

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL₅₀) A 96 HORAS EN
RODOSTOMO (*Hemigrammus rhodostomus*) EXPUESTO AL HERBICIDA
GRAMOXONE® (PARAQUAT)

CAROL ELICIA VARGAS RINCÓN

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
BOGOTÁ D. C.
2010

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 (CL₅₀) A 96 HORAS EN
RODOSTOMO (*Hemigrammus rhodostomus*) EXPUESTO AL HERBICIDA
GRAMOXONE® (PARAQUAT)

CAROL ELICIA VARGAS RINCÓN

Tesis para optar al grado de Biólogo

Director

DIANA MILENA OCHOA CARDONA

Médico Veterinario

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

BOGOTÁ D. C.

2010

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Bogotá, 14 de Mayo de 2010

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por su infinita misericordia al permitir el desempeño de este proyecto, llenando de entendimiento nuestras mentes finitas, brindando fortaleza en medio de las dificultades, y colmándonos de templanza para seguir adelante en medio de las circunstancias adversas, permitiéndonos crecer como personas a través de su Palabra.

A mis Padres, que por medio de su colaboración y apoyo incondicional, hicieron posible esta investigación.

A mis familiares y amigos, que durante todo este tiempo sus palabras de aliento no fueron en vano, a pesar de ser privados de mi presencia en varias ocasiones.

A colaboradores como Diana Ochoa que permitieron que éste estudio fuera posible, por su dedicación y paciencia. Al doctor Jaime Fernando González y Hernán Hurtado que brindaron un espacio en sus laboratorios para la realización del experimento, al igual que su equipo de trabajo.

A Paola Moreno, quién me colaboró de manera incondicional separando de su tiempo para asesorías y colaboración en la toma de fotografías. Gracias por estar ahí, siempre dispuesta...

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	1
1. OBJETIVOS.....	3
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. JUSTIFICACIÓN.....	4
3. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1 GENERALIDADES DE LA ESPECIE (<i>Hemigrammus rhodostomus</i>).	5
3.2 PARAQUAT.....	7
3.2.1 Generalidades de paraquat.....	7
3.2.2 Propiedades fisicoquímicas.....	8
3.2.3 Mecanismo de acción.....	10
3.2.4 Efectos medioambientales.	12
3.2.5 Efectos en organismos acuáticos.....	13
3.3 PRINCIPALES ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS.	16
3.4 PRINCIPALES ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN PECES.....	16
3.4.1 Alteraciones en hígado.....	16
3.4.2 Daños en branquias.	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 ANIMALES EXPERIMENTALES.....	19
4.2 PERIODO EXPERIMENTAL.	19
4.2.1. Evaluación del comportamiento.	21
4.2.2. Sacrificio.....	21
4.3. DETERMINACIÓN DE LA CL ₅₀	22
4.4. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	22
4.4.1. Extracción de muestras.	22
4.4.2. Cortes y procesamiento de muestras.....	22
4.4.3 Tinción y montaje de láminas.....	22
5. RESULTADOS.....	24
5.1 DETERMINACIÓN DE LA CL ₅₀	24
5.2. CAMBIOS COMPORTAMENTALES.....	27
5.3 ALTERACIONES HISTOLÓGICAS.....	28

5.3.1 Hígado.....	28
5.3.2 Branquias.....	35
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>H. rhodostomus</i>	6
Figura 2. Formula estructural del paraquat (1,1'-dimetil-4, 4'-bipyridinium).....	8
Figura 3. Mecanismo de acción del paraquat.....	11
Figura 4. Hígado de Rodostomo (<i>H. rodosthommus</i>) no expuesto a Gramoxone® (grupo control).....	29
Figura 5. Hígados de Rodostomos (<i>H. rodosthommus</i>) tratados con 1 ppm de Gramoxone®.....	30
Figura 6. Hígado de Rodostomo (<i>H. rodosthommus</i>) tratados con 15 ppm de Gramoxone®.....	31
Figura 7. Hígados de Rodostomos (<i>H. rodosthommus</i>) tratados con 45 ppm de Gramoxone®.....	32
Figura 8. Hígado de Rodostomo (<i>H. rodosthommus</i>) tratados con 70 ppm de Gramoxone®.....	33
Figura 9. Hígado de Rodostomo (<i>H. rodosthommus</i>) tratados con 150 ppm de Gramoxone®.....	34
Figura 10. Hígado de Rodostomo (<i>H. rodosthommus</i>) tratado con 30 ppm de Gramoxone®.....	35
Figura 11. Lámelas y filamentos branquiales de Rodostomos (<i>H. rodosthommus</i>) no expuestos a Gramoxone® (Grupo control)	36
Figura 12. Branquia de Rodostomo (<i>H. rodosthommus</i>), tratada con 1 ppm de Gramoxone®.....	36
Figura 13. Branquias de Rodostomo (<i>H. rodosthommus</i>), tratado con 15ppm de Gramoxone®.....	37
Figura 14. Branquias de Rodostomo (<i>H. rodosthommus</i>) tratadas con 45 ppm de Gramoxone®.....	38
Figura 15. Branquias de Rodostomo (<i>H. rodosthommus</i>) tratadas con 70 ppm de Gramoxone®.....	38
Figura 16. Branquia de Rodostomo (<i>H.rodosthommus</i>) tratados con 150 ppm.....	39
Figura 17. Branquia de Rodostomo (<i>H. rodosthommus</i>) tratados con 30 ppm de Gramoxone®.....	40

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación científica	6
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del paraquat.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 3. Efectos del paraquat en invertebrados acuáticos.....	14
Tabla 4. Efectos del paraquat en peces.....	15
Tabla 5. Concentraciones de Gramoxone® para cada uno de los tratamientos.....	20
Tabla 6. Cálculo del volumen de Gramoxone® en partes por millón (ppm).....	21
Tabla 7. Etapas por las que pasan los órganos escogidos para el estudio histológicos, hasta la inclusión en parafina.....	23
Tabla 8. Tinción de Hematoxilina-Eosina.....	23
Tabla 9. Número de peces muertos al finalizar las 96 h.	25
Tabla 10. Porcentaje de mortalidad de peces (<i>Hemigrammus rhodostomus</i>).	26
Tabla 11. Principales cambios comportamentales.....	27

ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Fotografía de individuos tratamiento control.	61
Anexo 2. Apariencia del agua de los tratamientos de mayor aplicación de Gramoxone®.	61
Anexo 3. Muerte de los peces del tratamiento 6 (150ppm) una hora después de la aplicación del paraquat.	61
Anexo 4. Nado irregular de los peces del tratamiento 5 (70ppm) una hora después de la adición del paraquat.	62
Anexo 5. Pérdida del eje de nado de los peces del tratamiento 4 (45 ppm) 24h después de la aplicación del paraquat.	62
Anexo 6. Los peces del tratamiento 3 presentaron movimientos mínimos y la mayoría del grupo nadaba en el fondo del acuario.	62
Anexo 7. Muerte de peces de los tratamientos 4,5 y 6 luego de la adición del producto comercial Gramoxone® (paraquat).	63
Anexo 8. Formato del registro de resultados.....	64

RESUMEN

Se evaluó la toxicidad del producto comercial Gramoxone® (paraquat) en peces ornamentales Rodostomos (*Hemigrammus rhodostomus*), los cuales fueron expuestos a 0, 1, 15, 30, 45, 70 y 150 ppm de este producto. La concentración letal media (CL₅₀) para Gramoxone fue de 32,83 ppm en 96 h de exposición. Los peces evidenciaron cambios comportamentales inducidos por estrés tales como; nado irregular, movimientos mínimos, boqueo, pérdida del eje de nado e incremento en la tasa de ventilación durante el tiempo de exposición. El porcentaje de mortalidad para la concentración de 0 ppm correspondió al 20,8%; en 1 ppm correspondió al 12,48%; en 15 ppm correspondió al 37,44%; en 30 ppm correspondió al 4,16%; para las concentraciones 45 ppm, 70 ppm y 150 ppm correspondió al 100% de la mortalidad. Las lesiones en branquias comenzaron desde la concentración de 1 ppm observándose levantamiento epitelial, hiperplasia de las células epiteliales, hipertrofia, desorden lamelar, fusión lamelar, edemas multifocales, hemorragia y congestión. Al igual que en las branquias los daños en hígado se evidenciaron desde la menor concentración de Gramoxone, observándose congestión, hipertrofia de hepatocitos, anisocitosis, dilatación de los espacios vasculares sinusoidales, vacuolización, hemorragia y presencia de macrófagos agregados. Los órganos del tratamiento control no evidenciaron cambios histopatológicos. Demostrando que el paraquat es un producto tóxico que en concentraciones mínimas genera lesiones en los principales órganos de los peces en estudio, y que el aumento en su concentración puede generar la muerte de los individuos.

Palabras claves

Rodostomo, Concentración letal media, *Hemigrammus rhodostomus*, Gramoxone®, histopatología, branquias e hígado.

INTRODUCCIÓN

Colombia ha sido uno de los principales proveedores latinoamericanos de peces ornamentales para exportación a una gran variedad de países en Europa, Asia y Norte América; sin embargo, en los últimos años, serios inconvenientes económicos y biológicos, han sido ocasionados por la reducción de éstos individuos que son extraídos principalmente de cuencas y ríos (Proexport, 2004, Mojica *et al.*, 2002). Por lo anterior, reconocer las principales problemáticas causantes de dicha disminución y deterioro, así como la búsqueda de alternativas que propendan por la defensa del hábitat de las múltiples especies encontradas en estos ecosistemas para su restauración y preservación, juega un papel muy importante.

Los Rodostomos (*Hemigrammus rhodostomus*), comúnmente conocidos como borrachitos, son peces ornamentales de hábitos omnívoros, originarios de la cuenca del río Orinoco y de gran importancia comercial, caracterizada por su alta demanda nacional e internacional; sin embargo, en los últimos años ha presentado una marcada disminución, ya que luego de ocupar un 70% entre las principales especies exportadas en 2002, a finales del 2004 solo ocupó un 4% (INCONDER, 2006; Mancera and Álvarez, 2008).

La disminución en las poblaciones de éste pez, puede tener su origen en múltiples causas; no obstante, el impacto ambiental ocasionado por el uso indiscriminado de plaguicidas en cultivos agrícolas cercanos a las cuencas que ésta especie habita, puede llegar a ser una de las principales razones.

En la región de la Orinoquia, durante los últimos años, los cultivos de palma y arroz han tenido un crecimiento significativo, ocupando una gran extensión cercana al hábitat de los rodostomos, dichos cultivos son extensamente fumigados con una gran variedad de pesticidas donde el paraquat es de los más comúnmente usados además de ocupar uno de los principales puestos respecto al volumen de ventas (3 % de herbicidas comercializados) (ICA, 2006).

El paraquat (1,1- dimetil-4,4-bipiridinium dicloruro) es un herbicida bipiridilo altamente tóxico para los organismos acuáticos, con efectos que pueden ir desde alteraciones comportamentales hasta daños degenerativos en órganos como branquias, hígado, intestino, riñón y cerebro que pueden llevar hasta la muerte del pez, lo cual ha sido reportado en peces (*Clarias gariepinus*) expuestos a 18 mg L^{-1} de paraquat (Omitoyin *et al.*, 2006).

Parvez & Raisuddin (2005) han demostrado daños irreversibles en *Channa punctata*, por lo que resaltan la importancia de reconocer las principales lesiones y marcadores enzimáticos que demuestren la toxicidad de este compuesto, ya que la presencia del paraquat en cuerpos de agua puede llegar a causar una disminución en la tasa de sobrevivencia de los organismos presentes en dichos ecosistemas lo que se puede ver directamente reflejado en la cadena alimenticia.

Por dicha razón, el objetivo de este trabajo fue determinar la concentración letal 50 (CL₅₀) del herbicida Gramoxone® en peces rodostomos y evaluar los principales daños histopatológicos en órganos como hígado y branquias con el fin de realizar un aporte al conocimiento de los efectos ocasionados por este herbicida.

1. OBJETIVOS.

1.1. OBJETIVO GENERAL.

- Establecer la concentración letal 50 (CL₅₀) a 96 horas del herbicida Gramoxone® y las principales lesiones histopatológicas en hígado y branquias que se produce en los Rodostomos (*Hemigrammus rhodostomus*).

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la mortalidad de *Hemigrammus rhodostomus* expuesto a 6 concentraciones distintas de paraquat.
- Determinar las principales alteraciones histopatológicas en hígado producidas por el paraquat.
- Determinar las principales alteraciones histopatológicas en branquias producidas por el paraquat.

2. JUSTIFICACIÓN.

El rodostomo (*Hemigrammus rhodostomus*) es una especie íctica nativa ornamental de gran importancia debido a su alta comercialización y exportación (Mancera & Álvarez, 2008). Sin embargo, durante los últimos años se ha reportado por parte de pescadores una notable disminución en la población de esta especie que es capturada en los caños y vertientes de ríos de la Orinoquia y como consecuencia se ha producido una baja en su comercialización (Comunicación personal, pescadores de la zona). Sumado a esto, datos publicados por el INCODER en el 2006, revelan como el porcentaje de exportación de esta especie pasó de ser de un 70% en el 2002 a un 4% en el 2004.

En la región de la Orinoquia existen grandes plantaciones de palma y arroz que son comúnmente fumigadas con grandes volúmenes de Gramoxone® donde su uso a llegado a ser indiscriminado en este tipo de cultivos, ya que en muchas zonas productoras de arroz el uso de dicho químico es inadecuado y su dosificación es mayor a las recomendaciones técnicas (Fittipaldi, 2008, Cuevas, 2001). La proximidad de dichos cultivos a los caños y vertientes que son hábitat del rodostomo y el uso masivo del Gramoxone® en los mismos, se ha convertido en un riesgo potencial por posibles efectos de deriva de este producto, ocasionando graves daños que pueden ir desde efectos agudos a crónicos (Bonilla *et al.*, 2000).

El Gramoxone® es un herbicida de amplio espectro hecho a base de paraquat, el cual se clasifica como altamente tóxico. Hasta el momento se han reportado una amplia cantidad de efectos en seres humanos y animales (León y Rodríguez, 2001). A pesar de que existen reportes en la literatura de concentraciones letales en diversas especies de peces, aún se desconoce información acerca de los efectos tóxicos de éste herbicida en la especie rodostomo. Por eso mismo, la determinación de la CL₅₀ permitirá de esta manera profundizar en el conocimiento de los efectos del herbicida en esta especie así como contribuir a la evaluación de los daños potenciales que pueden ocurrir en órganos calve como el hígado y el riñón de estos peces.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES DE LA ESPECIE (*Hemigrammus rhodostomus*).

