

UCH-FC
D. Ambiental
278
C.1



EVALUACION DE EFECTOS TERATOGENICOS DE FUNGICIDAS MEDIANTE BIOENSAYOS CON PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*).

Seminario de Título

Entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

BIÓLOGO CON MENCIÓN EN MEDIO AMBIENTE.



por

Javiera Fernanda De la Paz Montt

Director de Seminario de Título: Dr Miguel Allende C.
Co-director: Ms. Ximena Molina P.

Diciembre, 2009
Santiago - Chile



EVALUACIÓN DE EFECTOS TERATOGÉNICOS DE FUNGICIDAS MEDIANTE BIOENSAYOS CON PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*).

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile, en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de

BIÓLOGO AMBIENTAL.

JAVIERA FERNANDA DE LA PAZ MONTT

Dr. Miguel Allende Connolly
Director Seminario de Título

M.Sc. Ximena Molina
Co-Directora



Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Juan Fernández H.
Presidente Comisión

M.Sc. Sylvia Copaja C.
Corrector

Santiago de Chile, Diciembre del 2009



BIOGRAFÍA



Llegué a este mundo justo a tiempo para dejar atrás el año 1983, el día 30 de Diciembre, en la ciudad de Santiago. Evento que se relaciona estrechamente con mi amor por el periodo de fin de año. Crecí junto a mi familia en la comuna de la Florida dónde aprendí, jugué y conocí a mis mejores amigas.

Complete la enseñanza básica en el colegio Divina Pastora, donde decidí no ser católica y la enseñanza media la pasé sumando amigas y amigos en distintos colegios que me enseñaron sobre la diversidad y el valor de distintas cosas. Durante la época del colegio muy temprano nació en mí una hermosa curiosidad por la naturaleza que fue creciendo con los años y me hizo decidir que debía dedicarme a estudiarla, curiosidad que se enfocó en gran parte en el misterio de la formación de nuevos seres vivos. Así, al tratar de experimentar con esto obtuve el año 1999 a mi propio cachorro de humano, mi hermoso hijo Marcos.

El año 2003 logré ingresar a la Universidad de Chile, para estudiar Biología Ambiental y maravillarme aún más con la hermosa complejidad de esta Tierra. En segundo año de mi carrera decidí entrar a aprender más al laboratorio de Biología del desarrollo del Dr. Miguel Allende, lugar en que me acogieron como una más de la casa y tanto me gustó que me mantengo allí hasta el día de hoy. Obtuve el grado de Licenciada en Cs. Ambientales con mención en Biología el año 2008, año en que también descubrí al padre de mis futuros hijos.

DEDICATORIA



A mi hijo Marcos, por darme sentido y razón...



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por su amor y compañía, por apoyarme e impulsarme en todos mis logros y ayudarme en mis caídas. A mis padres por permitirme realizar este sueño y a mis hermanas por quererme como soy, a la Monse por su guía y a la Coté porque sin su ayuda no hubiese podido lograrlo. A mi abuela Alicia por ser mi gran amiga, a la Juani por cuidarme a mí y a mi hijo. Al Ivan por creer en mí y ser el hermano que nunca tuve.

A mis amigas Maca y Eileen por estar ahí, escucharme, aconsejarme y quererme, a la Marioli por ser mi copiloto en todo el camino.

Al Dr. Juan Fernández por su ayuda, consejos e inspiración,

A mi tutor Miguel Allende por apoyar mis ideas y confiar en mí; a mis amigos y compañeros del lab por enseñarme, aceptarme y hacer grato el día a día. A la Carmen por enseñarme a usar la pipeta, al Undu por alegrarme y cuidarme, al Pedro por sus respuestas y confianza, a la Vivi por hacerme sentir siempre joven, a la Rosario por exorcizarme, a Claudia y Cata por su ternura, al Leo por su humor, a la Luisa por ser la mejor primera dama, al Floro por toda su ayuda, a Juanito por los quequitos, y a todos los demás pasados y presentes por mantener y hacer crecer esta gran familia, la Cami, el Oscar, el Darko, Esteban, el Polo, Andrés y la Vivi N.

A mi compañero de vida Luis Guzmán, por mostrarme el futuro por el cual quiero luchar y apoyarme en esta etapa final, la más importante de mi carrera. Por aguantarme y darme su amor incondicional día a día.

INDICE DE CONTENIDOS



BIOGRAFÍA.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE DE CONTENIDOS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCION.....	1
1.1 Efectos ambientales del uso de pesticidas.....	1
1.2 El concepto de calidad de aguas y la legislación chilena.....	1
1.3 Pesticidas derivados de triazoles.....	4
1.3.1 Triadimefón y Triadimenol: usos y mecanismo de acción fungistática.....	5
1.3.2 Triadimefón y Triadimenol: Toxicidad y mecanismo de acción teratogénica.....	6
1.4 Factores incidentes en la toxicidad y evaluación de contaminantes acuáticos.....	7
1.5 Ventajas del pez cebra (<i>Danio rerio</i>) como modelo.....	7
1.6 Tejidos derivados de las Crestas Neurales	8
1.7 Desarrollo de la Línea Lateral en el pez cebra.....	9

II. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivo general.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
III. MATERIALES Y METODOS.....	12
3.1 Determinación de los LC ₅₀ y CI ₅₀ para triazoles y Citral. Aplicación del Fish Embryo Toxicity Test (Test FET).....	12
3.2 Análisis de supervivencia: Análisis Probit.	12
3.3 Cálculo de las concentraciones bajas, medias y altas de exposición Aplicación de factores de seguridad.....	13
3.4 Detección de muerte celular.....	13
3.5 Tinción de cartílago.....	13
3.6 Bioensayos con organismos transgénicos.....	14
IV. RESULTADOS.....	16
4.1 Alteraciones causadas por la exposición a triazoles y Citral durante la embriogénesis.....	16
4.2 Concentración letal media a las 96 horas (LC ₅₀ 96 h) y calculo de concentraciones límite para FON, NOL, 1,2,4-T y Citral, según la normativa chilena.....	18
4.3 Concentraciones medias que inhiben la eclosión a las 96 horas (CI ₅₀ 96 h)	21
4.4 Detección de muerte celular.....	22
4.5 Efectos sobre el desarrollo craneofacial.....	24
4.5.1 Bioensayos con organismos silvestres (WT).....	24
4.5.2 Bioensayos con organismos transgénicos.....	25
4.6 Efectos sobre el desarrollo del Sistema Nervioso Periférico	30



4.7 Citral.....	34
4.7.1 Alteración del desarrollo de la Línea Lateral posterior (LLp) del pez cebra.....	34
4.7.2 Teratogénesis, duplicación de la cola.....	35
4.8 Efecto sinérgico en mezclas de triazoles y sus productos de degradación.....	36
V. DISCUSIÓN.....	39
5.1 Alteraciones morfológicas.....	41
5.2 Letalidad e inhibición de la eclosión.....	42
5.3 Aumento de muerte celular.....	43
5.4 Malformaciones del esqueleto craneofacial.....	45
5.5 Efectos sobre el Sistema Nervioso Periférico.....	46
5.6 Efectos en derivados de las Crestas Neurales.....	47
5.7 Citral interrumpe el desarrollo de la Línea Lateral posterior y produce duplicación de la cola en el pez cebra.....	48
5.8 Sinergia y factores de seguridad de la Nch 1333 Of. 1978.....	49
VI. CONCLUSIONES.....	52
VII. REFERENCIAS.....	54
VIII. ANEXOS.....	59
Anexo A: Información y propiedades fisicoquímicas de los compuestos ensayados	60
Anexo B: Datos obtenidos en el Análisis Probit.....	62



INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resultados del análisis estadístico de los datos de bioensayos, determinación de LC ₅₀ 96 h para embriones y larvas.....	19
Tabla 2: Resultado de la aplicación de factores de seguridad sobre los LC ₅₀ 96 h, según la Nch 1333 Of. 1978.....	20
Tabla 3: Resultados del análisis estadístico de los datos de bioensayos, determinación Cl ₅₀ 96 h para embriones y larvas.....	21
Tabla 4: Porcentaje de individuos con malformaciones del esqueleto craneofacial tras la exposición a triazoles y Citral.....	26
Tabla 5: Número de neuromastos de la LLp depositados en larvas de 3 dpf expuestas a Citral durante la embriogénesis.....	35





INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química y secuencia de productos en la degradación de FON.....	5
Figura 2: Estructura química del Citral.....	7
Figura 3: Esquema representativo de un embrión de pez cebra de 35 hpf.....	8
Figura 4: Apariencia de larvas expuestas a concentraciones altas de triazoles y Citral desde blástulas por 96 horas.....	17
Figura 5: Hipopigmentación en la epidermis de larvas de 40 hpf expuestas a 1,2,4-T.....	17
Figura 6: Hipopigmentación en la vesícula ocular de larvas de 3 dpf expuestas durante la embriogénesis a una alta concentración de Triazol libre.....	18
Figura 7: Aumento de muerte celular en embriones silvestres (WT) de 24 hpf expuestos a 1,2,4-T.....	22
Figura 8: Aumento de muerte celular en embriones silvestres (WT) de 24 hpf expuestos a concentraciones bajas de FON, NOL, Citral y media de 1,2,4-T.....	23
Figura 9: Esquema de la anatomía de los arcos faríngeos (AF), esqueleto mandibular y neurocráneo en larvas WT de pez cebra.....	24
Figura 10: Cartílago craneofacial de larvas de 7dpf expuestas a FON.....	25
Figura 11: Cartílago craneofacial de larvas de 5 dpf expuestas a 1,2,4-T.....	25
Figura 12: Larvas de 5 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestas a	



FON durante la embriogénesis.....	26
Figura 13: Larvas de 5 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestas a NOL durante la embriogénesis.....	27
Figura 14: Larvas de 7 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestas a 1,2,4-T durante la embriogénesis.....	28
Figura 15: Embriones de 1 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestos a Citral desde blástulas.....	28
Figura 16: Larvas de 3 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestas a Citral durante la embriogénesis.....	29
Figura 17: Larvas de 5 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestas a Citral durante la embriogénesis.....	30
Figura 18: Embriones de 42 hpf de la línea transgénica FoxD3::GFP expuestas a FON durante la embriogénesis.....	31
Figura 19: Larvas de 42 hpf de la línea transgénica FoxD3::GFP expuestas a 1,2,4-T durante la embriogénesis.....	32
Figura 20: Larvas de 4 dpf de la línea transgénica FoxD3::GFP expuestas a 1,2,4-T durante la embriogénesis.....	33
Figura 21: Larvas de 3 dpf de la línea transgénica CldnB::GFP expuestas una concentración alta de Citral durante la embriogénesis.....	34
Figura 22: Duplicación de cola en larvas silvestres de 6 dpf expuestas a Citral durante la embriogénesis.....	35
Figura 23: Aumento de muerte celular en larvas WT de 24 hpf expuestas a una	

mezcla de triazoles.....36

Figura 24: Aumento de muerte celular en larvas WT de 48 hpf expuestas a una mezcla binaria de FON y 1,2,4-T.....37

Figura 25: Larvas de 5 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestas a una mezcla de triazoles durante la embriogénesis y hasta los 4 dpf.....38



LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

1,2,4-T :	1,2,4-Triazol
AF :	Arcos Faringeos
CN:	Crestas Neurales
CNC :	Crestas Neurales Craneales
CNT:	Crestas Neurales Troncales
COPs:	Compuestos Orgánicos Persistentes
dexp:	Días de exposición
dpf :	Días post fertilización
CI ₅₀ :	Concentración media de Inhibición
FON :	Triadimefon
GFP :	Proteína Fluorescente Verde (Green Fluorescent Protein)
hexp:	Horas de exposición
hpf :	Horas post fertilización
INN :	Instituto Nacional de Normalización
ISO:	Organización Internacional para la Estandarización
LC ₅₀ :	Concentración Letal Media
LLp :	Línea Lateral posterior
LTm96 :	Límite de tolerancia máximo 96 Horas
NOL :	Triadimenol
OECD:	Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo
PNEC :	Concentración sin efectos negativos predecibles (Predicted No Effect Concentration)
RA :	Ácido retinoico
SAG:	Servicio Agrícola y Ganadero.
SNP :	Sistema Nervioso Periférico
USEPA :	U.S. Environmental Protection Agency
WT :	Wild Type, línea de peces silvestres.

RESUMEN

La contaminación de cuerpos de agua con pesticidas y sus productos de degradación es un problema poco estudiado en nuestro país. Actualmente en Chile, no existe legislación que proteja a los ecosistemas acuáticos de la contaminación producida por sustancias tóxicas como pesticidas, farmacos u otros productos de la industria química.

Si bien la Norma chilena oficial 1.333 (Nch 1333 Of.1978) del Instituto Nacional de Normalización (INN) determina las concentraciones máximas de sustancias tóxicas que se permiten en las aguas destinadas a la vida acuática, entre otros usos, este valor se calcula aplicando factores de seguridad (factores de dilución) sobre el Limite de Tolerancia máximo a las 96 h (LTm96¹), determinado a partir de bioensayos.

En este estudio, mediante bioensayos con peces cebra (*Danio rerio*) transgénicos en etapas tempranas del desarrollo, se determinaron los efectos embriotóxicos y teratogénicos de cuatro compuestos químicos: dos fungicidas derivados del triazol, Triadimefón (FON), Triadimenol (NOL), del último producto de degradación de toda esta familia química (Triazol libre, 1,2,4-T), y Citral, un aromatizante utilizado en la industria alimenticia y farmacológica. A través de bioensayos agudos de letalidad se determinaron tres concentraciones de exposición para cada compuesto: una alta, equivalente al LC₅₀ 96 h, una media, determinada aplicando un factor de seguridad 10 veces menor que la LC₅₀ (LC₅₀ 96 h/10) y una concentración baja, 100 veces menor (LC₅₀ 96 h/100). Luego, a partir de lo anterior, se evaluó la efectividad de la aplicación

¹ Según la Nch 1333 Of.1978, LTm96 = mediana del límite de tolerancia: concentración del material en ensayo en un diluyente adecuado, en la cual sobrevive el 50% de los organismos acuáticos de prueba al cabo de un periodo de exposición de 96 h. Así, el LTm96 es equivalente al LC₅₀ 96 h.

de dichos factores de seguridad como método para determinar concentraciones de sustancias tóxicas que permitan la subsistencia de los organismos acuáticos.

Se encontró que existe una relación entre el estadio de desarrollo de los individuos y la sensibilidad a los distintos compuestos, siendo los embriones mas sensibles que las larvas a los efectos letales y a la inhibición de la eclosión tras la exposición a 1,2,4-T, mientras que la sensibilidad para estos efectos ante la exposición a Citral fue mayor para las larvas. Para todos los compuestos ensayados, los individuos expuestos durante la embriogénesis fueron sensibles a teratogénesis, manifestada como: defectos en el desarrollo craneofacial inducidos por FON, NOL, 1,2,4-T y Citral; interrupción de desarrollo de la línea lateral posterior (LLp) y duplicación de la cola causada por Citral; alteraciones en la expresión génica en las células de Schwann que recubren al nervio de la LLp, y alteración en la organización y cantidad de células pigmentarias en el caso de FON y 1,2,4-T.

Tras la aplicación de los factores de seguridad FON, NOL, y Citral, mantuvieron sus efectos negativos sobre los individuos expuestos durante la embriogénesis, aunque en un porcentaje muy bajo (aproximadamente el 4% de los individuos), efectos evidenciados por la alteración del desarrollo de la mandíbula y de los arcos branquiales para los tres compuestos. Además la exposición de embriones a una mezcla de derivados del triazol y Triazol libre, en las concentraciones presumidas como permisibles por la normativa chilena, ejercieron una clara sinergia, provocando efectos teratogénicos en una proporción mucho mayor que en los individuos control.

ABSTRACT

Pollution of water bodies with pesticides and their degradation products is a serious problem in our country that remains poorly studied. Currently, in Chile there is a lack of legislation aimed at protecting the aquatic ecosystems from contamination associated with toxic substances such as pesticides, pharmaceutical compounds and other products of the chemical industry.

The official Chilean standard, number 1.333 from the Instituto Nacional de Normalización (INN), provides guidelines on the maximum load of toxic substances allowed in bodies of water that sustain aquatic life, among other uses. However, these values have been calculated applying "security factors" (dilution factors) set at the 96 h Maximum Limit of Tolerance (LTm96 h), which is determined through bioassays.

In this study, using bioassays based on transgenic zebrafish lines at early developmental stages, the embryotoxic and teratogenic effects for four chemical compounds were determined. These were: two triazole derivative fungicides, Triadimefón (FON) and Triadimenol (NOL); the final degradation product of this entire chemical family, Free Triazole (1,2,4-T); and Citral, a fragrance ingredient used in foods and pharmaceutical substances. Through acute survival bioassays, three exposure concentrations were calculated for each test compound: a high concentration that was equivalent to the LC_{50} 96 h, a middle concentration applying a security factor of ten to the same LC_{50} 96 h (LC_{50} 96 h /10) and a low exposure concentration, applying a security factor of one hundred (LC_{50} 96 h /100). Starting from the previous information, the efficiency of these security factors as a method to determine the concentrations of toxic compounds that allow aquatic organism survival was evaluated.

My results show a relationship between the developmental stage and the sensitivity to the different compounds, embryos being more sensitive than larvae to the lethal effects and hatching inhibition after exposure to 1,2,4-T, while sensitivity to these effects when exposed to Citral was greater for larvae. For all compounds tested, the individuals exposed to the agents during embryogenesis were sensitive and displayed teratogenic effects: craneofacial defects induced by FON, NOL, 1,2,4-T and Citral, disruption of the posterior lateral line (pLL) development and caudal fin duplications caused by Citral; alteration in the pLL nerve coating by Schwann cells and organization of iridophores on individuals exposed to FON and 1,2,4-T.

After applying the security factors on FON, NOL and Citral, these withheld their negative effects on individuals exposed during embryogenesis, although, in a very low percentage (roughly 4% of exposed individuals). These effects included alterations in the mandible and branchial arch development for all three compounds. Moreover, a mixture of triazole derivatives and free triazole, in concentrations that are permissible under the Chilean standard, exerted a clear synergy causing teratogenic effects in exposed embryos at a much higher proportion than those that occur naturally in control individuals.

I. INTRODUCCION

El uso masivo de pesticidas sintéticos, junto con la modernización de las técnicas agrícolas, dieron lugar a mediados del siglo XX a la llamada "Revolución Verde", que prometía erradicar el hambre y la desnutrición en el tercer mundo al incrementar exponencialmente la producción de alimento en dichos países. En base a esto, la industria química y los gobiernos comenzaron la promoción del uso de pesticidas en la lucha contra el hambre y las enfermedades transmitidas por vectores como el dengue y la malaria. Si bien este tipo de sustancias generan varios beneficios para el ser humano, tanto económicamente como en el combate de enfermedades, su mal uso y manejo trae consigo graves efectos negativos sobre la salud de las personas, el medio ambiente y la economía.

1.1 Efectos ambientales del uso de pesticidas

Chile es un país con una gran actividad agrícola y forestal, y por tanto un gran importador y usuario de pesticidas. No obstante un gran problema asociado al uso de estos, es la cantidad utilizada y su dispersión a gran escala en el ambiente, la cual ha sido detectada tardíamente en el tiempo. Un ejemplo de esto es el insecticida organoclorado Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), el que ha sido encontrado en el Ártico, a miles de kilómetros de su punto de aplicación más cercano (Cade y col., 1971), afectando a la salud de las personas y del medio ambiente, lo que fue descubierto varios años después de su utilización y dispersión masiva.

1.2 El concepto de calidad de aguas y la legislación chilena

La calidad del agua es un concepto relativo dependiendo del uso que se le dará a ésta, por lo que no existe un estándar de calidad global que sea aplicable a toda situación y

uso; sino más bien, las propiedades de las aguas y su nivel de contaminación, entre otros, determinan si un agua es apta para un uso en particular. Es decir, el concepto de calidad de aguas es más bien funcional y antropocéntrico, y no relacionado a la mera conservación de los ecosistemas.

En el caso de la contaminación acuática, para minimizar la exposición a sustancias tóxicas y proteger la salud de las personas, la legislación chilena ha utilizado como referencia los estándares internacionales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) o de la Agencia de Protección Ambiental de los EEUU (USEPA). Entre este tipo de sustancias tóxicas se encuentran los pesticidas, elementos que no han sido considerados para las aguas de riego (Nch 1.333 Of.1978), mientras que para el agua destinada al consumo de humanos y animales se hace referencia sólo a algunos de ellos, que en su mayoría corresponden a sustancias de uso restringido por el SAG, ya que son parte de la lista de los 12 Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP's) más peligrosos definidos en el Convenio de Estocolmo el año 2004. Entre ellos, se destacan el DDT, Dieldrin, Endrin, Heptacloro, Clordán y Lindano (Nch 409/1 Of.1984).

