

Efecto del neonicotinoide - tiametoxam en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*)

García, K.Y.^{1*}, Salazar, M.¹, García, J.E.¹

¹ Universidad del Quindío, Grupo de Investigación en Biología y Educación (BIOEDUQ)

Resumen: El pez cebra ha surgido como la mejor opción para ensayos toxicológicos, ofrece ventajas marcadas como un modelo de desarrollo de vertebrados y permite comprender las dinámicas de diversas sustancias tóxicas. Actualmente se ha encontrado una creciente preocupación por el uso de plaguicidas neonicotinoides y los posibles efectos ecológicos y ecotoxicológicos sobre los polinizadores y los invertebrados, y los efectos indirectos en ecosistemas acuáticos. El objetivo principal fue evaluar las alteraciones fenotípicas desde huevo hasta el periodo larval del pez cebra (*Danio rerio*) (6 días aproximadamente) relacionadas con tres dosis (0,48µg/ml, 0,90µg/ml, 1,30µg/ml) de plaguicida Neonicotinoide (tiametoxam). Para esto se usaron cuatro repeticiones, cada repetición con veinte huevos. Se realizó un diseño de bloques al azar evaluando la tasa de mortalidad y una descripción macroscópica de las alteraciones provocadas por este plaguicida, se encontraron alteraciones como: cifosis, lordosis, edema pericárdico, edema del saco vitelino, hipertrofia en las aletas y una ralentización en el desarrollo, la mayor tasa la presentó el tratamiento 3 (1,30µg/ml), demostrando que el neonicotinoide tiametoxam es tóxico y letal para el pez cebra.

Palabras clave: insecticida; neonicotinoides; pez cebra; alteraciones; toxicología.

Abstract: *Effect of neonicotinoid - thiamethoxam in the zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development.*

Zebrafish has emerged as the best choice for toxicological testing, present marked advantages as a model of vertebrate development and allows to understand the dynamics of various toxic substances. There has been growing concern over the use of neonicotinoid pesticides and possible ecological and ecotoxicological effects on pollinators and invertebrates, and indirect effects on aquatic ecosystems. The objective was to evaluate phenotypic alterations from egg to larval period of zebrafish (*Danio rerio*) (6 days approximately) related to three doses (0,48µg/ml, 0,90µg/ml, 1,30µg/ml) of the pesticide Neonicotinoid (Thiamethoxam), for this, four replicates were used, each repetition with twenty eggs. A randomized block design was performed evaluating the mortality rate and a macroscopic description of the alterations caused by this pesticide, alterations were found such as: kyphosis, lordosis, pericardial edema, yolk sac edema, fins hypertrophy and a slowdown in development, demonstrating a higher mortality rate in the treatment with higher concentration (1,30µg/ml). The neonicotinoid thiamethoxam that proved to be toxic and lethal to the zebrafish.

Keywords: toxicology; alterations; zebrafish; neonicotinoid; insecticide.

Introducción

Los insecticidas son uno de los principales contaminantes del medio ambiente. Su capacidad de biocumulación y bioampliación hace que persistan mucho tiempo en el ambiente. Aunque juegan un papel importante al proteger los cultivos de plagas, representan grandes amenazas para la salud de los seres humanos y de los organismos distintos a los diana (Taparia et al., 2014).

Los neonicotinoides son una familia de insecticidas que actúan en el sistema nervioso central de los insectos. Son una clase relativamente nueva de insecticidas derivados de la nicotina. Debido a su alta neurotoxicidad para los insectos, los neonicotinoides son muy eficaces en el control de ciertas plagas. Aplicados como tratamientos

foliares, en gránulos en el suelo o como recubrimiento de semillas, se ha convertido en una de las clases de insecticidas más utilizados en agricultura. Se utilizan en plantas de maíz, en árboles frutales y en muchos otros cultivos. Tienen propiedades sistémicas, lo que significa que son absorbidos por la totalidad del sistema vascular de la planta, por lo que todas las partes de las plantas en crecimiento contienen residuos de los plaguicidas, incluso el polen y el néctar (Gómez, 2013).

El perfil ambiental de esta clase de insecticidas indica que son persistentes, tienen alto potencial de lixiviación y escorrentía, y son altamente tóxicos para una amplia gama de invertebrados. Por lo tanto, los neonicotinoides representan un riesgo significativo para las aguas superficiales y la diversidad de fauna acuática y terrestre que sustentan estos ecosistemas (Morrissey et al., 2015).

Son activos a dosis muy pequeñas, y según la dosis, la inactivación del sistema nervioso puede provocar la muerte de los individuos afectados, directamente, o una serie de trastornos como descoordinación, parálisis, pérdidas del sentido de la orientación, de la eficacia del vuelo y de la termorregulación (Gómez, 2013).