El rodostomo es conocido también como tetra rodostomo, tetra nariz roja (Leticia), tetra de cabeza roja o borrachín. Pertenece al orden Characiforme, familia Characidae (Tabla 1), en donde se agrupan más de 700 especies (Castellanos y Sánchez, 2007).

El rodostomo es originario de América del sur, abunda en Brasil y en Colombia se encuentra en las cuencas del río Amazonas y Orinoco, prefiriendo aguas turbias y con temperaturas medias de 22°C a 28°C, según registros (Biocomercio sostenible, 2002).

Este pez tiene una longitud de 4 a 5 cm, su cuerpo es alargado y comprimido, presenta una mancha roja intensa en la cabeza la cual va desde la boca al opérculo, cubriendo la parte superior de sus ojos, su color corporal es plateado con una serie de brillos verdes o amarillos a lo largo de la línea lateral (Figura 1). Su aleta caudal presenta una mancha peduncular pequeña y redondeada que se extiende a los radios medios, con rayas oblicuas negras en los lóbulos superiores e inferiores que se dirigen perpendicularmente a su cuerpo, esta especie posee una aleta anal de gran longitud con más de 10 radios, las hembras a diferencia de los machos tienen un cuerpo más redondeado y de mayor tamaño con una coloración más oscura que los machos (Rundle, 2006).

Figura 1. *H. rhodostomus*.



Tomado de Hoffmann and Hoffmann, 2003.

Tabla 1. Clasificación Taxonómica.

Clasificación Taxonómica	
Reino	Animal
Filo	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Characiformes
Familia	Characidae
Género	<i>Hemigrammus</i>

Tomado de Lasso (2005).

El Rodostomo es un pez de hábito omnívoro que se alimenta de algas, vegetales, rotíferos, crustáceos, insectos y peces de menor tamaño, presenta premaxilares en dos series regulares igual que el tetragonopterinae, sus dientes son multicúspides, en donde la cúspide central es más grande que las demás (Castellanos y Sánchez, 2007).

3.2 PARAQUAT.

El paraquat es un herbicida postemergente no selectivo que se emplea en cultivos de gramíneas, graminiformes y latifoliadas anuales de gran importancia económica y en manejo de áreas no agrícolas (Gagneten, 2002). El paraquat es ampliamente usado en Colombia, algunos de los productos comerciales más conocidos son: Gramoxone[®], Proxone[®], Gramafin[®], Gramuron[®], Pillarxone[®], Herbaxone[®] y Paraquat plus[®] (Angulo, 2003).

En Colombia el paraquat es usado por gran cantidad de productores y trabajadores al ser un químico de libre venta, sin embargo, se utiliza principalmente en cultivos de soya, arroz y algodón, controlando malezas como *Echinochloa colonum* (liendre puerco), *Echinochloa crusgalli* (Barba de indio), *Leptochloa filiformis* (paja mona), *Eleusine indica* (pata de gallina), *Amaranthus sp.* (bledo), *Avena fatua* y *Ipome sp.* (batatilla) (Camejo, 1984).

3.2.1 Generalidades de paraquat.

El paraquat (1, 1'-dimetil-4, 4'-bipyridinium) es uno de los herbicidas más empleados en Colombia desde su introducción en la agricultura desde 1961 (Bonilla *et al.*, 2000). Generalmente los herbicidas a base de paraquat se formulan en forma de sal o dicloruro del catión, un compuesto de amonio cuaternario, este catión es el que tiene el efecto herbicida y el efecto tóxico. La concentración líquida de paraquat contiene del 25% al 44% de ingrediente activo, más el solvente (agua) y coadyuvantes (Isenring, 2006). Este herbicida es considerado como altamente tóxico y su dosis letal en ratas corresponde a 120 mg de producto/kg de peso de ingrediente activo (Chavarriaga, 1997).

3.2.2 Propiedades fisicoquímicas.

Su fórmula química es $C_{12}H_{14}N_2$, compuesta por dos anillos iguales de pirimidinas (Figura 2), lo que le da el nombre de bipyridilo, estos dos anillos se cuaternizan al adicionárseles un grupo metil a sus respectivos átomos de nitrógeno, formando sales incoloras de cloro. En el grupo de bipyridilos hay cuatro importantes herbicidas; Diquat, Paraquat, Ciperquat y Difenzoquat (Ware & Whitacre, 2004).

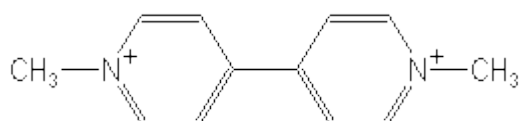


Figura 2. Fórmula estructural del paraquat (1,1'-dimetil-4, 4'-bipyridinium).

Tomado de Ware & Whitacre (2004).

El paraquat es un compuesto altamente insoluble en solventes orgánicos, sus sales son cristalinas, sin olor y de forma higroscópica en polvo. El dicloruro de paraquat tiene una masa relativa de 257,2, mientras que la masa molecular del paraquat en estado iónico es de 186,2, siendo ligeramente soluble en alcohol pero insoluble en disolventes orgánicos, no es explosivo ni inflamable en disoluciones acuosas. El paraquat es corrosivo para los metales e incompatible con agentes humectantes, puede sufrir reducciones de un solo electrón y quedar en forma catiónica, el potencial redox para esta reacción es de 446 mv, (Tabla 2) (World Health Organization, 1984).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del paraquat.

Nombre químico	
Paraquat (cation)	1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium
Paraquat dicloro (sal)	1,1'-diemethyl-4,4'-bipyridinium dicloro
Peso molecular	186.2 (cation); 257.2 (sal)
Número CAS	4685-14-17 (cation); C ₁₂ H ₄ Cl ₂ N ₂
Solubilidad a 20°C	
Agua	561g/L
Methanol	144g/L
Ethanol	1.7g/L
Acetona	200mg/L
Mas solventes orgánicos	Insoluble o poco insoluble
Estados físicos	Sólido, blanco (puro), amarillo (técnico)
Usos principales	Herbicida, desecante
Peso específico	1.24-1.26
Punto de fusión	175°C a 180° C, descomposición a 345°C.
Estabilidad	Estables sobre exposición a ácidos calientes, inestable en pH alcalinos >10
Punto de inflamación	No explosivo, no inflamable
Volatilidad	No volátil

Tomado de Ronald (1990).

3.2.3 Mecanismo de acción.

El paraquat se caracteriza por ser de contacto y de pequeña translocación, generando una rápida acción, eliminando las semillas y matando el tejido verde (Gagneten, 2002).

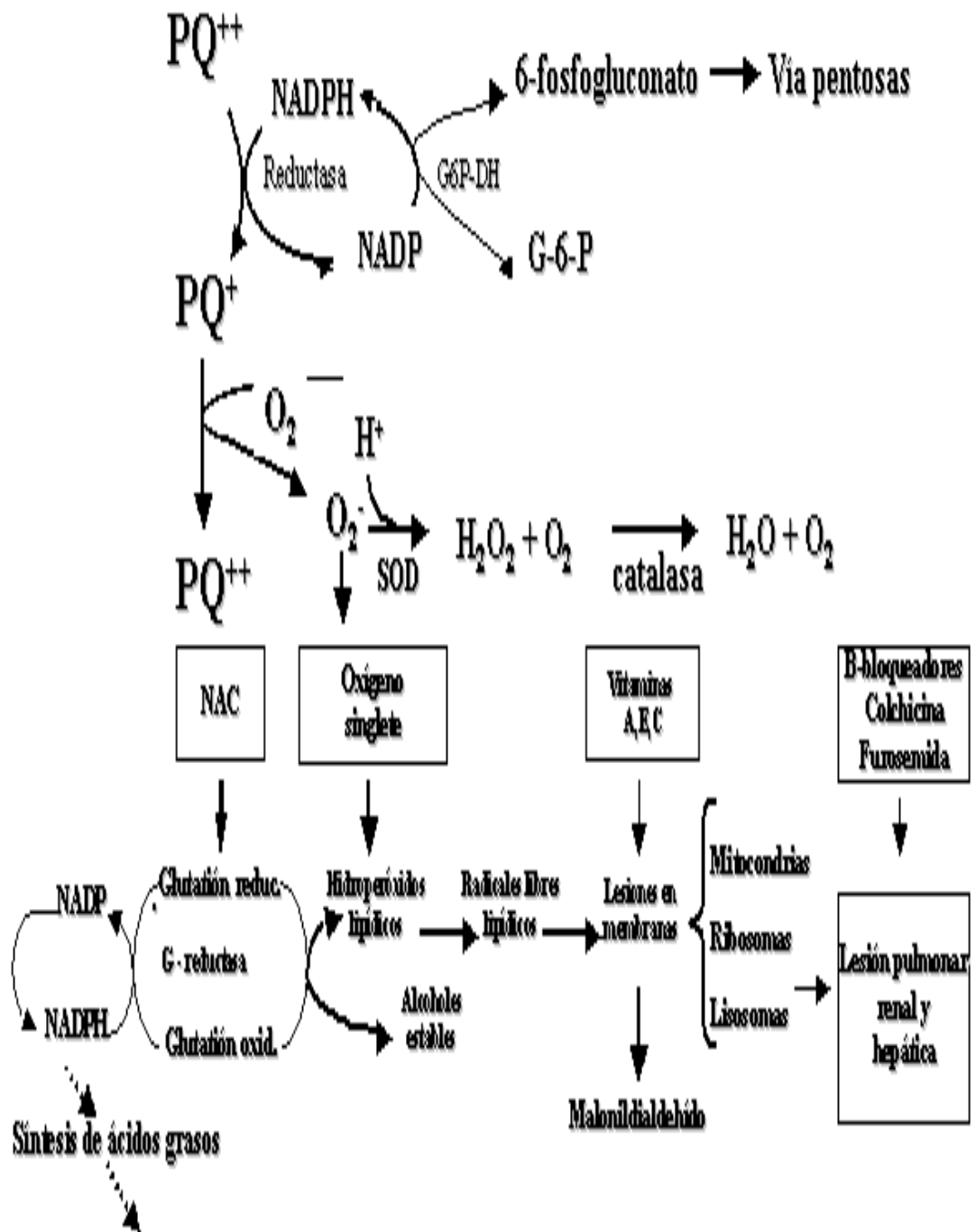
El contacto con el paraquat afecta rápidamente los principales tejidos de las plantas, dándoles una apariencia de daño por helada, causándoles una destrucción de las membranas celulares. Este proceso de marchitamiento y de desecación se efectúa en cuestión de horas, por lo que se usa como desecante foliar antes de la cosecha de semillas, soya, caña de azúcar y girasoles (Haley, 1979).

Su mecanismo de acción ocurre a través de los iones positivos que se encuentran disociados de manera natural, reduciéndose por fotosíntesis y formando radicales libres estables. Estos radicales libres se oxidan y forman un nuevo ion que es el peróxido de hidrógeno, el cual destruye la planta (Ware & Whitacre, 2004).

El paraquat afecta principalmente los organelos superficiales de las plantas, transportándose en gran cantidad al xilema, lo que evita procesos como la reducción de ferredoxina y una serie de procesos ciclos de reducción-oxidación, en el que sufre una reducción por un electrón donado por el NADPH, transformándose en radicales libres (Bus and Gibson, 1986). El paraquat al recuperar su configuración inicial, reacciona con el O_2 generando una producción de radicales superóxidos que atacan directamente las membranas celulares y acaban con los sistemas de detoxificación de los individuos expuestos, imposibilitando la producción eficaz de energía (Isenring, 2006; Ochoa y González, 2008) (Figura 3). En cultivos de interés como la caña de azúcar este químico deseca el huso, las hojas y demás tejidos, ya que en un tiempo prolongado de 72 horas la actividad de amilasas incrementa en las hojas, disminuye la sucrosa, se genera una supresión de invertasas y aparece ribosa, siendo de esta manera un producto nocivo para el proceso fotosintético de las plantas (Chavarriaga, 1997).

Aunque se ha estudiado muy poco acerca de los metabolitos de estos compuestos tóxicos, se demostró que estos presentan altas afinidades por los compuestos lipídicos almacenándose en estos. Al entrar al sistema de los organismos, estos se distribuyen tejidos de alta irrigación y ricos en grasas o se filtran de manera plasmática (Labrada y Parker, 1996; García, 2002).

Figura 3. Mecanismo de acción del paraquat.



Tomado de Angulo (2003).

3.2.4 Efectos medioambientales.

El paraquat se caracteriza por ser altamente absorbido por los suelos y sedimentos degradándose lentamente en estos. Sus componentes iónicos al ser insolubles en grasas no permiten la acumulación en la cadena alimenticia (Caseley, 1996).

En la superficie del suelo se ha demostrado que el paraquat sufre un efecto de fotodescomposición, lo que hace que se pierda el 50% del producto a la tercera semana de su aplicación en ecosistemas de agua dulce, la pérdida se hace más rápida porque 36 horas después se ha eliminado el 50% del producto, en el caso de ecosistemas marinos 24 horas después se ha observado pérdidas del 50-70% del producto (Alström, 2003).

Este producto no solo afecta a la maleza, sino que a su vez ataca insectos benéficos y otros organismos que hacen parte de la cadena trófica, a nivel mundial el fenómeno que más se registra es el de contaminación de aguas superficiales y subterráneas cuyos orígenes están en:

- El arrastre de material contaminante desde terrenos en los que se ha aplicado el herbicida, por acción de aguas lluvia o por agua de riego.
- Fumigación aérea realizada continúa a los cursos de agua.
- El lavado con aguas lluvia de las partículas del herbicida que se encuentran en la vegetación.
- Y derrames accidentales que ocurren en depósitos de herbicidas (León y Rodríguez, 2001).

Cuando se emplean herbicidas, su incorporación en el agua puede resultar accidental ya que este puede dirigirse por escorrentía siguiendo el curso de agua y contaminar fuentes alimenticias de poblaciones tanto humanas como animales (Ávila y Guzmán, 2000; Gagneten, 2002).

El paraquat que llega a las corrientes de agua es asimilado por la materia orgánica y se solubiliza rápidamente, su efecto en muchos organismos aumenta al ingerir microalgas que se encuentran contaminadas aumentando su acción tóxica (ATSDR, 2005).

Muchas de las investigaciones muestran un gran efecto sobre la comunidad planctónica y sobre otros organismos como anfibios y peces que son afectados por la ingestión de estos, hasta el momento no se conocen cuales son las especies más afectadas al ser expuestas a este producto, pero este químico puede llegar a generar anomalías físicas y deterioro de los principales tejidos de los organismos expuestos (Gagneten, 2002).