Para definir los límites máximos de sustancias tóxicas en las aguas destinadas a la vida acuática, en Chile se aplican factores de seguridad sobre el Límite de Tolerancia máximo a las 96 horas (LTm96), que es el equivalente a la mediana del límite de tolerancia al cabo de 96 horas de exposición determinado mediante bioensayos¹ (NCh 1333 Of.1978), es decir, correspondería al LC₅₀ 96 h. Estos factores de seguridad que se aplican sobre el LTm96, corresponden a un factor de dilución de 100 para: pesticidas, metales pesados y compuestos acumulables, ó a un factor de dilución de 10 para: cianuros, tóxicos no acumulables y detergentes (NCh 1333 Of.1978), es decir, la concentración máxima permitida para un determinado tóxico sería su LC₅₀/100, o su LC₅₀/10 según corresponda,

¹ Bioensayo se define como una prueba de laboratorio en la que se observa la respuesta fisiológica de uno o más organismos frente a un estímulo (Vila & Molina, 2006). En el caso descrito la respuesta es la muerte y el estímulo es la exposición a distintas concentraciones de una sustancia particular.

considerando que estas concentraciones no tendrían efectos sobre los organismos. No se define en la norma para que especie o nivel trófico debe calcularse este límite, sólo se presenta el siguiente recuadro: "Factores de seguridad para diferentes tóxicos" (Nch 1333 Of. 1978).

TÓXICO	FACTOR DE SEGURIDAD
Pesticidas	1/100 de la LTm96
Metales Pesados	1/100 de la LTm96
Cianuros	1/10 de la LTm96
Tóxico no acumulativo	1/10 de la LTm96
Tóxico acumulativo y persistente	1/100 de la LTm96
Detergentes	1/10 de la LTm96

Hasta el momento, en la normativa chilena las variables que se utilizan para asignar una determinada calidad a las aguas son de naturaleza física o química, dejando de lado variables biológicas (Vila & Molina, 2006), como pudiera ser la utilización de bioindicadores o bioensayos. El año 2004 la Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA) creó una guía para el establecimiento de las Normas Secundarias de Calidad de Aguas Continentales Superficiales y Marinas, las que tendrían como finalidad la protección de los ecosistemas. En esta guía se establecen clases de calidad² objetivo a las aguas, según la cantidad presente de diversos componentes. Estas normas a diferencia de las normas de calidad primaria o las normas del INN, no regirán por igual en todo el territorio nacional, debido a las grandes diferencias que presentan los distintos ecosistemas a lo largo de nuestro país. Por esto el Programa de Desarrollo de Normas Secundarias de Calidad de Aguas contempla la creación de una norma específica para cada cuenca, tomando en cuenta sus características propias y parámetros especiales definidos para cada una de ellas. En estas normas se incorporarán los *"bioensayos y los bioindicadores los que*

² Clases de Calidad: Tipificación del agua de acuerdo a niveles de calidad por elemento o compuesto.

podrán ser utilizados como herramientas complementarias para determinar los impactos producidos sobre las comunidades acuáticas, los usos prioritarios y/o el estado trófico de los lagos, canales, fiordos y estuarios, entre otros” (CONAMA, 2004). De esta manera, se pretenden incorporar variables biológicas al concepto de calidad de agua para las normas de calidad secundaria³. Estos criterios y metodologías ya están siendo aplicados en la Comunidad Europea y por la USEPA.

1.3 Pesticidas derivados de triazoles

Una de las familias de compuestos químicos que se utilizan en grandes cantidades en la industria agrícola y farmacéutica, es la de los triazoles. En Chile se utiliza cerca de una veintena de compuestos de esta familia química en varias formulaciones comerciales como ingredientes activos de fungicidas (SAG, 2007). Debido a sus usos, toxicidad y características fisicoquímicas, estos agentes son bien conocidos como potenciales contaminantes de las aguas y de potencial peligro para animales y humanos (USEPA, 2006a, 2006b, 2006c, 2006d; Báez y col, 1997). Ha sido reportado que hijos de madres que han estado bajo tratamiento con el antimicótico derivado del triazol, fluconazole h6, durante el primer trimestre de embarazo presentan malformaciones congénitas (Pursley y col., 1996; Aleck & Bartley, 1997; Lopez-Rangel & Van Allen, 2005). Así mismo, ha sido descrito que existe una alta incidencia de malformaciones en hijos de personas expuestas constantemente a agroquímicos, sobre todo en las regiones V, VI y VIII, zona que presenta la mayor actividad agrícola en el país (Rojas y col., 2000; Cavieres, 2004).

La comprensión de las propiedades toxicológicas de este tipo de sustancias y la creación de herramientas que permitan evaluar y monitorear la calidad biológica de las

³ Existen dos tipos de normas de calidad ambiental: las Normas de Calidad Primaria y las Normas de Calidad Secundarias. Las primeras tienen como objetivo proteger la salud de la población y se aplican en todo el país por igual. Las segundas permiten proteger recursos naturales u otros, tales como cultivos, ecosistemas, especies de flora o fauna, monumentos nacionales o sitios con valor arqueológico.

aguas, complementando o representando una alternativa a las costosas e imperfectas técnicas analíticas de monitoreo, tiene una gran relevancia en nuestro país.

Dado los antecedentes descritos, este trabajo se enfocó al estudio de dos compuestos activos de fungicidas derivados del triazol, utilizados principalmente en la zona centro de nuestro país: Triadimefón o FON (Bayleton®), 1-(4-clorofenoxy)-3,3 dimetil-1-(1H-1, 2, 4- triazol- 1 -il) butanona; su principal producto de degradación Triadimenol o NOL (Baytan®), (1RS, 2RS; 1RS, 2SR)-1-(4-chlorofenoxy)-3,3-dimetil -1-(1H-1,2,4-triazol-1- l)butan-2-ol; y un tercer compuesto que corresponde al producto final de degradación de ambos, y de toda la familia de compuestos químicos derivados del triazol, el Triazol libre (1,2,4-T), 1H-1,2,4-Triazole (Angier y Embry, 2005). La degradación de FON en los suelos es mediada por microorganismos, y tiene como principal (no único) producto a NOL (Singh, 2005). Cada paso de degradación produce un aumento en la solubilidad de la molécula, lo que aumenta la probabilidad de que los productos finales como 1,2,4-T lleguen a las aguas superficiales o subterráneas por escorrentía o lixiviación.

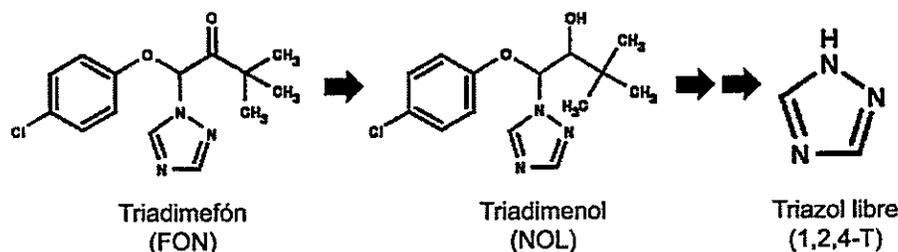


FIGURA 1: Estructura química y secuencia de productos en la degradación de FON.

1.3.1 Triadimefón y Triadimenol: usos y mecanismo de acción fungistática.

En Chile FON y NOL son utilizados para el tratamiento sistémico, preventivo, curativo y erradicante de enfermedades como el oídio en productos hortofrutícolas. En el caso de FON destacan la vid, frambuesas y manzanas. Mientras NOL se utiliza para el tratamiento y prevención de carbones, helmintosporiosis, septoria y rincosporiosis, entre otras, en semillas de cereales como el maíz, cebada, avena y centeno. Los triazoles al igual que los

azoles, ejercen su acción fungistática impidiendo la biosíntesis del Ergosterol, un esteroide que es importante componente de la membrana plasmática de los hongos, mediante la inhibición de la enzima Esterol 14 α -desmetilasa (CYP51) (Lepesheva y Waterman, 2007). A diferencia de la acción de otros antifúngicos, como los polienos que producen pérdida de contenido citoplasmático y muerte celular, por lo que se dice que tienen efecto fungicida, se dice que los triazoles poseen una acción fungistática, ya que su mecanismo de acción no produce muerte celular inmediata, sino más bien se inhibe la reproducción al impedir la biosíntesis de ergosterol y por ende de la membrana citoplasmática (Thompson L, 2002).

1.3.2 Triadimefón y Triadimenol: toxicidad y mecanismo de acción teratogénica .

Los derivados del triazol, FON y NOL han demostrado tener una amplia gama de efectos tóxicos y teratogénicos sobre vertebrados e invertebrados (Ankley y col, 2005; Menegola y col, 2000, 2005; Gropelli y col, 2005; Pennati y col, 2006; Goetz y col, 2006; Papis y col, 2007), entre los que cabe mencionar problemas en la fertilidad y comportamiento sexual, cambio en la expresión de genes implicados en el desarrollo embrionario y trastornos endocrinos. A su vez, diversos estudios han revelado que los efectos producidos por triazoles son similares a los causados por la exposición temprana a ácido retinóico (RA), se ha demostrando que *in vitro* la incubación simultánea de triazoles con Citral, un inhibidor de la síntesis de RA disminuye los efectos teratogénicos producidos por estos fungicidas (Papis y col, 2007; Di Renzo y col, 2007). Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) es además un compuesto utilizado como aditivo de comidas, perfumes y productos de limpieza. Este compuesto interrumpe la señalización del ácido retinoico al impedir la oxidación de retinol (vitamina A) a ácido retinoico, y por tanto su biosíntesis (Connor, 1988). Es por esto, que el modo de acción de los triazoles ha sido asociado a la alteración de los niveles endógenos de RA, morfógeno derivado de la vitamina A, esencial para la especificación de ejes y patrones morfogenéticas durante el desarrollo embrionario (Schuh y col., 1993, Perz-Edwards y col., 2001; White y col., 2007).

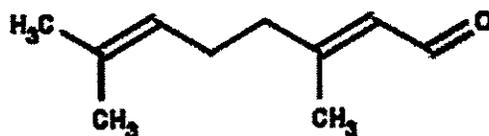


FIGURA 2: Estructura química del Citral.

1.4 Factores incidentes en la toxicidad y evaluación de contaminantes acuáticos.

Los efectos sub-letales producidos por contaminantes acuáticos dependen de varios factores tales como: concentración en el agua, duración de la exposición, la etapa de vida en que ésta ocurra, la interacción con otras sustancias presentes en el medio y las condiciones ambientales, entre otros. Todos estos factores dificultan la creación de normativas que realmente protejan al medio ambiente, y hace que la Evaluación de Riesgos Ambientales (ERA) para la introducción de nuevas sustancias químicas al mercado (como pesticidas o fármacos), sea muchas veces deficiente, debido a la cantidad y complejidad de los factores a considerar.

Muchos efectos tóxicos no son detectados mediante los bioensayos comunes que se basan en la inspección visual de los individuos, ni son capaces de dilucidar los mecanismos de acción tóxica de las sustancias en estudio. Es por ello que en este trabajo se utilizaron herramientas de la biología celular y molecular, como líneas de peces transgénicos y tinciones tejido específicas. Estas técnicas permitieron una mayor sensibilidad para la detección de efectos sub-letales sobre tejidos y órganos específicos. Así, se evaluó la efectividad del método que utiliza la normativa chilena para determinar las concentraciones de contaminantes máximas permitidas en las aguas destinadas a la vida acuática.

1.5 Ventajas del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo.

El pez cebra es un pequeño teleosteo (talla máxima 5 cm) de agua dulce ampliamente utilizado en toxicología debido a sus ventajas comparativas (Zhang y col.,

2003; Vosilyené, 2007). Estos peces producen una gran descendencia, tienen un corto periodo generacional (aproximadamente 3 meses) y su desarrollo embrionario se completa a las 48 horas, a un ritmo constante bajo condiciones definidas; la transparencia de los embriones facilita la observación detallada de estructuras internas y para su mantención se requiere de pequeños volúmenes, por lo que el costo de realizar ensayos puede ser reducido minimizando las cantidades de sustancias a utilizar, y los volúmenes de desechos producidos (Braunbeck y col, 2005). El mantenimiento y generación de líneas transgénicas y mutantes gen específicos no presenta mayor dificultad, permitiendo así contar con un gran número de líneas de peces transgénicos, mutantes y silvestres de esta especie.

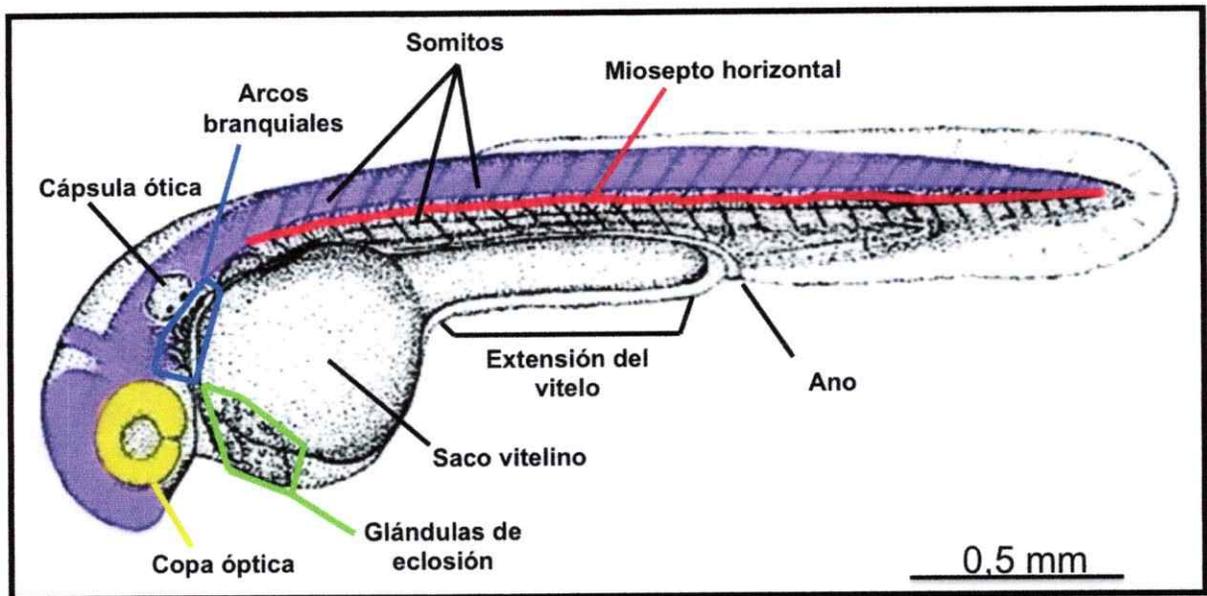


FIGURA 3: Esquema representativo de un embrión de pez cebra de 35 hpf. En morado se muestra la ubicación del Sistema Nervioso Central (SNC). Modificado de Kimmel y col., *Developmental Dynamics* 1995.

1.6 Tejidos derivados de las Crestas Neurales

Las Crestas Neurales (CN) son un grupo de células pluripotenciales exclusivas de los vertebrados que derivan del ectodermo durante el desarrollo embrionario y cambian sus propiedades epiteliales por mesenquémicas, lo que les permite migrar desde su lugar de origen (entre la epidermis y el tubo neural) a través de distintas rutas hacia variados

destinos en el embrión, diferenciándose en una gran variedad de tejidos y tipos celulares según la ubicación que estas adquieran en el embrión. Entre los tejidos derivados de las CN destacan elementos cartilagosos y tejido conectivo de la cabeza, células pigmentarias de la epidermis, neuronas y células de Schwann, ganglios simpáticos y parasimpáticos, células cardíacas, células del timo, y células productoras de epinefrina de la glándula adrenal (Gilbert, 2006). Las CN pueden ser divididas en cuatro dominios: las CN Craneales (CNC), las CN Troncales (CNT), las CN vagales y sacrales, y las CN cardíacas.

Varios síndromes congénitos, así como alteraciones del desarrollo embrionario causados por la exposición prenatal a agentes tóxicos afectan la migración, proliferación y/o diferenciación de este tejido embrionario. Así, se producen serias malformaciones en los individuos. Uno de los tipos de agentes químicos que producen este tipo de alteraciones, son los derivados del triazol.

1.7 Desarrollo de la Línea Lateral en el pez cebra.

El sistema mecanosensorial de peces y anfibios, la Línea Lateral (LL), corresponde a un grupo de células mecano-sensoriales epidermales que se encuentran distribuidas a lo largo de todo el cuerpo y son capaces de percibir el movimiento de las aguas. En el pez cebra este órgano se divide en dos, la Línea lateral anterior que se encuentra en la cabeza, y la Línea Lateral posterior (LLp). Esta última se forma a partir de un grupo de células (primordio) que migran lateralmente desde la parte posterior de la cabeza hacia la cola a través del miosepto horizontal, siguiendo y reconociendo ciertas señales químicas (químioquinas) que son detectadas gracias a la presencia de receptores específicos en la superficie de estas células. En su camino migratorio, el primordio de la LLp va depositando grupos de células que posteriormente se diferenciarán en las unidades funcionales de este sistema mecanosensorial, los llamados neuromastos. Cada neuromasto maduro posee en su centro células ciliadas encargadas de transducir los estímulos mecánicos del medio.

Este sistema se encuentra totalmente expuesto al medio ambiente, por lo que es muy sensible a la presencia de contaminantes acuáticos y ha sido utilizado como modelo para la detección de efectos neurotóxicos inducidos por metales pesados (Hernández y col, 2006)

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar los efectos causados en el desarrollo embrionario del pez cebra por concentraciones sub-letales, según la normativa ambiental chilena, de Triadimefón (FON), Triadimenol (NOL), Triazol libre (1,2,4-T) y Citral, mediante el uso de bioensayos.

2.2 Objetivos Específicos

- (i) Determinar la Concentración Letal para la mitad de una población experimental (LC_{50}) de pez cebra, para FON, NOL, 1,2,4-T y Citral, y a partir de los datos y la aplicación de los factores de seguridad correspondientes, determinar las concentraciones límite según la Nch 1333, Of. 1978.
- (ii) Determinar la concentración de FON, NOL, 1,2,4-T y Citral, que son capaces de inhibir la eclosión de la mitad de una población de embriones (CI_{50}) de pez cebra.
- (iii) Determinar los efectos que tienen FON, NOL, 1,2,4-T y Citral sobre el desarrollo embrionario del pez cebra y evaluar la efectividad de la aplicación de factores de seguridad sobre el LC_{50} .
- (iv) Determinar los posibles efectos de sinérgicos de mezclas de los diferentes compuestos ensayados.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Determinación de los LC_{50} y CI_{50} para triazoles y Citral. Aplicación del "Fish Embryo Toxicity Test" (Test FET)

Esta parte del estudio se llevó a cabo realizando, con pequeñas modificaciones, el Fish Embryo Toxicity Test (Test FET) descrito por la OCDE para este modelo (OCDE, 2006). Blástulas de entre 3 y 5 hpf, o larvas de 48hpf, fueron individualmente incubadas durante 96 horas, en microplacas de 24 pocillos con un volumen de 2 mL, en una estufa a 26°C. Se utilizaron entre 5 y 8 concentraciones de cada compuesto de prueba más un control negativo, correspondiente al medio de cultivo E3 (5 mM NaCl; 0,17 mM KCl; 0,33 mM $CaCl_2$; 0,33 mM $MgSO_4$). Para la determinación de la concentración letal media (LC_{50}) se registró el número de individuos muertos cada 24 horas, y se consideró como muertos a aquellos en los que no se pudieron detectar latidos cardiacos ni circulación sanguínea. De manera simultánea, a partir del día 2 (48 hpf), se registró también diariamente el número de individuos eclosionados. Estos datos permitieron determinar la concentración media de cada compuesto que resultó en la inhibición de la eclosión (CI_{50}).

3.2 Análisis de supervivencia: Análisis Probit.

Los datos obtenidos a partir del Test FET fueron procesados en Excel y sometidos a un análisis estadístico de supervivencia, llamado Análisis Probit (Bliss, 1934). Para esto se utilizó el software Statplus professional 2007, obteniéndose así el intervalo de confianza del 95% para los valores de LC_{50} y CI_{50} .

3.3 Cálculo de las concentraciones bajas, medias y altas de exposición. Aplicación de factores de seguridad.

Sobre los LC_{50} determinados en la primera parte se aplicaron factores de dilución iguales a 100 o 10. Estos corresponden a los mismos factores que utiliza la Nch 1333 of 1978 para determinar los límites de pesticidas, compuestos bioacumulables, metales y otros, permisibles en las aguas destinadas al uso de vida acuática. De esta manera se determinó como concentración alta de exposición aquella equivalente al LC_{50} ; como concentración media a la resultante de la aplicación de un factor igual a 10, es decir, al $LC_{50}/10$, y finalmente se consideró como concentración baja de exposición aquella equivalente a la aplicación del factor igual a 100 sobre el LC_{50} , es decir, al $LC_{50}/100$.

