

## Effect of Chlorpyrifos 0,0-dietil 0-(3, 5, 6-tricloro-2-piridil fosforotioato) in juvenile of tilapia (*Oreochromis spp*) males <sup>□</sup>

*Efecto del Clorpirifos 0,0-dietil 0-(3, 5, 6-tricloro-2-piridil fosforotioato) en machos juveniles de tilapia (*Oreochromis spp*)*

*Efeito de Clorpirifós 0,0 dietil-0 - (3, 5 fosforotioato, 6-tricloro-2-piridil) em tilápias juvenis masculinos (*Oreochromis spp*)*

Diego A Aranzazu Taborda<sup>1\*</sup>, MV, Esp, MSc; Berardo de J Rodríguez<sup>1</sup>, MV, Esp, PhD; Beatriz Vieco Durán, Bacteriologa<sup>2</sup>, Luis F Restrepo Betancur<sup>3</sup>, Estadístico.

<sup>1</sup>Grupo de Investigación Centauro, Docente, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup>Laboratorio de Inmunohistoquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

<sup>3</sup>Docente, Escuela de Producción Agropecuaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

(Recibido: 1 febrero, 2011; aceptado: 22 abril, 2012)

### Summary

*Chlorpyrifos is a highly toxic insecticide to freshwater organisms and little is known regarding its potential to affect endocrine systems at sublethal concentrations. The induction of vitellogenin (Vtg) is a fairly sensitive marker of the effects of estrogenic compounds in juvenile fish. Objective: to evaluate histological changes and Vtg production in juvenile male tilapia (*Oreochromis spp*) exposed to sublethal concentrations of the insecticide Lorsban<sup>®</sup> EC (active ingredient chlorpyrifos). Methods: juvenile tilapia were exposed to 4, 8, and 12 µg/L of chlorpyrifos for 28 days in a semistatic system, with tanks receiving a 50% (v/v) daily water change to maintain nominal concentrations of the insecticide throughout the experiment. Subgroups of 3 animals from each concentration batch were euthanized on days 7, 14, 21 and 28 days, and samples of liver, gonads, gills, kidney and brain tissues were taken for routine histopathology examination. Liver and gonads were also processed by immunohistochemistry using monoclonal anti-killifish vitellogenin Vtg ND – 5F8 to detect Vtg. Results: we found significant statistical difference (p<0.05) for some injuries to the brain (degeneration and gliosis of the optic tectum), kidneys (vacuolar nephrosis and tubular hyaline granules), and liver (karyomegaly, binucleation, and hyaline granules in hepatocytes). Similarly we verified the induction of vitellogenin synthesis in liver and gonads, finding significant difference (p<0.05) in the expression of this protein between the control group and 4 mg / L with respect to treatment of 8 and 12 mg / L. Conclusion: the results obtained on the induction of*

□ Para citar este artículo: Aranzazu DA, Rodríguez B de J, Vieco B, Restrepo LF. Efecto del Clorpirifos 0,0-dietil 0-(3, 5, 6-tricloro-2-piridil fosforotioato) en machos juveniles de tilapia (*Oreochromis spp*). Rev Colomb Cienc Pecu 2012; 25:276-291.

\* Autor para correspondencia: Diego A Aranzazu. Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Cra 75 No 65-87. Medellín, Colombia. Correo electrónico: daranta7@gmail.com

*vitellogenin in males suggest a general effect of blocking concentrations of Chlorpyrifos for the possible induction of this protein. The mechanisms are not known at this time.*

**Key words:** biomarkers, endocrine disruption, immunohistochemistry organophosphate compounds, vitellogenin.

#### Resumen

Hasta donde se conoce, no hay estudios en tilapias juveniles (*Oreochromis spp*), que valoren el potencial de disrupción endocrina del Clorpirifos por análisis histológico e inmunohistoquímico de la inducción de la Vitelogenina (Vtg) hepática. **Objetivo:** determinar los efectos de la exposición subaguda al Clorpirifos en órganos blanco de disrupción en peces juveniles machos de tilapia. **Métodos:** el experimento de dosis subletal, se realizó en un sistema semiestático, con recambio diario del 50% del volumen de agua manteniendo la concentración nominal en cada grupo experimental mediante la adición de la mitad de la dosis hasta el día 28. Las concentraciones de Clorpirifos para la exposición fueron 4, 8, y 12 µg/L. Con cada concentración se trataron 12 juveniles, con tres replicas para cada concentración. Los 12 peces del grupo control no recibieron tratamiento. Se realizó el estudio anatomopatológico de tres animales por grupo, por cada semana los días 7, 14, 21 y 28 de estudio. Se efectuó la toma de muestras para estudio histopatológico de hígado, gónadas, branquias, riñón y encéfalo y se procesaron por histopatología de rutina. Las muestras de hígado y gónada también se procesaron por inmunohistoquímica. **Resultados:** el análisis MANOVA encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para lesiones en encéfalo (degeneración tectum óptico), riñón (gránulos hialinos) e hígado (cariomegalia), constituyéndose en órganos de impacto de los efectos del Clorpirifos a bajas dosis. Se verificó la inducción de Vtg en hígado y gónada de los animales expuestos, encontrando diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) en la expresión de esta proteína entre el grupo control y de 4 µg/L con relación a los grupos de 8 y 12 µg/L. **Conclusión:** los resultados obtenidos sobre la inducción de Vtg en machos sugieren un efecto antagonista del Clorpirifos sobre los Receptores Estrogénicos (REs), con una posible disminución en la síntesis de ésta proteína. Los mecanismos no se conocen en el momento.

**Palabras clave:** biomarcadores, disrupción endocrina, inmunohistoquímica organofosforados, vitelogenina.

#### Resumo

O clorpirifos é um inseticida altamente tóxico para os organismos de água doce. Porém, pouco se sabe acerca de seu potencial efeito no sistema endócrino em concentrações subletais. A indução de vitelogenina hepática (Vtg) é um marcador bastante sensível do efeito de componentes estrogênicos em peixes juvenis. **Objetivo:** determinar os efeitos da exposição subaguda ao clorpirifos em órgãos alvo de disrupção endócrina em machos juvenis de tilapia. **Métodos:** o experimento foi realizado em um sistema semi-estático com recambio diário de 50% do volume de água, com manutenção da concentração nominal em cada grupo experimental mediante a adição da metade da dose de clorpirifos até o dia 28. Três grupos de 12 peixes foram tratados com concentrações de clorpirifos de 4, 8 y 12 µg/L, respectivamente, com três réplicas para cada grupo. Um grupo controle não recebeu nenhum tratamento. Realizou-se o estudo anatomopatológico de rotina do fígado, gônadas, brânquias, rins e encéfalo de três animais por grupo nos dias 7, 14, 21 e 28. As amostras de fígado e gônada foram também processadas por imunohistoquímica usando um anticorpo monoclonal para detectar Vtg (anti-killifish Vtg ND-5F8). **Resultados:** mediante análise MANOVA encontrou-se diferença significativa ( $p < 0.05$ ) para lesões no encéfalo (degeneração do tectum óptico), rim (grânulos hialinos) e fígado (cariomegalia), fato que demonstra que estes são os órgãos alvo dos efeitos do clorpirifos a baixas doses. Verificou-se a indução de Vtg no fígado e gônada dos animais expostos, com diferença estatística significativa ( $p < 0.05$ ) na expressão desta proteína entre o grupo controle e o grupo de 4 µg/L com relação aos grupos de 8 e 12 µg/L. **Conclusão:** os resultados obtidos sobre a indução de Vtg em machos sugerem um efeito antagonista do clorpirifos sobre os receptores estrogênicos, com uma possível diminuição na síntese desta proteína. Os mecanismos ainda são desconhecidos.

**Palavras chave:** biomarcadores, disrupção endócrina, imunohistoquímica, organofosforados, vitelogenina.

## Introducción

El organofosforado Clorpirifos es el plaguicida más aplicado en Colombia, con un volumen de producción de 776.824 kg (Arboleda *et al.*, 2000; Loaiza *et al.*, 2000). Si bien su tiempo de degradación y vida media en el agua de 53 días es breve (De Silva y Samayawardhena, 2005), puede afectar de forma crónica a las especies de vida corta (Arboleda *et al.*, 2000) y particularmente a los peces, cuando la exposición coincide con etapas claves para la reproducción (De Silva y Samayawardhena, 2005).

La sensibilidad de las diversas especies acuáticas al Clorpirifos es muy variable, (Giesy *et al.*, 1999) y los escasos estudios que se han realizado a nivel mundial para determinar sus efectos en peces, se han focalizado en la intoxicación aguda en larvas de tilapia (Gul, 2005) y guppy (De Silva y Samayawardhena, 2005; Mahmut *et al.*, 2005).

