

UCH-FC  
MAB-B  
D331  
C.1



**BIOENSAYOS CON EMBRIONES DE PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*) COMO  
HERRAMIENTAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES  
TOXICOLÓGICAS DE CUERPOS DE AGUA Y MECANISMOS DE INHIBICIÓN DE  
LA ECLOSIÓN.**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

**MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

por

**Javiera Fernanda De la Paz Montt**

Marzo, 2012

Director de Tesis: Dr. Miguel Allende C.  
Co-directora: Dra. Carmen Gloria Feijoo.

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGISTER**

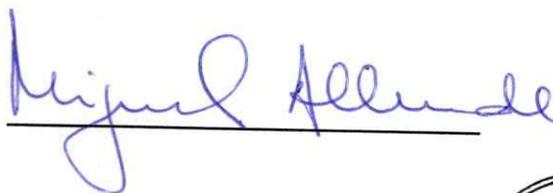
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata.

**JAVIERA FERNANDA DE LA PAZ MONTT**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 16 de Enero de 2012.

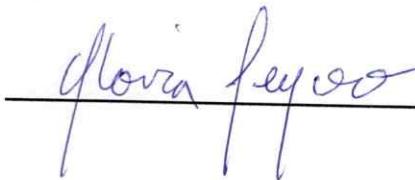
**Director de Tesis**

*Dr. Miguel Allende Connelly*



**Co-Directora de Tesis**

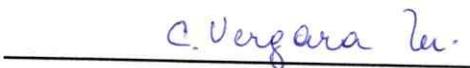
*Dra. Carmen Gloria Feijoo*



**Comisión de Evaluación de la Tesis**

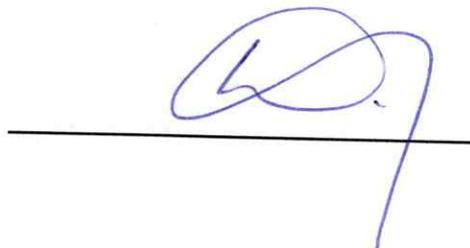
**Presidenta Comisión**

*Dra. Cecilia Vergara*



**Corrector**

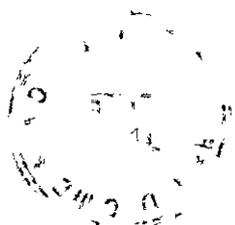
*Dr. Nicolás Giuliani*





*A Marcos y Luis, con amor.....*

## BIOGRAFÍA



En 1983 nací en Santiago. Durante mi época escolar pase por varios establecimientos, donde conocí grandes personas. El año 1999 llega a mi vida mi hijo Marcos, y el 2010 para completarla mi marido Luis Guzmán. El año 2003 ingreso a la carrera de Biología Ambiental en la Universidad de Chile y el 2004 al laboratorio del Dr. Allende. Obtuve la licenciatura en Cs. Ambientales el 2008, y el título de Bióloga Ambiental el 2009. En 2011 vi nacer legalmente a la Corporación para el Desarrollo de las Ciencias Ambientales, mi gran proyecto personal.

## AGRADECIMIENTOS



Quisiera agradecer y dedicar este trabajo a mi familia, por ser mi apoyo y aguantarme durante todo este tiempo, sobre todo a mi marido Luis y mi hijo Marcos, quienes se han encargado de darme alegrías y razones. A mis padres, mi abuela y mis bellas hermanas por estar siempre preocupados de mi y comprender que yo soy así.

A mi tutor Miguel Allende por apoyarme, creer y confiar en mi, generalmente más que yo misma.

A mi co-tutora Carmen Gloria Feijoo, por sus consejos y correcciones llenos de cariño y ternura, y por ser además una buena amiga y psicóloga.

A mis compañeros de laboratorio por la compañía, las discusiones, los reactivos y los aportes en ideas, y sobre todo en soluciones experimentales y para el estrés.

A mis amigas Macarena, Eileen, Isidora, Rosario, Camila, María Eliana, y Viviana; por darme ánimo y apoyo cada vez que las necesité.

A Cesar Díaz por su paz, su ayuda y enseñanzas con inmensa paciencia.

A Leonardo y Ricardo por recordarme el amor por la ciencia cuando se me escapaba a ratos.

A Cristián Undurraga, por ser un gran amigo y apoyo.

A mis compañeros de CODECIAM, por permitirme usar fuera de la universidad todo lo que he aprendido en estos años.

Al Dr. Octavio Monasterio por permitirme el uso de sus equipos de laboratorio.

## INDICE DE CONTENIDOS



AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE DE CONTENIDOS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
I. INTRODUCCION.....	1
1.1 Bioensayos para estudios de ecotoxicología.....	2
1.2 El pez cebra como modelo para estudios de ecotoxicidad.....	2
1.3 La eclosión, un parámetro para evaluar la reproducción.....	4
1.4 Enzimas de eclosión, coriolisinas.....	6
1.5 Origen y funciones del líquido perivitelino (LPV).....	7
II. OBJETIVOS.....	9
III. MATERIALES Y METODOS.....	11
3.1 Elección de los puntos de muestreo.....	11
3.2 Toma, almacenamiento y preparación de muestras.....	11
3.3 Determinación de la concentración de metales pesados.....	11
3.4 Bioensayos de toxicidad.....	12

3.5 Detección de muerte celular.....	12
3.6 Detección de neurotoxicidad periférica.....	13
3.7 Detección de teratogénesis craneofacial.....	14
3.8 Incubaciones para cuantificar y evaluar la inhibición de la eclosión y los mecanismos asociados.....	14
3.9 Cuantificación y evaluación morfológica de las células de las glándulas de eclosión.....	14
3.10 Ensayo de liberación de enzimas proteolíticas.....	15
3.11 Extracción y concentración del líquido perivitelino (LPV) .....	15
3.12 Cuantificación de la actividad proteolítica del LPV o de proteínas liberadas por embriones descorionados.....	16
3.13 Cuantificación e identificación de las proteínas contenidas en el LPV y su función biológica.....	13
 IV. RESULTADOS.. .....	 17
4.1 Creación una batería de bioensayos con pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) para detectar efectos sub-letales específicos mediados por compuestos tóxicos presentes en el medio acuático.....	17
4.1.1 Efectos tóxicos sub-letales en el desarrollo embrionario, provocados por la exposición a muestras de agua contaminadas con metales pesados.....	18
4.1.1.1 Cuantificación de las respuestas de bioensayos de diferente duración.....	22
4.1.2 Citotoxicidad, aumento de la muerte celular (MCA).....	24
4.1.3 Neurotoxicidad periférica: pérdida de funcionalidad de células ciliadas de la LLp (FCC) .....	25

4.2 Determinar posibles mecanismos de acción asociados a la inhibición de la eclosión, usando tóxicos de referencia.....	26
4.2.1 Inhibición de la eclosión causada por fungicidas triazólicos.....	26
4.2.2 Cuantificación y evaluación morfológica de las CGE, en larvas expuestas a triazoles.....	30
4.2.2.1 Patrón de expresión de GFP en la línea transgénica <i>PAX6_hs6A</i> ..	30
4.2.2.2 Cuantificación del número de células de las glándulas de eclosión, en larvas <i>PAX6_hs6A</i> .....	32
4.2.2.3 Cuantificación del número de glándulas de eclosión, en larvas <i>cldnB:GFP</i> , tras exposición a triazoles.....	23
4.2.2.4 Análisis morfológico de células de la glándula de eclosión en la línea <i>cldnB:GFP</i> .....	36
4.2.3 Evaluación de muerte celular en las células de las glándulas de eclosión, mediada por tóxicos de referencia.....	37
4.2.3.1. Detección muerte celular con anaranjado de acridina.....	37
4.2.3.2. Detección de células apoptóticas mediante TUNEL.....	39
4.2.4. Evaluación de proteasas liberadas por las CGE de embriones de pez cebra en etapa previa a la eclosión.....	40
4.2.4.1. Actividad proteolítica del medio de incubación.....	41
4.2.4.2. Evaluación del contenido de gránulos de cimógeno en las CGE...42	
4.3. Caracterización del contenido proteico del líquido perivitelino (LPV) en el pez cebra.....	44
4.3.1 Determinación de la concentración de proteínas totales en el LPV.....	44
4.3.2 Separación de las proteínas presentes en el LPV en etapa de pre-eclosión y eclosión por SDS-PAGE.....	45

4.3.3 Identificación de las proteínas presentes en el LPV de embriones de pez cebra en etapa de eclosión.....	47
V. DISCUSIÓN.....	50
5.1 Bioensayos con embriones de pez cebra para detectar presencia de contaminantes biodisponibles en cuerpos de agua en Chile.....	50
5.1.1 Ventajas del bioensayo para evaluación de aguas continentales con embriones de pez cebra.....	53
5.1.1.1 Reducción del costo del bioensayo.....	53
5.1.1.2 Necesidad de menor control de variables.....	53
5.1.1.3 Detección de cualquier tipo de compuesto biodisponible en niveles tóxicos.....	53
5.1.1.4 Versatilidad y facilidad en la transferencia tecnológica.....	54
5.1.2 Relevancia de las respuestas toxicas añadidas.....	54
5.1.2.1 No Inflado de la vejiga natatoria, NIV.....	54
5.1.2.2 Pérdida de funcionalidad del sistema de la Línea Lateral, FCC.....	55
5.2 Mecanismos de acción asociados a la inhibición de la eclosión mediada por contaminantes acuáticos.....	57
5.2.1 Cuantificación y morfometría de las CGE.....	57
5.2.2 Evaluación de muerte celular en las CGEs después del tratamiento con triazoles.....	58
5.2.3 Evaluación de la liberación de proteasas por parte del embrión y del contenido granular en las CGE después del tratamiento con triazoles.....	59
5.3 Caracterización del contenido proteico del líquido perivitelino (LPV) del pez cebra durante el periodo de eclosión.....	63

5.3.1 Cuantificación y separación de proteínas del LPV de pez cebra.....	63
5.3.2 Identidad y posible función de las proteínas del LPV de pez cebra.....	64
VI. CONCLUSIONES.....	66
VII. REFERENCIAS.....	67
VIII. ANEXOS.....	72
Anexo A: Información y propiedades fisicoquímicas de los tóxicos de referencia utilizados.....	73
Anexo B: Ajuste de variables de incubación de embriones y larvas de pez cebra para bioensayos con aguas continentales.....	75
Anexo C: Cálculo de la cantidad de proteínas totales en el LPV.....	77
Anexo D: Figuras suplementarias.....	79

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Resumen cualitativo de los bioensayos y porcentaje de muestras alteradas y respuestas más frecuentes.....	20
<b>Tabla 2:</b> Propiedades físicas y químicas de las muestras evaluadas.....	21
<b>Tabla 3:</b> Concentraciones de exposición a triazoles que inhiben la eclosión en embriones de pez cebra.....	27
<b>Tabla 4:</b> Agentes físicos y químicos que alteran la eclosión.....	61

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Patrón de expresión del gen <i>he1a</i> en pez cebra.....	7
<b>Figura 2:</b> Cuantificación de las respuestas obtenidas en bioensayos de distinta duración.....	23
<b>Figura 3:</b> Inflación de la vejiga natatoria en larvas de 7 dpf.....	23
<b>Figura 4:</b> Tinción <i>in vivo</i> de células apoptóticas en larvas de 7 dpf expuestas a aguas del Valle del Huelehueico.....	24
<b>Figura 5:</b> Pérdida de funcionalidad en células ciliadas de la línea lateral posterior (FCC) en larvas de 4 dpf expuestas a aguas del Valle del Huelehueico.....	25
<b>Figura 6:</b> Éxito de la eclosión en larvas expuestas a triazoles durante la embriogénesis.....	28
<b>Figura 7:</b> Mortalidad en larvas descorionadas y no eclosionadas hasta los 8 dpf.....	29
<b>Figura 8:</b> Patrón de expresión de GFP en la línea transgénica <i>PAX6_hs6A</i> .....	31
<b>Figura 9:</b> Cambio en la expresión génica en las CGE tras la exposición a tóxicos que inhiben la eclosión.....	33
<b>Figura 10:</b> Patrón de expresión de GFP en la línea transgénica <i>cldnB:GFP</i> .....	34
<b>Figura 11:</b> Cuantificación del número de CGE en la línea <i>cldnB:GFP</i> .....	35
<b>Figura 12:</b> Evaluación morfométrica de las CGE a los 2 dpf.....	36

<b>Figura 13:</b> Evaluación de muerte celular en las CGE en embriones silvestre con anaranjado de acridina.....	38
<b>Figura 14:</b> Detección de células apoptóticas mediante TUNEL en embriones expuestos a triazoles.....	39
<b>Figura 15:</b> Detección de actividad proteolítica en el medio extraembrionario.....	42
<b>Figura 16:</b> Retención de gránulos de cimógeno contenidos en las CGE tras la exposición a triazoles.....	43
<b>Figura 17:</b> Concentración de proteínas totales en el LPV de embriones de pez cebra.....	45
<b>Figura 18:</b> SDS-PAGE que revela el perfil de bandas de proteínas en el LPV de embriones de pez cebra.....	46
<b>Figura 19:</b> Expresión de GFP en el transgénico <i>hsp70:GFP</i> en larvas de 4 dpf.....	79
<b>Figura 20:</b> Aumento en la actividad locomotora de larvas de pez cebra expuestas a FON.....	79
<b>Figura 21:</b> Ovocito maduro de pez cebra.....	80

## LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

1,2,4-T :	1,2,4-Triazol
dexp:	Días de exposición
dpf :	Días post fertilización
CGE:	Células de la glándula de eclosión
CI <sub>50</sub> :	Concentración media de Inhibición
DA:	Dopamina
DAT:	Transportador de dopamina
dpf :	Días post fecundación
EPV:	Espacio Perivitelínico.
Ed:	Edemas
FCC:	Funcionalidad de Células Ciliadas
FET:	Fish Embryo Toxicity
FON :	Triadimefon
GFP :	Proteína Fluorescente Verde (Green Fluorescent Protein)
hexp:	Horas de exposición
hpf :	Horas post fecundación
IEC:	Inducción de Estrés Celular
INN :	Instituto Nacional de Normalización
ISO:	Organización Internacional para la Estandarización
LC <sub>50</sub> :	Concentración Letal Media
LL:	Línea Lateral
LLp :	Línea Lateral posterior
LMA:	Actividad locomotora
LPV:	Líquido Perivitelínico
MCA:	Muerte Celular Aumentada
MCF:	Malformaciones Craneofaciales
MEC:	Matriz extracelular
MG:	Malformaciones Generales
MS:	Espectrometría de Masas

NCC: Presencia de Células Ciliadas  
NIV: No inflado de la vejiga natatoria  
NOL : Triadimenol  
OECD: Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo  
PRL: Prolactina  
WT : Wild Type, línea de peces silvestres.

## RESUMEN

Chile es un país cuya economía depende básicamente de la explotación y exportación de recursos naturales. Gran parte de las actividades industriales requieren la utilización agua de una buena calidad biológica, es decir, con baja cantidad de contaminantes tóxicos. Mientras las malas prácticas de las industrias asociadas, y la intensa actividad minera deterioran este recurso, se hace necesaria la creación de nuevas herramientas de monitoreo y fiscalización de la calidad del agua continental. Los ensayos biológicos usando embriones de pez cebra representan un complemento a las técnicas analíticas de evaluación de calidad de aguas, al sumar la evaluación de toxicidad de las muestras a la detección cuantitativa de los contaminantes, por lo que este trabajo busca aportar con avances y complementos a los actuales protocolos de bioensayos que utilizan este modelo biológico internacionalmente.

La inhibición de la eclosión es una respuesta clásicamente registrada como punto final de efectos negativos sobre la reproducción, pero existen escasos antecedentes acerca de los mecanismos de acción que pueden gatillar esta respuesta, causada comúnmente por la exposición de peces en etapas tempranas del desarrollo a agentes tóxicos. Este trabajo busca suplir la falta de antecedentes en la literatura, utilizando tóxicos de referencia que permitan estudiar las causas que producen este efecto negativo en la sobrevivencia y reproducción de los animales.

Se determinó que compuestos utilizados en la industria agrícola, como los fungicidas derivados del 1,2,4-triazole, al estar presentes en el medio acuático son capaces de inhibir la secreción de la enzima proteolítica que ayuda al embrión a lisar el corion y liberarse de él para comenzar su vida libre como larva. Así, determinamos que

las glándulas unicelulares que producen y secretan esta enzima, constituyen un nuevo tejido blanco para la acción de contaminantes acuáticos.

### ABSTRACT

Chile is a country whose economy depends primarily on the exploitation and export of natural resources. These industrial activities require the use of high quality waters, i.e., with low amounts of toxic pollutants. While the careless practices of these industries and intense mining activity harm this resource, it is necessary to create new tools for monitoring and control of continental water quality. Bioassays with zebrafish embryos represent a complement to analytical techniques for assessing water quality, and the present work seeks to deliver improvements and complements to existing bioassay protocols that use this biological model internationally.

Hatching inhibition is a classic response registered as a negative effect on reproduction, but few prior reports exist about the mechanisms that could trigger this effect on fish as a response after the exposure to toxic agents during early developmental stages. The aim of this work is to address this lack of background in the literature, using toxicants of reference to study the direct causes of this negative effect on reproduction.

It was determined that fungicides derived from 1,2,4-triazole present in the aquatic environment, are able to inhibit the secretion of the proteolytic enzyme that helps the embryo to release itself from the chorion and to begin its free life as a larva. Thus, we determined that the unicellular glands that produce and secrete this enzyme represents a new target tissue for the action of water pollutants.

## I. INTRODUCCION

Chile es un país que presenta un creciente desarrollo económico y humano en las áreas de la minería, la agroindustria y la acuicultura entre otras, actividades que requieren constantemente del uso de aguas con bajos niveles de contaminación, es decir, con una baja carga toxicológica. La práctica inapropiada de estas actividades, y la intensa actividad minera, producen un deterioro de este recurso. Es de suma importancia para el desarrollo económico del país asegurar la calidad del recurso hídrico, y por lo tanto, es muy relevante crear herramientas legales que regulen la emisión de contaminantes, así como la implementación de tecnologías de monitoreo mas rápidas, sensibles y económicas que las existentes.

Todas las variables que utiliza actualmente la normativa chilena para asignar una determinada calidad a las aguas, son de naturaleza física o química, dejando de lado las variables biológicas (Vila, 2006). Lo anterior conlleva una subestimación de los riesgos asociados a la contaminación de las aguas sobre la biodiversidad, la economía y la salud humana. A nivel internacional, sí se consideran estos aspectos, y se utilizan bioensayos como indicadores de las condiciones biológicas de este recurso. Así, en Chile actualmente se están desarrollando las "normas secundarias de calidad de aguas", que pretenden incorporar a los bioensayos y bioindicadores como herramientas complementarias para determinar los impactos producidos por contaminantes, y el estado trófico de los cuerpos de agua.

### 1.1 Bioensayos para estudios de ecotoxicología.

Hoy en día, existe una gran variedad de tipos de bioensayos para evaluar el efecto de contaminantes acuáticos usando tanto organismos invertebrados como vertebrados. En general, estos pueden clasificarse como ensayos de toxicidad aguda o de toxicidad crónica, diferenciándose esencialmente en su duración, y en el tipo de resultados que permiten obtener. Así, los ensayos crónicos son los mas reveladores en este aspecto, pero implican mayor costo económico y tiempo para su realización. Los ensayos agudos pueden llevarse a cabo rutinariamente y permiten el análisis de un mayor número de muestras de manera más rápida y a menor costo, condiciones esenciales para el monitoreo ambiental. Si bien existen variados organismos y protocolos estandarizados para realizar éste tipo de ensayos, todos poseen finalidades similares: determinar la concentración de algún material o el nivel de algún agente, capaz de producir un efecto deletéreo en un grupo de organismos durante una exposición de corta duración, bajo condiciones controladas (Revisado por Vosyliené, 2007). Finalmente, producto de que las alteraciones en el desarrollo embrionario debido a factores ambientales, son determinadas en una pequeña ventana temporal, y a su vez pueden traer consecuencias negativas en el ciclo de vida de los organismos; la realización de bioensayos agudos con embriones permite detectar efectos crónicos o irreversibles, que puedan tener efectos negativos sobre las poblaciones.

### 1.2 El pez cebra como modelo para estudios de ecotoxicidad.

El pez cebra (*Danio rerio*) posee una amplia gama de ventajas experimentales, lo que lo ha llevado convertirse en uno de los modelos biológicos mas utilizados en estudios toxicológicos y genéticos, entre otros (referirse a Kimmel y col, 1995; Zhang y

col, 2003; Braunbeck y col, 2005). Dentro de las ventajas que presenta este organismo están: (1) fecundación externa; (2) transparencia del corion y de las células en el estado embrionario y larval; (3) gran cantidad de embriones por cruce; (4) tiempo generacional corto (3 meses); y (5) cercanía filogenética con mamíferos por ser un vertebrado. En la actualidad existen diversas tinciones vitales (ej, diAsp y anaranjado de acridina) y líneas transgénicas de pez cebra que representan una alternativa real y sensible para la evaluación y detección de contaminantes acuáticos biodisponibles presentes en las aguas, así como para el estudio de los posibles mecanismos de acción a través de los cuales ejercen su toxicidad. Las propiedades del embrión de pez cebra, permiten hacer ensayos o tratamientos en el animal completo observando directamente las consecuencias sobre células y tejidos, prescindiendo de los ensayos de sobrevivencia (o letalidad) que son poco informativos sobre los mecanismos de la toxicidad. Es decir, podemos detectar efectos tóxicos sub-letales en organismos vivos y en tiempo real, sin la necesidad de realizar cortes histológicos, complicadas tinciones o inmunoensayos para evaluar daños sobre tejidos u órganos particulares. Así, por ejemplo, la tinción con el colorante vital diAsp, permite visualizar y cuantificar *in vivo* la funcionalidad de las neuronas periféricas (células ciliadas) que se encuentran en el sistema mecanosensorial de los peces, la línea lateral (LL). Lo anterior permite evaluar de manera rápida y sencilla, el efecto que puede tener en la integridad de estos órganos sensoriales la presencia de contaminantes en las aguas. Debido a que estas células se encuentran expuestas directamente al medio ambiente, son especialmente sensibles a las alteraciones del medio acuático, y hay evidencia de que la presencia de antibióticos (Harris y col, 2003), fármacos (Ou y col, 2007), biotoxinas (Lefebvre y col, 2004) y metales (Faucher y col, 2005; Hernández y col, 2006; Linbo y col, 2006), disueltos en el medio pueden dañarlas.