3.4 Detección de muerte celular.

Para la detección de células muertas en embriones y larvas se utilizó al marcador vital anaranjado de acridina, que permite detectar *in vivo* la presencia de muerte celular al unirse al DNA de células muertas en tejidos y organismos vivos completos. Los individuos descorionados manualmente fueron incubados en una solución de anaranjado de acridina a una concentración de 5 mg/L durante 5 a 10 minutos, en el caso de embriones y durante 15 a 20 minutos, para larvas sobre 48 hpf. Luego fueron lavados varias veces en el medio de cultivo E3 y trasladados a un recipiente limpio, para su observación bajo el microscopio de fluorescencia.

3.5 Tinción de cartílago.

Para la visualización de las estructuras esqueléticas de las larvas sometidas a distintos tratamientos, éstas fueron tratadas con el colorante Alcian Blue, que tiñe la matriz extracelular asociada a los condrocitos (células cartilagenosas). Larvas de 5 y 7 días post fertilización (dpf) fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato salino (PBS)

durante toda una noche, y al día siguiente lavadas varias veces en PBS con Tween al 0,1% (PBST) y blanqueados durante una hora en una solución de H₂O₂ al 5% en KOH al 70%. Luego se lavó nuevamente varias veces con PBST y la larvas se dejaron tiñendo toda la noche en una solución 0,1% Alcian Blue 8GX (Sigma) diluido en 80% de etanol y 20% de ácido acético. Al tercer día, los embriones fueron incubados en una solución de etanol ácido (etOH 70% / HCl 5%) que aclara las zonas sobreteñidas.

3.6 Bioensayos con organismos transgénicos.

Se realizaron bioensayos agudos con distintas líneas transgénicas de pez cebra para la detección de efectos sub-letales provocados por la exposición a triazoles y Citral durante la embriogénesis. Embriones en etapa de blástula fueron expuestos durante 48 horas a concentraciones altas, medias y bajas de los distintos compuestos en microplacas de 6 pocillos con un volumen de 5 mL c/u y alrededor de 20 embriones por pocillo.

Para la detección de malformaciones craneofaciales inducidas por las exposiciones a derivados de triazol y Citral, se utilizó la línea transgénica de pez cebra Sox10::GFP. Las malformaciones fueron evaluadas a las 24 hpf y a los 3, 5 y 7 dpf mediante la comparación por observación de los individuos control y aquellos expuestos a distintos tratamientos. Se evaluó la presencia, tamaño y forma de los elementos esqueléticos de la cabeza, pudiendo identificarse los elementos mandibulares (cartilago de Meckel, palatocadrato, ceratoideo e hyosimplectico), el condrocáneo, arcos branquiales, y en determinados casos las aletas pectorales.

Efectos sobre el sistema nervioso periférico (SNP) fueron evaluados en individuos de 36 hpf y 4 dpf. Para ello se utilizó la línea transgénica FoxD3::GFP, que expresa el gen reportero GFP en las células de Schwann que recubren al nervio de la LLp, y en células precursoras de iridióforos. Se evaluó como punto final el cambio de expresión de GFP en estos tipos celulares derivados de la Cresta Neural.

A través del uso de la línea CldnB::GFP, se estudió la migración del primordio de la LLp, evaluándose en individuos de 3 dpf el número de neuromastos depositados. Para esto se contó bajo la lupa el número de neuromastos depositados por el primordio en cualquiera de los dos lados de la larva.

IV. RESULTADOS

4.1 Alteraciones causadas por la exposición a triazoles y Citral durante la embriogénesis

Tras la exposición a fungicidas derivados del triazol y Citral en concentraciones medias ($LC_{50}/10$) y altas (LC_{50}), los embriones y larvas de pez cebra sufrieron severos edemas pericardíacos y vitelinos (dentro del saco vitelino), los cuales se hacían más graves al paso del tiempo, llevando en la totalidad de los casos a la muerte de los individuos antes de los 7 u 8dpf. Los embriones, además, desarrollaron una curvatura anormal de la columna vertebral (Fig. 4), lo que sumado a los severos edemas, dificultaba la natación en las larvas eclosionadas. Se observó un importante descenso en el ritmo cardíaco de las larvas expuestas a las concentraciones altas de todos los compuestos, retraso en el desarrollo embrionario, reducción en el tamaño de los ojos (microftalmia) y la cabeza, e hipopigmentación de todo el cuerpo y los ojos en el caso de los individuos expuestos a Triazol libre (Fig. 5). Aparte de los efectos morfológicos se observaron también claros efectos conductuales como: pérdida de la motilidad de las larvas, disminución o ausencia de respuesta ante estímulos mecánicos y ejecución ocasional de movimientos espasmódicos que podrían ser evidencia de estrés. Todos los efectos antes mencionados fueron dosis-dependientes y se hacían evidentes a partir de los 2 o 3 dpf, agravándose con el paso del tiempo. Los efectos evaluados en este trabajo se limitaron a los propuestos como objetivo: letalidad, inhibición de la eclosión, muerte celular y teratogénesis.

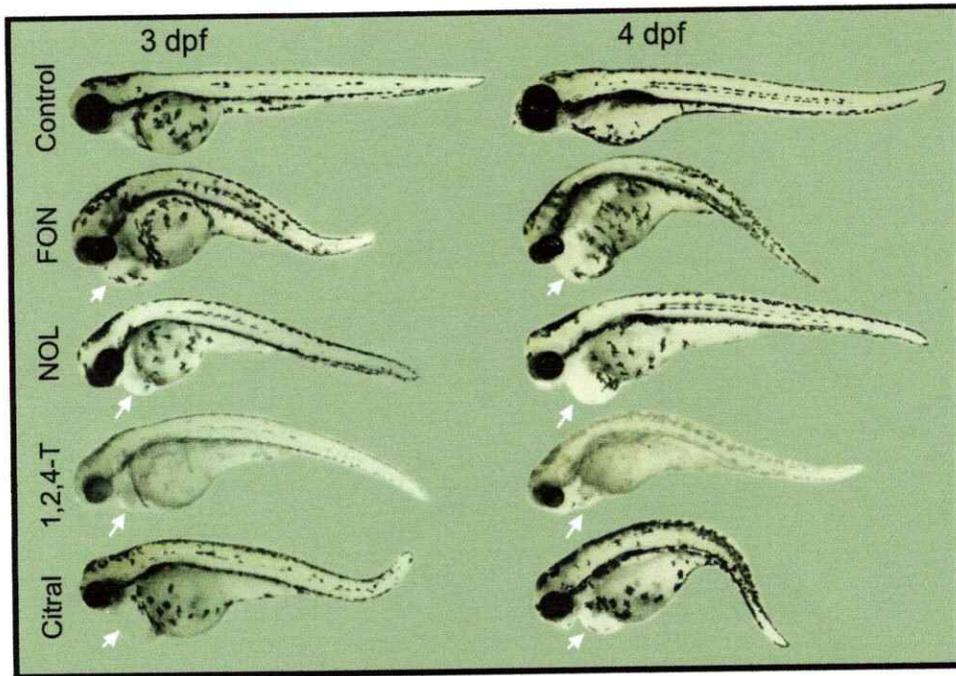


FIGURA 4: Apariencia de larvas expuestas a concentraciones altas de triazoles y Citral desde blástulas por 96 horas. Se observa en todos los casos un leve retraso del desarrollo embrionario, edemas pericardiacos (fechas), curvatura anormal del eje corporal, reducción del tamaño de la cabeza y microftalmia. FON 36,4 mg/L; NOL 55,5 mg/L; 1,2,4-T 12 g/L; y Citral 4,2 mg/L. (17x).

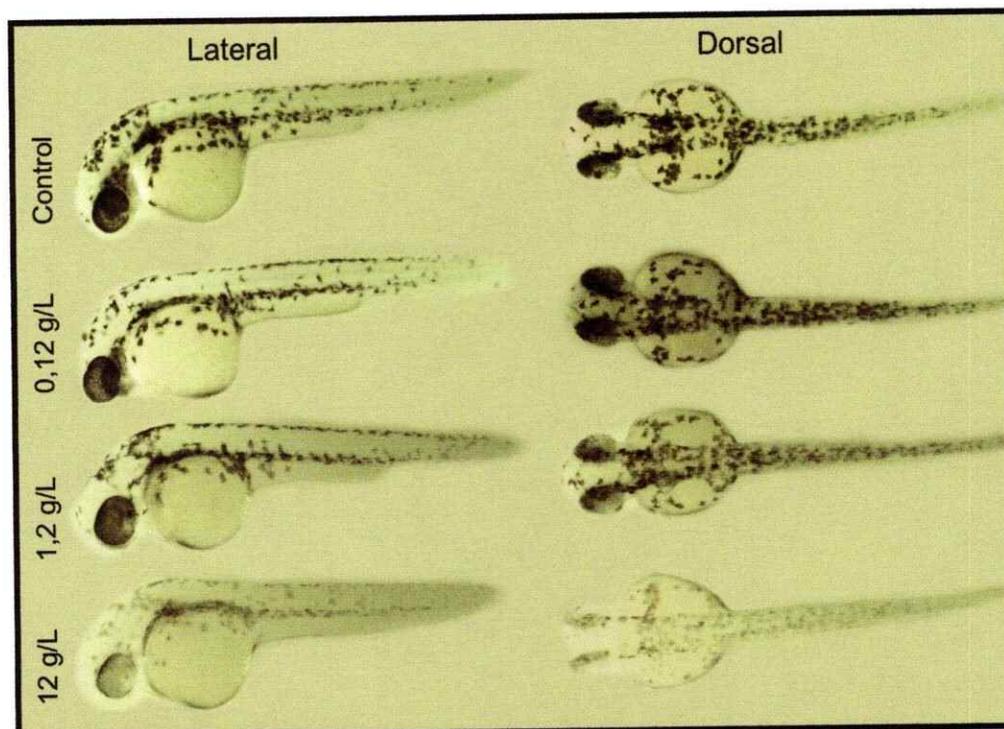


FIGURA 5: Hipopigmentación en la epidermis de larvas de 40 hpf expuestas a 1,2,4-T. Se observa una reducción dependiente de la concentración, en la pigmentación de todo el cuerpo de larvas expuestas. (23x).

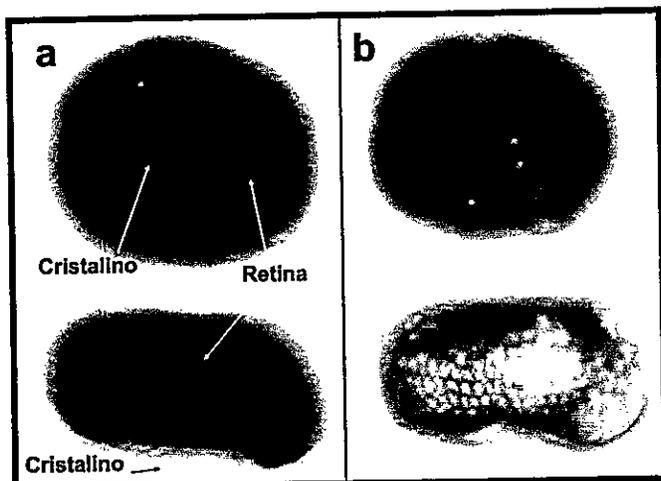


FIGURA 6: Hipopigmentación en la vesícula ocular de larvas de 3 dpf expuestas durante la embriogénesis a una alta concentración de Triazol libre. a) Control; b) 1,2,4-T 12 g/L. (1480x).

4.2 Concentración letal media a las 96 horas (LC_{50} 96 h) y cálculo de concentraciones límite para FON, NOL, 1,2,4-T y Citral, según la normativa chilena.

Mediante el análisis Probit (Bliss, 1934) se determinaron los límites de los intervalos de confianza del 95% ($IC_{95\%}$) para el LC_{50} resultante de tres tiempos distintos de exposición: 48, 72 y 96 horas, comenzando la exposición en el estadio de blástula (3 a 5 hpf), es decir, previo al inicio de la gastrulación, o en larvas tempranas (48 hpf) para evaluar diferencias en la sensibilidad de los individuos según el estadio de desarrollo. Los LC_{50} 96 h calculados para embriones y larvas se presentan en la Tabla 2 y los valores obtenidos tras la aplicación de los distintos factores de seguridad sobre dichos LC_{50} 96 h se presentan en la Tabla 3, valores que serán de aquí en adelante, señalados como las concentraciones: alta, media y baja en la mayoría de los experimentos posteriores. Los valores obtenidos de los resultados de todos los bioensayos se presentan en el Anexo B.

TABLA 1: Resultados del análisis estadístico de los datos de bioensayos, determinación de LC₅₀ 96 h para embriones y larvas.

Compuesto	Estadio de desarrollo	LCL	UCL	Error Estándar	LC ₅₀	Unidad
FON	Blástula	32,80	39,93	1,80	36,37	mg/L
	Larva temprana	30,22	36,40	1,56	33,31	mg/L
NOL	Blástula	-	-	-	Nd	-
	Larva temprana	50,09	60,32	2,57	55,21	mg/L
1,2,4-T	Blástula	9,77	14,25	1,08	12,01	g/L
	Larva temprana	11,08	14,36	0,82	12,72	g/L
Citral	Blástula	3,71	4,65	0,24	4,18	mg/L
	Larva temprana	2,91	3,72	0,20	3,31	mg/L

Valores calculados mediante Análisis Probit de los datos obtenidos en el Test FET para FON, 1,2,4-T, NOL y Citral. LCL: Límite inferior del Intervalo de Confianza; UCL: Límite superior del Intervalo de Confianza; Nd: No determinado

Los LC₅₀ 96 h determinados para embriones y larvas de pez cebra en los bioensayos con FON dieron un valor igual a 36,37 mg/L (123,9 µM) para embriones y 33,31 mg/L (112,7 µM) para larvas, en el caso de NOL sólo se pudo calcular para larvas, obteniendo un valor igual a 55,21 mg/L (186,6 µM); los valores obtenidos en los bioensayos para 1,2,4-T fueron de 12,01 g/L (0,17 M) y 12,72 g/L (0,18 M) para embriones y larvas respectivamente, mientras que para Citral el LC₅₀ 96 h para embriones fue de 4,18 mg/L (27,5 µM) y de 3,31 mg/L (21,7 µM) para las larvas.

Los valores presentados en la tabla 1 indican que existe una leve diferencia en la sensibilidad de los individuos según la etapa del desarrollo en la que se realicen los bioensayos. Así, para el caso de FON y Citral, se observa una mayor sensibilidad de las larvas en comparación con las blástulas, mientras que para la exposición a 1,2,4-T la sensibilidad es levemente mayor en las blástulas. A partir de los resultados obtenidos se puede determinar que la toxicidad aguda de los compuestos estudiados seguiría el siguiente orden decreciente: Citral > FON > NOL > 1,2,4-T.

TABLA 2: Resultado de la aplicación de factores de seguridad sobre los LC₅₀ 96 h, según la Nch 1333 Of. 1978.

Compuesto	Estadio de desarrollo	LC ₅₀	<u>LC₅₀</u>	<u>LC₅₀</u>	Unidad	Concentración
			10	100		LC ₅₀
FON	Blástula	36,37	3,64	0,36	mg/L	123,9 µM
NOL	Larva	55,21	5,52	0,55	mg/L	186,6 µM
1,2,4-T	Blástula	12,01	1,20	0,12	g/L	0,174 M
Citral	Blástula	4,18	0,42	0,04	mg/L	27,6 µM
Categoría asignada		Concentración alta	Concentración media	Concentración baja		

A partir de los valores presentados en la Tabla 1 se determinaron las concentraciones que se utilizaron en la mayoría de los bioensayos realizados posteriormente para la determinación de efectos sub-letales (Tabla 2). Estas concentraciones fueron calculadas aplicando un factor de dilución igual a 100 al LC₅₀ 96 h correspondiente para asignar una concentración baja y un factor igual a 10 para la concentración media, siendo finalmente considerada como una concentración alta de exposición la equivalente al LC₅₀ 96 h para embriones (excepto en el caso de NOL, donde este valor no se pudo calcular, por lo que se utilizó el valor correspondiente para las larvas). De acuerdo a lo anterior se determinaron los valores que según la Nch. 1.333 Of. 1978 no tendrían efectos negativos sobre los individuos, aplicando un factor de seguridad igual a 100 para FON y NOL por tratarse de pesticidas y a Citral por ser una molécula altamente lipofílica y por tanto potencialmente bioacumulable. En el caso del 1,2,4-T el factor de seguridad aplicado corresponde a 10, ya que se trata de una molécula hidrosoluble y no considerada como pesticida. Así, los valores límite calculados son iguales a 0,36 mg/L (1,2 µM) para FON; 0,55 mg/L (1,9 µM) para NOL; 1,2 g/L (0,02 M) para 1,2,4-T y finalmente 0,04 mg/L (0,3 µM) para Citral.

4.3 Concentraciones medias que inhiben la eclosión a las 96 horas (CI₅₀ 96 h).

Una respuesta que comúnmente es utilizada como punto final de evaluación de efectos toxicológicos de sustancias químicas, es la inhibición de la eclosión. En el pez cebra este evento ocurre entre las 48 hpf y 72 hpf (Kimmel y col, 1995), por lo que a las 96 hpf en condiciones control aproximadamente el 100% de los individuos ha eclosionado.

Se determinaron las CI₅₀ 96 h para la inhibición de la eclosión en larvas de 4 dpf expuestas desde el estadio de blástula (3-5 hpf) y en larvas de 6 dpf expuestas antes de eclosionar y desde las 48 hpf (Tabla 3). El análisis de los resultados de bioensayos con FON arrojaron un valor de CI₅₀ 96 h igual a 16,32 mg/L (55,6 µM) para larvas, mientras que los valores para embriones no pudieron determinarse con un error estándar aceptable, por lo que dicho valor se consideró no determinado. En el caso de 1,2,4-T los valores obtenidos fueron de 5,59 g/L (0,08 M) y 7,83 g/L (0,11 M) para embriones y larvas respectivamente. Para Citral la CI₅₀ 96 h en embriones fue de 6,17 mg/L (40,5 µM) y de 3,21 mg/L (21,1 µM) para las larvas, valor muy cercano al LC₅₀96 h correspondiente.

TABLA 3: Resultados del análisis estadístico de los datos de bioensayos, determinación de la CI₅₀ 96 h para embriones y larvas.

Compuesto	Estadio de desarrollo	LCL	UCL	CI ₅₀	Error Estándar	Unidad	Concentración CI ₅₀
FON	Blástula	Nd	Nd	Nd	-	-	-
	Larva	10,87	20,75	16,32	2,16	mg/L	55,6 µM
1,2,4-T	Blástula	3,53	7,64	5,59	1,03	g/L	0,081 M
	Larva	6,26	9,40	7,83	0,79	g/L	0,113 M
Citral	Blástula	3,47	8,86	6,17	1,36	mg/L	40,5 µM
	Larva	2,89	3,54	3,21	0,16	mg/L	21,1 µM

Valores calculados mediante el Análisis Probit de los datos obtenidos en el Test FET para FON, 1,2,4-T, y Citral. LCL: Limite inferior del Intervalo de Confianza; UCL: Limite superior del Intervalo de Confianza; Nd: No determinado.

Estos resultados coinciden con los presentados en la Tabla 1 en relación a las diferencias de sensibilidad de los individuos según la edad y el compuesto ensayado, ya

que, en el caso de las Cl_{50} 96 h determinados para 1,2,4-T y Citral, nuevamente se encuentra una mayor sensibilidad de los embriones frente a la exposición a 1,2,4-T, y de las larvas ante Citral. Cabe mencionar que en todos los casos las Cl_{50} fueron inferiores a los LC_{50} , excepto en el caso de los embriones expuestos a Citral, donde la Cl_{50} superó a la concentración letal media.

4.4 Detección de muerte celular.

Con la tinción vital de anaranjado de acridina, se determinó si el triazol libre, y bajas concentraciones de FON, NOL y Citral, eran capaces de inducir muerte celular en embriones de 24 hpf expuestos desde el estadio de blástula (Figs. 7 y 8).

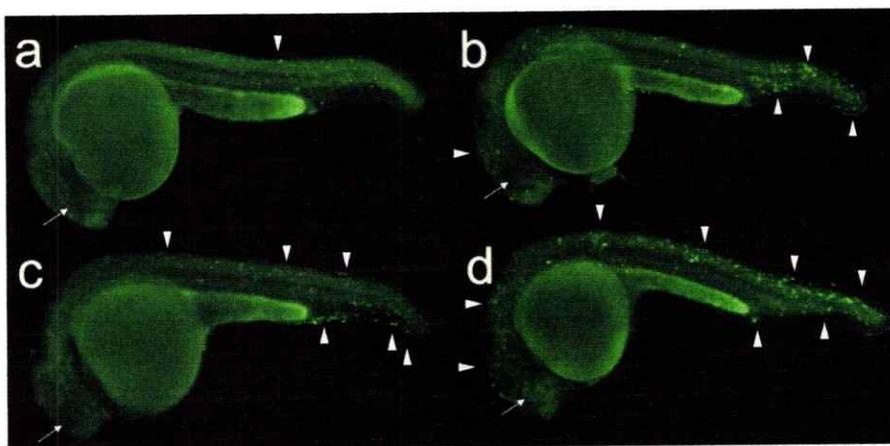


FIGURA 7: Aumento de muerte celular en embriones silvestres (WT) de 24 hpf expuestos a 1,2,4-T. Vista lateral de embriones expuestos a 1,2,4-T desde la etapa de blástulas. Las células marcadas en color verde (puntas de flecha) han incorporado el colorante anaranjado de acridina, que se une al DNA de células muertas. La fluorescencia emitida por el vitelo corresponde a auto fluorescencia. (a) Control; (b) concentración baja; (c) concentración media; (d) concentración alta. (30x).