Los impactos ecológicos de insecticidas o productos químicos en el ambiente se pueden estudiar mediante el uso de modelos biológicos sensibles. El pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en un organismo modelo ampliamente utilizado en estudios ecotoxicológicos (Hill et al., 2005). Las numerosas ventajas que presenta el pez cebra para evaluar cualquier tipo de sustancia están dadas por: i) desarrollo embrionario externo lo que permite el manejo de los embriones sin perjudicar a los peces adultos. ii) los embriones y las larvas son transparentes por lo tanto facilita al investigador la observación de los diferentes órganos, con la ayuda de una lupa o de un estereomicroscopio. iii) tiempo corto de desarrollo (72 h); alcanzan la madurez sexual a los 3 - 4 meses. iv) son fértiles todo el año, lo cual proporciona una gran capacidad reproductiva. v) una hembra es capaz de colocar cientos de huevos por semana, esto permite disponer de una gran cantidad de individuos. vi) finalmente existe un gran conocimiento sobre su biología, y su genoma está totalmente secuenciado (Moreno, 2013). Además de esto, el pez cebra es muy utilizado como modelo para la comprensión de la biología del desarrollo en los vertebrados, además, de presentar una alta conservación en la función de genes entre este y el humano (Clark y Ekker, 2015). La importancia del pez cebra se ha determinado porque muchos de los fenotipos de los mutantes se han encontrado en el humano, aportando un poderoso instrumento para profundizar en las patologías humanas (Báez y col, 2004).

El tiametoxam se usa en cultivos de mango, es un insecticida sistémico de la familia de los neonicotinoides con actividad por contacto e ingestión. Es considerado una sustancia moderadamente tóxica con gran espectro de actividad insecticida. Para *Apis mellifera* es tóxica y dañino para organismos acuáticos y edáficos. Es utilizado para el control de larvas como hojas y para impedir que los insectos se alimenten de éstas. El control se realiza especialmente para insectos que atacan cultivos de mango cítricos, arroz, trigo, algodón, aceitunas, coliflor, etc., alimentos de un alto consumo a nivel mundial (Sinhay y Thaker, 2014); organismos entre los que se destacan: Aphididae, Thysanoptera, Coleoptera, Chilopoda, Diplopoda, Symphyta e Isoptera, interviene a nivel estomacal por el consumo de las hojas con residuos del insecticida y por contacto directo con el mismo. Actúa, al igual que otros neonicotinoides, interfiriendo en la transmisión nerviosa al unirse a receptores nicotínicos de acetilcolina (Syngenta, 2015).

*e-mail: kygarciab@uqvirtual.edu.co

En estudios realizados con ratones y conejos se ha demostrado que los neonicotinoides afecta el desarrollo y la calidad de los embriones de preimplantación y muestra embriotoxicidad incluso a dosis agudas (Babel'ová et al., 2017), aunque se espera que los insecticidas neonicotinoides tengan una influencia dañina en los mamíferos, hay pocos datos experimentales en animales para apoyar el efecto y los mecanismos, Yoneda et al., (2018) realizaron un estudio con ratones macho, donde aplicaron distintas dosis de dinotefurano y realizaron análisis conductuales, en una prueba de campo abierto, la actividad locomotora total se incrementó de una manera dependiente de la dosis, estos resultados sugieren que la exposición a dinotefurano en ratones machos causa hiperactividad, dado que la acetilcolina causa la liberación de dopamina, los neonicotinoides pueden conferir un riesgo de trastornos del desarrollo a través de una alteración en los sistemas de monoaminas.

A pesar de que en la Unión Europea en el 2018 se firmó la resolución para la prohibición de neonicotinoides, en países de América, incluido Colombia, se siguen aplicando cada vez más a medida que se reduce el uso de los insecticidas organofosforados. Considerando que los neonicotinoides son perjudiciales para las abejas, persisten varios años en el suelo y el agua, lo que constituye un peligro para los ecosistemas, se debe evitar el uso indebido o ilegal de estas sustancias, con una legislación de uso general para el control de estos insecticidas y buscar alternativas para el control de insectos.

Por tanto, es imprescindible conocer acerca de la toxicología ambiental, la cual analiza los efectos de los contaminantes, evaluando la naturaleza de estos y las dosis que afectan, ya sea de manera tóxica o nociva a los diferentes niveles estructurales de los seres vivos (Alvarez, 2011). La evaluación de insecticidas es de gran importancia, ya que permite conocer las alteraciones físicas que experimenta dichos organismos ante un contaminante. Los resultados obtenidos servirán como apoyo para futuras evaluaciones de los efectos toxicológicos de los plaguicidas en los diferentes estadios del desarrollo de poblaciones diferentes a los diana, que están en contacto con estos químicos, además, servirá como un medio de información a los agricultores sobre los efectos de estos insecticidas y su proceso de contaminación en cuerpos de agua.

El presente estudio se diseñó para identificar los efectos morfológicos y la tasa de mortalidad inducidos por tiametoxam en tres concentraciones, en el desarrollo embrionario del pez cebra.