3.2.5 Efectos en organismos acuáticos.

La tasa de asimilación que presenta el pez frente al paraquat, depende y está relacionada directamente con la concentración de tóxico en la comida o en el medio en el que se desarrolla el mismo. A su vez la tasa de asimilación depende del tamaño, la edad y el sexo del organismo (Instituto de seguridad e higiene en el trabajo, 2006).

Estudios realizados en peces de agua dulce (*Channa punctata*) que fueron expuestos a paraquat mostraron niveles reducidos de glutatión de forma significativa en órganos como hígado y páncreas, niveles altos de ácido ascórbico en hígado y una disminución significativa de ácido úrico en riñones produciendo estrés oxidativo en los peces (Parvez & Raisuddin, 2005).

Hasta el momento se conocen una diversidad de organismos invertebrados (Tabla 3) y peces (Tabla 4) en los que se han desarrollado estudios de concentraciones letales y tiempo de exposición, demostrando los efectos que este producto tiene sobre la biota acuática.

Tabla 3. Efectos del paraquat en invertebrados acuáticos.

Especie	CL₅₀ (ppm)	Efectos y tiempo de exposición
<i>Rithropanopeus harrisi.</i>	0.00086	19 días
Asellus, Lymnaea,	0.5	Antes de 4 días no muerte
<i>Murex brandaris</i>	1	18 días
<i>Daphnia hyalina</i>	2.5	14 días
<i>Daphnia pulex</i>	2.7	Inmovilización a las 48 horas.
<i>Simocephalus serrulatus.</i>	3.7	Muerte a las 48 horas.
<i>Eucyclops,</i> <i>Diaptomus</i>	5	Muerte a las 48 horas

Tomado de Ronald (1990).

Tabla 4. Efectos del paraquat en peces.

Especie	CL₅₀ (ppm)	Efectos y Tiempo de exposición
<i>Cyprinus carpio</i>	5	Incrementa la actividad de varias enzimas en el hígado, y niveles de azúcar en la sangre.
<i>Lepomis cyanellus</i>	1	Residuos luego de 16 días.
<i>Lepomis macrochirus</i>	1	Residuos luego de 16 días.
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	1	Residuos luego de 16 días.
<i>Ictalurus punctatus</i>	1	Residuos luego de 16 días.
<i>Micropterus dolomieu</i>	1	A los 16 días se observaron residuos de paraquat (mg/Kg FW). 0.2 en músculo, 0.2 en ovario, 4.7 en piel y 6.1 en tracto digestivo.
<i>Mugil cephalus</i>	1	Muerte 60 minutos.
<i>Mugil cephalus</i>	10	Muerte 48 horas.
<i>Puntius gonionotus</i>	1	Muerte 48 horas.
<i>Fundulus similis</i>	> 1	Muerte 96 horas.
<i>Gambusia affinis</i>	3	Muerte 96 horas.
<i>Brachydanio rerio</i>	7.5-48.5	Muerte 96 horas.
<i>Poecilia mexicana</i>	12	Muerte 96 horas.
<i>Lepomis macrochirus</i>	13	Muerte 96 horas.
<i>Poecilia reticulata</i>	15-22	Muerte 96 horas.
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	15-32	Muerte 96 horas.

Tomado de Ronald (1990).

3.3 PRINCIPALES ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS.

Se han identificado lesiones producidas por el paraquat en órganos como riñón, hígado, piel, sistema vascular, reproductivo, y nervioso con alteraciones como patología de los túbulos proximales, necrosis hepatocelular, hiperqueratosis, congestión miocárdial, incremento en leucocitos, eritrocitos, degeneración, hiperexcitabilidad, irritabilidad, falta de coordinación y convulsiones respectivamente (Ronald, 1990).

Un estudio realizado por Salguero *et al.*, (2005) en seres humanos que ingirieron paraquat con motivo de suicidio, mostraron lesiones como necrosis de células epiteliales de los conductos biliares, desprendimiento de células epiteliales hacia el interior de los conductos hepáticos.

3.4 PRINCIPALES ALTERACIONES HISTOPATOLOGICAS EN PECES

Alteraciones histopatológicas en órganos específicos como branquias, riñón e hígado, responsables de funciones vitales como la respiración, excreción y biotransformación, se han utilizado como buenos indicadores de efecto ante la presencia de una variada clase de contaminantes (Camargo y Martínez, 2007).

3.4.1 Alteraciones en hígado.

En pequeñas concentraciones de paraquat se observan infiltrados mixtos de linfocitos y leucocitos; además de que originan lesiones hepatocanaliculares por su capacidad hepatotóxica intrínseca, producen alteraciones hepáticas parenquimatosas, vacuolización, necrosis, y un incremento de macrófagos agregados y células granulares eosinófilas en juveniles de Catfish (*Clarias gariepinus*) (Omitoyin *et al.*, 2006).

Según Figueiredo *et al.*, (2006) el parénquima hepático de tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) expuestos a paraquat ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) durante 45 días, muestra poca eosinofilia e incremento considerablemente de vacuolización citoplasmática, además de aparición de células necróticas en la periferia de regiones en las que se encuentra mayor

vacuolización, las membranas de los hepatocitos muestran ruptura. Se ha identificado que a medida que aumenta la concentración de paraquat, aumenta la observación de macrófagos agregados. Todas estas alteraciones se atribuyen a la condición necrótica-degenerativa. Al incrementarse la vacuolización en concentraciones superiores a 18 y 40 ppm hay presencia de picnosis, hemorragias y necrosis (Omitoyin *et al.*, 2006).

La mayoría de estudios se han centrado en células endoteliales, ya que pueden llegar a constituir el 48% de las células que se encuentran en las sinusoides, y son las principales células afectadas en lesiones hepáticas, indicando un papel importante en las respuestas tóxicas del hígado (Salguero *et al.*, 2005).

Un ensayo realizado por Parma de Croux *et al.*, (1999), en juveniles de *Piaractus mesopotamicus* expuestos a 7 concentraciones de paraquat (0,75; 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0 y 48, 0 ppm), demostró que esta especie al ser expuesta a una concentración mayor a 24 ppm evidencia alteración de los hepatocitos caracterizada por vacuolización del citoplasma y desplazamiento nuclear; en este mismo estudio en concentraciones mayores a 12 ppm se describen congestión y tumefacción generalizadas, además de dilatación de las sinusoides hepáticos.

Se ha observado en peces de la especie *Prochilodus lineatus* que al ser expuestos a paraquat los núcleos de los hepatocitos presentaban anisocariosis, acompañado de hipertrofia nuclear, vacuolización nuclear, estancamiento de la bilis por presencia de gránulos de color amarillo-marrón en el citoplasma, y en casos más graves necrosis focal (Camargo y Martínez, 2007).

Un estudio realizado por Rojik *et al.*, (1983), en tres especies principales de peces con hábitos alimenticios diferentes (*Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix* y *Silurus glanis* L); muestra los principales daños tóxicos en branquias e hígado, las células de las branquias pierden completamente su citoplasma, ya que desaparece la totalidad de los organelos al ocurrir ruptura de la membrana plasmática, se observa necrosis focal y mitocondrias de origen endoplasmático, se reporta que el pilar celular se mantiene intacto, mientras que en el hígado su grado de daño celular se indicó por la hinchazón mitocondrial y la vacuolización del retículo endoplasmático, además el número de

leucocitos aumenta considerablemente y las vacuolas se observan llenas de gránulos densos que aparecieron por efecto de toxicosis.

3.4.2 Daños en branquias.

Evans, (1987) recopiló una marcada información sobre principales daños branquiales por contaminantes como lluvia ácida, metales pesados, xenobióticos orgánicos y paraquat. El estudio con el contaminante paraquat se realizó en *Opsanus beta*, las branquias de estos peces presentaron hiperplasia lamelar y fusión entre ellas, hipertrofia epitelial y telangiectasia (marcada dilatación de los vasos sanguíneos terminales) así como separación epitelial de membranas basales, necrosis general y descamación epitelial.

En un estudio realizado por Omitoyin *et al.*, (2006) en *Clarias gariepinus*, demostró que el paraquat en concentraciones superiores a 1.6 ppm, produce hinchazón del extremo distal de los filamentos branquiales, infiltración de la mucosa, congestión lamelar, necrosis celular y hemorragias de submucosa en branquias, retraso en el crecimiento y congestiones severas.

Peces de la especie *Oreochromis niloticus* expuestos a 11,20; 12,0 y 14,20 ppm de paraquat (durante a 96h), muestran daños en la arquitectura de las lamelas, hiperplasia de los filamentos y atrofia de los componentes tisulares (Babatunde, *et al.*, 2001). Sinhaseni y Tesprateep, (1987) en la especie *Puntius gonionotu* expuesta a 4 ppm de paraquat (durante 12h) evidenciaron vacuolización hidrópica de las células epiteliales de las lamelas y desprendimiento epitelial.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

El período de aclimatación así como el desarrollo de la fase experimental, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Toxicología Acuática de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá.

4.1 ANIMALES EXPERIMENTALES.

Los juveniles de la especie *Hemigrammus rhodostomus* (n=200) fueron procedentes de Acacias del departamento del Meta. Una vez en el laboratorio, los peces fueron sometidos a un periodo de aclimatación de 3 semanas en un acuario de 40 galones bajo condiciones controladas en el laboratorio (temperatura de 26+/-1°C, pH), se realizaron recambios cada dos días del 30 % del agua; se alimentaron 2 veces al día con concentrado comercial con un porcentaje de proteína del 45 %.

4.2 PERIODO EXPERIMENTAL.

En esta fase se utilizaron un total de 14 acuarios de 10 galones cada uno, los individuos de experimentación fueron asignados al azar para cada uno de los acuarios y para cada uno de los tratamientos. El Gramoxone® (p.a. Paraquat) fue obtenido de una fuente comercial (Syngenta, Gramoxone plus®) El producto posee una concentración de 200 g/l. Clasificación toxicológica I (Muy tóxico, Peligroso para el medio ambiente).

Las concentraciones de Gramoxone® utilizadas en cada uno de los tratamientos fueron elegidos basados en revisión de literatura utilizando concentraciones cercanas a las utilizadas en otras especies de similar morfología y tamaño. Los individuos fueron expuestos durante 96h a 6 distintas concentraciones del herbicida. Para cada uno de los acuarios se seleccionaron 12 individuos. Cada tratamiento contó con una repetición para un total de 24 individuos por tratamiento. Las concentraciones empleadas para cada uno de los tratamientos se seleccionaron entre el rango de 0 ppm a 150 ppm (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones de Gramoxone® por tratamiento.

Tratamiento	ppm
Tratamiento 1 (control)	0
Tratamiento 2	1
Tratamiento 3	15
Tratamiento 4	45
Tratamiento 5	70
Tratamiento 6	150
Tratamiento 7	30

El cálculo del volumen de Gramoxone® en partes por millón (ppm) utilizado en cada uno de los tratamientos se realizó en base al volumen de agua de cada uno de los acuarios experimentales (Tabla 6).

Tabla 6. Calculo del volumen de Gramoxone® en partes por millón (ppm).

Tratamientos	Acuarios	Volumen de Acuario (L)	Volumen de Gramoxone®
2 (1 ppm ó 1 µL/L)	10g 1	32.2	32.2 µL
	10g 7	37.6	37.5 µL
3 (15 ppm ó 15 µL/L)	10g 2	35.2	528 µL
	10g 5	34.4	516 µL
4 (45 ppm ó 45 µL/L)	10g 3	37.9	1.70 ml
	10g 1	37.8	1.70 ml
5 (70 ppm ó 70 µL/L)	10g 4	34	2.38 ml
	10g 9	35.4	2.48 ml
6 (150 ppm ó 150 µL/L)	10g 6	34.6	5.19 ml
	10g 12	37.5	5.63 ml
7 (30 ppm ó 30 µL/L)	10g 11	37.8	1.13 ml
	10g 3	37.9	1.13 ml

4.2.1. Evaluación del comportamiento.

Durante las 96h del periodo experimental fueron observadas variables comportamentales como actitud en el acuario, eje de nado, patrón de nado (errático, normal), y ubicación dentro de la columna de agua.

4.2.2. Sacrificio.

Previo al sacrificio se realizaron registros de la hora de muerte de cada uno de los individuos, peso y talla y posteriormente fueron fijados y conservados en formaldehído.

Una vez finalizadas las 96 horas de exposición se sacrificaron los individuos que sobrevivieron a la exposición, mediante choque térmico (4°C). Los individuos en cada uno de los tratamientos fueron preservados y fijados en formaldehído bufferado al 4% para luego proceder a la extracción de los respectivos órganos.

4.3. DETERMINACIÓN DE LA CL₅₀

Con los diferentes datos de tiempo de mortalidad se aplicó el método de Sperman-Karber con el programa (Trimmed Sperman-Karber), el cual es un programa estadístico no paramétrico usado ampliamente con estos fines, este procedimiento estima la media de distribución de tolerancia de los tratamientos en Log₁₀. Los resultados de la mortalidad en el control se ajustan usando el procedimiento Abbott (Hamilton *et al.*, 1977).

4.4. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.

4.4.1. Extracción de muestras.

Luego de terminado el proceso de fijación (Tabla 7) se tomaron 10 individuos al azar de cada uno de los tratamientos a los cuales se les tomaron las respectivas muestras de branquias (segundo arco branquial) e hígado de cada uno de los peces con ayuda de un estereoscopio y un equipo de disección. Estas muestras fueron fijadas en formaldehído al 4 % para el posterior examen histopatológico.

4.4.2. Cortes y procesamiento de muestras.

Las muestras de tejido fueron sometidos a un proceso de deshidratación e impregnación en parafina (Moyle & Schrek, 1990), luego de la obtención de bloques se montaron sobre soportes de plástico, los cuales facilitaron el manejo en el micrótopo rotatorio, en donde se realizaron cortes de 5 micras de espesor.

4.4.3 Tinción y montaje de láminas.

Las laminas fueron sometidas a procesos de hidratación y tinción con Hematoxilina-eosina (H&E), y pasado unos minutos se realizaron unas deshidrataciones finales y montaje con Entellan[®] (Prophet *et al.*, 1995). Luego del montaje se dejaron secar 24 horas, evitando el daño del montaje con el Entellan[®] (Tabla 8). Luego de rotuladas se procedió a una toma de fotos que permitió su descripción morfológica e histológica, algunas se tomaron a un aumento de 40x y 100x, para mayor observación y descripción celular.