Una serie de protocolos para realizar bioensayos con líneas silvestres de pez cebra en distintos estadios de desarrollo, han sido estandarizados por la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) y por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Estos son parecidos entre si y recomiendan el uso de este modelo para estudios toxicológicos de compuestos químicos individuales. En particular la OCDE publicó el año 2006 el Fish Embryo Toxicity Test (FET Test), protocolo de bioensayo que utiliza embriones de pez cebra como modelo para evaluar la toxicidad de compuestos químicos aislados, registrando respuestas como letalidad y éxito en la eclosión. La adherencia a estas prácticas representa un desafío para los países de economía emergente como Chile, particularmente en lo referido a las exportaciones de productos alimenticios y para evaluación de riesgos.

### 1.3 La eclosión, un parámetro para evaluar la reproducción.

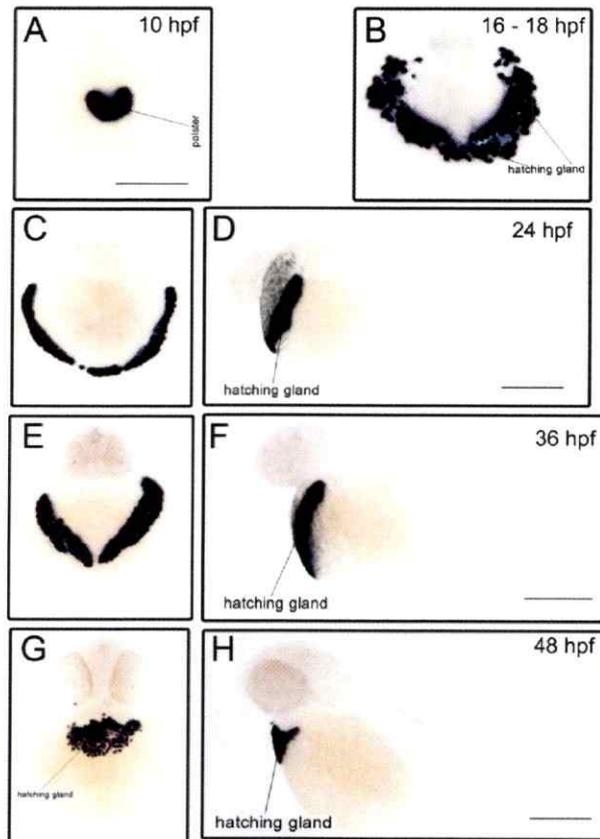
La eclosión corresponde a la liberación de las larvas de su envoltura embrionaria o corion, marcando el fin del periodo embrionario y el comienzo de la etapa larval. Este suceso es regulado por múltiples factores endógenos y ambientales como los ciclos de luz-oscuridad, la concentración de oxígeno en el medio, la liberación de enzimas proteolíticas, liberación de hormonas y la ocurrencia de contracciones musculares. La etapa de eclosión es crítica, los individuos sufren de manera simultánea grandes cambios; agotan las reservas alimenticias que otorga el vitelo, su nivel de desarrollo nervioso y muscular les permite ir en busca de su propio alimento, pero a su vez se vuelven más vulnerables al ataque de depredadores, al estrés mecánico y osmótico, y a la presencia de compuestos químicos en el agua.

Prácticamente la totalidad de los bioensayos con organismos acuáticos (vertebrados e invertebrados) en etapas de desarrollo temprano, evalúan el éxito en la eclosión como indicador de toxicidad reproductiva (Bresch, 1982; Landner y col, 1985; Mizell y col, 1997; OECD, 1992; Segner, 2003). La inhibición de la eclosión corresponde a un efecto sub-letal, que en un corto periodo de tiempo produce la muerte cuando es irreversible, y genera directamente un efecto a nivel poblacional al tener un impacto negativo en la reproducción. Así, en el caso de enfermedades parasitarias, esta respuesta representa una alternativa de control de los agentes patógenos (Frederick & Twintillia, 1982; Souza y col, 2008). En humanos la inhibición de la eclosión del blastocisto representa un problema de infertilidad o bien, una alternativa de anticoncepción (Biggers y col, 1978). En casos de contaminación ambiental, problemas relacionados con la utilización masiva de pesticidas u otros agentes químicos, han causado la disminución radical de poblaciones enteras de aves al impedir la eclosión de los polluelos, y en la industria acuícola este efecto representa un serio problema al reducir la eclosión de las ovas. A pesar de todo esto, existen escasos antecedentes relacionados a los mecanismos celulares y moleculares relacionados a la inhibición de la eclosión a causa de contaminantes ambientales. Compuestos de uso masivo como los pesticidas por ejemplo, llegan a las aguas a través de múltiples vías como la escorrentia superficial, la lixiviación y la precipitación, alcanzando a los organismos acuáticos como los peces que sufren a causa de esto multiples efectos negativos, entre los que se encuentra comúnmente la inhibición de la eclosión.

#### 1.4 Enzimas de eclosión, coriolisinas.

Antes de la eclosión, el embrión secreta al espacio perivitelino (EPV) enzimas proteolíticas que lisan el corion, evento crucial para permitir que las contracciones musculares espontáneas que comienzan en este periodo, rompan esta envoltura protéica permitiendo la eclosión. En el pez cebra este evento ocurre entre las 48 y las 72 horas post fecundación (hpf). En estos embriones existe un grupo de glándulas unicelulares que conforman un tejido embrionario transiente. Estas células de las glándulas de eclosión (CGE) corresponden a células secretoras que se encuentran en la superficie pericárdica del vitelo (Fig. 1) bajo el periderma. Éstas se especifican al final de la gastrulación, alcanzando la madurez en el periodo de pre-eclosión para posteriormente liberar sus gránulos citoplasmáticos justo antes de que ocurra la eclosión. Estas células luego desaparecen aunque no está claro por que mecanismo (Willemse & Denucé, 1973; Kimmel y col, 1995).

Se sabe que en peces estas células producen enzimas proteolíticas denominadas genéricamente *coriolisinas*, que tienen como sustrato a las glicoproteínas que constituyen la cara interna (ZRI, zona radiata interna) del corion. En los peces teleósteos en general, las CGE producen dos proteasas distintas que actúan de manera cooperativa para cumplir esta función (Inohaya y col, 1995). En pez cebra, sólo se ha descrito una coriolisina, HE1 (fig. 1), que corresponde a una metaloproteasa de aproximadamente 27 kDa, y que fue recientemente purificada por el grupo de Sano (2008). La Figura 1 muestra el patrón de expresión que se ha descrito para el gen que codifica la proteína HE1 en pez cebra. Esta enzima es liberada al EPV y actúa, hasta donde se sabe, de manera individual.



**Figura 1: Patrón de expresión del gen *he1a* en pez cebra.** Se observa la distribución espacio-temporal de la expresión del gen *he1a*, que codifica la coriolisina de pez cebra, por medio de hibridación *in situ*. Dicho gen se expresa en los precursores de las CGE provenientes de la región del mesodermo axial dorsal denominada polster, que durante el desarrollo pasan desde una posición anterior dorsal, a una posición ventral en la región pericárdica del saco vitelino. Vistas anteriores (A-C, E, G) y vistas laterales (D, F, H). Modificado de Thisse y col, 2001. Barra de escala 250  $\mu$ m.

### 1.5 Origen y funciones del líquido perivitelino (LPV).

Inmediatamente después de la fecundación, la secreción de los gránulos corticales del ovocito separa a la envoltura vitelina de la membrana citoplasmática del cigoto, formando el espacio perivitelino (EPV), el cual posteriormente absorbe agua del medio externo. Así, el LPV que rodea al embrión contiene entre otras sustancias, proteínas provenientes de los gránulos corticales. La persistencia de éstas en el LPV se desconoce.

Se ha descrito en varias especies de invertebrados y vertebrados que el LPV constituye un microambiente para el embrión en desarrollo, y que lo protege de las variaciones del medio ambiente externo. Entre las funciones que cumple el LPV están: nutrición, captación de iones, mantención de la presión osmótica, permitir la difusión de gases y solutos, y además posee propiedades antioxidantes (Garin y col, 1996; Finn, 2007; Eddy, 1974; Mueller y Seymour, 2011; Dreon y col, 2004). Estas funciones del LPV no han sido estudiadas en el pez cebra aunque se ha sugerido que en esta especie, el LPV posee factores que contribuyen a la reasociación post mitótica de los blastómeros en la etapa de clivaje (Roubaud & Pairaul, 1980). A pesar de la importancia de este medio que rodea al embrión durante el desarrollo temprano, no existen antecedentes hasta la fecha sobre los componentes proteicos que constituyen el LPV en el pez cebra.

## II. OBJETIVOS

### **Objetivo General**

Desarrollar metodologías para detectar la presencia, efectos y mecanismos de acción específicos de tóxicos biodisponibles en aguas continentales en Chile, utilizando embriones y larvas silvestres y transgénicas de pez cebra (*Danio rerio*).

### **Objetivos Específicos**

**2.1** Desarrollar una batería de bioensayos con pez cebra para la detección de efectos sub-letales específicos mediados por compuestos tóxicos presentes en el medio acuático.

**2.1.1** Determinación de los niveles de muerte celular que induce la exposición aguda a distintas muestras en larvas de pez cebra.

**2.1.2** Determinación de efectos neurotóxicos tras la exposición a aguas potencialmente contaminadas en larvas de pez cebra.

**2.1.3** Determinación de efectos teratogénicos producidos por la contaminación presente en las muestras.

**2.2** Determinar los posibles mecanismos asociados a la inhibición de la eclosión, usando tóxicos de referencia.

**2.2.1** Evaluar el número y morfología de las glándulas de eclosión, tras exposición a tóxicos de referencia.

**2.2.2** Evaluar muerte celular en las glándulas de eclosión, mediada por compuestos tóxicos.

**2.2.3** Evaluar la liberación de proteasas al medio extraembrionario.

**2.3 Caracterización del contenido protéico del líquido perivitelinico (LPV) del pez cebra.**

**2.3.1 Determinación de la concentración de proteínas totales en el LPV.**

**2.3.2 Identificación de las proteínas presentes en el LPV.**

### III. MATERIALES Y METODOS

**3.1 Elección de los puntos de muestreo.** Se seleccionaron distintas cuencas hidrográficas de las cuales se tomaron al menos dos puntos de muestreo distintos, buscando comparar zonas que presentaran fuentes conocidas de contaminación, con otras que, aparentemente no presentan alteraciones.

**3.2 Toma, almacenamiento y preparación de muestras.** Las muestras de agua continental (superficial o subterránea) a evaluar, fueron tomadas en envases plásticos de 4 litros de capacidad para coleccionar la muestra total que luego fue vertida en envases plásticos de 300 mL. El pH y la conductividad fueron medidos *in situ*. Para el análisis de metales se adicionó previamente 0,5 mL de HNO<sub>3</sub> al 65% a cada frasco como preservante, luego se guardaron a 4 °C hasta el momento del análisis. Para los análisis biológicos, las muestras se mantuvieron a baja temperatura (< 4°C) y posteriormente fueron almacenadas a -20° C hasta el momento de su uso, período que no superó en ningún caso más de 30 días, mientras que para el análisis químico se mantuvieron a 4 °C. El día previo al inicio de los bioensayos, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y luego temperadas a 26° C antes de iniciar las incubaciones. Las muestras utilizadas en los bioensayos no fueron sometidas a ningún tipo de tratamiento químico o físico, como la adición de preservantes o filtración.

**3.3 Determinación de la concentración de metales pesados.** Parte de las muestras tomadas fueron enviadas a un laboratorio externo (CENMA) para la determinación del contenido de metales pesados. Las concentraciones fueron determinadas por

espectrometría de emisión óptica con plasma de argón acoplado inductivamente, o por voltametría de resolución anódica.

**3.4 Bioensayos de toxicidad.** La incubaciones se realizaron exponiendo grupos de 20 individuos en etapa de blástula (3 a 5 horas post fertilización, hpf) dentro de su corion, durante 4 a 7 días en placas de cultivo de 6 pocillos en 5 ml de medio. En los casos en que la muestra contenía exceso de sedimentos, se utilizaron insertos de poliestireno con una malla de 500  $\mu\text{m}$ , para evitar la adherencia excesiva de partículas al corion que dificulta la observación de los embriones. Las incubaciones se realizaron en condiciones semi-estáticas a 26 °C con recambio de medio cada 24 h, utilizando cada muestra más un control negativo en medio de cultivo E3 (Embryo medium: 5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>, equilibrado a pH 7.0). El estado de los individuos fue evaluado visualmente, registrando cada 24 horas el número de embriones o larvas que presentaran: muerte, edemas (Ed), eclosión, malformaciones generales (MG) e inflado de la vejiga natatoria (NIV). Además, en etapas específicas, se evaluó: presencia de malformaciones craneofaciales (MCF), aumento de muerte celular (MCA), funcionalidad de células ciliadas (FCC), número de neuromastos con células ciliadas (NCC) e inducción de estrés celular (IEC). La proporción de respuestas encontradas en cada grupo fue sometida a análisis estadístico (Anova no paramétrica) utilizando el software Graph Pad Prism®.

**3.5 Detección de muerte celular (MCA).** Para detectar los niveles de muerte celular en los embriones tras las exposiciones, individuos de distintos estadios fueron incubados con la tinción vital anaranjado de acridina (acridinium chloride hemi- (zinc

chloride), Sigma A1121) en una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  durante 5 a 10 minutos, y luego lavados intensamente con E3 para su observación. Para evaluar específicamente la muerte celular programada se utilizó la técnica de TUNEL (TdT-mediated x-dUTP Nick End Labeling) que permite detectar enzimáticamente etapas tempranas de fragmentación de DNA en células apoptóticas. Para ello se utilizó el *In Situ* Cell Death Detection kit, TMR red de Roche®, según las indicaciones del fabricante.

**3.6 Detección de neurotoxicidad periférica (NCC y FCC).** Para la determinación de los efectos neurotóxicos se utilizó la línea transgénica *brn3c:GFP*, que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) en un grupo de neuronas perteneciente al sistema mecanosensorial de los peces, la línea lateral (LL) (Parinov y col, 2004). Éstas son células ciliadas que se encuentran expuestas al medio externo, lo que las hace muy sensibles a contaminantes acuáticos, pudiendo perder su funcionalidad o morir. La desaparición de la marca de GFP en la LL, indicará la muerte de estas células. Para determinar la funcionalidad de las células ciliadas de larvas expuestas, éstas se incubaron por 5 minutos en una solución 50  $\mu\text{M}$  del marcador vital DiAsp (4-(4-diethylaminostyryl)-N-methylpyridinium iodide), el que es incorporado exclusivamente por células ciliadas funcionales. Luego fueron lavadas varias veces con E3 y anestesiadas con tricaina (MS-222, Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma) para su observación bajo la lupa de fluorescencia (Hernández y col, 2006). El número de neuromastos funcionales en la LL posterior (LLp) fue cuantificado.

**3.7 Detección de teratogénesis craneofacial.** Para determinar la inducción de teratogénesis, o aberraciones en el desarrollo de distintas estructuras, se utilizó la línea transgénica *sox10:GFP*, que expresa GFP en los elementos craneofaciales (cartílagos mandibulares y faríngeos) y aletas pectorales (Carney y col, 2006).

**3.8 Incubaciones para cuantificar y evaluar la inhibición de la eclosión y los mecanismos asociados.** Se incubaron grupos de 20 individuos entre las 3 y 5 horas post fertilización (hpf) dentro de su corion, durante 48 horas en placas de cultivo de 6 pocillos en 5 ml de medio con triazoles. Las incubaciones se realizaron a 26 °C, utilizando cada tóxico en distintas concentraciones, más un control negativo con medio E3. Al segundo día de exposición, las larvas fueron descorionadas manualmente y evaluadas a menos que se indique lo contrario. Los tóxicos de referencia utilizados corresponden a tres compuestos de la familia química de los triazoles, los fungicidas Triadimefón (FON) y Triadimenol (NOL) y el último producto de degradación de toda esta familia química, el Triazol libre (1,2,4-T). Estos compuestos fueron elegidos por ser ampliamente utilizados en Chile y ser conocidos como potenciales contaminantes acuáticos. FON, NOL y 1,2,4-T afectan al desarrollo embrionario de vertebrados y producen inhibición de la eclosión en concentraciones sub-letales (De la Paz J. F., 2009).

**3.9 Cuantificación y evaluación morfológica de las células de las glándulas de eclosión (CGE).** Se utilizaron las líneas transgénicas *Pax6\_hs6A* y *cldnB:GFP* que expresan GFP en las glándulas de eclosión a partir aproximadamente de las 24 hpf, permitiendo el estudio de este tejido *in vivo*. Utilizando lupa y microscopio de epifluorescencia, se tomaron fotografías que luego fueron procesadas para cuantificar

el número de células y evaluar su morfología, utilizando el software Adobe® Photoshop® CS4, e ImageJ, respectivamente.

**3.10 Ensayo de liberación de enzimas proteolíticas.** Para evaluar la liberación de proteasas, se incubaron de manera individual 20 embriones de 42 hpf por cada tratamiento en placas de 96 pocillos, con 100  $\mu$ l de medio de exposición por embrión (E3 ó E3 con triazoles). Al cabo de 4 y 8 h, se extrajeron y reemplazaron inmediatamente (con medio fresco), 80  $\mu$ l de medio por cada pocillo, obteniéndose 1,6 ml totales por tratamiento, en los dos tiempos distintos. El líquido se recolectó en tubos Eppendorff de 1,5 ml en hielo y luego se centrifugó a 18.000 rcf por 30 minutos. Posteriormente el sobrenadante fue concentrado 50 veces, utilizando microfiltros Amicon® Ultra 0,5 (10K) de Millipore.

**3.11 Extracción y concentración del LPV.** Larvas de 2 dpf expuestas a los tóxicos de referencia, fueron descorionadas manualmente y el LPV liberado fue recolectado en buffer Tris-HCl 1mM pH 7.5 (30 embriones / 200  $\mu$ l de buffer), para luego ser centrifugado a 18.000 rcf por 45 minutos. El sobrenadante obtenido fue almacenado a -80°C. Antes de su utilización el LPV fue descongelado en hielo y concentrado utilizando microfiltros Amicon® Ultra 0,5 (10K) de Millipore.

**3.12 Cuantificación de la actividad proteolítica del LPV o de proteínas liberadas por embriones descorionados.** Para cuantificar la actividad proteolítica del LPV o de las proteínas liberadas por embriones descorionados, se utilizó el kit de detección de actividad proteasa, Protease Fluorescent Detection Kit, de Sigma®. Dicho kit utiliza

como sustrato caseína acoplada a fluoresceína, posterior precipitación ácida del sustrato no clivado y finalmente cuantificación de la fluoresceína remanente en solución mediante espectrometría de fluorescencia, para esto se utilizó el Luminiscence Spectrometer Perkin Elmer, modelo LS 50.

**3.13 Cuantificación e identificación de las proteínas contenidas en el LPV y su función biológica:** Para evaluar el contenido de proteínas totales en el LPV, se utilizó el método de Bradford. Luego, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante al 12% (SDS-PAGE) teñido con plata, las proteínas del LPV fueron separadas según su tamaño para determinar el patrón de bandeo de este líquido. Para determinar la identidad de las proteínas presentes en el LPV de 2dpf, se envió una muestra a un laboratorio externo, el cual por medio de secuenciación de péptidos por espectroscopía de masas determinó su identidad. Luego se buscaron en la bibliografía los antecedentes generales más relevantes acerca de la función biológica de las proteínas encontradas.

## IV. RESULTADOS

### ***4.1 Creación de una batería de bioensayos con pez cebra para detectar efectos sub-letales específicos, mediados por compuestos tóxicos presentes en el medio acuático.***

Se probaron distintas metodologías que permitieran realizar de manera fácil, reproducible y sensible bioensayos de exposición a aguas continentales, ya sean superficiales o subterráneas, utilizando embriones de pez cebra. Basándose en el FET Test (OECD, 2006) se diseñó un nuevo protocolo de incubación de embriones de pez cebra en aguas continentales. Se manejaron distintas variables para encontrar el mejor método de incubación (detalle en anexo B) y los parámetros más relevantes a registrar en el bioensayo. Así, el FET Test fue adecuado para la evaluación de aguas continentales manejando el método de incubación, y aumentando el número de respuestas sugeridas por la OECD. Para poner a prueba el método desarrollado, se recogieron muestras de aguas continentales de distintos lugares de Chile, en tres zonas con historial o riesgo de contaminación con metales pesados:

a) *IX Región de la Araucanía, Valle del Huelehueico.* En este lugar se tomaron 4 muestras distintas, dos de agua superficial (canales, muestras 1a y 1b) y dos de agua subterránea (consumo humano, muestras 2a y 2b). Esta zona fue elegida por presentar un alto riesgo de contaminación acuática debido a la presencia en el lugar de 3 empresas del rubro de la celulosa y la metalurgia.

b) *VII Región del Maule, comuna de Pencahue.* En este lugar se tomó sólo una muestra de agua superficial (muestra P1) desde un canal de regadío, agua destinada al riego y al consumo animal. El punto de muestreo fue elegido por haber sido afectado

por una fisura en un tranque de relave de la mina Las Palmas. Existe además en la zona una alta actividad agrícola.

c) *VI Región del Libertador General Bernardo O'higgins, comuna de Doñihue.* En este lugar se tomaron 3 muestras distintas, dos de agua superficial (canales) y una de agua subterránea (consumo humano y animal). Esta zona fue elegida por haber sido afectada por la ruptura de un tranque de relave de la mina El teniente, durante el terremoto ocurrido en febrero del 2010, lo que produjo el derrame superficial de desechos mineros en una amplia zona de la comuna. Además, existe en la zona una alta actividad agrícola y agropecuaria, lo que aumenta la probabilidad de contaminación de tipo orgánica.