En guppys (*Poecilia reticulata*) expuestos a concentraciones de Clorpirifos entre 0.002 µg/L y 2 µg/L, se observó disminución significativa en el número de empujes gonadopodiales, de crías producidas y de su supervivencia al compararse con peces no expuestos (De Silva y Samayawardhena, 2005); esto sugiere un posible efecto disruptivo de este plaguicida sobre el rendimiento reproductivo.

La Vtg es el precursor de la proteína del vitelo del huevo en peces teleósteos, utilizada como biomarcador de la exposición a químicos estrogénicos en el ambiente acuático (Arukwe *et al.*, 2003; Canapa *et al.*, 2007). Los peces machos poseen los genes para Vtg, pero normalmente no sintetizan cantidades medibles de la proteína; sin embargo, cuando los machos son expuestos a xeno-estrogénos, son capaces de producir niveles detectables de Vtg, en concentración igual o superior a los peces hembras (Arukwe *et al.*, 1999; Carballo *et al.*, 2005; Örn *et al.*, 2003).

Debido a que algunas investigaciones previas sugieren un probable efecto Disruptor Endocrino (DE) del Clorpirifos en los peces (De Silva y Samayawardhena, 2005) y que hasta donde se conoce en la actualidad, no hay estudios en tilapias

juveniles que valoren su efecto potencial, utilizando biomarcadores anatomopatológicos, y evaluando la expresión tisular de Vtg; se formuló la siguiente hipótesis: la exposición subaguda de tilapias machos juveniles al insecticida Clorpirifos utilizando dosis subletales, causa alteraciones morfológicas en órganos blancos e induce la expresión de Vtg. Para comprobar esta hipótesis se planteo como objetivo, determinar el efecto de la exposición subaguda a Clorpirifos sobre órganos blanco y sobre la expresión hepática y gonadal de Vtg.

## Materiales y métodos

### *Animales experimentales*

Se utilizaron 120 peces machos juveniles de tilapia (*Oreochromis spp*), con longitud corporal de  $15.9 \pm 1.5$  cm, peso  $89.1 \pm 10.2$  gramos, clínicamente sanos, obtenidos de un mismo desove y criados en estanques de la estación piscícola del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, en el municipio de San Jerónimo departamento de Antioquia, Colombia.

### *Condiciones experimentales*

El experimento se realizó en el Laboratorio de Bioensayos del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid (San Jerónimo, Antioquia, Colombia) ubicado a una altura de 750 msnm, con una temperatura promedio de 25 °C. Los animales experimentales se alojaron en acuarios de vidrio, con capacidad para 64 litros, con aireación constante y filtro XY - 380; se alimentaron con concentrado comercial (34% de proteína) dos veces/día con un suministro del 2% de la biomasa total de cada grupo tanto durante la fase de aclimatación de una semana de duración, como de la fase experimental subletal de 28 días de duración.

Durante el período de aclimatación y durante el transcurso de la fase experimental, se midieron diariamente los parámetros de calidad del agua: temperatura (Termómetro estándar de varilla -10 a 150 °C BRAND), oxígeno disuelto (oxímetro LCD HQ10) y pH (pH-metro PINPOINT). El agua utilizada provenía del acueducto municipal del municipio de San Jerónimo.

El experimento de dosis subletal, se realizó en un sistema semiestático, con recambio diario del 50% del volumen de agua manteniendo la concentración correspondiente en cada grupo experimental mediante la adición de la mitad de la dosis hasta el día 28. Los peces se sometieron a un período de aclimatación de 7 días. Previo al período de aclimatación, los peces se sometieron a un baño en 10 g/L de sal no yodada durante una hora para eliminar ectoparásitos.

#### *Sustancia experimental*

El Clorpirifos utilizado (0,0-dietil 0-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato), 480 g/L de formulación a 20 °C se adquirió de una fuente comercial Lorsban\* 4 EC. Dow AgroSciences. Las diluciones requeridas se realizaron en el agua de acueducto utilizada en los acuarios.

#### *Exposición subaguda*

Las concentraciones para la exposición fueron de 4 µg/L, 8 µg/L y 12 µg/L, teniendo como base los estudios previos de toxicidad con Clorpirifos realizados por Pathiratne y Athauda, 1998; en los que se determinó que estas son concentraciones subletales y corresponden entre el 4 y el 10% de la Concentración Letal (CL) 50 estimada para el estadio de dedinos de tilapia nilótica. Con cada concentración se trataron 12 juveniles, con tres replicas para cada tratamiento. El grupo de 12 peces establecido como control no recibió dosificaciones con Clorpirifos.

#### *Anatomopatología*

El número de animales vivos y muertos, así como los signos clínicos de los individuos se monitorearon todos los días, por un período de 12 horas hasta la culminación del experimento al día 28. Tres animales por grupo, por cada semana, considerando los peces muertos y los vivos, los días 7, 14, 21 y 28, se sometieron a evaluación macroscópica, y se tomaron muestras de tejido de cada animal para realizar estudio histopatológico. De los animales que murieron durante el experimento, no se tomaron muestras para histopatología, ya que presentaron cambios autolíticos evidentes.

Las necropsias se realizaron según el protocolo descrito por Reimschuessel *et al* (1998). Para la histopatología branquial se tomó el segundo arco branquial izquierdo. Se tomaron adicionalmente muestras de hígado, gónadas, encéfalo y riñón. Se evaluaron los índices gonadosomático y hepatosomático luego de removidos los órganos en el procedimiento de necropsia.

El índice hepatosomático (IHS) se calculó como:  $IHS = HW (W-HW)^{-1} \times 100$ , donde HW es el peso del hígado (g) y W es el peso húmedo del pez (g). El índice gonadosomático (IGS) se calculó como:  $IGS = GW (W-GW)^{-1} \times 100$ , donde GW es el peso de la gónada (g) y W es el peso húmedo del pez (g) (Sindhe, 2004).

Las muestras se procesaron por técnicas de histopatología convencional, así: se fijaron en formalina tamponada al 4%, se incluyeron en parafina, se cortaron a 4 µm de espesor y se colorearon con hematoxilina - eosina. La evaluación histopatológica se realizó con un microscopio óptico Leica DLM. Para la denominación de las lesiones se utilizaron criterios establecidos previamente por otros investigadores (Bernet *et al.*, 1999; Ferguson, 2006; Roberts, 2001).

Las variables identificadas se categorizaron por medio de una escala ordinal de valores según el grado de severidad, de acuerdo a los parámetros propuestos por Bernet *et al* (1999), como se presenta en la (Tabla 1).

**Tabla 1.** Valores establecidos para la severidad y distribución de las lesiones.

| Nivel | Grado de lesión | Distribución  |
|-------|-----------------|---|
| 0     | Ausencia        | No aplica   |
| 1     | Leve            | Hasta el 30% del tejido en 10 campos de 400X de distribución focal.               |
| 2     | Moderada        | Hasta el 60% del tejido afectado en 10 campos de 400X de distribución multifocal. |
| 3     | Severa          | Más el 60% del tejido afectado en 10 campos de 400X de distribución difusa        |

Las imágenes de lesiones representativas de los diferentes órganos se tomaron con cámara digital una cámara para microscopía digital instantánea Leica EC3 (Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland).

### *Inmunohistoquímica*

La detección de Vtg se realizó tanto para el grupo control como para los grupos tratados con concentraciones variables de Clorpirifos, utilizando la técnica de inmunohistoquímica *Advance* (Biocompare, 2008) de acuerdo al protocolo recomendado por Laboratorios Dako. El procedimiento se describe a continuación: para la inmunomarcación de Vtg, las muestras de hígado y gónada de todos los peces se fijaron en formalina bufferada neutra (4% de concentración final), se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de tejido de 4  $\mu\text{m}$ , posteriormente se colocaron en láminas cubiertas con poli-L-lisina (Slide Tech.<sup>®</sup> CA. USA) y se secaron en estufa durante toda la noche a 58 °C.

Los cortes se desparafinaron, hidrataron y lavaron en agua destilada. Luego se realizó la recuperación antigénica de los cortes sumergidos en buffer citrato a pH 6 durante 30 minutos, utilizando un vaporizador a 100 °C aproximadamente. Posteriormente se dejaron reposar en la solución buffer durante 30 minutos y se estabilizaron en PBST (Solución phosphate buffered saline with tween 20) (Merck Chemicals. Darmstad. Alemania), durante 5 minutos. Después, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con la aplicación de peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ / 40% en metanol (Merck Chemicals. Darmstad. Alemania) por 10 minutos.

Los cortes se inmunocolorearon con el anticuerpo monoclonal *anti-killifish vitellogenin Vtg* ND – 5F8 (Biosense Laboratorios AS, Bergen, Noruega) a diluciones de 1/100 por una hora a temperatura ambiente. Este anticuerpo es recomendado por la casa productora para su uso en *Oreochromis spp.* Las diluciones se realizaron en PBS conteniendo 1% de BSA (Sigma-Aldrich. Saint Louis MO. USA). Luego de la incubación con este anticuerpo primario, los cortes se lavaron con PBST durante 5 minutos, se incubaron con *Advance™ HRP Link* durante 30 minutos (Dako. San Antonio. USA), seguido de un lavado con PBST durante 5 minutos. Luego se incubaron con la enzima *Advance* 30 minutos, para posteriormente hacer un lavado con PBST durante 10 minutos.