En la Figura 7 se puede apreciar como embriones WT de 24 hpf expuestos a distintas concentraciones de 1,2,4-T, presentan una mayor cantidad de células muertas a medida que aumenta la concentración de exposición a éste compuesto. Se observa un aumento de la muerte celular en tejidos superficiales como la piel, especialmente de la cola y cerca del ano en todos los tratamientos, mientras que en los embriones expuestos a concentraciones media y alta (Fig. 7c y 7d) se observa marca también en la cabeza y el tronco, la que se

localiza mayormente a lo largo del Sistema Nervioso Central (ver Fig. 3). Los individuos expuestos a concentraciones altas presentan una mayor cantidad de células muertas en la zona de la copa óptica (flechas en Fig. 7d).

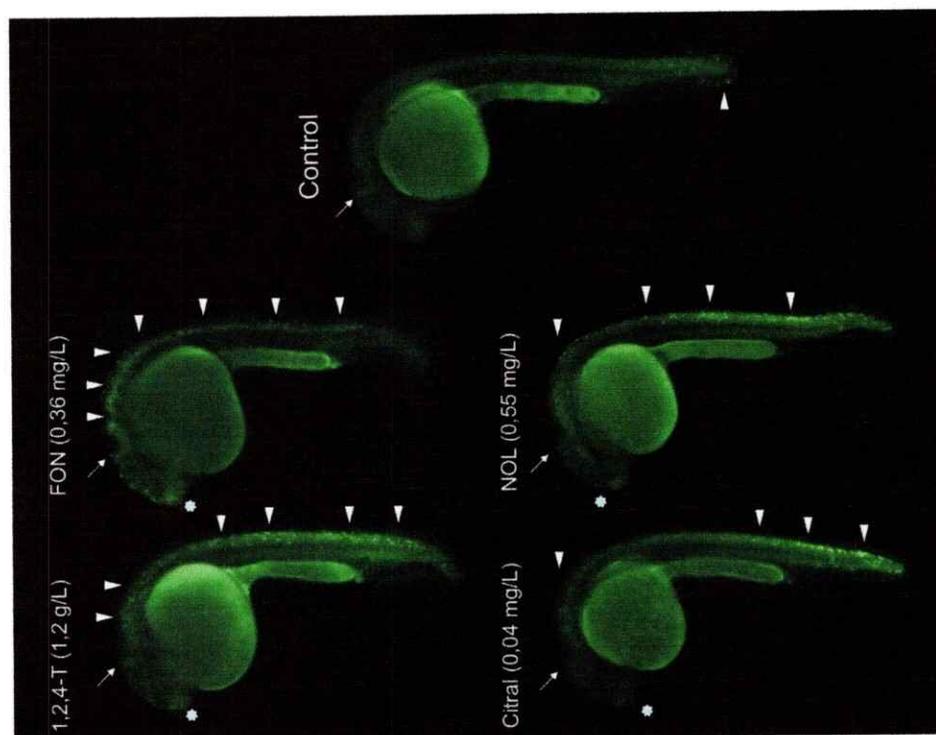


FIGURA 8: Aumento de muerte celular en embriones silvestres (WT) de 24 hpf expuestos a concentraciones bajas de FON, NOL, Citral y media de 1,2,4-T. Vista lateral de embriones expuestos a triazoles y Citral, desde la etapa de blástula. Las células muertas han incorporado el colorante anaranjado de acridina (puntas de flecha). (a) Control; (b) concentración baja de FON; (c) concentración baja de NOL; (d) concentración media de 1,2,4-T; (e) concentración baja de Citral. Flechas, límite cerebro medio - posterior; asterisco, bulbo olfatorio. (30x).

La exposición a concentraciones equivalentes a los límites según la Nch 1333 Of.1978 calculados para triazoles y Citral (ver Tabla 3), producen muerte celular de tejidos superficiales y profundos en embriones de 24 hpf expuestos desde el estadio de blástula. Todos los tratamientos revelaron muerte celular aumentada a lo largo del tubo neural (ver Fig. 3) respecto a los controles, lo mismo sucedió en el ano y la cola.

4.5 Efectos sobre el desarrollo craneofacial.

4.5.1 Bioensayos con organismos silvestres (WT).

Los resultados observados a partir de la tinción de cartilago con el colorante Alcian Blue y los bioensayos con la línea transgénica Sox10::GFP, indican que FON, NOL, 1,2,4-T y Citral tienen un efecto teratogénico no reversible sobre el esqueleto craneofacial en el pez cebra al igual que ha sido previamente reportado para anfibios y mamíferos (Groppelli y col., 2005; Menegola y col., 2005).

En la Figura 9 se muestra un esquema representativo de la anatomía de los arcos faríngeos (AF) y el esqueleto de la cabeza en larvas silvestres de pez cebra, donde se identifican individualmente los elementos esqueléticos afectados.

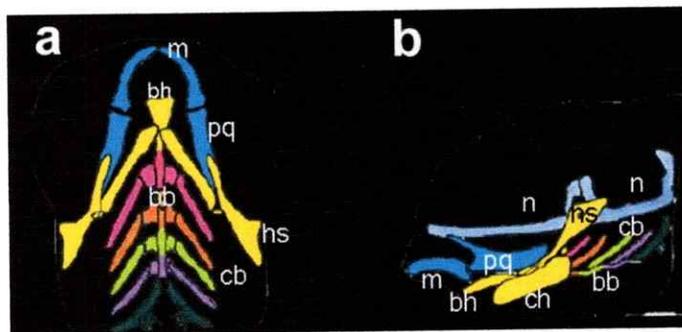


FIGURA 9: Esquema de la anatomía de los arcos faríngeos (AF), esqueleto mandibular y neurocráneo en larvas WT de pez cebra. (a) Vista ventral del esqueleto faríngeo, anterior hacia arriba, (b) vista lateral, anterior hacia izquierda y dorsal hacia arriba. Se muestra de un mismo color a los cartílagos derivados de un mismo segmento (AF 1-7). El neurocráneo es mostrado uniformemente en gris (n). bb, basibranquial; bh, basohídeo; cb, ceratobranquio; ch, ceratohídeo; hs, hiósimpléctico; m, cartílago de Meckel; pq, palatoquadrate. Modificado de Schilling y col 1996.

La tinción histológica del cartilago mandibular con Alcian Blue en larvas de pez cebra expuestas a series de concentraciones de FON y 1,2,4-T, revelaron una progresiva malformación del cartilago de Meckel (flechas en Figs. 10 y 11) en función de la concentración de ambos tóxicos, llegando a la agénesis total en las concentraciones superiores de FON, mientras que en las larvas expuestas a 1,2,4-T se aprecian cambios de ángulo en la posición del cartilago de Meckel, y elementos mandibulares derivados del AF2 (Fig. 11).

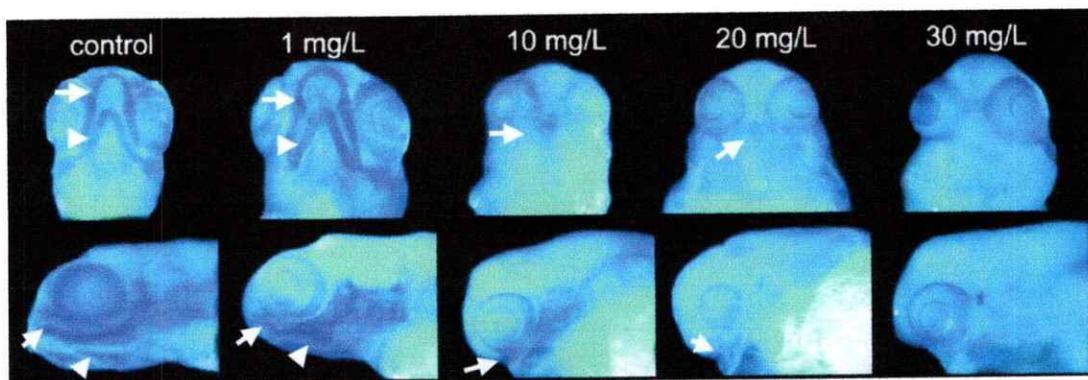


FIGURA 10: Cartílago craneofacial de larvas de 7dpf expuestas a FON. Tinción de la matriz cartilagenosa con el colorante Alcian Blue en larvas WT de pez cebra de 7 dpf, que fueron expuestas a distintas concentraciones de FON durante 96 h a partir de la etapa de blástula (3-5 hpf). Flechas, cartílago de Meckel; cabezas de flecha, ceratohídeo. Arriba vistas ventrales y abajo vistas laterales. (27x).

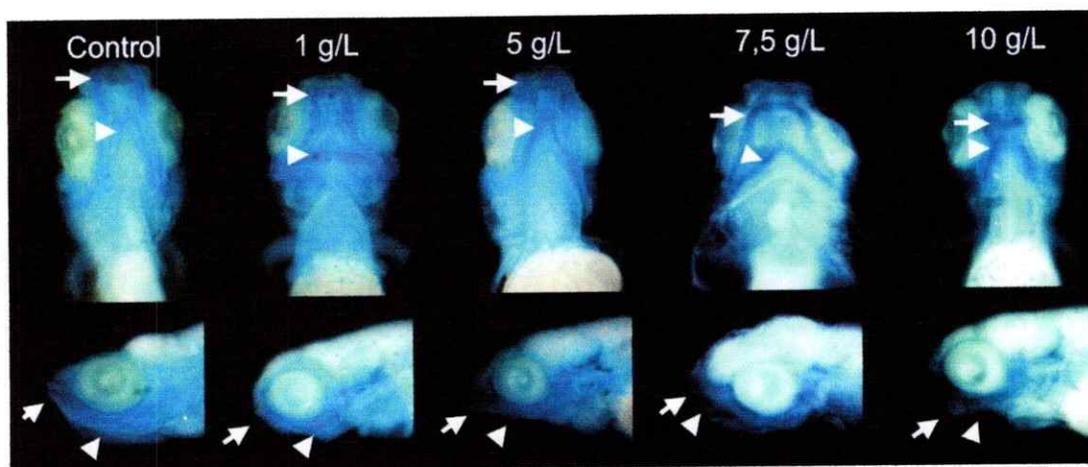


FIGURA 11: Cartílago craneofacial de larvas de 5 dpf expuestas a 1,2,4-T. Tinción de cartílagos de la cabeza de larvas WT de pez cebra, de 5 dpf, que fueron expuestas a distintas concentraciones de 1,2,4-T durante 96 h a partir de la etapa de blástula (3-5 hpf). Flechas, cartílago de Meckel; cabezas de flecha, ceratohídeo. Arriba vistas ventrales y abajo vistas laterales. (28x).

4.5.2 Bioensayos con organismos transgénicos.

Los bioensayos con individuos de la línea transgénica Sox10::GFP que permite observar *in vivo* células derivadas de las Crestas Neurales Craneales (CNC) expresando la proteína fluorescente verde (GFP), mostraron con mejor resolución los efectos teratogénicos producidos por triazoles y Citral sobre los elementos del esqueleto craneofacial del pez cebra (Fig. 12 a 17).

TABLA 4: Porcentaje de individuos con malformaciones del esqueleto craneofacial tras la exposición a triazoles y Citral.

Compuesto	Concentración baja (LC ₅₀ /100)	Concentración media (LC ₅₀ /10)	Concentración alta (LC ₅₀)	Controles
FON	4%	91%	100%	0%
NOL	4%	18%	100%	0%
1,2,4-T	0%	3%	22%	0%
Citral	8%	22%	97%	0%

Se observó una clara relación de la severidad de los efectos con la concentración de las sustancias ensayadas, presentándose efectos teratogénicos evidentes tras exposición a concentraciones altas para todas las sustancias, también en las concentraciones medias (excepto en el caso de 1,2,4-T), y sólo la exposición a Citral en baja concentración demostró tener un efecto teratogénico, aunque en baja proporción (Tabla 4).

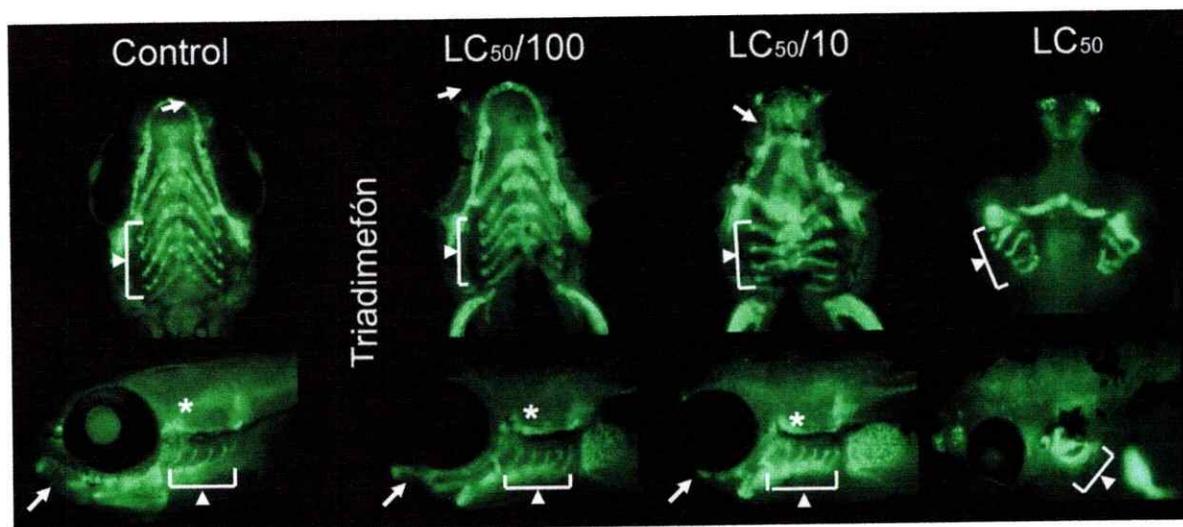


FIGURA 12: Larvas de 5 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestas a FON durante la embriogénesis. Fotografías representativas de larvas expuestas desde blástulas, y durante 48 h a concentración baja, media y alta de FON. Flechas, elementos mandibulares; cabezas de flecha, arcos branquiales; asteriscos, neurocráneo. Arriba vistas ventrales y abajo vistas laterales. (35x).

En la Figura 12 se puede apreciar la alteración que produce FON en el desarrollo de los elementos mandibulares y los arcos braquiales de larvas de pez cebra expuestas durante la embriogénesis a una concentración media, mientras que en la concentración alta

se observa agénesis de estas estructuras. Se observa también un cambio en la forma, orientación y tamaño de los ojos y la cabeza.

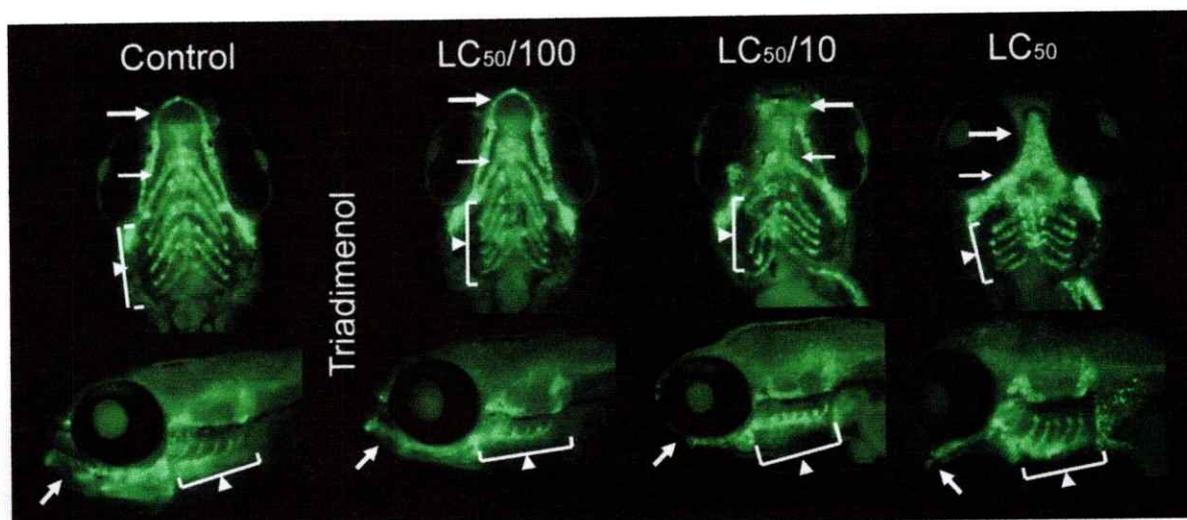


FIGURA 13: Larvas de 5 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestas a NOL durante la embriogénesis. Fotografías representativas de larvas expuestas desde blástulas, y durante 48 h a concentración baja, media y alta de NOL. Flechas, elementos mandibulares; puntas de flecha, arcos branquiales. Arriba vistas ventrales y abajo vistas laterales. (35x).

La exposición a NOL (Fig. 13) produjo alteración en el desarrollo temprano de las estructuras mandibulares del pez cebra así como de los arcos branquiales a partir de la exposición a la concentración media, aunque incluso en altas concentraciones estas estructuras sí se encuentran presentes, a diferencia de lo ocurrido con FON. Se observa que la concentración más alta de exposición genera una aparente fusión de los elementos mandibulares superiores e inferiores.

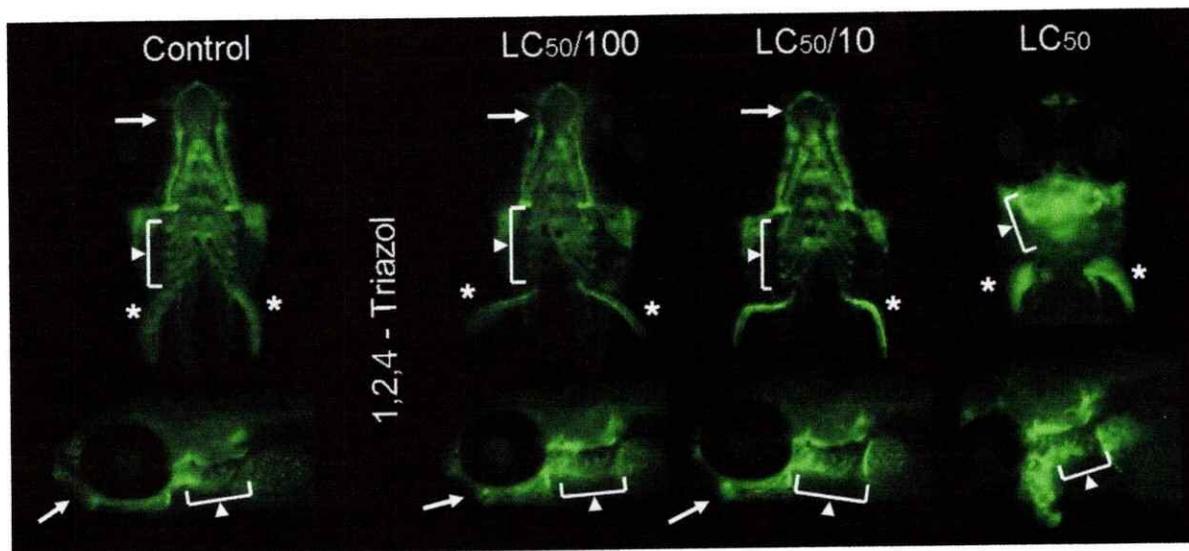


FIGURA 14: Larvas de 7 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestas a 1,2,4-T durante la embriogénesis. Fotografías representativas de larvas expuestas desde blástulas, por 48 h a concentración baja, media y alta de 1,2,4-T. Flechas, elementos mandibulares; puntas de flecha, arcos branquiales; asteriscos, aletas pectorales. Arriba vistas ventrales y abajo vistas laterales. (35x).

A los 7 dpf en los embriones expuestos a 1,2,4-T (Fig. 14) se observaron algunas diferencias en la curvatura de las aletas pectorales al compararlas con los controles, mientras que sólo se observó malformación mandibular y de los ceratobranquios (Fig. 14, puntas de flecha) en las larvas expuestas a concentraciones altas de este compuesto, se aprecia también un acortamiento en la distancia entre los ojos, lo que los posiciona casi ventralmente. La concentración más alta de exposición genera una aparente fusión de los elementos mandibulares superiores e inferiores, similar a lo observado en larvas expuestas a NOL.

