639.
- Peluso M, Munnia A, Bolognesi C, Parodl S. 1998. 32P-postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31: 55–9.
- Penry DL. 1998. Applications of efficiency measurements in bioaccumulation studies: definitions, clarifications, and a critique of methods. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 17: 1633–1639.
- Pérez A, Nash O, Chu-Ko F, Mori L. 2009. Crecimiento, Conversión Alimenticia y Sobrevivencia de Paco (*Piaractus brachypomus*) cultivado en Estanques con y sin revestimiento de Geomembranas en la Amazonia Peruana. *Piscicultura. Biología de las Poblaciones de Peces Amazónicos y Piscicultura. II Coloquio de la Red de Investigaciones sobre la Ictiofauna Amazónica (RIIA)*, 151-158.
- Pérez R, Castellanos JE, Torres A, Hurtado H. 1999. Microscopia electrónica de cultivos de ganglio de la ratones adultos infectados por el virus de la rabia. *Biomédica VI Encuentro Científico I.N.S. Resúmenes* 19:150-151.
- Perry SF. 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annual Review of Physiology*, 59: 325–347.
- Pineda R. 1999. Elaboración y evaluación de dietas a partir de harinas de barrilete (*Euthynnus lineatus*) y rasposa (*Haemulon maculiconda*) como alimento de bagre (*Letalurus punctatus*) en condiciones de laboratorio. Tesis de maestría. Universidad de colima. México, p: 20-22
- Poleo G, Aranbarrio J, Mendoza L, Romeo O. 2011. Cultivo de Cachama blanca en altas densidades y en dos sistemas cerrados. Universidad Centro occidental Lisandro Alvarado. Estación de Piscicultura. Barquisimient- Venezuela. *Pesquisa Agropecuária Brasileria*, 46: 429-437.
- Postma TJ, Vermorken JB, Liefiting AJM, Pinedo HM, Heimans JJ. 1995. Paclitaxel induced neuropathy. *Annals Oncology*, 6: 489–94.
- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabaib VL, 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death?. *Experimental Cell Research* 283: 1–16.
- R Project for Statistical Computing. 2011. <http://www.r-project.org>.
- Ramirez WD, Rondón IB, Vidal HB, Eslava PM. Toxicidad aguda y lesiones histopatológicas en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) expuestas a la mezcla de herbicida Roundup® más surfactante cosmoflux® 411F. 2009. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Córdoba*, 14: 1563-1575.
- Ramírez WF, Rondón IS, Eslava PR. 2003. Efectos del glifosato (GP) con énfasis en organismos acuáticos (revisión de literatura). *Revista Orinoquia*, 2: 70-100
- Ramírez-Duarte WF, Eslava-Mocha PR. 2009. Efectos de la exposición crónica a GP y surfactante Cosmoflux® 411F en Cachama blanca. *Memorias XV Jornada de Acuicultura. Villavicencio. Colombia*. 46-50 p.