Tabla 7. Etapas por las que pasan los órganos escogidos para el estudio histológico hasta la inclusión en parafina.

Etapas	Finalidades	Duración
1. Fijación: formaldehído al 4%	Conserva la morfología y la composición del tejido.	Más de 24 horas.
2. Deshidratación: en alcohol etílico, comenzando con el de 70% y terminando con alcohol absoluto.	Eliminar el agua de los tejidos.	6 horas.
3. Aclaramiento: solventes de alcohol y de parafina, se empleó xilol.	Embeber el órgano en una sustancia miscible con la parafina.	2 horas.
4. Inclusión: se emplea parafina fundida, se realiza en una estufa a 60°C.	La parafina penetra en los vasos, en los espacios intercelulares y también en el interior de las células embebiendo el tejido y haciendo más fácil la obtención de los cortes en el micrótopo.	2 horas.
5. Bloques: el órgano se colocó en un molde rectangular que contiene parafina fundida.	Obtención del bloque de parafina de forma regular, para ser cortado por el micrótopo.	5 minutos por bloque.

Tabla 8. Tinción de Hematoxilina-Eosina.

Reactivo	Resultados
Hematoxilina	Azul: núcleo, regiones ácidas del citoplasma.
Eosina	Rosa: regiones básicas del citoplasma.

5. RESULTADOS.

5.1 DETERMINACIÓN DE LA CL₅₀.

Una vez finalizado el periodo experimental de 96h, se registraron los datos de mortalidad y sobrevivencia para cada uno de los tratamientos. La CL₅₀ se determinó mediante el programa Spearman- Karber teniendo en cuenta las mortalidades en cada uno de los tratamientos. El programa arrojó una CL₅₀ de 32,83 ppm de Gramoxone®, siendo los límites de confianza inferior y superior de 28,01 y 38,49 respectivamente. El número de mortalidades en cada uno de los tratamientos se registró durante todo el periodo experimental (Tabla 9). Con esta información se pudo establecer el intervalo de concentración en el cual se identificó del 0 al 100% de mortalidad.

En la tabla 10 se muestran los porcentajes de mortalidad de los individuos en los diferentes tratamientos durante todo el periodo experimental, observándose que los individuos de los tratamientos de 70 y 150 ppm murieron en el transcurso de la primera hora (Figura 5), mientras que los individuos expuestos a las menores concentraciones presentaron mortalidad pasadas las primeras horas de exposición.

Tabla 9. Número de peces muertos al finalizar las 96 h del período experimental.

Tratamiento	Nº de peces muertos
Control (0ppm)	5
Tratamiento 2 (1ppm)	3
Tratamiento 3 (15ppm)	9
Tratamiento 4 (45ppm)	24
Tratamiento 5 (70ppm)	24
Tratamiento 6 (150ppm)	24
Tratamiento 7 (30ppm)	1

Tabla 10. Porcentaje de mortalidad en cada uno de los tratamientos durante las 96 horas de experimentación.

Tratamiento (concentración ppm)	Mortalidad acumulada (%)												Total (%)
	1h	3h	6h	9h	12h	24h	33h	36h	45h	54h	72h	96h	
0 (control)	00	00	00	4.16	16.66	00	00	00	00	00	00	00	20.8
1	00	00	00	00	00	00	00	4.16	00	8.33	00	00	12.48
15	00	00	00	00	4.16	12.48	4.16	00	12.48	4.16	00	00	37.44
30	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	4.16	00	4.16
45	00	00	41.6	00	58.33	00	00	00	00	00	00	00	100
70	00	100	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	100
150	00	100	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	100

5.2. CAMBIOS COMPORTAMENTALES.

Los peces control durante las primeras 12h de la exposición al herbicida Gramoxone® presentaron un marcado comportamiento de agresividad y competencia por parte de los individuos de mayor tamaño (diferencias de más de 4 mm), provocando la muerte de 5 individuos de un acuario réplica.

Los peces de los demás tratamientos presentaron cambios en su nado (nado errático, nado en el fondo, pérdida del eje de nado, nado en la superficie, entre otros) y en su movimiento (movimientos mínimos, boqueo, entre otros). En la tabla 11 se expresan las principales alteraciones comportamentales registradas para cada uno de los tratamientos.

Tabla 11. Principales cambios comportamentales en los diferentes tratamientos y porcentaje de peces que lo presentaron.

Cambios comportamentales	Trat. 1 (%)	Trat. 2 (%)	Trat. 3 (%)	Trat. 4 (%)	Trat. 5 (%)	Trat. 6 (%)	Trat. 7 (%)
Movimientos mínimos.	0	100	100	0	100	0	100
Nado en la superficie.	0	0	50	0	50	0	0
Nado en el fondo	0	50	0	0	0	0	30
Giro sobre su propio eje.	0	0	0	50	0	0	0
Nado errático.	0	0	0	80	0	100	0
Perdida del eje de nado.	0	0	0	50	100	100	0
Nado boca arriba.	0	0	0	0	100	100	0
Peces agonizando.	0	0	0	0	100	100	0
Boqueo	0	0	0	0	50	80	0

Se observó una marcada reducción en la actividad de nado acompañada de movimientos mínimos en la mayoría de los tratamientos (tratamiento 2, 3, 5 y 7) en los que se aplicó el Gramoxone[®], observándose mayor disminución de movimiento en los tratamientos en los que se aplicó mayor cantidad de Gramoxone[®].

A su vez, la pérdida del eje de nado fue claramente visible en los tratamientos 4, 5 y 6, presentándose 15 minutos después de la aplicación del herbicida, inclinándose con la cabeza hacia abajo y en algunas ocasiones girando sobre su propio eje.

La alteración de nado en el estrato basal de la columna de agua fue presentada en los tratamientos 2 y 7 en las que se aplicó 1 ppm y 30 ppm de Gramoxone[®], la muerte de los peces fue menor pasadas 12 h de la aplicación.

Los peces presentaron boqueo en los tratamientos 5 y 6 (mayores aplicaciones de Gramoxone[®]), este cambio comportamental se presentó 15 minutos después de la aplicación del herbicida, demostrando una posible limitada toma de oxígeno luego de la aplicación de grandes cantidades de este producto.

Los peces de los tratamientos 5 y 6 pasados 30 minutos de la aplicación del Gramoxone[®] empezaron a nadar boca arriba y a permanecer inmóviles por un tiempo prolongado, y repentinamente presentaban movimientos bruscos que les permitían incorporarse nuevamente. Luego de 45 minutos la totalidad de los organismos empezaron a agonizar y empezaron a morir cumplida la hora de la aplicación del herbicida.

5.3 ALTERACIONES HISTOLÓGICAS.

5.3.1 Hígado.

En el hígado se hallaron grandes diferencias entre el control y los demás tratamientos en los que se aplicó el Gramoxone[®], acentuándose las lesiones en las concentraciones más altas (Tabla 12).

Luego de las 96 h de exposición el hígado de los organismos control mostró una arquitectura uniforme; los hepatocitos presentaron citoplasma homogéneo y núcleos

esféricos de gran tamaño, además de su citoplasma granular. El parénquima hepático se caracterizó por una eosinofilia moderada generalizada, y presencia de algunas células mononucleares asociadas a las sinusoides; las cuales son análogas a las células de Kupffer en mamíferos, estas se encuentran adheridas al endotelio (Figura 4).

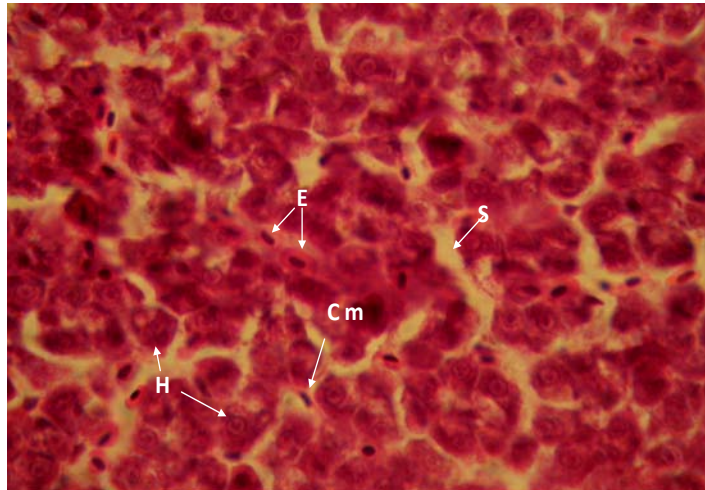


Figura 4. Hígado de Rodostomo (*H. rodosthomus*) no expuesto a Gramoxone® (grupo control). H, hepatocitos con apariencia normal; Cm, células mononucleares asociadas a las sinusoides; S, Sinusoides. E, eritrocitos. Aumento 1020x. H&E.

En los hígados del tratamiento 2 (1 ppm) el parénquima hepático de los peces expuestos al paraquat mostró poca eosinofilia aun cuando se presentó un incremento de la vacuolización citoplasmática. Se observó congestión multifocal así como presencia de anisocitosis de los hepatocitos caracterizada por hipertrofia, encontrándose células de mayor tamaño y diferencias marcadas entre ellas (Figura 5).

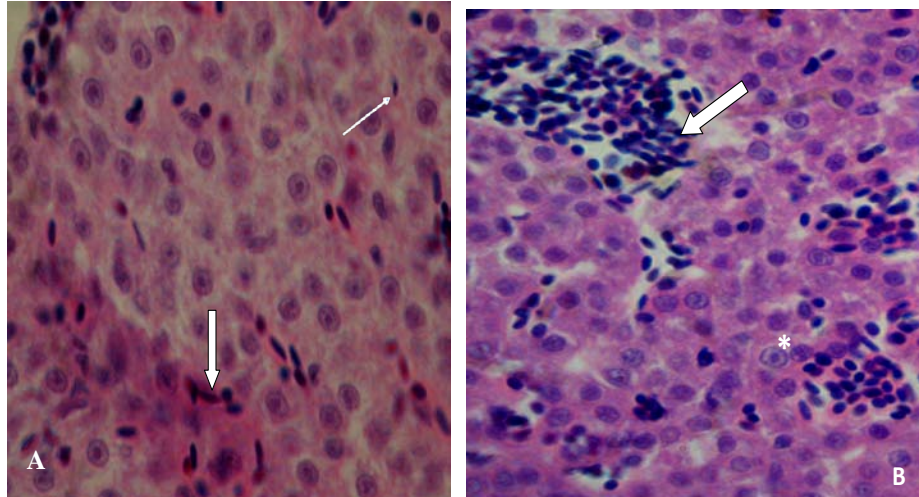


Figura 5. Hígados de Rodostomos (*H. rodosthommus*) tratados con 1 ppm de Gramoxone®. A. Eritrocito (flecha gruesa); célula mononuclear, (flecha delgada). Aumento 1300x. H&E B. congestión, (flecha gruesa); Anisocitosis de los hepatocitos caracterizado por hipertrofia frecuente, (*). Aumento 1020x. H&E.

En los hígados del tratamiento 3 (15ppm) se observó congestión en varias regiones del parénquima hepático, y un aumento en la vacuolización citoplasmática e infiltración de células mononucleares. En el tejido de este tratamiento se observó dilatación de los espacios vasculares de las sinusoides, aumentándose el estrecho espacio perisinusoidal (Figura 6).

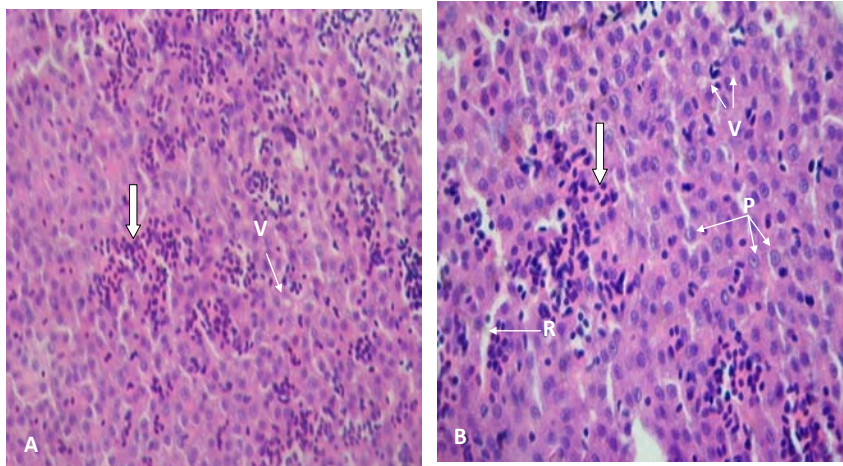


Figura 6. Hígado de Rodostomo (*H. rodostomus*) tratados con 15 ppm de Gramoxone®. A. infiltración de células mononucleares, (flecha gruesa); Vacuolización hialina, (V). Aumento 100x. H&E B. infiltración, (flecha gruesa); dilatación de los espacios vasculares de los sinusoides, (R); Picnosis nuclear y Anisocariosis (P); Vacuolización hialina, (V). Aumento 1020x. H&E

Los hígados del tratamiento 4 (45ppm) presentan varias características anteriores como individualización de los hepatocitos y la presencia de núcleos irregulares, pero es notoria una dilatación severa de los espacios vasculares de las sinusoides, y por ende una individualización mayor de los hepatocitos, además de una marcada congestión (Figura 7).

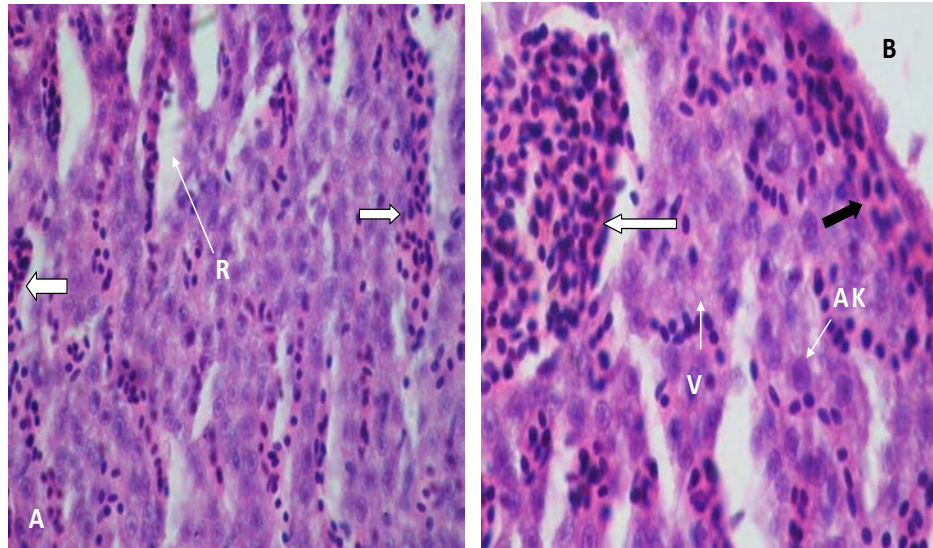


Figura 7. Hígados de Rodostomos (*H. rodostomus*) tratados con 45 ppm de Gramoxone®. A. dilatación de los espacios vasculares de los sinusoides, (R); infiltración de hematíes, (flechas gruesas). Aumento 1020x. H&E B. congestión severa, (flecha gruesa); congestión severa, (flecha gruesa negra); Vacuolización hialina, (V); Anisocariosis, (AK). Aumento 1300x. H&E

En el tejido hepático del tratamiento 5 (70ppm) se observaron focos circunscritos de células inflamatorias en áreas cercanas a necrosis. Algunas regiones se encontraron rodeadas por infiltrados inflamatorios crónicos, y presencia de hemorragia. Fue posible la observación de células granulares eosinófilas dispuestas de forma dispersa por todo el tejido parenquimatoso (Figura 8).