Material y métodos

Área de estudio

El estudio se realizó en las instalaciones del laboratorio BIOEDUQ, el cual cuenta con una humedad relativa que oscila entre 68% y 80% y una temperatura promedio que oscila entre los 18°C y 25°C. Los huevos embrionados fueron donados por el Laboratorio de Biología del Desarrollo y el Laboratorio de Neurociencias y Ritmos Circadianos de la Universidad de los Andes.

Sustancia química

Tiametoxam 3-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-iliden(nitro) amina, extracto puro fue donado por el Laboratorio de Plaguicidas y Salud de la Universidad del Quindío. Las soluciones de ensayo se realizaron a partir de una solución stock que contenía 1mg de tiametoxam en 100 ml de agua destilada para una concentración final de 10µg/ml, a partir de esta concentración stock se obtuvo las tres diferentes soluciones experimentales que consistía en: solución al 0,48µg/ml (5 ml de solución stock en 100 ml de agua destilada), solución al 0,90µg/ml (10 ml de solución stock en 100 ml de agua destilada) y solución al 1,30µg/ml (15 ml de solución stock en 100 ml de agua destilada).

Proceso experimental

El proceso experimental se desarrolló de la siguiente manera: se utilizaron tres tratamientos (0,48µg/ml; 0,90µg/ml y 1,30µg/ml) más

el grupo control, en cada uno se realizaron cuatro repeticiones, 20 huevos para cada repetición, es decir 80 huevos por tratamiento, para un total de 320 huevos para todo el proceso experimental.

Se realizó una evaluación de huevos de pez cebra y se removieron los huevos no fertilizados, muertos o con presencia de hongo, para evitar daños en el proceso. Los huevos fertilizados con 10 hpf (horas post fertilización), se ubicaron en cajas Petri con las diferentes concentraciones anteriormente mencionadas realizando una renovación diaria de soluciones para mantener las concentraciones apropiadas. La exposición de insecticida se evaluó hasta las 144 horas (6 días aproximadamente). La observación del desarrollo de pez cebra se realizó directamente en la caja Petri usando para ello un microscopio óptico con cámara digital marca Zeiss, se realizó una descripción y un registro fotográfico de las alteraciones encontradas en huevos y larvas.

Análisis estadístico

Se realizó un diseño de bloques completos al azar. La variable de respuesta fue la tasa de mortalidad, se utilizó el paquete estadístico Statistix 8.0. Además de esto se realizó una tabla según el nivel de afectación de las alteraciones encontradas en cada uno de los tratamientos.

Resultados y discusión

Tasa de mortalidad

Según el análisis de varianza bajo el diseño de bloques al azar, se observaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla 1). Al realizar la prueba LSD (Least significant difference) de comparación de medias, el tratamiento tres (1,30µg/ml) presentó la mayor tasa de mortalidad con respecto a los tratamientos uno y dos (0,48µg/ml y 0,90µg/ml).

Tabla 1. Análisis de varianza bajo un diseño de bloques al azar

Tratamiento	Concentraciones	Medias en %	Error estándar
1	0,48µg/ml	48,75	±0,0584
2	0,90µg/ml	51,25	±0,0584
3	1,30µg/ml	71,25*	±0,0584
4	Control	0	±0,0584

*De acuerdo con el valor de $p = 0000$, el tratamiento tres (1,30µg/ml) presentó la mayor tasa de mortalidad con respecto a los tratamientos uno y dos (0,48µg/ml y 0,90µg/ml). El grupo control no presentó mortalidad. El error estándar fue de ±0,0584.

Los estudios realizados sobre los efectos de los insecticidas en el desarrollo embrionario del pez cebra han demostrado que estos afectan la sobrevivencia. En este estudio, se utilizaron tres dosis y se determinó una relación directa entre dosis y mortalidad. La mortalidad observada en los tres tratamientos indica según el análisis de varianza, que existen diferencias altamente significativas, se observó que la dosis de 1,30µg/ml presentó la mayor tasa de mortalidad con un valor de 71,25 superando el 50% de la población, lo cual demuestra que el tiametoxam presenta una alta toxicidad en las etapas de desarrollo embrionario que puede ser considerado como efectos letales a la exposición a corto plazo. El tiempo estimado de sobrevivencia de los embriones fue aproximadamente 8 días en cada uno de los tratamientos.

Los ambientes acuáticos están siendo constantemente contaminados debido a la descarga de efluentes agrícolas, industriales o domésticos que amenazan la existencia de organismos; entre estos contaminantes, se encuentran los insecticidas procedentes de la fumigación de productos agrícolas, como un factor principal de la pérdida de la biodiversidad en los ecosistemas (Zhang et al., 2017). Durante las últimas 2 décadas, una nueva clase de insecticidas, los neonicotinoides, se encuentra entre las cinco principales clases químicas de insecticidas en el mercado mundial (Jeschke y Nauen, 2008; Jeschke y Nauen, 2011; Tomizawa y Casida, 2011; Casida y

Durkin, 2013). El amplio uso de insecticidas neonicotinoides ha causado preocupación por sus efectos en los organismos no objetivo, la alta solubilidad en agua, junto con su amplio uso en el paisaje, coloca a los medios acuáticos en alto riesgo de contaminación a través de eventos de escorrentía.