- Ramírez-Duarte WF, Rondón-Barragán IS, Vidal HH, Eslava-Mocha PE. 2004. Toxicidad del Roundup en Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), concentración letal 50, observaciones clínicas y lesiones asociadas. En: Memorias del II Congreso Colombiano de Acuicultura. X jornada de Acuicultura IALL. Retos frente a la globalización de mercados, 27-29 de Octubre de 2004. Universidad de los Llanos. Villavicencio. Colombia. 142-144p.
- Randi AS, Monserrat JM, Rodríguez EM, Romano LA. 1996. Histological effects of cadmium on the gills of the fresh water fish, *Macropsobrycon Uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). *Journal of Fish Diseases*, 19: 311-22.
- Rebaza C, Vallafana E, Rebaza M, Deza S. 2002. Influencia de tres densidades de siembra en el crecimiento de *Piaractus brachypomus* "Paco" en segunda fase de alevinaje en estanques seminaturales. *Folia Amazónica*, 13: 1-2.
- Reite OB, Evensen Ø. 2006. Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 192-208.
- Reite OB. 1997. Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. *Fish & Shellfish Immunology*, 7: 567-584.
- Reite OB. 1998. Mast cells/eosinophilic granule cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional response. *Fish & Shellfish Immunology*, 8: 489-513.
- Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini GE. 2005. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, 113: 716-720.
- Rondón-Barragán IS, Ramírez-Duarte WF, Eslava-Mocha PE. 2007. Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux® 411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20: 431-446.
- Rudnicki CAM, Melo GC, Donatti L, Kawall HG, Fanta E. 2009. Gills of juvenile fish *Piaractus mesopotamicus* as histological biomarkers for experimental sublethal contamination with the organophosphorus azodrin® 400. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 1431-1441.
- Salazar M, Ocampo D. 2002. Tasa de crecimiento del pez ángel *Pterophyllum scalare* (Perciformes: Chichlidae) en condiciones de laboratorio. *Acta universitaria*, 12: 28-33
- Salazar-Lugo R, Mata C, Oliveros A, Rojas LM, Lemus M, Rojas-Villaruel. 2011. Histopathological changes in gill, liver and kidney of neotropical fish *Colossoma macropomun* exposed to paraquat at different temperatures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31: 490-495.
- Sghirlanzoni A, Pareyson D, Lauria G. 2005. Sensory neuron diseases. *The Lancet Neurology*, 4: 349-61.

- Shiogiri NS, Paulino MG, Carraschi SP, Baraldi FG, Da Cruz C, Fernandes MN. 2012. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34: 388–396.
- Soso AB, Gil-Barcellos LJ, Ranzani-Paiva MJ, Kreutz LC, Quevedo RM, Anziliero D, Lim M, Bolognesi da Silva L, Ritter F, Calliari BA, Finco JA. 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female *Jundia (Rhamdia quelen)*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 308–313.
- Stock D, Holloway PJ. 1993. Possible mechanisms for surfactant-induced foliar uptake of agrochemicals. *Journal of Pest Science*, 38: 165–177.
- Szarek J, Siwicki A, Andrzejewska A, Terech-Majewska E, Banaszkiwicz T. 2000. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Environmental Research*, 50: 263–266.
- Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. 2012. Mast cells and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1822: 21–33.
- Theoharides TC, Donelan JM, Papadopoulou N, Cao J, Kempuraj D, Conti P. 2004. Mast cells as targets of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25: 563–568.
- Thophon S, Kruatrachue M, Upathan ES, Pokethitiyook P, Sahaphong S, Jarikhuan S. 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 121: 307–320.
- Tsui TK, Chu LM. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52: 1189–1197.
- Vásquez W. 2004. Principios de nutrición aplicada al cultivo de peces. Universidad de los Llanos. p 64.
- Velmurugan B, Mathews T, Cengiz EI. 2009. Histopathological effects of cypermethrin on gill, liver and kidney of fresh water fish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and recovery after exposure. *Environmental Technology*, 30: 1453–1460.
- Walsh LP, McCormick C, Martin C, Stocco DM. 2000. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ Health Perspectives*, 108:769–76.
- WHO. 1994. Environmental health criteria: glyphosate. World Health Organization, Geneva.
- Williams GM, Kroes R, Munro IC. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31: 117–165.
- Wolf JC, Wolfe MJ. 2005. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology*, 33: 75–85.

- Wullimann MF, Rupp B, Reichert H. 1996. Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: A Topological Atlas. Birkhäuser Verlag ed. Basel, Switzerland.
- Young C, Roth KA, Klocke BJ, West T, Holtzman DM, Labruyere J, Qin YQ, Dikranian K, Olney JW. 2005. Role of caspase-3 in ethanol-induced developmental neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, 20: 608-614.
- Zar JH. 2006. Biostatistical analysis. Pearson Education. 5 editions. New Jersey. USA. 944p.