

**ANÁLISIS DE LAS MALFORMACIONES DEL EMBRIÓN DE
TRUCHA *Oncorhynchus mykiss* (WALBAUM, 1792) EN
CONDICIONES DE LABORATORIO BAJO LOS EFECTOS DE
DOSIS SUB LETALES DE CARBOFURANO (2,2-DIMETHYL-2,3-
DIHYDRO-1-BENZOFURAN-7-YL METHYLCARBAMATE)**

Juan David Camargo Buitrago

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y DE LA SALUD
BOGOTÁ D.C.
2017

**ANÁLISIS DE LAS MALFORMACIONES DEL EMBRIÓN DE
TRUCHA *Oncorhynchus mykiss* (WALBAUM, 1792) EN
CONDICIONES DE LABORATORIO BAJO LOS EFECTOS DE
DOSIS SUB LETALES DE CARBOFURANO (2,2-DIMETHYL-2,3-
DIHYDRO-1-BENZOFURAN-7-YL METHYLCARBAMATE)**

Juan David Camargo Buitrago

Proyecto de grado para optar el título de Biólogo

Directora: Bióloga con maestría Clara Santafé Millán
Codirectora: Bióloga con maestría Edilma Guevara

LABORATORIO DE ICTIOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA
UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y DE LA SALUD
BOGOTÁ D.C.
2017

Página de Aprobación

Nota de aprobación



Directora. Biol. Clara Santafé M.

Codirectora. Biol. Edilma Guevara R.

Jurado. Biol. Edgar Raúl Cubillos G.

Jurado. Biol. Juan Pablo Hernández S.

Bogotá D.C. ____ del mes de _____ del año ____

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad El Bosque por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, a la doctora Clara Santafé Millán por su apoyo y amistad, a la profesora Edilma Guevara por su asesoramiento y dedicación a la profesión, de igual manera al gremio docente de la facultad de Biología por su constante colaboración y motivación.

Especial agradecimiento a mi familia por su apoyo y curiosidad hacia mi profesión durante estos años, también a mi novia Maria Fernanda por su incondicional apoyo durante estos años de relación.

Gracias a mi papá, mamá, madrina y tío Gabriel por ser los pilares y el ejemplo en mis estudios, sin ustedes no sería la persona que soy hoy ni la que espero ser mañana.

Nota de salvedad

“La Universidad El Bosque no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, sólo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia.”

Dedicado a mi querida abuela Lilia Beatriz.

Tabla de Contenido

Introducción	1
Marco de referencia.....	3
1. Pesticidas	3
1.1. Organofosforados y Carbamatos	3
1.2. Efectos en la salud a causa de organofosforados y carbamatos	4
2. Impacto de los pesticidas	7
2.1. Peces como indicadores	9
2.2. Malformaciones en peces	10
2.3. Inhibidores endocrinos	11
2.4. Estrés oxidativo	12
3. Características de la especie <i>Oncorhynchus mykiss</i>	13
Pregunta de investigación	15
Justificación.....	16
Objetivos	18
Métodos	19
Resultados	24
Análisis de resultados.....	38
Conclusiones	44
Referencias Bibliográficas	46
Anexos.....	50

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura molecular del carbofurán (RAP-AL, 2008).	4
Figura 2. Montaje del experimento; arriba: acuarios con las concentraciones de carbofurán; abajo: acuario de control.	20
Figura 3. Esquema del diseño para la investigación basado en el propuesto por Celis de la Rosa (2014).	22
Figura 4. Porcentajes de individuos muertos por semanas durante la realización del experimento.	26
Figura 5. Malformaciones por cada uno de los tratamientos realizados.	31
Figura 6. Malformaciones encontradas por semana en cada uno de los tratamientos.	32
Figura 7. Número de malformaciones por tratamiento durante la realización del experimento.	33

Lista de Tablas

Tabla 1. Etapas del desarrollo de <i>Oncorhynchus mykiss</i> observadas durante la realización del experimento basada en la tabla propuesta por (Bejarano, 1983).	24
Tabla 2. Porcentajes y valores de mortalidad en los diferentes tratamientos transcurrido el tiempo en semanas durante el experimento.	25
Tabla 3. Alteraciones morfológicas macroscópicas encontradas en los embriones de <i>Oncorhynchus mykiss</i> durante su desarrollo.	27
Tabla 4. Cálculo de proporción en que se encuentran las malformaciones.	35
Tabla 5. Calculo de la Incidencia Acumulada para cada uno de los tratamientos realizados	36

Lista de Anexos

Anexo 1. Tipos de pesticidas y sus organismos objetivo, (Baird & Cann, 2014).	50
Anexo 2. Clasificación de la peligrosidad de los pesticidas según la OMS y la EPA estadounidense (Baird & Cann, 2014).	50
Anexo 3. Tabla de desarrollo normal de <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Bejarano, 1983).	51
Anexo 4. Características del fijador de Boüin (Montalvo, 2010).	53
Anexo 5. Prueba ANOVA realizada con ayuda del programa IBM SPSS Statistics	54
Anexo 6. Significancia de la prueba estadística de Levene realizado con ayuda del programa IBM SPSS Statistics.	55
Anexo 7. Prueba de Tukey realizada con ayuda del programa IBM SPSS Statistics	55

Resumen

El carbofurán ($C_{12}H_{15}NO_3$) es un pesticida perteneciente a la familia de los carbamatos, caracterizados por su alta toxicidad para animales y seres humanos por lo que la OMS lo cataloga en el grupo 1b. Se utiliza como insecticida, acaricida y nematocida de amplio espectro que actúa ingresando a los organismos por contacto, ingestión y en una menor medida por inhalación, en cualquiera de los casos inhibe la Acetilcolinesterasa “AChE”. La trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* pertenece a la familia de los salmónidos caracterizados por presentar altos contenidos lipídicos, habitar en zonas climáticas frías y tener una amplia comercialización para consumo. En el presente trabajo se analizó el efecto de cuatro dosis sub letales de carbofurán (2.0 $\mu\text{g/L}$, 2.5 $\mu\text{g/L}$, 3.0 $\mu\text{g/L}$ y 3.5 $\mu\text{g/L}$) y un tratamiento de control en ovas de *O. mykiss* en tres replicas, con el fin de identificar el grado de mortalidad y las malformaciones que se presentaban en la población, obteniendo como resultado una mortalidad del 81,6% y 2.840 casos de malformaciones denominadas: Oscurecimiento del saco vitelino (OS-V), Vitelo adicional (VA), Cifosis – Lordosis (CI-LO), Escoliosis (ES), Edema del saco vitelino (E-SV), constricción del saco vitelino (C-SV), Reducción del tamaño (RT), Decoloración (DE) y Edema pericárdico (EP). Finalmente se utilizó el índice de incidencia acumulada dando un resultado de 2,37 definiendo que todos los individuos presentaban al menos dos tipos de malformación de las 9 encontradas; el ANOVA con un $P < 0,05$ determina que existieron diferencias entre las variables, mientras que la prueba de Tukey da a conocer que los tratamientos 2,0 ppm y 2,5 ppm fueron los que presentaron mayores diferencias.

Palabras clave: *Carbofurán; O. mykiss; malformaciones; inhibidores endocrinos; estrés oxidativo.*

Abstract

Carbofuran ($C_{12}H_{15}NO_3$) is a pesticide belonging to the family of carbamates, characterized by high toxicity for animals and humans, for that reason the OMS catalog it in group 1b. Actually is used as a broad spectrum insecticide, acaricide and nematicide which act by entering the organisms through contact, ingestion and to a lesser extent by inhalation, in any case inhibiting AChE. The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* belongs to the family of salmonids characterized by high lipid content, living in cold climatic zones and having a wide commercialization for consumption. In the present document the intention was to analyze the effect of four carbofuran doses (2.0 μ g/L, 2.5 μ g/L, 3.0 μ g/L and 3.5 μ g/L) and a control treatment in *O. mykiss* eggs in three repetition to identify the degree of mortality and malformations, obtained as results a mortality rate of 81,6% and 2.840 malformations denominated: Darkening of the yolk sac (O-SV), Additional yolk sac (VA), Kyphosis - Lordosis (CI-LO), Scoliosis (ES), Yolk sac edema (E-SV), constriction of the yolk sac (C-SV), reduction of size (RT), discoloration (ED) and pericardial edema (EP). Finally, was used the cumulative incidence index, which gives a result of 2.37 meaning that all the individuals had at least two types of malformation of the 9 found; the ANOVA give a $P < 0,05$ meaning that exist different significances between the treatments, the Tukey test shows that 2,0 ppm and 2,5 ppm treatments present greater differences between them.

Key words: *Carbofuran, O. mykiss; malformations; endocrine inhibitors; oxidative stress.*

Introducción

Actualmente, el excesivo uso de pesticidas está afectando la calidad de los recursos provenientes de los ecosistemas tanto terrestres como acuáticos, en consecuencia, la calidad de vida de sus pobladores según el Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF, 2012). Prácticamente todos los cultivos alimentarios comerciales a nivel global se producen hoy en día utilizando insecticidas, herbicidas y fungicidas sintéticos. Dependiendo de las diferentes cosechas también varían los tipos de pesticidas que se utilizan, se menciona que tres cuartas partes de los pesticidas utilizados en Malasia son herbicidas, en India, Filipinas y Colombia predominan los insecticidas y en una menor manera los fungicidas (Baird & Cann, 2014).

El ingreso de químicos tóxicos a los ecosistemas acuáticos se da mediante una aplicación extensiva de pesticidas a tierras que son de uso agrícola, aunque también se ve afectada cierta parte del suelo que no corresponde a este uso (Ramirez & Mijangos, 1999). La problemática comienza debido al lavado que producen las lluvias, el arrastre del viento y el mal manejo que se le da a los residuos químicos, estos llegan a los ríos, quebradas y lagos, contaminándolos y generando efectos catastróficos en la fauna. En condiciones de laboratorio se ha observado que algunos de estos productos son cancerígenos y mutágenos en ratas, peces y monos (Pastor, 2002).

Los agrotóxicos poseen una alta eficacia contra todo tipo de plagas en cultivos, pero esta aplicación de químicos afecta de manera adversa la capacidad de microorganismos del suelo encargados de reintegrar elementos como el Carbono, Nitrógeno y el Agua a los diferentes ciclos biológicos. Por otro lado, la concentración tóxica de algunos productos químicos tiende a incrementarse a medida que asciende en la cadena trófica, fenómeno denominado

biomagnificación, producto de la bioacumulación de sustancias en los tejidos de los consumidores que serán presas de un depredador (Ramirez & Mijangos, 1999).

El daño a la fauna silvestre varía ampliamente dependiendo de los diferentes compuestos y dosis utilizadas de los agrotóxicos, así como las formas de su aplicación. Desde un punto de vista general, existe un daño mayor en los organismos acuáticos, siendo los peces particularmente vulnerables a cambios en la composición del agua, particularmente en los criaderos donde están estandarizadas las condiciones para obtener un buen desempeño, acorde con el ciclo de vida de la especie utilizada en la actividad acuícola (AUNAP, 2013).

Entre los estudios de laboratorio que están enfocados en evaluar los efectos que tienen los agrotóxicos en la fauna se encuentran las pruebas de toxicidad. Estas consisten en la toma diaria de datos, esto permite analizar en qué grado las concentraciones químicas pueden ser usadas y no generen alteraciones morfológicas o fisiológicas en la biota, estas alteraciones son analizadas macroscópicamente con ayuda del estereoscopio determinando las alteraciones en el desarrollo a nivel morfológico de los embriones (Osorio, 2010).

El carbofurán es un pesticida perteneciente al grupo de los carbamatos, caracterizados como persistentes en el ambiente y por sus niveles de toxicidad que causan la muerte a diferentes especies de peces y aves (Soloneski & Larramendi, 2012). En el laboratorio de ictiología – embriología de la Universidad El Bosque durante el periodo comprendido entre Agosto de 2016 y Mayo 2017, como hipótesis se plantea que a medida que aumentan las concentraciones de carbofurán, también lo hará el número de malformaciones evidenciadas en los embriones de *Oncorhynchus mykiss*, las cuales afectarán su desarrollo normal evitando que lleguen al estado juvenil – adulto.