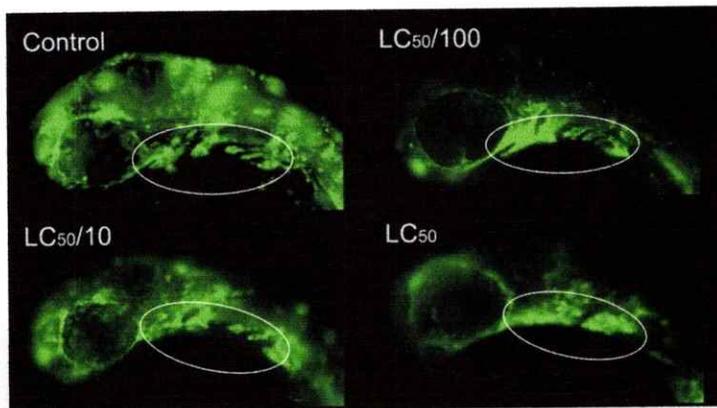


FIGURA 15: Embriones de 1 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestos a Citral durante la embriogénesis. Vista lateral de embriones expuestos a concentración baja, media y alta de Citral. Se ve dentro de los círculos blancos a las células de las CNC que han alcanzado los arcos faríngeos. (55x).

La Figura 15 muestra embriones

Sox10::GFP durante la etapa de segmentación expuestos a Citral, que expresan GFP en las crestas neurales craneales (CNC) que en esta etapa ya han migrado desde su original posición dorsal (sobre el tubo neural) hacia los arcos faríngeos y branquiales. Se puede observar que mientras en el control las células de las CNC han migrado como distintas corrientes separadas de células, en los embriones expuestos a la concentración alta de Citral estos grupos de células parecieran encontrarse fusionadas, presumiblemente como una alteración en las rutas migratorias de estas células.

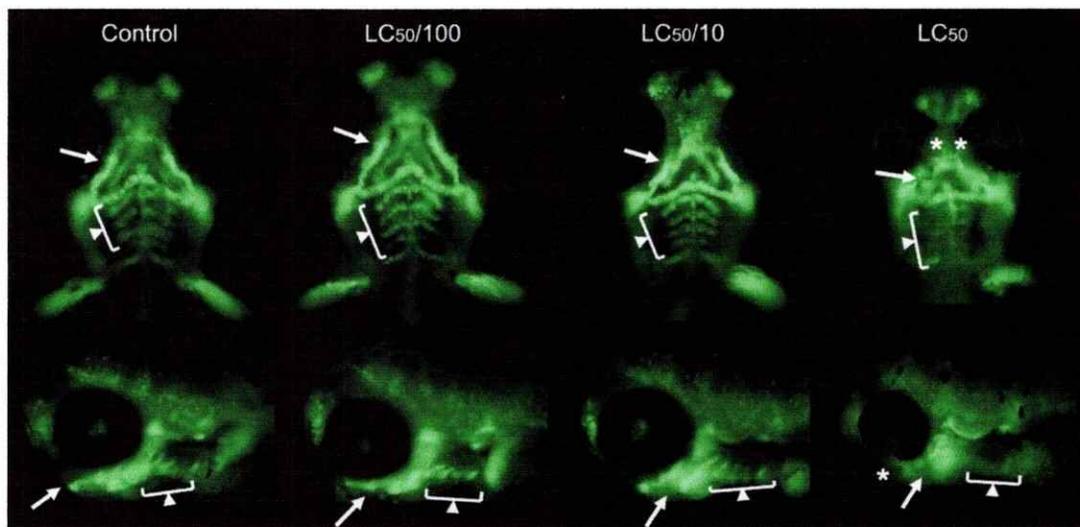


FIGURA 16: Larvas de 3 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestas a Citral durante la embriogénesis. Fotografías representativas de larvas expuestas desde blástulas y por 48 h a concentración baja, media y alta de Citral. Flechas, elementos mandibulares; cabezas de flecha, arcos branquiales; asteriscos, apertura copa óptica. Arriba vista ventral y abajo vista lateral. (48x).

La exposición a Citral durante la embriogénesis indujo malformación de los elementos craneofaciales y braquiales, además de una alteración en el desarrollo y cierre de la copa óptica en las larvas expuestas a concentraciones altas, mientras que concentraciones medias y bajas no producen alteración evidente de estas estructuras a los 3 dpf (Fig. 16).

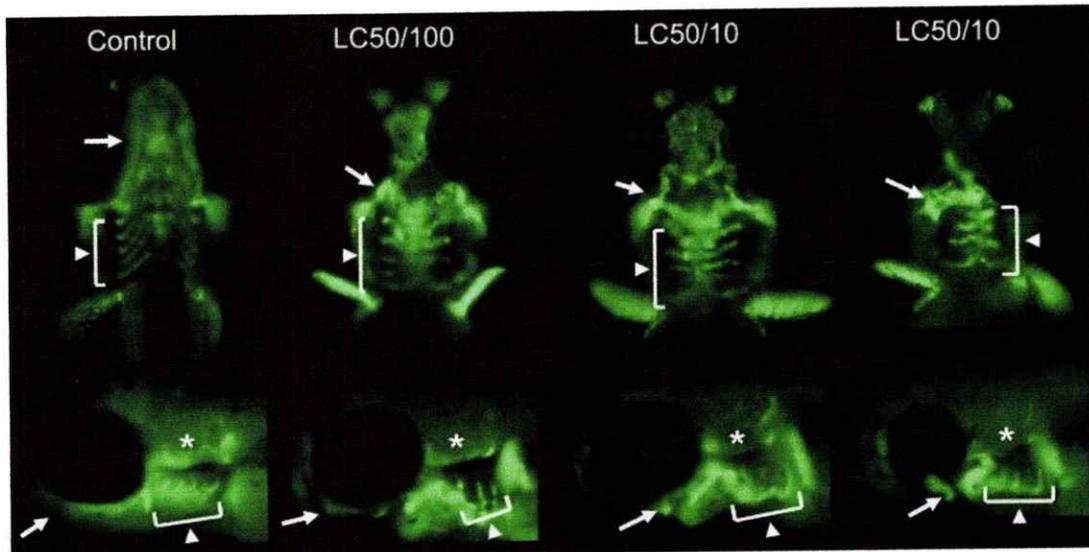


FIGURA 17: Larvas de 5 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestas a Citral durante la embriogénesis. Fotografías representativas de larvas expuestas desde blástulas a concentración baja, media y alta de Citral. Flechas, elementos mandibulares; cabezas de flecha, arcos branquiales; asteriscos, neurocráneo. Arriba vistas ventrales y abajo vistas laterales. (40x).

A los 5 dpf las larvas expuestas a Citral mostraron graves malformaciones evidenciadas por una organización aberrante de los elementos mandibulares superiores derivados del AF1 e inferiores, derivados del AF2. Se observa un severo cambio de ángulo en los arcos branquiales en todos los tratamientos, y se aprecia también una importante disminución del neurocráneo y del tamaño de los ojos (microftalmia) y la cabeza en las larvas expuestas a la concentración alta de Citral (Fig. 17).

4.6 Efectos sobre el desarrollo del Sistema Nervioso Periférico (SNP).

La línea transgénica FoxD3::GFP expresa GFP en grupos celulares derivados de las CN como: precursores de células pigmentarias, células de Schwann de SNP y otras células con origen embrionario distinto, como las neuronas de la glándula pineal (Gilmour y col., 2002). Las células de Schwann que recubren el nervio de la Línea Lateral posterior (LLp) se ubican a lo largo del miosepto horizontal (ver figura 3), a las que se suman otras que posteriormente se posicionan entre los somitos hacia dorsal y ventral de este nervio. Bioensayos con esta línea transgénica permitieron advertir la presencia de anomalías

en las células de Schwann y en la organización de células precursoras de pigmentos (iridioforos) del pez cebra, a causa de la exposición temprana a distintas concentraciones de FON (Fig. 18) y 1,2,4-T (Figs. 19 y 20).

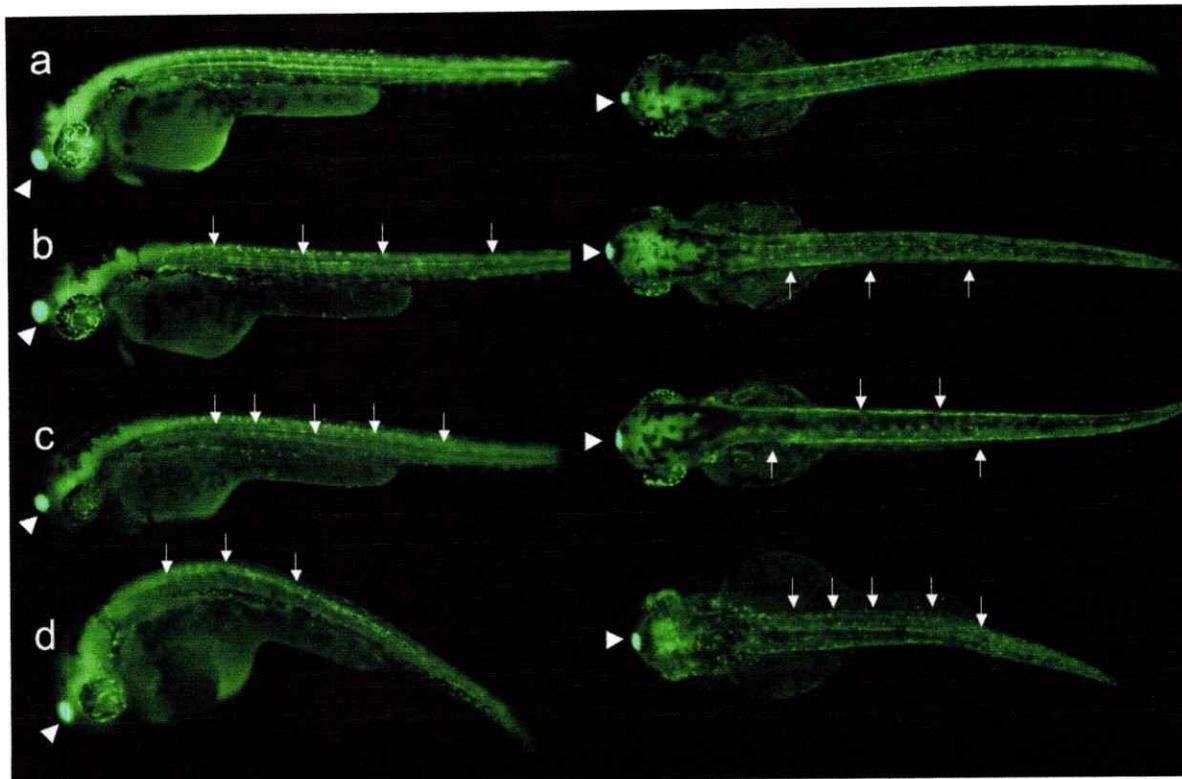


FIGURA 18: Larvas de 42 hpf de la línea transgénica FoxD3::GFP expuestas a FON durante la embriogénesis. (a) Control; (b) concentración baja; (c) concentración media; (d) concentración alta. Se observa disminución en la expresión de GFP en el nervio de la LLp (flechas) de las larvas tratadas. Izquierda vistas laterales y derecha vistas dorsales. Puntas de flecha, glándula pineal. (26x).

En la figura 18 se observa en los embriones de la línea FoxD3::GFP, disminución en la expresión de GFP por parte de las células de Schwann que recubren al nervio de la LLp, tras ser expuestos a todas las concentraciones de FON. Al aumentar la concentración de exposición el efecto se hace mas evidente en cuanto a gravedad y recurrencia. Así, de los individuos expuestos a la concentración baja, un 3,8% presentó pequeñas discontinuidades en la expresión de GFP sobre el nervio de la LLp (N: 25-27; SD: 0,2), en aquellos expuestos a la concentración media, este efecto se presentó de manera un poco mas

severa en un 5,7% de los individuos (N: 24-28; SD: 2,1), y de los individuos expuestos a la concentración alta un 9,8% (N: 25-26; SD: 3,0) presenta una evidente disminución de la expresión de GFP en el nervio de la LLp, mientras que en los controles estas discontinuidades en la expresión, no fueron detectadas nunca. No se observó en estos individuos alteración en la expresión de GFP en la glándula pineal.

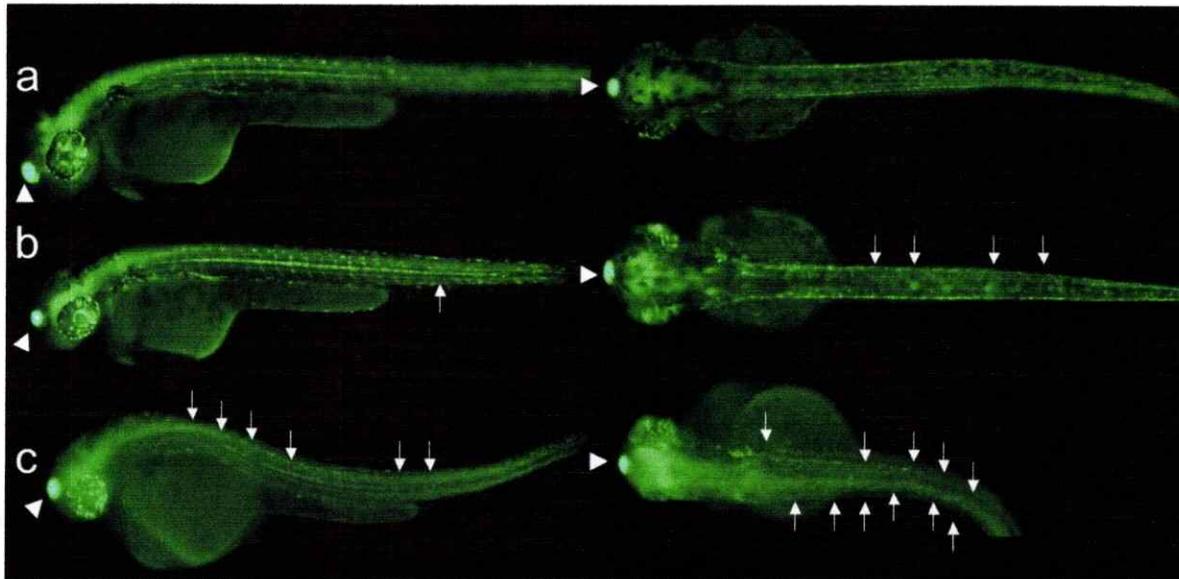


FIGURA 19: Larvas de 42 hpf de la línea transgénica FoxD3::GFP expuestas a 1,2,4-T durante la embriogénesis. (a) Control (b) 2 g/L (c) 20 g/L. Izquierda vistas laterales y derecha vistas dorsales. Se observa disminución en la expresión de GFP en el nervio de la LLp (flechas) de las larvas tratadas. Puntas de flecha, glándula pineal. (26x).

En el caso de la exposición a 1,2,4-T (Fig. 19) se observan a las 42 hpf discontinuidades en la la expresión de GFP sobre el nervio de la LLp, similares a las provocadas por la exposición a FON, las cuales son más evidentes en las larvas expuestas a una concentración de 1,2,4-T igual a 20 g/L. Al igual que en el caso anterior no se observó alteración del tamaño u organización de la glándula pineal y el efecto es agravado con el aumento de la concentración.

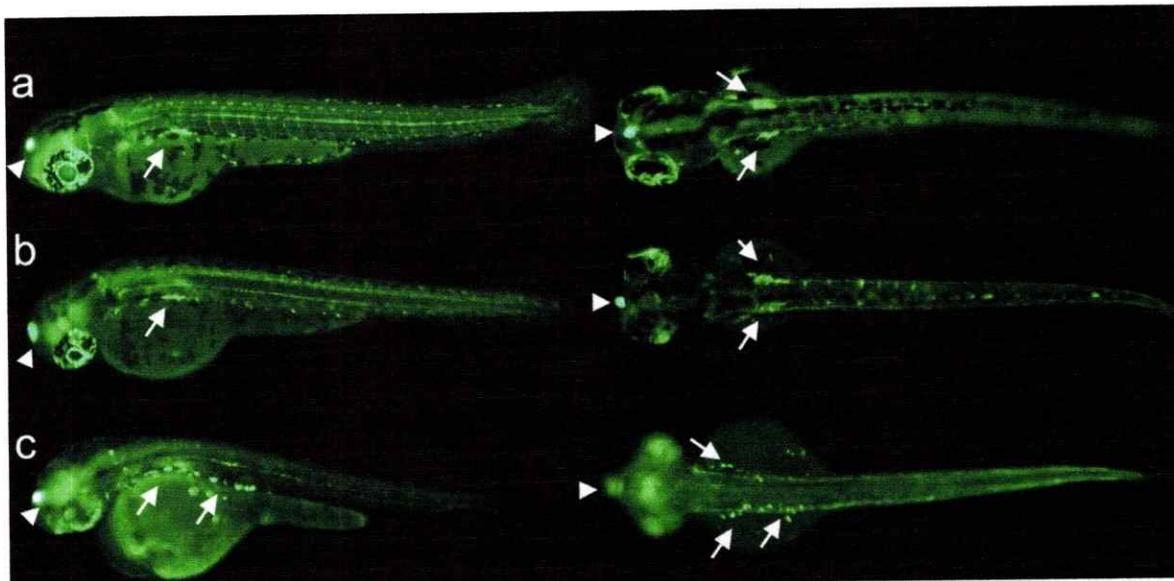


FIGURA 20: Larvas de 4 dpf de la línea transgénica FoxD3::GFP expuestas a 1,2,4-T durante la embriogénesis. Larvas expuestas a 1,2,4-T, mostrando disminución en la expresión de GFP en el nervio de la LLp y en la organización de células pigmentarias (flechas). Las cabezas de flecha muestran a la glándula pineal. (a) Control (b) 2 g/L (c) 20 g/L. Izquierda vista lateral y derecha vista dorsal. (25x).

En la Figura 20 se ven larvas de 4 dpf expuestas a 1,2,4-T durante la embriogénesis, estas muestran la misma discontinuidad en la expresión de GFP previamente descrita en el nervio de la LLp a las 42 hpf causado por FON y 1,2,4-T, mostrando que este efecto no es reversible, al menos dentro de los siguientes 2 días post tratamiento (dpt), es decir, luego de finalizada la exposición. En esta etapa del desarrollo el nervio de la LLp que corre a lo largo del miosepto horizontal (ver figura 4), ha extendido las proyecciones que se conectan a los órganos funcionales de la línea lateral, los llamados neuromastos (Gilmour y col., 2002), proyecciones que no se observan en las larvas expuestas a las concentraciones media y alta utilizada de este compuesto, también se puede ver una clara desorganización de células pigmentarias (iridióforos) en la parte ventral del tronco anterior (Fig. 20, Flechas). No se observa en ningún caso reducción de tamaño o cambio de forma de la glándula pineal.

4.7 Citral

4.7.1 Alteración del desarrollo de la Línea Lateral posterior (LLp) del pez cebra.

Bioensayos preliminares realizados con la línea transgénica *CldnB::GFP* con los compuestos derivados de triazol y el Triazol libre, no mostraron evidencia de efectos sobre la migración del primordio de la LLp, ni sobre la depositación de los neuromastos. Sólo se vieron efectos negativos en el desarrollo de este órgano mecanosensorial, cuando los embriones fueron expuestos a Citral (Fig. 21).

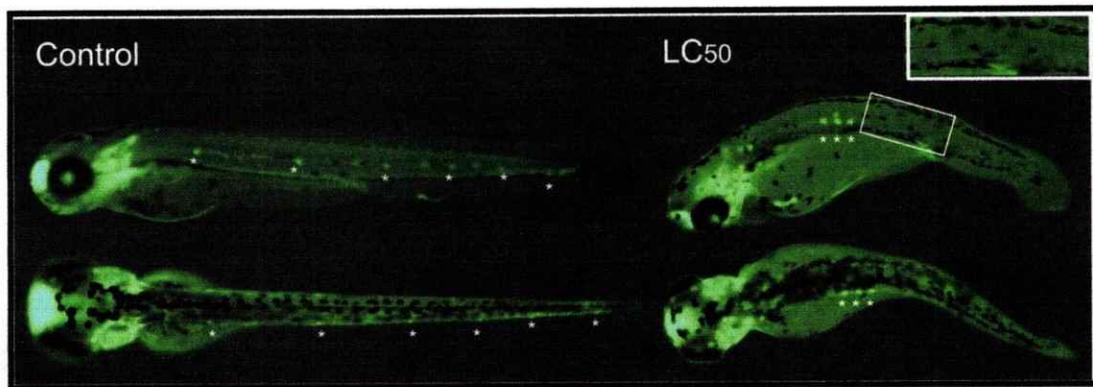


FIGURA 21: Larvas de 3 dpf de la línea transgénica *CldnB::GFP* expuestas a una concentración alta de Citral durante la embriogénesis. Se observa una disminución en el número de neuromastos (asteriscos) depositados en las larvas expuestas a Citral. Arriba vistas laterales y abajo vistas dorsales. (23x).

En el caso de larvas expuestas a Citral durante la embriogénesis se produjo una severa alteración en la formación de la LLp, lo que se hizo evidente por una reducción en el número de neuromastos depositados a los 3 dpf. Este efecto sólo se hizo presente en los individuos expuestos a la concentración alta de Citral (tabla 6). Además, se observó una reducción en la distancia entre los neuromastos que alcanzaron a ser depositados, ubicándose estos de manera contigua como se indica en la figura 21.