Los cortes se colorearon durante 5 minutos utilizando diaminobenzidina (Sigma-Aldrich.

Saint Louis MO. USA) y se realizó contratincción con hematoxilina de Harris durante 60 segundos. Posteriormente los cortes se lavaron con agua corriente y se colocaron 3 segundos en agua amoniacal. Se lavaron nuevamente en agua corriente para finalmente realizar deshidratación, aclaración en xilol y el montaje en resina. Como controles positivos se utilizaron hígado y ovario de tilapia hembra sexualmente madura. Para verificar y controlar la ocurrencia de tinción inespecífica algunos cortes no se procesaron con el anticuerpo primario. Para la evaluación de la inmunomarcación se empleó un microscopio óptico Leica DMLB (MeyerInstruments, Houston, TX, USA) y se determinó la positividad o negatividad en los tejidos para cada grupo experimental siguiendo las pautas sugeridas para los procesos de calidad en inmunohistoquímica (Baquero, 2007).

### *Consideraciones éticas*

En esta investigación se acató la normatividad vigente en Colombia para la investigación Biomédica: ley 84 de 1989 y las normas reglamentarias de la resolución 08430 de 1993 del Ministerio de Salud. El trabajo fue aprobado para su realización por el Comité de Bioética para la Experimentación Animal de la Universidad de Antioquia, Acta No.44 de agosto de 2008. El personal encargado del experimento observó las medidas de seguridad recomendadas para el uso del producto. El Clorpirifos es un producto aprobado en los Estados Unidos por la FDA-CVM. En Colombia está aprobado su uso como insecticida para el control de insectos de pastos y cultivos por el Instituto Colombiano Agropecuario ICA.

### *Método estadístico*

Después de obtenidos los análisis de laboratorio se creó una base de datos en el paquete Excel, luego se efectuó su control de calidad verificando la adecuada consignación de la información y se realizó el análisis estadístico referido a continuación.

Se empleó un diseño completamente aleatorizado, efecto fijo, desbalanceado, con análisis MANOVA, donde se emplearon contrastes canónicos de tipo ortogonal, basado en la familia Box-Cox, con el

objetivo de encontrar por máxima verosimilitud el  $\lambda$  óptimo para hacer ajuste a la información. Se validaron los supuestos tanto del MANOVA para cada tipo de situación experimental. El análisis de varianza mediante el método MANOVA se realizó por etapas en cada período de tiempo, con base en el diseño completamente aleatorizado y entre tiempos con base en un diseño por bloques aleatorizados, donde cada tiempo fue el efecto de bloque.

También se empleó análisis descriptivo de tipo univariado, el que permitió construir intervalos de confiabilidad para cada grupo de lesiones, con ajuste debido al tamaño de la muestra, empleando un error de tipo I del 5%. Para calcular el porcentaje de animales que presentaron una lesión determinada, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lesión} = \frac{\text{Número de animales con la lesión}}{\text{total de animales evaluados}} \times 100$$

## Resultados

### Parámetros de calidad del agua

Los parámetros de calidad del agua se mantuvieron constantes durante la fase experimental. La temperatura promedio en los acuarios fue de  $24 \pm 0.8$  °C, el pH promedio fue de  $6.90 \pm 0.20$  y el oxígeno disuelto en los acuarios fue de  $7.0 \pm 0.2$  mg/L, con una dureza total del agua de 80 mg/L. Estos parámetros se encontraron en los rangos óptimos propuestos para tilapia en condiciones de cultivo (Córdoba, 2006).

### Manifestaciones clínicas

No se observaron manifestaciones clínicas en los peces durante la fase experimental, relacionadas con los tratamientos utilizados durante el período diurno de 12 horas por día de observación de los peces (6:00 a.m. a 6:00 p.m.).

### Mortalidad durante el período del ensayo

En el tratamiento de 12  $\mu\text{g/L}$  se presentaron dos muertos para la primera semana del experimento y uno para la tercera semana. En el tratamiento de 8  $\mu\text{g/L}$  sólo se presentó un muerto en la tercera semana del experimento. Para el tratamiento de 4  $\mu\text{g/L}$  se presentaron dos muertes la primera semana del

experimento. No se presentó mortalidad en el grupo control. En general, las muertes ocurrieron en horas de la noche, período en que no se observaba a los peces, estos se encontraron en la mañana fuera de los acuarios (saltaron al exterior). Al realizar las necropsias de estos animales sus órganos presentaron autólisis y no fueron aptos para análisis histopatológico.

### Índice hepatosomático (IHS) e índice gonadosomático (IGS)

Al analizar todos los tratamientos durante el período del experimento no se encontró diferencia estadística significativa para las variables IGS e IHS, a los días 7, 14, 21 y 28 ( $p \geq 0.05$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Índices hepatosomático (IHS) y gonadosomático (IGS) en machos de tilapia expuestos a dosis variables de Clorpirifos.

| Tratamiento        | 7               | 14              | 21              | 28              |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 12 $\mu\text{g/L}$ | n=8             | n=7             | n=8             | n=9             |
| IHS                | 3.44 $\pm$ 0.83 | 2.94 $\pm$ 0.87 | 2.58 $\pm$ 0.56 | 2.75 $\pm$ 0.54 |
| IGS                | 0.49 $\pm$ 0.45 | 0.44 $\pm$ 0.19 | 0.59 $\pm$ 0.45 | 0.52 $\pm$ 0.32 |
| 8 $\mu\text{g/L}$  | n=6             | n=8             | n=8             | n=8             |
| IHS                | 3.52 $\pm$ 0.38 | 3.05 $\pm$ 0.77 | 4.48 $\pm$ 4.38 | 2.52 $\pm$ 0.62 |
| IGS                | 0.53 $\pm$ 0.25 | 0.36 $\pm$ 0.34 | 0.69 $\pm$ 0.72 | 0.70 $\pm$ 0.58 |
| 4 $\mu\text{g/L}$  | n=8             | n=8             | n=7             | n=9             |
| IHS                | 3.71 $\pm$ 0.41 | 2.84 $\pm$ 0.48 | 3.40 $\pm$ 0.73 | 3.85 $\pm$ 0.65 |
| IGS                | 0.51 $\pm$ 0.22 | 0.55 $\pm$ 0.46 | 0.26 $\pm$ 0.15 | 0.49 $\pm$ 0.22 |
| Control            | n=3             | n=3             | n=3             | n=3             |
| IHS                | 3.31 $\pm$ 0.23 | 3.27 $\pm$ 0.28 | 2.62 $\pm$ 0.63 | 2.90 $\pm$ 0.23 |
| IGS                | 0.49 $\pm$ 0.36 | 0.39 $\pm$ 0.17 | 0.41 $\pm$ 0.47 | 0.20 $\pm$ 0.02 |

### Hallazgos macroscópicos

La evaluación macroscópica de los órganos evidenció en forma general las siguientes características: branquias rojizas en forma difusa, las que ocasionalmente presentaron moco blanco-grisáceo entre los filamentos; hígados de color rojizo con áreas blanco amarillentas irregulares distribuidas en un patrón multifocal; riñones de color rojo intenso y difuso. Las gónadas en general se caracterizaron por su color blanco amarillento difuso. No se observaron alteraciones macroscópicas en el encéfalo de los peces.

### Hallazgos histopatológicos

Se evaluaron las lesiones histopatológicas en branquias, hígado, encéfalo, riñón y gónada. La tabla 2 resume las principales alteraciones histopatológicas que pueden considerarse como efecto del tratamiento con Clorpirifos a dosis subletales durante un período de 28 días. Las

principales alteraciones en orden de importancia se encontraron en encéfalo, riñón e hígado, encontrando diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos con relación a las

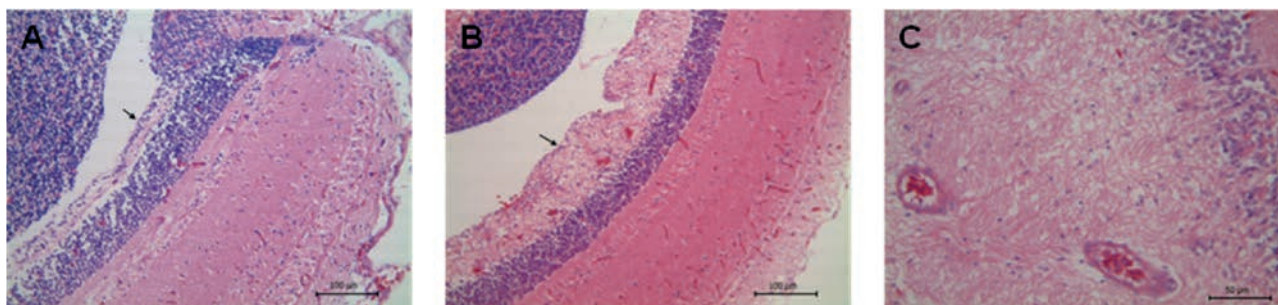
dosis utilizadas de Clorpirifos. La tabla 3 incluye las principales lesiones encontradas en tilapias expuestas a dosis subletales de Clorpirifos por un período de 28 días.