4.1.1 Efectos tóxicos sub-letales en el desarrollo embrionario, provocados por la exposición a muestras de agua contaminadas con metales pesados.

El método de bioensayo que propone la OECD con embriones de pez cebra, se limita a evaluar como punto final de toxicidad la letalidad que inducen los compuestos químicos en los individuos (OECD, 2006), y el método sugerido por la misma entidad para embriones y larvas (OECD, 1992; OECD, 1998), aumenta los puntos a evaluar incluyendo eclosión, apariencia, conducta (respuesta a estímulos mecánicos y motilidad) y medidas morfométricas (peso y talla). En el método desarrollado en este trabajo, se evaluó un número mayor de respuestas para aumentar la sensibilidad del ensayo, y determinar de manera simultánea efectos letales, teratogénicos, y sub-letales más específicos que los netamente morfológicos o conductuales, que pueden ser evaluados de manera subjetiva; sin aumentar la duración del ensayo (hasta 6 días)

e incrementando así, la cantidad de información que se puede obtener de cada experimento. Las respuestas adicionalmente evaluadas fueron:

- a. Presencia de edemas (Ed).
- b. Malformaciones generales (MG).
- c. No Inflado de la vejiga natatoria (NIV).
- d. Malformaciones craneofaciales (MCF).
- e. Muerte celular aumentada (MCA).
- f. Funcionalidad (FCC) y presencia (NCC) de células ciliadas de la línea lateral.
- g. Inducción de estrés celular (IEC).

Luego de realizar los bioensayos diseñados y evaluar las distintas muestras ambientales recogidas, se realizó una tabla comparativa con las respuestas encontradas en cada una de las exposiciones a las distintas muestras de agua. Los resultados obtenidos fueron relacionados con el contenido de metales pesados en las aguas. Así, se determinó de manera relativa la sensibilidad del método y los parámetros que más responden a la presencia de contaminación por metales. La Tabla 1 muestra de manera cualitativa un resumen de los resultados obtenidos en los bioensayos, y la Tabla 2 muestra las concentraciones de metales encontrados en las aguas y los límites máximos permitidos por la normativa ambiental vigente en Chile que aplicaría en cada caso (según si es agua de consumo humano o no). Esto permitió determinar si los niveles de metales encontrados en las muestras, superaban o no a las concentraciones consideradas como perjudiciales e inadmisibles en nuestro país (superan las concentraciones permitidas por la normativa ambiental), y a la vez

correlacionar la presencia y concentración de metales con los niveles de respuestas positivas en los bioensayos.

**Tabla 1: Resumen cualitativo de los bioensayos. Porcentaje de muestras alteradas y respuestas más frecuentes.**

Etapa de evaluación	Muestra	Muerte 4 dpf	Ed 4 dpf	Eclosión 4 dpf	MG 4 dpf	NIV 6 dpf	MCF 5 dpf	MCA 2 dpf	FCC 4 dpf	NCC 4 dpf	IEC 8 dpf	% Respuesta bioensayos
Valle del Huelehueico	1a	■	■	■	■	■	■	■	■	ND	ND	38
	1b	■	■	■	■	■	■	■	■	ND	ND	0
	2a	■	■	■	■	■	■	■	■	ND	ND	75
	2b	■	■	■	■	■	■	■	■	ND	ND	25
Pencahue	P1	■	■	■	■	■	■	■	ND	■	■	0
Doñihue	D1	■	■	■	■	■	■	ND	■	■	■	33
	D2	■	■	■	■	■	■	ND	■	■	■	22
	D3	■	■	■	■	■	■	ND	■	■	■	44
% muestras con respuesta		25	63	25	38	38	38	20	14	0	0	

Se consideraron como respuestas positivas (cuadros color café), aquellas en que el parámetro evaluado superó por más de un 50% a los controles en las larvas expuestas a esa muestra, y como negativas aquellas en que la diferencia no superó el 50% (cuadros color celeste). El porcentaje de respuestas del bioensayo de la columna derecha, refleja el nivel de toxicidad de las muestras particulares (mientras mayor el porcentaje de respuestas presentadas, más tóxica es la muestra). En la fila inferior, el porcentaje de muestra alteradas representa la frecuencia con que se presentó esa respuesta particular. Ed, presencia de edemas; MG, malformaciones generales; NIV, no inflado de la vejiga natatoria; MCF, malformaciones craneofaciales; MCA, muerte celular aumentada; FCC, funcionalidad de células ciliadas y NCC, presencia de células ciliadas; IEC, inducción de estrés celular.

Al observar la Tabla 1, es posible notar que las respuestas que comúnmente son evaluadas en los bioensayos estandarizados, muerte y eclosión, no necesariamente son las respuestas más frecuentes, respondiendo ambas en un 25% de las muestras evaluadas. De este modo la presencia de edemas, detección de malformaciones, inflado de la vejiga natatoria, y pérdida de funcionalidad de células ciliadas de la línea

lateral; responden de mejor manera, obteniéndose una respuesta positiva en el 63%, 38%, 38% y 14% de las muestras evaluadas, respectivamente. Los ensayos con la línea transgénica *hsp70:GFP*, no arrojaron resultados positivos en ningún caso.

**Tabla 2: Propiedades físicas y químicas de las muestras evaluadas.**

Muestra	pH	C (uS/c)	Metales totales (ug/L.) encontrados	Parámetros sobre la norma (%)		% Respuestas bioensayos	
				NCh 409	NCh 1.333		
Valle del Huelehueico	1a	5,82	82,15	Zn (7,13); Cu (3,65); Al (321); Se (21,3); Mn (40,2); Ba (19,7); B (25,1); Fe (3,83)	—	Se (6,5%)	38
	1b	6,08	112,1	Zn (18); Cu (2,91); Al (278); Se (42,5); Mn (62,9); Ba (24,1); B (24); Fe (406)	—	Se (112,5%)	0
	2a	7,18	80,34	Zn (106); Cu (26,6); Pb(9,8); Al (50,5); Se (90,3); Mn (1445); Ba (29,5); B (40,4); Fe (378)	Fe (26%), Mn (1345%), Se (803%)	—	75
	2b	6,91	361	Zn (110); Cu (33,4); Pb(14,6); Al (74,4); Se (43,6); Mn (3,47); Ba (14,9); Fe (13,9)	Se (336%)	—	25
Pencahue	P1	7,58	223	Zn (30,5); Al (10,3); Se (47,3); Mn (255); Ba (40,6); Fe (20,9)	—	Se (136,5%); Mn (27,7%)	0
Doñihue	D1	7,49	391	Zn, Cu, Fe, Pb, Cd, Bi, Sn, Ti, Sb, Ag (<LD)	Ninguno	—	33
	D2	7,82	397	Zn, Cu, Fe, Pb, Cd, Bi, Sn, Ti, Sb, Ag (<LD)	—	Ninguno	22
	D3	7,78	378	Zn, Cu, Fe, Pb, Cd, Bi, Sn, Ti, Sb, Ag (<LD)	—	Ninguno	44

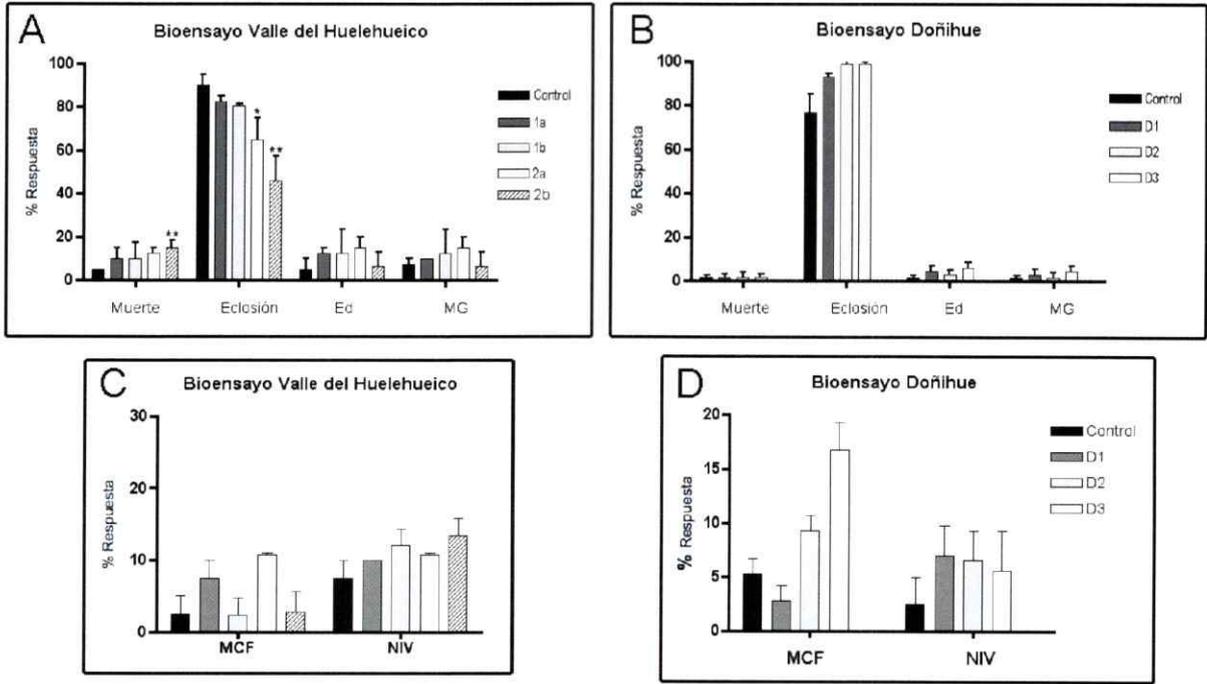
NCh, Norma Chilena Oficial. Nch 409: Agua Potable - Requisitos; Nch 1333 estándares nacionales de calidad ambiental según el uso dado al recurso.

Al comparar los resultados de los bioensayos con las propiedades físicas y químicas de las muestras, es posible notar que existe una buena correlación de los resultados químicos y biológicos, ya que, la muestra que posee una mayor cantidad de metales sobre la normativa, es a su vez la que presenta un mayor porcentaje (75%) de respuestas positivas en los bioensayos (Tabla 1, muestra 2a). El resto de las muestras que presentan múltiples respuestas positivas en los bioensayos, como: 1a (38%), 2b (25%), D1-3 (33%; 22%; 44%), probablemente den cuenta de un efecto de adición por la contribución de los metales individuales y/o de la presencia de otro, u otros tipos de

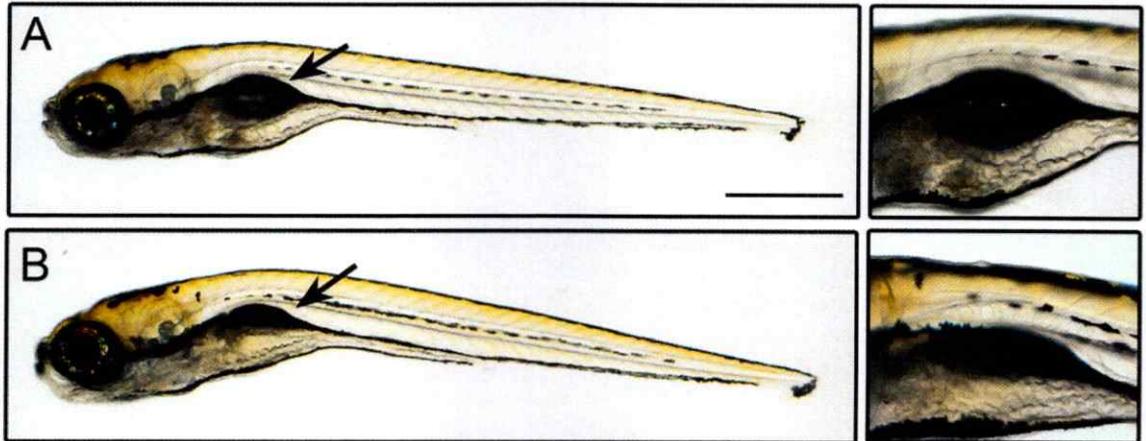
contaminantes en las muestras como pesticidas, iones u otros; o bien, las diferencias en parámetros físicos de las mismas, como el pH o la conductividad.

#### *4.1.1.1 Cuantificación de las respuestas de bioensayos de diferente duración.*

La cuantificación de las respuestas de toxicidad y teratogénesis evaluadas durante los primeros 4 días de desarrollo de los embriones, permitió comparar y corroborar la eficacia del método de bioensayos, tanto para agua superficial como subterránea. Al prolongar el ensayo desde los 4 a los 6 o 7 días de exposición, es posible aumentar el número de respuestas evaluadas. Después de la eclosión (2 - 3 dpf) se puede cuantificar el número de individuos que logran inflar la vejiga natatoria entre los 4 a 6 dpf (Fig. 3), la correcta morfogénesis del esqueleto craneofacial entre los 5 y 7 dpf (Fig. 2). Otra respuesta que puede evaluarse al alargar la duración del ensayo, es el patrón de distribución de los cromatóforos y la producción de pigmentos en los mismos. En nuestro laboratorio hemos visto que estas respuestas se manifiestan frente a la presencia de algunos contaminantes orgánicos (De la Paz & Allende, datos no publicados).



**Figura 2: Cuantificación de las respuestas obtenidas en bioensayos de distinta duración.** Respuestas evaluadas hasta a los 4 días post fecundación (pf) con muestras obtenidas de (A) Huelehueico; (B) Doñihue. Respuestas evaluadas después del día 5 pf de (C) Huelehueico; (D) Doñihue. Ed, edemas; MG, malformaciones generales; NIV, no inflación de la vejiga natatoria; MCF, malformaciones craneofaciales.

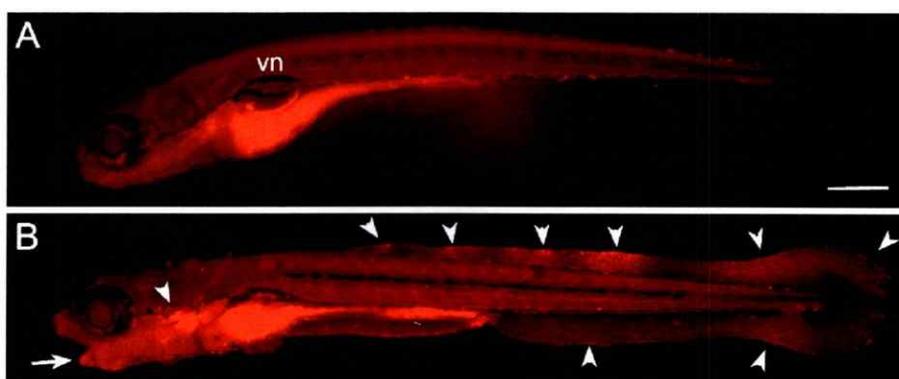


**Figura 3: Inflación de la vejiga natatoria en larvas de 7 dpf.** La exposición a algunas de las muestras de agua contaminada generaron defectos en la vejiga natatoria de las larvas, impidiendo su correcta inflación lo que genera problemas en la capacidad de desplazamiento de los individuos. Barra de escala 500  $\mu\text{m}$ .

La mayoría de las muestras evaluadas presentó una reducción en la inflación de la vejiga natatoria respecto de los controles, efecto que aunque no fue estadísticamente significativo, demostró ser bastante relevante, detectándose en prácticamente la totalidad de las muestras evaluadas (Fig. 2, C y D).

#### 4.1.2 Citotoxicidad, aumento de la muerte celular (MCA).

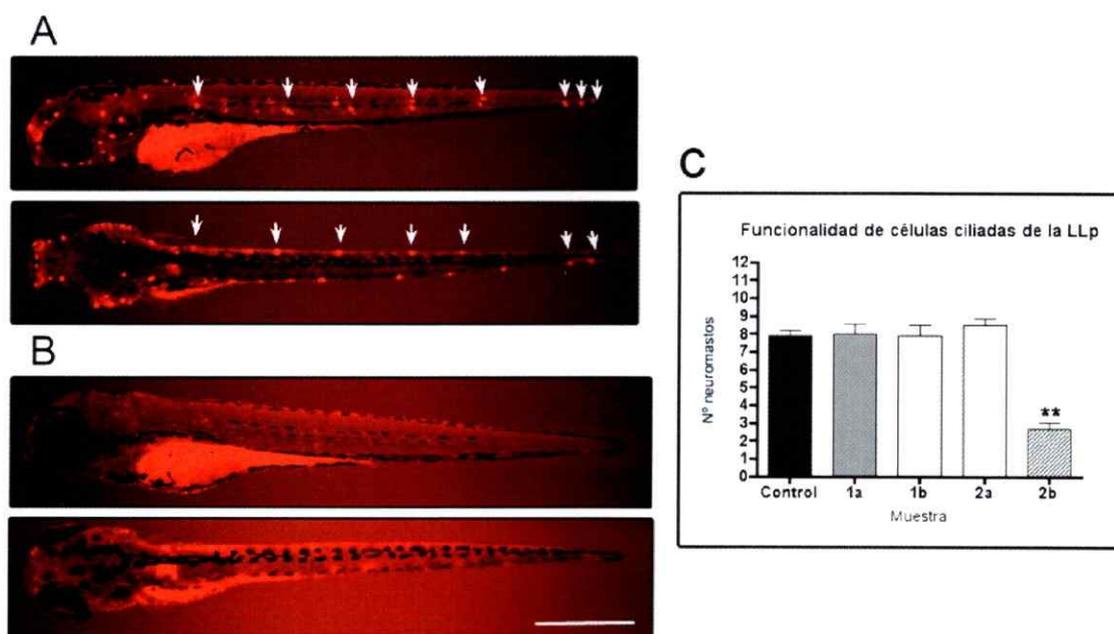
La tinción *in vivo* de células muertas con anaranjado de acridina en larvas, no revela un aumento en la muerte celular tras 24 horas de exposición en ninguno de los casos. Solamente hay un cambio significativo en una de las muestras evaluadas que presentó aumento de muerte celular principalmente en la epidermis del tronco, después de 2 días de exposición (muestra 2b). Al aumentar a siete días la duración de la exposición, tampoco se reveló una MCA significativa en la mayoría de las muestras evaluadas, a excepción nuevamente de lo ocurrido en las larvas expuestas a la muestra 2b del Valle del Huelehueico, las cuales presentaron MCA en la epidermis de la cola, aletas caudales y dorsales en desarrollo, y la cara (Fig. 4, B).



**Figura 4.** *Tinción in vivo de células muertas en larvas de 7 dpf expuestas a aguas del Valle del Huelehueico.* Vista lateral de larvas representativas mostrando *in vivo* la presencia de un número mayor de células muertas en larvas expuestas a agua de consumo humano, muestra 2b (B, cabezas de flecha) en comparación con los controles (A). vn, vejiga natatoria; flecha, mandíbula inferior desviada. Barra de escala 300  $\mu$ m.

#### 4.1.3 Neurotoxicidad periférica: pérdida de funcionalidad de células ciliadas de la LLp (FCC)

Larvas expuestas a la mayoría de las muestras provenientes de las tres regiones estudiadas, resultaron no tener diferencias significativas en el número de neuromastos funcionales con los controles a los 4 dpf, momento en el cual la LLp, ya posee entre 8 y 10 neuromastos funcionales. Sólo la muestra 2b presentó diferencia con el control, observándose una ausencia de marca en prácticamente la totalidad de los neuromastos de la LLp, en comparación con los controles (Fig. 4, A y B).



**Figura 5: Pérdida de funcionalidad en células ciliadas de la línea lateral posterior (FCC) en larvas de 4 dpf expuestas a aguas del Valle del Huelehueico.** (A) Control; (B) Larva expuesta a la muestra 2b. Arriba vistas laterales y abajo vistas dorsales. (C) Cuantificación del número de neuromastos funcionales en la LLp en larvas de 4 dpf (FCC). Las larvas expuestas a la muestra 2b presentaron una reducción estadísticamente significativa en comparación con el control (\*\*P < 0,01). Barra de escala 500  $\mu$ m.

La Figura 5 muestra una larva representativa que fue expuesta a la muestra 2b (Fig. 5, B), y como consecuencia no posee células ciliadas funcionales en ningún neuromasto del sistema de la línea lateral. Este efecto es evidente si se comparan estas larvas expuestas, con las larvas del grupo control (Fig. 5, A) que se encuentran en la misma etapa del desarrollo. A diferencia de lo que ocurre en las larvas expuestas a la muestra de agua 2b, las larvas control a los 4 dpf poseen aproximadamente ocho neuromastos en cada lado del tronco y la cola (flechas), los que corresponden a la LL posterior (LLp), y en la LL anterior (cabeza) un número abundante de neuromastos, también incorporan a la tinción vital diAsp demostrando la presencia en su interior, de células ciliadas funcionales.