Dada la frecuencia de detección de los neonicotinoides en los sistemas acuáticos, estudios recientes han explorado los potenciales efectos letales y subletales de los neonicotinoides en especies acuáticas (Pisa et al., 2015; Anderson et al., 2015). Además, de sus efectos sobre la mortalidad, los neonicotinoides han demostrado reducir la movilidad, las tasas de alimentación, fecundidad, desarrollo y crecimiento en organismos acuáticos (Alexander et al., 2008; Colombo et al., 2013).

Alteraciones morfológicas

El pez cebra (*Danio rerio*), es una alternativa para estos tipos de estudios, ya que presenta un menor consumo de tiempo y un menor costo de mantenimiento de acuerdo con otros tipos de modelos. Su uso como un modelo para el estudio de la toxicidad en el desarrollo embrionario ha ido en aumento de manera constante. Asimismo, el pez cebra ha demostrado ser un modelo predictivo para la evaluación de los efectos teratogénicos y neurotóxicos de muchas sustancias conocidas (McGrath y Li, 2008).

Los embriones de pez cebra (*Danio rerio*) expuestos a 0,48µg/ml de tiametoxam presentaron alteraciones morfológicas, que se empezaron a evidenciar en el proceso de eclosión del embrión, aproximadamente entre las 72 y 120 h, encontrándose: lordosis leve con un ángulo de 90° y 145°, lordosis severa con ángulo de 17°, edema pericárdico, lordosis media, edema del saco vitelino e hipertrofia de la aleta caudal (Figura 1). En la figura 1D, se observa el área del edema pericárdico que fue de 0,075 mm².



Figura 1: A. Embrión con desarrollo normal (control). B. Embrión de 5 dpf (días post-fertilización) expuesto a 0,48µg/ml de tiametoxam, con una leve lordosis (L) con ángulo de 90° y Edema pericárdico (EP) C. Embrión de 4 dpf expuesto a 0,48µg/ml de tiametoxam con una lordosis severa (L) y edema pericárdico (EP). D. Embrión de 5dpf expuesto a 0,48µg/ml de tiametoxam con lordosis leve (L), Edema pericárdico, edema del saco vitelino (ESV) e hipertrofia de la aleta caudal (HA).

Los embriones de pez cebra (*Danio rerio*) expuestos a 0,90µg/ml de tiametoxam presentaron mayores alteraciones a nivel óseo, como: lordosis y cifosis (Figura 2), hipertrofia en aleta caudal (Figuras 2C) y enrollamiento total del cuerpo (Figura 2G). Igualmente se encontraron alteraciones a nivel cardiaco como edema pericárdico (Figuras 2D y 2F) y edema del saco vitelino (Figura 2F).

La toxicidad de los neonicotinoides en el desarrollo embrionario del pez cebra no se ha estudiado ampliamente, sin embargo, los datos obtenidos en el presente trabajo han sido relacionados con estudios en otras sustancias, donde han reportado alteraciones similares en columna vertebral entre las que se encuentra lordosis, cifosis y enrollamiento total del cuerpo (Figura 2B, 2C y 2G), como lo encontrado por DeMicco et al., (2009), que demostraron que los piretroides en el desarrollo embrionario del pez cebra son ligeramente teratogénicos a dosis muy altas, causando deformación en el eje del cuerpo.