**Tabla 3.** Principales lesiones encontradas en tilapias expuestas a dosis subletales de Clorpirifos por un período de 28 días.

| Lesiones                          | 4 µg/L |       | 8 µg/L |       | 12 µg/L |       | Control |      | Wilks Lambda |
|-----------------------------------|--------|-------|--------|-------|---------|-------|---------|------|--------------|
|                                   | n      | %     | n      | %     | n       | %     | n       | %    |              |
| Alteraciones degenerativas tectum | 20     | 62.50 | 21     | 67.74 | 28      | 87.50 | 1       | 8.33 | 0.0001       |
| Gliosis tectum optico             | 14     | 43.75 | 19     | 61.29 | 30      | 93.75 | 0       | 0    | 0.0001       |
| Nefrosis vacuolar                 | 28     | 87.50 | 22     | 70.96 | 29      | 90.62 | 0       | 0    | 0.0001       |
| Hiperplasia glomerular            | 16     | 50.00 | 20     | 64.52 | 27      | 84.38 | 0       | 0    | 0.0001       |
| Alteraciones nucleares hígado     | 17     | 53.13 | 26     | 83.87 | 31      | 96.87 | 0       | 0    | 0.0001       |
| Gránulos hialinos hígado          | 16     | 50.00 | 21     | 67.74 | 25      | 78.13 | 0       | 0    | 0.0001       |
| Gránulos hialinos riñón           | 9      | 28.13 | 11     | 35.48 | 14      | 43.76 | 0       | 0    | 0.0001       |

Para el caso del encéfalo, las principales alteraciones encontradas fueron: vacuolización y gliosis difusa del tectum óptico (Figura 1). Estas alteraciones fueron mayores en el tratamiento de 12 µg/L, al compararlas con los tratamientos

de 4 y 8 µg/L. El grupo control no presentó las alteraciones descritas. Al realizar el análisis MANOVA se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) para las dos alteraciones descritas entre los tratamientos y el grupo control.

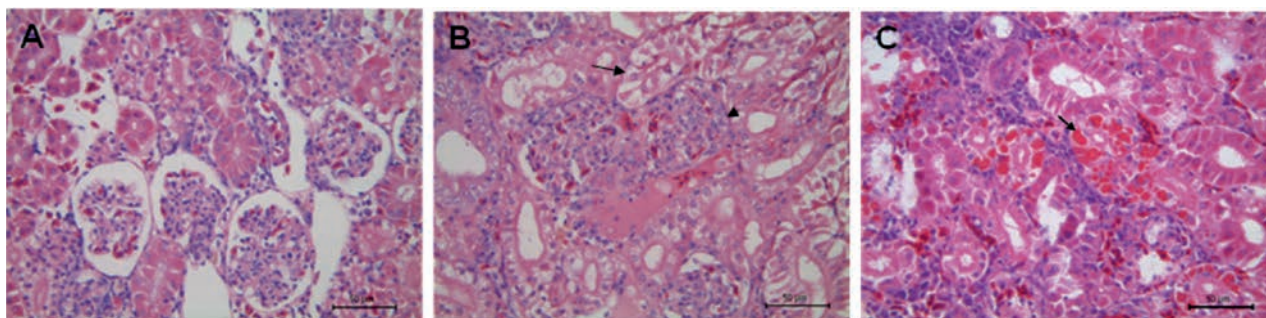


**Figura 1.** Cerebro. Tectum óptico. A, Tectum normal, grupo control, zona gris periventricular flecha (20X H-E). B, Vacuolización, congestión y gliosis del tectum en zona gris periventricular (flecha), tratamiento clorpirifos 8 µg/L día 21, (20X H-E). C, Vacuolización, gliosis y congestión del tectum en zona gris periventricular, tratamiento clorpirifos 12 µg/L día 21, (40X H-E).

En el riñón, las alteraciones encontradas fueron: vacuolización severa y extensa de los túbulos proximales, gránulos hialinos intracitoplasmáticos en túbulos y el agrandamiento glomerular con disminución del espacio urinario (espacio de Bowman) (Figura 2). Al realizar el análisis MANOVA se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) en una dimensión para todas las lesiones descritas.

La vacuolización de los túbulos proximales también denominada nefrosis vacuolar, fue un cambio frecuente relacionado directamente con los tratamientos utilizados, siendo mayores los

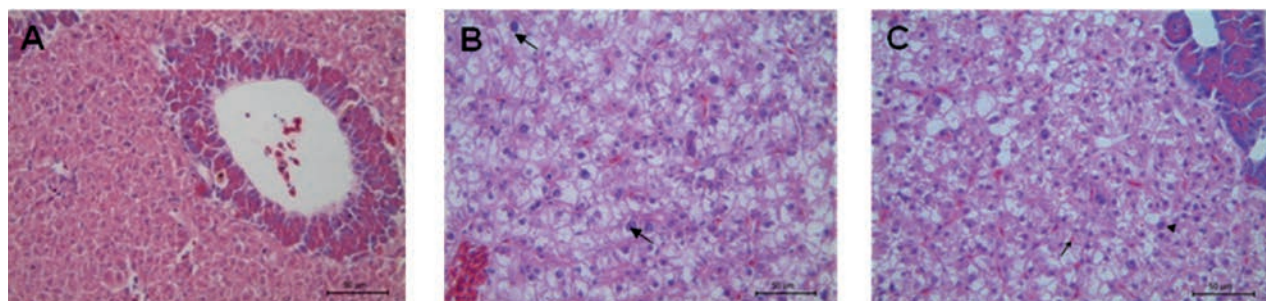
efectos conforme se incrementó la dosis. El grupo control no presentó las alteraciones descritas y fue diferente estadísticamente de los tratamientos de 4 y 8 µg/L. La acumulación intracitoplasmática de inclusiones eosinófilas en las células de los túbulos renales presentó diferencias significativas entre el tratamiento de 12 µg/L y el grupo control. El agrandamiento aparente de los ovillos glomerulares y el efecto asociado de disminución del espacio urinario presentó diferencias significativas entre los tratamientos en forma similar a la observada en la nefrosis vacuolar ( $p < 0.0001$ ).



**Figura 2.** Riñón. A, Grupo control 28 días. Apariencia normal de glomérulo y estructuras tubulares (H-E 40X). B, Nefrosis vacuolar severa epitelio tubular (flecha) e hiperplasia de glomérulos y reducción de espacio de Bowman (cabeza de flecha), tratamiento 12 µg/L, 28 días, (H-E 40X). C, Gránulos hialinos intracitoplasmáticos en epitelio tubular, tratamiento 12 µg/L, 28 días, flecha (H-E 40X).

Las lesiones encontradas en los hígados fueron: degeneración grasa, congestión sinusoidal, infiltrado de células granulares eosinofílicas asociadas principalmente a grandes vasos portales, alteraciones nucleares como cariomegalia y binucleación, y por último la presencia de

inclusiones eosinófilas en el citoplasma de los hepatocitos (Figura 3). Al realizar el análisis MANOVA se encontró significancia en una dimensión ( $p < 0.0001$ ), para las alteraciones nucleares y la presencia de gránulos citoplasmáticos eosinófilos entre los tratamientos.



**Figura 3.** Hígado. A, Característica normal de hepatocitos, grupo control, (H-E 40X) B, Tumefacción de hepatocitos y cambios nucleares del tipo cariomegalia (flecha) tratamiento de 12 µg/L, 28 días, (H-E 40X). C, Cambios similares a los descritos para la imagen B, adicionalmente las flechas indican la presencia de gránulos hialinos en el citoplasma de hepatocitos, tratamiento de 12 µg/L, 28 días, (H-E 40X)

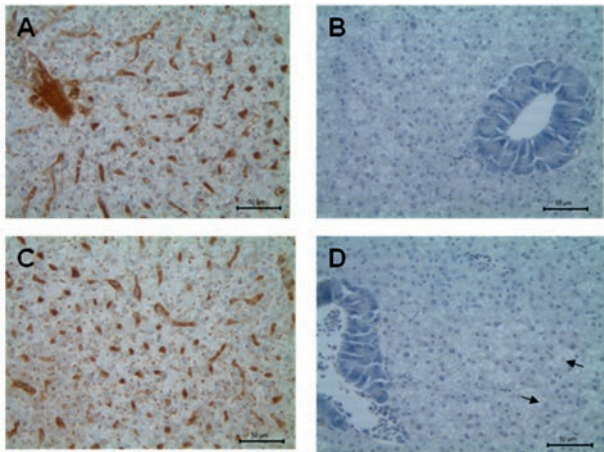
En las branquias se encontraron lesiones frecuentes como: atrofia, fusión, hiperplasia y congestión lamelar. Sin embargo, al realizar el análisis MANOVA no se encontró diferencia estadística para las lesiones entre los tratamientos. ( $p > 0.05$ ).