#### ***4.2 Determinar posibles mecanismos de acción asociados a la inhibición de la eclosión, usando tóxicos de referencia.***

Como se mencionó anteriormente, uno de los eventos cruciales para lograr la eclosión en peces, es la liberación al espacio perivitelino de enzimas proteolíticas que degraden al corion, o *coriolisinas*; por lo que este objetivo se enfocó mayoritariamente en el estudio de las células responsables de la producción de la coriolisina de pez cebra

##### ***4.2.1 Inhibición de la eclosión causada por fungicidas triazólicos.***

En un trabajo anterior se observó que la exposición de embriones de pez cebra a compuestos químicos de la familia de los triazoles en concentraciones sub-letales (Triadimefón, FON; Triadimenol, NOL; y 1,2,4-Triazol, 1.2.4-T), inhibe la eclosión de las larvas, por lo que estos mismos compuestos fueron utilizados como tóxicos de

referencia para estudiar a nivel celular los posibles fenómenos que explican este efecto.

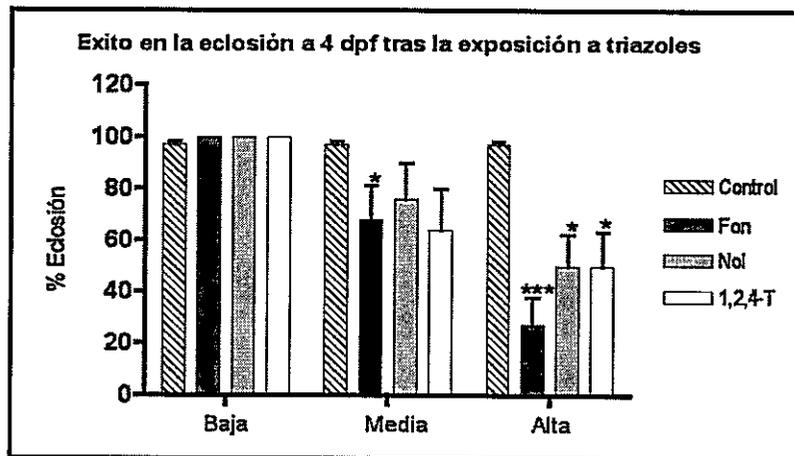
**Tabla 3: Concentraciones de exposición a triazoles que inhiben la eclosión en embriones de pez cebra.**

Tóxico	Periodo de exposición	Concentración de exposición		
		Alta (LC <sub>50</sub> 96h)	Media (IC <sub>50</sub> 96h)	Baja (IC <sub>50</sub> 96h/10)
Triadimefón (FON)	3 - 48 hpf	36,4 mg/L	16,3 mg/L	1,6 mg/L
Triadimenol (NOL)	3 - 48 hpf	55,5 mg/L	28,0 mg/L	2,8 mg/L
1,2,4-Triazole (1,2,4-T)	3 - 48 hpf	12,0 g/L	5,6 mg/L	0,6 mg/L

LC<sub>50</sub> 96 h, concentración letal para el 50% de una población tras 96 h de exposición; IC<sub>50</sub> 96 h, concentración que inhibe la eclosión del 50% de una población experimental luego de 96 h de exposición.

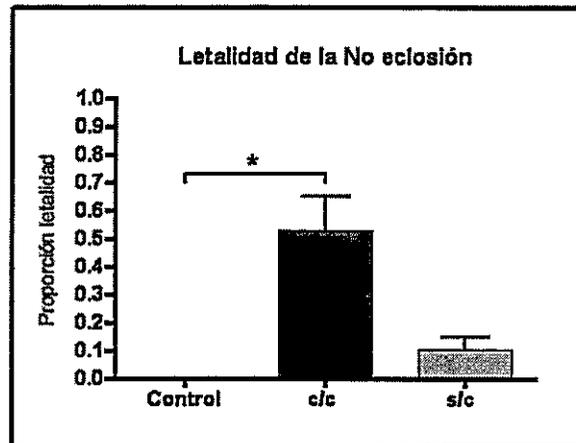
Las concentraciones de triazoles utilizadas en todos los experimentos de este trabajo derivan de concentraciones efectivas determinadas en un trabajo anterior (De la Paz, 2009). Las concentraciones altas de exposición, corresponden a la concentración letal para el 50% de la población, tras 96 h de tratamiento (LC<sub>50</sub> 96 h); las concentraciones medias son equivalentes a aquellas que inhiben la eclosión del 50% de la población tras 96 h de exposición (IC<sub>50</sub> 96 h) y finalmente las concentraciones bajas se refieren a esta última diluida 10 veces (Tabla 3). El tiempo de incubación se extendió en todos los casos sólo por 48 h, para minimizar la letalidad de los tratamientos dentro de los primeros 4 días de desarrollo.

En la Figura 6 se muestra el éxito en la eclosión en individuos de pez cebra expuestos a triazoles durante la embriogénesis, y la dependencia de esta respuesta con la concentración. Así, la exposición a concentraciones altas de triazoles disminuye el éxito en la eclosión, alcanzando sólo un 27% de éxito con FON, y un 50% para NOL y 1,2,4-T. En el caso de las concentraciones medias, la exposición a FON resultó en una diferencia significativa en comparación con los controles, ya que sólo un 68% de los embriones tratados logró eclosionar. Las concentraciones bajas de exposición no causaron diferencias aparentes con el control a los 4 dpf, en ningún caso.



**Figura 6: Éxito de la eclosión en larvas expuestas a triazoles durante la embriogénesis.** El gráfico refleja el efecto que tiene sobre la eclosión; la exposición a concentraciones altas, medias y bajas de tres triazoles distintos (\*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ).

Para evaluar el efecto letal que puede tener la inhibición de la eclosión, se comparó en individuos expuestos a una alta concentración de FON, la sobrevivencia de embriones no eclosionados versus individuos liberados de su corion de manera manual. El registro de la sobrevivencia de ambos grupos se continuó hasta los 8 dpf (Fig. 7), periodo tras el cual los individuos sufren inanición si no se les administra alimento.



**Figura 7: Mortalidad en larvas descorionadas y no eclosionadas hasta los 8 dpf.** Se evaluó la mortalidad de individuos tratados con FON durante la embriogénesis diariamente hasta el octavo dpf, y el resultado de los datos acumulados se muestra como proporción de individuos muertos en los distintos grupos: control; tratados con FON (c/c); y tratados con FON, pero descorionados al segundo dpf (s/c).

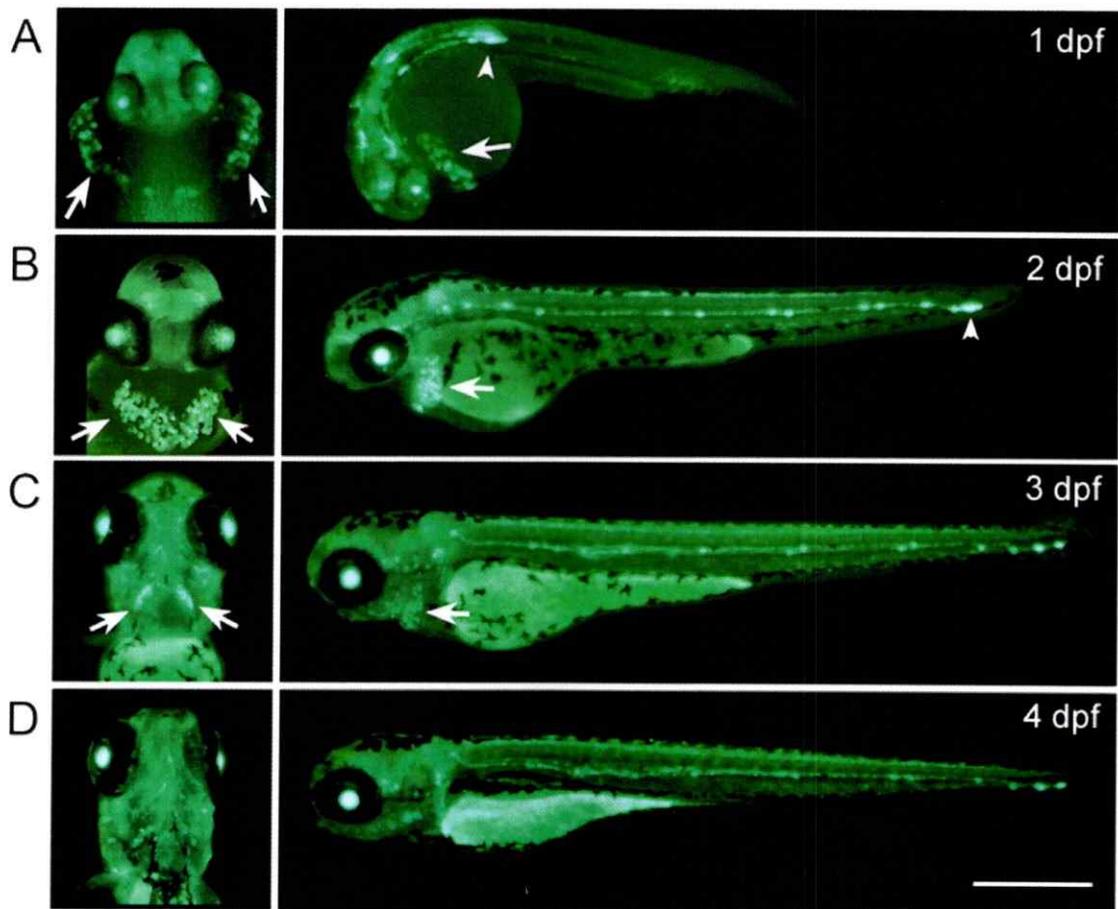
La evaluación de la mortalidad en los embriones no eclosionados (c/c, Fig. 7) presenta una diferencia estadísticamente significativa con los controles ( $*P < 0,05$ ), lo que no ocurrió en el caso de los embriones manualmente descorionados (s/c, Fig. 7); que alcanzaron una mortandad que no fue estadísticamente diferente a la de los controles. Este resultado demuestra que la inhibición de la eclosión es letal en embriones de pez cebra. Además, indica que el defecto inducido por el contaminante es sobre el corion mismo o sobre la capacidad del embrión de salir de éste, pero que no son otros defectos que afectan el normal desarrollo del pez, los que producen mortandad en este periodo de tiempo. Este hallazgo nos motivó a indagar en los mecanismos de eclosión en las larvas, y a examinar la función de las glándulas de eclosión en peces expuestos a contaminantes.

#### 4.2.2 Cuantificación y evaluación morfológica de las CGE, en larvas expuestas a triazoles.

Para analizar las causas que conllevan a la inhibición de la eclosión provocada por los triazoles, decidimos evaluar la integridad de las células de la glándulas de eclosión (CGE) en las etapas de pre-eclosión (1 dpf) y de eclosión (2 dpf a 3 dpf), ya que, una alteración que les impidiera realizar su función biológica secretora, podría ser la causa del efecto observado. Para determinar si esta respuesta se relaciona con la alteración del desarrollo de las CGE, estudiamos a este grupo celular *in vivo* mediante la utilización de líneas de pez cebra transgénicos.

##### *4.2.2.1 Patrón de expresión de GFP en la línea transgénica PAX6<sub>hs6A</sub>.*

En la línea transgénica *PAX6<sub>hs6A</sub>* de pez cebra, la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) es dirigida por un elemento regulador del gen *pax6* de humanos. La expresión del reportero en este transgénico ha sido descrita en distintas partes del sistema nervioso central y periférico; como el tectum óptico, el cerebro posterior, la médula espinal, la línea lateral y el cristalino (Navratilova y col, 2009). Al analizar con mayor detención la expresión de GFP en distintos estadios, es posible notar que el reportero se encuentra además, en el citoplasma de un grupo de células en la región pericárdica del vitelo entre los días 1 y 3 post fecundación, expresión que al día 4 ya no es detectable bajo el microscopio (Fig. 8). Al comparar la expresión espacio-temporal de GFP en estos individuos, con el patrón de expresión del gen *he1a* (Thiesse 2001, Fig. 1), se determinó que estas células corresponden las CGE.



**Figura 8: Patrón de expresión de GFP en la línea transgénica *PAX6\_hs6A*.** A la izquierda vistas ventrales de la región rostral muestran la expresión de GFP en las CGE en la región pericárdica del saco vitelino (flechas), expresión que persiste solamente hasta los 3 dpf. A la derecha vistas laterales de mismas larvas, muestran expresión de GFP en el primordio de la LLp (cabezas de flecha) durante su migración (1 - 2 dpf), pero a diferencia de lo ocurrido con las CGE esta expresión en la LLp se mantiene al comenzar el periodo larval. Barra de escala 500  $\mu$ m.

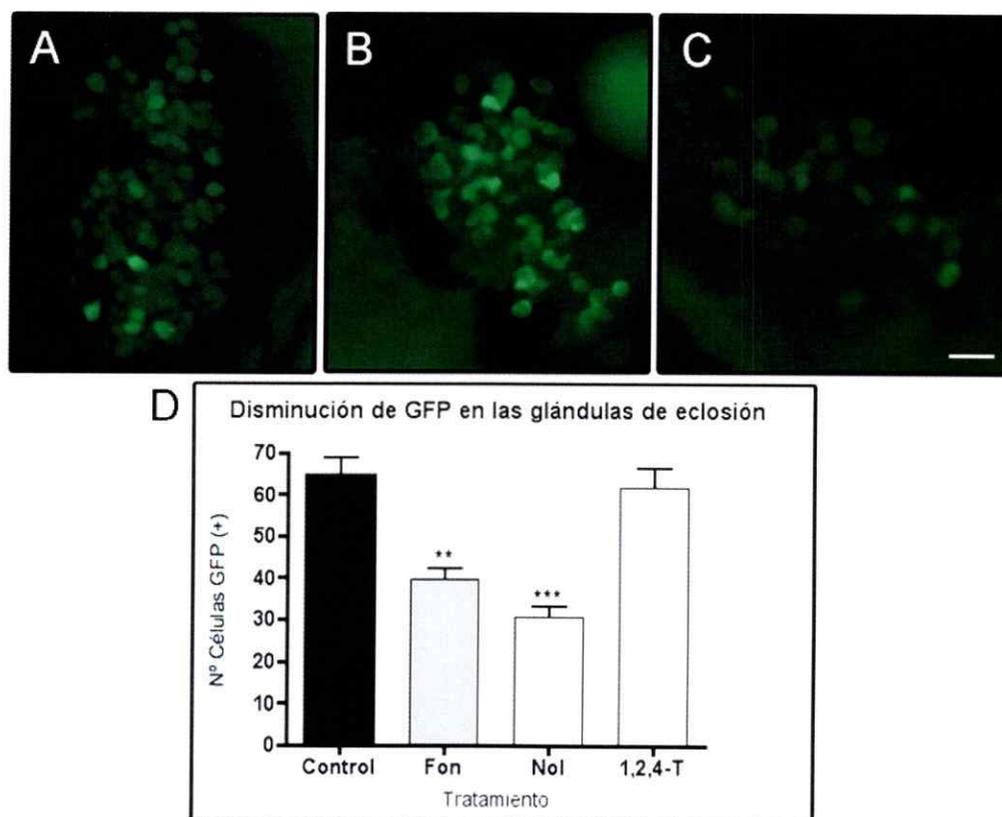
En los individuos *PAX6\_hs6A* se puede observar en la región pericárdica del vitelo entre los días 1 y 3 post fecundación, la presencia de GFP en un patrón casi idéntico al de expresión del gen *he1* (Fig. 8, A-C). Este patrón de expresión es consistente con la ubicación y la naturaleza transiente de las CGE, que una vez pasado el periodo de eclosión entre 48 y 72 hpf, desaparecen (Fig. 8, D). Se observa además, como este grupo de células cambia su distribución alrededor del vitelo, que abarca una amplia

superficie (Fig. 8, A) hasta una ubicación cada vez mas central y anterior en la región ventral, acercándose progresivamente a la zona faríngea de los individuos a los 3 dpf (Fig. 8, C). En esta etapa del desarrollo, se puede observar un grupo de células bastante reducido si se compara con la extensión inicial del espacio que ocupaban al día 1 y 2 post fecundación (Fig. 8, A y B).

#### *4.2.2.2 Cuantificación del número de células de las glándulas de eclosión, en larvas PAX6<sub>hs6A</sub>.*

La cuantificación del número de células GFP positivas en las larvas expuestas a concentraciones altas de los tres triazoles utilizados, denota una disminución significativa en la detección del reportero (Fig. 9, D). Efecto que fue dependiente de la concentración de exposición, lo que se muestra en la Figura 9, A-C tomando los tratamientos con FON como ejemplo. La exposición a FON y NOL produce una reducción en el número de células detectables, de aproximadamente un 40% y 55% respectivamente. Esto no ocurre tras la exposición a 1,2,4-T donde el número de células GFP positivas no fue significativamente distinto de los controles, a pesar de que también produce inhibición de la eclosión en la concentración utilizada.

Para evaluar las causas de esta diferencia entre los tratamientos con los fungicidas (FON y NOL) y el triazol libre (1,2,4-T), y determinar si esta reducción en el número de células detectables se debe a una diferencia en el número de las mismas, ó a un cambio en la expresión del reportero, se utilizó una segunda línea transgénica que permitiera cuantificar con mayor precisión y evaluar morfométricamente a este grupo de células.

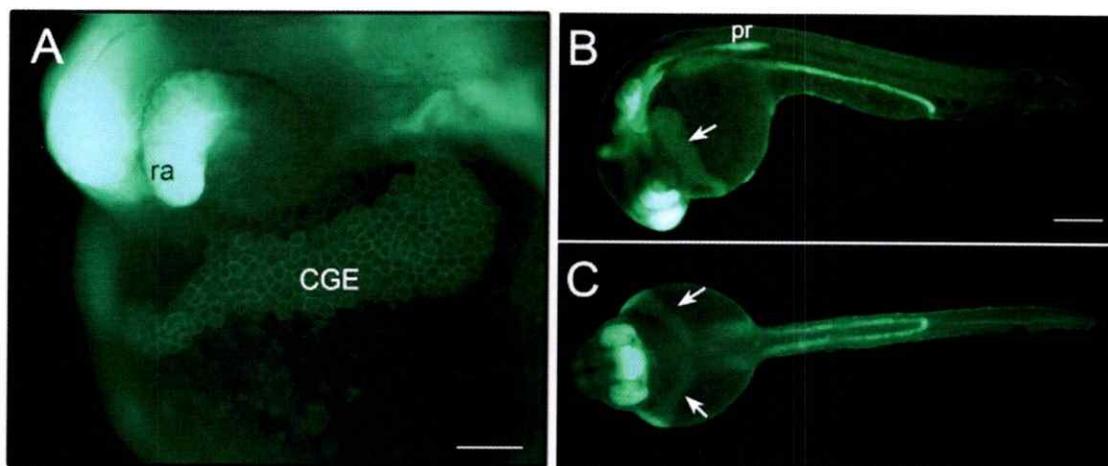


**Figura 9: Cambio en la expresión génica en las CGE tras la exposición a tóxicos que inhiben la eclosión.** CGEs de larvas representativas de la línea transgénica *PAX6\_hs6A* de 2 dpf muestran la disminución dependiente de la concentración, del número de células tras la exposición a FON durante la embriogénesis. El número de CGEs detectables tras la exposición a concentraciones altas de triazoles fue cuantificado, y se observa una disminución significativa en las larvas expuestas a FON y NOL, pero no a 1,2,4-T. (A) Control; (B) FON 28 mg./L; (C) FON 36,4 mg/L; (D) Cuantificación (N=20 embriones/tratamiento) (\*\*P<0,01; \*\*\* P<0,001). Barra de escala 50  $\mu$ m.

