



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA**

**LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**TITULO:**

**“EVALUACIÓN DEL DAÑO TERATOGENICO INDUCIDO EN  
EMBRIONES DE PEZ CEBRA A TRAVÉS DE LA PRUEBA “*Danio rerio*  
Teratology assay (DarTa)” POR MANGANESO A CONCENTRACIONES  
REGISTRADAS EN AGUA DE LA DESEMBOCADURA DE METZTITLÁN,  
HIDALGO.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**VILLAFUENTES TÉLLEZ HÉCTOR ALBERTO**

**ASESOR:**

**DR. JUAN CARLOS GAYTÁN OYARZÚN**

**Mineral de la Reforma, Hidalgo.**

**Octubre 2009**

## **DEDICATORIA**

A todas la personas que se involucraron en la realización este proyecto, incluyendo a profesores, amigos y en especial a mis padres que me han brindado su apoyo a lo largo de mi formación como universitario.

A todos ellos ¡ Gracias !

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. **Juan Carlos Gaytán Oyarzún**, por darme la oportunidad de realizar un de sus proyectos de titulación.

A todos mis compañeros de laboratorio de genética evolutiva con los que compartí gran parte del tiempo y experiencias durante la realización de la tesis.

A todos mis compañeros de generación que a lo largo de la carrera compartimos momentos inolvidables.

Se agradece a todos los profesores presentes en mi formación, al Centro de Investigaciones Biológicas, en especial Laboratorio de Genética Evolutiva, y a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por facilitar sus servicios.

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	10
<b>2. ANTECEDENTES</b>	
2.1 CONTAMINACIÓN.....	12
2.2 CONTAMINACIÓN DEL AGUA.....	14
2.3 METALES PESADOS.....	16
2.4 MANGANESO Y SUS EFECTOS TOXICOS.....	19
2.5 CINETICA AMBIENTAL DEL MANGANESO.....	20
2.6 TOXICOLOGIA AMBIENTAL.....	22
2.7 ECOTOXICOLOGIA.....	22
2.8 BIOINDICADORES.....	28
2.9 BIOENSAYOS.....	31
2.10 TERATOGENESIS.....	33
2.11 BIOLOGÍA DEL PEZ CEBRA ( <i>Danio rerio</i> ).....	35
2.12 DESARROLLO EMBRIONARIO.....	40
2.13 EVALUACIÓN DE DAÑO TERATOGENICO EN <i>Danio rerio</i> .....	43
<b>3. JUSTIFICACION</b> .....	45
<b>4. OBJETIVOS</b>	
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	47
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	47
<b>5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>	
5.1. AREA DE ESTUDIO.....	48
5.2. MUESTREO Y ANALISIS DE AGUA.....	50
5.3. ANALISIS DE LAS MUESTRAS.....	53
5.4. EVALUCIÓN DE LA TÓXICIDAD Y TERATOGENICIDAD DEL Mn.....	53
5.5. EVALUACIÓN DEL AGUA DE METZTITLAN,HIDALGO.....	61
5.6. ANALISIS ESTADISTICO.....	62

<b>6. RESULTADO Y ANALISIS DE ESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>7. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>84</b>
<b>8. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>89</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Rutas de ingreso de contaminantes orgánicos.....	13
<b>Tabla II.</b> Exposición prolongada al manganeso .....	21
<b>Tabla III.</b> Ejemplos de biomarcadores a diferentes niveles de organización.....	29
<b>Tabla IV.</b> Escalas de observación en ensayos de toxicidad.....	33
<b>Tabla V.</b> Impacto del pez cebrá en biomedicina y biotecnología.....	38
<b>Tabla VI.</b> Características de la laguna de Metztlán, Hidalgo.....	50
<b>Tabla VII.</b> Condiciones físico-químicas de adultos de <i>D. rerio</i> .....	55
<b>Tabla VIII.</b> Temperatura óptima de Mn establecida por etapa de desarrollo de <i>D. rerio</i> .....	57
<b>Tabla IX.</b> Concentraciones de Mn presentes en la zona de estudio.....	64
<b>Tabla X.</b> Registro de ovoposiciones.....	65
<b>Tabla XI.</b> Resultados de fertilidad y viabilidad observada con Mn en embriones de <i>D. rerio</i> .....	67
<b>Tabla XII.</b> Datos para realizar el análisis de varianza (ANOVA) reportando las CL de cada concentración y los porcentajes de malformaciones....	68
<b>Tabla XIII.</b> Porcentaje y número de individuos <i>D. rerio</i> que presentan daño teratogénico de las 3 dosis subtóxicas con 72 horas de tratamiento durante el desarrollo embrionario.....	69
<b>Tabla XIV.</b> Resultados de Prueba de Tukey HSD test; utilizando como variable organismos con malformaciones, con $p \leq 0.5000$ y $\alpha 0.050$ .....	70
<b>Tabla XV.</b> Comparación de medias estadísticas en 3 concentraciones de Mn.....	71
<b>Tabla XVI.</b> Resultados de las pruebas estadísticas y las diferencias de medias.....	72
<b>Tabla XVII.</b> Toxicidad y daño teratogénico de agua de San Cristóbal y la desembocadura de la laguna de metztlán.....	74
<b>Tabla XIII.</b> Porcentaje y número de malformaciones inducidas por tratamientos con agua de Metztlán, Hgo.....	76