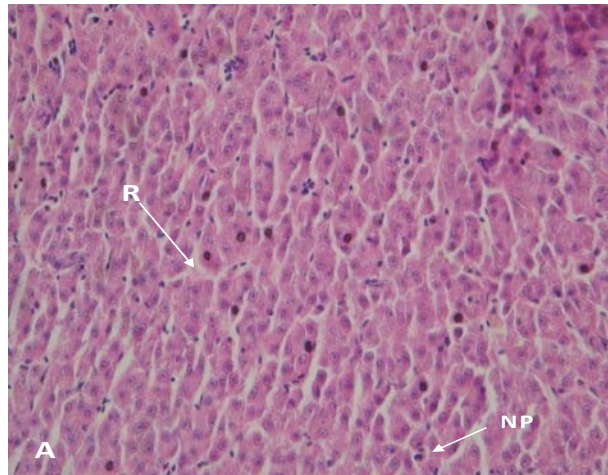


Figura 8. Hígado de Rodostomo (*H. rodosthommus*) tratados con 70 ppm de Gramoxone®. A. núcleo picnotico, (NP); dilatación de los espacios vasculares de las sinusoides, (R). Aumento 100x. H&E.

El tejido hepático del tratamiento 6 (150 ppm) presentó cada una de las lesiones descritas anteriormente, pero en un grado mayor de severidad, ya que se observaron mayor cantidad de células mononucleares. Se pudo observar variaciones en el núcleo de los hepatocitos tales como picnosis, cariopsis y cariólisis. Además dilatación excesiva de los espacios vasculares de las sinusoides (Figura 9).

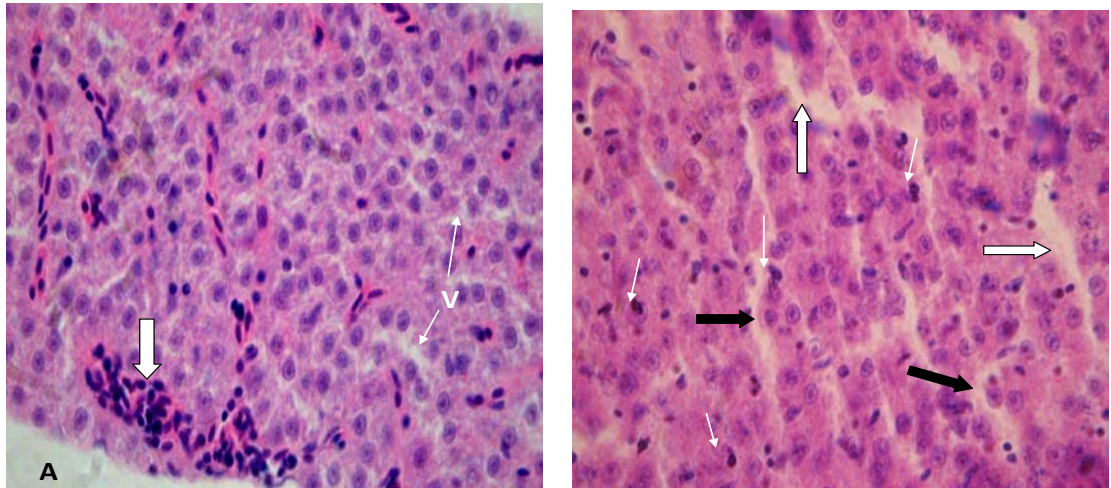


Figura 9. Hígado de Rodostomo (*H. rodostomus*) tratados con 150 ppm de Gramoxone®. A. Vacuolización, (V); infiltración severa de mononucleares, (flecha gruesa); Aumento 1020x. H&E B. congestión, (flechas individuales); dilatación de los espacios vasculares de los sinusoides, (flechas gruesas blancas); individualización de hepatocitos y núcleos irregulares por anisocariosis, (flechas negras). Aumento 1020x. H&E

En el tratamiento 7 (30ppm) se observó vacuolización leve citoplasmática, se observó necrosis al presentarse núcleos picnóticos de los hepatocitos, y presencia de células eosinófilas y macrófagos agregados (Figura 10).

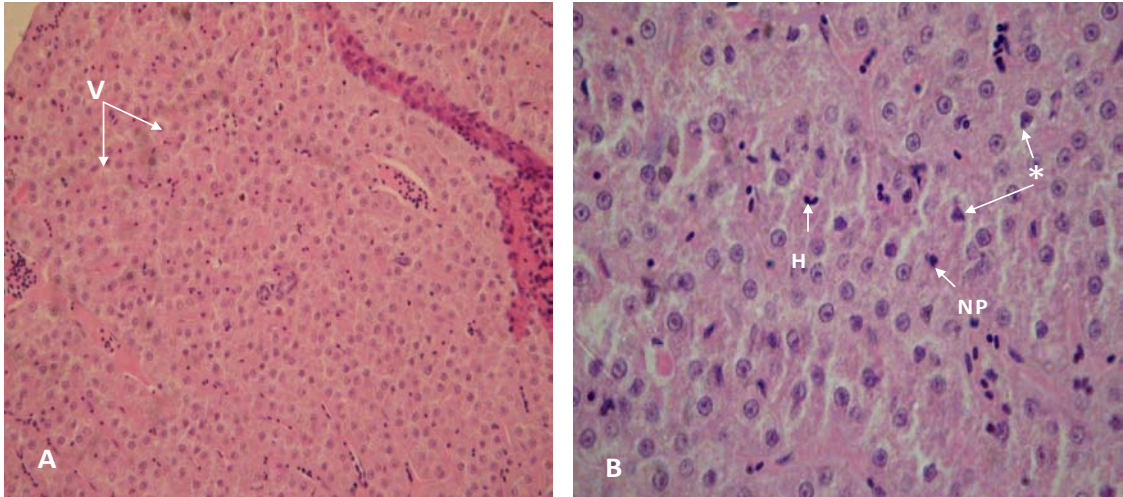


Figura 10. Hígado de Rodostomo (*H. rodosthommus*) tratado con 30 ppm de Gramoxone[®]. A. Vacuolización, (V); Aumento 100x. H&E B. hematie, (H); núcleos picnoticos, (NP); Cariolisis, (*). Aumento 1020x. H&E.

5.3.2 Branquias.

El estudio histológico de las branquias mostró diferencias morfológicas entre el tratamiento control y los tratamientos expuestos al Gramoxone[®] (Tabla 13), ya que pasadas las 96 h de exposición las branquias de los organismos control no presentaron cambios en su estructura, siendo morfológicamente similares a lo descrito para peces teleósteos. Estas presentaban dos hileras de filamentos de las que surgen perpendicularmente las lamelas, encontrándose revestidas por un epitelio escamoso compuesto por células indiferenciadas. Entre las lamelas los filamentos se encuentran alineados por epitelio estratificado denso y constituido por varios tipos celulares como células compatibles con células de cloro, células mucosas y pavimentosas (Figura 11).

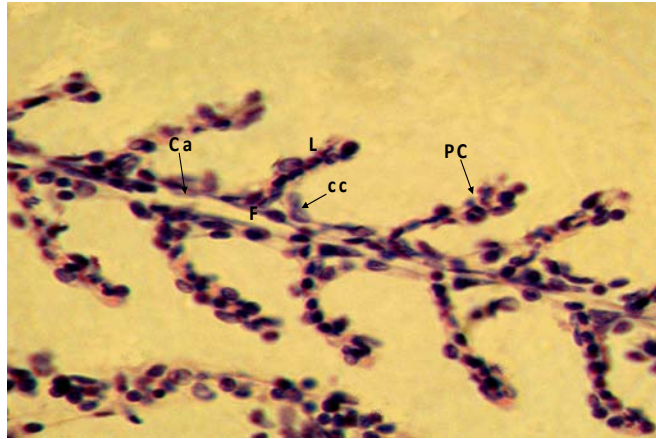


Figura 11. Lámelas y filamentos branquiales de Rodostomos (*H. rodosthomus*) no expuestos a Gramoxone® (Grupo control). L, lámelas; F, Filamentos; Ca, Cartílago central; cc, células compatibles con células de cloro; PC, pilar celular. Aumento 1620x. H&E.

Las branquias del tratamiento 2 (1ppm) mostraron alteraciones histomorfologicas como: levantamiento del epitelio de las lamelas, hiperplasia e hipertrofia de las células epiteliales (Figura 12).

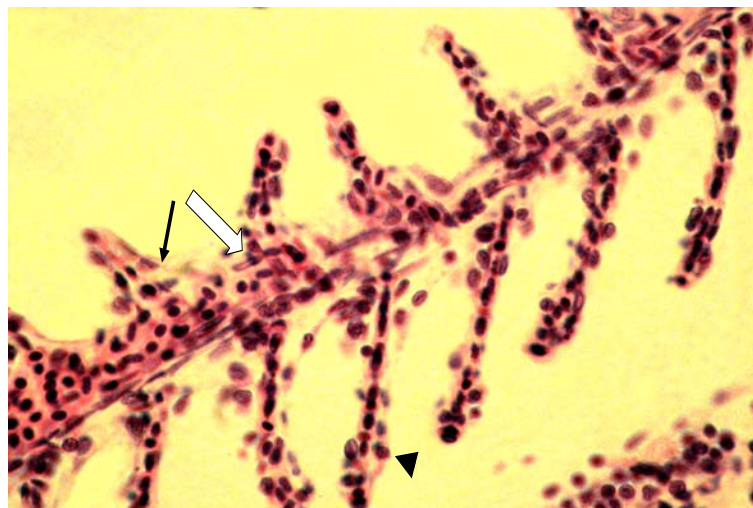


Figura 12. Branquia de Rodostomo (*H. rodosthomus*), tratada con 1 ppm de Gramoxone®. Desprendimiento epitelial lamelar, (flechas); hiperplasia de las células epiteliales (flecha gruesa). Hipertrofia de células epiteliales (Cabeza de flecha) Aumento 1020x. H&E.

Se identificaron alteraciones de las branquias del tratamiento 3 (15ppm) tanto a nivel celular del filamento branquial donde se observa daño en las lámelas y fusión de las mismas, hiperplasia focal lamelar, desorden lamelar y hemorragias. También se observaron lesiones en la porción final del filamento, donde fue común la hipertrofia (Figura 13).

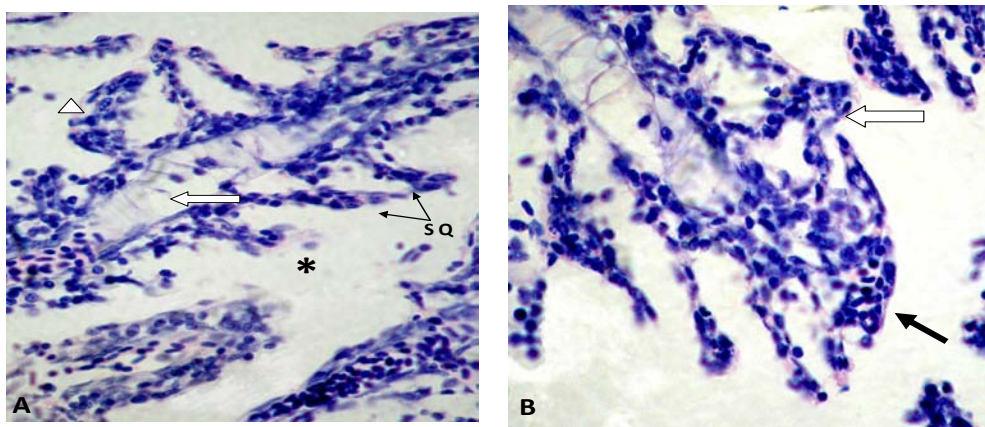


Figura 13. Branquias de Rodostomo (*H. rodostomus*), tratado con 15ppm de Gramoxone®. A. hipertrofia (puntas de flechas); ruptura del epitelio con hemorragia (*); sinequia lamelar, (SQ); Cartilago de tipo hialino (flecha gruesa). Aumento 1020x. H&E B. fusión lamelar (flecha gruesa blanca); hiperplasia, (flecha negra). Aumento 1300x. H&E.

En las branquias del tratamiento 4 (45 ppm) además de presentarse las lesiones descritas en los tratamientos anteriores, se observaron hemorragia, básicamente como una reacción inflamatoria. Se presentó congestión sanguínea, separación epitelial en las lamelas, Fusión lamelar y congestión moderada (Figura 14).

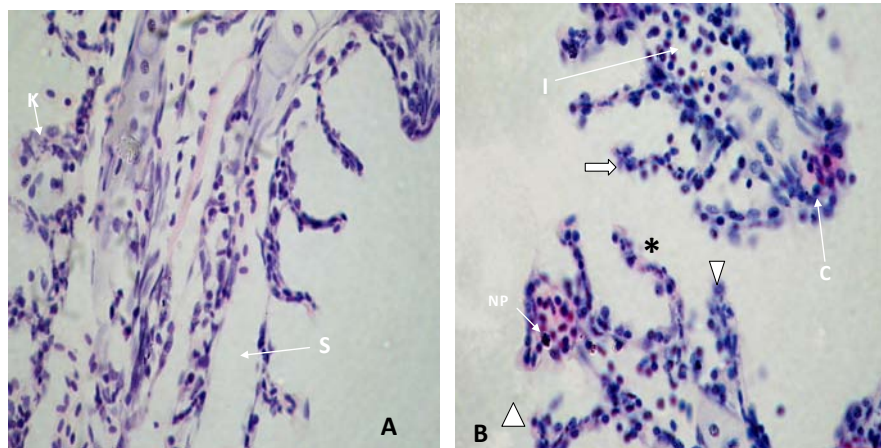


Figura 14. Branquias de Rodostomo (*H. rodosthommus*) tratadas con 45 ppm de Gramoxone®. A. cariorresis, (K); Desprendimiento epitelial, (S); Aumento 1020x. H&E B. Núcleos picnoticos, (NP); Sinequia lamelar, (flecha gruesa); hiperplasia, (puntas de flecha); desorden lamelar, (*); infiltración, (I); congestión moderada, (C). Aumento 1020x. H&E

En las branquias del tratamiento 5 (70 ppm) se observaron las mismas lesiones descritas en los anteriores tratamientos, pero el grado de severidad fue mayor, ya que se observó necrosis de forma masiva alrededor del tejido, se observaron aneurismas e hiperplasia lamelar (Figura 15).