#### 4.2.2.3 Cuantificación del número de glándulas de eclosión, en larvas *cldnB:GFP*, tras exposición a triazoles.

El experimento anterior fue repetido, esta vez con embriones *cldnB:GFP* que también expresan GFP en las glándulas de eclosión. A diferencia de la línea transgénica *PAX6\_hs6A*, en *cldnB:GFP* la expresión del reportero es dirigida por el promotor del gen *cldnB* y la proteína fluorescente posee una señal de unión a membranas (Haas & Gilmour, 2006). En estos embriones entre 1 y 2 dpf, la expresión

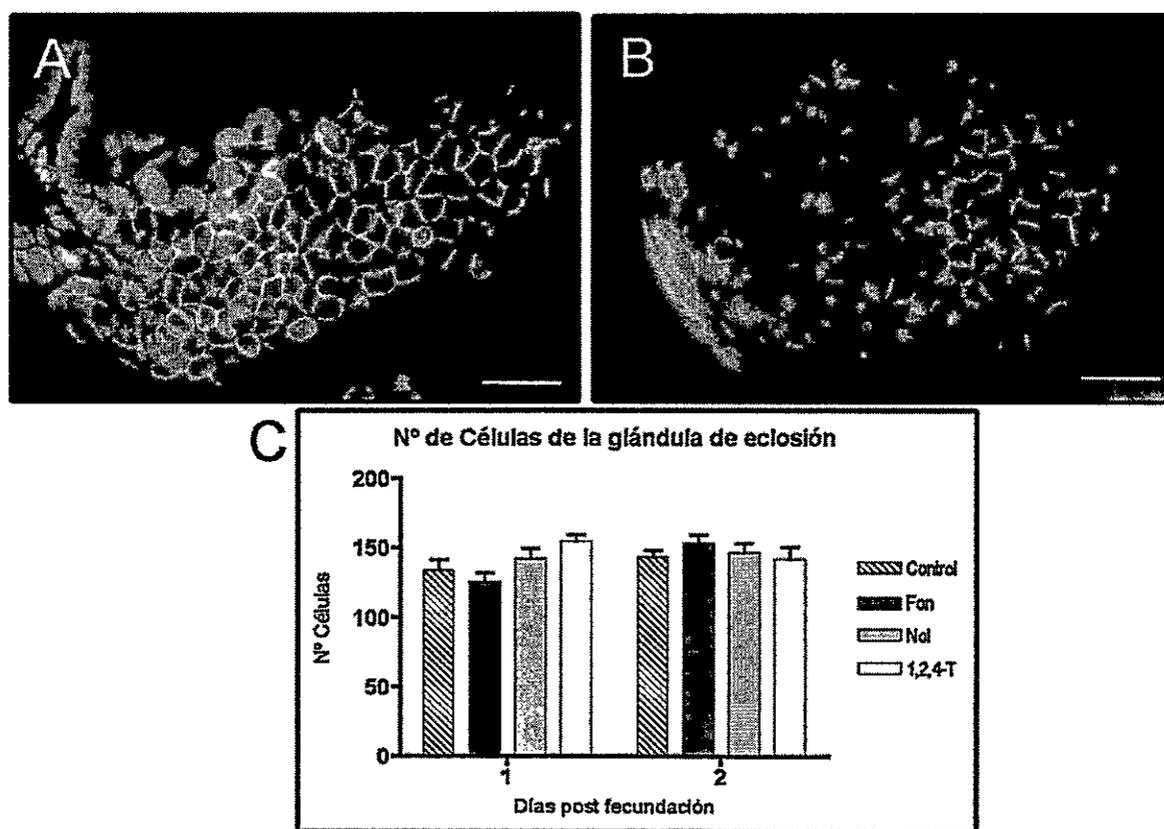
del reportero se observa en las CGE, el epitelio de los pronefros, la retina anterior y en todas las células del sistema de la LLp, entre otras (Fig. 10).



**Figura 10: Patrón de expresión de GFP en la línea transgénica *cldnB:GFP*.** Expresión de GFP muestran la distribución bilateral de las CGE en la región pericárdica. (A) Vista lateral anterior; (B) vista lateral; (C) vista ventral. CGE, células de las glándulas de eclosión; pr, primordio de la LLp; ra, retina anterior. Barra de escala (A) 100  $\mu\text{m}$ , (B) 250  $\mu\text{m}$ .

Para cuantificar las CGE presentes en los embriones de 1 y 2 dpf expuestos a triazoles, se contó en embriones *cldnB:GFP* el número de células en la mitad del área total del epitelio, el que posee una simetría bilateral como puede apreciarse en la Figura 10, C. La GFP de membrana en este transgénico permitió de manera mucho más simple y confiable la cuantificación de las CGE, y demuestra que no hay una disminución del número de células tras los tratamientos con triazoles a los 2 dpf en comparación con los controles, y que tampoco existe un cambio en la cantidad de éstas entre el primer y segundo día post fecundación (Fig. 11); por lo que la proliferación celular de este tejido probablemente finalice antes del primer día. Debido a que la disminución de la expresión del reportero en las CGE de los embriones

*PAX6<sub>hs6A</sub>* según este resultado, no se debe a una reducción en el número de células, decidimos evaluar la morfología de éstas para determinar su integridad o si existe alguna alteración que pudiese sugerir el motivo del cambio de expresión génica observado.



**Figura 11: Cuantificación del número de CGE en la línea *cldnB:GFP*.** Microfotografías de fluorescencia de las CGE de individuos representativos (A) Control; (B) FON; (C) cuantificación de las CGE que no refleja diferencias significativas entre distintos estadios o tratamientos (1dpf: N=17; 2 dpf: N=25). Barra de escala, 50  $\mu$ m.

#### 4.2.2.4 Análisis morfológico de células de la glándula de eclosión en la línea *cldnB:GFP*

La evaluación morfométrica de las CGE comprendió la medición de su área, diámetro y circularidad. Los resultados demuestran que, aunque el área celular se mantiene respecto a los controles en los embriones sometidos a cualquiera de los tratamientos (Fig. 12, A); existe una diferencia en la forma de las células de los embriones de 2 dpf tratados con FON y NOL, ya que, éstas tienen un perímetro (Fig. 12, B) y circularidad diferente (Fig. 12, C) que las CGEs de los controles. Los embriones tratados con 1,2,4-T no presentan diferencias morfológicas en ningún caso con los controles (Fig. 12, B y C).

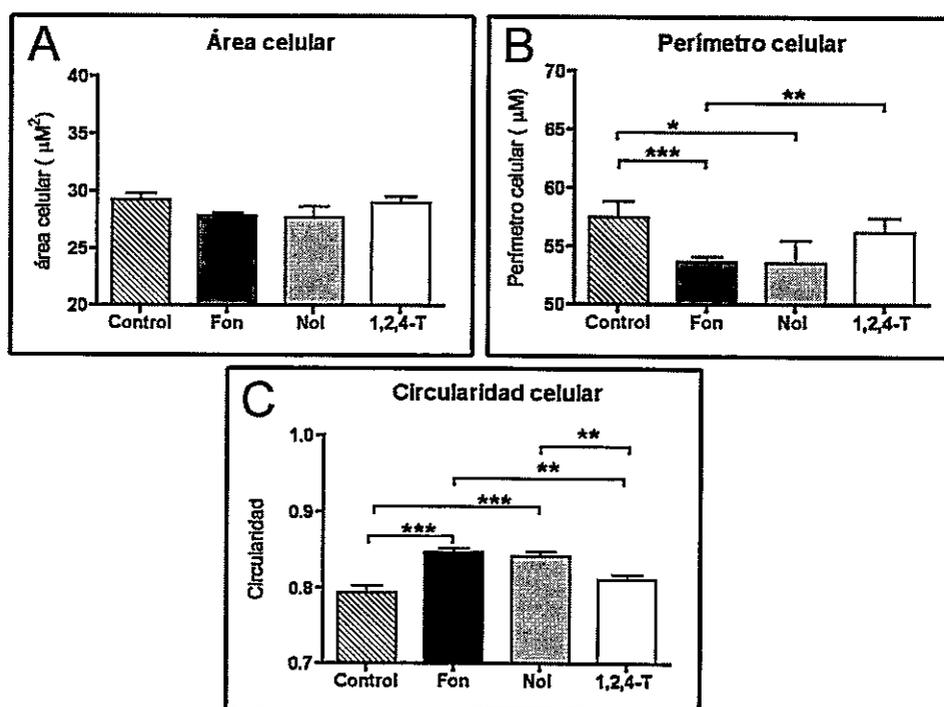


Figura 12: *Evaluación morfométrica de las CGE a los 2 dpf*. El número de células totales medidas fue de 70 por cada tratamiento (7 células x 10 embriones / tratamiento). (A) área celular; (B) perímetro celular; (C) circularidad de las CGE.

Así, la descripción morfométrica de las CGEs a los 2 dpf, revela que estas células en individuos normales poseen un área entre los 27 y 30  $\mu\text{m}^2$ , su perímetro bordea entre los 55 a 60  $\mu\text{m}$ , y su circularidad alcanza a un 80% aproximadamente en este estadio. En cambio en los individuos tratados con FON y NOL, el perímetro de las CGE es menor, alcanzando entre 52 y 55  $\mu\text{m}$ , mientras la medida del circularidad llega al 85%, en ambos casos.

#### 4.2.3 Evaluación de muerte celular en las células de las glándulas de eclosión, mediada por tóxicos de referencia.

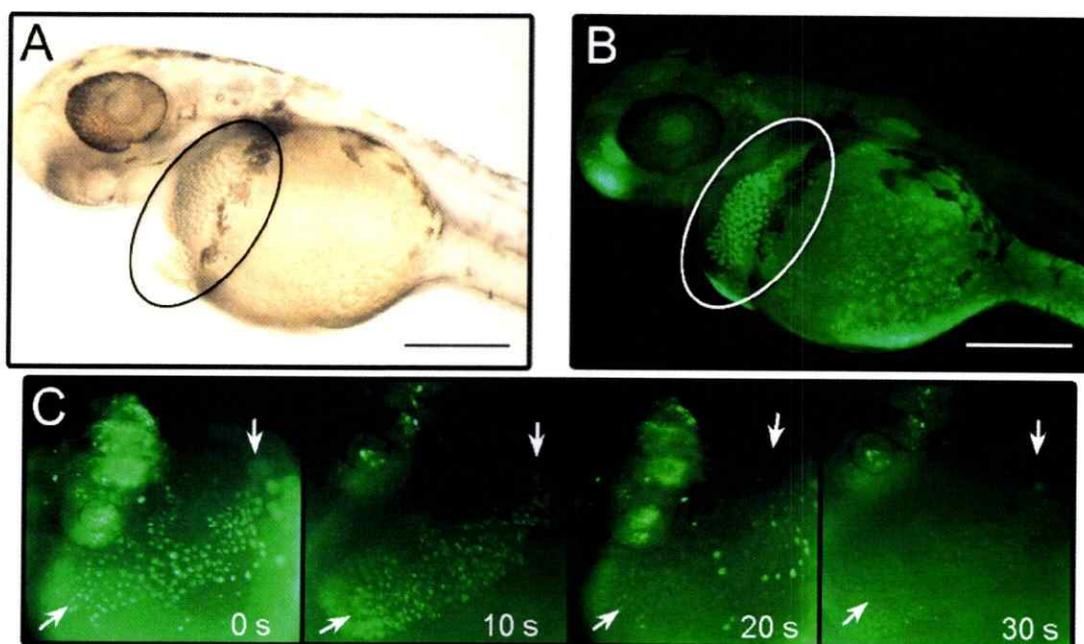
En un trabajo anterior de nuestro laboratorio, se observó de manera preliminar que las CGE de embriones de 2 dpf expuestas a FON incorporan el colorante vital anaranjado de acridina, el cual se une al ADN de células muertas; por lo que es ampliamente utilizado como marcador de muerte celular *in vivo* en embriones de pez cebra (Parng y col, 2004). Este antecedente nos llevó a pensar que la diferencia morfológica observada en las CGE tras los tratamientos con FON y NOL, podía explicarse por algún proceso de aumento de volumen, fenómeno que puede anteceder por muchas horas a la necrosis u oncosis (Majno & Joris, 1995).

##### *4.2.3.1. Detección de muerte celular con anaranjado de acridina.*

El colorante vital anaranjado de acridina demostró ser incorporada por las CGE de embriones y larvas de 1 y 2 dpf tratadas con triazoles, pero al intentar cuantificar esta respuesta notamos que las GCE de los individuos control, también incorporaban la marca en todos los experimentos realizados, que fueron más de 3. Al evaluar esta

marca con mayor detención, se hizo evidente que ésta desaparece de las CGE de manera progresiva y bastante rápida tras la exposición a la luz, tanto en los controles como en los tratamientos; aunque la marca de las zonas que normalmente presentan muerte celular durante el desarrollo (zonas control), como el ano o la aleta caudal, no desaparecía.

La Figura 13 muestra la coincidencia espacial de la marca vital con las CGE, comparando la posición de estas últimas con la ubicación de la marca (Fig. 13, A y B), además muestra como ésta desaparece en los embriones control de 1 dpf tras la exposición a la luz UV, mientras la marca presente en algunas células del cerebro anterior (Fig. 13, C), y en las zonas control, no desaparece (no mostrado).



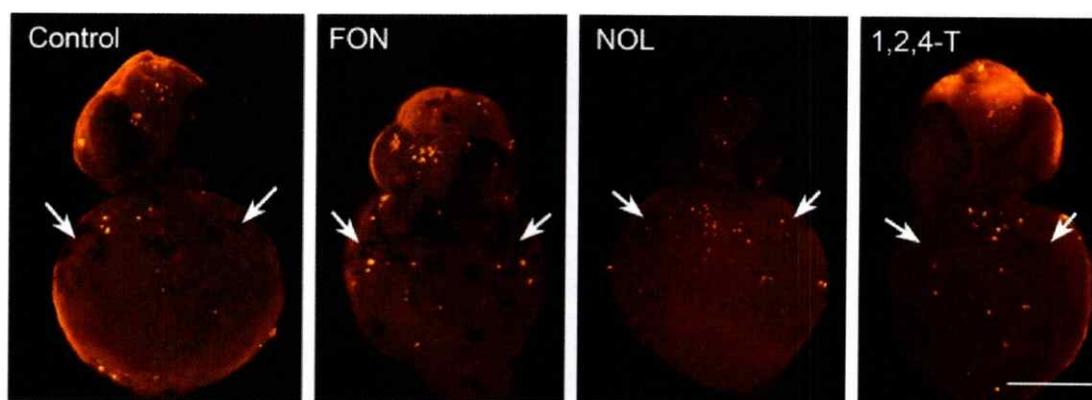
**Figura 13: Evaluación de muerte celular en las CGE en embriones silvestre con anaranjado de acridina.** (A) Larva silvestre de 2 dpf, fotografiada bajo luz blanca y (B) luz UV con filtro verde; (C) larva silvestre de 1 dpf, con luz UV y filtro verde. Se muestra la localización de la marca en las CGE (círculos en A y B) y desaparición progresiva de la misma (flechas en C) en menos de un minuto de exposición continua a la luz UV. Barra de escala 250  $\mu\text{m}$ .

Para determinar si la incorporación de anaranjado de acridina en las CGE, corresponde a una condición de muerte celular en este tejido a partir del primer dpf, o a una incorporación inespecífica de la marca por parte de éste, decidimos realizar en los mismos estadios y tras las mismas exposiciones, una reacción de detección de células apoptóticas con un método enzimático específico para muerte celular programada.

#### 4.2.3.2. Detección de células apoptóticas mediante TUNEL.

La técnica de TUNEL detecta de manera enzimática las etapas iniciales de la fragmentación del ADN, característica de las células que sufren muerte celular programada.

La Figura 14 muestra vistas ventrales de la parte anterior de embriones de 2 dpf tratados con triazoles, que fueron sometidas al marcaje con TUNEL. Se pueden apreciar algunas marcas de células apoptóticas en la región del vitelo y del cerebro anterior, tanto en los controles como en los individuos tratados.



**Figura 14: Detección de células apoptóticas mediante TUNEL en embriones expuestos a triazoles.** Vistas ventrales de larvas de 2 dpf muestran la región anterior del vitelo y la cabeza, y no presentan diferencias aparentes en la cantidad de células apoptóticas entre los tratamientos y los controles. Barra de escala 200  $\mu\text{m}$ .

Aunque los embriones tratados muestran un ligero aumento en la cantidad de células apoptóticas, la diferencia es insignificante en el área de las CGEs (Fig. 14). Así, este experimento no reveló una diferencia significativa en la cantidad de células apoptóticas entre los tratamientos y el control, por lo que no se podría atribuir un efecto de inducción de muerte celular de los triazoles sobre este tejido. El mismo experimento fue realizado con embriones de 1 dpf y el resultado también fue negativo (figura no mostrada).

#### 4.2.4. Evaluación de proteasas liberadas por las CGE de embriones de pez cebra en etapa previa a la eclosión.

Los resultados anteriores demuestran que existen diferencias fenotípicas expresadas como cambios en la expresión del reportero GFP en la línea transgénica *PAX6\_hs6A*, y como diferencias morfológicas entre las glándulas de eclosión de embriones controles y tratados con triazoles. Buscando una explicación a esta situación y la relación con la inhibición de la eclosión que producen estos compuestos, se descartó la muerte celular anticipada y también la reducción del número de células. Lo que a su vez, descarta posibles defectos en el desarrollo o la proliferación de este tejido transiente. Así, otra posible explicación podría ser una acumulación o falla en la liberación del contenido citoplasmático en estas células.

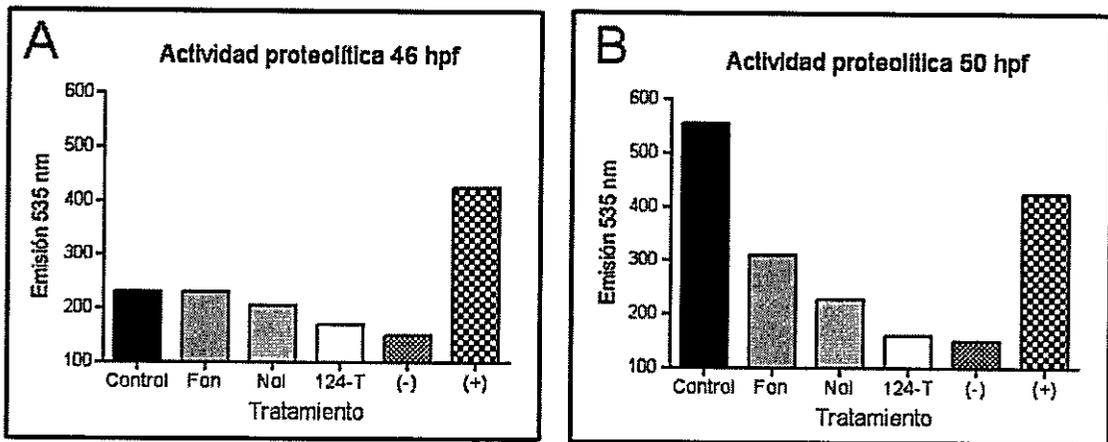
La maduración de estas células secretoras conlleva una acumulación progresiva de gránulos de cimógenos entre el primero y segundo día de desarrollo que, como se dijo anteriormente son liberados antes de la eclosión entre el segundo y tercer día de desarrollo, aunque se desconoce el momento o estadio preciso de su liberación o si es

un evento sincrónico en el desarrollo del pez cebra. Lo que sí se sabe, es que este proceso es indispensable para el éxito de la eclosión.

Para evaluar la liberación del contenido de las CGE, decidimos medir el cambio en la actividad proteolítica del medio de incubación de embriones descorionados manualmente, y de esta manera determinar el momento en que el contenido de estos gránulos, es liberado al espacio extraembrionario.

#### *4.2.4.1. Actividad proteolítica del medio de incubación.*

Los datos presentados en la Figura 15 muestran la actividad proteolítica relativa del medio de incubación que contenía embriones descorionados entre las 46 y 50 hpf, medida con un método colorimétrico. La intensidad de la emisión de fluorescencia (535 nm) refleja la actividad proteolítica total del medio, que se relaciona con la secreción de proteasas por parte de los embriones incubados en éste. A las 46 hpf, la intensidad de la emisión del medio control (230) es similar a la intensidad de emisión en los tratamientos con FON (230), NOL (204) y 1,2,4-T (170), valores que no superan por mucho a la emisión del medio blanco de la reacción (149); mientras que el valor para el control positivo con tripsina es indiscutiblemente superior (425). A las 50 hpf, el valor de intensidad de emisión de fluorescencia para el medio de los embriones control aumenta considerablemente de 230 a 553, aunque los valores para los embriones tratados varía levemente (FON, de 230 a 309; NOL, de 204 a 227, y 1,2,4-T, de 170 a 159 ) y mantienen una diferencia marginal con el blanco (149), pero considerable aún en comparación con la tripsina (425).



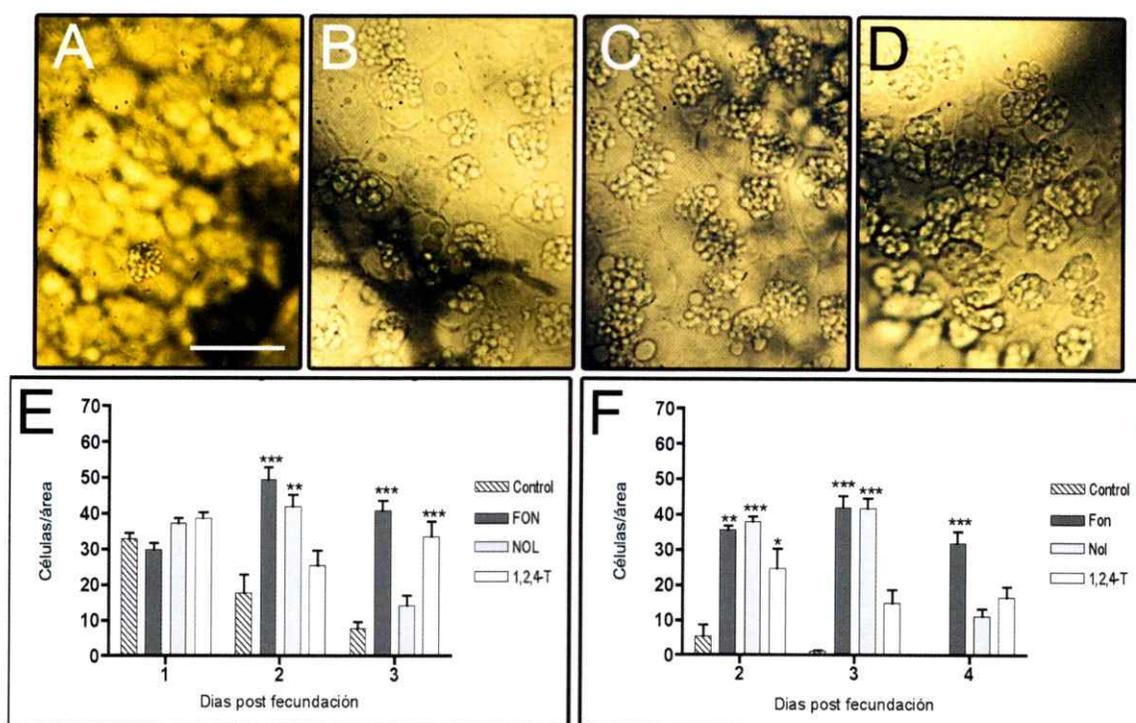
**Figura 15: Detección de actividad proteolítica en el medio extraembrionario.** La evaluación de la actividad proteolítica, reflejada por la emisión de luz 535 nm, en el medio E3 que contenía embriones en periodo normal de eclosión, muestra diferencias entre los individuos que fueron previamente tratados con triazoles y los individuos control a las 50 hpf, mientras 4 horas antes la emisión 535 nm era similar en todos los casos.