**Tabla XIX.** Clasificación y descripción de malformaciones.....78

**Tabla XX.** Cuantificación de malformaciones en columna vertebral.....80

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Destino de un agente químico ambiental en el sitio efector del organismo.....	16
<b>Figura 2.</b> Toxicodinámica de los compuestos en un organismo.....	25
<b>Figura 3.</b> <i>D. rerio</i> , Hamilton, 1822.....	35
<b>Figura 4.</b> Estadios de desarrollo de <i>Danio rerio</i> .....	42
<b>Figura 5.</b> Malformaciones de columna vertebral de <i>D. rerio</i> .....	44
<b>Figura 6.</b> Laguna de Metztitlán.....	48
<b>Figura 7.</b> Mapa del estado de Hidalgo, localizando zona de estudio.....	49
<b>Figura 8.</b> Sitios muestreados de Metztitlán Hidalgo.....	49
<b>Figura 9.</b> Muestreo de agua.....	52
<b>Figura 10.</b> Sitios muestreados.....	51
<b>Figura 11.</b> Pecera de 70 litros con un lote de organismos experimentales.....	54
<b>Figura 12.</b> Medición de parámetros físico-químicos del agua de <i>D. rerio</i> en producción.....	54
<b>Figura 13.</b> Recolección de huevos utilizando sifón.....	58
<b>Figura 14.</b> Embriones de <i>D. rerio</i> colectados con 24 horas de desarrollo observados con microscopio estereoscópico.....	58
<b>Figura 15.</b> Embriones en tratamiento, con oxígeno y temperatura controlada.....	60
<b>Figura 16.</b> Curva de toxicidad de Mn en embriones de <i>D. rerio</i> a 24 horas de tratamiento.....	66
<b>Figura 17.</b> Número de organismos con malformaciones por tratamiento.....	69
<b>Figura 18.</b> Representación de las diferencias significativas que exhiben las concentraciones probadas.....	71
<b>Figura 19.</b> Frecuencia de malformaciones en columna vertebral a las tres concentraciones probadas en embriones de <i>D. rerio</i> .....	72

<b>Figura 20.</b> Grafica de toxicidad de agua de las localidades de Metztlán, Hgo.....	75
<b>Figura 21.</b> Comparación de alevines de pez cebra referente al retraso de pigmentación.....	76
<b>Figura 22.</b> Correlación de efectos tóxicos de las concentraciones de Mn y de las aguas de Metztlán.....	77
<b>Figura 23.</b> Embrión de <i>D. rerio</i> a 72 horas de desarrollo.....	77
<b>Figura 24.</b> Correlación de las frecuencias de malformaciones en las concentraciones de Mn probadas y las muestras de agua.....	80
<b>Figura 25.</b> Malformaciones sencillas y Malformaciones cuerpo curvo en columna vertebral en alevines del pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	81
<b>Figura 26.</b> Malformaciones en aleta caudal y Malformaciones dobles en Columna vertebral en alevines del pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	82
<b>Figura 27.</b> Malformaciones sencillas y Malformaciones múltiples en columna vertebral de alevines del pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	83
<b>Figura 28.</b> Malformaciones dobles y Malformaciones en aleta caudal de alevines del pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	84

## RESUMEN

En el presente trabajo se realizaron pruebas de toxicidad para evaluar el efecto teratogénico del manganeso (Mn) a tres dosis subtoxicas, con agua del río San Cristóbal y la que desemboca en la Laguna de Metztitlán, Hidalgo, tomando como referencia las concentraciones reportadas durante el muestreo en temporadas de lluvias y de estiaje durante un año; la prueba utilizada para evaluar el daño causado por el manganeso es DarTa (*Danio rerio* Teratology assay), la cual utiliza como bioensayos a los embriones de *Danio rerio* y evalúa el efecto teratogénico del Mn induciendo la frecuencia y tipo de malformaciones en columna vertebral.