Marco de referencia

1. Pesticidas

Se define “pesticida” como una sustancia que mata o controla organismos no deseados, estos actúan sobre una parte del ciclo metabólico de los organismos, siendo tóxicos y causándoles la muerte selectivamente (Anexo 1). Principalmente se encuentran insecticidas, sustancias que matan insectos; herbicidas, compuestos que matan plantas; fungicidas, que actúan sobre hongos y en ocasiones se utilizan para proteger semillas almacenadas antes de plantarlas (Baird & Cann, 2014).

A lo largo de la historia se han venido usando una serie de componentes para controlar plagas, entre estos se encuentran el dióxido de azufre (SO₂) utilizado como insecticida y fungicida, el fluoruro de sodio (NaF) utilizado para el control doméstico de hormigas, ácido bórico para controlar cucarachas, luego de la segunda guerra mundial se implementaron los insecticidas organoclorados, compuestos orgánicos que contienen cloro, caracterizados por su baja solubilidad en agua, pero alta solubilidad en medios hidrocarbonados como grasas animales (Baird & Cann, 2014).

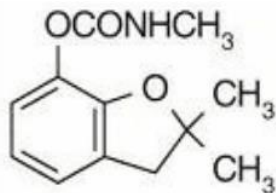
1.1. Organofosforados y Carbamatos

Entre los compuestos más utilizados en el mundo para controlar plagas se encuentran los organofosforados y los carbamatos. Los organofosforados actúan inhibiendo las enzimas del sistema nervioso, mientras que los carbamatos al tener un átomo de carbono en su fórmula química en vez de uno de fósforo, actúa sobre la acetilcolina (Baird & Cann, 2014).

Entre los principales insecticidas correspondientes al grupo de los carbamatos, se encuentra el aldicarb y el carbofurán, ambos caracterizados por su toxicidad. El aldicarb está permitido en Estados Unidos y prohibido en muchos países de Europa, mientras que el carbofurán se encuentra prohibido según las regulaciones de la Environmental Protection Agency “EPA”, ya que su toxicidad frente a la fauna silvestre ha causado la muerte de millones de aves al año (Fernandez & Mancipe, 2010).

El carbofurán “C₁₂H₁₅NO₃” (Figura 1) es un plaguicida sistémico utilizado como insecticida, acaricida y nematicida de amplio espectro que pertenece al grupo de los carbamatos, la OMS clasifica este compuesto en el grupo 1b que significa altamente peligroso (Anexo 2). A temperatura ambiente es un sólido cristalino, de color grisáceo, carente de olor, aunque si está expuesto a altas temperaturas o llamas libera gases tóxicos de óxido de nitrógeno, presenta una solubilidad en agua de 351 mg/L a 25°C, una densidad de 1,2 gr/cm³. Este pesticida actúa ingresando a los organismos por contacto e ingestión y en una menor medida por inhalación (NCBI, 2017). En cualquiera de los casos inhibe la acetilcolinesterasa.

Figura 1. Estructura molecular del carbofurán (RAP-AL, 2008).



1.2. Efectos en la salud a causa de organofosforados y carbamatos

Los carbamatos no son tan persistentes en el medio ambiente como los organoclorados, pero presentan una alta toxicidad para animales y seres humanos que tienen contacto con

estos compuestos. Los países en desarrollo son los que presentan una mayor tasa de enfermedades asociadas a pesticidas, de las cuarenta mil personas que mueren al año por intoxicación, tres cuartas partes se dan en países en desarrollo, la principal causa se debe a una ignorancia generalizada y pocas medidas de control acerca de prendas protectoras (Baird & Cann, 2014).

Las intoxicaciones por carbamatos se deben principalmente a la inhibición de la colinesterasa provocando parálisis neuromuscular, aunque la relación enzima – carbamil es reversible, si las personas se encuentran en contacto constante con el pesticida, sin las medidas de protección adecuadas al hacer uso de estos elementos o si se consume alguna sustancia alcohólica que reaccione con el compuesto en el organismo, puede llevar a riesgos potencialmente peligrosos, específicamente estados de shock por la disminución de noradrenalina, afectaciones en el sistema nervioso central y periférico (Gil & Jesus, 2010) y algunas otras que se explicarán más adelante.

Diferentes estudios epidemiológicos demuestran que los pesticidas organofosforados y carbamatos tienen consecuencias pre y postnatales como cáncer en niños, muerte fetal, retardo del crecimiento intrauterino, nacimientos prematuros y defectos al nacimiento. El sistema de vigilancia epidemiológica en Centroamérica menciona una serie de compuestos relacionados con una tasa aguda de intoxicación en la población, entre ellos se encuentran metamidofos, terbufós, etoprofós, endosulfán, carbofurán y aldicarb (Fernandez & Mancipe, 2010).

Prácticamente todos los cultivos alimentarios comerciales en escala global se producen hoy en día utilizando insecticidas, herbicidas y fungicidas sintéticos, estos han sido objeto de

preocupación para áreas de la salud humana debido a la ingestión de alimentos contaminados, aunque Colombia cuenta con alrededor de 37 mil hectáreas de cultivos orgánicos (Willer & Kilcher, 2014), su población, en particular mujeres embarazadas y niños, se considera vulnerable ya que los órganos internos aun en crecimiento, se ven más afectados frente a cualquier efecto negativo que puedan tener estos compuestos (Baird & Cann, 2014).

Entre los principales efectos se encuentra, que cuando las madres en condición de embarazo y tienen contacto directo o indirecto con pesticidas, algunas de estas sustancias pasan directamente al feto en desarrollo, causándole aumento en la incidencia de cáncer, enfermedades neurodegenerativas como párkinson y alzhéimer, y alteraciones endocrinas e inmunitarias que pueden manifestarse a largo plazo, incluso después de que la sustancia fuera prohibida por la ley (Greenpeace, 2015) como demuestra la International Agency for Research on Cancer “IARC” que comprueba que existe una relación entre 21 tipos de pesticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos; con la presencia de algún tipo de cáncer en el 77% de la población de 75.000 empleados fumigadores (Alavanja, Ross, & Bonner, 2013).

En Colombia las intoxicaciones por carbamatos y organofosforados representan un problema de salud pública, se han registrado tres eventos de intoxicación masiva, en Chiquinquirá “1967” donde se intoxicaron 500 personas y murieron 63, “1970” en Puerto López 190 personas intoxicadas causando la muerte a 7, por último en Pasto “1977” unas 300 personas intoxicadas donde 15 de ellas murieron (Fernandez & Mancipe, 2010) un informe más reciente del instituto nacional de salud menciona que entre el año 1998 y el 2011, se registraron 4.835 muertes provocadas por intoxicaciones y mal manejo al momento

de aplicar los agroquímicos, aunque también se reporta una disminución progresiva en la cantidad de muertes a partir del año 2002 (Chaparro & Castañeda, 2015).

2. *Impacto de los pesticidas*

Se deben analizar los peligros potenciales al hacer uso de pesticidas, ya que en la mayoría de los casos hay efectos adversos a lo que se espera. Cabe mencionar que en estos casos la probabilidad no es una medida de control ni mitigación de algún peligro, debido a que los efectos ecológicos pueden provenir de diferentes fuentes y generalmente se debe analizar cuál es el componente específico que se desea proteger (Alfonso & Toro, 2010), por ejemplo el transporte de algunos compuestos en el agua subterránea, donde el componente a proteger sería el agua y la biota asociada.

Se hablan de tres tipos de compuestos químicos que producen efectos perjudiciales en la salud, en primer lugar se encuentran los mutágenos, que son sustancias que causan mutaciones perjudiciales y heredables en el ADN; los carcinógenos, sustancias que causan cáncer y finalmente los teratógenos, que son sustancias que están presentes en la madre y causan defectos de nacimiento en el feto (Baird & Cann, 2014). La mayoría de los compuestos organoclorados son mucho más solubles en medios orgánicos que en el agua, por esto se encuentran clasificados como contaminantes orgánicos persistentes (COP), debido a esta condición es más probable que estén absorbidos por la materia orgánica suspendida en el agua, en zonas fangosas de las cuencas y no necesariamente disueltos en el agua (Baird & Cann, 2014).

Muchos de los plaguicidas como los organoclorados, organofosforados y carbamatos, categorizados como persistentes según la Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas

para América Latina “RAP-AL”, se encuentran en los tejidos de los peces, más específicamente en sus tejidos grasos. Cuando el agua pasa a través de las branquias, se difunde de manera selectiva del agua hacia los tejidos grasos del animal, este proceso se denomina bioconcentración (Baird & Cann, 2014).

Por otro lado se habla de biomagnificación, cuando las especies bioacumulan compuestos orgánicos en sus tejidos grasos y estos a su vez no son metabolizados ni eliminados sino que por el contrario aumentan con respecto al tiempo y su concentración aumenta ascendiendo en una cadena trófica. Un ejemplo de ello fue realizado por el gobierno canadiense donde se muestra una relación directamente proporcional entre la concentración de DDT en las truchas y su edad en años (Ludwig & Auman, 1991).

Uno de los plaguicidas más conocidos es el para-diclorodifeniltricloroetano (DDT) de acción neurotóxica, llamado elixir de la muerte por la escritora Rachel Carson en su libro *la primavera silenciosa*, recibió ese nombre debido a la disminución poblacional de varios grupos de aves entre ellos el águila calva, estas aves incorporaron a su dieta material contaminado que se bioacumulaba desde lombrices, huevos de aves y peces; lo cual afectó la capacidad reproductiva inhibiendo el citocromo p450 responsable de la síntesis hormonal (estrógenos y testosterona) de las aves causando una drástica disminución poblacional por biomagnificación (Carson, 1960).

Otro ejemplo de biomagnificación se evidenció en las costas de Long Island, Estados Unidos, donde se encontraron concentraciones de Diclorodifeniltricloroetano “DDT” y Diclorodifenildicloroetileno “DDE” en el plancton de 0,04 ppm, 0,5 ppm en peces pequeños, 2 ppm en el pez aguja, llegando hasta cormoranes y águilas en 25 ppm. En estas aves el efecto

fue tan drástico que su capacidad de reproducción quedó dañada, cabe mencionar que la bioacumulación se da en su mayor parte por el consumo de alimentos contaminados y de una menor manera bebiendo agua. (Baird & Cann, 2014)

Los datos anteriormente mencionados corresponden a estudios de toxicología, que es la ciencia que se encarga del estudio de los efectos nocivos sobre los organismos frente a sustancias y componentes que son ajenos a ellos. Generalmente en esta ciencia, los efectos se determinan alimentando, inyectando o simplemente exponiendo a los seres vivos a la sustancia de interés y observando cómo afecta su salud (Jimenez & Kuhn, 2009). La toxicología ambiental se centra específicamente en exposiciones crónicas a dosis relativamente bajas de un compuesto tóxico durante largos periodos de tiempo (Lilia, 2014).

Para ayudar a comprender el grado de toxicidad de los diferentes compuestos se realizan experimentos con animales, generalmente ratones de laboratorio, si la dosis administrada para el experimento demuestra ser letal para el 50% de la población, se denomina dosis letal media (DL_{50}), cabe recalcar que entre menor sea el valor de la DL_{50} mayor será su toxicidad, ya que se requiere una menor cantidad para afectar el organismo (Baird & Cann, 2014).

2.1. Peces como indicadores

Actualmente los pesticidas encabezan la lista de componentes tóxicos más perjudiciales para el medio ambiente, produciendo en la vida acuática efectos teratógenos, carcinógenos y morfológicos sobre especies que no eran objeto de acción, entre estos grupos se encuentran los peces como uno de los más afectados (Soloneski & Larramendi, 2012). Por esta razón los peces son usados alrededor del mundo como bioindicadores de buena salud ecosistémica ya

que funcionan como modelo para monitorear la contaminación en ambientes acuáticos, eso se debe a que presentan sensibilidad frente a toxinas, que en ocasiones metabolizan y bioacumulan (Fazio, Marafioti, & Torre, 2013). Algunos autores (Otieno, Lalah, Virani, & Jondiko, 2010) encontraron concentraciones de carbofurán en cuerpos de agua entre 0,005 y 0,495 mg/L, estas zonas acuáticas se encontraban en lugares no cultivados, sin fertilizar y sin esterilizar, posteriormente en los tejidos de *Clarias gariepinus*, un pez ampliamente comercializado que habita en esos cuerpos de agua, se encontró evidencia de bioacumulación (Harabawy & Ibrahim, 2014).