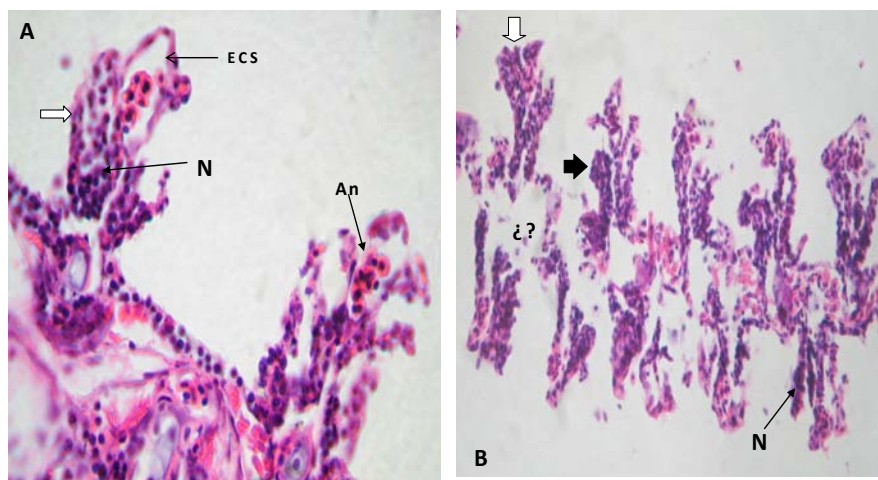


Figura 15. Branquias de Rodostomo (*H. rodosthommus*) tratadas con 70 ppm de Gramoxone®. A. separación capilar epitelial, (ECS); Aneurisma, (An). Necrosis, (N). Aumento 1300x. H&E B. fusión lamelar, (flecha gruesa); hiperplasia, (flecha negra); necrosis, (N). Aumento 100x. H&E.

En las branquias del tratamiento 6 (150 ppm) se observó mayor severidad de las lesiones, y predominaron la fusión lamelar y necrosis del filamento y las lamelas. Aumentaron las infiltraciones de leucocitos alrededor de las lesiones, además de que se observó la presencia de macrófagos agregados como respuesta a la necesidad de fagocitosis de sustancias extrañas e infecciosas o por posibles procesos de reparación (Figura 16).

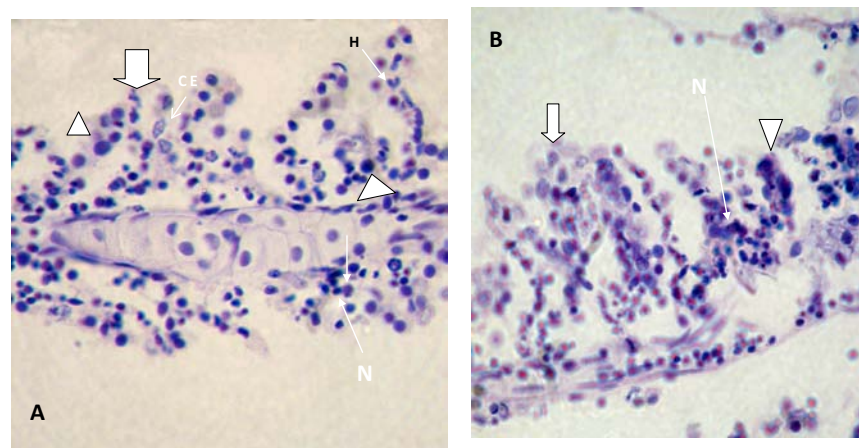


Figura 16. Branquia de Rodostomo (*H.rodostomus*) tratados con 150 ppm.

A. fusión lamelar, (flecha grande); hematie, (H); anisocitosis, (puntas de flechas); necrosis, (N); Células granulares eosinófilicas degranuladas, (CE). Aumento 1020x. H&E B. fusión lamelar, (flechas gruesas); necrosis, (N); macrófagos agregados, (puntas de flechas). Aumento 1020x.

H&E

Las branquias del tratamiento 7 (30 ppm) mostraron desprendimiento epitelial lamelar, hiperplasia e hipertrofia de las células de las lamelas, este tratamiento presento branquitis severa con infiltración mononuclear (Figura 17).

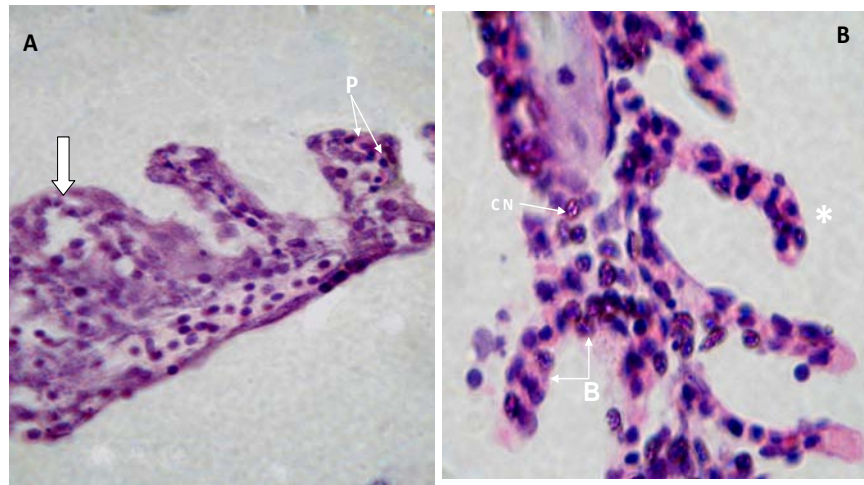


Figura 17. Branquia de Rodostomo (*H. rodosthommus*) tratados con 30 ppm de Gramoxone[®]. A. fusión lamelar, (flecha gruesa); Células picnoticas, (P); Aumento 1020x. H&E B. neutrófilo, (CN); hipertrofia, (*); Branquitis severa con infiltración mononuclear, (B). Aumento 1020x. H&E.

Tabla 12. Resultados de cambios histopatológicos en hígado de *Hemigrammus rhodostomus* sometidos a varias concentraciones de Gramoxone® (paraquat a 96h)

TRATAMIENTOS (concentraciones ppm)	Horas de observación	Necrosis de hepatocitos	Vacuolización	Dilatación espacios vasculares	Hemorragias	Macrófagos agregados	Infiltración de Leucocitos
control	96	-	-	-	-	-	-
1	96	+	-	+	-	-	+
15	96	+	+	+	+	-	+
30	96	+	+	+	+	+	-
45	24	+	++	+++	+	-	++
70	24	++	+	+++	+++	+	++
150	24	+	+	+++	+++	++	++

Ausente: -, leve: +; moderado: ++; severo: +++

Tabla 13. Resultados de cambios histopatológicos en branquias de *Hemigrammus rhodostomus* sometidos a varias concentraciones de Gramoxone® (paraquat) a 96h.

TRATAMIENTOS (concentración ppm)	Horas de observación	Fusión lamelar	infiltración	Hemorragia	Hiperplasia	Hipertrofia	Necrosis
Control	96	-	-	-	-	-	-
1	96	-	-	-	-	+	-
15	96	+	-	+	+	+	-
30	96	+	-	-	+	+	-
45	24	+	+	+	-	-	+
70	24	+++	++	+++	+	-	++
150	24	+++	++	+++	-	+	++

Ausente: -, leve: +, moderado: ++, severo: +++

DISCUSIÓN

6.1 DETERMINACIÓN DE LA CL₅₀.

El cálculo estimado de CL₅₀ de Gramoxone® a 96 h fue 32,83 ppm, siendo los límites de confianza inferior y superior 28,01 ppm y 38,49 ppm respectivamente, para Rodostomo. Este valor es alto comparado con el CL₅₀ de tres especies de peces ornamentales (*Poecilia mexicana*, 12,0 ppm; *Poecilia reticulata*, 15,0-22,0 ppm y *Lepomis macrochirus*, 13,0 ppm) descritos por Ronald (1990), a pesar que era de esperarse que por sus características similares (morfología y tamaño corporal) el porcentaje de mortalidad fuera cercano al de Rodostomo, este pez presentó un valor mayor, según Lech and Bend, (1980), la mortalidad de los peces va a estar influenciada y determinada por: la concentración del contaminante químico, el tamaño, salud de los organismos y el tiempo de exposición a éste, demostrando que estas características son factores determinantes de la toxicidad y mortalidad de los peces (Eissa *et al.*, 2006).

Se registró la mortalidad de 5 individuos control (sin exposición al herbicida), lo cual no interfiere con el resultado arrojado por el programa trimmed Spearman-Kärber. La mortalidad en este tratamiento se evidenció en la réplica, concluyéndose que uno de los factores causales fue la presencia de agresividad y la competencia intraespecífica por la diferencia entre los tamaños de los mismos, observándose mordeduras en las aletas y otras partes del cuerpo. Aunque los individuos se extrajeron y se agregaron al acuario de forma aleatoria, el tamaño de los peces no era completamente homogéneo (variaciones de más de 5 mm), en especial en la réplica de este control. Este comportamiento agresivo es muestra de defensa territorial y reproductiva, ya que individuos de mayor tamaño incrementan los ataques a los de menor tamaño para tener acceso a las hembras del acuario (Audesirk *et al.*, 2003). Se logró observar hembras cargadas en el momento de la disección, demostrando que los ataques violentos en este tratamiento se incrementaron por reproducción y cuidado de las hembras en puesta.

En la concentración de 1 ppm, la mortalidad al término del ensayo fue del 12,48% (3 individuos) iniciando la mortalidad de los organismos pasadas 36 h del ensayo, en tanto que el tratamiento 3 alcanzó un valor de 37,44% (9 individuos) al finalizar el ensayo. Los individuos expuestos a los tratamientos de mayor concentración presentaron mortalidad

en las primeras horas de exposición concordando con lo descrito en la literatura (Parma de Croux., *et al* 1999).

El tratamiento 7 presentó un porcentaje de mortalidad de 4,16% (1 individuo), este pez murió a las 72 h de la aplicación del tóxico, aunque en el momento del ensayo se valoró ésta concentración como la más cercana a la CL₅₀ por su valor intermedio y mortalidad total de los individuos sometidos al tratamiento con 45 ppm, este tratamiento se inicio 48 h después de los tratamientos 1 al 6 con la dieta normal que traía el grupo en el acuario de aclimatación lo que les permitió desarrollarse mejor, obteniendo mayor tamaño y masa muscular, encontrándose que mientras los individuos de los demás tratamientos tuvieron una longitud promedio de 2,4 cm, el tratamiento 7 tuvo un promedio de 3,1 cm; al mismo tiempo este ultimo tratamiento presentó una marcada diferencia con las mortalidades presentadas ya que según Díaz *et al.*, (2004) y Omitoyin *et al.*, (2006) la respuesta de un organismo a una sustancia tóxica va a estar influenciada por factores como la edad (mayor sensibilidad de individuos jóvenes al compuesto), la dieta (animales mejor alimentados brindan respuestas más consistentes) y la densidad poblacional y estrés (organismos alterados o presionados son más sensibles). Atribuyéndose la sobrevivencia de los individuos del tratamiento 7 a mayor resistencia a la concentración del paraquat por su mayor tamaño otorgado por su alimentación y aclimatación prolongada.

6.2 CAMBIOS COMPORTAMENTALES.

Las principales alteraciones comportamentales observadas fueron: movimientos mínimos, nado irregular, hiperventilación, pérdida del eje de nado y boqueo en los peces desde la concentración de 1 ppm hasta la de 150 ppm de paraquat. Dichas alteraciones concuerdan con las citadas por otros autores, en juveniles de "pacu" (*Piaractus mesopotamicus*) (Parma de Croux *et al.*, 1999) y catfish (*Clarias gariepinus*) (Omitoyin *et al.*, 2006) en concentraciones de 29,3 ppm y 18 ppm respectivamente de paraquat durante un periodo de 72 h. A partir de la concentración de 70 ppm los organismos permanecieron en la superficie boqueando como resultado de una dificultad para obtener suficiente oxígeno, como respuesta a lesiones branquiales y un índice de estrés que tienen los peces cuando se encuentran en un entorno desfavorable, tal como lo reporta Parma de Croux *et al.*, (1999) siendo este un intento por una mayor compensación de oxígeno a causa de la deficiencia branquial.

Una de las alteraciones comportamentales más marcadas fue el cuadro de hiperexcitación que presentaron los individuos expuestos a 30, 45, 70 y 150 ppm y que se caracterizaron por un incremento brusco en sus movimientos, visto como un intento para escapar del tóxico, lo que hizo que se fatigaran y minimizaran sus movimientos, disminuyendo su nado y permaneciendo en un letargo en el fondo del acuario. La combinación de los efectos de fatiga y el efecto tóxico directo del paraquat en los tejidos de los peces condujeron a la muerte de estos, siendo estos signos de toxicosis, los cuales han sido referenciados por Babatunde *et al.*, (2000), demostrando la intoxicación a causa del contacto con el contaminante.

6.3 ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN BRANQUIAS.

Los peces expuestos al Gramoxone® (paraquat) mostraron: levantamiento epitelial, hiperplasia, desorden lamelar, congestión, fusión lamelar, edemas, branquitis, hemorragias, necrosis, hipertrofia y presencia de macrófagos agregados, acorde con lo reportado por Babatunde *et al.*, (2000) en peces de la especie *Oreochromis niloticus* expuesta a 12 ppm de Gramoxone a 96 h, Evans (1987) en *Oncorhynchus kisutch* sometidas a 100 ppm de paraquat por 120 h, Omitoyin *et al.*, (2006) en la especie *Clarias gariepinus* (18 ppm a 96 h) y Sinhaseni and Tesprateep (1987) en peces *Puntius gonionotus* (4 ppm a 48 h).