La parte experimental inicia con un muestreo preliminar para identificar la presencia y concentración de manganeso en la zona de estudio; a partir de los datos conocidos se realizaron pruebas para determinar 3 dosis sub-toxicas obteniéndose los siguiente, a una concentración de 0.158µg/l (CL<sub>16</sub>), 0.079µg/l (CL<sub>23</sub>) y 0.316µg/l (CL<sub>21</sub>), partiendo de estas concentraciones se expusieron embriones de *D. rerio* con Mn, durante un periodo de 72 horas para identificar la frecuencia y tipo de malformaciones inducidas en columna vertebral, obteniéndose a 0.158µg/l (10% c/malformaciones), 0.079µg/l (8.3% c/malformaciones) y la 0.316µg/l (13% c/malformaciones), conoedores de que el agua San Cristóbal es una mezcla compleja que contiene otros elementos aparte de Mn, arrojando una toxicidad del 23.2% (CL<sub>23</sub>) de mortandad, y la desembocadura de la Laguna de Metztitlán arroja una toxicidad del 7.2% (CL<sub>7</sub>) de mortandad como una mezcla compleja.

Los resultados obtenidos apoyan estudios previos y futuros en la Laguna de Metztitlán, debido a que es un cuerpo de agua de gran importancia ecológica y se tiene el registro que existe un gran número de metales pesados presentes, y que existen fluctuaciones de estos en temporadas estacionales del año producto a actividades antropogénicas, cabe mencionar que las actividades que se realizan en la zona son de suma importancia para la economía de la población local que realiza actividades de agricultura y pesca dichos recursos son consumidos por la población, por ello es necesario evaluar el potencial de riesgo real que existente.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. CONTAMINACIÓN

Desde tiempos inmemoriales el hombre ha procurado establecer y aumentar su comodidad y bienestar siguiendo instintos ancestrales; las sociedades modernas han optado por aceptar los beneficios de la ciencia y tecnología, que se han ofrecido sin importar los riesgos (Vettorazzi, 1992).

Se denomina contaminación a la aparición de una nueva sustancia en un sistema natural (atmósfera, aguas, suelos) o al aumento de la concentración de una sustancia del sistema, superando las variaciones típicas y naturales. La contaminación puede ser química (mediante elementos o compuestos químicos en estado sólido, líquido o gaseoso), física (calor, ruido, radioactividad), o biológica (bacterias, virus y otros microorganismos) (Ruza *et al.*, 1984).

Todo cambio significativo en la composición o condiciones normales de un medio, constituye una forma de contaminación; como en cualquier ambiente contaminado, los cambios afectan al recurso en sí dependiendo de un fin determinado (Méndez, 2000); dentro de un ecosistema una gran variedad de especies pueden estar expuestas a contaminantes y a muy diversas rutas de ingreso, dependiendo del nicho ecológico al que pertenezca (Tabla I). La contaminación supone un desequilibrio grave en el biosistema, hasta el punto de llegar a imposibilitar la vida de las especies existentes (Baird, 2001).

**Tabla I. Principales rutas de ingreso de contaminantes orgánicos en los organismos (tomado de Castillo, 2004).**

<b>TIPO DE ORGANISMO</b>	<b>RUTA DE INGRESO</b>	<b>FUENTE DE CONTAMINANTES</b>
<b>Vertebrados Terrestres</b>	Sistema digestivo Piel Pulmones	Alimento y agua ingeridos. Aerosoles y partículas en aire Vapor; gotas y partículas en aire.
<b>Invertebrados Terrestres</b>	Tracto alimentario Cutícula (insectos) Tráqueas (artrópodos), vías aéreas	Alimento y agua. Superficies contaminadas. Ambiente contaminado (suelo). Gotas y partículas en aire.
<b>Peces</b>	Branquias Sistema digestivo	Contaminantes disueltos o suspendidos en agua y sedimentos. Alimento.
<b>Mamíferos acuáticos y aves</b>	Sistema digestivo	Alimento, Cantidades pequeñas de agua ambiental o agua ingerida (aves).
<b>Anfibios</b>	Sistema digestivo Piel	Alimento, Cantidades pequeñas de agua ingerida. Contaminantes disueltos agua y sedimentos.
<b>Invertebrados acuáticos</b>	Tracto alimentario Superficies respiratorias	Alimento y Agua ingerida. Contaminantes disueltos o suspendidos en agua y sedimentos.
<b>Plantas</b>	Hojas Raíces	Contaminantes en gotas o partículas Vapores. Contaminantes disueltos en agua del suelo.

## 2.2 CONTAMINACIÓN DE AGUA

Dentro de la contaminación del ambiente, los sistemas acuáticos enfrentan un problema de relevante importancia, debido a que impacta a nivel ecológico, económico y social, aunado a que cada segundo, la industria, ciudades y las zonas agrícolas, vierten toneladas de contaminantes a ríos y aguas costeras (Colín, 2001). La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la contaminación de aguas dulces de la siguiente manera, "Cuando su composición o su estado están alterados de tal modo que ya no reúnen sus condiciones o al conjunto de utilidades a las que se hubiera destinado en su estado natural" (OMS, 2006).

