

EFFECTOS DEL HERBICIDA 2-CLORO-2,6-BIS-ETILAMINA-S-TRIAZINA, SOBRE ALGUNOS TEJIDOS DE *COLOSSOMA MACROPOMUM* Cuvier 1818 (PISCES: CHARACIDAE)

M.I. SEGNINI DE BRAVO^{1,3}; J. MEDINA^{2,3}; S. MARCANO³; A. BOADA-SUCRE^{3,4} & H. FINOL⁵.

¹Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

²Instituto de Investigaciones Agrícolas de Venezuela.

³Postgrado en Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

⁴Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos, Universidad Simón Rodríguez, Caracas, Venezuela.

⁵Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

msegnini@cantv.net

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue evaluar los posibles efectos del herbicida 2-cloro-2,6-bis-etilamina-S-triazina, sobre algunos tejidos de *Colossoma macropomum*. Se estudiaron cuatro peces, expuestos y cuatro no expuestos al mismo (controles). Se les diseccionó partes del tejido muscular dorsal y caudal, intestinal y renal, las cuales fueron procesadas posteriormente por las técnicas rutinarias de microscopía electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos mostraron alteraciones patológicas en todos los tejidos analizados de aquellos peces expuestos al herbicida, tales como: atrofia con una disposición no paralela de las miofibrillas, sistema sarcotubular hinchado, fibrosis, escasez de heterocromatina en el núcleo, alteraciones a nivel de los túbulos renales, mitocondrias hinchadas, lisosomas primarios presentes y vacuolas autofágicas. Se puede inferir que este herbicida usado en labores agrícolas produce efectos deletéreos sobre las características morfológicas celulares en varios órganos de esta especie.

Palabras claves: *Colossoma macropomum*, herbicida, microscopía electrónica de transmisión

ABSTRACT: The objective of this study was to assess the possible effects of the herbicide 2-chloro-2,6-bis-ethylamino-S-triazin on some tissues of *Colossoma macropomum*. Eight fish specimens were subject to study, 4 previously exposed to the herbicide and 4 nonexposed ones used as references. Parts of their dorsal and caudal muscle tissue, as well as intestinal and renal tissue, were desiccated and subsequently processed by transmission electron microscopy. The results showed pathological alterations in all the tissues of the fish subject to the herbicide, such as atrophy and myofibrillar disarray, swelling of the sarcotubular system, fibrosis, scarcity of heterochromatine in the nucleus, alteration of the renal tubules, swollen mitochondria, presence of primary lysosomes and autophagic vacuoles. It is thus concluded that herbicides used in agricultural activities have deleterious effects on the cell morphology of various organs of this species.

Key words: *Colossoma macropomum*, herbicide, transmission electron microscopy

INTRODUCCIÓN

La necesidad de los productores agrícolas de controlar las malezas no deseadas en sus cultivos, los ha llevado a utilizar herbicidas, siendo los más utilizados el gramazone (Paraquat) y la atrazina, por su acción efectiva y bajo costo.

La atrazina es una triazina sistémica, que ha sido usada por más de 40 años en más de 80 países y se puede detectar en casi todas las superficies acuáticas del mundo. Actualmente se sigue considerando como un herbicida de bajo riesgo ecológico debido a su débil acumulación y biomagnificación (DIANA *et al.* 2000; FELSOT, 2001). Recientemente, algunos autores han reportado que los

herbicidas a ciertos niveles de concentraciones pueden producir cambios patológicos (WIEGAND *et al.* 2001). La atrazina a concentraciones menores de 20 µg/l tiene efectos adversos sobre la biomasa y el desarrollo embrionario de las ranas que habitan las aguas tratadas con este herbicida (DENOYELLES *et al.* 1987; HAYES *et al.* 2002). En peces se ha señalado disminución del desove, malformaciones en los embriones y reducción del hermafroditismo (ROLF *et al.* 1986; HAMM & HINTON 2000). LAUREN *et al.* (1989) encontraron degeneración de los tubulos renales y aumento de figuras mielínicas, en la trucha arcoiris tratada con el antibiótico fumagilín. En Venezuela, el herbicida más usado es 2-cloro-4,6-bis-etilamina-S-triazina, y poco se conoce de su efecto en los peces de cultivo. En tal sentido

el objetivo de este trabajo fue estudiar los posibles efectos de este herbicida, sobre la musculatura blanca y roja, el riñón e intestino del pez *C. macropomum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