Resultados obtenidos en laboratorio con la especie *C. gariepinus* demuestran que el carbofurán a dosis de 0,16 y 0,49 mg/L por 35 días, causa alteraciones hematológicas mutagénicas generando cambios en los parámetros bioquímicos en la sangre: en los eritrocitos se reportó una disminución en cantidad, efectos genotóxicos y morfológicos como micronucleos, acantocitos, eritrocitos pálidos, citoplasma con exceso de vacuolas; por otro lado, disminución de linfocitos, fosfatasa alcalina, albumina y globulina; y otros aumentos en la cantidad de neutrófilos, basófilos, monocitos, concentración de glucosa en plasma, lípidos totales, urea, creatinina y aminotransferasa. Concluyendo que esta especie puede ser usada como bioindicadora de contaminación en el agua (Harabawy & Ibrahim, 2014).

2.2. Malformaciones en peces

Al ser los peces utilizados como bioindicadores de calidad del agua, quiere decir que presentan unas características que los hacen fácilmente diferenciables si se encuentran en aguas contaminadas o limpias. Una de las características principales es que este grupo llega a presentar una serie de malformaciones congénitas, adquiridas durante etapas del desarrollo

embrionario y que son macroscópicamente visibles (Adler, 1974). Las malformaciones exógenas hacen referencia a aberraciones ocurridas entre el proceso de fecundación y el nacimiento o eclosión (Adler, 1974). Muchas de las malformaciones resultan de errores de origen genético, aunque en ocasiones son el resultado de la combinación de uno o varios factores ambientales que incluyen agentes infecciosos, hipoxia, desbalance nutricional, malas prácticas de manejo y otras condiciones relacionadas con situaciones de estrés (Bruno & Poppe, 1996).

Entre las malformaciones atribuidas a causas ambientales se menciona la reducción en el tamaño del huevo, decoloración general, alevines pseudo albinos, gemelos, cuerpo espiral, dos cabezas, dos colas, alteraciones del cráneo o mandíbula. Por otro lado también se mencionan algunas malformaciones atribuidas a condiciones genéticas como deformaciones óseas, aletas ausentes o duplicadas, cifosis, lordosis. (Bruno & Poppe, 1996).

2.3. Inhibidores endocrinos

Algunos pesticidas como el carbofurán se comportan como disruptores endocrinos, es decir que alteran los efectos de las hormonas enviando mensajes confusos al organismo, este pesticida también tiene el potencial de cambiar la expresión de los genes vitales relacionados con el desarrollo fetal, generando alteraciones en las hormonas, disfunción reproductiva o en algunos casos inmunosupresión (Jin, Chen, & Liu, 2010).

Los disruptores endocrinos químicos “DEQ” tienen la capacidad de provocar efectos adversos sobre la salud de un organismo o de su descendencia, entre los efectos de los DEQ se encuentran inhibidores de estrógenos, anti andrógenos, hormonas de la tiroides,

reguladores de ácidos grasos como la PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ), retinoides vinculados con la visión, crecimiento óseo, función inmune y activador de genes supresores de tumores; inhibidores de enzimas y receptores neurotransmisores que de manera independiente o en conjunto alteran fisiológicamente procesos de homeostasis, reproducción y procesos de desarrollo (Kandarakis, 2009).

La acetilcolinesterasa es mencionada como el principal objeto de acción por parte de los pesticidas organofosforados y carbamatos, esta enzima es responsable de la hidrólisis de la acetilcolina “ACh” produciendo colina y acetato, cuando se inhibe esta enzima provoca la acumulación de la ACh despolarizando la célula y provocando una parálisis neuromuscular. En ocasiones compuestos como el carbofurán causan efectos irreversibles en la vista, generan vómitos, diarreas, y en situaciones críticas sudoración, somnolencia, escalofríos y dificultad para respirar (Mendoza, 2008).

Otro estudio realizado demuestra que las hormonas de la tiroides en peces se ven inhibidas, entre ellas la triyodotironina “T3” y la tiroxina “T4”, que juegan un papel crucial en el desarrollo fetal, crecimiento del organismo y en el metabolismo asociado a la reproducción. Entonces alguna alteración en el eje de la tiroides puede causar serios problemas en el desarrollo normal, presentando problemas de diferenciación y crecimiento de estructuras en la mayoría de grupos vertebrados incluidos los peces (Brown & Adams, 2004).

2.4. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo también se encuentra asociado a la toxicidad en peces, ya que causa muerte celular y alteraciones en los procesos fisiológicos, algunos pesticidas pueden inducir estrés oxidativo generando una variedad de compuestos conocidos como Especies de

Oxígeno Reactivo “EOR”, entre dichos compuestos se encuentran H_2O_2 , O_2 , OH y algunos radicales libres que interactúan con el ADN causando rompimientos de la molécula y algunos otros daños en las cadenas (Lukacová & Knazická, 2013). Cuando no se encuentra un balance entre las enzimas antioxidantes celulares y las EOR, el sistema antioxidante no está disponible para eliminar o neutralizar el exceso de las EOR lo cual induce un estado de estrés oxidativo (Nishida, 2011).

Las defensas antioxidantes en peces incluyen enzimas como la glutatión-S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD), catalasa y otras defensas como la glutatión reductasa (GSH), vitaminas A, C y E, carotenos entre otros. También se encuentran compuestos extracelulares que actúan como fluidos barriendo radicales libres y EOR (Valavanidis & Vlahogianni, 2006). En peces la SOD y la catalasa actúan como primera línea de defensa contra el estrés oxidativo. La SOD cataliza el superóxido que se encuentra en desproporción, transformándolo en peróxido de hidrogeno y oxígeno, en ese momento la catalasa actúa descomponiendo el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno (Banaee, 2013).

3. Características de la especie *Oncorhynchus mykiss*

Comúnmente llamada trucha arcoíris, la especie *Oncorhynchus mykiss* cuyo nombre quiere decir “mandíbula en forma de gancho” es originaria de Estados Unidos, específicamente en lugares donde la temperatura a nivel del mar es de $20^{\circ}C$ a causa de la latitud. Habitan en zonas de aguas muy limpias, flujo rápido y bajas temperaturas, naturalmente pueden vivir en aguas cuya temperatura se encuentra entre los $4^{\circ}C$ y $25^{\circ}C$, en la etapa de alevinaje donde los tamaños oscilan entre los 5 y 8 cm la mortandad es de 15%, por otro lado se dan situaciones de canibalismo cuando el tamaño presenta diferencias de más del 30% (Parrado, 2012).

Pertenece a la familia Salmonidae, presentando un cuerpo fusiforme y alargado; una cabeza pequeña y una boca puntiaguda, la cual esta hendida hacia los ojos y posee una fila de dientes fuertes en cada una de las mandíbulas que le permiten atrapar sus presas (Rosado & Erazo, 2001). A su vez esta especie se caracteriza por que en sus huevos se encuentran altos contenidos lipídicos necesarios durante el desarrollo (Sargent & Henderson, 1989).

En referencia al contexto local en cuanto a la producción de trucha arcoíris en Colombia, se registran actualmente 43 empresas dedicadas a la distribución de trucha arcoíris, ya sea que estén dedicadas a la fertilización de huevos, importación de OVAS de truchas de fuentes extranjeras donde manipulan el sexo de los especímenes siendo estas hembras en su totalidad, crianza de alevines o maduración de alevines para consumo.

Los criaderos de trucha arcoíris necesitan condiciones específicas para su viabilidad, en primer lugar se tiene la calidad del agua donde se encuentra que el oxígeno debe estar entre 7,5 ppm - 12 ppm; Temperatura entre 12°C - 16°C y pH 6,5 – 8,5. La temperatura es una variable que debe saber manejarse ya que a una mayor temperatura, el desarrollo en los peces es más rápido, pero la cantidad de oxígeno disuelto es menor y la cantidad de amoníaco aumenta, es decir que a mayor temperatura se necesitará un caudal mayor en el criadero para suplir la demanda de oxígeno disuelto y evitar la acumulación de amoníaco (FAO, 2014).

La viabilidad de los alevines de trucha arcoíris la definen parámetros como la calidad de las ovas y las condiciones ambientales a las que se crían. Particularmente en la calidad, el vitelo es fundamental ya que provee lipoproteínas, fosfoproteínas y algunas inclusiones compuestas por triglicéridos, estas en conjunto proveen aminoácidos, fosfatos inorgánicos y calcio requeridos en estadios tempranos de desarrollo (Rosado, Landines, & Diaz, 2012).

Pregunta de investigación

¿Cuáles son las malformaciones en los embriones de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) a partir del estadio de pigmentación corporal bajo diferentes concentraciones sub letales de 2,2-DIMETHYL-2,3-DIHYDRO-1-BENZOFURAN-7-YL METHYLCARBAMATE en condiciones de laboratorio?

Justificación

Los pesticidas sintéticos han sido utilizados alrededor del mundo en la actividad agrícola desde 1950 (Greenpeace, 2015), actualmente se consideran una problemática debido a que el excesivo uso de estos ha generado acumulación en el suelo luego de continuas aplicaciones, persistencia en el ecosistema a causa de sus cualidades fisicoquímicas, y problemas de salud pública ambiental que incluyen efectos mutagénicos, carcinógenos y teratógenos en la biota (Alfonso & Toro, 2010).

Aunque los pesticidas orgánicos como los organoclorados, organofosforados y carbamatos se encuentran en el grupo de plaguicidas menos persistentes, estudios a lo largo del tiempo han ido reportando una serie de efectos tóxicos en la salud de los seres humanos, donde solo en Colombia se reportan 4.924 muertes por intoxicación con productos pertenecientes a esta categoría (Chaparro & Castañeda, 2015) (Fernandez & Mancipe, 2010).

Actualmente se utilizan diferentes modelos biológicos como ratones, aves y peces para probar la toxicidad y efectos de los pesticidas a nivel genético, metabólico y morfológico (Baird & Cann, 2014). Los resultados demuestran alteraciones vinculadas con desordenes inmunológicos, neurológicos, cáncer y defectos en los procesos de desarrollo en las diferentes especies (Harabawy & Ibrahim, 2014).

Particularmente el grupo de los peces es utilizado como indicador de la calidad del agua, y en este se han realizado estudios que demuestran la toxicidad de diferentes sustancias contaminantes en su desarrollo embrionario (Fazio, Marafioti, & Torre, 2013). Por esta razón

se pretende utilizar la especie *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), un pez de importancia económica (AUNAP, 2013) y cuyos estadios del desarrollo se encuentren ya establecidos (Bejarano, 1983), para analizar los efectos del plaguicida carbofurán caracterizado como inhibidor endocrino (NPIC, 2015) y altamente peligroso (RAP-AL, 2008).

Objetivos

Objetivo general

Analizar las diferentes malformaciones que se presentan durante el desarrollo embrionario de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) expuesta a concentraciones sub letales de carbofurán.

Objetivos específicos

- Describir y analizar los efectos morfológicos que se presentan en la especie *Oncorhynchus mykiss* durante la etapa final del desarrollo embrionario bajo las diferentes concentraciones sub letales de Carbofurán.
- Comparar los diferentes estadios finales de desarrollo del embrión de *Oncorhynchus mykiss* ante las concentraciones sub letales de Carbofurán con el tratamiento de control.
- Valorar el grado de mortalidad debido a las concentraciones de carbofurán en los embriones de *Oncorhynchus mykiss*.

Métodos

Los 1.500 embriones hembras en su totalidad de *Oncorhynchus mykiss* para el presente trabajo se importaron en conjunto con la empresa Acuagranja S.A.S. reconocida por su amplia trayectoria en asesorías e implementación de proyectos acuícolas, equipos de trabajo y manipulación de ovas de diferentes especies de peces comerciales teniendo en cuenta condiciones ambientales en el departamento de Cundinamarca.

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Ictiología – Embriología de la Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia. En este lugar se utilizaron motores, manguera para oxigenar, termómetro ambiental para mantener controlada la temperatura, nevera, estereoscopio, cajas Petri, fijador Bouin, acuarios y multiparámetro para verificar condiciones experimentales constantemente.