La contaminación de los mantos freáticos es de los principales problemas a que se enfrenta la humanidad debido a escurrimientos y filtraciones al subsuelo de las precipitaciones pluviales naturales que arrastran contaminantes solubles de la atmósfera y los suelos; así como las aguas residuales que tienen deficiente o ningún tipo de tratamiento de depuración (Molina, 2005).

Actualmente los sistemas acuíferos se pueden considerar, que están contaminados por cuatro tipos de contaminantes principalmente según la clasificación de González (1998):

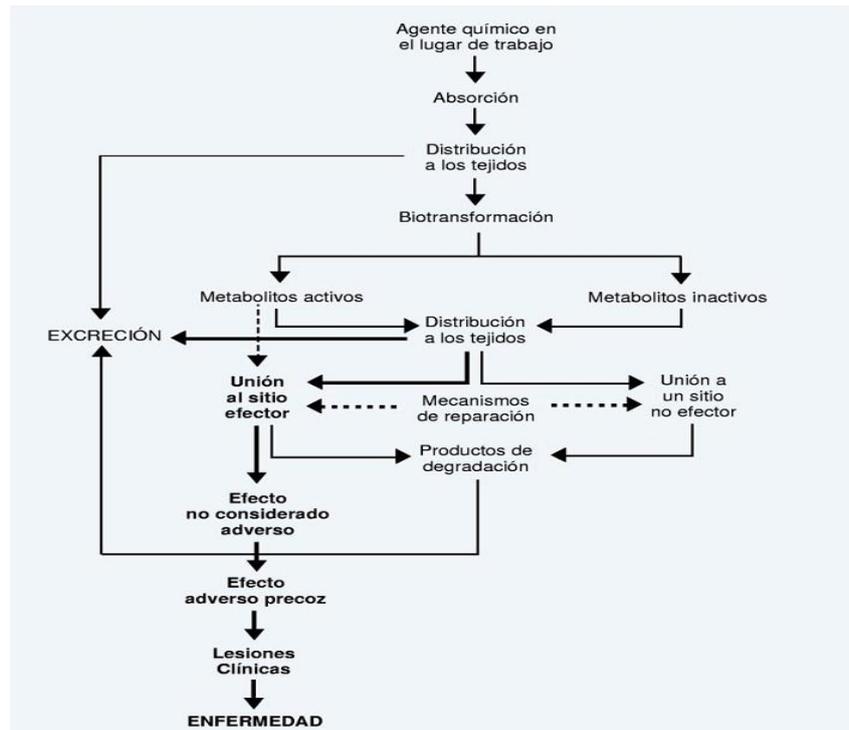
**a) contaminantes orgánicos:** son derivados de insecticidas, pesticidas, herbicidas, restos de benceno, toluenos, etc. En su mayoría asociados con el origen de procesos cancerígenos.

**b) contaminantes inorgánicos:** sustancias que el agua disuelve al pasar por la corteza terrestre y es muy común su presencia en pozos; unas de las sustancias inorgánicas más peligrosas que se pueden encontrar en mantos freáticos son el arsénico, plomo, mercurio, cadmio, níquel, cobre, sodio y asbesto, todas ellas en su mayoría asociadas con procesos cancerígenos.

**c) contaminantes biológicos:** es originada por microorganismos, que habitan en el agua y restos fecales; como por ejemplo bacterias, algas, virus, son elementos comunes, ocasionan muchas enfermedades, entre las que destacan el cólera y la tifoidea.

**d) contaminantes radioactivos:** son contaminantes que se encuentran en la naturaleza y por explosiones nucleares hechas por el hombre, como el *Beta* y *Alfa*, entre otras (González, 1998).

Una vez que un contaminante ingresa a un organismo, no siempre llega como tal hacia un órgano en particular, sino que pasa por una serie de transformaciones antes de llegar al órgano blanco (Fig. 1), así como procesos de acumulación y excreción (toxicocinética).



**Fig. 1. Destino de un agente químico ambiental en el sitio efector del organismo (tomado de Peña *et al.*, 2001).**

## 2.3 METALES PESADOS

Este grupo de elementos, comprende 40 elementos químicos, debido a que son metales que tiene una densidad igual o superior a  $5 \text{ g/cm}^3$  cuando está en forma elemental y/o su número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos) (Vega, 1985).

Los metales pesados son peligrosos porque tienden a bioacumularse, la bioacumulación significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo biológico en un cierto plazo, comparada a la concentración del producto químico en el ambiente (Ramos, 1994). Son elementos que se introducen en los ciclos biogeoquímicos por procesos naturales como erupciones volcánicas, alteración de rocas y minerales.

El aumento de estas concentraciones en tiempos recientes es consecuencia de diversas actividades antropogénicas. Los metales pesados llegan a los sistemas acuáticos por precipitación desde la atmósfera, o a través de aguas residuales industriales, agrícolas y domésticas (Barrón, 2002).