#### 4.2.4.2. Evaluación del contenido de gránulos de cimógeno en las CGE.

Se ha descrito que el contenido de las CGE en el pez cebra es altamente refractante (Kimmel y col, 1995), y que una vez liberados los gránulos que contienen en su citoplasma, esta característica se pierde. Utilizando microscopía óptica, se cuantificó el número de CGEs que contenían gránulos de cimógeno en su interior (Fig. 16) para evaluar así, si el arresto de la enzima HE1 es responsable de la inhibición de la eclosión de las larvas, y explica finalmente la diferencia en la actividad proteolítica del medio extraembrionario entre los controles y los tratamientos con triazoles.

Los embriones que fueron sometidos a concentraciones altas de FON, NOL y 1,2,4-T, contienen un número significativamente superior de células con contenido granular en comparación con los embriones control. Dos experimentos distintos se realizaron para comprobar este resultado. En el primero, embriones en estadio de blástula fueron expuestos por 48 h a los químicos, y la liberación de gránulos se evaluó a los 1, 2 y 3

dpf para caracterizar la acumulación y liberación de los mismos. Se observó que, según lo esperado, no existe diferencia entre los controles y los tratamientos hasta el segundo dpf, diferencia que se incrementa al tercer dpf (Fig. 16, E). En el segundo experimento las exposiciones se iniciaron a las 24 hpf, y la cuantificación se realizó a los 2, 3 y 4 dpf (Fig. 16, F).



**Figura 16: Retención de gránulos de cimógeno contenidos en las CGE tras la exposición a triazoles.** (A) Control; (B) FON; (C) NOL; (D) 1,2,4-T; (E) exposición temprana (0 a 2 dpf), evaluación de 1 a 3 dpf; (F) exposición tardía (1 a 3 dpf) evaluación de 2 a 4 dpf. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

La Figura 16 refleja la dinámica de liberación de gránulos de cimógeno de las CGEs entre los 1 y 4 dpf. Al observar en los controles el número de células/área que contiene gránulos de cimógeno, es evidente la disminución de éstas entre los 2 y 3 dpf, llegando

a la ausencia total al día 4. Esta situación no es replicada por los embriones tratados, los que a pesar de mostrar algunas variaciones en el periodo de tiempo evaluado, mantienen a partir de los 2 dpf una diferencia significativa con los controles tras la exposición temprana (Fig. 16, E) y tardía en el número de células/área con contenido granular (Fig. 16, F).

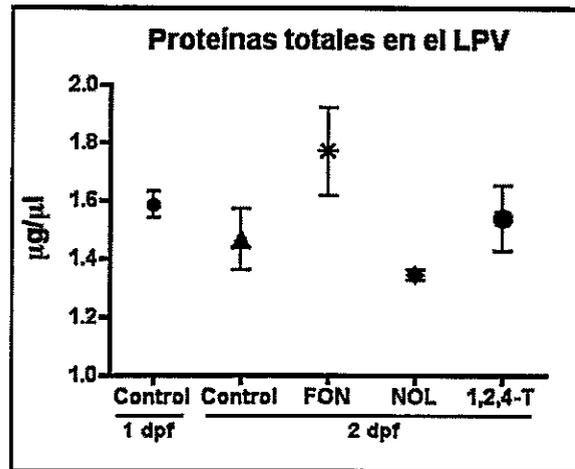
#### ***4.3. Caracterización del contenido proteico del líquido perivitelino (LPV) en el pez cebra.***

Para realizar una caracterización inicial del contenido del LPV se determinó la concentración total de proteínas presentes en este medio a 1 y 2 dpf, y se investigó la identidad de las mismas a los 2 dpf, ya que, la información acerca de otras proteínas que se encuentren en el LPV, aparte de las coriolisinas, es prácticamente inexistente en pez cebra.

##### ***4.3.1 Determinación de la concentración de proteínas totales en el LPV.***

El contenido proteico del LPV extraído del espacio perivitelino (EPV) de embriones de 24 y 48 hpf, se analizó para conocer la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford. Se determinó que la concentración encontrada en el LPV de embriones de 1 dpf que fue de 1,6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; mientras a los 2 dpf la concentración de proteínas totales en el LPV (Fig. 17) es en promedio de 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , valor que no presenta diferencia estadísticamente significativa con el primer día, ó con embriones del mismo estadio tratados con triazoles, cuyos valores promedio alcanzaron a 1,8

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para FON;  $1,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  para NOL y  $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  para 1,2,4-T a los 2 dpf (cálculos en anexo C).

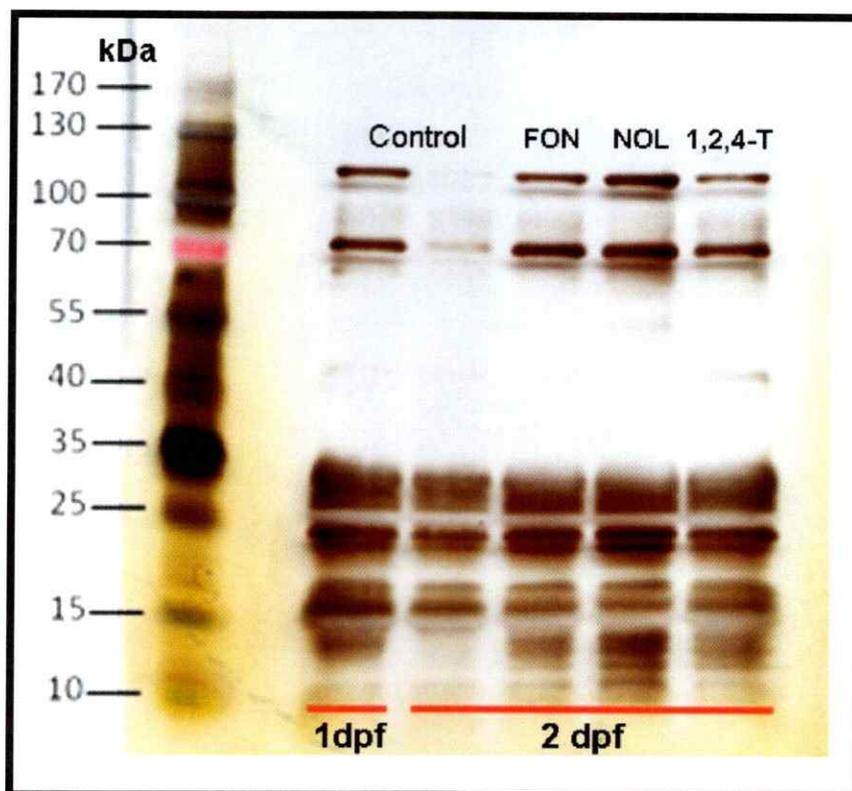


**Figura 17: Concentración de proteínas totales en el LPV de embriones de pez cebra.** La concentración de proteínas totales se determinó para el LPV de embriones de 1 y 2 dpf, y también después del tratamiento con triazoles a los 2 dpf.

La determinación de las proteínas totales en el LPV demuestra que no existe una variación significativa en su concentración entre el primer y segundo dpf, y tampoco luego de la exposición a triazoles (Fig. 17), aunque este método no permitiría detectar si hay un cambio a nivel de la identidad y proporción de las distintas proteínas que se encuentran presentes este medio extraembrionario.

#### 4.3.2 Separación de las proteínas presentes en el LPV en etapa de pre-eclosión y eclosión por SDS-PAGE

Para determinar si existen cambios en la composición proteica del LPV entre los días 1 y 2 post fecundación, y tras el tratamiento con triazoles durante la embriogénesis, se realizó una separación por tamaño molecular de las mismas utilizando la técnica de SDS-PAGE (Figura 18).



**Figura 18: SDS-PAGE que revela el perfil de bandas de proteínas en el LPV de embriones de pez cebra.** Perfil proteico del LPV de embriones de 1 dpf y de 2 dpf tratados con triazoles.

La Figura 18 muestra el patrón de bandas de proteínas presentes en el LPV de embriones de 1 dpf, carril A; de 2 dpf, carril B; y de 2 dpf tratados con triazoles, carriles C - E. Es posible apreciar una cantidad importante de bandas bien definidas que podrían agruparse en dos conjuntos: (grupo a) proteínas con tamaño molecular superior a 60 kDa, entre las que se puede apreciar una banda de 120 kDa y otra de aproximadamente 70 kDa; (grupo b) un segundo conjunto de proteínas de tamaño inferior a 35 kDa, que incluye una banda intensa cercana a los 30 kDa, dos bandas muy cercanas entre los 20-25 kDa, otras dos de aproximadamente 17 y 15 kDa y un conjunto de bandas de menor tamaño. Por último se distingue además una banda muy tenue cercana a los 40 kDa. Debido a que sabemos que este líquido contiene

conjunto de bandas de menor tamaño. Por último se distingue además una banda muy tenue cercana a los 40 kDa. Debido a que sabemos que este líquido contiene abundantes proteasas, no es posible determinar por este medio si cada una de las bandas observadas pertenece efectivamente a una proteína particular o a fragmentos degradados.

El patrón electroforético encontrado en el LPV no varía de manera evidente entre el primer y segundo dpf entre los controles, a excepción de las dos bandas del grupo (a) que se ven con menor intensidad al día 2, respecto del día 1. Después del tratamiento con triazoles tampoco se ven diferencias importantes aparte de estas mismas dos bandas, que extrañamente sí aparecen muy marcadas en el LPV de los embriones tratados.

#### 4.3.3 Identificación de las proteínas presentes en el LPV de embriones de pez cebra en etapa de eclosión.

Mediante secuenciación de péptidos con espectrometría de masas (MS) se identificaron todas las proteínas que existen en el LPV del pez cebra a los 2 dpf. A continuación se presenta una lista con la identidad de las principales proteínas encontradas, es decir, cuyas identidades fueron predichas con mayor fidelidad; y la función biológica general que poseen, según la literatura:

1. HE1a: Hatching Enzyme (29,4 kDa): Metaloproteasa, coriolisina del pez cebra, sintetizada y secretada por las CGE antes de la eclosión.
2. ZP2.3: Zona Pellucida glycoprotein 2.3 (47,2 kDa): Glicoproteína constituyente de la cara interna del corion, sustrato natural de la metaloproteasa HE1.

3. si:dkey-46g23.3, proteína hipotética (158,3 kDa): Proteína extracelular con actividad inhibitoria de endopeptidasas.
4. ZP2.2: Zona Pellucida glycoprotein (47,1 kDa): Glicoproteína constituyente de la cara interna del corion, sustrato natural de la metaloproteasa HE1.
5. PZP: pregnancy zone protein;  $\alpha$ -2-macroglobulin; (159,6 kDa): Inhibidor de proteasa universal, con rol en el sistema inmune innato de vertebrados e invertebrados.
6. CHIA: Acidic chitinase; Eosinophil chemotactic cytokine (52,7 kDa): Hidrolasa que participa en el metabolismo de quitina. Defensa antimicrobiana.
7. Proteína hipotética LOC100126100 (KDa 17,6 kDa): Posee dominio de Lectina tipo C. Unión a azúcares para reconocimiento. Organización de la MEC, endocitosis, reconocimiento de patógenos, interacción célula-célula.
8. TFA: transferrin-a (73,48 kDa): Transporte de hierro.
9. Proteína hipotética LOC751705 (15,56 kDa): Posee dominio Lectina de unión a galactosa. Reconocimiento de azúcares.
10. Proteína hipotética LOC564906; (38,0 kDa): Proteína similar a catepsina-L, endopeptidasa que participa en la degradación proteica en lisosomas.
11. *l*-rhamnose-binding lectin CSL3; (24,4 kDa): Reconocimiento de azúcares, unión a ramnosa. Participa en el sistema inmune innato de vertebrados.
12. Proteína hipotética LOC564979 (38,0 kDa): Proteína similar a papaína, posee dominio de tipo cisteína peptidasa, que en invertebrados funciona como enzima de eclosión, mientras en vertebrados se le asocia una función de degradación lisosomal de proteínas.

Entre las proteínas identificadas se encontró en primer lugar como era esperado, a la coriolisina HE1 de pez cebra y sus sustratos naturales, que forman parte de la Zona Radiata Interna (ZRI) del corion, las glicoproteínas ZP2.2 y ZP2.3 que son homólogas a las proteínas que se encuentran en la zona pelúcida del ovocito de mamíferos.

Llama la atención la presencia de al menos tres secuencias que fueron reconocidas con función asociada al reconocimiento de azúcares (LOC100126100, LOC751705 y CSL3); una hidrolasa con participación en el metabolismo de la quitina (CHIA); dos endopeptidasas asociadas a la degradación lisosomal de proteínas (LOC564906 y LOC564979) y dos inhibidores de proteasas (si:dkey-46g23.3, y PZP en sus isoformas 1 y 2). Así, es posible que de las proteínas encontradas con dominios referidos al reconocimiento de azúcares (tipo lectinas) se relacionen al reconocimiento y aglutinación de patógenos; a su vez, la presencia de inhibidores de proteasas también podría otorgar una defensa antimicrobiana al embrión en desarrollo, del mismo modo lo haría la presencia de endopeptidasas. Por último, la existencia de quitinasa es señal de que el LPV tendría propiedades antimicóticas y de defensa contra la presencia de posibles parásitos o depredadores de tipo artrópodos u otros invertebrados que posean exoesqueleto.

## V. DISCUSION

### ***5.1 Bioensayos con embriones de pez cebra para detectar presencia de contaminantes biodisponibles en cuerpos de agua en Chile.***

Los resultados obtenidos en los bioensayos permiten aseverar que el método utilizado posee una buena sensibilidad y correlación con los análisis químicos. No en todos los casos esto fue así, lo que probablemente se deba a la presencia de otro tipo de contaminación o compuestos que no fueron determinados en la química analítica. También podría deberse a las diferencias en los parámetros físicos de las muestras. En futuros trabajos, se sugiere incorporar una mayor cantidad de parámetros al análisis químico, con el fin de poder asociar de mejor manera la relación causa-efecto de las respuestas que se observen en los distintos bioensayos.

En el caso de las muestras de Doñihue, el método de detección de metales utilizado<sup>1</sup> posee límites de detección mayores que en el resto de las muestras<sup>2</sup>, lo que podría explicar en parte el hecho de tener respuestas positivas en los bioensayos, más no en la química analítica. En este caso es importante considerar, que no se evaluó la totalidad de los parámetros químicos de calidad de aguas que establecen las normas, y que la presencia de contaminantes de tipo orgánico o iónico, podría haber estado presente también en las muestras. Además, éstas se tomaron en un lugar cercano a cultivos agrícolas, por lo que la contaminación de tipo orgánica es bastante probable.

Los bioensayos realizados son capaces de detectar los efectos producidos por cualquier tipo de contaminante que se encuentre biodisponible en niveles tóxicos, de

---

<sup>1</sup> Espectrofotometría de emisión óptica con plasma.

<sup>2</sup> Voltametría de Redisolución Anódica.

manera independiente a su identidad, lo que no ocurre con los análisis químicos que sólo dan respuesta positiva a los compuestos específicos que se buscan con cada técnica aplicada. Esto podría explicar porque la muestra 1a arrojó mayores efectos que la muestra 1b a pesar de tener una menor cantidad de metales, ya que, en este estudio no se evaluaron parámetros como la presencia de pesticidas, iones, dureza, o materia orgánica disuelta (MOD), y se sabe que este último es capaz de modular la acumulación de cadmio en el embrión (Burnison y col, 2006). Es posible que la diferencia de pH de las muestras determinara una distinta biodisponibilidad de los contaminantes que éstas contenían, produciendo así una diferencia en la respuesta tóxica detectada. Existen antecedentes de que la variación de ciertos parámetros físicos de las aguas, pueden modular la toxicidad del cobre en larvas de pez cebra, específicamente la neurotoxicidad reflejada en el daño a las neuronas del sistema de la LLp (Linbo y col, 2009), lo que podría explicar el porqué la muestra 2b que posee una concentración de cobre (33,4 µg/L) superior a la reportada como neurotóxica en larvas (igual a 20 µg/L), no presenta respuesta en la cuantificación de FCC (Fig. 5), y sí lo hace la muestra 2a que posee una menor cantidad de éste metal (26,6 µg/L).

La utilización de la línea transgénica *hsp70*:GFP que expresa al reportero GFP en tejidos sometidos a estrés celular (Blechinger y col, 2002), no fue tan útil como se esperaba, ya que los individuos controles presentan una alta variabilidad en la expresión del reportero, lo que dificulta la interpretación de los resultados (Fig. 19, Anexo D). Los bioensayos con esta línea transgénica no dieron en ningún caso respuesta positiva significativa, lo que demuestra una baja sensibilidad de la misma para su utilización en estudios ecotoxicológicos. Probablemente los niveles de toxicidad que se requieren para obtener una respuesta, son mucho más altos que los

necesarios para activar cualquiera de las otras respuestas que fueron evaluadas. Por el contrario la línea *sox10:GFP* permitió la detección de malformaciones craneofaciales de manera muy rápida y sencilla, manifestadas como alteraciones en la morfología de los elementos del esqueleto mandibular y faríngeo.

El aumento en la cantidad de puntos de evaluación de toxicidad con respecto a los métodos sugeridos por la OECD, permite evaluar una mayor cantidad de efectos sobre el desarrollo, crecimiento y fisiología de los embriones y larvas frente a la exposición a aguas contaminadas. Este aumento en la sensibilidad del ensayo es vital a la hora de evaluar muestras ambientales que, a diferencia de los ensayos para la evaluación de soluciones reconstituidas con compuestos químicos individuales, contendrán mezclas no identificadas. Estas podrían tener distintas interacciones cambiando la biodisponibilidad de los distintos compuestos y el nivel de toxicidad general de la muestra. Esto además variará frente a la diferencia de los parámetros físicos como el pH, la dureza, la conductividad y la presencia de iones en las muestras analizadas por lo que la toxicidad de éstas en general no actuará por uno, sino por varios mecanismos de acción. El registro de efectos letales, teratogénicos, fisiológicos, citotóxicos y neurotóxicos amplía enormemente el rango de detección de efectos que podría encontrarse en una muestra desconocida, lo que otorgaría varias ventajas a este tipo de bioensayos, permitiendo mediante su uso una mejor evaluación de los riesgos y efectos asociados a la contaminación de las aguas continentales.

### 5.1.1 Ventajas del bioensayo para evaluación de aguas continentales con embriones de pez cebra.

*5.1.1.1 Reducción del costo del bioensayo.* Al ser el sugerido un ensayo semi-estático, los volúmenes de muestra requeridos son bastante bajos (<500 ml/muestra); por lo que se facilita el transporte y almacenamiento de las mismas. El rápido desarrollo de esta especie y su tamaño, permiten la realización de bioensayos rápidos y en espacios reducidos de incubación. El costo de reproducir y mantener los peces es muy inferior al costo equivalente en mamíferos e incluso de cultivos celulares.

*5.1.1.2 Necesidad de menor control de variables.* Los tests estandarizados para evaluar compuestos químicos aislados, exigen el control de una gran cantidad de parámetros físicos y químicos (pH, conductividad, presencia de iones, metales, etc.) de las soluciones a evaluar. De esta forma, se limita el tipo de sustancias que se pueden analizar (compuestos volátiles o lipofílicos se excluyen), lo que no sólo aumenta el costo del ensayo, sino que hace imposible el análisis de muestras ambientales. Las muestras ambientales deben ser alteradas en la menor medida posible, para así permitir la evaluación de los efectos toxicológicos que producen las propiedades físicas, químicas y biológicas en su conjunto; requisito indispensable en la evaluación de riesgos asociados a la contaminación acuática.

*5.1.1.3 Detección de cualquier tipo de compuesto biodisponible en niveles tóxicos.* Esto es un gran complemento a las técnicas analíticas de evaluación de aguas, ya que, la naturaleza de los efectos tóxicos junto a los antecedentes de las actividades antropogénicas y la geología en las áreas a evaluar, permiten elegir de mejor manera

el tipo de sustancias químicas a cuantificar (metales, pesticidas, fármacos, etc.). Lo anterior permite abaratar los costos asociados, permitiendo así una evaluación mas completa de la calidad real del agua, sumando la variable biológica a la química y física, que actualmente se utilizan como únicos parámetros en la evaluación y fiscalización de la calidad de aguas en Chile.

*5.1.1.4 Versatilidad y facilidad en la transferencia tecnológica.* La simplicidad y los costos relativamente bajos asociados al ensayo propuesto, facilitarían la implementación de éstos como método de evaluación de la calidad de aguas continentales con distintos usos (consumo humano y animal, riego, acuicultura, recreación, efluentes de plantas de tratamiento, RILES, etc.). A pesar de que la evaluación de respuestas como citotoxicidad y neurotoxicidad, puede aumentar el costo e infraestructura requerida en los ensayos, éstas pueden ser utilizadas como complemento en estudios mas detallados e incluso en estudios ecotoxicológicos con especies locales, ya que, su evaluación no requiere un alto entrenamiento y las tinciones vitales no son especie-especificas como otros marcadores moleculares utilizados en estudios toxicológicos en laboratorios especializados (sondas, anticuerpos, transgénicos GFP, etc.) los que además son muy costosos, requieren de alto entrenamiento para su uso y, exceptuando la evaluación del GFP, no permiten la evaluación de tejidos y tipos celulares *in vivo*.