C. macropomum fue expuesto a una dosis de 2,5 ppm del herbicida 2-cloro-2,6-bis-etilamina-S-triazina durante 72 horas. Se tomó esta concentración porque era la concentración intermedia entre el mínimo y el máximo recomendado para su uso por los fabricantes (1,6 a 3,3 ppm). La concentración letal (CL_{50-96h}) para *C. macropomum* es de 62 ppm (MEDINA, 1995). Se tomaron al azar cuatro peces provenientes de aguas tratadas con el herbicida y cuatro de condiciones normales de cultivo. Se decapitaron y rápidamente se disecaron parte de la musculatura dorsal y caudal, los riñones y parte del intestino. Luego se cortaron trozos de ambos músculos, del riñón e intestino de aproximadamente 1 mm de diámetro y se fijaron con glutaraldehído (2,5%) y OsO_4 (1%) en buffer fosfato de Millonig (320 mOsm, pH 7,4) por 45 min. Posteriormente se lavaron tres veces con buffer fosfato de Millonig/min y se postfijaron por una hora a 4°C con OsO_4 (1%) en el mismo buffer. Después, se lavaron por 15 min con agua destilada. La deshidratación se realizó en concentraciones crecientes de etanol a 4°C/5 min en cada concentración de etanol. Luego, a temperatura ambiente, se sumergieron en óxido de propileno dos veces por un tiempo de 15 min cada uno, y se infiltraron con una mezcla de óxido de propileno-resina epóxica (1:1) por 30 min y cuatro cambios en la resina pura LX-112 (Ladd Research, Inc. Burlington). Finalmente, se colocaron en moldes de plástico, para ser polimerizadas en una estufa a 60°C por 48 horas. Secciones de 60 - 80 nm fueron obtenidas con un ultramicrotomo Porter-Blum MT2-B, colocadas en rejillas de cobre (200 mesh), luego se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en microscopios Hitachi modelos H-500 y H-7100 a un voltaje de aceleración de 75 y 100 kV respectivamente.

RESULTADOS

Los resultados de esta investigación para aquellos peces tratados con herbicida a nivel del tejido muscular, tejido renal e intestinal mostraron alteraciones patológicas tales como, signos de atrofia muscular con elementos del sistema sarcotubular hinchados (sistemas terminales), degradación de miofibrillas, área de hipercontracción muscular. También se pueden observar capilares con

membrana plasmática muy gruesa y estrecha luz, existiendo una estrecha relación entre la membrana plasmática de éstos y la membrana basal. Otras alteraciones son la presencia de mitocondrias pleomórficas muy densas, vacuolas autofágicas y axonolisis del nervio motor (Figs. 1-3).

Con respecto a los resultados de microscopía electrónica del riñón de *C. macropomum*, se observó que los peces tratados con atrazina mostraron alteraciones en los túbulos donde se encontraron vacuolas autofágicas y figuras mielínicas, en algunas de las mitocondrias se aprecia la vacuolización de algunos de sus bordes notándose un espacio electrón transparente. Las mitocondrias deberían ubicarse paralelas a lo largo de las interdigitaciones, pero no están en esa disposición, por lo que lucen como mitocondrias cortas y algunos espacios están totalmente desprovistos de mitocondrias, es decir como espacios vacíos (Figuras 4-6).

En el tejido intestinal se pueden observar estructuras vacuoladas con restos de mitocondrias, dilatación de la envoltura nuclear y gránulos electrón densos (Figura 7).

DISCUSIÓN

El uso creciente de pesticidas y herbicidas en la agricultura convencional, ha contribuido a la contaminación de las fuentes acuáticas debido a su introducción accidental en los cursos de agua cercanos a su aplicación; lo cual ha traído como consecuencia que el zooplancton y la ictiofauna se encuentren expuestos crónicamente a bajas concentraciones de estos compuestos químicos, produciendo daños biológicos imperceptibles. La mayoría de estas sustancias ocasionan primeramente daños a nivel subcelular antes de reflejarse en la población, como por ejemplo, modificaciones en los patrones de crecimiento y reproducción. En esta investigación se observaron algunas alteraciones en la fibra muscular, en los túbulos renales y en el intestino de *C. macropomum*, lo cual indica que éstos son tejidos fácilmente alterables con la contaminación ambiental (Figuras 1-7).