Entre los metales pesados de mayor interés toxicológico se encuentran: aluminio (Al), antimonio (Sb), arsénico (As), bario (Ba), berilio (Be), cadmio (Cd) cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), estaño (Sn), hierro (Fe), litio (Li), manganeso (Mn), mercurio (Hg), molibdeno (Mo), níquel (Ni), plomo (Pb), selenio (Se), talio (Tl) y zinc (Zn) (Vega,1985).

### **2.3.1 TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS**

La toxicidad en el medio acuático depende de la forma fisicoquímica en que se encuentren: iones simples o complejos, óxidos o hidróxidos, complejos organometálicos hidro o liposolubles, de la especiación química particular del elemento. La solubilidad y generalmente la biodisponibilidad varían con la temperatura, tiempo, impurezas, pH y también con el tamaño y la naturaleza de las partículas absorbentes del sistema acuático (Figueruelo *et al.*, 2001).

Los efectos de los metales y sus compuestos sobre los organismos acuáticos son diversos; muchos de ellos actúan como nutrientes de los organismos acuáticos; en otros casos, un exceso de bioelementos metálicos, puede ser tóxico e incluso letal, interfiriendo en algunos procesos vitales (Figueruelo *et al.*, 2001).

### **2.3.2 FACTORES QUE AFECTAN LA ACUMULACIÓN DE METALES PESADOS EN PECES**

El medio acuático puede ser dividido en tres compartimentos principales; agua, sedimentos y organismos vivos. Los elementos metálicos naturalmente presentes en el medio ambiente o introducidos artificialmente por las actividades humanas se reparten en estos compartimentos en función de diferentes mecanismos de naturaleza química, física o biológica. Los intercambios entre estos compartimentos estarán influenciados por las variaciones en los ecosistemas de los factores abióticos (características físico-químicas del agua y de los sedimentos) o bióticos (hábitat, régimen alimentario, naturaleza y cantidad de alimento disponible), por las variaciones de precipitación fluvial según las estaciones y fluctuaciones climatológicas (García, 2002).

Se podría establecer tres umbrales críticos para el contenido de metales: un primer umbral, a nivel de trazas, donde los metales esenciales juegan su papel de activadores enzimáticos indispensables en el metabolismo; un segundo umbral, que determina una absorción pasiva, donde los metales van acumulándose en ciertos órganos; y un tercer umbral, incompatible con los fenómenos vitales, que desencadena procesos de defensa que tienden a disminuir la permeabilidad y el paso de estos metales a través de las membranas celulares (Barreiro, 1991). El segundo y tercer umbral han dado pauta a estudios para dilucidar efectos sub letales y de toxicidad crónica (Barreiro, 1991).

## 2.4 MANGANESO Y SUS EFECTOS TÓXICOS

En la naturaleza el Mn se presenta en siete estados de oxidación, los más comunes son 2, 4 y 7, ocupa el doceavo lugar en abundancia ambiental (Rojas *et al.*, 2003); los países productores más importantes figuran Estados Unidos de América, Australia, Brasil, China, Gabón, India, Sudáfrica, Ucrania y México (Mineral Commodity Summaries, 2004).

Los compuestos del Mn tienen varias aplicaciones en la industria, el dióxido de manganeso se usa como un desecante y/o catalizador de pinturas y barnices; así como para la fabricación de vidrio y en pilas secas. Sus usos más frecuentes son: manufactura de cerámica, cerillos, vidrio, colorantes, puntas de soldadura, así como aleaciones de acero y hierro fundido, denominadas súper aleaciones no ferrosas (Castillo, 1999). Según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de los Estados Unidos de América (ATSDR), algunos compuestos orgánicos de manganeso se incluyen en pesticidas, tales como el “Maneb” o “Mancozeb”, en el metilciclopentadienil manganeso tricarbonil (MMT) y en algunos aditivos de gasolina (ATSDR, 2000).

Los efectos tóxicos por una exposición a manganeso producen desórdenes neurológicos y psiquiátricos durante exposición laboral a manganeso, principalmente por inhalación, para los animales el Manganeso es un componente esencial un gran número de enzimas encargadas de realizar diversas reacciones metabólicas durante el desarrollo (Donaldson, 1987).

En cuanto a los efectos tóxicos por manganeso en animales; el invertebrado, anfípodo, *Crangonyx pseudogracilis*, es el organismo más resistente al manganeso, en lo que se refiere a vertebrados, la especie más sensible es *Gastrophryne carolinensis*, para la que es admisible una concentración letal para el 50% de los individuos (CL<sub>50</sub>) igual a 1,42 mg/l (Birge, 1979).