TABLA 6: Número de neuromastos de la LLp depositados en larvas de 3 dpf expuestas a Citral durante la embriogénesis.

Concentración de Citral	Número de individuos estudiados	Neuromastos depositados en la LLp
Control (0 mg/L)	33	5,2
Baja (0,04 mg/L)	32	5,8
Media (0,42 mg/L)	36	5,1
Alta (4,18 mg/L)	34	2,6

4.7.2 Teratogénesis, duplicación de la cola.

El tratamiento con distintas concentraciones de Citral durante 96 h a partir de la etapa de blástulas, llevo a una progresiva malformación de los ojos, curvatura y reducción en el largo del tronco y cola, lo que resultó en un acortamiento de la longitud total del cuerpo. Las larvas expuesta a 1 mg/L (6,6 μ M) durante la embriogénesis, presentaron una duplicación de la cola en un 18% de los individuos tratados (N: 25-30; SD: 5,6%) que se manifestó con distintos grados de severidad. Es importante mencionar que este tratamiento no produjo ninguna de las aberraciones morfológicas antes descritas en individuos expuestos a la concentración alta de Citral (Fig. 4).

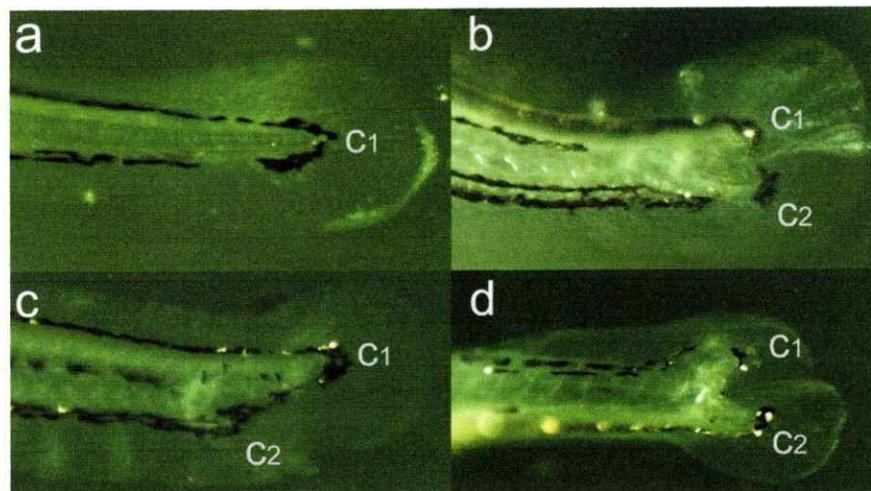


FIGURA 22: Duplicación de la cola en larvas WT de 6 dpf expuestas a Citral durante la embriogénesis. Se observa la duplicación de la cola en larvas silvestres (WT) expuesta a 6,6 μ M de Citral durante 96 h. (a) control, (b - d) Citral 6,6 μ M. C1 y C2 representan los dos extremos caudales de las colas dobles (6x).

4.8 Efecto sinérgico en mezclas de triazoles y sus productos de degradación.

Los organismos acuáticos suelen estar expuestos a mezclas de contaminantes que, en conjunto, pueden potenciarse, actuar por distintas vías o bien, inhibirse mutuamente. En el caso de los pesticidas es de gran relevancia conocer que ocurrirá en el medio ambiente con sus productos de degradación, ya que estos pueden en algunos casos ser más tóxicos que los compuestos parentales que son directamente aplicados de manera constante en los cultivos. Además, estos productos de degradación generalmente son más estables en el ambiente y por tanto tienden a acumularse. En el caso del fungicida FON, la acción microbiana degrada a este compuesto en al menos tres productos, de los cuales NOL es el más importante en cuanto a cantidad (Singh, 2005). La degradación total de NOL lleva a la formación de 1,2,4-T y sus conjugados (Triazol alanina y Triazol ácido acético), productos comunes a todos los compuestos derivados del triazol (USEPA, 2006d), por lo que un cuerpo de agua afectado por la aplicación de FON, posiblemente sea contaminado por una mezcla de estos compuestos. En base a lo anterior se determinó el efecto de la exposición a una mezcla de concentraciones bajas de FON, NOL y 1,2,4-T, evaluando el aumento de muerte celular (Figs. 23 y 24) y el desarrollo craneofacial de larvas expuestas a esta mezcla de compuestos (Fig. 25).

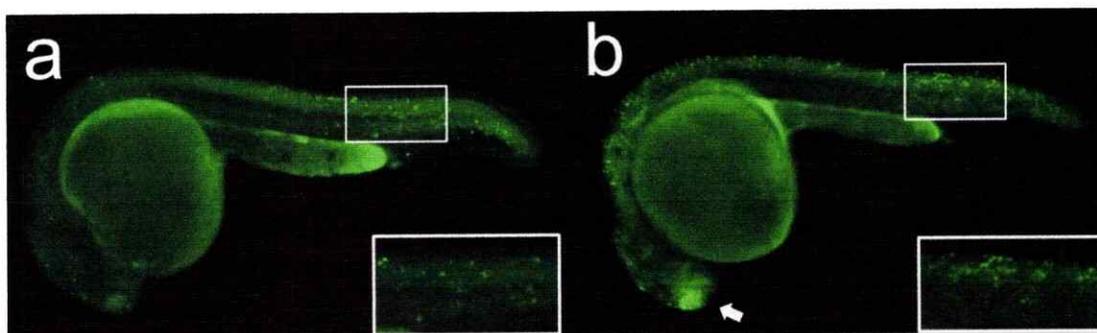


FIGURA 23: Aumento de muerte celular en larvas WT de 24 hpf expuestas a una mezcla de triazoles. La tinción con anaranjado de acridina permite observar un gran número de células muertas a lo largo de todo el embrión, sobre todo en la zona del cerebro anterior (flecha) y tubo neural en general. (37x).

La exposición a una mezcla de triazoles: FON (0,36 mg/L), NOL (0,55 mg/L) y 1,2,4-T (1,2 g/L), es decir, en las concentraciones permitidas por la Nch 1333 Of. 1978 para las

aguas destinadas a la vida acuática, produce un aumento generalizado de muerte celular en los tejidos dorsales del embrión de pez cebra de 24 hpf, que se ubica mayoritariamente a lo largo del SNC, aunque el efecto es mas evidente en el cerebro anterior (Fig. 23b, flecha). No se detectó muerte en otras zonas específicas del cuerpo en esta etapa del desarrollo.

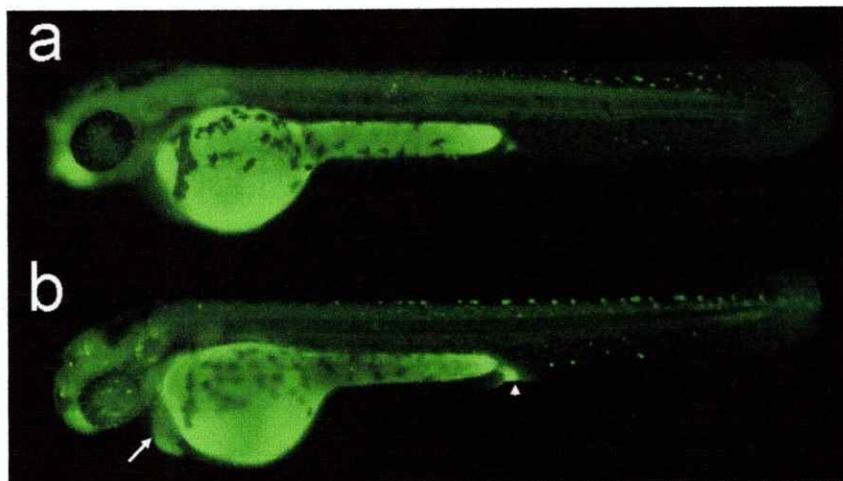


FIGURA 24: Aumento de muerte celular en larvas WT de 48 hpf expuestas a una mezcla binaria de FON y 1,2,4-T. Tras la incubación a partir de la etapa de blástula, se aprecia en larvas de 48 hpf un incremento de células muertas en la zona dorsal y de los ojos, además se puede ver muerte celular en las glándulas de eclosión (flecha) y el ano (punta de flecha). (30x).

En la figura 24 se observa un leve aumento en el número de células muertas en el tejido superficial de la cola y el ano en larvas de pez cebra de 48 hpf expuestas a una mezcla de FON (0,36 mg/L) y 1,2,4-T (1,2 g/L). Se aprecia también un aumento de tejido muerto en el ojo, en el cerebro, alrededor de la cápsula ótica y en la zona pericardial donde se encuentran las glándulas de eclosión. (Fig. 24, flechas).

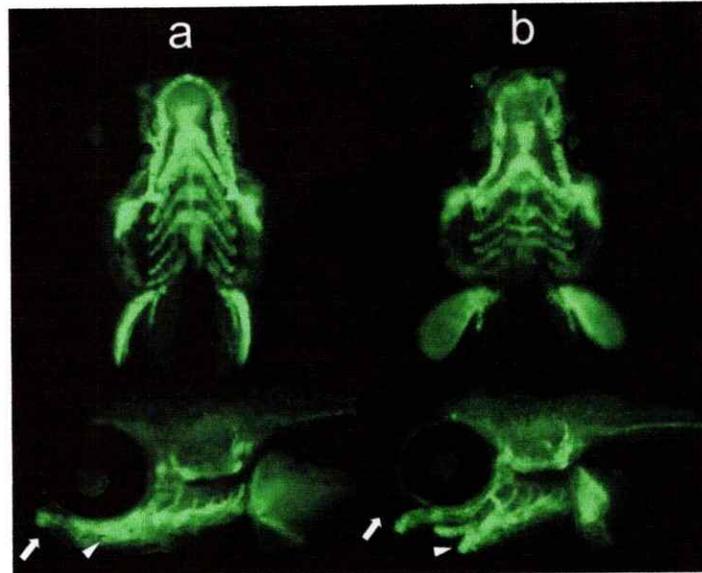


FIGURA 25: Larvas de 5 dpf de la línea transgénica Sox10::GFP, expuestas a una mezcla de triazoles durante la embriogénesis y hasta los 4 dpf. La exposición durante cuatro días a una mezcla de bajas concentraciones de FON, NOL y media de 1,2,4-T durante el desarrollo temprano produce alteración en el desarrollo de los elementos mandibulares en el pez cebra, al igual que lo hace la exposición a una concentración alta de cualquiera de estos compuestos. Flechas, cartílago de Meckel; puntas de flecha, ceratohideo. (38x).

La exposición de larvas de la línea transgénica Sox10::GFP, a la mezcla de triazoles en las concentraciones permitidas por la Nch 1333 Of. 1978, permitieron evaluar la aplicación los factores de seguridad que impone esta norma para proteger a los ecosistemas acuáticos, y evaluar su eficiencia como método para determinar niveles de contaminación permitidos.

En la figura 25 se observan los efectos teratogénicos producidos por la exposición a una mezcla de triazoles en una concentración dentro del margen permitido por la norma. Las malformaciones observadas no fueron tan severas como las vistas en larvas expuestas a concentraciones altas de cualquiera de los compuestos por separado, pero fueron detectadas en aproximadamente el 80% de los individuos expuestos, mientras que las malformaciones naturales observadas en los controles, no superaron el 2 o 4% de los casos, mostrando que estos compuestos al encontrarse en el medio, aún en bajas concentraciones, pueden actuar de manera sinérgica en la inducción de efectos teratogénicos en el pez cebra.

V. DISCUSION

El pez cebra ha sido intensamente utilizado como modelo vertebrado para estudios de toxicología y ecotoxicología (Zhang y col., 2003; Ton y col., 2006), y existen varios tests estandarizados para la evaluación de muestras de aguas y sustancias químicas, que lo utilizan para detectar efectos tóxicos y teratogénicos (OECD, 1998; ISO, 1996 y 2007). Así, en algunos países de la Comunidad Europea esta especie ya es utilizada como una herramienta de fiscalización de normas relacionadas a la calidad del agua, como el caso de Alemania donde se utiliza un test con embriones de pez cebra de 48 h para el monitoreo de aguas residuales (Braunbeck y col., 2005). Así mismo, ha sido propuesto el uso de líneas transgénicas de pez cebra para la detección de efectos sub-letales a modo de descifrar los mecanismos de acción de las sustancias tóxicas y detectar sustancias químicas en una matriz a partir de sus efectos tóxicos (Carvan y col., 2000; Perz-Edward y col., 2001; Blechinger y col., 2002). Este es el primer trabajo realizado en Chile que apunta a validar el uso de líneas transgénicas de pez cebra como herramienta para la detección de efectos tóxicos sub-letales de contaminantes acuáticos, como los pesticidas.

Los resultados obtenidos demuestran que la utilización de líneas transgénicas para realizar bioensayos de toxicidad poseen varias ventajas respecto al uso de ejemplares silvestres (no transgénicos). Así, permiten la detección de efectos sub letales *in vivo* y a tiempo real, sin la necesidad de tinciones histológicas o complejos marcajes moleculares. Algunos de los efectos que se pueden detectar mediante bioensayos con las líneas transgénicas utilizadas en este trabajo son:

- Neurotoxicidad (FoxD3::GFP)
- Malformación de estructuras que no son detectables a simple vista (Sox10::GFP, para esqueleto craneofacial y aletas pectorales).

- Cambio en la expresión de genes (todas las líneas).
- Alteración del desarrollo de órganos particulares, como la línea lateral (CldnB::GFP).

Una de las principales falencias de los bioensayos de exposición aguda es la imposibilidad de detectar con ellos efectos a largo plazo como alteración endocrina, carcinogénesis u otros. Por otra parte los ensayos agudos en adultos entregan información sobre efectos fisiológicos de las sustancias, pero no revelan efectos teratogénicos, para lo que se requieren ensayos con embriones. Tampoco revelan posibles efectos crónicos como neurotoxicidad o alteración endocrina, ya que, para ello las exposiciones debieran ser mas largas (duración equivalente al 10% de la vida del organismo) lo que conlleva dificultades de orden práctico. A partir de los resultados aquí presentados proponemos que los bioensayos con organismos transgénicos en etapas tempranas del desarrollo, presentan además de las ventajas propias de los bioensayos agudos, algunas ventajas de los ensayos crónicos (efectos permanentes). Estos bioensayos permiten en un corto tiempo de exposición, la detección de variados efectos sub-letales que pueden considerarse como crónicos por ser irreversibles (como teratogénesis y neurotoxicidad), y que posiblemente afecten el desempeño y reproducción de los individuos adultos y por tanto tengan efectos sobre distintos niveles de organización biológica (poblaciones y comunidades).

El uso del tipo de bioensayos propuestos aquí podría ser de gran utilidad en la evaluación de riesgo ambiental (ERA) de sustancias químicas, en el monitoreo de aguas continentales, efluentes de plantas de tratamiento o aguas para distintos usos como cultivos hidrobiológicos, agua potable o riego. Además, se agrega la ventaja de una metodología mucho más rápida y a un costo mucho menor que los bioensayos crónicos con organismos adultos, representando una posible alternativa que complemente o reemplace a las costosas y complejas técnicas analíticas.

5.1 Alteraciones morfológicas

Todos los tratamientos con triazoles y Citral, produjeron fenotipos morfológicos bastantes similares: leve retraso en el desarrollo embrionario, formación de edemas pericardiacos y vitelinos, reducción o pérdida de movilidad en las larvas, curvatura anormal de la columna vertebral, microftalmia, reducción en el tamaño de la cabeza, y disminución del ritmo cardíaco lo que posiblemente influyó en la formación de los edemas. Todos los efectos fueron dependientes de la concentración y duración de la exposición, y fueron comunes a todos los compuestos utilizados en los tratamientos a pesar de presentarse en distinto grado. Los fenotipos anteriormente descritos (excepción de la microftalmia y tamaño de cabeza reducido) se producen también tras la exposición a una gran cantidad de contaminantes acuáticos como metales pesados, dioxinas, antibióticos y pesticidas (Blechinger y col., 2002; Zhang, 2003; Ton y col., 2006) e incluso por cambios en las condiciones ambientales como variaciones en el pH o la concentración de oxígeno disuelto en el medio, por lo que pareciera ser que corresponden más bien a una respuesta fisiológica generalizada del organismo ante el estrés ambiental, y no dan información específica acerca del mecanismo de acción de una clase de agente en particular.

En el caso de los embriones tratados con concentración media y alta de Triazol libre durante la embriogénesis se observó hipopigmentación de la epidermis y la retina de las larvas (Fig. 4). A partir de lo observado es posible postular que la hipopigmentación se debe a desaparición o disminución de las células pigmentarias productoras de melanina (melanóforos), o a defectos en la síntesis o distribución de éste pigmento. Sin embargo de manera superficial se observa la presencia de melanóforos aparentemente en la cantidad y patrones correctos, aunque se aprecia una importante reducción en la intensidad del color de estas células en comparación con los controles al aumentar la concentración del compuesto.

5.2 Letalidad e inhibición de la eclosión.

Los estudios de dosis-respuesta realizados para determinar las concentraciones medias que producen letalidad e inhibición de la eclosión tras 96 horas de exposición a triazoles y Citral (LC_{50} 96 h y CI_{50} 96 h), mostraron que existe en el pez cebra una leve diferencia de sensibilidad en los distintos estadios del desarrollo ante la exposición a los distintos compuestos. Así, ante la exposición a 1,2,4-Triazol se demostró una mayor sensibilidad de los embriones, mientras que los tratamientos con FON y Citral reflejaron tener un efecto de toxicidad aguda mayor en las larvas. Este fenómeno puede deberse a cambios en las posibles vías de ingreso de los compuestos y/o diferencia en la biodisponibilidad de los distintos compuestos, posiblemente por causa de una serie de factores que incluyen la afinidad y el tamaño de las moléculas. Ya ha sido descrito que el corion del pez cebra posee cierta selectividad ante el tipo y tamaño de partículas y moléculas a las que permite el paso hacia el embrión (Braunbeck y col., 2005; Scholz y col., 2008), actuando como una barrera que protege parcialmente a los individuos en la etapa más frágil de su vida. Así probablemente FON y Citral por ser moléculas relativamente lipofílicas ($\log Kow$: 2,77 y 3,45 respectivamente) y poco solubles, sean adsorbidas por el corion, como ocurre con el lindano ($\log Kow$: 3,72) disminuyendo su biodisponibilidad para el embrión (Braunbeck y col., 2005), y teniendo mayor efecto sobre las larvas que una vez eclosionadas o cerca de hacerlo, ya no poseen esta protección o esta se encuentra debilitada por las enzimas coriolíticas que secreta la larva en este estadio; mientras que el 1,2,4-T que es soluble y de muy baja lipofiliidad ($\log Kow$: -0,58), podría quizás atravesar más fácilmente esta barrera proteica dejando más vulnerable a sus efectos a los embriones en sus primeras etapas de desarrollo.

A pesar de que la inhibición de la eclosión en los individuos expuestos a triazoles y Citral podría ser consecuencia de varios factores como la disminución de la movilidad de los individuos, endurecimiento del corion u otros, los ensayos de detección de muerte

celular en larvas de 2 dpf expuestas a las concentración medias y altas de triazoles, demostraron aumento de muerte en células ubicadas en la región ventral anterior del saco de vitelino, donde se ubican las glándulas de eclosión (Fig. 3), células de gran tamaño que son las responsables de secretar enzimas proteolíticas que permiten la degradación del corion y consecuentemente la eclosión del embrión entre los 2 y 3 dpf (datos no mostrados), así la muerte de estas células podría ser una causa importante en la inhibición de la eclosión en los individuos expuestos a triazoles.

Los datos de LC_{50} 96 h y CI_{50} 96 h permiten ordenar a los compuestos según su toxicidad en orden decreciente de la siguiente manera: Citral > FON > NOL > 1,2,4-T. Esta jerarquía sugiere que la degradación y el consecuente aumento en la solubilidad de los compuestos derivados de triazol, produce una disminución de la toxicidad aguda de estos en el pez cebra, lo que probablemente podría extrapolarse a otros organismos acuáticos.

5.3 Aumento de muerte celular.

Durante el desarrollo embrionario en vertebrados, y en etapas posteriores a la gastrulación (excepto en mamíferos), la muerte celular es un proceso natural y necesario para la modelación de órganos, tejidos y estructuras complejas como el sistema nervioso, el sistema inmune y el aparato mandibular en vertebrados. (Atchley & Hall, 1991; Zakeri & Lockshin, 2002; Penaloza y col., 2006). Las tinciones vitales realizadas en este trabajo con el colorante Anaranjado de acridina permiten detectar en tejidos y organismos vivos la presencia de células muertas, más no hace distinción entre células apoptóticas o necróticas, a pesar de esto permite analizar muy fácilmente de manera cualitativa la inducción de muerte celular tras la exposición a sustancias tóxicas, como los xenobióticos.