Los embriones de pez cebra (*Danio rerio*) expuestos a 1,30µg/ml de

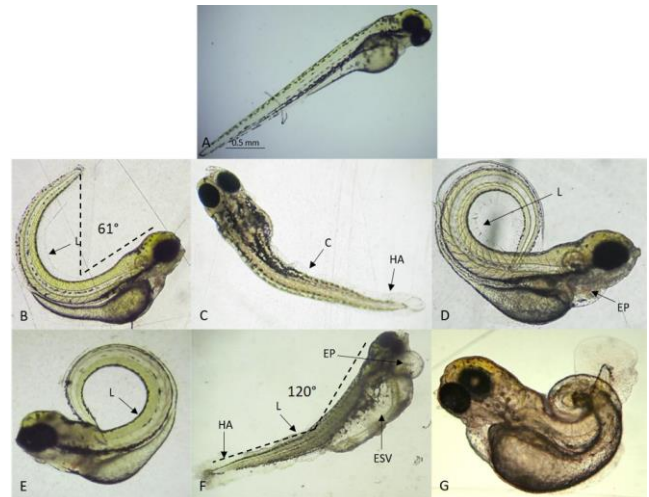


Figura 2: A. Embrión con desarrollo normal (control). B. Embrión de 5 dpf expuesto al 0,90µg/ml de tiametoxam con lordosis leve (L). C. Embrión de 4 dpf expuesto al 0,90µg/ml de tiametoxam con cifosis leve (C), hipertrofia en la aleta caudal (HA). D. Embrión de 4 dpf expuesto al 0,90µg/ml, y edema pericárdico leve (EP). E. Embrión de 5 dpf expuesto al 0,90µg/ml de tiametoxam con lordosis leve (L), edema pericárdico (EP), edema del saco vitelino (ESV) e hipertrofia de la aleta caudal (HA). F. Embrión de 5 dpf expuesto al 0,90µg/ml de tiametoxam con lordosis severa (L), edema pericárdico (EP), edema del saco vitelino (ESV) e hipertrofia de la aleta caudal (HA). G. Embrión de 4 dpf con un enrollamiento total del cuerpo.

tiametoxam, presentaron mayor número de alteraciones a nivel cardiaco que se pudo evidenciar a las primeras horas de la eclosión entre las 72 h hasta las 144 h (Figura 3), la mayoría de embriones mostraron una lordosis severa con un ángulo de 30° (Figura 3C), edema de saco vitelino e hipertrofia de la aleta caudal (Figura 3D y 3E). Igualmente se registró una malformación en la notocorda (Figura 3E). La totalidad de estas alteraciones óseas se lograron observar en las primeras horas de eclosión aproximadamente entre 96 y 120 h. En este tratamiento el edema pericárdico se presentó en mayor ocurrencia y en mayor tamaño con un área desde 0,42 mm² hasta 0,54 mm².



Figura 3: A. Embrión con desarrollo normal (control). B. Embrión de 5 dpf expuesto al 1,30µg/ml de tiametoxam con lordosis (L), edema pericárdico (EP) y edema del saco vitelino (ESV). C. Embrión de 4 dpf expuesto al 1,30µg/ml con lordosis severa (L) con ángulo de 30°, edema pericárdico (EP), edema del saco vitelino (ESV) y hemorragia en la parte superior a la aleta caudal (H). D. Embrión de 5 dpf expuesto al 1,30µg/ml de tiametoxam con edema pericárdico (EP), edema del saco vitelino (ESV) e hipertrofia de la aleta caudal (H). E. Embrión de 6 dpf expuesto al 1,30µg/ml con daños en la parte superior de la notocorda (DN), edema pericárdico (EP) y edema del saco vitelino (ESV).

Se plantea que las alteraciones como el edema pericárdico y el edema del saco vitelino pueden ser causados por la súperhidratación del órgano afectado, debido a problemas de la regulación osmótica derivados de la acumulación del insecticida (Hollert et al., 2003; Hallare et al., 2005; Cook et al., 2005). Se puede inferir que el tiametoxam pudo haber inducido significativamente alteraciones cardiovasculares en embriones de pez cebra.

En la concentración 0,48µg/ml de tiametoxam se logró observar

Tabla 2. Niveles de afectación en cada una de las alteraciones encontradas por tratamientos.

Alteraciones	T1	T2	T3
Lordosis*	++[+]	+++ [+++]	+++ [+++]
Cifosis	-	+	-
Edema pericárdico	+	+	++
Edema del saco vitelino	+	+	+
Hipertrofia de aletas	+	+	+
Enrollamiento del cuerpo	-	+	-
Hemorragia	-	-	+
Daños en notocorda	-	-	+
Coagulación del huevo	+	+	-
Huevos sin eclosionar	+	+	+

Niveles de afectación en cuanto a número de individuos. Leve (+) Media (++) Severa (+++) (n = 80 embriones). *Lordosis. Niveles de afectación según el ángulo. Leve [+], ángulo de 90° a 170° de cabeza a cola comparado al control que tiene un ángulo de 180°. Media [++], ángulo de 80° a 30° de cabeza a cola. Severa [+++] ángulo menor de 30° de cabeza a cola

embriones de 6 dpf con deterioro total del cuerpo y alteración ósea (Figura 4E). También se observó la no eclosión de embriones en la concentración de 0,90µg/ml, varios embriones duraban dentro del corion hasta los 6 dpf (Figura 4D), en la concentración de 1,30µg/ml de Tiametoxam se encontró una coagulación del embrión, ésta generalmente se presentó 24 h después de agregar el tratamiento (Figura 4C), en esta misma concentración se observaron varios embriones que no terminaban el proceso de eclosión y conservaron el corión alrededor de la cabeza hasta los 8 dpf (Figura 4D y 4F).