Algunos animales la dosis letal es bastante baja, lo cual significa que tienen pocas posibilidades de supervivencia incluso a pequeñas dosis de manganeso cuando este excede la dosis esencial. El Manganeso puede causar disturbios en los pulmones, hígado y órganos vasculares, decremento de la presión sanguínea, fallos en el desarrollo de fetos de animales y daños cerebrales. En los últimos años el manganeso ha comenzado a considerarse como peligroso desde el punto de vista ambiental ya que, no se dispone de mucha información en lo referente a sus efectos y modos de acción, y se ha reportado que el manganeso es responsable de la inhibición de la síntesis de dopamina y serotonina en el cerebro de mamíferos (Crosby, 1998).

## **2.5 CINÉTICA AMBIENTAL DE MANGANESO**

Son pocos los trabajos existentes sobre toxicidad crónica del manganeso sobre organismos acuáticos. Uno de los organismos invertebrado más sensible a efectos de contaminantes es la pulga de agua (*Daphnia magna*), para la que se han reportado concentraciones tóxicas de Mn cerca a 0.88 mg/l (Kimball, 1978).

El manganeso exhibe un comportamiento algo único con respecto a su toxicidad (Nelson, 2001), debido a que se acumula en los tejidos ricos en mitocondrias y atraviesa fácilmente las barreras hematoencefálica y placentaria al ser un oligoelemento que interviene activador enzimático y cofactor enzimático (Tabla II), también se han observado concentraciones elevadas de manganeso en las zonas más pigmentadas del organismo, como son la retina, la conjuntiva pigmentada y la piel morena (Gunnar, 2001).

**Tabla II. Exposición prolongada al manganeso (tomado de Vega, 1985).**

<b>ESTADO</b>	<b>CONTAMINACIÓN</b>	<b>SÍNTOMAS Y SIGNOS DE INTOXICACIÓN</b>
Oxido de Manganeso	Agua potable  (originados de desecho de baterías secas)	<b>Neurológicos</b> -Anorexia -Astenia -Hiposexualidad -Hipertonía Muscular  <b>Psicomotores</b> -Disartria -Insomnio -Adiana
Ferromenganeso	Área en zonas aledañas a industrias de aleaciones	<b>Neumonías</b> <b>Bronquitis</b> -Neumonitis -Bronquitis

Las dosis relativamente altas del manganeso afectan la réplica del DNA y causan mutaciones en microorganismo y células de mamíferos; en estas últimas causa daño directo al DNA y aberraciones cromosómicas, así como cambios neurológicos, aumento de tono muscular y posturas anormales (Vega, 1985). Por otra parte García en el 2003, reporta que grandes cantidades de

manganeso afectan la fertilidad en mamíferos y tienen efectos tóxicos durante el desarrollo embrionario. Existen reportes a exposiciones prolongadas a compuestos de manganeso, de forma inhalada u oral, y que están asociados con la génesis de efectos adversos en el sistema nervioso y respiratorio, entre otros (International Manganese Institute, 2007).

## **2.6. TOXICOLOGÍA AMBIENTAL**

La ciencia encargada de evaluar los efectos de los agentes contaminantes es la toxicología ambiental, la cual se encarga de estudiar los daños causados al organismo por exposición a tóxicos que se encuentran en el medio ambiente; su objetivo principal, es evaluar el o los impactos que producen en la salud pública y en el ambiente (Cairns, 1992 y Peña *et al.*, 2001).

## **2.7 ECOTOXICOLOGÍA**

El uso de los métodos de evaluación biológica para detectar compuestos potencialmente dañinos tuvo sus orígenes desde principios del siglo XVII (Blaise *et al.*, 1985), pero en la segunda mitad del siglo XX se desarrolla una ciencia multidisciplinaria, con enfoques ambientales, ecológicos y toxicológicos denominada “Ecotoxicología”, cuyo principio se basa en que los organismos vivos y su ambiente son herramientas esenciales para la evaluación de la calidad ambiental, puesto que ellos son los que están expuestos a los efectos combinados de la ecotoxicidad y son el punto final de la evaluación de algún efecto. Evaluando, los efectos en ecosistemas e individuos, desde su emisión

hasta los efectos individuales; pasando por su cinética y transformación tanto en el ambiente como en los organismos; e incluso impactando en la gestión de normas y leyes que regulen el uso, almacenamiento, liberación y exposición a agentes xenobióticos (Fornicola, 1992).

El efecto causado por un tóxico dependerá de su toxicidad inherente (capacidad de causar algún efecto nocivo sobre un organismo vivo), de la sensibilidad de organismo a ese agente, del grado de exposición, que a su vez dependerá de la cantidad que ingrese, del tiempo y concentración de la exposición, de cuánto pase a los distintos compartimientos del ecosistema y de su persistencia (Fornicola, 1992).