Las concentraciones utilizadas fueron basadas en la tesis de pregrado de Martínez, E (2016) quien trabajó el pesticida carbofurán teniendo en cuenta las dosis sub letales (50 ppm y 100 ppm) y sus efectos en la especie *Danio rerio*. Para la trucha se establece según (RAP-AL, 2008) la CL50 22mg/L tras 96h de exposición. Por otro lado para clasificar las malformaciones se utilizó como referencia el documento de (Burgos, 1999) que a su vez mencionó los documentos de (Arias & Solervicens, 1998), (Bruno & Poppe, 1996) y (Sadler, 1986).

Al ser recibidas las ovas se mantuvieron en una nevera a temperatura entre 6 - 8°C durante un periodo de 24 horas para adaptarlas al nuevo entorno y evitar una mortandad por causas

de manipulación y cambios bruscos de temperatura. Cumplido este periodo de tiempo se separaron en grupos de 100 ovas para cada uno de los tratamientos correspondientes a 2,0 ppm, 2,5 ppm, 3,0 ppm, 3,5 ppm y el control como se observa en la Figura 2.

Figura 2. Montaje del experimento; arriba: acuarios con las concentraciones de carbofurán; abajo: acuario de control.



Se realizaron 3 repeticiones bajo las mismas condiciones experimentales en un sistema cerrado con una temperatura de 12°C, pH: 7 y Oxígeno disuelto 9mg/L. esto con el fin de evitar alteración en los resultados debido a factores externos. Para mantener las condiciones adecuadas y constantes, se realizaban cambios de agua dos veces por semana (martes y viernes). Dichos cambios se realizaban reposando agua para evitar presencia de compuestos clorados, enfriando a 10°C y aplicando las disoluciones de carbofurán de cada uno de los tratamientos con pipeta de 10mL.

Debido a que el producto comercial denominado Furadán presentaba una concentración base de 330g/L, se procedió a tomar 3,03mL y completar con agua destilada hasta llegar a 1L con el fin de llegar a una “solución stock 1” de 1g/L. Para llegar a unas concentraciones más diluidas del pesticida, se tomó 1mL de la solución stock 1 y se completó con agua destilada hasta llegar a 5L, con la finalidad de obtener una concentración de 200µg/L, que se denominó “solución stock 2” y a partir de esta se realizaron los montajes anteriormente mencionados.

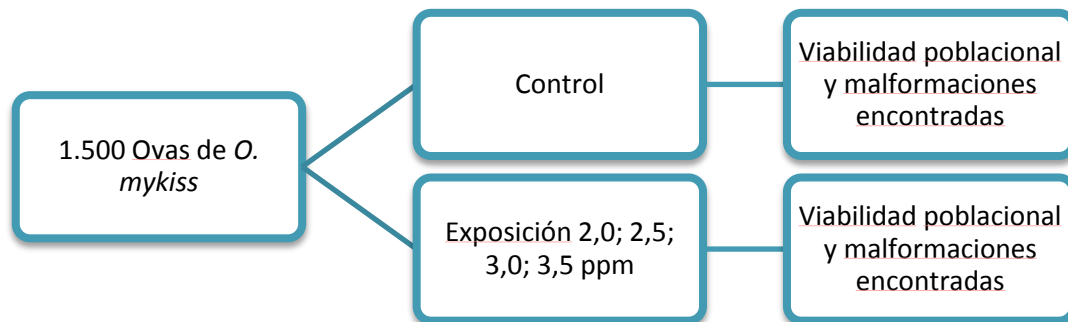
La solución de 2,0 ppm se realizó agregando 20mL de la solución stock 2 hasta completar 2L y así sucesivamente con las concentraciones 2,5 ppm, 3,0 ppm y 3,5 ppm. Cabe mencionar que en estos casos el agua utilizada no era destilada y estaba previamente reposada a temperatura entre 10 y 12°C. Después de tener listas las disoluciones se colocaron 100 ovas por cada uno de los tratamientos. Se puso el suplemento de oxígeno y se tomó la temperatura de cada acuario para verificar que todos tuvieran las mismas condiciones frente a la misma cantidad de agua para el experimento.

El periodo de observación da inicio al finalizar el transcurso de las 24 horas de aclimatación de las ovas que se encontraban en su totalidad en el estadio de pigmentación retinal (Anexo 3), hasta el punto en el que se realiza la absorción total del vitelo por parte de los alevines. La observación se realizó dos veces por semana con ayuda de un estereoscopio para detectar malformaciones y poder caracterizarlas, y medir las ovas con ayuda de una regla o un pie de rey. Los alevines que presentaban algún tipo de alteración morfológica macroscópica fueron analizados con el fin de obtener una descripción detallada acerca de las

posibles causas de su muerte, posteriormente fijados en recipientes de vidrio con una solución denominada fijador de Bouin (Anexo 4).

El diseño experimental fue basado en un estudio analítico de cegamiento de tratamiento, denominado de esta manera ya que el investigador desconoce las características de exposición que recibe cada grupo, el esquema del diseño se muestra en la Figura 3.

Figura 3. Esquema del diseño para la investigación basado en el propuesto por Celis de la Rosa (2014).



Por otro lado se realizará un cálculo de proporciones, con el fin de identificar el tipo de malformación que se presenta en la población de estudio mediante la fórmula:

$$P = m / N$$

Donde P es la proporción en la que se encuentra la malformación en el universo de estudio, m corresponde a la malformación o característica de interés, y N representa la población de individuos.

Finalmente se realizará un estudio cualitativo de incidencia acumulada (IA) que consiste en este caso en el número de individuos que adquieren una o más malformaciones durante un periodo de tiempo específico, esta medida proporciona un estimado de la probabilidad de que un individuo tomado de la población desarrolle un tipo de malformación durante un periodo de tiempo específico (Celis De La Rosa, 2014). Estos datos de incidencia acumulada se realizarán por tratamiento experimental, con el fin de analizar la actividad del pesticida en los embriones en desarrollo con la fórmula:

$$IA = \frac{\text{Número de casos de malformación durante el periodo de estudio}}{\text{total de la población en riesgo al inicio del periodo de estudio}}$$

Ya que los datos se muestran en grupos poblacionales iguales para cada uno de los tratamientos y repeticiones, se utilizará el programa estadístico IBM SPSS Statistics para realizar un análisis de varianza (ANOVA) con el fin de evaluar la importancia del factor concentración de carbofurán frente al número de individuos. Después de ello una prueba Tukey con el mismo programa para evidenciar que existan diferencias significativas entre los tratamientos.

Resultados

Inicialmente se identificaron los estadios del desarrollo desde el momento en el que llegaron las ovas hasta la etapa de reabsorción total del vitelo tomando como base las descripciones propuestas por Bejarano (Anexo 3). En la Tabla 1 se reportan las etapas del desarrollo correspondientes a las semanas que tardó la población en llegar al estadio de alevín mayor a 1,6 cm, donde ya no se encontraba la presencia del saco vitelino.

Tabla 1. Etapas del desarrollo de *Oncorhynchus mykiss* observadas durante la realización del experimento basada en la tabla propuesta por (Bejarano, 1983).

Tiempo de observación en semanas	Etapas del desarrollo en las que se encontraba la población
1	Pigmentación retinal inicial, Pigmentación corporal por melanóforos y aumento del tamaño del embrión
2	Pigmentación corporal por melanóforos y aumento del tamaño del embrión
3	Pigmentación corporal por melanóforos y aumento del tamaño del embrión, periodo de pre eclosión
4	Eclosión del alevino, Absorción parcial del vitelo
5	Absorción parcial del vitelo
6	Absorción total del vitelo, Alevín >1,6 cm

A medida que transcurría el tiempo la cantidad de ovas en cada uno de los tratamientos era menor, En la Tabla 2 se muestra el promedio de la cantidad de individuos de la tres repeticiones, y su disminución poblacional por concentraciones a medida de que transcurría el tiempo en semanas.

Se puede observar que los tratamientos experimentales con las concentraciones de 2,0 ppm y 2,5 ppm registraron una mortandad casi absoluta donde la de 2,5 ppm fue del 100%,

mientras que en la concentración de 2,0 ppm murió el 99,67% finalizando con vida solo 1 individuo. Por otro lado los tratamientos de 3,0 ppm y 3,5 ppm no registraron una mortandad total, estas fueron en promedio de 71,7% y 93,7 respectivamente. Para finalizar, en el control se observó una mortalidad del 43%.

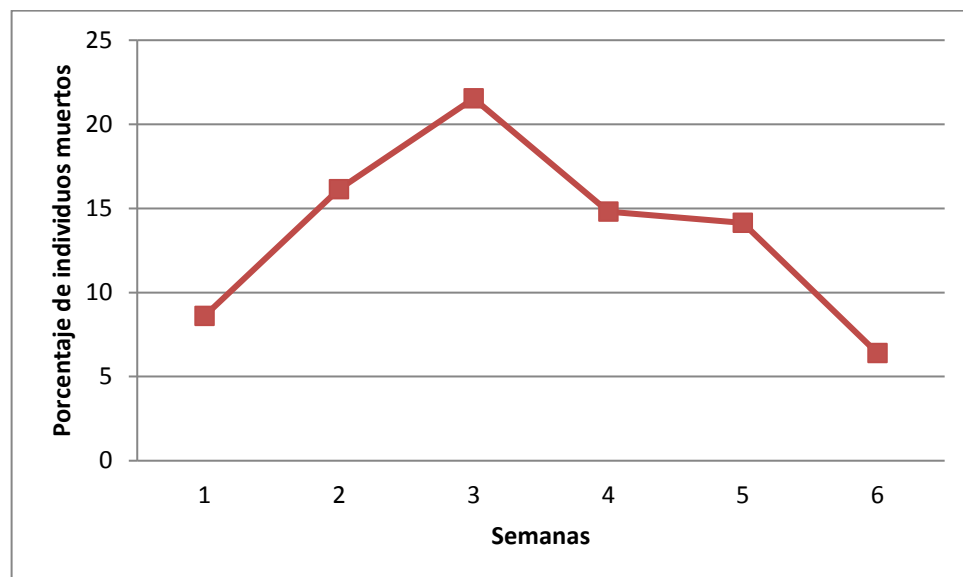
Tabla 2. Porcentajes y valores de mortalidad en los diferentes tratamientos transcurrido el tiempo en semanas durante el experimento.

Semanas	Control	2,0 ppm	2,5 ppm	3,0 ppm	3,5 ppm
1	4% 12	7.67% 23	12.67% 38	5.33% 16	13.3% 40
2	12.3% 37	31% 93	41.67% 125	12% 36	26.67% 80
3	20.3% 61	65% 195	64.3% 193	34.67% 104	47% 141
4	28.67% 86	81.3% 244	79.67% 239	53.3% 160	62.3% 187
5	34% 102	94.67% 284	98% 294	67.3% 202	82% 246
6	43% 129	99.67% 299	100% 300	71.67% 215	93.67% 281

En los puntos donde hubo una mayor disminución poblacional por cada uno de los tratamientos fue durante la semana 3 registrándose una mortandad en las 3 repeticiones del experimento de 21%, por el contrario en la semana que se detectó un menor número de muertes fue durante la última semana con un porcentaje de pérdida de individuos de 6,4%. En la Figura 4 se puede observar el promedio en porcentaje de individuos muertos durante la realización de este estudio.

Al sumar todos los porcentajes de mortandad de los embriones de *Oncorhynchus mykiss* da un valor de 81,6%, es decir, de los 1.500 ovas que se utilizaron para la realización de este trabajo, 1.224 murieron, y el 18,4% correspondiente a 276 ovas sobrevivieron, y de este último porcentaje 11,4% corresponde a alevines vivos en el tratamiento de control, 5,67% sobrevivieron al tratamiento de 3,0 ppm, 0,07% y 1,27% sobrevivieron a los tratamientos de 2,0 ppm y 3,5 ppm respectivamente.