Los resultados muestran claramente que en embriones expuestos desde blástulas a las distintas concentraciones de 1,2,4-T, se induce muerte en la epidermis, en el SNC y en la copa óptica a las 24 hpf. Además se demostró que la exposición a bajas concentraciones

de los derivados de triazoles y Citral, producen un aumento de la muerte celular preferentemente a lo largo del tubo neural, haciendo presumir un efecto neurotóxico por parte de estos compuestos. No se apreció muerte en otras estructuras como el corazón o los arcos branquiales en esta etapa del desarrollo.

De estos resultados se desprende que las concentraciones calculadas a partir de los LC_{50} 96 h para embriones de pez cebra y la aplicación de los factores de seguridad definidos en la Nch 1.333, no son inocuas para los embriones de esta especie, ya que tras menos de 24 hexp los individuos presentan un importante aumento en la cantidad y distribución espacial de células muertas, lo que denota un serio efecto citotóxico de estos compuesto, aún en muy bajas concentraciones, las que podrían ser ambientalmente relevantes.

Cabe recalcar que a pesar de que estas respuestas no son acompañadas de efectos letales a los 4 dexp, las consecuencias de este tipo de efectos sub-letales a mediano y largo plazo para el desarrollo, supervivencia y desempeño de los individuos y las poblaciones es desconocido, y más aún las consecuencias para las comunidades acuáticas que se ven expuestas no a un solo compuesto, sino que a complejas mezclas de sustancias químicas presentes en la matriz acuática.

5.4 Malformaciones del esqueleto craneofacial.

Los resultados de las tinciones de cartílago y bioensayos con la línea transgénica Sox10::GFP, muestran claramente y con una buena correlación, que existe una fuerte alteración en el desarrollo de las estructuras mandibulares en individuos expuestos a triazoles y Citral en concentraciones medias y altas. Al comparar las dos técnicas, los bioensayos con la línea transgénica demostraron ser mucho más fáciles, eficientes y claros en cuanto a la visualización del desarrollo de la estructura mandibular y las aletas del pez cebra. De tal modo, proponemos el uso de este tipo de ensayos en lugar de tinciones histológicas como el Alcian Blue, ya que estas requieren del uso de varios reactivos, de un mayor tiempo de dedicación y la calidad de los resultados es variable según el protocolo y técnica utilizada. En cambio, los bioensayos realizados con larvas transgénicas demuestran una alta reproducibilidad (p. ej., no varían mas que levemente en la intensidad de la fluorescencia emitida por organismos homocigotos y heterocigotos), y se facilita la evaluación de un alto número de individuos.

El análisis de las malformaciones craneofaciales encontradas en los bioensayos hechos en distintas etapas del desarrollo, presentan algunas incongruencias en los resultados. Así, en los bioensayos con Citral, se observó que en individuos analizados en 1 dpf y 3 dpf, se encuentran anormalidades sólo en aquellos tratados con la concentración alta. Sin embargo, al evaluar a los individuos de 5 dpf, el efecto es evidente en todos los tratamientos. Estas incongruencias se deben probablemente a la aparición tardía del efecto, posiblemente por un retraso en el desarrollo de los individuos tratados. Se concluye que el análisis de este efecto teratogénico debe ser realizado solamente a partir de los 5 dpf cuando esta estructura craneofacial ya posee una arquitectura bien definida y los efectos de retraso en el desarrollo son menos obvios y no logran alterar los resultados.

La alteración del desarrollo craneofacial puede deberse a la perturbación de distintos procesos celulares, como la migración, proliferación o diferenciación de las células de la

cresta neural craneal (CNC). Así, es posible que estos compuestos interfirieran a uno o más de estos procesos, y posiblemente los mecanismos de acción de triazoles y Citral no sean los mismos. Esto podría explicar también en parte la observación anterior.

Ha sido propuesto que el mecanismo implicado en la inducción de malformaciones craneofaciales por parte de triazoles es la alteración de la migración de las CNC hacia los arcos faríngeos, causada por la alteración de los niveles endógenos de ácido retinóico, específicamente por la inhibición de su degradación lo que llevaría a un aumento en la concentración de éste dentro del embrión (Menegola y col, 2006). Aunque los resultados aquí presentados no indican cuales son los mecanismos implicados en la alteración del desarrollo craneofacial inducido por triazoles en el pez cebra, si sugieren un mecanismo muy similar al antes descrito, ya que en los individuos expuestos a altas concentraciones de NOL se observa una fusión de los elementos mandibulares superiores e inferiores, los que derivan de los arcos branquiales 1 y 2 y ya se ha visto este tipo de fusiones en ratones (Menegola, 2004). A partir de los datos también se podría predecir un mecanismo similar para las malformaciones inducidas por Citral, ya que ante la exposición a altas concentraciones de éste, se observó que en embriones de 1 dpf las corrientes migratorias de las CNC parecieran fusionarse, en comparación con los controles (Fig. 15). Lo mismo ha sido descrito en ratones para compuestos derivados de triazol (Menegola y col., 2000, 2003 y 2005).

5.5 Efectos sobre el Sistema Nervioso Periférico

Las interacciones entre glia y axones son indispensables para el desarrollo y supervivencia del sistema nervioso en vertebrados (Gilmour y col, 2002). En el caso del nervio de la LLp de peces y anfibios, las células de Schwann hacen posible la mantención del sistema mecanosensorial, la Línea Lateral (LL). La mecanotransducción de las neuronas de este órgano (células ciliadas) es indispensable para las respuestas oportunas

del individuo ante los estímulos mecánicos de su entorno, por lo que es éste sistema el que permite a los peces la natación en cardumen y el escape ante los depredadores, conductas esenciales para su sobrevivencia.

Los embriones de la línea transgénica FoxD3::GFP expuestos a FON y 1,2,4-T, durante las primeras 48 horas de desarrollo, presentaron una disminución en el número de células GFP positivas (células de Schwann que recubren el nervio de la LLp), lo que puede significar la ausencia de estas células, o bien la no diferenciación de las mismas. Este tipo de alteración podría traer graves consecuencias en la supervivencia y desempeño en todas las etapas de la vida de los peces. Los efectos observados varían proporcionalmente a la concentración del químico.

Estos resultados se correlacionan con antecedentes en mamíferos, de que la exposición prenatal a 1,2,4-T induce efectos neurotóxicos, que se reflejan en lesiones neuropatológicas en el cerebro y SNP de ratas y conejos (USEPA, 2006d).

5.6 Efecto en derivados de la Cresta Neural

Los efectos observados tras la exposición temprana a dos derivados de triazol (FON y NOL) y a Triazol libre (1,2,4-T) recaen en tejidos derivados de la CN:

1. Esqueleto mandibular: derivado de la CN Craneal.
2. Células de Schwann: derivadas de la CN Troncal.
3. Melanóforos: derivados de CN la Troncal.

Esto concuerda con la evidencia existente en anfibios y mamíferos, en los que se ha detectado que los efectos teratogénicos inducidos por triazoles recaen principalmente en tejidos y estructuras derivados de la CN, aunque este trabajo es el primero en demostrar un efecto sobre las células pigmentarias (melanóforos e iridióforos).

5.7 Citral interrumpe el desarrollo de la Línea Lateral posterior y produce duplicación de la cola en el pez cebra.

Embriones de la línea transgénica CldnB::GFP que expresan GFP en las células del primordio de la LL y sus derivados, fueron expuestos a una alta concentración de Citral durante la embriogénesis y presentaron una seria alteración en el desarrollo de este órgano. Estos individuos, a los 3 dpf presentaron en promedio la mitad del número de neuromastos depositados en comparación con los controles, depositándose solamente los primeros dos o tres neuromastos de la LLp, es decir, los más anteriores.

Al igual que las malformaciones antes reportadas, este fenómeno podría tener variadas causas: (a) interferencia de los compuestos ensayados sobre la migración del primordio, (b) inhibición de la proliferación celular o (c) deficiencia en el depósito de los proneuromastos. Aunque a partir de los resultados obtenidos no se puede extrapolar un mecanismo causante de este efecto, existen antecedentes de que retinoides naturales y artificiales son capaces de inhibir en humanos la expresión de ciertos receptores de quimioquinas (CCR7 y CXCR4), que son esenciales para la correcta migración de células dendríticas en humanos y del primordio de la LLp en el pez cebra (Villablanca y col., 2008), permitiendo a estas últimas células moverse a través del miosepto horizontal detectando ciertas señales químicas. Así, es posible que la alteración de la vía del ácido retinoico mediante la incubación con Citral altere la expresión de estos receptores impidiendo que el primordio encuentre su ruta migratoria normal y quede detenido o cambie su ruta migratoria, desviándose del miosepto horizontal.

El ácido retinoico (RA) es un derivado de la vitamina A, esencial para la formación de patrones corporales en vertebrados. Efectos de delección o duplicación de estructuras han sido reportados en vertebrados expuestos a RA exógeno, efecto que cambia según la dosis. Ha sido descrito que el exceso de RA induce la duplicación homeótica de las aletas

pectorales en los peces *Danio rerio* y *Fundulus heteroclitus* y que la inhibición de la síntesis de este morfógeno produce una eliminación de las mismas (Vandersea y col., 1998) .

Los resultados aquí presentados demuestran que la exposición al inhibidor de la síntesis de RA, Citral, induce una duplicación de la cola en embriones de pez cebra expuestos a concentraciones tan bajas como 6,6 μM , efecto que presenta un amplio rango de severidad en los individuos que lo presentan (Fig. 22). Los datos obtenidos en este trabajo son netamente descriptivos, por lo que no permiten postular si acaso este efecto se relaciona o no con la interrupción de la señalización de RA, esto es bastante probable, ya que la interrupción o la inducción de este morfógeno suele tener efectos sobre el patrón corporal de los organismos.

5.8 Sinergia y factores de seguridad de la Nch 1333 Of. 1978

Los resultados de la tinción para detectar muerte celular y de bioensayos con la línea transgénica Sox10::GFP en embriones y larvas de pez cebra expuestas a una mezcla de triazoles, demuestran que las concentraciones permitidas por la Nch 1333 Of. 1978, no son inocuas y que la mezcla de estos compuestos ejerce un efecto sinérgico sobre los individuos expuestos, generando respuestas muy similares a las observadas tras la exposición a concentraciones mayores de los compuestos proporcionados por separado.

La base teórica de los factores de seguridad utilizados en esta norma para definir concentraciones límite de contaminantes acuáticos, viene de estándares utilizados por la Comunidad Europea (CE). En su contexto original, la aplicación de factores de seguridad sobre datos toxicológicos (como el LC_{50}), para la Evaluación de Riesgos Ambientales (ERA) por parte de sustancias químicas, parte con al menos dos importantes presunciones sobre los ecosistemas acuáticos:

- La sensibilidad del ecosistema depende de la especie más sensible.

- La protección de la estructura del ecosistema, protege la función de las comunidades.

Estas premisas permiten que datos obtenidos a partir de una sola especie, puedan ser extrapolados a un nivel de organización biológica superior, como los ecosistemas. Así, es aceptado que la protección de la especie más sensible protegerá la estructura y por ende la función del ecosistema acuático.

Debido a que generalmente la cantidad de datos disponibles para predecir efectos sobre los ecosistemas, es limitado y se reduce mayoritariamente a datos provenientes de tests de toxicidad aguda, se deben utilizar factores de seguridad. El objetivo de usar estos factores es predecir una concentración bajo la cual exista muy baja probabilidad de ocurrir un efecto inaceptable. Entonces a esta concentración calculada, al igual que en la Nch 1333 Of. 1978, a partir de bioensayos y la aplicación de factores de seguridad, se le denomina PNEC (por sus siglas en inglés) o Concentración sin efectos previstos. Para poder hacer con el menor error o riesgo posible esta extrapolación, la magnitud de los factores de seguridad debe considerar varias incertezas:

- Variación de los datos de toxicidad entre distintos laboratorios y dentro de un mismo laboratorio.
- Variabilidad biológica entre especies e intraespecífica.
- Extrapolación de los datos de toxicidad aguda a datos de toxicidad crónica.
- Extrapolación de los datos de laboratorio a el impacto en terreno (posibles efectos de aditividad, sinergia y antagonismo por la presencia de mezclas en el ambiente).

Según la CE, el valor de los factores de seguridad y el valor sobre el cual estos deben ser aplicados (LC_{50} o $NOEC^4$) para el cálculo de la PNEC, depende de la naturaleza, cantidad y relevancia de los datos disponibles.

En la Nch 1333 Of. 1978 esta definido de manera muy somera el cálculo de los valores límite para contaminantes acuáticos, ya que, en ella no se hace mención sobre qué organismo (especie o nivel trófico) o mediante qué método, los $LTm96$ (LC_{50}) deben ser calculados, y los factores de seguridad son bastante bajos al compararlos con los sugeridos por la CE (CE, 2003). A partir de esta información, y la comparación con la normativa chilena, creo que es necesaria la revisión de esta norma y sobre todo del método que esta propone para determinar las concentraciones permisibles de compuestos químicos en el medio ambiente acuático.

⁴NOEC = Concentración sin efectos observados, que equivale a la concentración más alta en la cual no se observó respuesta en un bioensayo determinado.

VI. CONCLUSIONES

1. La exposición a derivados de triazol y Citral durante la embriogénesis de *Danio rerio* induce diversos efectos que incluyen la formación de edemas, curvatura anormal del cuerpo, microftalmia y reducción del tamaño de la cabeza en concentraciones equivalentes al LC₅₀ 96 h.
2. La exposición a 1,2,4-T durante la embriogénesis reduce la pigmentación normal en la epidermis de todo el cuerpo y la retina en larvas de *Danio rerio*.
3. Existe diferencia en la sensibilidad del pez cebra ante la exposición a contaminantes químicos según el estadio del desarrollo, resultado que se correlaciona con la presencia e integridad del corion y la lipofilidad de las moléculas.
4. NOL y 1,2,4-T presentan una menor toxicidad aguda en el pez cebra que FON, siendo el Triazol libre el menos tóxico entre los analizados.
5. La toxicidad aguda de Citral es mayor a cualquiera de los triazoles estudiados, para las larvas de pez cebra.
6. Las concentraciones calculadas como permitidas según la Nch 1333 Of. 1978 para FON (0,36 mg/L), NOL (0,55 mg/L), 1,2,4-T (1,2 g/L) y Citral (0,04 mg/L), inducen un efecto citotóxico en tejidos superficiales y profundos, especialmente a lo largo del tubo neural (neurotóxico), en embriones de 24 hpf expuestos desde el estadio de blástula.
7. El uso de líneas transgénicas presenta una mejor resolución y menor variabilidad en la detección de malformaciones craneofaciales, al compararse con el uso de tinciones histológicas.
8. La exposición temprana a triazoles induce malformación de las estructuras craneofaciales derivadas de las CNC en el pez cebra, al igual que en anfibios y mamíferos.

9. La exposición temprana a FON y 1,2,4-T induce anomalías en las células de Schwann que recubren al nervio de la LLp, y en el caso de 1,2,4-T también desorganización y disminución de precursores de iridióforos.
10. La exposición a Citral durante el desarrollo temprano altera el depósito de neuromastos por parte del primordio de la LLp y produce duplicación de la cola en el pez cebra.
11. La aplicación de los factores de seguridad definidos en la Nch 1333 Of. 1978: 1/10 y 1/100 de la LTM96, calculados para embriones de pez cebra, no definen una concentración inocua para los individuos.

VII. REFERENCIAS

- Aleck K.A & Bartley D. L. 1997. Multiple malformation syndrome following fluconazole use in pregnancy: Report of an additional patient. *American Journal of Medical Genetics* 72:253-256.
- Angier, J. y Embry, M. 2005. Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Triadimefon. USEPA. PC Code: 109901.
- Ankley G.T., Jensen K.M., Durhan E.J., Makynen E.A., Butterworth B.C., Kahl M.D., Villeneuve D.L., Linnam A., Gray L.E., Cardon M., Wilson V.S. 2005. Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Science* 86:300-308.
- Atchley W.R., & Hall B.K. 1991. A model for development and evolution of complex morphological structures. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 66:101-157.
- Báez M.E., Rodríguez M., Lastra O., Contreras O. 1997. Solid Phase Extraction of Organophosphorus, Triazine, and Triazole-Derived Pesticides from Water Samples. A Critical Study. *Journal of High Resolution Chromatography* 20: 591-596.
- Bliss C.I. 1934. The Method of Probits. *Science, New Series* 79:38-39.
- Blechinger S.R., Warren J.T. Jr, Kuwada J.Y., Krone P.H. 2002. Developmental toxicology of cadmium in living embryos of a stable transgenic zebrafish line. *Environmental Health Perspectives* 110:1041-1046.
- Braunbeck T, Böttcher M., Hollert H., Kosmehl T., Lamer E., Leist E., Rudolf M., Seitz N. 2005. Towards an alternative for the acute fish LC₅₀ test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species—an update. *ALTEX* 22:87-102.
- Cade T.J., Lincer J.L, White C.M., Roseneau D.G., y Swartz L.G. 1971. DDE residues and eggshell changes in Alaskan Falcons and hawks. *Science* 172:955-957.
- Carvan M.J. 3rd, Dalton T.P., Stuart G.W., Nebert D.W. 2000. Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. *New York Academy of Sciences* 919:133-147.
- Cavieres M.F. 2004. Exposición a pesticidas y toxicidad reproductiva y del desarrollo en humanos. Análisis de la evidencia epidemiológica y experimental. *Revista Médica de Chile* 132: 873-879.

CONAMA, Comisión Nacional del Medio Ambiente. 2004. Guía para el Establecimiento de las Normas Secundarias de Calidad Ambiental para Aguas Continentales Superficiales y Marinas. Gobierno de Chile.

Connor MJ. 1988. Oxidation of retinol to retinoic acid as a requirement for biological activity in mouse epidermis. *Cancer Research*. 15:7038-7040.

Di Renzo F., Broccia M.L., Giavini E., Menegola E. 2007. Citral, an inhibitor of retinoic acid synthesis, attenuates the frequency and severity of branchial arch abnormalities induced by triazole-derivative fluconazole in rat embryos cultured in vitro. *Reproductive Toxicology* 24:326-332.

EC, European Communities. Institute for Health and Consumer Protection 2003. Technical guidance on risk assessment.

Gilbert S.F 2006. Neural crest cells and axonal specificity, en Sinauer Associates Inc. (eds). *Developmental Biology*, 8ª Edición, pp 407-424.

Gilmour D., Maischein H.M., Nusslein-Volhard C. 2002. Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron* 34:577-588.

Goetz A., Ren H., Schmid J., Blystone C., Thillainadarajah I., Best D., Nichols H., Strader L., Wolf D., Narotsky M., Rockett J. and Dix D.J. 2007. Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat. *Toxicological Sciences* 95:227-239.

Groppelli S., Pennati R., De Bernardi F., Menegola E., Giavini E., Sotgia C. 2005. Teratogenic effects of two antifungal triazoles, triadimefon and triadimenol, on *Xenopus laevis* development: craniofacial defects. *Aquatic Toxicology* 73:370-381.

Hernández P.P., Moreno V., Olivari F.A., Allende M.L. 2006. Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hearing Research* 213:1-10.

INN, Instituto Nacional de Normalización. Norma Chilena Oficial 1.333: Requisitos de calidad de agua para diferentes usos. Ministerio de Obras Públicas, Gobierno de Chile. 1978.

INN, Instituto Nacional de Normalización. Norma Chilena Oficial 409: Agua Potable, Parte 1: Requisitos. Ministerio de Obras Públicas, Gobierno de Chile. 1984.

ISO, International Organization for Standardization. ISO 7346-21:1996. Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Part 2: Semi-static method.

ISO, International Organization for Standardization. ISO 15088:2007. Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (Danio rerio).

Lopez-Rangel E, Van Allen MI. 2005. Prenatal exposure to fluconazole: an identifiable dysmorphic phenotype. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology 73:919-923

Lepesheva G. & Waterman M. 2007. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. Biochimica et Biophysica Acta 1770: 467-477.

Kimmel C., Ballard W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. Developmental Dynamics 203:253-310.

Menegola E., Broccia M.L., Di Renzo F., Prati M., Giavini E. 2000. In vitro teratogenic potential of two antifungal triazoles: triadimefon and triadimenol. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Anima 36:88-95.

Menegola E., Broccia M.L., Di Renzo F., Prati M., Giavini E. 2003. Pathogenic pathways in fluconazole-induced branchial arch malformations. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology 67:116 –124

Menegola E., Broccia M.L., Di Renzo F., Massa V., Giavini E. 2004. Relationship between hindbrain segmentation, neural crest cell migration and branchial arch abnormalities in rat embryos exposed to fluconazole and retinoic acid in vitro. Reproductive Toxicology 18: 121-130.

Menegola E., Broccia M.L., Di Renzo F., Massa V., Giavini E. 2005. Craniofacial and axial skeletal defects induced by the fungicide triadimefon in the mouse. Birth Defects Research (Part B) 74:185–195.