El 100% de las gónadas estudiadas presentaron madurez, caracterizada por la presencia de espermatozoides y espermátidas en las luces tubulares. Como lesiones frecuentes se encontraron para los diferentes tratamientos fibrosis intersticial y vacuolización del epitelio germinal. Sin embargo, al realizar el análisis MANOVA no se encontró significancia en ninguna dimensionalidad para las lesiones entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ).

#### *Hallazgos inmunohistoquímicos*

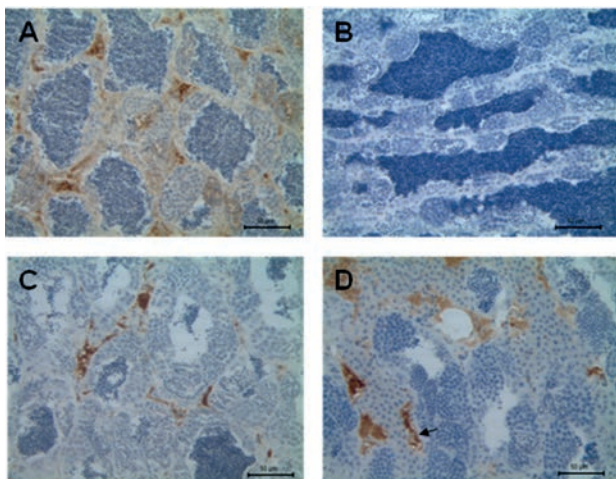
La inmunomarcación de Vtg en hígado se evidenció en los hepatocitos como granulaciones pequeñas de color café en su citoplasma; con frecuencia estos gránulos se agruparon hacia la cara sinusoidal del hepatocito. De igual manera, se observó inmunomarcación en los sinusoides y en el plasma retenido en las estructuras vasculares de mayor calibre relacionadas tanto con los vasos centrales del lobulillo y los vasos portales (Figura 4). Las inclusiones intracitoplasmáticas eosinófilas observadas con la coloración de hematoxilina – eosina no fueron positivas para la inmunomarcación.





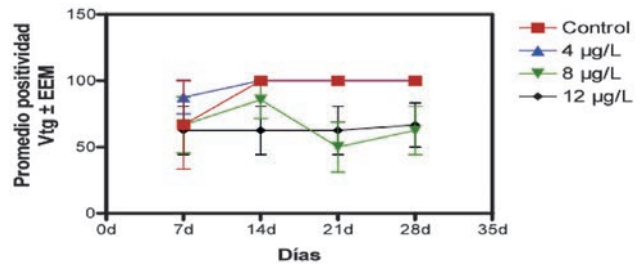
**Figura 4.** Inmunomarcación en hígado. A, Hígado de tilapia hembra madura. Control positivo inmunomarcación Vtg. Se observa positividad en citoplasma de hepatocitos, sinusoides y plasma de vaso portal. B, Hígado de tilapia hembra madura. Control negativo inmunomarcación Vtg. C, Inmunomarcación de Vtg en hígado de tilapia macho al día 28 del tratamiento 4µg/L. La marcación es evidente en sinusoides. La marcación en hepatocitos es tenue y granular. D, Hígado de tilapia macho. La inmunomarcación es negativa en los gránulos eosinófilos citoplasmáticos presentes en los hepatocitos, en hígado de tilapia macho al día 28 del tratamiento 4µg/L (flecha). Inmunohistoquímica. Técnica del polímero Advance. DAB. Hematoxilina de Harris 40 X.

La inmunomarcación de la Vtg en el tejido testicular estuvo relacionada principalmente con el tejido intersticial y asociada directamente con los vasos sanguíneos allí presentes. De igual manera a lo encontrado para el hígado, la inmunomarcación se hizo evidente en los grandes vasos asociados al mediastino de la gónada. En forma esporádica la marcación se presentó en el epitelio germinal del órgano (Figura 5).

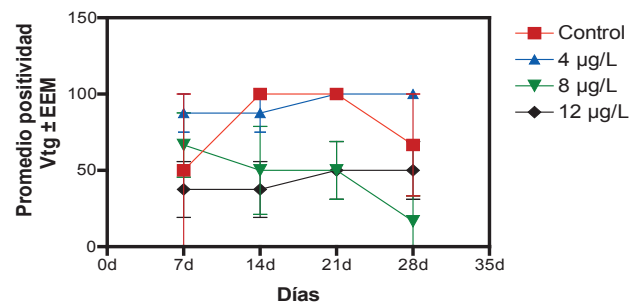


**Figura 5:** A. Inmunomarcación testículo de tilapia en el tejido intersticial, vascularización y plasma al día 21 del tratamiento 12µg/L. B. Inmunomarcación negativa testículo de tilapia macho día 21 del tratamiento 12 µg/L. C. Inmunomarcación en testículo de tilapia en tejido intersticial al día 14 del tratamiento 4 µg/L. D. Inmunomarcación para Vtg en tejido intersticial y en el epitelio espermático (flecha). Inmunohistoquímica. Técnica del polímero Advance. DAB. Hematoxilina de Harris. 40X

Las figuras 6 y 7 presentan la evolución de la inmunomarcación de Vtg observada en los tejidos hepático y gonadal en los machos de tilapia expuestos a concentraciones subletales de Clorpirifos durante un periodo de 28 días.



**Figura 6.** Evolución inmunomarcación de Vtg en hígado de machos juveniles de tilapia expuestos a dosis bajas de Clorpirifos. Los resultados se expresan como promedio de inmunomarcación ± Error Estándar de la Media.



**Figura 7.** Evolución inmunomarcación Vtg en testículo de machos juveniles de tilapia expuestos a dosis bajas de Clorpirifos. Los resultados se expresan como promedio de inmunomarcación ± Error Estándar de la Media.

Al realizar el análisis MANOVA no se presentó diferencia estadística significativa para la marcación de Vtg entre los diferentes tratamientos en los días 7 y 14 de experimentación; ( $p > 0.05$ , 0.7917 y 0.4918, respectivamente). En los días 21 y 28 de experimentación se presentó diferencia estadística significativa ( $p < 0.001$ ) para la marcación de Vtg entre el grupo control con relación a los otros tres tratamientos de 4, 8 y 12 µg/L (Tabla 4).

**Tabla 4.** Análisis Multivariado de Varianza. Inmunomarcación vitelogenina en tilapias expuestas a dosis subletales de Clorpirifos por un periodo de 28 días.

| Día | Wilks'Lambda | Pillai's | Hotelling-Lawley | Roy's  |
|-----|--------------|----------|------------------|--------|
| 7   | 0.7917       | 0.6707   | 0.7929           | 0.2359 |
| 14  | 0.4918       | 0.5165   | 0.4388           | 0.0293 |
| 21* | 0.0001       | 0.0027   | 0.0001           | 0.0001 |
| 28* | 0.0236       | 0.3781   | 0.0065           | 0.0001 |

\* Se presentó diferencia estadística entre los tratamientos

## Discusión

Los parámetros de calidad del agua evaluados durante el experimento no presentaron variaciones significativas entre los diferentes tratamientos. Estos parámetros en general se encontraron dentro del rango adecuado descrito para la especie (Córdoba, 2006) y por lo tanto se considera que estos no se relacionan directamente con las alteraciones encontradas en los peces evaluados.

No se observaron manifestaciones clínicas asociadas a las diferentes concentraciones de Clorpirifos empleadas, aunque los compuestos organofosforados se han considerado responsables de efectos neurológicos y alteraciones del comportamiento debido a su mecanismo de acción (Córdoba, 2001; Gul, 2005). Estas observaciones difieren de lo observado en trabajos previos de exposición subaguda con Clorpirifos en juveniles de *P. reticulata* durante 14 días, en los que se evidenciaron manifestaciones clínicas de parálisis y edema ventral que se relacionaron directamente con la dosis del tóxico (De Silva y Samayawardhena, 2005).

Las concentraciones utilizadas en nuestro estudio se ubican entre el 4% y 10% de la CL-50 para la especie y no indujeron efectos clínicamente observables; esto posiblemente se debió a las bajas concentraciones utilizadas, a una mayor resistencia relacionada con la edad de los individuos y a la sinergia de los dos factores anteriores favoreciendo una detoxificación más eficiente del compuesto tóxico (Dai et al., 2001).

La toxicidad de los pesticidas es altamente dependiente de la duración, frecuencia, e intensidad de la exposición, pero de igual manera es importante la susceptibilidad del organismo blanco, lo que está influenciado por la edad, el estado de salud y la variación genética (Chandrasekara y Pathiratne, 2007). La inhibición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en el cerebro del pez en exposiciones tóxicas a compuestos organofosforados es muy específica y las concentraciones cercanas a la CL50 pueden inducir una disminución del 60% en la actividad fisiológica normal (De Silva y Samayawardhena, 2005, Rajeswary y Ramudu, 2005).