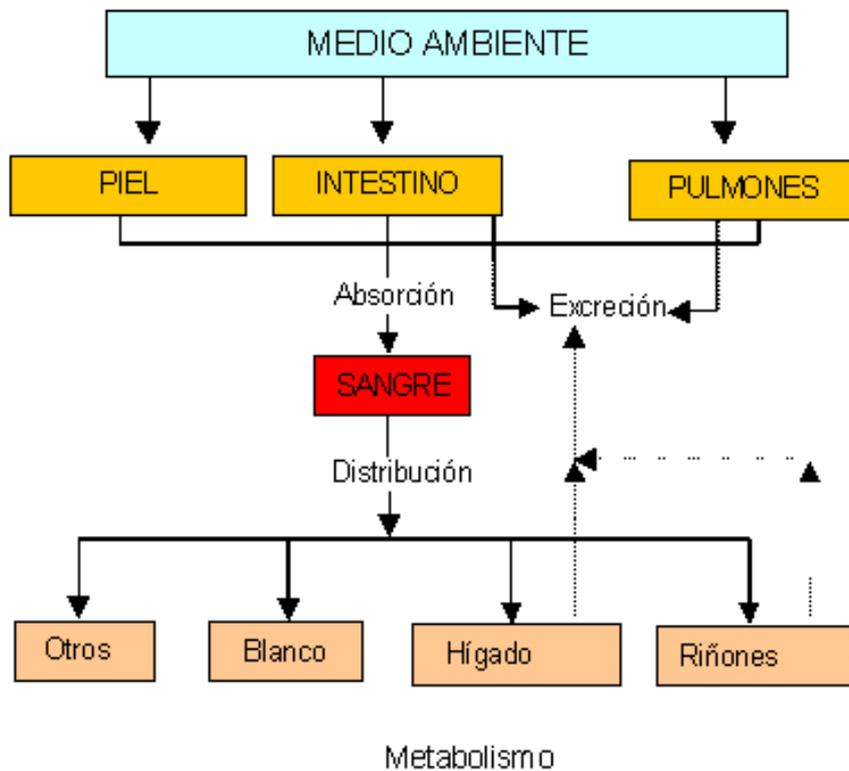
Los efectos asociados a una exposición aguda, pueden manifestarse en cuestión de minutos, horas o días, dependiendo de múltiples factores ambientales, químicos y/o biológicos, mientras que los efectos asociados a una exposición crónica aparecen solamente semanas, meses o años después del contacto con la sustancia tóxica y depende principalmente del ciclo de vida del organismo a evaluar y de su capacidad metabólica (Gad, 1998).

La toxicidad aguda, es por lo general, más fácil de identificar y la evidencia científica obtenida de los estudios a corto plazo es más confiable, sirve principalmente para evaluar efectos tóxicos y es preliminar para estudios de efecto colaterales. La determinación de la toxicidad aguda de las sustancias es la base de la regulación y el manejo de los compuestos químicos, principalmente para casos de exposición ocupacional (Buikema, 1982).

La toxicidad crónica es más difícil de evaluar debido a que existen problemas inherentes a la toxicidad a largo plazo. Por lo tanto, idealmente, un estudio en animales tendría que involucrar un alto número de individuos expuestos a diferentes concentraciones de un compuesto. Sin embargo, en la práctica, un estudio de este tipo algunas veces no es factible desde el punto de vista económico, de tiempo y de espacio; por lo que se diseñan estudios en grupos de organismos más pequeños, desde bacterias, hasta cultivos de tejidos en humanos, que son expuestos a niveles relativamente elevados de sustancias tóxicas y que dan respuestas a corto plazo (Gabilondo, 2005).

La toxicocinética, es el estudio de los procesos que experimenta un tóxico en el organismo en función del tiempo, y que comprende el seguimiento del tóxico a través del organismo hasta que es eliminado. Los tóxicos algunas veces no se distribuyen de forma homogénea, sino que se acumulan en determinadas zonas u órganos (órgano afín), en donde se pueden metabolizar y ser expulsados posteriormente en forma de metabolitos secundarios, los cuales algunas veces pueden ser más o menos peligrosos que los compuestos originales (Lagarto *et al.*, 2002).

El efecto producido por una dosis, depende de la cantidad de tóxico que llegue en estado activo al sitio de acción (órgano blanco) y del tiempo que se le permita actuar (Vega, 1985). El proceso de transporte y transformaciones que experimenta el tóxico desde la superficie epitelial de contacto hasta llegar a los órganos en los que se almacenan y en los que causa lesiones es muy complejo (Fig. 2).



**Fig. 2. Toxicodinámica de los compuestos en un organismo (tomado de Cortinas, 2005).**

Por conveniencia, para facilitar el estudio de la toxicocinética de un compuesto, se considera que cualquier compuesto atraviesa por cuatro fases, la absorción, distribución, metabolismo y excreción (Cortinas, 2005), y cada una de esta fase o etapas se define de la siguiente manera:

**Absorción:** Se define como el proceso por el cual éste atraviesa membranas y capas de células hasta llegar al torrente sanguíneo, las vías de exposición a los tóxicos ambientales son la ingestión, la inhalación y la exposición cutánea y una misma dosis química, puede producir diferentes efectos, dependiendo de la vía por la cual ingresa, su concentración y frecuencia.