#### *5.1.2 Relevancia de las respuestas tóxicas añadidas.*

*5.1.2.1 No Inflado de la vejiga natatoria, NIV.* En el pez cebra la vejiga natatoria (VN) se forma entre los 1,5 y 2 dpf, momento en el cual se encuentra llena de fluido, el que

es reemplazado por gas de baja densidad entre los 4 y 6 dpf. Se sabe que este órgano tiene importantes funciones en la sobrevivencia de los peces. El periodo en que ocurre el inflado de la vejiga, coincide con el inicio de la vida libre tras la eclosión, y con el agotamiento de las reservas de vitelo, lo que obliga a las larvas a buscar alimento por si mismas (Robertson y col, 2007).

La inflación de la VN reduce la densidad<sup>3</sup> y gravedad específica<sup>4</sup> de las larvas, lo que tiene al menos dos consecuencias vitales: (1) reduce los requerimientos energéticos para mantenerse en posición vertical y nadar a diferentes profundidades en la columna de agua, generando ventajas adaptativas y energéticas para los individuos; y (2) el cambio en la gravedad específica varia la sensibilidad mecanosensorial de la línea lateral, al cambiar la relación entre las velocidades del flujo que este sistema sensorial detecta en el agua (Stewart & McHenry, 2010), lo que a su vez puede influenciar la susceptibilidad de los individuos al ataque de depredadores.

Las implicancias de una incapacidad en la formación y/o inflado de la VN, son letales, ya que, las larvas que no puedan buscar su alimento morirán de inanición, y además tendrán un mayor riesgo de ser depredadas al poseer una capacidad de desplazamiento restringida, por ser incapaces de controlar su gravedad específica y alcanzar una flotabilidad neutra.

*5.1.2.2 Pérdida de funcionalidad del sistema de la Línea Lateral, FCC:* El sistema mecanosensorial de la Línea Lateral (LL) se encuentra presente en peces y anfibios. Se compone de una serie de órganos superficiales, denominados neuromastos. Existen dos tipos de neuromastos: (1) los superficiales, que poseen sensibilidad a los

---

<sup>3</sup> Masa en un volumen determinado.

<sup>4</sup> Medida adimensional resultante del cociente entre la densidad de dos sustancias, este caso se refiere a la razón entre densidad de un cuerpo (larva), y un medio líquido (agua).

movimiento del agua y se encuentran distribuidos en la superficie de la cabeza, tronco y aleta caudal en peces adultos, juveniles y larvas; y (2) los neuromastos canales, que se encuentran distribuidos en canales bajo la superficie de las escamas y poseen sensibilidad a cambios de presión. Los neuromastos corresponden básicamente a un grupo de varios tipos celulares en forma de volcán, que en su centro poseen entre 2 y más de 30 células ciliadas sensoriales, que reciben los estímulos hidromecánicos del entorno y dan información posicional al individuo (Bleckman & Zelick, 2009). En el pez cebra, este sistema comienza su desarrollo en el periodo embrionario al primer dpf, y a los 4 dpf la larva ya cuenta con entre 8 y 10 neuromastos superficiales funcionales en la LL posterior (LLp), que se encuentra en el tronco de la larva. La LL posee una importante función sensorial y se relaciona con las conductas de detección de presas, escape de depredadores, interacción social y reotaxis (Froehlicher y col 2009). Así, la pérdida de la funcionalidad de los neuromastos debido a los efectos citotóxicos inducidos por contaminantes acuáticos sobre estas células ciliadas, en condiciones de laboratorio son sub-letales; pero en condiciones naturales, la pérdida de este sistema mecanosensorial tendría graves consecuencias conductuales a nivel individual, poblacional y ecosistémico.

Ambas respuestas (Inflado de la vejiga natatoria, NIV y funcionalidad de las células ciliadas, FCC) tienen efectos en la interacción depredador-presa, jugando un rol en ambas conductas. Así, tanto los efectos teratogénicos como neurotóxicos que impidan el correcto funcionamiento de la VN o del sistema de la LL, respectivamente, tendrán importantes consecuencias a nivel de sobrevivencia de las especies que estén expuestas a contaminantes que produzcan este tipo de efectos. Por estos motivos pensamos que es de sumo interés su consideración en los bioensayos de toxicidad con fines de evaluación de riesgos y calidad de aguas.

## **5.2 Mecanismos de acción asociados a la inhibición de la eclosión mediada por contaminantes acuáticos.**

La disminución en la sobrevivencia que produce la inhibición de la eclosión, refuerza la idea acerca de otorgar una mayor importancia a esta respuesta en cuanto a su registro en los ensayos de evaluación de toxicidad de compuestos químicos y de muestras ambientales. También refuerza la necesidad de mayores antecedentes respecto a los mecanismos de acción que pueden explicar este fenómeno en peces, sobretodo en *Danio rerio*, especie que se ha convertido en uno de los modelos por excelencia utilizado en este tipo de estudios.

Para dilucidar de que manera agentes químicos, en particular potenciales contaminantes acuáticos, pueden disminuir o impedir la reproducción de organismos como los peces a través de la inhibición de la eclosión; se evaluaron tres compuestos de la familia de los triazoles que se sabe poseen este impacto en el pez cebra en distinto nivel. Si se comparan los porcentajes de inhibición de la eclosión después de los distintos tratamientos con estos compuestos (Fig. 6), es evidente que el triazol que produce esta respuesta a una menor concentración es FON (concentración media), seguido de NOL y 1,2,4-T, que presentan una toxicidad mucho menor que éste.

### **5.2.1 Cuantificación y morfometría de las CGE.**

Los análisis que se realizaron a los individuos tratados con estos agentes; se enfocaron en las consecuencias que estos tienen sobre las células de las glándulas de eclosión (CGE).

Nuestra cuantificación del número de CGE a los 2 dpf, difiere un poco con el reporte hecho por el grupo de Schoots, que en 1982 describió que el pez cebra posee alrededor de 200 CGE; mientras que, si consideramos que en esta cuantificación sólo se tomo en cuenta un lado del epitelio que componen las CGE, el número total de estas células que alcanza a desarrollar el pez cebra debiera ser superior, cercano a las 300. Esta cuantificación de las CGE en los embriones *cldnB:GFP*, además difiere con el conteo realizado en la línea *PAX6\_hs6A* que registró un número de células cercano a las 70 a los 2 dpf, esto sugiere que la expresión de GFP en este transgénico marca solamente a una subpoblación de células de las glándulas de eclosión.

#### *5.2.2 Evaluación de muerte celular en las CGEs después del tratamiento con triazoles.*

En conjunto los resultados de los experimentos de tinción vital y marcaje enzimático de células muertas (Fig. 13 y 14), demuestran que la diferencia morfológica de las CGE a los 2 dpf en individuos tratados con FON y NOL, no se relacionan con un estado pre-necrótico o pre-apoptótico, y sugieren que la causa en la reducción de GFP en la línea *PAX6\_hs6A* es debido a un cambio en la expresión génica y no en la cantidad de células. Además, sugieren fuertemente que de manera contraria a lo que la literatura describe, estas glándulas no presentan normalmente muerte celular programada durante la embriogénesis; como ocurre en ciertas zonas del ano, la aleta caudal en desarrollo, o las rosetas olfatorias. Estas zonas son comúnmente utilizadas como control positivo de que los marcajes de muerte celular en el embrión de pez cebra han funcionado (zonas control) y de la misma manera se había clasificado a las CGE (Parrng y col, 2004). Por el contrario, nuestros resultados demuestran que en este caso, la utilización de anaranjado de acridina da un falso positivo en este tejido embrionario.

### *5.2.3 Evaluación de la liberación de proteasas por parte del embrión y del contenido granular en las CGE después del tratamiento con triazoles.*

La liberación de proteasas al medio extraembrionario es el principal mecanismo para permitir la eclosión de peces, tras la finalización del desarrollo embrionario. El aumento en la actividad proteolítica del medio de incubación de los embriones a las 50 hpf, indica una liberación de proteasas al medio externo por parte de los embriones en condiciones normales. Sin embargo, la desigualdad en la actividad proteasa detectada entre el medio de incubación de los embriones tratados y el control, se hace evidente en este momento (Fig. 15). Determinamos que esto se debe a un arresto de la liberación de los gránulos citoplasmáticos de las CGE, que impide la liberación de la coriolisina HE1 al medio extraembrionario. Este fenómeno de arresto citoplasmático produciría a su vez un cambio en la forma de las células, lo que definitivamente se vería reflejado en su morfología; más no necesariamente en su tamaño o área celular, explicando los resultados obtenidos en la morfometría (Fig. 12).

Las cuantificación de células/área con contenido de gránulos de cimógeno entre el primer y cuarto dpf (Fig. 16), permitió confirmar que los triazoles ejercen su acción inhibitoria de la eclosión impidiendo la liberación de los gránulos citoplasmáticos de estas glándulas unicelulares. El importante número de células con contenido granular aún a los 3 y 4 dpf en los individuos tratados, demuestra que el efecto que tiene la exposición a triazoles perdura al menos 24 horas, ya que, incluso después de este tiempo los embriones no son capaces de liberar los gránulos; incluso más tiempo si se considera que la duración de la inhibición de la eclosión pudo seguirse hasta los 8 dpf (Fig. 7). Además, gracias a este resultado se hace evidente otra vez la diferencia en la toxicidad entre los tres triazoles evaluados. La duración del efecto ejercido por FON es

mucho más prolongada con respecto a NOL y 1,2,4-T. De este modo, los embriones expuestos a éste mantienen una diferencia significativa con los controles en el número de células con gránulos hasta el 4 dpf, mientras NOL sostiene su diferencia hasta el tercer dpf y 1,2,4-T sólo hasta el 2 o 3 dpf, dependiendo del comienzo de la exposición (Fig. 16).

Estos resultados en su conjunto, nos hacen pensar que la inhibición de la secreción de los gránulos de las CGE, no es un efecto directo sobre las mismas células, sino que podría tratarse mas bien de un mecanismo indirecto a través del sistema nervioso o endocrino. Existe evidencia de que en el pez cebra, la secreción de los gránulos de las CGE es controlada a través del sistema neuroendocrino mediante la liberación de prolactina, PRL (Schoots, 1982) y que la liberación de esta hormona desde la glándula pituitaria es controlada negativamente por aumentos en la liberación de dopamina (DA) desde el hipotálamo (Bernier, 2009). Se sabe que en ratones el fungicida Triadimefón (FON) posee un efecto estimulante al ser administrado de manera oral, efecto que se demostró se relaciona con la unión de esta molécula al transportador de dopamina (DAT) que permite la recaptura de este neurotransmisor desde el espacio sináptico (Reeves y col, 2004). Así, una posible explicación a estos resultados sería que en el pez cebra, FON estuviera bloqueando la recaptura de DA, y por tanto, aumentando su concentración en las sinápsis hipotalámicas de las larvas; produciendo de esta manera una disminución o inhibición de la liberación de PRL, efecto que tendría como consecuencia final la inhibición de la secreción de HE1, impidiendo la eclosión.

En experimentos preliminares, determinamos que la exposición de larvas de pez cebra de entre 2 y 4 dpf a FON, produce un efecto estimulante. Este efecto se ve reflejado en un aumento de la actividad locomotora en las larvas expuestas, con

respecto a la actividad de las larvas control, que se hace evidente aproximadamente una hora post tratamiento (hpt) y dura por lo menos 17 h (Fig. 20 Anexo D; De la Paz & Beiza, no publicado). Estos datos apuntan a que una inhibición de DAT mediada por triazoles en el pez cebra en la etapa final de la embriogénesis, es probable y podría ser el mecanismo a través del cual los triazoles inhiben la secreción de HE1 desde las CGE, aunque se requiere de nuevos experimentos para comprobar este mecanismo de disrupción endocrina en peces, por parte de los triazoles. Una manera de comprobar esto podría ser "rescatando" la inhibición de la eclosión producida con triazoles, realizando co-incubaciones con inhibidores de los receptores de DA.

Existen varios reportes en invertebrados y en peces, de que sustancias químicas y agentes físicos son capaces de alterar la eclosión (Tabla 4), ya sea actuando sobre los individuos directamente, o a través de la exposición de los peces progenitores (Schoot, 1982; Hansen, 1985; Hoar & Randall, 1988a; Mizell, 1997; Nagler & Cyr, 1997; Segner, 2003; Brix, 2006).

**Tabla 4: Agentes físicos y químicos que alteran la eclosión.**

<i>Agentes químicos inhibitorios</i>	<i>Agentes físicos inhibitorios</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solventes orgánicos</li> <li>• Organoclorados</li> <li>• Metales pesados</li> <li>• Quelantes</li> <li>• Pesticidas</li> <li>• Moduladores nerviosos (MS-222, tetrodotoxina, dopamina y sus agonistas)</li> <li>• Inhibidores de la respiración celular (KCN)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiperoxia</li> <li>• Cambios de temperatura</li> <li>• Cambios de pH</li> </ul>
<i>Agentes químicos estimulantes</i>	<i>Agentes físicos estimulantes</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ionóforos de Ca<sup>2+</sup></li> <li>• Hormonas</li> <li>• Moduladores nerviosos (epinefrina)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipoxia</li> <li>• Corriente eléctrica</li> </ul>

En pez cebra sólo tenemos conocimiento de un estudio en el cual se sugirió que un pesticida tuviese efectos sobre la liberación de la HE1, pero no se demostró empíricamente (Zhou, 2009) por lo que, hasta donde sabemos, este es el primer estudio que demuestra que un grupo de contaminantes (en este caso, triazoles) es capaz de inhibir la secreción de la enzima de eclosión en un organismo acuático.

Aunque las concentraciones utilizadas en este estudio son bastante altas y poco probables de encontrar en el ambiente, es importante recalcar que debido a la complejidad de las mezclas de compuestos químicos y las variaciones en los factores físicos y biológicos a las que se ven enfrentados los organismos en su entorno, es muy relevante tomar en cuenta en los estudios (eco)toxicológicos los mecanismos de acción y los efectos que pueden tener sobre las poblaciones los productos de degradación de los contaminantes, ya que, como demostramos en este trabajo, los productos de degradación de fungicidas tienen efectos similares que sus derivados, aunque se requieran concentraciones muy superiores para ejercer los efectos. Así, efectos similares podrían obtenerse en la exposición de poblaciones naturales a mezclas de compuestos que actuen de manera aditiva o sinérgica, como suele ocurrir con los productos de degradación de compuestos bioactivos. La evaluación de compuestos en conjunto con sus productos de degradación, permitirá evaluar de mejor manera los riesgos que estos pueden acarrear para las poblaciones naturales o artificiales que se vean expuestas a ellos.

### ***5.3 Caracterización del contenido protéico del líquido perivitelino (LPV) del pez cebra durante el periodo de eclosión.***

#### ***5.3.1 Cuantificación y separación de proteínas del LPV de pez cebra.***

Se sabe que en moluscos y peces vivíparos, el LPV constituye la principal fuente de nutrientes durante el desarrollo embrionario temprano (Hoar & Randall, 1988b; Garin y col, 1996). Nuestros resultados apuntan a que esta situación no se mantendría en el pez cebra, ya que de ser así, el consumo de las proteínas del LPV por parte del embrión en desarrollo debiera verse reflejado en una disminución de su concentración, situación que no fue detectada mediante el método de Bradford (Fig. 17). También existen antecedentes en salmónidos, de que la actividad de las coriolisinas al degradar la ZRI libera péptidos que quedan en el LPV aumentando la concentración de proteínas en éste (Schoots y col, 1982). Lo anterior podría compensar el posible consumo de éstas por parte del embrión. A diferencia de lo que ocurre en moluscos, que poseen un ovocito de tipo oligolecito (poco vitelo), el ovocito de peces es de tipo telolecito, es decir, contiene una cantidad importante de vitelo que provee los nutrientes esenciales al embrión hasta que éste comienza su vida libre y puede buscar alimento por si mismo (Gilbert, 2006). De esta manera no se puede afirmar, ni descartar una función nutricional del LPV en base a estos resultados.

Por otro lado, no se observó diferencia en la concentración de proteínas o el patrón de bandeo de las mismas en el LPV entre el primer y segundo día de desarrollo, ni entre embriones de 2 dpf tratados con triazoles, como se pensó podría ocurrir debido al arresto de los gránulos de las CGEs. De esto deducimos que la cantidad de proteínas que liberan las CGE es despreciable en relación a la concentración de proteínas totales

que se encuentran en el LPV, y que una posible función nutricional del LPV para el embrión de pez cebra, es improbable.

El patrón electroforético de las proteínas del LPV no mostró una variación significativa entre el 1 y 2 dpf, a excepción de la reducción de la intensidad de dos bandas de 120 y 70 kDa respectivamente, situación que no se ve reflejada en embriones tratados con triazoles. A pesar de no tener una explicación certera para esta situación, una posibilidad es que la presencia de la enzima HE1 que es liberada en esta etapa, degradara a estas proteínas en los controles, lo que no ocurriría en los embriones tratados con triazoles debido a la inhibición en la secreción de los granulos de las CGE y la menor concentración de proteasas en el LPV de estos individuos.

### 5.3.2 Identidad y posible función de las proteínas del LPV de pez cebra.

Los resultados obtenidos a partir de la secuenciación mediante espectrometría de masas (MS) de las proteínas contenidas en el LPV a los 2 dpf, sugiere que este medio podría tener una función protectora contra patógenos en esta especie. En él se encontró presencia de: inhibidores de proteasas, proteínas de reconocimiento de azúcares, de metabolismo de quitina y endopeptidasas. Llama fuertemente la atención la presencia de transferrina-A, proteína asociada al transporte de hierro, esencial para la incorporación de éste en la hemoglobina en eritrocitos.

Se ha descrito en otras especies de peces la presencia lectinas en el corion, que se sugiere poseen una función de prevención de la poliespermia al producir aglutinación de espermios supernumerarios, y de la misma manera una función defensiva contra patógenos (Kudo & Inoue, 1989; Kudo, 2000). Incluso se ha descrito que éstas poseen una alta afinidad a toxinas y antibióticos *in vitro* (Kudo & Yazawa, 1995, 1997). Este es

el primer trabajo que identifica a las principales proteínas presentes en el LPV del pez cebra, y sugiere una función de defensa contra patógenos de este fluido.

Se requiere mayor investigación para comprobar este posible rol de protección contra agente tóxicos y patógenos, que podrían conferir las proteínas del LPV al embrión de pez cebra. Aunque esta información es un buen punto de partida para la investigación de nuevos mecanismos de defensa innata en peces, durante la embriogénesis. La identificación de las proteínas presentes en el LPV del pez cebra, podría tener implicancias en el uso de este modelo en bioensayos para determinar toxicidad de sustancia químicas, respuesta inmune contra patógenos y rastreo de drogas

## VI. CONCLUSIONES

**6.1** El ensayo de evaluación de aguas continentales desarrollado permite una justa evaluación de la calidad toxicológica de las aguas, bastante congruente con los análisis químicos y físicos, siendo capaz de detectar la toxicidad producida por el conjunto de estas variables en un contexto mas realista, aunque con un menor control de las mismas. El aumento del número de respuestas toxicológicas a evaluar, aumenta la sensibilidad y cantidad de información obtenida a partir de los bioensayos con pez cebra.

**6.2** Las glándulas de eclosión del pez cebra constituyen un tejido blanco previamente inexplorado, sensible a la presencia de agentes tóxicos en el medio acuático, que puede incluso ser estudiado sin el uso de técnicas de marcaje molecular, mediante microscopía óptica.

**6.3** La identificación de las proteínas presentes en el LPV, sugiere una función de este medio extraembrionario en la defensa contra patógenos.

## VI. REFERENCIAS

- Bernier, N. (2009) Fish Neuroendocrinology, Fish Physiology, First Edition. Academic Pres Inc.
- Blechinger, S. R., Warren, J. T., Kuwada, J. Y., and Krone, P. H. (2002) Developmental Toxicology of Cadmium in Living Embryos of a Stable Transgenic Zebrafish Line, *Environmental Health* 110, 1041-1046.
- Bleckmann, H., and Zelick, R. (2009) Lateral line system of fish., *Integrative zoology* 4, 13-25.
- Braunbeck, T., Boettcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute fish LC(50) test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species -- an update., *Altex* 22, 87-102.
- Bresch, H. (1982) Investigation of the long-term action of xenobiotics on fish with special regard to reproduction., *Ecotoxicology and Environmental Safety* 6, 102-112.
- Brix, K. V., Gerdes, R. M., Adams, W. J., & Grosell, M. (2006). Effects of copper, cadmium, and zinc on the hatching success of brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 580-583.
- Burnison, B. K., Meinelt, T., Playle, R., Pietrock, M., Wienke, A., and Steinberg, C. E. W. (2006) Cadmium accumulation in zebrafish (*Danio rerio*) eggs is modulated by dissolved organic matter (DOM)., *Aquatic toxicology Amsterdam Netherlands* 79, 185-191.
- Carney, T. J., Dutton, K. a, Greenhill, E., Delfino-Machin, M., Dufourcq, P., Blader, P., and Kelsh, R. N. (2006) A direct role for Sox10 in specification of neural crest-derived sensory neurons., *Development (Cambridge, England)* 133, 4619-30.
- Christian, F. A., and Tate, T. M. (1982) Effects of Fluometuron on Embryonic Development and Hatching of *Fasciola hepatica* 's Miracidia, *New York* 357, 353-357.
- De la Paz, J. F. (2009) Evaluacion de efectos teratogénicos de fungicidas mediante bioensayos con pez cebra (*Danio rerio*), Universidad de Chile.
- Dreon, M. S., Heras, H., and Pollero, R. J. (2004) Characterization of the major egg glycolipoproteins from the perivitellin fluid of the apple snail *Pomacea canaliculata*., *Molecular Reproduction and Development* 68, 359-364.
- Eddy, F. B. (1974) Osmotic properties of the perivitelline fluid and some properties of the chorion of Atlantic salmon eggs (*Salmo salar*), *Journal of Zoology* 174, 237-243.
- Faucher, K., Lagardère, J.-P., and Aubert, A. (2005) Quantitative aspects of the spatial distribution and morphological characteristics of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.;

Teleostei, Serranidae) trunk lateral line neuromasts., *Brain behavior and evolution* 65, 231-243.