Recientemente, estudios sobre el efecto que estos compuestos químicos producen sobre las funciones reproductivas a través del sistema endocrino, han demostrado que ellos se comportan como señales biológicas, capaces de alterar el control de la expresión del

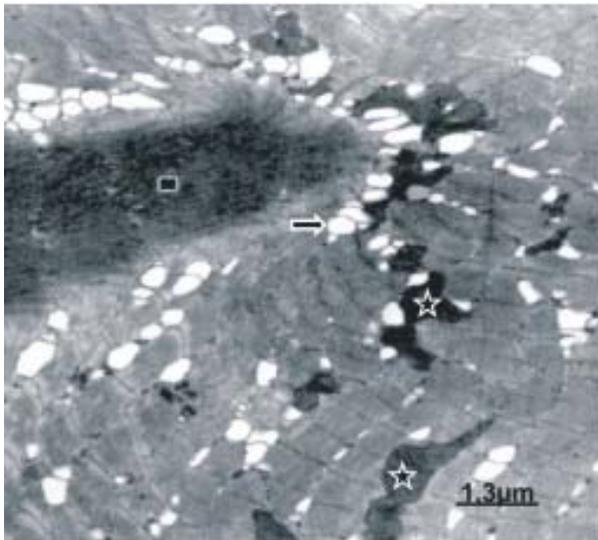


Fig. 1: Micrografía (MET) de una sección longitudinal de la fibra muscular de *Colossoma macropomum*. Nótese el área de hipercontracción (rectángulo), elemento del sistema sarcotubular hinchado (flecha) y mitocondrias pleomórficas y muy electrónicas (estrellas).

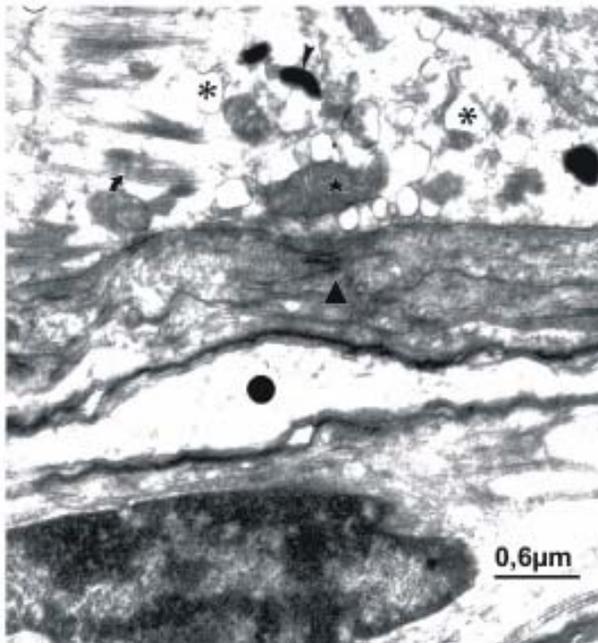


Fig. 2. Micrografía (MET) de una sección longitudinal de la fibra muscular de *Colossoma macropomum*. Nótese restos de miofibrillas (flecha), lisosomas (cabeza de flecha), vacuolas con restos de mitocondrias (asteriscos), mitocondrias vacuolizadas (estrella), capilar con pared gruesa y estrecha luz (triángulo) y nervio motor alterado (círculo negro).

gene a nivel molecular e interferir con la retroalimentación homeostática a nivel funcional y del desarrollo (MYERS *et al.* 2003). Una hipótesis generalizada de señales biológicas en el ecosistema, sugiere que cualquier proceso mediado por las señales químicas es un blanco potencial para la disrupción, esto ocurre dentro de un organismo, entre e ínter organismos, o en todo el ecosistema (MCLACHLAN, 2001). Casi todo el desarrollo biológico se manifiesta como una secuencia de eventos orquestada y controlada por mecanismos de señalización bioquímica que activan la expresión del gene. Una interferencia en cualquier paso de estos procesos durante el desarrollo puede dar lugar a efectos adversos que van desde defectos obvios en el nacimiento hasta cambios sutiles que solamente se manifiestan después de una exposición prolongada (MCLACHLAN *et al.* 2001). Las altas dosis de los productos químicos de interrupción endocrina pueden resultar en toxicidad evidente, tal como muerte celular, pero a niveles más bajos, ellas pueden alterar la expresión de los genes, resultando en cambios del sistema endocrino que llegan a ser permanentes durante los períodos críticos del desarrollo (WELSHONS *et al.* 2003). El herbicida Cloro-s-triazina, produce una disrupción endocrina como feminización, cambio del color y en la etología del cortejo en los machos de *Cyprinus carpio* (SANDERSON *et al.* 2001), guppies (*Poecilia reticulata*) (BAATRUP & METTE, 2001), y en el goldfish (*Carassius auratus*), (ISHIBASHI *et al.* 2004).