Mallat (1985 citado por Velasco & Cruz, 2008) concluyó que las más comunes lesiones en las branquias inducidas por contaminantes químicos y sustancias tóxicas son necrosis, hiperplasia, hipertrofia y ruptura del tejido epitelial de las branquias, fusión lamelar y alteración de las células de cloro. En el presente estudio, el daño severo en el epitelio de las branquias de los peces expuestos a altas concentraciones del paraquat (45, 70 y 150 ppm) fue conducido por la hipoxia lo que luego los llevó a la muerte (Velasco & Cruz, 2008). Olurin *et al.* (2006) concluyeron en *Clarias gariepinus* que hay un incremento de la superficie branquial y la afinidad de la hemoglobina al oxígeno como respuesta adaptativa a la hipoxia.

En las branquias expuestas a una concentración de 15 ppm muestran formación de edemas en el epitelio del filamento, caracterizándose por espacios incoloros en esta región. Estudios realizados en organismos acuáticos con exposición a metales pesados han indicado que esta es una de las lesiones más frecuentes, al igual que el

levantamiento del epitelio lamelar, las cuales se han descrito como mecanismos de defensa, permitiendo un incremento en la distancia del tejido con el contaminante (Figueiredo *et al.*, 2006; Parma de Croux *et al.*, 1999). A pesar de que estas lesiones se han reportado en ensayos con otros contaminantes como metales pesados y cobre, se ha observado coincidencia en las alteraciones expuestas al paraquat en este tratamiento.

Por otra parte, fue posible observar fusión entre las lamelas secundarias en algunas regiones, hiperplasia de células epiteliales y desorden lamelar, como una respuesta a la presencia de agentes irritantes, permitiendo ser un mecanismo que limita la difusión del tóxico hacia la circulación sanguínea (Sinhaseni y Tesprateep, 1987). Velmurugan *et al.* (2007) reportaron levantamiento epitelial, hipertrofia, edemas intraepiteliales, necrosis y fisión de las lamelas secundarias adyacentes en las branquias de peces de la especie *Cirrhinus mrigala* expuestos a concentraciones de 0,3 ppb y 0,6 ppb del pesticida lambda-cyhalothrin por 10 días, demostrando como las branquias son buenos indicadores de la contaminación ambiental, al ser el agua una entrada fácil de contaminación por productos químicos.

Ramírez *et al.* (2009) exponen que cuando la hiperplasia lamelar no se genera de una manera rápida para salvaguardar las lamelas, el epitelio lamelar se fusiona y forma una barrera entre el plasma y el agua, mecanismo que provoca una reducción de la superficie lamelar, lo que genera condiciones hipóxicas en los peces las cuales han sido reportadas por Velasco *et al.* (2006). Estas lesiones corresponden con las citadas por Hirt y Dromitrovic, (2000) en peces *Aequidens portalegrensis* expuestos a cloruro de cadmio (20, 40 y 60 ppm por 96 h) en donde se evidenció hiperplasia, hipertrofia y fusión lamelar.

Bhavan & Geraldine (2000 citado por Eslava *et al.*, 2007) han reportado que el desprendimiento lamelar y la fusión lamelar puede llegar a ser una adaptación fisiológica que emplean los peces para disminuir el área superficial con el objetivo de seguir manteniendo sus funciones osmorreguladoras.

En las branquias, se encontraron lesiones que se asemejan a las encontradas por Omitoyin *et al.* (2006) como son: necrosis, hemorragias y presencia de macrófagos agregados, este ensayo se aplicó en la especie *Clarias gariepinus* al ser sometidos a 29,3 y 18 ppm de paraquat a 72 h. Esto corrobora que el daño que ejerce el paraquat en

este órgano genera extravasación de hematíes, y daño de las principales células epiteliales de las branquias.

En los tratamientos en los que se aplicó mayor cantidad de Gramoxone® se observó la presencia de hemorragias y aneurismas las cuales pueden ser ocasionadas por un aumento en la presión venosa y el efecto irritante del herbicida sobre el pilar celular lamelar y los senos venosos lamelares (Abel, 1976; Stangg & Shuttleworth, 1986 citado por Ramírez *et al.*, 2009). En un estudio realizado en la Universidad de los llanos en *Piaractus brachypomus* expuestos a glifosato se observó necrosis lamelar, la cual coincide con este estudio, los autores atribuyen esta lesión a una respuesta a la acción citotóxica del químico resultado de una alteración y desnaturalización de las proteínas de la membrana plasmática (Eslava *et al.*, 2007).

Algunas de las lesiones anteriormente reportadas coinciden con las citadas en otros ensayos histológicos con paraquat, mientras que otras como la presencia de edemas y levantamiento epitelial se han reportado en ensayos con otros contaminantes como: sulfato de cobre, contaminantes urbanos, surfactante cosmoflux 411f y Glifosato, demostrando que las lesiones son mecanismos de defensa, ante la amenaza de contaminantes (Ramírez *et al.*, 2009). La presencia de estas lesiones llega a generar graves inconvenientes en la excreción de compuestos tóxicos, respiración y otra serie de procesos fisiológicos que conllevan a la muerte de los individuos (Eslava *et al.*, 2007).

6.4 ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN HÍGADO

Los peces tratados con paraquat, mostraron alteraciones del parénquima hepático como: vacuolización, hipertrofia, anisocitosis, congestión, dilatación de los espacios vasculares de las sinusoides, hemorragia y presencia de macrófagos agregados, coincidiendo con lo reportado por Omitoyin *et al.* (2006); Parma de Croux *et al.* (1999), y lo citado por Velmurugan *et al.* (2007) en *Cirrhinus mrigala* al ser expuestos al pesticida lambda-cyhalothrin (0,3 ppb y 0,6 ppb).

En todos los tratamientos expuestos a paraquat se observaron alteraciones en el tamaño de los hepatocitos, como hipertrofia y anisocitosis en las que se detecta un incremento anormal en el tamaño de los hepatocitos, coincidiendo con la afirmación de Figueiredo *et al.* (2006) quien lo reporta como un posible incremento en el contenido lipídico, lo cual

pudo deberse a alteraciones en la síntesis de lipoproteínas necesarias para la correcta eliminación y transporte de lípidos desde los hepatocitos. En los tratamientos de concentraciones más altas (45 ppm, 70 ppm y 150 ppm), se observaron tamaños y formas anormales en los núcleos de los hepatocitos, descritos por este autor como una actividad metabólica consecuencia de la presencia de un contaminante.

Se observó un aumento en la presencia de vacuolas en el interior de los hepatocitos, las cuales se atribuyen a un alto contenido lípidico y procesos degenerativos como respuesta a un daño metabólico coincidiendo en este aspecto con los planteamientos de Camargo y Martínez, 2007 y Figueiredo *et al.*, 2007. Ramírez *et al.*, (2009) expresan que la vacuolización lipídica puede ocurrir como una respuesta estratégica fisiológica para almacenar xenobióticos liposolubles, con el propósito de disminuir su disponibilidad.

Las alteraciones del parénquima hepático como necrosis, congestión y aumento en los macrófagos agregados y células granulares eosinófilas, son resultado de una asociación a lesiones degenerativas necróticas, las cuales responden a un proceso de biotransformación (Mishra y Mohanty, 2008), en este caso del paraquat. Un estudio de Jiraungkoorskul *et al.* (2002) con la especie *Oreochromis niloticus* expuesta a 36 ppm de Roundup® a 96 h, coincide con este ensayo en la presencia de necrosis focal, picnosis, cariorrésis, cariólisis e incremento del tamaño de los hepatocitos, describiendo que la presencia de estas lesiones se encuentran relacionadas con cambios degenerativos frecuentes, en los que se encuentra la degeneración hidrópica ocurrida por la hipoxia inducida por las lesiones branquiales.

Se observó la dilatación de los espacios vasculares de las sinusoides, siendo parte de una lesión del parénquima hepático del hígado de los Rodostomos, esta lesión no se encuentra reportada en ningún trabajo de exposición a paraquat en peces. Velmurugan *et al.* (2007) en peces de la especie *Cirrhinus mrigala* expuestos al pesticida lambda-cyhalothrin (0,3 y 0,6 ppb); Mishra y Mohanty, (2008) en peces de agua dulce *Channa punctatus* expuestos a cromo hexavalente ($K_2Cr_2O_7$) (41,75 ppm) explicando esta alteración como un incremento hepático del espacio sinusoidal y viéndose un daño moderado luego de 40 ppm de este tóxico, y Oliva *et al.* (2009) en peces *Solea senegalensis*, los cuales reportaron esta alteración como una de las principales lesiones en hígado de peces al ser expuestos a contaminantes tóxicos.

El aumento en la densidad de los macrófagos agregados es considerada como una lesión importante que se asocia con una reducción de la capacidad de bioreparación hepática, ya que su incremento es relacionado con la necesidad de biotransformar material exógeno que coincide con el reporte de Figueiredo *et al*, (2007). A medida que se incrementó la concentración de exposición a paraquat se aumento la densidad de melanomacrofagos agregados, según Camargo y Martínez (2007) se ha sugerido su relación con la destrucción de componentes endógenos y exógenos.

CONCLUSIONES

- El valor de la CL₅₀ o concentración letal del 50% de la población en 96 horas para el herbicida Gramoxone® (paraquat) es 32,83 ppm, con unos límites de confianza (límite inferior de 28,01 ppm, límite superior de 38,49 ppm), siendo este valor menor a la concentración parámetro que tiene la casa comercial para peces (trucha arco iris: CL₅₀ 96 horas 55 mg/l), demostrando la susceptibilidad que tiene el Rodostomo y otras especies al momento de las aplicaciones de paraquat a cultivos cercanos a sus hábitats.
- Este trabajo al igual que otros realizados con contaminantes sobre cuerpos de agua, demostró como la histopatología puede ser usada como un biomarcador de la contaminación ambiental.
- Las branquias son los órganos que más daños histopatológicos presentan por su exposición y contacto directo con herbicidas, ya que la entrada de los compuestos xenobioticos a diferencia de otros órganos no es a través del torrente sanguíneo.
- La exposición de *H. rhodostomus* a paraquat causa alteraciones histopatológicas en tejido hepático y branquial por su alta toxicidad.
- Las lesiones histopatológicas encontradas en las branquias de los diferentes tratamientos aplicados en este trabajo, guardan relación con las alteraciones respiratorias observadas como el boqueo.
- Aunque las alteraciones en el tejido hepático no se detectaron de manera macroscópica, histológicamente se muestra lesión en los hepatocitos demostrando el daño que el paraquat ejerce sobre el hígado de los rodostomos.
- El paraquat es un producto que aunque se han desarrollado varias investigaciones y pruebas que demuestran su alta toxicidad y peligro hacia la fauna, no se ha conseguido leyes que regulen su distribución y uso.

- Los organismos del tratamiento 5 y 6 fueron los más afectados por las altas concentraciones del herbicida, ya que casi todos los peces mostraron la totalidad de los cambios comportamentales y lesiones histológicas, demostrando que a medida que se aumenta la concentración del paraquat, incrementan las lesiones y daños.
- Al comparar los daños provocados por el herbicida paraquat en seres humanos (Salguero *et al.*, 2005) y los observados en este estudio, se puede ver como las lesiones en el endotelio tienen un papel importante de la lesión hepatotóxica producida por este.

RECOMENDACIONES

- Es de vital importancia seguir llevando a cabo ensayos de toxicidad en organismos acuáticos que habiten cuencas cercanas en donde se aplican concentraciones de paraquat y otros herbicidas, para incrementar la cantidad de referencias que demuestren las implicaciones degenerativas que este producto tiene sobre la biota acuática.
- Es necesario realizar más estudios en peces ornamentales, por su valor económico para el país y su importancia al ser un recurso biológico. Además que muchas especies afectadas hacen parte de organismos endémicos Colombianos.
- Verificar antes del ensayo el tamaño de los peces que van a ser expuestos al producto químico, ya que este factor va a determinar tanto la mortalidad como la competencia intraespecifica entre los individuos.
- Al realizar los ensayos con productos tóxicos se debe tener en cuenta una correcta manipulación, ya que estos compuestos son altamente cancerígenos y su contacto puede provocar efectos letales o indeseables.
- Evaluar diferentes tipos de tinciones que permitan un mayor reconocimiento de las lesiones provocadas por el tóxico.
- Es necesario realizar más estudios en peces ornamentales, por su valor económico para el país y su importancia al ser un recurso biológico.
- Realizar un análisis de agua de las cuencas donde son extraídos los Rodostomos, para saber qué cantidad está llegando a estas.