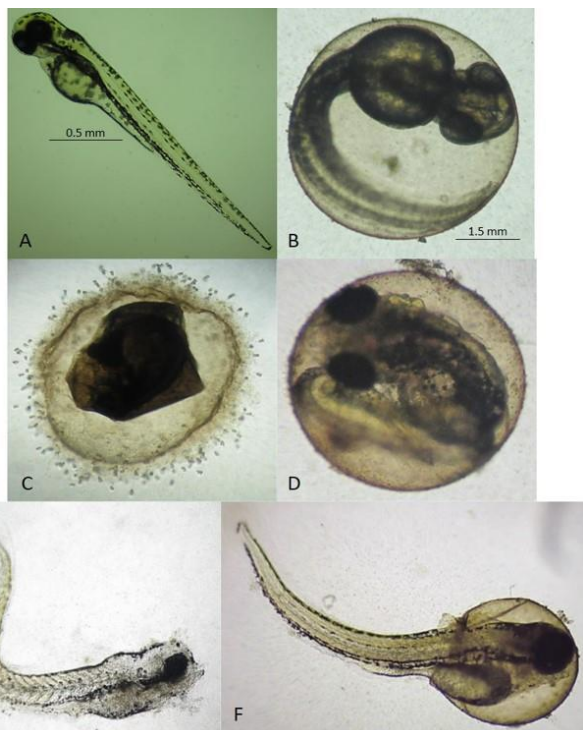


Figura 4: A. Embrión con desarrollo normal (control). B. Huevo embrionado con desarrollo normal (control). C. Huevo embrionado con 2 dpf expuesto a 1,30µg/ml presenta una coagulación del embrión y una invasión por vorticella. D. Embrión con 6 dpf expuesto a 0,90µg/ml, sin eclosionar. E. Embrión con 6 dpf expuesto al 0,48µg/ml, mostrando un alto grado de toxicidad. F. Embrión con 4 dpf expuesto al 1,30µg/ml, sin terminar el periodo eclosión.

Las primeras etapas de vida del pez cebra pueden ser más sensibles a las sustancias tóxicas que en los peces adultos (Fishman, 2001; Sun et al., 2006; Vitor et al., 2010), se ha demostrado que las altas concentraciones de insecticidas pueden atravesar el corion y causar múltiples efectos teratogénicos e incluso causar la muerte en embriones de peces. Esto puede ser debido a la rápida absorción del

insecticida, que pasa a través de los poros de la membrana del corión produciendo daños a los embriones en desarrollo, como los hallados en esta investigación; también, se encontraron efectos similares en embriones de pez cebra expuestos a otros tipos de insecticida como: cipermetrina, bifentrina, clorpirifós, trifluzamida y fipronil, los cuales producen lesiones y muertes de larvas, encontrando anomalías como: edema pericárdico, eje del cuerpo curvo, apoptosis en las células del sistema nervioso, movimientos espontáneos anormales, inhibición de la eclosión, ritmo cardíaco lento degeneración de notocorda, entre otras. (Stehr et al., 2006; Jin et al., 2009; Shi et al., 2011; Yang et al., 2016; Zhang et al., 2017).

Las anomalías en la columna vertebral y del esqueleto observadas en los embriones en los tres tratamientos están en concordancia con lo reportado por Bomma et al., (2016), donde utilizaron toxafeno y otros insecticidas organoclorados, organofosforados y neonicotinoídes y hallaron alteraciones óseas como lordosis y cifosis en peces *Pimephales promelas*.

Los cambios morfológicos observados como la coagulación del huevo y la no eclosión de embriones han sido utilizados como criterios de valoración toxicológicos, como los encontrados en el presente trabajo, donde estas alteraciones se presentaron en menor número, además estos cambios han sido reportados por Bai et al., (2016) donde menciona que estas variaciones son definidas como letales, subletales, teratogénicas, cuando son provenientes de insecticidas.

Comparación de los tratamientos con las alteraciones

En la tabla 2 se observa los niveles de afectación con los tratamientos. La alteración con mayor ocurrencia fue la lordosis presentando un nivel medio en el tratamiento uno (0,48µg/ml) es decir más del 40% y menos del 80% de los individuos presentaron esta alteración. En cuanto a los tratamientos dos y tres (0,90µg/ml y 1,30µg/ml) con un nivel severo, más del 80% de individuos presentó esta alteración. Según el ángulo de cabeza a cola, en el tratamiento uno (0,48µg/ml) se identificó un nivel de afectación leve, es decir, la mayoría de individuos tuvieron un ángulo de 90° a 170° de cabeza a cola comparado con el control el cual presentó un ángulo de 180°. Los tratamientos dos y tres (0,90µg/ml y 1,30µg/ml) exhibieron un nivel de afectación severo, la mayoría de individuos con un ángulo menor de 30° de cabeza a cola con respecto al control.