ARISYOSHI *et al.* (1990) estudiaron el efecto del Diazinón (O,O-dietil-O-[6-metil-2-isopropil-4-metil-6-pirimidil] fosforotiato) en peces y observaron que éste influía en la química de las proteínas, y que a dosis subletales disminuía la traslación de los genes normales y aumentaba, en cambio, la traslación de los genes de las proteínas del estrés. Este pesticida en el riñón de la carpa (*C. carpio*), aumenta los enlaces químicos de las proteínas con el metal, formando metalotionina así como también incrementa los niveles de la homo oxigenasa, mientras disminuye la actividad de esta última en el hígado y páncreas (LARKIN & TJEERDEMA, 2000). La Kepona (clorodecona) altera el volumen mitocondrial por efecto compensatorio en el tejido branquial de peces de agua dulce; mientras que el retículo endoplasmático se reduce (MALLAT *et al.* 1995). El uso de Chloramina-T (N-sodio-N-cloro-para-toluenosulfanamida) como un agente profiláctico y terapéutico en cultivos de peces (truchicultura) de agua dulce fue investigado por POWELL *et al.* (1995), quienes encontraron que los cambios morfológicos eran consistentes con un mecanismo compensatorio para el ingreso de los iones, indicando que

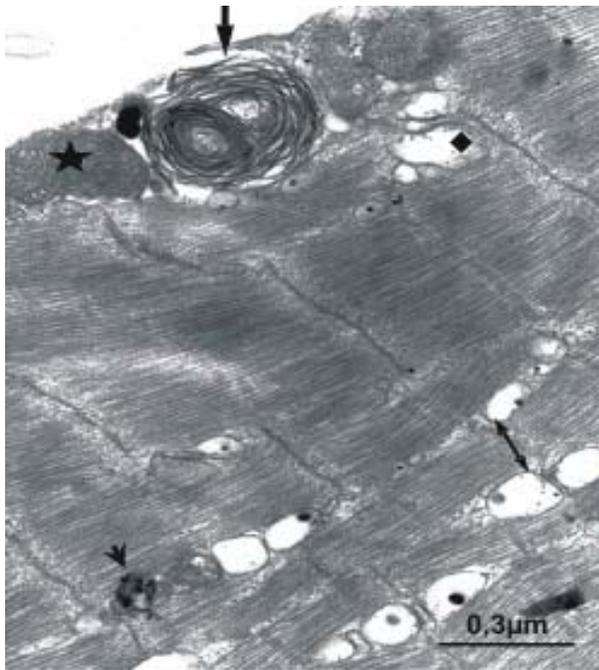


Fig. 3. Micrografía (MET) de una sección longitudinal de la fibra muscular de *Colossoma macropomum*. Nótese la figura mielinica (flecha), vacuola autofágica (rombo), triadas hinchadas (doble flecha), lisosoma (cabeza de flecha) y mitocondrias (estrella).

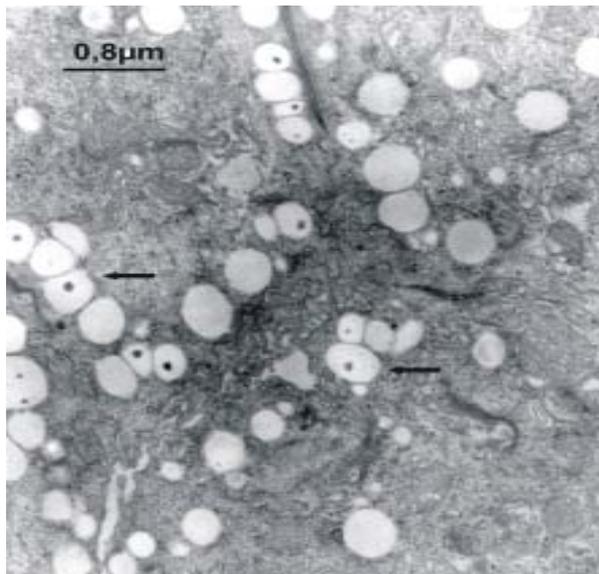


Fig. 4. Micrografía (MET) de una sección longitudinal de riñón de *Colossoma macropomum*. Nótese las vacuolas (flechas).