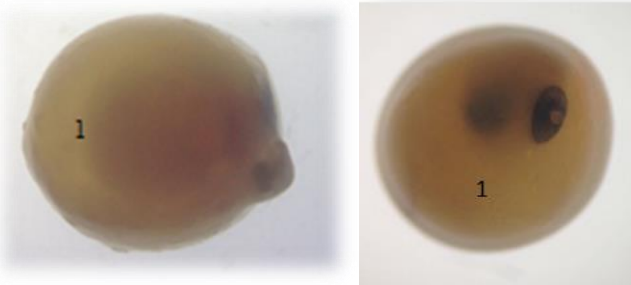
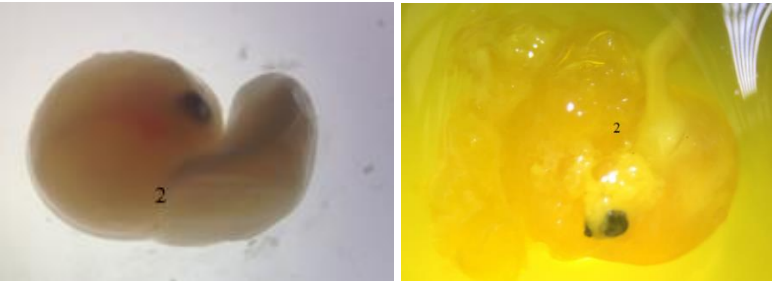
Figura 4. Porcentajes de individuos muertos por semanas durante la realización del experimento.

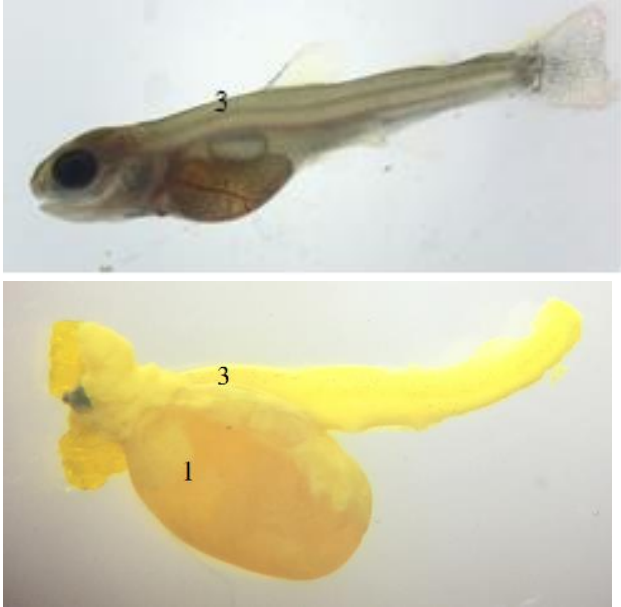
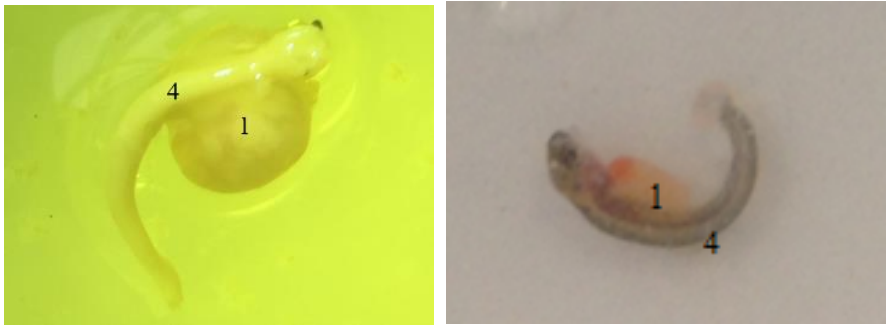



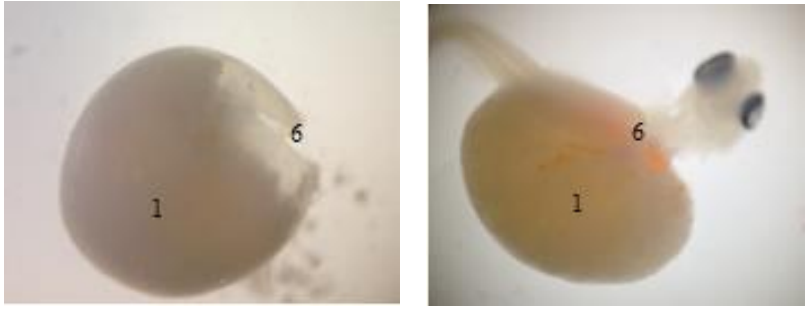
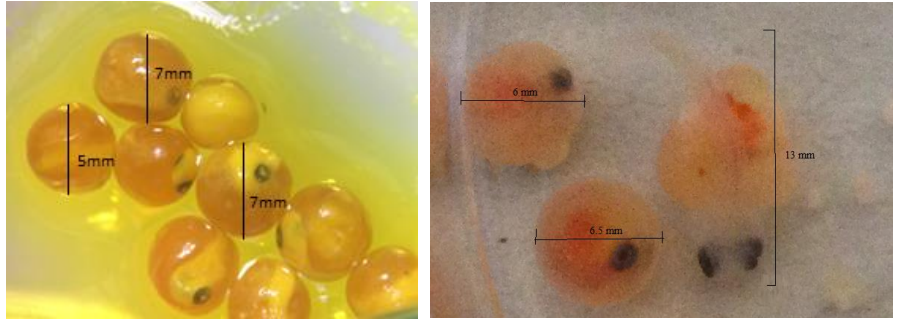

A partir de los datos anteriores se puede decir que en los tratamientos en los que hubo una mortandad más alta son los de 2,0 ppm y 2,5 ppm. Las principales causas atribuidas a las muertes durante el desarrollo embrionario en las ovas de trucha arcoíris se encuentran en la Tabla 3, de igual manera se encuentran las descripciones de cada una de las alteraciones macroscópicas evidenciadas.

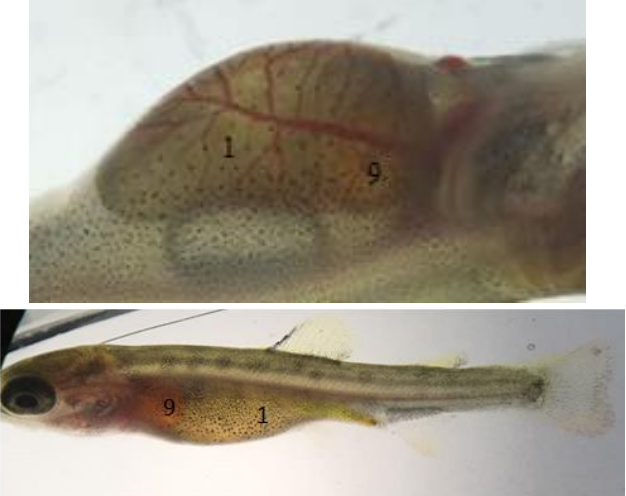
En general la mayoría de las muertes durante el desarrollo de las ovas de trucha está relacionado con causas de alteraciones en el vitelo, tanto la membrana como en el contenido vitelino, que como se mencionó anteriormente es rico en lípidos y proteínas fundamentales para el desarrollo de los individuos.

Tabla 3. Alteraciones morfológicas macroscópicas encontradas en los embriones de *Oncorhynchus mykiss* durante su desarrollo.

Alteraciones morfológicas	Descripción
<p>Oscurecimiento del saco vitelino</p> <p>(O-SV)</p>	<p>El saco vitelino (1) toma una coloración grisácea, se torna rígido y al ser observado al microscopio se evidencia que la estructura membranosa carece de poros que comuniquen con el medio exterior (Arias & Solervicens, 1998).</p> <div style="text-align: center;">  </div>
<p>Fusión o vitelo adicional</p> <p>(VA)</p>	<p>Corresponde a individuos dobles, en este caso se observa una unión por su estructura vitelina (2) donde puede uno presentar un mayor tamaño que el otro (Bruno & Poppe, 1996). La unión se da específicamente por los componentes de la pared del saco denominados somatopleura (ectodermo más la hoja somática del mesodermo lateral) y esplacnopleura (endodermo más la hoja esplácnica del mesodermo lateral), es decir, poseen en común la masa de vitelo y la cavidad celómica (Burgos, 1999)</p> <div style="text-align: center;">  </div>

<p>Cifosis - Lordosis (CI-LO)</p>	<p>Curvatura anormal de la parte anterior de la columna (3) que crea una apariencia encorvada en la postura. Los individuos con este tipo de malformación mantienen una completa normalidad de sus órganos internos pero a medida que crece se produce cierta degeneración de la musculatura aledaña a las vértebras “Cifosis” (Burgos, 1999) Cuando la desviación angular de la columna se da en un sentido dorsal La patología se clasifica como “Lordosis” (Lonstein, 1999).</p> 
<p>Escoliosis (ES)</p>	<p>Inclinación de las vértebras que genera una apariencia de la columna (4) en forma de “S” o de “C”. (Burgos, 1999)</p> 
<p>Edema del saco vitelino (E-SV)</p>	<p>Los edemas se dan principalmente por la acumulación de líquidos relacionados con actividades metabólicas, en este caso se evidencia la presencia de ellos ya que se observa un ensanchamiento de la región vitelina y en la mayoría de los casos unos puntos de color naranja o amarillo fuerte (5) dentro del vitelo (1) (Arias & Solervicens, 1998).</p>

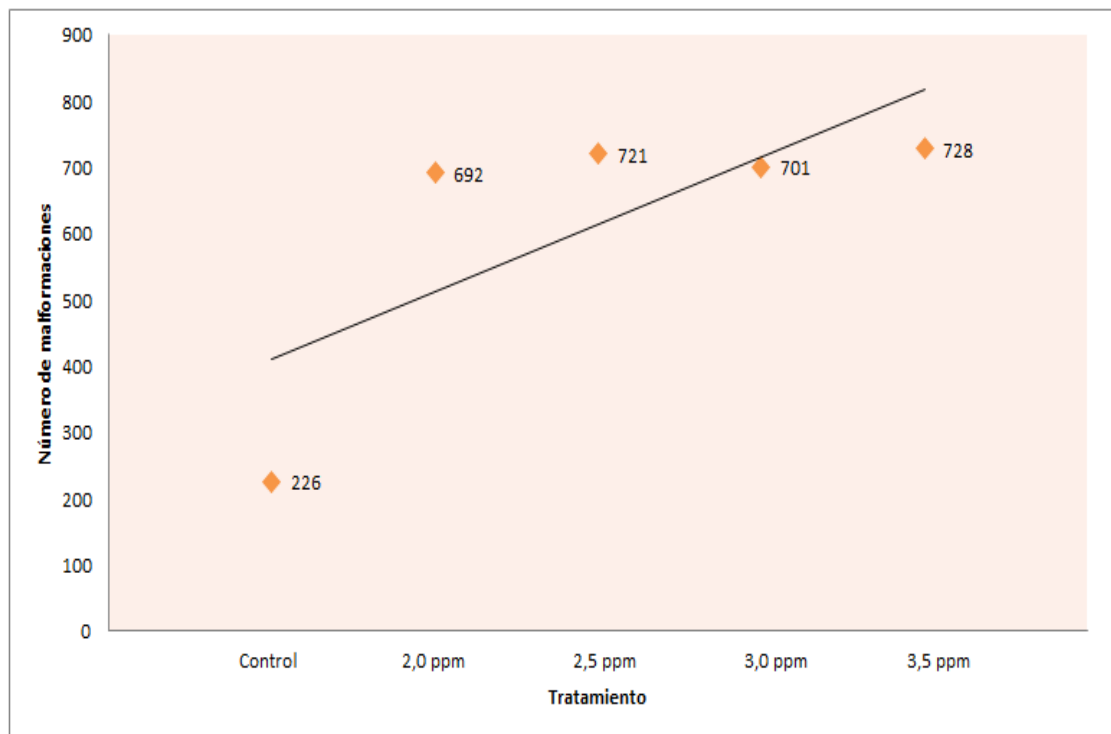
	
<p>Constricción del saco vitelino (C-SV)</p>	<p>El saco vitelino (1) se contrae en el extremo apical (6), es decir, el que está unido directamente al embrión, donde al terminar de coagular se desprende (Arias & Solervicens, 1998).</p> 
<p>Reducción de tamaño (RT)</p>	<p>Algunos de los embriones presentan un tamaño menor en comparación con otros que tienen el mismo tiempo de desarrollo (Sadler, 1986).</p> 
<p>Decoloración (DE)</p>	<p>El alevín presenta una falta de pigmentación (7) en todo su cuerpo, normalmente el vitelo (1) presenta un color anaranjado fuerte pero en este caso se torna de un color translucido opaco que permite evidenciar los vasos sanguíneos (8), de igual manera el alevín se torna en un color blanco casi translucido (Bruno & Poppe, 1996).</p> 