Para el caso de edema pericárdico el tratamiento 1,30µg/ml presentó un nivel de afectación medio, más del 40% de los individuos mostraron este tipo de alteración, mientras que en los otros dos tratamientos los niveles de afectación fueron leves, menos de 40% de los individuos. En otras alteraciones como cifosis, edema del saco vitelino, hipertrofia de aletas, enrollamiento del cuerpo, hemorragia, daños en notocorda, coagulación del huevo y huevos sin eclosionar se presentaron de forma leve en los tratamientos, es decir menos del 40% de los individuos registraron estos tipos de alteraciones.

El pez cebra se usa comúnmente para modelar enfermedades humanas usando modificaciones genéticas; sus aplicaciones incluyen estudios de corazón, riñón, hígado, hematopoyético, inmunológico y otros sistemas. De manera similar, se puede usar para modelar los efectos en la salud de las exposiciones ambientales para comprender mejor las etiologías y los mecanismos de las enfermedades relacionadas con el ambiente en los seres humanos. Desde hace varios años ha aumentado la preocupación por la persistencia de compuestos químicos en el medio ambiente, así como los efectos agudos y a largo plazo de la exposición a tóxicos ambientales y contaminantes; el pez cebra proporciona un modelo ideal para estudiar estos efectos. Los productos químicos pueden simplemente agregarse al medio embrionario y el pez y transparente puede ser evaluado en busca de letalidad y anomalías del desarrollo a partir de la fertilización hasta las etapas larvares. White et al., 2008).

La capacidad de observar los efectos de las toxinas in vivo permite la evaluación directa de la toxicidad, así como las medidas de absorción, distribución, metabolismo y eliminación. El pez cebra se ha utilizado

para estudiar los compuestos que van desde metales y metaloides de origen natural hasta componentes sintéticos de productos de consumo, pesticidas, subproductos de procesamiento industrial e incineración de desechos. El pez cebra también es fácilmente susceptible para pruebas de toxicidad, y para investigaciones sobre los mecanismos de acción de productos farmacéuticos y sustancias tóxicas. El modelo de pez cebra brinda la oportunidad de combinar el poder de la toxicología rápida y la capacidad de estudiar la asociación de exposiciones con resultados a largo plazo en un vertebrado, convirtiéndolo en un sistema complementario e invaluable para la investigación en ecotoxicología (Bambino y Chu, 2017).

Conclusiones

El pez cebra es un excelente sistema de modelo animal para estudiar los efectos toxicológicos del neonicotinoide tiametoxam. La tasa de mortalidad fue directamente proporcional a la concentración de tiametoxam. Entre más alta la concentración, más alta la mortalidad de embriones. Las alteraciones morfológicas más frecuentes fueron: lordosis, edema pericárdico, edema del saco vitelino e hipertrofia en aletas. Las menos frecuentes fueron: enrollamiento del cuerpo, hemorragia y daños en notocorda. El neonicotinoide tiametoxam que demostró ser tóxico y letal para el pez cebra.

Agradecimientos

A la Universidad del Quindío, Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental, las Doctoras Zayra Viviana Garavito y Verónica Akle de la Universidad de los Andes, al Laboratorio de investigación en Biología y Educación (BIOEDUQ), al almacén de materiales y reactivos de biología de la Universidad del Quindío, al museo de artrópodos de la Universidad del Quindío (MAUQ) y al Laboratorio de Plaguicidas y Salud de la Universidad del Quindío.

Bibliografía

1. Alexander AC, Heard KS, Culp JM. Emergent body size of myfly survivors. *Freshw Biol* 2008; 53, 171-180.
2. Álvarez C. Efectos teratógenos del nitrato de plomo en el desarrollo embrionario del pez cebra *Danio rerio* (Halmiton, 1822) a cinco dosis subletales (Trabajo de pregrado) Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C, 2011.
3. Anderson JC, Dubetz C, Palace PV. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: a literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Sci total Environ* 2015; 505, 409-422.
4. Báez OA, Prieto F, Galán CA. Bioacumulación y daños genotóxicos en pez cebra (*Danio rerio*) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo (México). *Ensayos en cortos plazos. AquaTIC* 2005; 21, 62 – 70.
5. Bai H, Kong W, Shao C, Li Y, Zhang L, Min L, Guan F, Wang C. Zebrafish embryo toxicity microscale model for Ichthyotoxicity evaluation of marine natural products. *Mar Biotechnol* 2016; 18, 264-270.
6. Babelová J, Šeřčiková Z, Čikoš Š, Špirková A, Kovařiková V, Koppel J, Makarevich AV, Chrenek P, Fabian D. Exposure to neonicotinoid insecticides induces embryotoxicity in mice and rabbits. *Toxicology* 2017; 392, 71-80.
7. Bambino K, Chu J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. *Curr Top Dev Biol.* 2017; 124, 331-367.
8. Bomma Y, Rajesh P, Venkateswara R. Toxicomorphomics and toxicokinetics of quinalphos on embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) and its binding affinity towards hatching enzyme, ZHE1. *Aquat Toxicol* 2016; 180, 155-163.
9. Casida JE, Durkin KA. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu Rev Entomol*