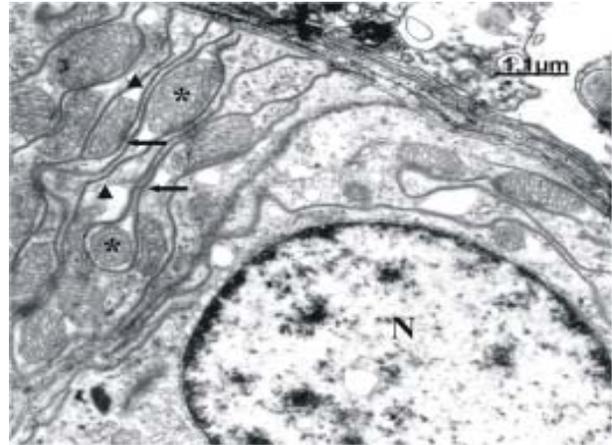


Fig. 5. Micrografía (MET) de una sección longitudinal de riñón de *Colossoma macropomum*. Nótese las mitocondrias (asterisco) con vacuolización de sus bordes (triángulo). El núcleo (N) cercano a pocas interdigitaciones y vacuola (flechas).



Fig. 6. Micrografía (MET) de una sección longitudinal de riñón de *Colossoma macropomum*. Nótese las vesículas pinocíticas distribuidas irregularmente (flechas), vacuolas autofágicas con restos mitocondriales (triángulo), membrana basal engrosada, con interdigitaciones sin mitocondrias (flecha gruesa) y las vacuolas autofágicas en el citoplasma endotelial (estrellas).

estos materiales aumentaban la permeabilidad iónica del epitelio, coincidiendo con una posible entrada de agua lo cual conduce a un edema intercelular. La proliferación de cloruros celulares y el edema celular pueden ser afectados también por el intercambio gaseoso a través del epitelio branquial.

Investigaciones realizadas en los peces medaka, *Oryzias latipes*, y guppy (*P. reticulata*), (WESTER *et al.* 1990) expuestos al bis (tris-n-butil-estaño) oxido (TBTO) y al Di-n-butil-estaño-di-cloruro (DBTC) encontraron a nivel del riñón, en los túbulos proximales, la presencia de mitocondrias deformes y un número aumentado de lisosomas. La especie *Tinca tinca*, expuesta al ácido 2,4 dichlorofenoxiacético, después de un examen histológico, reveló alteraciones marcadas del tejido hematopoyético, caracterizado por una progresiva hinchazón y necrosis celular, activación del sistema fagocítico y la subsiguiente formación de figuras mielínicas (GOMEZ *et al.* 1998). ROLF *et al.* (1986) en *Ictarulus punctatus* encontraron pérdida del equilibrio de esta especie en aguas tratadas con herbicida. Estudios en la carpa (*C. carpio*) expuesta a emersión de