<p>Edema pericárdico</p> <p>(EP)</p>	<p>Acumulación de fluidos cercanos a la cavidad pericárdica donde en la parte del corazón se evidencian unos coágulos (9) de color amarillo fuerte de un tamaño aproximado a 1/5 del tamaño del saco vitelino (1) (Arias & Solervicens, 1998).</p> 
--------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

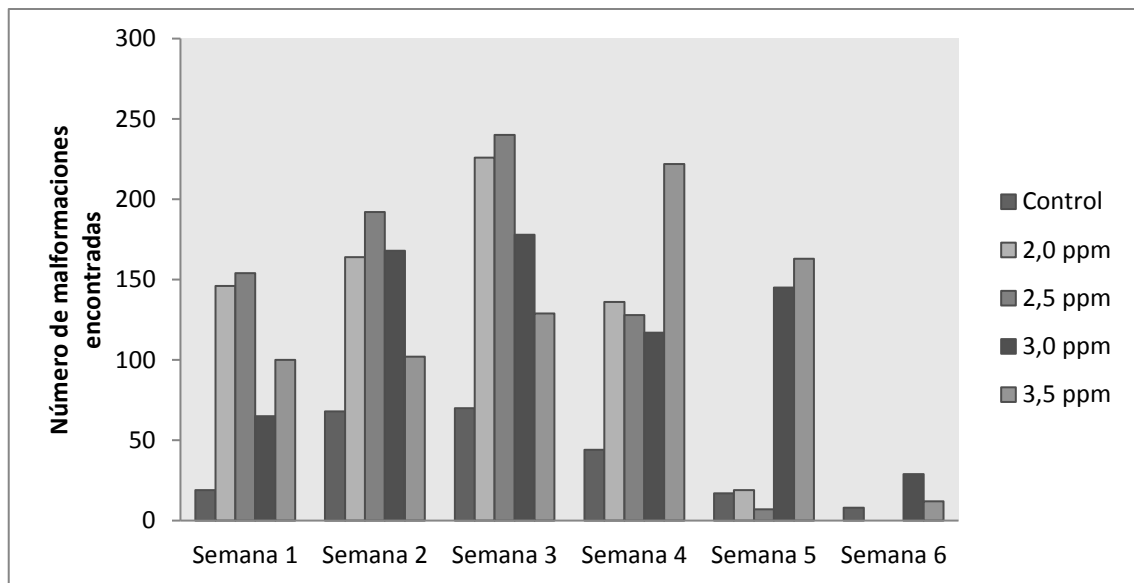
En la Figura 5 se observa la cantidad de malformaciones por tratamiento y una línea de tendencia que cruza a través de los datos, se evidencia una relación directamente proporcional entre la concentración de carbofurán y la cantidad de casos de alteraciones morfológicas encontradas.

Tomando en cuenta la Figura 5, se acepta la hipótesis planteada de que a medida que aumenta la concentración de carbofurán, también lo hará el número de malformaciones encontradas. A pesar de que en el tratamiento de 3,0 ppm se observó una menor cantidad de malformaciones, la línea de tendencia muestra claramente el incremento por lo que se acepta la hipótesis del experimento.

Figura 5. Malformaciones por cada uno de los tratamientos realizados.



Al establecer la relación entre las semanas y las malformaciones se puede decir que hubo una mayor cantidad de alteraciones morfológicas durante la semana 3, en este punto los alevines se encontraban finalizando el estadio de pigmentación corporal, aumentando su tamaño y preparándose para la eclosión que tendría lugar durante el transcurso de esa semana. Por otro lado la semana que presentó una menor cantidad de malformaciones fue la 6, la Figura 6 muestra la cantidad de alteraciones morfológicas encontradas durante cada semana hasta que finaliza el experimento.

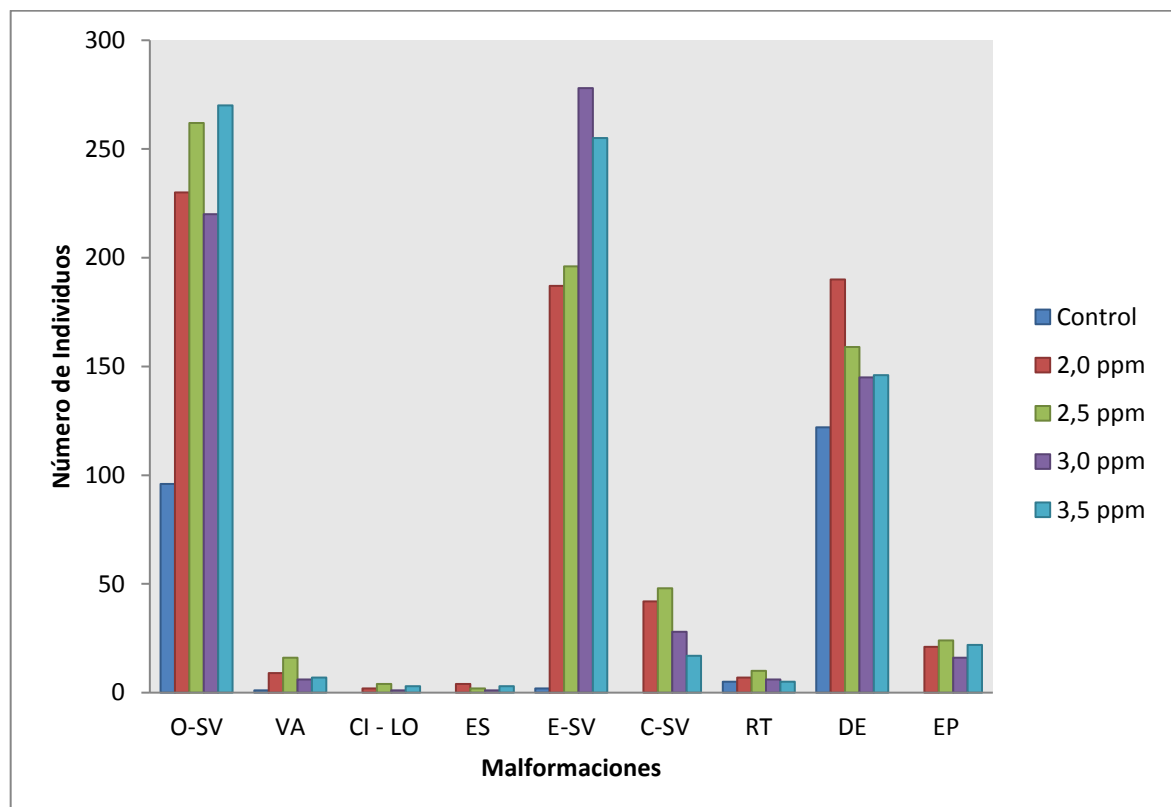
Figura 6. Malformaciones encontradas por semana en cada uno de los tratamientos.

En la Figura 6 se muestra que el tratamiento de control presenta un menor número de malformaciones durante las cuatro primeras semanas, pero durante la semana 5 supera al tratamiento de 2,5 ppm por 12 malformaciones, presentando este último 4 individuos con oscurecimiento del saco vitelino, 2 presentaban edemas en el saco vitelino y un individuo con la malformación edema pericárdico.

Se puede observar que durante 5 semanas desde el inicio del experimento, todos los tratamientos presentaron malformaciones, pero en la sexta semana los tratamientos de 2,0 ppm y 2,5 ppm no registran malformaciones, esto se debe fundamentalmente a que solo un individuo perteneciente a la concentración 2,0 ppm logró llegar a esta semana con vida, cabe mencionar que este único individuo presentaba oscurecimiento en el saco vitelino al iniciar la semana, cuando aún quedaba una porción de vitelo que terminaría de absorber exitosamente.

Durante las tres primeras semanas del experimento el tratamiento que se caracterizó por presentar un mayor número de malformaciones fue el de 2,5 ppm, donde para la primera semana reporta 154, para la segunda 192 y para la tercera se reporta el pico más alto de malformaciones encontradas que es de 239. El siguiente valor considerado elevado se registra durante la misma semana 3 para el tratamiento 2,0 ppm con 226 alteraciones morfológicas, muy cercanas a las 220 evidenciadas durante la semana 4 en el tratamiento de 3,5 ppm. En la Figura 7, se observa con más detalle cuales fueron las malformaciones que se evidenciaron en cada uno de los tratamientos.

Figura 7. Número de malformaciones por tratamiento durante la realización del experimento.



En la Figura 7 se muestra que el tratamiento de control presento una diferencia en cuanto a la presencia y el número de las malformaciones que se presentaron, en el tratamiento de 3,0 ppm se muestra que la malformación edema en el saco vitelino presenta el valor más alto de toda la gráfica con presencia en 278 individuos. Por otro lado se puede apreciar que las malformaciones de cifosis – lordosis y escoliosis no representan una cantidad significativa en la población de individuos malformados.

En el tratamiento de control la malformación que se presenta en mayor proporción es decoloración con 122 individuos afectados, en los tratamientos de 2,0 ppm, 2,5 ppm y 3,5 ppm la malformación que presenta la cifra más alta corresponde al oscurecimiento del saco vitelino con 230, 262 y 270 individuos respectivamente.

Para observar la proporción en que se encuentra alguna malformación en las ovas de *Oncorhynchus mykiss*, se utilizó como “m” la cantidad de individuos que presentaban la malformación encontrada, por otro lado “N” representada con el número total de individuos utilizados para el estudio que en este caso fueron 1.500 embriones. Los datos del cálculo de proporción de cada una de las malformaciones se muestran en la Tabla 4.

En la Tabla 4 se muestra que las proporciones más altas con respecto a la presencia de algún tipo de malformación en el universo de estudio, pertenecen a oscurecimiento del saco vitelino (O-SV) con un valor de 0,719 siendo el más alto, le sigue la presencia de edemas en el saco vitelino (E-SV) con una proporción de 0,612 y también se encuentra con un valor de 0,508 la decoloración (DE) del individuo.

Tabla 4. Cálculo de proporción en que se encuentran las malformaciones.

Alteraciones morfológicas	Cálculo de proporción	Control	2,0 ppm	2,5 ppm	3,0 ppm	3,5 ppm
Oscurecimiento del saco vitelino	0.719	0.32	0.77	0.87	0.73	0.90
Edema del saco vitelino	0.612	0.01	0.62	0.65	0.93	0.85
Decoloración	0.508	0.41	0.63	0.53	0.48	0.49
Constricción del saco vitelino	0.090	0.00	0.14	0.16	0.09	0.06
Edema pericárdico	0.055	0.00	0.07	0.08	0.05	0.07
Fusión o vitelo adicional	0.026	0.00	0.03	0.05	0.02	0.02
Reducción de tamaño	0.022	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02
Escoliosis	0.007	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01
Cifosis - Lordosis	0.005	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01

En los tratamientos de 2,5 ppm y 3,5 ppm se evidencia la presencia de todas las malformaciones encontradas durante la realización del experimento, a su vez la que tuvo una mayor presencia en los dos fue la malformación oscurecimiento del saco vitelino con valores 0,87 y 0,90 respectivamente. Por otro lado las malformaciones que menos se observaron en estos dos tratamientos fueron Cifosis – Lordosis y Escoliosis, con valores de 0,01 representados por menos de 5 individuos afectados cada una.

En la tabla se muestran las malformaciones que estuvieron presentes todos los tratamientos las cuales son: oscurecimiento del saco vitelino, edema en el saco vitelino, reducción de tamaño y decoloración; específicamente las malformaciones denominadas vitelo adicional, constricción del saco vitelino y edema pericárdico se encontraron en todas las concentraciones con presencia del pesticida comercial furadán.

Para el cálculo de la incidencia acumulada es necesario tener en cuenta que la exposición de las ovas al agente carbofurán fue de 6 semanas, equivalente a 42 días, y que la población en riesgo de contraer algún tipo de malformación a causa del carbofurán es de 1.200 individuos, es decir, no se tendrá en cuenta el tratamiento de control ya que no se considera como población en riesgo según la ecuación para el cálculo de la “IA”.

Se encontraron en total 3.068 casos de malformaciones en los 42 días de exposición al carbofurán, y teniendo en cuenta que la población en riesgo es de 1.200 individuos nos da como resultado el cálculo de la IA 2,56, este valor expresa que del total de individuos considerados en riesgo, presentaban al menos dos malformaciones de las descritas en la Tabla 3. Específicamente, si se quiere observar en que tratamiento se observa un índice IA mayor ver Tabla 5.