- 2013; 58, 99-117.
10. Clark KJ, Ekker SC. How Zebrafish Genetics Informs Human Biology. *Nature Edu* 2015; 8, 3.
11. Colombo V, Mohr S, Berghahn R, Pettigrove VJ. Structural changes in a macrozoobenthos assemblage after imidacloprid pulses in aquatic field-based microcosms. *Arch Environ Contam Toxicol* 2013; 65, 683-692.
12. Cook LW, Paradise CJ, Lom B. The Pesticide Malathion Reduces Survival and Growth in Developing Zebrafish, 2005.
13. DeMicco A, Cooper KR, Richardson JR, White LA. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides in zebrafish embryos. *Toxicol Sci* 2009; 113, 177-186.
14. Fishman MC. Genomics-zebrafish-the canonical vertebrate. *Science* 2001; 294, 1290- 1291.
15. Gómez, A. Neonicotinoides versus abejas. Consultores apícolas, asistencia técnica y formación. Castellón, España, 2013.
16. Hallare AV, Kosmehl T, Schulze T, Hollert H, Köhler HR, Triebekom R. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Sci Total Environ* 2005; 347, 254-271.
17. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* 2005; 86, 6-19.
18. Hollert H, Keiter S, König N, Rudolf M, Ulrich M, Braunbeck T. A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J Soils Sediments* 2003; 3, 197-207.
19. Jeschke P, Nauen R. Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag Sci* 2008; 64, 1084-1098.
20. Jeschke P, Nauen R, Schindler M, Elbert A. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J Agric Food Chem* 2011; 59, 2897-2908.
21. Jin M, Zhang X, Wang L, Huang C, Zhang Y, Zhao M. Developmental toxicity of bifenthrin in embryo-larval stages of zebrafish. *Aquat Toxicol* 2009; 95, 347-354.
22. McGrath P, Li CQ. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discovery Today* 2008; 13, 394-401.
23. Moreno M. Mantenimiento en el laboratorio del pez cebra (*Danio rerio*). Universidad del País Vasco, 2013.
24. Morrissey CA, Mineau P, Devries JH, Sánchez-Bayo F, Liess M, Cavallaro M, Liber K. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environ Int* 2015; 74, 291-303.
25. Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, y col. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015; 22, 68-102.
26. Sinhay S. y Thaker AM. Study on the impact of lead acetate pollutant on immunotoxicity produced by thiamethoxam pesticide. *Indian J Pharmacol.* 2014; 46, 596 – 600.
27. Shi X, Aihua G, Guixiang J, Yuan L, Jing D, Jing J, Fan H, Long Y, y col. Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish. *Chemosphere* 2011; 85, 1010-1016.
28. Stehr CM, Linbo TL, Incardona JP, Scholz NL. The developmental neurotoxicity of fipronil: notochord degeneration and locomotor defects in zebrafish embryos and larvae. *Toxicol Sci* 2006; 92, 270-278.

29. Sun ZH, Jia SJ, Meng AM. Zebrafish swimming in life sciences. *Chin Bull Life Sci* 2006; 18, 431-436.
30. Syngenta. Tiametoxam, insecticida granulado dispersable 2015. www.syngenta.com.co. Consultado el día 12 de febrero de 2017.
31. Taparia N, Mathur L, Shahani L. Toxic action of quinalphos 25% ec (flash), an organophosphate insecticide in induction of skeletal malformations in the embryos of *Gallus domesticus*. *World J Pharm Pharm Sci* 2014; 3, 2078-2088.
32. Tomizawa M, Casida JE. Neonicotinoid insecticides: highlights of a symposium on strategic molecular designs. *J Agric Food Chem* 2011, 59, 2883-2886.
33. Vitor V, Joana A, Marisa S, Vitor R. Effects of marine toxins on reproduction and early stages development of aquatic organisms. *Mar Drugs* 2010; 8, 59-79.
34. White RM, Sessa A, Burke C, Bowman T, LeBlanc J, Ceol C, et al. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell* 2008; 2, 183-189.
35. Yang Y, Qi S, Wang D, Wang K, Zhu L, Chai T, Wang C. Toxic effects of thifluzamide on zebrafish (*Danio rerio*). *J Hazard Mater* 2016; 307, 127-136.
36. Yoneda N, Takada T, Hirano T, Yanai S, Yamamoto A, Mantani Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Tabuchi, Y, Hoshi N. Peripubertal exposure to the neonicotinoid pesticide dinotefuran affects dopaminergic neurons and causes hyperactivity in male mice. *J Vet Med Sci*. 2018; 4, 634-637.
37. Zhang J, Liu L, Ren L, Feng W, Peng L, Wu W, Yan Y. The single and joint toxicity effects of chlorpyrifos and beta-cypermethrin in zebrafish (*Danio rerio*) earlylife stages. *J Hazard Mater* 2017; 334, 121-131.