Las muertes ocurridas durante el experimento, probablemente fueron accidentales, ocasionadas por asfixia en peces que escaparon de los acuarios, es importante indicar que las muertes cesaron cuando se utilizaron mayas para cubrir los acuarios.

## IHS e IGS

En este estudio no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con Clorpirifos y los índices hepatosomático y gonadosomático. Esto puede explicarse por la presencia de lesiones como cambio vacuolar hepático presentes en los grupos control y en los tratados, no inducidas por los tratamientos. Adicionalmente, las dosis utilizadas probablemente no fueron lo suficientemente altas para incrementar el grado de lesión hepática y gonadal, de manera que modificaran significativamente los valores de estos índices en los grupos experimentales. Es importante destacar que el consumo de alimento no se modificó entre los diferentes grupos, durante el período de estudio.

## Histopatología

Los principales órganos afectados por la exposición subaguda al Clorpirifos fueron: encéfalo, riñón e hígado; y las principales alteraciones asociadas para dicha exposición fueron: alteraciones degenerativas y gliosis del tectum óptico, nefrosis vacuolar, hiperplasia glomerular, alteraciones nucleares en hígado, y gránulos eosinófilos en hígado y en riñón. Este es uno de los pocos estudios a nivel mundial que describe los efectos del Clorpirifos sobre diferentes órganos en peces, las lesiones en tectum óptico y en hígado coinciden con las descritas previamente por otros investigadores (Rajeswary y Ramudu, 2005).

En el estudio se encontró diferencia estadística significativa para la frecuencia de lesiones en el encéfalo, riñón e hígado, entre el grupo control y los tratamientos, lo que sugiere que estos son los principales órganos afectados por el Clorpirifos a bajas concentraciones en condiciones de exposición subaguda.

En el encéfalo, en los peces tratados con las diferentes concentraciones de Clorpirifos hubo un incremento en el espesor de la zona gris

periventricular del tectum óptico. Este incremento se debió a vacuolización difusa de esta zona, junto con gliosis y congestión multifocal. Los efectos adversos en el encéfalo tuvieron una relación dependiente de la dosis.

El cerebro es el primer órgano blanco afectado por los pesticidas organofosforados (De Silva y Samayawardhena, 2002). En el cerebro el Clorpirifos interfiere con la actividad de enzimas como la acetilcolinesterasa, llevándola a una disfunción progresiva y en último caso a su inhibición (Córdoba, 2001). Estas alteraciones en conjunto se han descrito poco en la literatura; sin embargo, estudios previos realizados en peces juveniles de *Oreochromis mossambicus* utilizando dosis subletales entre 34 y 100 µg/L por un período de siete días, relacionan estas alteraciones en forma directa con la dosis utilizada (Rajeswary y Ramudu, 2005). El tectum óptico de los peces es un centro que orienta patrones de respuesta que incluye los movimientos coordinados de la musculatura axial, aletas y ojos, las cuales constituyen respuestas naturales de los peces (Cerdá et al., 2008).

Como se indicó previamente no se observaron manifestaciones clínicas compatibles con efectos de inhibición de colinesterasas. Lo anterior sugiere que posiblemente el grado de alteración tisular encontrado en éste estudio no implica efectos clínicos evidentes. Infortunadamente los trabajos realizados con *Oreochromis mossambicus* (Rajeswary y Ramudu, 2005), utilizando dosis subletales mucho mayores a las aquí empleadas, no relacionan los efectos clínicos asociados con las lesiones y las dosis utilizadas. No obstante, la aparición de lesiones en el tectum óptico como las aquí descritas en peces de cultivo o del medio natural, debe alertar sobre un posible efecto tóxico causado por organofosforados, el cual deberá comprobarse con evaluaciones complementarias.

En el tejido renal la vacuolización de las células epiteliales tubulares fue un cambio relacionado directamente con los tratamientos utilizados. De lo anterior se concluye que este cambio es una lesión degenerativa, a la que otros autores han denominado nefrosis vacuolar (Ferguson, 2006). Esta alteración

ha sido descrita previamente en trabajos de exposición a cadmio (Thophon et al., 2003), mercurio (Banerjee y Bhattacharya, 1994) y se ha asociado a la toxicidad por pesticidas, entre ellos el glifosato (Eslava et al., 2007).

La acumulación intracitoplasmática de inclusiones eosinófilas en las células de los túbulos renales presentó diferencias significativas entre el grupo no expuesto y el grupo dosificado con la mayor concentración de Clorpirifos. Esta alteración ha sido descrita previamente en Colombia por otros autores, asociándose con exceso de proteína (Iregui et al., 2004) y con toxicidad por glifosato (Eslava et al., 2007). Este cambio podría deberse en este estudio a un aumento en la absorción de proteínas del filtrado glomerular o a sobrecarga en los túbulos proximales como ha sido propuesto antes (Jiraungkoorskula, 2002; Read, 1991), como consecuencia de la exposición al Clorpirifos.

El agrandamiento aparente de los ovillos glomerulares y la disminución del espacio urinario asociado, presentó diferencias significativas entre los tratamientos en forma similar a la observada en la nefrosis vacuolar. Esta alteración ha sido descrita previamente por otros autores y se ha relacionado directamente al impacto del tejido renal por xenobióticos y por agentes infecciosos (Simpson et al., 2000). En este estudio este hallazgo podría explicarse como un efecto directo de la exposición al Clorpirifos.

En el hígado se presentó diferencia significativa entre los tratamientos para las alteraciones nucleares, con respecto al control, con predominio de cariomegalia y binucleación. Estas lesiones se han reportado previamente en estudios en peces de estuario (Simpson et al., 2000) y bajo la exposición al glifosato (Eslava et al., 2007). Estos cambios, y principalmente la cariomegalia se ha observado como una lesión en respuesta a la exposición a tóxicos y a químicos carcinogénicos (Stentiford et al., 2003). De esta manera, la detección histopatológica de atipias nucleares podría ser útil como biomarcador de la exposición a contaminantes, donde el Clorpirifos podría desempeñar un papel importante para su desarrollo.

La presencia de inclusiones eosinófilas en el citoplasma de los hepatocitos también fue una lesión relacionada directamente a las mayores concentraciones de Clorpirifos. Al parecer estos gránulos hialinos están compuestos esencialmente de albúmina sérica y el desarrollo de estas inclusiones citoplasmáticas se puede deber al aumento en su disponibilidad y a alteraciones en la permeabilidad producidas por un incremento en la presión portal (Schlicht, 1963).

Ultraestructuralmente las gotas hialinas poseen una matriz granular limitada por retículo endoplásmico rugoso, o bien pueden estar constituidas por lisosomas secundarios (Papadimitriou *et al.*, 2000). Esta lesión se ha asociado a excesos de proteína (Iregui *et al.*, 2004) y se ha observado en peces expuestos a glifosato (Eslava *et al.*, 2007). En este estudio se constata que también puede ser ocasionada por exposición subaguda a Clorpirifos.

No se encontraron diferencias estadísticas para las lesiones en las branquias. Estas lesiones podrían deberse a un efecto asociado a la calidad del agua, y a variables diferentes a los parámetros físico químicos evaluados, sugiriendo exposición a posibles contaminantes. Las branquias por estar en contacto directo con el medio acuático constituyen un blanco primario para contaminantes irritantes (Ferguson *et al.*, 1992). Las lesiones encontradas en branquias no están asociadas a un contaminante particular y pueden ser originadas por metales pesados, pesticidas y xenobióticos orgánicos como se ha comunicado previamente (Eslava *et al.*, 2007). De esta manera y bajo las condiciones del estudio, estas lesiones no se pueden definir como biomarcadores específicos de exposición al Clorpirifos.

De igual manera a lo observado en las branquias, no se encontró diferencia estadística significativa para las lesiones presentes en las gónadas. Al estudiar las gónadas no se observó la presencia de ovocitos. Las lesiones encontradas de fibrosis intersticial y vacuolización del epitelio germinal son lesiones asociadas a la exposición experimental con algunos xenoestrógenos (Folmar, 2001; Rasmussen *et al.*, 2005) y reportadas

previamente por otros autores en peces de estuario impactados con químicos disruptores (Carballo *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2000; Stentiford *et al.*, 2003). De esta manera y bajo las condiciones de nuestro estudio, estas lesiones no se pueden definir como biomarcadores específicos de exposición al Clorpirifos, pero sugieren la presencia de contaminantes en el agua utilizada en el experimento.