Round Super TM (205 mg glifosato/l o 410 mg de glifosato/l) en concentraciones de 40 a 20 veces menores que aquellas utilizadas en la práctica, reveló que el herbicida causaba la aparición de estructuras mielínicas en los hepatocitos, hinchazón de las mitocondrias y desaparición de la membrana interna de las mitocondrias con ambas concentraciones, lo cual significa que esta sustancia es dañina al ciprínido en bajas concentraciones (SZAREK *et al.* 2000). En esta investigación, resultados semejantes se encontraron en *C. macropomum* expuesta al químico atrazina. Se observan a nivel de los túbulos renales, diversos efectos tales como mitocondrias hinchadas, presencia de lisosomas primarios, en algunas de las mitocondrias se aprecia la vacuolización de algunos de sus bordes notándose un espacio electrón transparente. Las mitocondrias deberían ubicarse paralelas a lo largo de las interdigitaciones, pero no están en esa disposición, por lo que lucen como mitocondrias cortas y algunos espacios están totalmente desprovistos de mitocondrias, es decir como espacios vacíos. A nivel muscular, alteraciones como las cisternas terminales del sistema sarcotubular hinchadas, área de hipercontracción muscular, así como capilares con membrana plasmática muy gruesa y estrecha luz. En el tejido intestinal se pudo observar estructuras vacuoladas con restos de mitocondrias, dilatación de la envoltura nuclear y gránulos electrón densos. Debido a la patología encontrada, recomendamos utilizar dosis menores de 2,5 ppm del herbicida 2-cloro-4,6-bis-etilamina-S-triazina para controlar la maleza en las piscinas de cultivo de cachamas evitando de esta manera daños irreversibles en los peces, ya que esa dosis, en un principio, hizo que el pez perdiera el balance y al recuperarse presentara nados lentos, debido posiblemente a la desorganización sarcomérica y fragmentación del sistema sarcotubular y a la atrofia neurogénica, por cambios en el nervio motor. De acuerdo a los resultados de esta investigación, posiblemente, el pez podría compensar algunas de las alteraciones mostradas. Por ello es necesario continuar las investigaciones en esa dirección; si se toma en cuenta que las alteraciones presentadas fueron subletales, no conduciendo a la muerte del animal. Se puede decir entonces, que los cambios observados dentro de organelos específicos de las células afectadas, son frecuentemente los responsables de las lesiones celulares adaptativas o crónicas. Se concluye que el uso de la microscopía electrónica de transmisión podría ser una herramienta en el monitoreo del efecto de agentes contaminantes, por lo que puede utilizarse como marcador de daños biológicos.

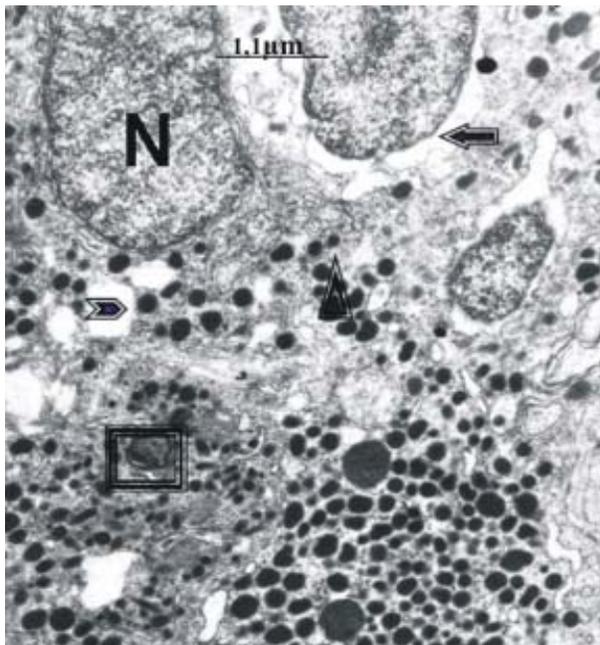


Fig. 7. Micrografía (MET) de sección longitudinal del intestino de *C. macropomum*. Nótese el núcleo (N), estructuras vacuoladas (cabeza de flecha), dilatación de la envoltura nuclear (flecha), vacuola autofágica con restos mitocondriales (cuadrado), gránulos electrón densos (triángulo).

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente (CI-5-1803-0978/1), al Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y al CDCH de la Universidad Central de Venezuela por su apoyo para esta investigación.