BIBLIOGRAFIA

1. Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR). 2005. Estudio De Sustancias Toxicas. Módulo IV. Department Of Health And Human Services. Atlanta. www.atsdr.cdc.gov/es.
2. Alström, S. 2003. Fundamentals of weed management in hot climate peasant agriculture. Universal Scientific Pub., pág. 271.
3. Angulo, N. Y. 2003. Intoxicación por paraquat. Universidad de Antioquia. <http://www.laboratoriosamerica.com.co/medicosenlinea/curso2003/descargas/Paraquat.doc>
4. Audersik, T., Audersik, G., y Byers, B. E. 2003. Biología la vida en la tierra. Comportamiento animal. Sexta edición. Pearson Educación, México. Pág 774.
5. Ávila, M., y Guzmán, P. 2000. Proyecto De Tecnología En Saneamiento Ambiental. Facultad De Medio Ambiente. Universidad Distrital Francisco José De Caldas. www.udistrital.edu.co/portal/documentos/publicaciones
6. Babatunde, M. M., Oladimeji A.A., and Balogun, J. K. Acute Toxicity Of Gramoxone To *Oreochromis niloticus* (Trewavas) In Nigeria. 2001. Department of Biological Sciences, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria. Water, Air, and Soil Pollution 131: 1–10.
7. Biocomercio sostenible. 2002. información básica sobre el mercado mundial de peces ornamentales. Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander Von Humboldt, Bogotá, Colombia. Pág. 13.
8. Bonilla, J.P., Peinado, J.E., Urdaneta, M. A., Carrascal, E. 2000. Informe Nacional sobre el Uso y Manejo de Plaguicidas en Colombia, Tendiente a Identificar y Proponer Alternativas para Reducir el Esguerrimiento de Plaguicidas al Mar Caribe. Ministerio Del Medio Ambiente. Proyecto Pnuma//Ucr/Car. Bogotá. Colombia. <http://www.cep.unep.org/pubs/meetingreports/GEF-pesticides/Colombia%20Final%20Report.doc>

9. Bus, J.S and Gibson, J.E. 1986. Paraquat: Model for oxidant-initiated Toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 55: 37-42.
10. Camargo M. M., and Martinez C. B. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3):327-336.
11. Camejo, B.F. 1984. Paraquat ¿Herbicida de la muerte? *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Agricultura de las Americas (Colombia)* 151: 73-75.
12. Caseley, J. 1996. Capitulo 10. Herbicidas. Manejo de malezas para países en desarrollo. *Estudio FAO Producción Y Protección Vegetal. Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y la Alimentación. Roma. Pág. 1222-1227.*
13. Castellanos, C., y Sánchez, P. 2007. Peces de la Amazonía Colombiana con énfasis en especies de interés comercial. *Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, INCODER. Universidad Nacional de Colombia.*
14. Chavarriaga, D.M. 1997. Resistencia de malezas a herbicidas en Colombia. *Resistencia de malezas a herbicidas. Jaboticabal. UNESP. Brasil.*
15. Cuevas, A. 2001. Manejo integrado de plagas en el cultivo de arroz. *Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Programa nacional de transferencia de tecnología Agropecuaria-Pronatta. ICA. Fedearroz. Cali. Colombia. www.agronet.gov.co/www/docs_si2/MIP%20arroz.pdf*
16. Díaz, M. C., Bustos, M. C., y Espinosa, A. J. 2004. Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. *Universidad Nacional de Colombia. Primera edición. Bogotá, Colombia. Pág. 40-41.*
17. Eissa, B. L., Ferrari, L., Osanna, N. A., y Salibian, A. 2006. Biomarcadores etológicos no invasivos de estrés ambiental: estudio comparativo en dos

- teleósteos de ecosistemas de la región pampeana argentina. *Rev. Toxicol.* 23: 11-16.
18. Eslava, P. R., Ramírez, W. F., y Rondón, I. S. 2007. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Unillanos - (IIOC-IALL). Primera edición. Universidad de los Llanos. Villavicencio, Meta – Colombia. Pág. 63-150.
19. Evans, D. H. 1987. The Fish Gill: Site of Action and Model for Toxic Effects of Environmental Pollutants. *Environmental Health Perspectives.* 71: 47-58.
20. Figueiredo, F.A., Fontanhas, F.A., Rocha, E., and Reis, H.A. 2006. The Effect of Paraquat on Hepatic EROD Activity, Liver, and Gonadal Histology in Males and Females of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Exposed at Different Temperatures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51: 626–632.
21. Fittipaldi, M. 2008. Consumo de agua en la agricultura: cultivo de arroz de riego. Boletín de dinámica de sistemas. <http://www.salle.url.edu/eng/elsDET/Catedra/biblioteca/0052.htm>
22. Gagneten, A. 2002. Efectos del herbicida paraquat sobre el zooplancton Iheringia, *Sér. Zool., Porto Alegre*, 92(3):47-56.
23. García, J.P. 2002. Estado Actual De La Contaminación Por Metales Pesados Y Pesticidas Organoclorados En El Parque Natural De Monfrague. Universidad De Extremadura. Facultad De Veterinaria. Pág 73-113.
24. Haley, T.J. 1979. Review of the Toxicology of Paraquat (1, 1'-Dimethyl-4, 4'-bipyridinium Chloride). *Clinical Toxicology* 14 (1): 1-46.
25. Hamilton, M.A., Russo, R.C, and Trurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11 (7): 714-719.

26. Hirt, L. M., y Domitrovic, H. A. 2000. Toxicidad y respuesta histopatológica en *Aequidens portalegrensis* (Pisces, Cichlidae) expuestos a cloruro de Cadmio en ensayos de toxicidad aguda y subletales. *Instituto de Ictiología del Nordeste, Facultad de Ciencias Veterinarias (UNNE)*. Corrientes- Argentina. Pág. 1-4.
27. Hoffmann, P and Hoffmann, M. 2003. Rodostomo. *Hemigrammus rhodostomus*. www.animalpicturesarchive.com/WebImg/340/1208
28. INCODER. 2006. Peces Ornamentales Mercado En Expansión Para Colombia. Sistema de información de precios y mercados para la producción acuícola y pesquera. Corporación Colombiana Internacional. Bogotá, Colombia. <http://www.incoder.gov.co/Archivos/Boletin%2049.pdf>
29. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO-ICA. 2006. Estadísticas de comercialización de plaguicidas año 2006. www.ica.gov.co/getattachment/6ce78611-9690.../Publicacion-26.aspx
30. Instituto De Seguridad E Higiene En El Trabajo. 2006. Toxicidad Aguda En Peces. Métodos Para La Ecotoxicidad. Ministerio De Presidencia- Departamentos Implicados. Ministerio De Trabajo Y Asuntos Sociales España. España. Madrid. [Http://Www.Mtas.Es/Search/Index.Jsp?Search=1&C=MTAS&Si=1&Ns=10&St=Relevance&Qt=DI50](http://Www.Mtas.Es/Search/Index.Jsp?Search=1&C=MTAS&Si=1&Ns=10&St=Relevance&Qt=DI50)
31. Isenring, R. 2006. Paraquat riesgos inaceptables para la salud de los usuarios. Red de acción de plaguicidas y sus alternativas para America Latina. Zürich, Switzerland. Pág. 1-30.
32. Jiraungkoorskul, W., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., and Pokethiyook, P. 2002. Histopathological Effects of Roundup, a Glyphosate Herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *ScienceAsia* 28 :121-127
33. Labrada, R., y Parker, C. 1996. Capitulo 1. El control de malezas en el contexto del manejo integrado de plagas. Manejo de malezas para países en desarrollo.

Estudio FAO Producción Y Protección Vegetal. Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y la Alimentación. Roma.

34. Lasso, C. 2005. Peces ornamentales de Venezuela. Aspectos socioeconómicos y de manejo sostenible del comercio internacional de peces ornamentales de agua dulce en el norte de Sudamérica retos y perspectivas. Memorias taller internacional. Taller de comunicadores, WWF Colombia. Bogotá D.C., Colombia. Pág. 59.
35. León, T.E., y Rodríguez, L. 2001. Ciencia, Tecnología Y Ambiente En La Agricultura Colombiana. Cuadernos Tierra Y Justicia N° 4, Pág. 16-27.
36. Mancera, N., and Alvarez, R. 2008. Comercio de peces ornamentales en Colombia. *Acta biol.Colomb.* [online]. ene. /abr. vol.13, no.1: 23-52.
37. Mishra, A. K., and Mohanty, B. 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26: 136–141.
38. Mojica, J.I., Castellanos, C., Usma, S. y Álvarez, R. 2002. Libro Rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. La serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Colombia. Ministerio del Medio Ambiente, Bogotá, Colombia. Pág. 1-55.
39. Moyle, P. B., & Scerck, C. B. 1990. Methods for fish biology. American Fisheries Society. Bethesda. Pág. 191
40. Ochoa, D. M., y Gonzalez, J. F. 2008. Stress oxidativo en peces: revision". En: Colombia Revista De Medicina Veterinaria Y Zootecnia ed: Centro De Publicaciones Universidad Nacional De Colombia v.55 fasc.2 p.1.

41. Oliva, M., Garrido, M.C., Márquez, D. S., & González, M. L. 2009. Sublethal and lethal toxicity in juvenile Senegal sole (*Solea senegalensis*) exposed to copper: A preliminary toxicity range-finding test. *Experimental and Toxicologic Pathology* 61: 113–121.
42. Olurin, K. B., Olojo, E. A.A., and Akindede, A. T. Histopathological responses of the gill and liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to the herbicide, glyphosate. *African Journal of Biotechnology*. 5(24): 2480-2487.
43. Omitoyin, B.O., Ajani, E. K., and Fajimi, O.A. 2006. Toxicity of Gramoxone (Paraquat) to Juvenile African Catfish, *Clarias gariepinus* (Bruchell, 1822). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 1 (1): 26-30.
44. Parma de Croux, M.J., Arquiel, P., Ortega, H.H., y Lorente, J.A. 1999. "Toxicidad aguda y alteraciones tisulares producidas por acción del herbicida Paraquat en juveniles de "Pacu" (*Piaractus mesopotamicus*)". *FABICIB* 3:113-118.
45. Parvez, S., and Raisuddin, S. 2005. Effects of Paraquat on the Freshwater Fish *Channa punctata* (Bloch): Non-Enzymatic Antioxidants as Biomarkers of Exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 392–397.
46. Proexport. 2004. Peces colombianos colorean acuarios de Estados Unidos. Resumen de noticias de exportación. La republica. Pyme. http://www.proexport.com.co/VBeContent/library/documents/DocNewsNo3949DocumentNo3375.HTM#_Toc92858061
47. Prophet, E., Mills, Bob., Arrington, J.B., Leslie, H., and Sobin, M.D. Editores. 1995. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP) Publicado por Registro de Patología de los Estados Unidos de América (ARP). Washington D.C.
48. Ramírez, W., Rondón, I., Vidal, H., y Eslava, P. 2009. Toxicidad aguda y lesiones Histopatológicas en cachama blanca (*piaractus brachypomus*) expuestas a la

mezcla de herbicida Roundup® más surfactante Cosmoflux® 411f. Rev.MVZ Córdoba 14(1):1563-1575.

49. Rojik, I., Nemcsók, J., and Boross, L. 1983. Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides. 1: Acta Biol Hung. 34(1):81-92.
50. Ronald, E. 1990. Paraquat Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. Contaminant Hazard Reviews. U.S. Fish and Wildlife Service Patuxent Wildlife Research Center Laurel, Maryland 20708 Biol Report 85(1.22).
51. Rundle, J. 2006. Hemigrammus and Hyphessobrycon. Practical fishkeeping magazine.
http://www.practicalfishkeeping.co.uk/pfk/pages/show_article.php?article_id=600#comment4190#comment4190
52. Salguero, M. V., Martínez, M.C., Soria, M. L., García, S, y Repetto, G. 2005. Estudio histopatológico de las lesiones hepáticas inducidas por paraquat. Cuad Med Forense 11(40):113-117.
53. Sinhaseni, P and Tesprateep T. 1987. Histopathological Effects of Paraquat and Gill Function of *Puntius gonionotus*, Bleeker. Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science Chulalongkorn University, Phayathai Road, Bangkok 10500, Thailand. Bull. Environ. Contain. Toxicot. 38:308-312.
54. Velazco, Y. M., Gómez, W., y Calderón, J. M. 2006. Toxicidad aguda del sulfato de cobre (CuSO₄) en alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) najo condiciones de aguas blandas. Revista ORINOQUIA. 10 (1): 64-70.
55. Velazco, Y. M., y Cruz, P.E. 2008. Behavioural and gill histopathological effects of acute exposure to sodium chloride in moneda (*Metynnis orinocensis*). Environmental Toxicology and Pharmacology 25: 365–372.

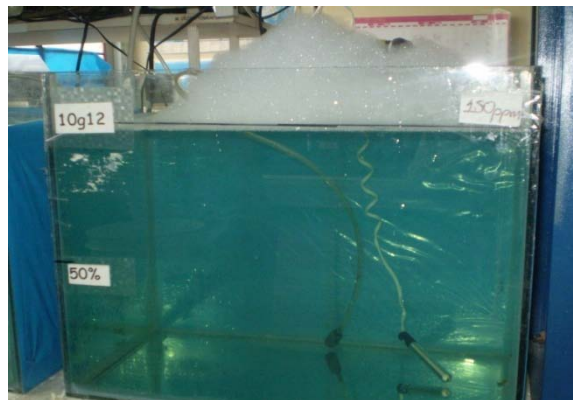
56. Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Ipek, E., and Unlu, E. 2007. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 24: 286–291.
57. Ware, G. W., & Whitacre, D. M. 2004. *The Pesticide Book*, 6th Ed. Meister Media Worldwide. Willoughby, Ohio. Pág. 488.
58. World Health Organization. 1984. Paraquat and Diquat. Environmental health criteria 39. International programme on chemical safety. Geneva, Switzerland.
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc39.htm>.

ANEXOS

Anexo 1. Fotografía de individuos tratamiento control.



Anexo 2. Apariencia del agua de los tratamientos de mayor aplicación de Gramoxone®.



Anexo 3. Muerte de los peces del tratamiento 6 (150ppm) una hora después de la aplicación del paraquat.



Anexo 4. Nado errático de los peces del tratamiento 5 (70ppm) una hora después de la adición del paraquat.



Anexo 5. Pérdida del eje de nado de los peces del tratamiento 4 (45 ppm) 24h después de la aplicación del paraquat.



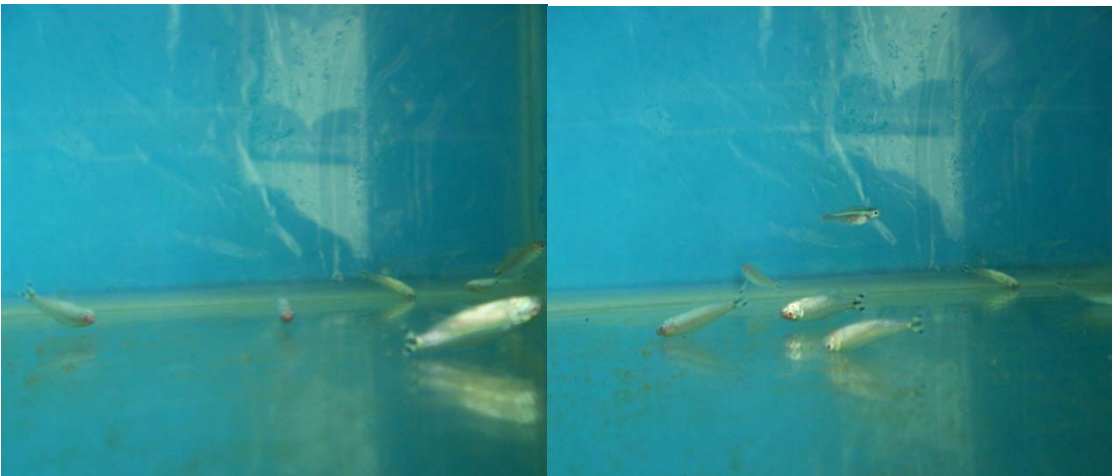
Anexo 6. Los peces del tratamiento 3 presentaron movimientos mínimos y la mayoría del grupo nadaba en el fondo del acuario.



Anexo 7. Muerte de peces de los tratamientos 4,5 y 6 luego de la adición del producto comercial Gramoxone® (paraquat).



150ppm



70ppm



45ppm