Tabla 5. *Calculo de la Incidencia Acumulada para cada uno de los tratamientos realizados*

Tratamiento	Incidencia Acumulada
2 µg/L	2.31
2.5 µg/L	2.40
3 µg/L	2.34
3.5 µg/L	2.43

En todos los tratamientos la incidencia acumulada es mayor que 2, lo que quiere decir que la probabilidad de que cada individuo escogido al azar tenga mínimo dos malformaciones es del 100%. Se observa que en los tratamientos donde se presentan más malformaciones corresponden al de 2.5 ppm y 3.5 ppm. Al ser comparados estos resultados con los de mortalidad de individuos por tratamiento donde la disminución poblacional fue mayor en las

concentraciones de 2 ppm y 2.5 ppm, se dice que no necesariamente en el lugar donde hubo más muertes hubo una mayor cantidad de malformaciones.

El análisis de varianza (ANOVA) se realizó con ayuda del programa IBM SPSS Statistics, donde se obtuvo un valor de significancia menor a 0,05 (Anexo 5), esto quiere decir que se rechaza la hipótesis de igualdad de medias ya que existen diferencias entre los tratamientos. De igual manera el estadístico de Levene que arroja el programa (Anexo 6) con unos valores de significancia mayores a 0,05 en las seis semanas de datos tomados, permitió hacer el análisis post hoc de la prueba de Tukey.

Por otro lado la prueba de Tukey demuestra que existen diferencias entre los datos tomados por cada tratamiento cada 7 días durante la realización total del experimento, los valores de significancia se muestran en la tabla (Anexo 7) donde cada uno de los tratamientos están representados por números, control (1), 2,0 ppm (2), 2,5 ppm (3), 3,0 ppm (4) y 3,5 ppm (5). En la Tabla de la prueba de Tukey se observa en que tratamientos existe una significancia mayor a 0,05 que representa el 47,5% de los 120 datos comparados, mientras que los datos que presentan una menor diferencia entre si corresponden al 52,5%.

Particularmente en la toma de datos de la primera semana los tratamientos que presentan una mayor diferencia entre si son 2,5 ppm y 3,5 ppm con un valor de 0,999; durante la segunda semana con valor de 1,00 difieren más el control y el tratamiento de 3,0 ppm; y de la tercera a la sexta semana los tratamientos que presentaron una mayor diferencia entre sus datos de disminución poblacional fueron 2,0 ppm y 2,5.

Análisis de resultados

Para empezar, se tiene que en el tratamiento control se presentó una mortandad de 43%, donde destacaron las malformaciones denominadas oscurecimiento en el saco vitelino y decoloración, con 96 y 122 individuos respectivamente. Estas alteraciones se atribuyen principalmente a causas de manejo y criopreservación al momento de enviar las truchas, entre las problemáticas asociadas a estas prácticas se encuentran: daños en los embriones debido a que las membranas no absorben suficiente crioprotector; sensibilidad de los embriones a la temperatura; y en la mayoría de los casos toxicidad asociada a los crioprotectores (Janik, Kleinhans, & Hagedorn, 2000).

Los crioprotectores más utilizados en este tipo de procesos son: metanol, etilenglicol, dimetilsulfóxido, propanediol y dimetil-lacetamida (Castillo, Cruz, & Medina, 2016). Por otro lado Roberts & Shepherd (1986) mencionan que en condiciones normales, la cantidad de individuos malformados puede ascender al 15%, donde la gran mayoría de no podría ni siquiera llegar a la eclosión.

Para este estudio la cantidad de individuos que llegaron a completar exitosamente la fase de la eclosión fue de 584, de los cuales 211 corresponden al primer experimento, 188 durante el segundo y 185 para la segunda repetición. Si se atribuye una mortandad considerada normal del 15% sobre la población inicial, quiere decir que de los 1500 embriones iniciales, 225 no llegarían a la eclosión según lo plantean Roberts & Shepherd (1986), por lo tanto las 691 muertes restantes de individuos antes de llegar a eclosionar, se pueden vincular a efectos del carbofurán como inhibidor endocrino o causante de estrés oxidativo.

Al analizar los estadios de desarrollo y compararlos con la cantidad de muertes se obtuvo que en la semana 3 de la realización del experimento hubo un mayor porcentaje de individuos muertos. Particularmente en esta semana los individuos se encontraban en los estadios de pigmentación corporal por melanóforos y pre-eclosión, caracterizadas por un aumento en el tamaño del embrión y la segregación de enzimas disolutivas del corion que permitirían la eclosión del alevín, Kandarakis (2009) y Jin, Chen & Liu (2010) encontraron que el efecto del carbofurán como disruptor endocrino tuvo una influencia al momento en el que se liberarían las enzimas que disolverían el corion, impidiendo a los alevines eclosionar y continuar con su desarrollo normal.

Particularmente entre la semana 3 y 4, cuando los alevines están eclosionando realizan movimientos vigorosos y latigazos caudales que lo ayudan a salir del corion, por lo que la mortandad en estos casos se atribuye a la acción del carbofurán despolarizando la célula por acción acumulativa de ACh y provocar una parálisis neuromuscular como menciona Mendoza (2008). De igual manera si el corion no se disuelve, resulta imposible que el alevín lo logre romper y de esta manera eclosionar para continuar su desarrollo, por lo que también se puede atribuir el efecto despolarizador a la malformación de reducción de tamaño donde se pausa el crecimiento en tamaño de los 33 embriones que presentaron esta característica. Hayes (1975) menciona una patología descrita como “enfermedad desmielinizante de los fosforados orgánicos”, donde se pierde la capa de mielina involucrada con la transmisión de impulsos nerviosos impidiendo una respuesta motriz adecuada por parte de los alevines ocasionándoles la muerte.

Al realizar una comparación entre las malformaciones se encuentra que oscurecimiento del saco vitelino, edema del saco vitelino, decoloración, constricción del saco vitelino, edema pericárdico, vitelo adicional y reducción de tamaño están relacionadas con problemas en el saco vitelino, mientras que las otras dos que corresponden a cifosis – lordosis y escoliosis tienen una relación más ligada a causas genéticas.

Arias & Solervicens (1998) mencionan que los edemas se producen debido a la pérdida de la capacidad de eliminación de residuos metabólicos, en general los peces de aguas continentales dependen de las branquias, la piel y los riñones para mantener la osmolaridad. Algún problema en los riñones asociado a carbamatos como la hidronefrosis mencionada por Consenza, ME & Bidanset, J (1995) genera una acumulación de residuos metabólicos vinculados con el oscurecimiento del saco vitelino, la presencia de edemas y coágulos (Neira, 2014) donde las dos primeras presentaron cálculos de proporciones en la población de 0,719 y 0,612 respectivamente, siendo los valores más altos.

Algunas de las alteraciones morfológicas encontradas se basan en un aumento del volumen celular como la constricción del saco vitelino en el que este crece mientras se coagula y finalmente se desprende, según López (2013) estos cambios en el tamaño se atribuyen a efectos fisiológicos con un papel importante en el metabolismo celular como respuesta al estrés oxidativo, cambios medio ambientales, alteración de la membrana celular y de los medios citoplasmáticos. Jarpa (1988) por otro lado, atribuye la constricción del saco vitelino al esfuerzo que tiene que hacer el alevín para nadar sobre superficies lisas, lo que genera un desprendimiento del saco y la muerte del individuo. Cabe mencionar que esta patología solo se evidencio en alevines eclosionados, es decir, durante la tercera semana se reportaron 40

casos, en la cuarta semana 65, para la quinta 24 y en la semana 6 se presentaron 7 casos en el tratamiento 3,0 ppm donde su vitelo presentaba composición sólida y coloración grisácea, signo de acumulación de residuos metabólicos.

En estudios toxicológicos se menciona que los pesticidas organofosforados producen estrés oxidativo en diferentes tejidos a través de la formación de Especies de Oxígeno Reactivas “EOR”, definiéndose como moléculas que actúan debido a la presencia electrones de valencia no apareados, estos causan reacciones con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido- reducción (Hicks & Gomez, 2007).

Frente a un aumento de la concentración a causa de factores abióticos como metales pesados, pesticidas y radiación ultravioleta, el equilibrio entre la producción y eliminación de EOR se ve perturbado causando daños en las estructuras celulares como fragmentación del ADN, degradación de proteínas, incrementos en la peroxidación lipídica y muerte celular (Gill & Tuteja, 2010). Basado en el estudio de (Ojha, Yaduvanshi, & Srivastava, 2011) las malformaciones relacionadas con la desviación de la columna vertebral, se pueden atribuir al efecto de las EOR en el genoma que se expresan en la cifosis, lordosis y escoliosis evidenciadas en 20 alevines presentes en los acuarios con el pesticida.

Según lo anteriormente mencionado, el daño celular producto de la acumulación de residuos metabólicos debido a la inadecuada degradación de proteínas, se relaciona con las malformaciones de vitelo adicional cuya proporción en la población es de 0,026, donde el vitelo se hincha y mezcla con otros según lo plantea Roberts & Shepherd (1986) y la malformación de falta de pigmentación, donde los melanóforos no reciben adecuadamente los nutrientes y las proteínas necesarias para que sean metabolizadas (Banaee, 2013) y se

reflejen en la pigmentación corporal del alevín quien presentara esa apariencia translúcida característica con valor según el cálculo de proporción de 0,508.

Los organofosforados orgánicos pueden provocar una serie de cambios encefalográficos, que no necesariamente son atribuibles a condiciones anóxicas, sino a causas de intoxicación con pesticidas incluso hasta tres semanas después del incidente (Grob, 1947) corroborado por (Holmes, 1964) por lo que una alteración generada en un estadio temprano del desarrollo puede llegar a manifestarse mucho después, generando cierto grado de incertidumbre al momento de establecer las causas.

La alta mortandad evidenciada en los tratamientos 2,0 ppm y 2,5 ppm se puede relacionar con la cantidad de individuos que no superaron la etapa de eclosión, como se había mencionado anteriormente la eclosión tiene lugar durante las semanas 3 y 4, y es justamente en este periodo de tiempo que la cantidad de muertes se encuentra entre 65% y 81% para 2,0 ppm y 64% y 80% para la concentración de 2,5 ppm, pero esta última reportó 240 malformaciones al finalizar la semana 3 presentando el mayor número de alteraciones morfológicas en todo el experimento, mientras que el tratamiento de 2,0 ppm registra 226, siendo este el segundo dato observado más alto, estos valores básicamente dan soporte a lo observado en las diferencias de la prueba de Tukey donde son estos dos tratamientos los que más difieren entre si desde la tercera hasta la sexta semana.

En el tratamiento de 3,0 ppm se registró la menor mortandad con respecto a los demás tratamientos con presencia de carbofurán, esta fue de 71,7%, al observar el comportamiento de las alteraciones morfológicas, se tiene que al finalizar la primera semana solo se registraron 67 malformaciones a comparación de los demás tratamientos cuyas cifras están

por encima de 100. Teniendo en cuenta que la malformación de edema en el saco vitelino es la que tiene mayor presencia en este tratamiento, quiere decir que no necesariamente es mortal ya que los alevines lograron terminar el proceso de absorción.

Se observa también que en el tratamiento de 3,5 ppm hay una mortandad superior al 90%, esta concentración registra 100 malformaciones al finalizar la primera semana, 102 al terminar la segunda y 129 en la tercera; pero es en la cuarta semana donde las malformaciones ascienden a 222, reportando el tercer mayor número de alteraciones morfológicas en el estudio, de estas 222, 86 corresponden a decoloración, 62 a edema en el saco vitelino y 56 a oscurecimiento del saco vitelino. Ya que los edemas no necesariamente están vinculados a la muerte de los embriones, la decoloración del alevín y el oscurecimiento del saco vitelino se reportan como el principal factor influenciado en la muerte de alevines.

Los datos arrojados por las pruebas estadísticas dan a entender que se presenta una diferencia significativa en cuanto a las disminuciones poblacionales que se tomaron semanalmente a lo largo del experimento. Por otro lado la prueba de Tukey muestra específicamente dónde están esas diferencias y entre que tratamientos se presentan obteniendo como resultado una diferencia entre la cantidad de muertes. Comparando los datos del control con cada uno de los tratamientos arroja un resultado que muestra que la diferencia poblacional del control con respecto al tratamiento de 3,0 ppm, donde la significancia es la más alta del grupo comparativo durante las semanas 1, 2, 3 y 4 (Anexo 7). Por otro lado, se evidencia que los tratamientos que tuvieron presencia del carbofurán, presentaron una mayor diferencia en cuanto a sus disminuciones poblacionales en las semanas 3, 4, 5 y 6 son las concentraciones de 2,0 y 2,5 ppm.