REFERENCIAS

- ARISYOSHI, T., S. SHIIBA, H. HASEGAWA & K. ARIZONO. 1990. Profile of metal binding proteins and heme oxygenase in red carp treated with heavy metals, pesticides and surfactants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44: 643-649.
- BAATRUP, E. & J. METTE. 2001. Antiandrogenic pesticides disrupts sexual characteristics in adult male guppy (*Poecilia reticulata*). *Environ. Health Perspect.* 109(10): 1063-1070.
- DENOYELLES, F.J., W.D. KETTLE, C.H. FROMM, M.F. MOFFETT & S.L. DEWEY. 1987. Use of experimental ponds to assess the effects of a pesticide on the aquatic environment. Miscellaneous Publication No. 75, 34th Annual Meeting of the Entomological Society of America, MPPEAL 75:1-88.
- DIANA, S.G., W.J. RESETARITS JR., D.J. SCHAEFFER, K.B. BECKMEN & V.R. BEASLEY. 2000. Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. *Environ. Toxicol. Chem.* 19(12): 2961-2967.
- FELSOT, A.S. 2001. Herbicide tolerant genes, Part 4. Withering wildlife?. *Agrochem. Environ. News.* 178: 1-8.
- GÓMEZ, L., J. MASOT, S. MARTÍNEZ, E. DURÁN, F. SOLER & V. RONCERO. 1998. Acute 2,4-D poisoning in the Tench. (*Tinca tinca L.*): Lesions in the hematopoietic portion of the kidney. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35(3): 479-483.
- HAMM, J.T. & D.E. HINTON. 2000. The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon. *Aquat. Toxicol.* 48: 403-418.
- HAYES, T.B., A. COLLINS, M. LEE, M. MENDOZA, N. NORIEGA, A.A. STUART & A. VONK. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. National Acad. Sci. (U.S.A.)*. 99(8): 5476-5480.
- ISHIBASHI, H., M. KOBAYASHI, Y. TOMIYASU, M. MIYAHARA, K. TACHIBANA, M. TSUCHIMOTO & K. ARIZONO. 2004. Development of plasma vitellogenin assay of endocrine-disrupting chemical using ovariectomized goldfish (*Carassius auratus*). *J. Health Sci.* 50(2): 169-73.
- LARKIN, D.J. & R.S. TJEERDEMA. 2000. Fate and effects of diazinon. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 166: 49-82.
- LAUREN, D.J., A. WISHKOVSKY, J.M. GROFF, R.P. HEDRICK & D.E. HINTON. 1989. Toxicity and pharmacokinetics of the antibiotic fumagillin, in yearling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98: 444-453.
- MALLAT, J., J.F. BAILEY, S.J. LAMPA, M.A. EVANS & S. BRUMBAUGH. 1995. A fish gill system for quantifying the ultrastructural effects of environmental stressors: methylmercury, Kepone and heat shock. *Can. J. Fishes. Aquat. Sci.* 52: 1165-1182.
- MCLACHLAN, J. A. 2001. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemical. *Endocrine Rev.* 22: 319-341.
- MEDINA, J. 1995. Informe de Gestión. FONAIAP. Estación Experimental Guárico. Sub-Estación Guanapito. Estado Guarico, Venezuela, 59 pp.
- MYERS, J. P., L.J. GUILLETTE JR., P. PALANZA, S. PARMIGIANI, S. H. SWAN, & F. S. VOM SAAL. 2003. The emerging science of endocrine disruption. The Science and Culture Series. In: The International Seminar on Nuclear War and Planetary Emergencies. (Series Editor and Chairman: A. Zichichi). Erice, Italy 1-13 pp.
- POWELL, M.D., G.M. WRIGHT & D.J. SPEARE. 1995. Morphological changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill epithelia following repeated intermittent exposure to chloramines-T. *Can. J. Zool.* 73: 154-165.

- ROLF, L.L., M.D. SETSER & J.L. WALKER. 1986. Pharmacokinetics and tissues residues in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, given intracardiac and intramuscular injections of gentamicin sulphate. *Veterin. Human Toxicol.* 28 (Suppl. 1): 25-31.
- SANDERSON, J.T., R.J. LETCHER, M. HENEWEER, J.P. GIESY & M. VAN DEN BERG. 2001. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ. Health Perspect.* 109(10): 1027-1089.
- SZAREK, J., A. SIWICKI, A. ANDRZEJEWSKA, E. TERECHMAJEWSKA & T. BANASZKIEWICZ. 2000. Effect of herbicide roundup super TM on the structural pattern of hepatocytes in carp. *Mar. Environ. Res.* 50(1-5): 263-266.
- WESTER, P.W., J.H. CANTON, A.A.J. VAN LERSEL, E.I. KRAJNC & H.A.M.G. VAESSEN. 1990. The toxicity of bis(tris-n-butyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltin-dichloride (DBTC) in the small fish species *Oryzias latipes* (medaka) and *Poecilia reticulata* (guppy). *Aquat. Toxicol.* 16: 53-72.
- WELSHONS, W. V., K. A. THAYER, B. M. JUDY, J. A. TAYLOR, E. M. CURRAN, & F. S. VOM SAAL. 2003. Large Effects from Small Exposures. I. Mechanisms for Endocrine-Disrupting Chemicals with Estrogenic Activity. *Environ. Health Perspect.* 111(8): 994-1006.
- WIEGAND, C., E. KRAUSE, C. STEINBERG & S. PLUGMACHER. 2001. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49(3): 199-205.

RECIBIDO: marzo 2005.

APROBADO: agosto 2005.