#### *Inmunohistoquímica*

En este trabajo se verificó la inducción de Vtg en hígado y gónada de los animales expuestos a bajas concentraciones de Clorpirifos 4, 8 y 12 µg/L y en los no expuestos; encontrando diferencia estadística en la expresión de esta proteína entre el grupo control y los grupos con tratamiento. La detección de Vtg por inmunomarcación en peces machos confirmó la presencia de exposición a xenoestrógenos. La Vtg es una proteína específica de las hembras, sintetizada en el hígado, transportada a través de la sangre a los oocitos en crecimiento y que se acumula en el saco vitelino de los peces como reserva de alimento para embriones y estadios larvales de los peces (Arukwe *et al.*, 2003). La síntesis de Vtg es hormono - dependiente, y está mediada por la interacción entre el estradiol y los receptores de estrógenos (REs), llevando a la inducción de los genes y a su transcripción. En machos la activación de genes que responden a estrógenos se produce por muchos disruptores químicos, como estrógenos sintéticos, alquilfenoles, fitoestrógenos y algunos pesticidas (Canapa *et al.*, 2007; Desantis *et al.*, 2005), los cuales pueden interferir con la liberación de las gonadotropinas, la esteroidogénesis y con la unión a los receptores de estrógenos nucleares (Frenzilli, 2008). Por esta razón, la presencia de la proteína Vtg o la expresión del gen de Vtg en machos se considera como un indicador de polución por xenoestrógenos (Folmar *et al.*, 2000; Hemmer *et al.*, 2008).

Las especies acuáticas parecen ser particularmente vulnerables a los químicos disruptores endocrinos, debido a que sus ecosistemas reciben una amplia variedad de contaminantes (Ferreira, 2008). Este es el caso del presente trabajo donde la inmunomarcación

para Vtg se presentó tanto en los animales tratados con Clorpirifos, como en el grupo control sin tratamiento. Lo anterior sugiere que la expresión de Vtg observada en machos de tilapia se debe a xenoestrógenos circulantes en el agua utilizada en este experimento, procedente de un acueducto municipal. La producción anómala de Vtg en machos o peces inmaduros se mide comúnmente como el punto final de exposición para químicos o contaminantes xenoestrogénicos en especies de peces (Canapa *et al.*, 2007).

En este estudio, la inmunomarcación de Vtg se verificó para el caso del tejido hepático en el citoplasma de los hepatocitos, sinusoides y plasma retenido de venas centrolobulillares y de vasos portales. Esta marcación ha descrito sido similar en trabajos previos de otros autores (Beyer *et al.*, 2007). La Vtg se produce primariamente en los hepatocitos, pero de igual manera aunque con bajos niveles de transcritos, se ha detectado en el testículo de varias especies de peces (Blum *et al.*, 2008).

Para el caso del tejido gonadal en este estudio la inmunomarcación encontrada está de acuerdo a la descrita por otros investigadores (Davis *et al.*, 2008), siendo esta prominente en el tejido intersticial, asociada a las estructuras vasculares y con menor frecuencia en el epitelio germinal testicular.

En conjunto la evidencia de la Vtg en los tejidos evaluados está de acuerdo a lo relatado anteriormente (Beyer *et al.*, 2007). Luego de la inducción de su síntesis en el tejido hepático, la Vtg es secretada de los hepatocitos y pasa a los sinusoides y de allí a la circulación general. Al parecer la Vtg es una proteína de secreción rápida, esto es sugerido por la marcación un poco más tenue en el citoplasma de los hepatocitos de los machos de este estudio, en contraste con la marcación más fuerte en las estructuras vasculares, de manera similar a lo comunicado antes por Canapa *et al.* (2007).

La expresión de Vtg en el tejido hepático y gonadal en este trabajo presentó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, siendo mayor en los grupos testigo y expuesto a

4 µg/L de Clorpirifos que en los tratamientos de 12 y 8 µg/L, para los días 21 y 28 de exposición. Las concentraciones crecientes de Clorpirifos en éste estudio, indujeron un efecto negativo sobre la expresión de Vtg, lo que sugiere un efecto de bloqueo de la síntesis de la proteína (Park *et al.*, 2007), dependiente de la concentración de éste insecticida y del tiempo de exposición.

Una respuesta en la expresión de Vtg, como la observada en este estudio no se ha reportado previamente, esto hace necesario plantear algunas posibles explicaciones al respecto, que deberán comprobarse en el futuro empleando modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, como los que se han reportado previamente (Andersen *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2003).

Esta respuesta antiestrogénica, podría deberse a que las concentraciones experimentales de Clorpirifos saturaron los receptores (REs) inhibiendo la síntesis de Vtg; a que el Clorpirifos se une a los REs produciendo una alteración conformacional, la cual aunque permite la dimerización del receptor y la unión al contrareceptor falla en activar la transcripción o, a que el Clorpirifos no activa los REs y cause bloqueo de estos, actuando como antagonista (Lazier *et al.*, 1996).

Lo anterior indica la necesidad de realizar futuros estudios para caracterizar a nivel molecular los efectos del Clorpirifos sobre la expresión de Vtg.

Estos resultados también podrían deberse a una alteración en la tasa de inducción de Vtg por efecto del agua utilizada en el experimento, que si bien provenía de un acueducto municipal y se destinaba al consumo humano, podría contener xenoestrógenos que no fueron determinados en este estudio por exceder los objetivos y los recursos disponibles para ello. Estos xenoestrógenos podrían haber competido por la unión a los REs alterando la síntesis de Vtg.

De este estudio se concluye que la exposición subaguda al Clorpirifos provoca cambios histopatológicos en el tectum óptico, el riñón y el hígado, e induce la expresión de Vtg en relación

inversa a la concentración utilizada, esto sugiere un efecto de bloqueo en la síntesis de esta proteína dependiente la concentración de este insecticida. Adicionalmente, se determinó la expresión de Vtg en tilapias sin tratamiento lo que insinúa la presencia de xenoestrógenos en el agua de un acueducto municipal en Antioquia utilizada para el consumo humano. Investigaciones futuras deberán incluir la identificación de los contaminantes presentes en el agua utilizada en este estudio y en el ambiente acuático de la cuenca hidrográfica donde se origina.

En Norte América y en la unión europea se han desarrollado múltiples investigaciones que proporcionan evidencia de disrupción endocrina en ecosistemas acuáticos con énfasis particular en contaminantes estrogénicos. En esos países estas investigaciones han impactado la legislación y las normas técnicas para monitorear disrupción endocrina (Matthiessen y Johnson, 2006).

Los resultados de este estudio, junto con los obtenidos por otros investigadores en Colombia evaluando el impacto de los herbicidas y sus mezclas (Eslava *et al*, 2007; Morales y Rodríguez, 2004; Murcia y Stashenko, 2008), son documentos clave, que sugieren la necesidad de establecer programas de monitoreo en nuestro medio que proporcionen información para la toma de decisiones, que ayuden a evaluar el impacto de estos contaminantes para la salud animal, para la salud pública, y para actualizar nuestra legislación al respecto.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Politécnico Jaime Isaza Cadavid por el apoyo brindado durante la ejecución de éste trabajo en sus instalaciones: Laboratorio de Bioensayos (San Jerónimo, Antioquia). La ejecución de esta investigación fue posible gracias a los recursos concedidos al grupo de investigación en Ciencias Veterinarias Centauro en la Estrategia de Sostenibilidad 2009 – 2010 del Comité para el Desarrollo de la Investigación de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Antioquia.

### Referencias

- Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermannsdn IM, Bonefeld-Jorgensen EC. Effects of currently used pesticides in assay for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 179:1-12.
- Arboleda JP; Peinado JE, Urdaneta MA, Carrascal E. Informe nacional sobre uso y manejo de plaguicidas en Colombia, tendiente a identificar y proponer alternativas para reducir el escurrimiento de plaguicidas al Mar Caribe. Ministerio del Medio, proyecto PNUMA//UCR/CAR. 2000; [Fecha de acceso: 23 de marzo de 2006] URL: <http://www.ine.gob.mx/cenica/cydif/seminario/c/>.
- Arukwe A, Gokoyr A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp Hepatol* 2003; 2:1- 21.
- Arukwe A, Nilsen BM, Berg K. Immunohistochemical analysis of the vitellogenin response in the liver of Atlantic salmon exposed to environmental estrogens. *Biomarkers* 1999; 4:373-380.
- Banerjee S, Bhattacharya S. Histopathology of kidney of *Channa punctatus* exposed to chronic nonlethal level of Elsan, mercury and ammonia. *Ecotoxicol Environ Saf* 1994; 29:265 – 275.
- Baquero M. Manual de calidad de inmunohistoquímica en anatomía patológica, Hospital Donostia, Unidad de Comunicación, 2007; p 10.
- Bernet D, Schmidt H, Meier W, *et al*. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis* 1999; 22:25-34.
- Beyer J, Bechmann RK, Taban IC, Aas E, Reichert W., Seljeskog E. Sanni S. Biomarker measurements in long term exposures of a model fish to produced water components (PAHs and alkylphenols). *Akvamiljø* 2007; 2:1-28.
- Biocompare. The buyer's guide for life scientist. Rabbit / Mouse Ig Kit, Advance – HRP Detection from Dako. [Fecha de acceso: 7 de julio de 2008] URL: <http://www.biocompare.com/Product.Details.html>
- Blum JL, Nyagode BA, James MO, Denslow ND. Effects of the pesticide methoxychlor on gene expression in the liver and testes of the male largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquat Toxicol* 2008; 86:459-469.
- Canapa A, Barucca M, Gorbi S, Benedetti M, Zucchi S, Biscotti MA. Vitellogenin gene expression in males of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* from Terra Nova Bay (Ross Sea): A role for environmental cadmium?. *Chemosphere* 2007; 66:1270-1277.
- Carballo M, Aguayo S, de la Torre A, Muñoz MJ. Plasma vitellogenin levels and gonadal morphology of wild carp (*Cyprinus carpio L.*) in a receiving rivers downstream of sewage treatment plants. *Sci Total Environ* 2005; 341:71-79.