Menegola E., Broccia M.L., Di Renzo F., Giavini E. 2006. Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects. Reproductive Toxicology 22: 186–195.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. 1998. Guideline for the testing of chemicals. Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. 2006. Guideline for the testing of chemicals. Fish Embryo Toxicity (FET) Test. 1^o version.

Orrego JP. El estado de las aguas terrestres en Chile: cursos y aguas subterráneas. Fundación Terram. (2002).

Papis E., Bernardini G., Gornati R., Menegola E., Prati M. 2007. Gene expression in *Xenopus laevis* embryos after Triadimefon exposure. *Gene Expression Patterns* 7:137-142.
Penalosa C., Lin L., Lockshin R.A., Zakeri Z. 2006. Cell death in development: shaping the embryo. *Histochemistry and Cell Biology* 126:149-158.

Pennati R., Groppelli S., Zega G., Biggiogero M., De Bernardi F., Sotgia C. 2006. Toxic effects of two pesticides, Imazalil and Triadimefon, on the early development of the ascidian *Phallusia mammillata* (Chordata, Ascidiacea). *Aquatic Toxicology* 79:205-212.

Perz-Edwards A., Hardison N.L., Linney E. 2001. Retinoic acid-mediated gene expression in transgenic reporter zebrafish. *Developmental Biology* 229:89-101.

Pursley T.J., Blomquist I.K., Abraham J., Andersen H.F., Bartley J.A. 1996. Fluconazole-induced congenital anomalies in three infants. *Clinical Infectious Diseases* 22:336-340

Rojas A., Ojeda M.E., Barraza X. 2000. Malformaciones congénitas y exposición a pesticidas. *Revista médica de Chile* 128: 399-404.

SAG, Servicio Agrícola y Ganadero. 2007. Lista de plaguicidas autorizados en Chile. Disponible en: <http://www.sag.gob.cl/>

Schilling T., Piotrowski T., Grandel H., Brand M., Heisenberg C.P., Jiang Y., Beuchle D., Hammerschmidt M., Kane D.A., Mullins M.C., van Eeden F., Kelsh R., Furutani-Seiki M., Granato M., Haffter P., Odenthal J., Warga R., Trowe T., Nüsslein-Volhard C. 1996. Jaw and branchial arch mutants in zebrafish I: branchial arches. *Development* 123:329-344.

Schuh T., Hall B.L., Kraft J.C., Privalsky M.L., Kimelman D. 1993. V-erbA and Citral reduce the teratogenic effects of all-*trans*retinoic acid and retinol, respectively, in *Xenopus* embryogenesis. *Development* 119:785-798.

Singh N. 2005. Factors Affecting Triadimefon Degradation in Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:70-75.

Thompson L. 2002. Panel: Nuevas alternativas en el armamento anti infeccioso que el clínico debe conocer. *Antifúngicos. Revista Chilena de Infectología* V.19 supl.1.

Ton C., Lin Y., Willett C. 2006. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 76:553-567.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. 2006a. Reregistration Eligibility Decision for Triadimefon and Tolerance Reassessment for Triadimenol. List B. Case N° 2700.

USEPA, United States Environmental Protection Agency, 2006b. Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Triadimefón.

USEPA, United States Environmental Protection Agency, 2006c. Triadimefon. Preliminary Human Health Risk Assessment.

USEPA, United States Environmental Protection Agency, 2006d. 1,2,4-Triazole, Triazole Alanine, Triazole Acetic Acid: Human Health Aggregate Risk Assessment in Support of Reregistration and Registration Actions for Triazole-derivative Fungicide Compounds.

Vandersea M., Fleming P., McCarthy R.A., Smith D.G. 1998. Fin duplications and deletions induced by disruption of retinoic acid signaling. *Development Genes and Evolution* 208:61–68.

Vila I. & Molina X. 2006. Manual de Evaluación de Calidad de Aguas. CENMA, Centro Nacional del Medio Ambiente. Primera Edición.

Villablanca E.J., Zhou D., Valentinis B., Negro A., Raccosta L., Mauri L., Prinetti A., Sonnino S., Bordignon C., Traversari C., Russo V. 2008. Selected natural and synthetic retinoids impair CCR7- and CXCR4-dependent cell migration in vitro and in vivo. *Journal of Leukocyte Biology* 84:871-879.

Vosylienė M. 2007. Review of the methods for acute and chronic toxicity assesment of single substances, effluents and industrial waters. *Acta Zoológica Lituanica* 17:3-15.

White R.J., Nie Q., Lander A.D., Schilling T.F. 2007. Complex regulation of cyp26a1 creates a robust retinoic acid gradient in the zebrafish embryo. *PlosBiology* 5:e304.

Zakeri Z., Lockshin R.A. 2002. Cell death during development. *Journal of Immunological Methods* 265:3-20.

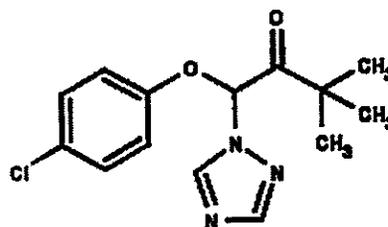
Zhang C., Willett C., Fremgen T. 2003. Zebrafish: an animal model for toxicological studies. *Current Protocols in Toxicology* 1.7.1-1.7.18.

A N E X O S

Anexo A: Información y propiedades fisicoquímicas de los compuesto ensayados.

1) TRIADIMEFÓN

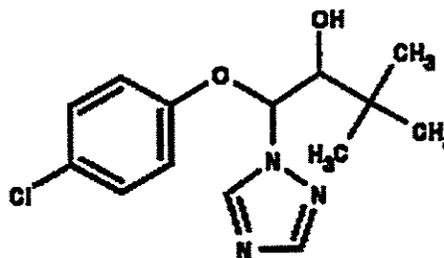
Sinónimos: Adifón, Amiral, Azocene, Bayleton, Haleton, Typhon, FON.
Nombre Sistemático: 1-(4-clorofenoxy)-3,3 dimetil-1-(1H-1, 2, 4- triazol- 1 -il) butanona
Nº de Registro CAS: 43121-43-3
Fórmula Molecular: C₁₄H₁₆ClN₃O₂
Masa molar: 293.76 g/mol



Propiedades Fisicoquímicas	Valor	Temperatura
Solubilidad en agua	71,5 mg/L	25 °C
Punto de fusión	82 °C	
Presión de vapor	1,50E-08 mm Hg	25 °C
Coefficiente de partición octanol-agua (Log Kow)	2,77	

2) TRIADIMENOL

Sinónimos: Bayfidan, Baytan, KWG 0519, Summit, Triafol, NOL.
Nombre Sistemático: (1RS, 2RS; 1RS, 2SR)-1-(4-clorofenoxy)-3,3-dimetil -1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ol
Nº de Registro CAS: 55219-65-3
Fórmula Molecular: C₁₄H₁₈ClN₃O₂
Masa molar: 295,77 g/mol



Propiedades Fisicoquímicas	Valor	Temperatura
Solubilidad en agua	120 mg/L	20 °C
Punto de fusión	124 °C	
Presión de vapor	3.10E-10 mm Hg	20 °C
Coefficiente de partición octanol-agua (Log Kow)	2,9	

3) 1,2,4-TRIAZOL

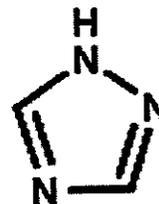
Sinónimos: Triazole, Triazol libre, 1,2,4-T.

Nombre Sistemático: 1,2,4-triazol

Nº de Registro CAS: 37306-44-8

Fórmula Molecular: C₂H₃N₃

Masa molar: 69,07 g/mol



Propiedades Fisicoquímicas	Valor	Temperatura
Solubilidad en agua	547 g/L	22 °C
Punto de fusión	119 – 122 °C	
Punto de ebullición	259 – 261 °C	
Coefficiente de partición octanol-agua (Log Kow)	-0,58	

4) CITRAL

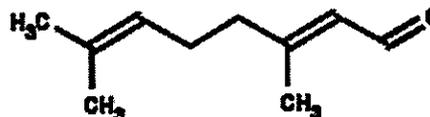
Sinónimos: AI3-01011, BRN 1721871, Lemsyn GB, NSC 6170.

Nombre Sistemático: 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-

Nº de Registro CAS: 5392-40-5

Fórmula Molecular: C₁₀H₁₆O

Masa molar: 152,24 g/mol



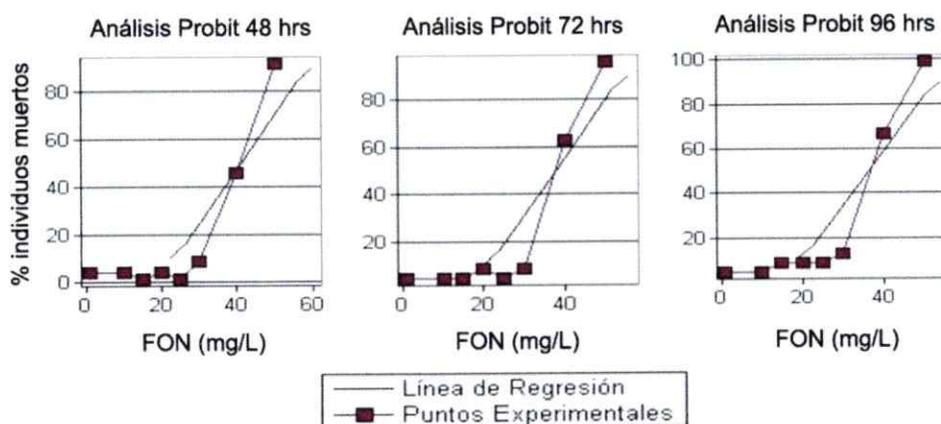
Propiedades Fisicoquímicas	Valor	Temperatura
Solubilidad en agua	1340 mg/L	37 °C
Punto de fusión	< -10 °C	
Punto de ebullición	227 °C	
Presión de vapor	0.0913 mm Hg	25 °C
Coefficiente de partición octanol-agua (Log Kow)	3,45	

Anexo B: Datos obtenidos en el Analisis P/robit.

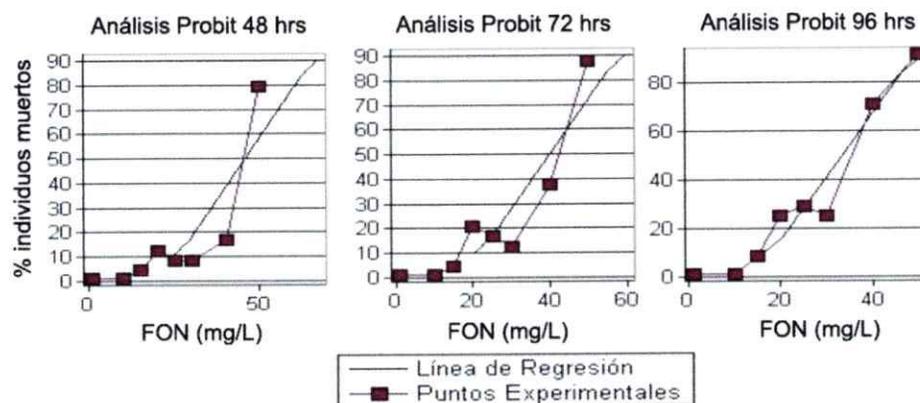
Triadimefón: Datos obtenidos con el software estadístico Stat Plus 2007.

TRIADIMEFÓN	BIOENSAYOS EN EMBRIONES ⁵			BIOENSAYOS EN LARVAS ⁶			
	Unidad: mg/L	48 hexp	72 hexp	96 hexp	48 hexp	72 hexp	96 hexp
LD50		41,10	37,69	36,37	45,57	39,92	33,31
Error Estándar LD50		2,47	2,35	1,80	2,15	1,99	1,56
LD50 LCL		36,17	33,01	32,80	41,32	35,98	30,22
LD50 UCL		46,03	42,38	39,93	49,82	43,85	36,40
Beta		0,10	0,07	0,07	0,06	0,07	0,08
Alfa		2,20	2,33	2,39	2,26	2,41	2,49
Error Estándar Beta		0,00	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

Curvas dosis-respuesta en embriones expuestos a FON:



Curvas dosis-respuesta en larvas expuestas a FON:



⁵ Bioensayos realizados desde la etapa de blástula.

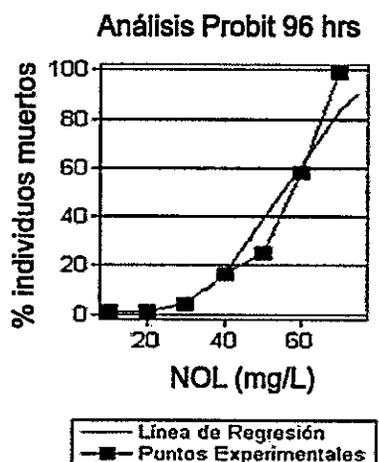
⁶ Bioensayos realizados desde las 48 hpf.

LCL: Limite inferior del Intervalo de Confianza; UCL: Limite superior del Intervalo de Confianza.

Triadimenol: Datos obtenidos con el software estadístico Stat Plus 2007.

TRIADIMENOL	BIOENSAYOS EN EMBRIONES ⁷			BIOENSAYOS EN LARVAS ⁸		
	48 hexp	72 hexp	96 hexp	48 hexp	72 hexp	96 hexp
Unidad: mg/L						
LD50	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	55,21
Error Estándar LD50	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	2,57
LD50 LCL	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	50,09
LD50 UCL	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	60,32
Beta	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0,07
Alfa	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	1,41
Error Estándar Beta	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0,02

Curvas dosis-respuesta en larvas expuestas a NOL:



⁷ Bioensayos realizados desde la etapa de blástula.

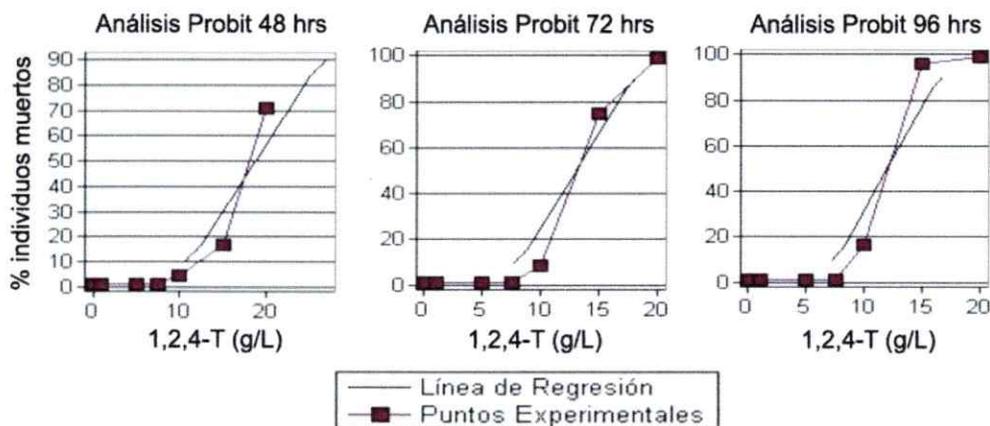
⁸ Bioensayos realizados desde las 48 hpf.

LCL: Limite inferior del Intervalo de Confianza; UCL: Limite superior del Intervalo de Confianza.

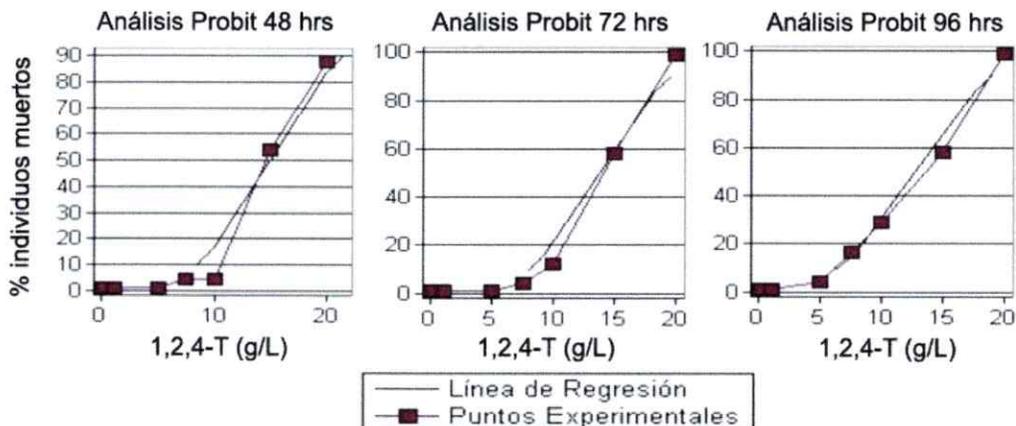
1,2,4-Triazol: Datos obtenidos con el software estadístico Stat Plus 2007.

1,2,4-TRIAZOL	BIOENSAYOS EN EMBRIONES ⁹			BIOENSAYOS EN LARVAS ¹⁰			
	Unidad: g/L	48 hexp	72 hexp	96 hexp	48 hexp	72 hexp	96 hexp
LD50		18,71	13,00	12,01	14,93	13,79	12,72
Error Estándar LD50		1,30	0,83	1,09	1,04	0,93	0,82
LD50 LCL		16,10	11,33	9,77	12,84	11,93	11,08
LD50 UCL		21,31	14,68	14,25	17,02	15,66	14,37
Beta		0,16	0,25	0,27	0,20	0,22	0,20
Alfa		2,05	1,82	1,80	2,07	1,97	2,43
Error Estándar Beta		0,04	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05

Curvas dosis-respuesta en embriones expuestos a 1,2,4-T:



Curvas dosis-respuesta en larvas expuestas a 1,2,4-T:



⁹ Bioensayos realizados desde la etapa de blástula.

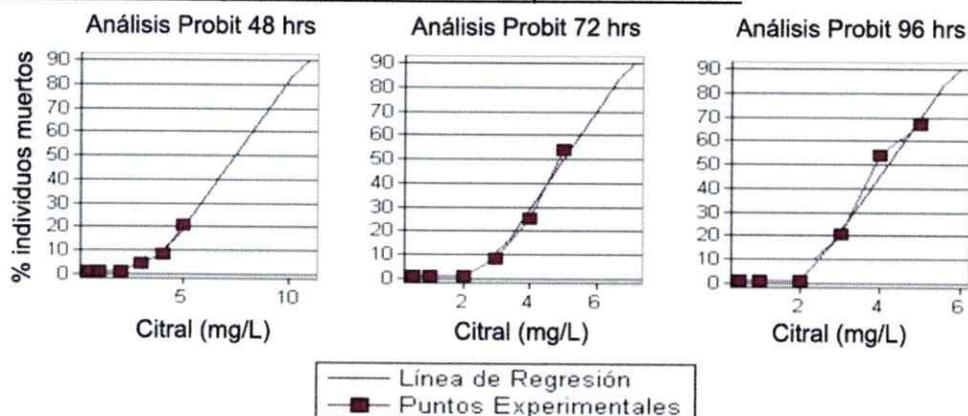
¹⁰ Bioensayos realizados desde las 48 hpf.

LCL: Limite inferior del Intervalo de Confianza; UCL: Limite superior del Intervalo de Confianza.

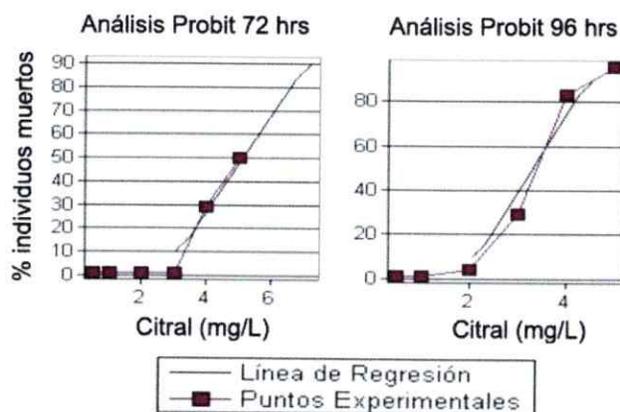
Citral: Datos obtenidos con el software estadístico Stat Plus 2007.

CITRAL	BIOENSAYOS EN EMBRIONES ¹¹			BIOENSAYOS EN LARVAS ¹²		
	48 hexp	72 hexp	96 hexp	48 hexp	72 hexp	96 hexp
Unidad: mg/L						
LD50	7,46	5,01	4,18	Nd	4,28	3,32
Error Estándar LD50	0,55	0,27	0,24	Nd	0,26	0,20
LD50 LCL	6,34	4,47	3,71	Nd	3,75	2,91
LD50 UCL	8,57	5,56	4,65	Nd	4,81	3,72
Beta	0,37	0,61	0,71	Nd	0,78	1,03
Alfa	2,25	1,95	2,05	Nd	1,68	1,60
Error Estándar Beta	0,19	0,18	0,18	Nd	0,19	0,22

Curvas dosis-respuesta en embriones expuestos a Citral:



Curvas dosis-respuesta en larvas expuestas a Citral:



¹¹ Bioensayos realizados desde la etapa de blástula.

¹² Bioensayos realizados desde las 48 hpf.

LCL: Limite inferior del Intervalo de Confianza; UCL: Limite superior del Intervalo de Confianza.