Finn, R. N. (2007) The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria., *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 81, 337-54.

Froehlicher, M., Liedtke, A., Groh, K. J., Neuhauss, S. C. F., Segner, H., and Eggen, R. I. L. (2009) Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies., *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands), Elsevier B.V.* 95, 307-19.

Garin, C. F., Heras, H., and Pollero, R. J. (1996) Lipoproteins of the egg perivitelline fluid of *Pomacea canaliculata* snails (Mollusca: Gastropoda)., *The Journal of experimental zoology, Albin Michel* 276, 307-314.

Gilbert S. F. (2006) *Developmental Biology*, Eighth Edition. Sinauer Associates, Inc.

Haas, P., and Gilmour, D. (2006) Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line., *Developmental cell* 10, 673-80.

Hansen, P. (1985). Chlorinated hydrocarbons and hatching success in Baltic herring spring spawners. *Marine Environmental Research* 15, 59-76.

Harris J, Cheng A, Cunningham L, MacDonald G, Raible D, Rubel E. (2003). Neomycin-induced hair cell death in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*): A model system to study hair cell survival. *J Assoc Res Otolaryngol* 4, 219-234.

Hernández, P., Moreno, V., Olivari, F., 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.

Hoar W. S. & Randall D. J. (1988a) *Fish Physiology -The Physiology of Developing Fish- Part A - Eggs and Larvae*. Academic Press, Inc.

Hoar W. S. & Randall D. J. (1988b) *Fish Physiology-The Physiology of Developing Fish- Part B -Viviparity and Posthatching Juveniles*. Academic Press, Inc.

Inohaya, K., Yasumasu, S., Ishimaru, M., Ohyama, A., Iuchi, I., and Yamagami, K. (1995) Temporal and spatial patterns of gene expression for the hatching enzyme in the teleost embryo, *Oryzias latipes*., *Developmental Biology* 171, 374-385.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., and Schilling, T. F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish., *Developmental dynamics* □: an official publication of the American Association of Anatomists 203, 253-310.

Kudo, S. (2000). Enzymes responsible for the bactericidal effect in extracts of vitelline and fertilisation envelopes of rainbow trout eggs. *Zygote Cambridge England*, 8(3), 257-265.

- Kudo, S. & Inoue, M. (1989). Bacterial action of fertilization envelope extract from eggs of the fish *Cyprinus carpio* and *Plecoglossus altivelis*. *The Journal of experimental zoology*, 250(2), 219-228.
- Kudo, S. & Yazawa, S. (1995). Binding of bacterial toxins to glycoproteins in the envelopes of rainbow trout eggs. *The Histochemical journal*, 27(4), 300-308.
- Kudo, S. & Yazawa, S. (1997). Binding of antibiotics to glycoproteins of the vitelline and fertilization envelopes of cherry salmon eggs. *The Histochemical journal*, 29(8), 607-616.
- Landner, L., Neilson, A. H., Sørensen, L., Tärnholm, A., and Viktor, T. (1985) Short-term test for predicting the potential of xenobiotics to impair reproductive success in fish., *Ecotoxicology and Environmental Safety* 9, 282-293.
- Lefebvre, K. a, Trainer, V. L., and Scholz, N. L. (2004) Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin., *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 66, 159-70.
- Linbo, T. L., Stehr, C. M., Incardona, J. P., and Scholz, N. L. (2006) Dissolved copper triggers cell death in the peripheral mechanosensory system of larval fish., *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 25, 597-603.
- Linbo, T. L., Baldwin, D. H., McIntyre, J. K., and Scholz, N. L. (2009) Effects of water hardness, alkalinity, and dissolved organic carbon on the toxicity of copper to the lateral line of developing fish., *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 1455-1461.
- Majno, G., and Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death., *The American journal of pathology, American Society for Investigative Pathology* 146, 3-15.
- Mizell, M., and Romig, E. S. (1997) The aquatic vertebrate embryo as a sentinel for toxins: zebrafish embryo dechoriation and perivitelline space microinjection., *The International journal of developmental biology* 41, 411-23.
- Mueller, C.A., Seymour, R.S. (2011) The importance of perivitelline fluid convection to oxygen uptake of *Pseudophryne bibronii* eggs. *Physiological and Biochemical Zoology* 84, 299-305.
- Nagler, J.J. & Cyr, D.G. (1997) Exposure of male American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) to contaminated marine sediments decreases the hatching success of their progeny. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1733-38.
- Navratilova, P., Fredman, D., Hawkins, T. a, Turner, K., Lenhard, B., and Becker, T. S. (2009) Systematic human/zebrafish comparative identification of cis-regulatory activity around vertebrate developmental transcription factor genes., *Developmental biology* 327, 526-40.
- OECD. (1992) Guideline for testing of chemicals N° 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test, Test.

OECD.(1998) Guideline for testing of chemicals nº 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages.

OECD. (2006) Guideline for testing of chemicals. Draft proposal for a new guideline. Fish Embryo Toxicity (FET) Test. First version.

Ou, H. C., Raible, D. W., & Rubel, E. W. (2007). Cisplatin-induced hair cell loss in zebrafish (*Danio rerio*) lateral line. *Hearing Research*, 233(1-2), 46-53.

Parinov, S., Kondrichin, I., Korzh, V., and Emelyanov, A. (2004) Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo., *Developmental dynamics*: an official publication of the American Association of Anatomists 231, 449-59.

Parrng C., Anderson N., Ton C. (2004) Zebrafish Apoptosis Assays for Drug Discovery, *Methods in Cell Biology* 76, 75-85.

Reeves, R., Thiruchelvam, M., and Cory-Slechta, D. a. (2004) Development of behavioral sensitization to the cocaine-like fungicide triadimefon is prevented by AMPA, NMDa, DA D1 but not DA D2 receptor antagonists., *Toxicological sciences*: an official journal of the Society of Toxicology 79, 123-36.

Robertson, G. N., Mcgee, C. A. S., Dumbarton, T. C., Croll, R. P., and Smith, F. M. (2007) Development of the Swimbladder and Its Innervation in the Zebrafish , *Danio rerio*, *Physiology* 985, 967-985.

Roubaud, P., and Pairault, C. (1980) Membrane differentiation in the pregastrula of the teleost, *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei: Cyprinidae). A scanning electron microscope study., *Reproduction Nutrition Development* 20, 1515-1526.

Sano, K., Inohaya, K., Kawaguchi, M., Yoshizaki, N., Iuchi, I., and Yasumasu, S. (2008) Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme - an evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion., *The FEBS journal* 275, 5934-46.

Schoots A., de Bont R., Van Eys G., J, Denucé M. (1982) Evidence for a stimulating effect of prolactin on teleostean hatching enzyme secretion. *Journal of Experimental Zoology* 219, 129-132.

Segner, H. (2003) Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 302-314.

Souza, M. M. C., Bevilaqua, C. M. L., Morais, S. M., Costa, C. T. C., Silva, A. R. a, and Braz-Filho, R. (2008) Anthelmintic acetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds, *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 80, 271-277.

Stewart, W. J., and McHenry, M. J. (2010) Sensing the strike of a predator fish depends on the specific gravity of a prey fish., *The Journal of experimental biology* 213, 3769-77.

Thisse, B., Pflumio, S., Fürthauer, M., Loppin, B., Heyer, V., Degrave, A., Woehl, R., Lux, A., Steffan, T., Charbonnier, X. Q., and Thisse, C. (2001) Expression of the zebrafish genome during embryogenesis, ZFIN Direct Data Submission <http://zfin.org>.

Vila, I. (2006) Manual de Evaluación de Calidad de Agua Primera Ed., p 104.

Vosyliënė, M. Z. (2007) Review of the methods for acute and chronic toxicity assessment of single substances , effluents and industrial waters, Acta Zoologica Lituanica 17, 3-15.

Willemse, M. T. M., and Denuce, J. M. (1973) Hatching Glands in the Teleosts, *Brachydanio Rerio*, *Danio Malabaricus*, *Moenkhausia Oligolepis* and *Barbus Schuberti*, Development, Growth and Differentiation 15, 169-177.

Zhang, C., Willett, C., and Fremgen, T. (2003) Zebrafish: an animal model for toxicological studies, Curr Protoc Toxicol 17, 1-18.

Zhou, S., Dong, Q., Li, S., Guo, J., Wang, X., & Zhu, G. (2009). Developmental toxicity of cartap on zebrafish embryos. Aquatic toxicology 95, 339-46.

# **ANEXOS**

## Anexo A: Información y propiedades fisicoquímicas de los tóxicos de referencia utilizados.

### 1) TRIADIMEFÓN

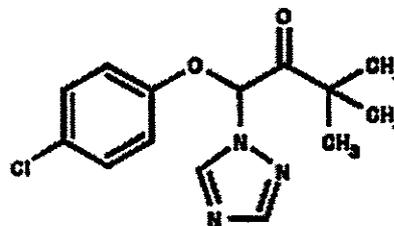
**Sinónimos:** Adifón, Amiral, Azocene, Bayleton, Haleton, Typhon, FON.

**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:** C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**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.

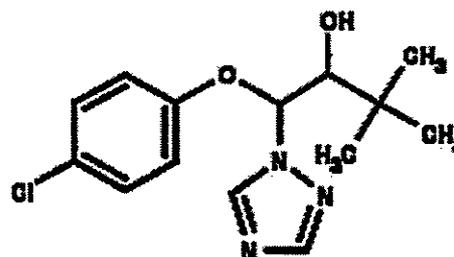
**Nombre Sistemático:** (1RS, 2RS; 1RS, 2SR)-1-(4-clorofenoxy)-3,3-dimetil -1-(1H-1,2,4-

triazol-1-il)butan-2-ol

**Nº de Registro CAS:** 55219-65-3

**Fórmula Molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**Masa molar:** 295,77 g/mol



Propiedades Físicoquímicas	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

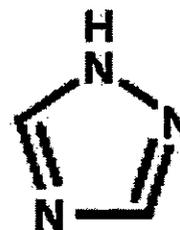
**Sinónimos:** Triazole, Triazol libre, 1,2,4-T.

**Nombre Sistemático:** 1,2,4-triazol

**Nº de Registro CAS:** 37306-44-8

**Fórmula Molecular:** C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub>

**Masa molar:** 69,07 g/mol



Propiedades Físicoquímicas	Valor	Temperatura
Solubilidad en agua <sup>f</sup>	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	

## **Anexo B: Ajuste de variables de incubación de embriones y larvas de pez cebra para bioensayos con aguas continentales .**

Para determinar el método apropiado de exposición de los embriones de pez cebra a muestras de agua continental, se tomaron dos muestras de agua superficiales y dos subterráneas en 4 puntos de la cuenca del Bio-Bío. Tres métodos de incubación distintos fueron utilizados y se detallan a continuación:

- 1) **Método 1:** Las muestras se usaron sin filtrar. Luego 20 embriones fueron incubados de manera estática, con un volumen de muestras igual a 5 ml por pocillo.
- 2) **Método 2:** Las muestras fueron pasadas con una bomba de vacío, por filtros con un poro de 0.5  $\mu\text{m}$  para remover partículas mayores y microorganismos. Los embriones fueron incubados de manera estática, con un volumen de muestras igual a 5 ml por pocillo.
- 3) **Método 3:** Las muestras se usaron *sin filtrar*. Los embriones fueron incubados de manera *semi-estática*, cambiando el medio de incubación cada 24 h. El volumen de muestra por pocillo, fue igual a 10 ml. Sobre las microplacas se colocaron insertos semipermeables (malla de poliéster de 500  $\mu\text{m}$ ).

Las placas del método 1, presentaron gran proliferación de hongos y zooplancton, produciendo gran mortandad de individuos. La adhesión de partículas al corion dificultó enormemente la visualización de los embriones, y por lo tanto la evaluación de efectos.

Las placas del método 2, no presentaron proliferación zooplancton, y la proliferación de hongos fue similar con el control. La ausencia de partículas mayores, permitió la correcta visualización de los embriones. La cantidad de embriones muertos fue similar en los distintos tratamientos, comparados con el control.

Las placas del método 3, no presentaron proliferación de zooplancton evidente, y la proliferación de hongos fue similar con el control. La ausencia de partículas mayores, permitió la correcta visualización de los embriones. Sí se registraron respuestas tóxicas aumentadas respecto a los controles.

El método 3, demostró ser el mejor para la incubación de embriones de pez cebra en muestras continentales, al evitar la muerte de los individuos por causas ajenas a la toxicidad de la matriz, mantener una buena visualización y no alterar las propiedades de la muestra al evitar la filtración.

## **Anexo C: Cálculo de la cantidad de proteínas totales en el LPV.**

C1.- Cálculo del volumen de LPV por embrión: El volumen en  $\mu\text{L}$  de LPV por cada embrión de pez cebra, fue calculado asumiendo que:

- (1) Huevo y ovocito son esferas perfectas.
- (2) Volumen del embrión es invariable.
- (3) Volumen del embrión es igual al del ovocito.

Según Kimmel (1995), el radio del huevo de pez cebra es igual a 0,35 mm. Utilizando la herramienta "recuento de medidas" del software Adobe® Photoshop® CS4; se calculó a partir de fotografías de huevos de pez cebra que el diámetro del ovocito de pez cebra es igual a 0,24 mm (Fig. 21, Anexo D).

(4)  $V = 4\pi r^3/3$

Luego utilizando la fórmula para el volumen de una esfera (4), se calculó que el volumen total del LPV para un embrión de pez cebra es igual a **0,12  $\mu\text{L}$** ; restando el volumen del embrión al volumen total del huevo.

C2.- Cálculo de las concentraciones proteínas totales en el LPV obtenido por descoronación manual en buffer Tris-HCl 25 mM pH 7,5

Para la extracción del LPV de embriones de pez cebra, grupos de 30 embriones fueron descorionados en 200  $\mu$ l de buffer Tris-HCl 25 mM pH 7,5. Luego este líquido fue recolectado con una micropipeta obteniéndose un LPV diluido en buffer (LPVd), el cual terminaba diluido en un factor igual 54,6 veces (FDE). Posteriormente este medio fue concentrado con filtros Amicon 0,5 (10K) de millipore, resultando un LPV concentrado (LPVc). La determinación de proteínas por el método de Bradford se realizó sobre el LPVc, y a través de la utilización de las siguientes ecuaciones, se obtuvo la concentración de proteínas en el LPV real (LPVr).

$$(5) \quad FDE = (200 \text{ ul buffer}) / (3,66 \text{ ul LPV} / 30 \text{ embriones})$$

$$(6) \quad LPVc / FC = LPVd$$

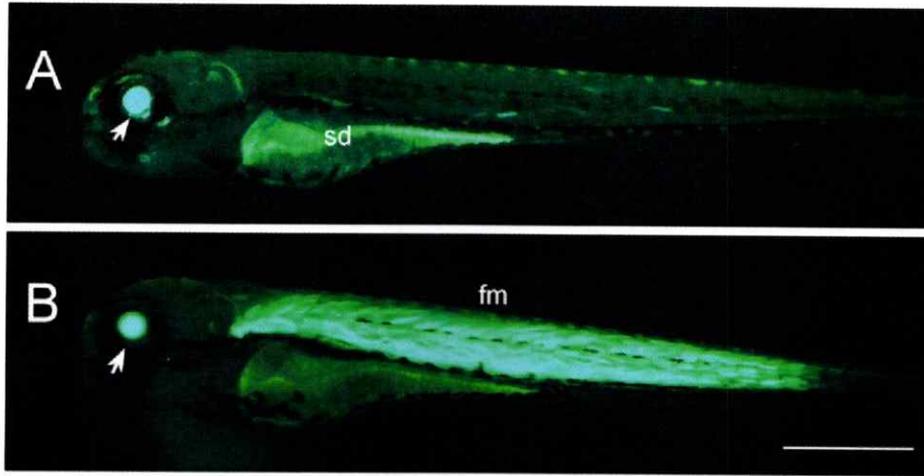
$$(7) \quad LPVd \times FDE = LPVr$$

Reemplazando la ecuación (6) en la ecuación (7), se obtiene que:

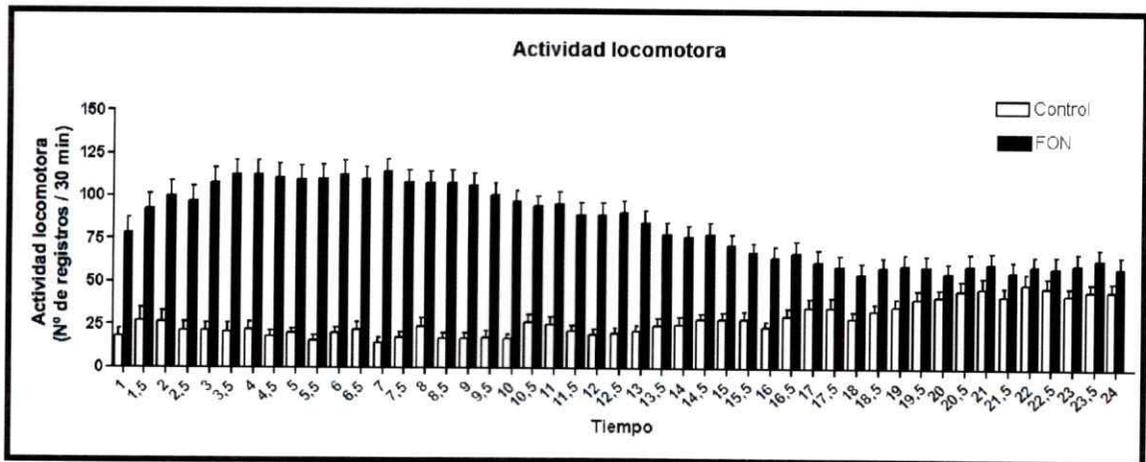
$$(8) \quad (LPVc / FC) \times FDE = LPVr$$

Donde:		Unidad	Valor
LPVd	Líquido perivitelino diluido	(ug/ul)	-
LPVc	Líquido perivitelino concentrado	(ug/ul)	-
LPVr	Líquido perivitelino real (ug/ul)	(ug/ul)	-
FC	Factor de concentración	-	-
FDE	Factor de dilución de extracción	-	54,6
Vh	Volumen huevo	uL	0,180
Ve	Volumen embrión	uL	0,058
Vi	Volumen LPV	uL	0,122

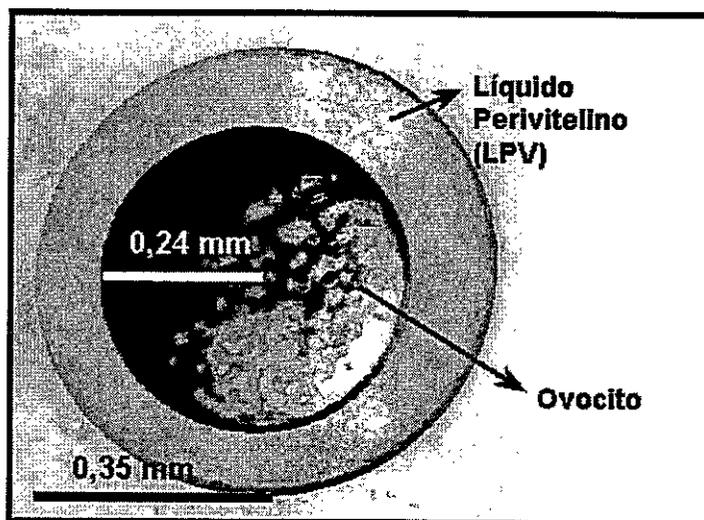
### Anexo D: Figuras suplementarias.



**Figura 19: Expresión de GFP en el transgénico *hsp70:GFP* en larvas de 4 dpf.** La expresión del reportero GFP en esta línea transgénica, demostró ser altamente variable aún en condiciones control. A y B muestran la expresión del reportero en dos larvas control de 4 dpf. La expresión basal de GFP en estas larvas debiese restringirse al territorio del cristalino en los ojos (flechas), pero comúnmente se observó la incidencia de expresión en otras regiones como las fibras musculares del tronco (fm) y el sistema digestivo (sd), tanto en especímenes homocigotos como heterocigotos. Esta alta variabilidad en la expresión de GFP impidió obtener resultados positivos confiables en los ensayos realizados con larvas de esta línea transgénica. Barra de escala 500  $\mu$ m.



**Figura 20: Aumento en la actividad locomotora de larvas de pez cebra expuestas a FON.** Larvas de 96 hpf fueron expuestas a FON (36,4 mg/L) y su actividad locomotora (LMA) fue registrada en el equipo Microtracker® durante 24 h en exposición continua, desde 1 hora de exposición. La LMA se reporta como nº de registros cada 30 min. La LMA de las larvas expuestas aumenta y se mantiene significativamente superior a la LMA de los controles durante 17 h ( $P < 0,001$ ), luego la actividad se hace comparable en ambos grupos.



**Figura 21: Ovocito maduro de pez cebra.** La figura muestra la relación de los radios del huevo y el ovocito en el pez cebra que permitieron el cálculo del volúmen del líquido perivitelínico (LPV).