Conclusiones

Se logra evidenciar la presencia de nueve malformaciones a nivel macroscópico en toda la población estudiada, denominadas oscurecimiento del saco vitelino, edema del saco vitelino, decoloración, constricción del saco vitelino, edema pericárdico, vitelo adicional, reducción de tamaño, escoliosis, cifosis y lordosis. Estas se pueden atribuir directa e indirectamente al carbofurán, ya que dicho compuesto afecta desde niveles moleculares hasta expresiones fenotípicas, indicando que hay un problema en el metabolismo de los peces que les impide completar su ciclo de desarrollo.

Las malformaciones que más se evidenciaron en la población corresponden a oscurecimiento del saco vitelino, edemas en el saco vitelino y decoloración; por otro lado las que se evidenciaron en menor cantidad fueron escoliosis, cifosis y lordosis.

En el tratamiento de control se presentaron 226 malformaciones mientras que los tratamientos con presencia de carbofurán presentaron 2.842 malformaciones donde 692 corresponden al tratamiento de 2,0 ppm; 721 a 2,5 ppm; 701 a 3,0 ppm y finalmente 728 a la concentración de 3,5 ppm por lo que se acepta la hipótesis, ya que el tratamiento de 2,0 ppm presenta el menor número de malformaciones reportadas y el de 3,5 ppm la cifra más alta.

La semana 3 se caracterizó por presentar un mayor número de muertes y malformaciones con 323 y 843 respectivamente. Por otro lado en la sexta semana se reportaron 96 individuos muertos y 49 malformaciones registradas presentando los valores más bajos.

Finalmente teniendo en cuenta las cifras obtenidas tanto de mortalidad cercana al 100%, como de las 9 malformaciones a unas concentraciones tan bajas de carbofurán, comparadas con las de RAP-AL (2008) quienes mencionan que la DL50 para trucha arcoíris es de 22mg/L, se concluye en este trabajo que la DL50 para *O. mykiss* durante periodos de exposición de 6 semanas (1.008h) es 3 ppm con una mortalidad de 56%, teniendo en cuenta que el rango de mortalidad de las ovas es del 15% por condiciones naturales.

Referencias Bibliográficas

- Adler, R. (1974). *Biología del desarrollo y malformaciones congénitas*. Buenos Aires: Editorial El Ateneo Pedro Garcia S.A.
- Alavanja, M., Ross, M., & Bonner, M. (2013). Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *A Cancer Journal for Clinicians*, 120-142.
- Alfonso, F., & Toro, i. (2010). Riesgo ambiental por el uso de agroquímicos. *Inventum*, 32-41.
- Arias, P., & Solervicens, P. (1998). Spinal cord malformation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) embryos: A preliminary study. *Fish Pathology*, 67-72.
- AUNAP. (2013). *Diagnóstico del estado de la acuicultura en Colombia*. Ministerio de agricultura: Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación - FAO.
- Baird, C., & Cann, M. (2014). *Química Ambiental* (Quinta ed.). Barcelona: Reverté, S.A.
- Banaee, M. (2013). physiological dysfunction in fish after insecticides exposure. *Insecticides - development of safer and more effective technologies*.
- Bejarano, C. (1983). *Estudios histológicos de la embriogénesis en trucha *Salmo gairdneri*, criada en el embalse del Neusa*. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana.
- Brown, S., & Adams, B. (2004). Contaminant effects on the teleost fish thyroid. *Environmental Toxicology Chem.*, 1680-1701.
- Bruno, D., & Poppe, T. (1996). *A colour atlas of salmonids diseases*. Londres: Academic press London.
- Burgos, M. (1999). *Malformaciones encontradas en alevines de salmón del atlántico (*Salmo salar*) provenientes de ovas nacionales e importadas en una piscicultura de la Décima Región, Chile*. Valdivia: Universidad Austral de Chile.
- Carson, R. (1960). *La primavera silenciosa*. (J. M. Sanchez, Ed.) Barcelona, España: Crítica.
- Castillo, E., Cruz, P., & Medina, V. (2016). Evaluación de la viabilidad de embriones de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) conservados a -14°C en diferentes estadios del desarrollo embrionario. *Archivos de medicina veterinaria*.
- Celis De La Rosa, A. D. (2014). *Bioestadística* (3a ed. ed., Vol. III). Mexico D.F., Mexico: El Manual Moderno.
- Chaparro, P., & Castañeda, C. (2015). Mortalidad debida a intoxicación por plaguicidas en Colombia entre 1998 y 2011. *Biomédica*, 90-102.
- Consenza, M., & Bidanset, J. (1995). Effects of neuronal development in rat embryo. *Vet. Hum. Toxicology*, 118-121.

- FAO. (2014). *Manual practico para el cultivo de la trucha arcoiris* . Guatemala : Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura .
- Fazio, F., Marafioti, S., & Torre, A. (2013). Effect of water quality in hematological and biochemical parameters of gobius niger caught in Faro lake (Sicily), Iran . *Fish Science*, 219-231.
- Fernandez, D., & Mancipe, L. (2010). intoxicación por organofosforados. *Revista Med*, 84-92.
- Gil, J., & Jesus, M. (2010). *Principios de urgencias, emergencias y cuidados críticos*. Granada: Alhulia.
- Gill, S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance . *Biochemistry and plant physiology*, 909-930.
- Greenpeace. (2015). *Pesticides and our health, a growing concern*. Greenpeace .
- Grob, D. (1947). Administration of disopropyk fluorophosphates (DFP) to man. III effect on the central nervous system with special reference to the electrical activity on the brain. *Bull Johns Hopkins Hospital*, 257.
- Harabawy, A., & Ibrahim, A. (2014). Sublethal toxicity of carbofuran pesticide on the african catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) hematological, biochemical and cytogenetic response. *Ecotoxicological Environmental Safety*, 61-67.
- Hayes, B. (1975). *Toxicology of pesticides* . Baltimore: Williams an Wilkins.
- Hicks, J., & Gomez, J. (2007). *Bioquímica*. Mexico : McGraw Hill.
- Holmes, J. (1964). Organophosphorus insecticides in Colorado . *Archieves in environmental health* , 445-453.
- Janik, M., Kleinhans, F., & Hagedorn, M. (2000). Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebra fish embryos (*Brachidanio rerio*). *Cryobiology*, 25-34.
- Jarpa, M. (1988). *Reseñas del programa de prevención de enfermedades y control sanitario de los cultivos de salmón: una visión chilena*. Santiago: Seminario Internacional: Técnicas de Cultivo y manejo del salmón, desarrollos recientes.
- Jimenez, M., & Kuhn, G. (2009). *Toxicología fundamental* . Sevilla : Diaz de Santos .
- Jin, Y., Chen, R., & Liu, W. (2010). Effects of endocrine disrupting chemicals on the transcription of genes related to the innate immune system in the early environmental stage of zebra fish (*Danio rerio*) . *Fish Shellfish immunology*, 854-861.
- Kandarakis, D. (2009). Endocrine disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocrine Rev.*, 293-342.

- Lilia, A. A. (2014). *curso basico de toxicología ambiental* . Mexico D.F.: Centro panamericano de ecología humana y salud.
- Lonstein, J. (1999). Congenital Spine Deformities: Scoliosis, Kyphosis, and Lordosis. *Orthopedic Clinics of North America*, 387-405.
- López, R. (2013). Hepatopatología para gastroenterólogos y hepatólogos. Segunda parte: Terminología útil en la interpretación de los hallazgos histopatológicos. *Revista colombiana de gastroenterología*, 247-255.
- Ludwig, J., & Auman, H. (1991). *Toxic chemicals in the great lakes and associated effects*. Ottawa: Gobierno de Canadá.
- Lukacová, J., & Knazická, Z. (2013). The toxic effect of 4- nonylphenol on male reproductive system. *Microbiological Biotechnological. Food Science*, 1455-1468.
- Martínez, E. (2016). *Efecto del 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metil carbamato, en el desarrollo reproductivo y embrionario de Danio rerio en condiciones del laboratorio*. Bogotá : Universidad El Bosque.
- Mendoza, N. (2008). *Farmacología medica*. Mexico D.F.: Editorial Medica Panamericana .
- Montalvo, C. (2010). Técnica histológica. *Universidad Nacional Autonoma de Mexico*.
- NCBI. (26 de Marzo de 2017). *National Center of Biothechnology Information* . Obtenido de Pub-Chem compound database: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carbofuran#section=Top>
- Neira, J. (9 de Marzo de 2014). *Marcos Godoy*. Obtenido de Enfermedad del saco azul (Hydrocele embrionalis) en salmonidos: http://www.marcosgodoy.com/index.php?option=com_content&view=article&id=89:edem-a-del-saco-vitelino-enfermedad-del-saco-azul-hydrocele-embrionalis-en-salmonidos&catid=9:uncategorised&Itemid=503&lang=es
- Nishida, Y. (2011). The chemical processes of oxidative stress by copper and iron ions in several neurodegenerative disorders. *Monatshefte Chem.*, 375-384.
- NPIC. (6 de Noviembre de 2015). *National Pesticide Information Center*. Obtenido de <http://npic.orst.edu/health/humhealth.es.html>
- Ojha, A., Yaduvanshi, S., & Srivastava, N. (2011). Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. *Pesticide biochemistry and physiology*, 148-156.
- Osorio, A. (2010). *Efectos del nitrato de plomo en la embriogénesis de la trucha arcoíris Oncorhynchus mykiss (Walbaum, 1792)*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.

- Otieno, P., Lalah, J., Virani, M., & Jondiko, I. (2010). Carbofuran and its toxic metabolites provide forensic evidences of furadan exposure in vultures (*Gyps africanus*) in Kenya. *Environmental contamination toxicology*, 84.
- Parrado, A. (2012). Historia de la acuicultura en Colombia . *Revista AcuaTIC*, 60-77.
- Pastor, S. (2002). Biomonitorización citogénica de cuatro poblaciones europeas expuestas a plaguicidas mediante el ensayo de micro núcleos. *Facultad de ciencias. Departamento de genética y microbiología*, Universidad Autonoma de Barcelona .
- Ramirez, A., & Mijangos, A. (1999). Efectos nocivos provocados por el uso de plaguicidas en la fauna silvestre de México y sus consecuencias ecológicas. *Ambiente Ecologico*, 58.
- RAP-AL. (2008). *Ficha Tecnica Carbofurano*. Chile: Red de Acción en Plaguicidas y sus alternativas en América Latina .
- Roberts, R., & Shepherd, C. (1986). *Handbook of trout and salmon diseases*. 2nd. Ed. Oxford: Fishing News Books.
- Rosado, R., & Erazo, A. (2001). Aspectos basicos para el cultivo de la trucha arcoiris. *Fundamentos de acuicultura continental*, 301-328.
- Rosado, R., Landines, m., & Diaz, G. (2012). Composicion de acidos grasos en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Revista de medicina veterinaria* , 11-22.
- Sadler, T. (1986). *Embriología Medica 5 ed*. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.
- Sargent, J., & Henderson, R. (1989). *Fish Nutrition*. Academic Press.
- Soloneski, S., & Larramendi, L. (2012). genetic toxycological profile of carbofuran, primicarbcbarbamic insecticides. *Insecticides - pestengineer*.
- Valavanidis, A., & Vlahogianni, T. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stressin acuatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology Environment*, 178-189.
- Willer, H., & Kilcher, L. (26 de Mayo de 2014). *Biotropico*. Obtenido de Colombia el unico pais donde decrece la agricultura ecológica: <http://www.biotropico.com/web/estudio-realizado-por-dra-h-willer-y-dr-l-kilcher-colombia-el-unico-pais-donde-decrece-la-agricultura-ecologica/>
- WWF (2012). Informe Planeta Vivo 2012: Biodiversidad, biocapacidad y propuestas de futuro: http://d2ouvy59p0dg6k.cloudfront.net/downloads/informe_planeta_vivo_2012.pdf