- Cerdá JM, Muriach B, Zanuy S, Muñoz JA. A cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): The midbrain and hindbrain. *Acta Histochemica* 2008; 10:1-18.
- Córdoba D. Toxicología. 4a. Edición, Manual Moderno, Bogotá (Colombia), 2001. 858p.
- Chandrasekara LWHU, Pathiratne A. Body size-related differences in the inhibition of brain acetylcholinesterase activity in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by chlorpyrifos and carbosulfan. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007; 67:109-119.
- Córdoba J. Calidad de agua: su papel en la producción acuícola. En: I Curso – Seminario Internacional de Patología y Sanidad Piscícola. Bogotá (Colombia), Agosto de 2006.
- Dai D, Tang J, Rose R, Hodsong E, Bienstock R et al. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *Pharmacology* 2001; 29:825-823.
- Davis LK, Pierce AL, Hiramatsu N, Sullivan CV, Hirano T, Grau EG. Gender-specific expression of multiple estrogen receptors, growth hormone receptors, insulin-like growth factors and vitellogenins, and effects of 17  $\beta$ -estradiol in the male tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen Comp Endocrinol* 2008; 156:544-551.
- De Silva PMCS, Samayawardhena LA. Effects of Clorpirifoson reproductive performances of guppy (*Poecilia reticulata*). *Chemosphere* 2005; 58:1293-1299.
- De Silva PMCS, Samayawardhena LA. Low concentrations of Lorsban in water result in far reaching behavioral and histological effects in early life stages in guppy. *Ecotoxicol Environ Saf* 2002; 53:248-254.
- Desantis S, Corriero A, Cirillo F. Immunohistochemical localization of CYP1A, vitellogenin and zone radiate proteins in the liver of swordfish (*Xiphias gladius L*) taken from the Mediterranean Sea, South Atlantic, South Western Indian and Central North Pacific Oceans. *Aquat Toxicol* 2005; 71:1-12.
- Eslava PR, Ramírez WF, Rondón IS. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Universidad de los Llanos, Colombia, 2007.
- Ferguson H W. Systemic Pathology of Fish. Scotian Press. London 2006.
- Ferguson HW, Morrison D, Ostland VE, Lumsden J, Byrne P. Responses of mucus – producing cells in gill disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Comp Pathol* 1992; 106:255-265.
- Ferreira, F. Vitellogenin gene expression in the intertidal blenny *Lipophrys pholis*: A new sentinel species for estrogenic chemical pollution monitoring in the European Atlantic coast? *Comp Biochem Physiol* 2008; 7:1010-1016.
- Folmar LC, Gardner GR, Schreiber MP, Magliulo-Cepriano L, Mills LJ, Zarogian G, et al. Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquat Toxicol* 2001; 51:431-41.
- Folmar LC, Hemmer M, Hemmer R, Bowman C, Kroll K, Denslow ND. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheephead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. *Aquat Toxicol* 2000; 49:77-88.
- Frenzilli G, Falleni A, Scarcelli V, Del Barga I, Pellegrini S, Savarino G, et al. Cellular responses in the cyprinid *Leuciscus cephalus* from a contaminated freshwater ecosystem. *Aquat Toxicol* 2008; 10:6-16.
- Giesy JP, Solomon KR, Coats JR, Dixon KR, Giddings JM, Kenaga EE. Chlorpyrifos: Ecological Risk Assessment in North American Aquatic Environments. *Rev Environ Contam Toxicol* 1999; 160:1-129.
- Gul A. Investigation of acute toxicity of clorpirifos-metyl on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus L.*) larvae. *Chemosphere* 2005; 59:163-166.
- Hemmer MJ, Cripe GM, Hemmer BL, Goodman LR, Salinas KA, Fournie JW, Walker CC. Comparison of estrogen-responsive plasma protein biomarkers and reproductive endpoints in sheephead minnows exposed to 17-trenbolone. *Aquat Toxicol* 2008; 88:128-136.
- Iregui CA, Hernández E, Jiménez A, Pulido A, Rey AL, Comas J, et al. Primer Mapa Epidemiológico de las Enfermedades de los Peces en Colombia. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia Bogotá. 2004.
- Jiraungkoorskula W, Upathama ES, Kruatrachuea M, Sahaphongc S, Vichasri-Gramsa S, Pokethitiyooka P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Sci Asia* 2002; 28:121-127.
- Kim BH, Takemura A, Kim SJ, Lee YD. Vitellogenin synthesis via androgens in primary cultures of tilapia hepatocytes. *Gen Comp Endocrinol* 2003; 132:248-255.
- Lazier CB, Langley S, Ramsey NB, Wright JM. Androgen Inhibition of Vitellogenin Gene Expression in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen Comp Endocrinol* 1996; 104:321-329.
- Loaiza A, Jaramillo J, León F. Incidencia de factores sociales, económicos, culturales y técnicos en el uso de agroquímicos por pequeños productores del departamento de Antioquia. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología. PRONATTA, Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Diciembre 2000; 172p.
- Mahmut S. Sarikaya R, Erkoc F, Kocak O. Investigation of acute toxicity of clorpirifos-metyl on guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 2005; 60:93-96.
- Matthiessen P, Johnson I. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environ Pollut.* 2006; 146:9-18.
- Morales CA, Rodríguez N. El Clorpirifos: posible disruptor endocrino en bovinos de leche. *Rev Col Cienc Pec* 2004; 17:255-266.

- Murcia MA, Stashenko E. Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia. *Agro Sur* 2008; 36:71-81.
- Örn S, Holbechb H, Madsenc T, Norrgrena L, Petersenc GI. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquat Toxicol* 2003; 65:397-411.
- Papadimitriou JC, Drachenberg CB, Brenner DS, Newkirk C, Trump BF, Silverberg SG. "Thanatosomes": A unifying morphogenetic concept for tumor hyaline globules related to apoptosis. *Hum Pathol* 2000; 31:1455-1465.
- Park CB, Takemura A, Aluru N, Park YJ, Kim BH, Lee CH. Tissue-specific suppression of estrogen, androgen and glucocorticoid receptor gene expression in feral vitellogenic male Mozambique tilapia. *Chemosphere* 2007; 69:32-40.
- Pathiratne, A., Athauda, P. Toxicity of chlorpyrifos and dimethoate to fingerlings of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: cholinesterase inhibition. *Sri Lanka J. Aquatic Sci* 1998; 3:77-84.
- Rajeswary, S., Ramudu K. Studies on toxicological effects of chlorpyrifos in the brain of freshwater fish, *Oreochromis mossambicus* (Peters) under sublethal exposure. *Environmental crisis and Security in the new millennium*. 2005; 241-248.
- Rasmussen TH, Teh SJ, Bjerregaard P, Korsgaard B. Anti-estrogen prevents xenoestrogen-induced testicular pathology of eelpout (*Zoarces viviparus*). *Aquat Toxicol* 2005; 72:177-194.
- Read NG. The role of lysosomes in hyaline droplet nephropathy induced by a variety of pharmacological agents in the male rat. *Histochem J* 1991; 23:436-443.
- Roberts RJ. *Fish Pathology*. W B Saunders, Edinburgh 2001.
- Schlicht I. Experimentelle untersuchungen uber die hyalintropfige Eiweiss-speicherung der leber. *Virchows Arch path Anat* 1963; 336:342-353.
- Sindhe VR, Kulkarni RS. Gonadosomatic and hepatosomatic indices of the freshwater fish *Notopterus notopterus* (Pallas) in response to some heavy metal exposure. *J Environ Biol* 2004; 25:365-368.
- Simpson MG, Parry M, Kleinkauf A, Warbreck D, Walker P, Leah RT. Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flexus*) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals. *Mar Environ Res* 2000; 53:283-287.
- Stentiford GD, Longshaw M, Lyons BP, Jones G, Green M, Feist SW. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar Environ Res* 2003; 55: 137-159.
- Thophon S, Kruatrachue M, Upatham ES, Pokethitiyook P, Sahaphong S, Jaritkhuan S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ Pollut* 2003; 121:307-320.