**Distribución:** Se refiere a la localización y concentración en los diferentes tejidos. La distribución no es la acción de transportar el tóxico, es decir, se refiere a que una vez que el tóxico ha llegado al torrente sanguíneo, se puede fijar y /o mover a distintos destinos y dependiendo:

- flujo sanguíneo,
- la velocidad de difusión en las interfaces sangre-tejido, la cual depende coeficiente de partición,
- la permeabilidad de la membrana y
- la afinidad del tejido por el compuesto

**Metabolismo:** Para reducir la posibilidad de que una sustancia tóxica cause daño en el tejido blanco, el organismo posee rutas metabólicas de biotransformación y detoxificación cuya meta es incrementar la solubilidad del tóxico en agua de manera que pueda ser excretado fácilmente. Sin embargo, en algunos casos, la biotransformación da como resultado la producción de un metabolito más tóxico que el compuesto original: en este caso el proceso se llama bioactivación.

**Excreción:** La excreción de sustancias tóxicas se lleva a cabo por los mismos mecanismos que el organismo utiliza para excretar los desechos metabólicos endógenos. Las principales vías de excreción son la orina, heces y aire exhalado (Cortinas, 2005).

Inicialmente el término xenobiótico (etimológicamente: “ajeno a la vida”) estaba limitado a compuestos químicos sintetizados por el hombre, constituidos por determinados elementos o grupos estructurales pero posteriormente fueron detectados en los sistemas naturales ampliando enormemente la gama de compuestos y/o elementos que caen en esta categoría (Ramos, 1994).

Se consideran xenobióticos a productos químicos industriales, compuestos orgánicos e inorgánicos, artificiales, extraños a la vida y a la naturaleza, no producidos por la biota (o sea el conjunto de los seres vivos: animales, plantas y microorganismos), obtenidos por síntesis por su utilidad tecnológica, o generados involuntariamente, como subproductos inevitables no deseados, a partir de ciertas reacciones químicas determinadas (Singleton, 1994); el origen en el ambiente de estas sustancias está fuertemente asociado a la fabricación, procesado, distribución, uso y eliminación de una gran cantidad de productos que facilitan el estilo de vida humano contemporáneo, y representan un alto riesgo sanitario y ambiental; estas sustancias sintéticas y/o naturales no se incorporan a los procesos naturales (los ciclos biogeoquímicos y biológicos), ni al metabolismo de los seres vivos, por lo que algunas sustancias resultan ser tóxicas, muy estables, persistentes, no biodegradables, no reciclables naturalmente, liposolubles y bioacumulables, y por ende muy peligrosas (Pérez, 2002).

## 2.8 BIOINDICADORES

La utilización de organismos vivos como indicadores de contaminación y para evaluar los efectos ambientales y biológicos antes mencionados, es una técnica bien reconocida. Lo anterior se sustenta en que la composición, condiciones y procesos de una comunidad, reflejan la integración y efectos de las características del ambiente según Boltovskoy en 1978. Los indicadores biológicos son atributos de los sistemas biológicos, que se emplean para descifrar factores y efectos de su ambiente; inicialmente se utilizaron especies o asociaciones de éstas como indicadores, posteriormente, correspondientes a otros niveles de organización del ecosistema, como poblaciones y comunidades entre otros, lo que resultó particularmente útil en estudios de contaminación, monitoreo y remediación ambiental (Ramírez, 2006).

Las especies indicadoras son aquellos organismos o restos de los mismos (Tabla III), que ayudan a descifrar cualquier fenómeno o acontecimiento actual o pasado, relacionado con el estudio de un ambiente. A cada especie o población le corresponden determinados límites de estas condiciones ambientales, entre las cuales los organismos pueden sobrevivir (límites máximos), crecer (intermedios) y reproducirse (límites más estrechos), cuando más estrechos sean sus límites de tolerancia, mayor será su utilidad como indicador ecológico (Peña *et al.*, 2001).

**TABLA III. Ejemplos de biomarcadores a diferentes niveles de organización (tomado de Pinilla, 1998).**

Nivel de organización	Ejemplo de biomarcador
Molécula unida a un receptor	TCDD unido a un receptor acetilcolina. Nonilfenoles unidos a un receptor de estrógeno
Respuesta bioquímica	Inducción de monooxigenasas Inhibición de acetilcolin estereasas
Alteraciones fisiológicas	Grosor de la cáscara de huevo (aves) Feminización de embriones
Efectos a nivel del individuo	Cambios de comportamiento Crecimiento

Las especies bioindicadoras, deben ser en general, abundantes, muy sensibles al medio de vida, fáciles y rápidas de identificar así como, con poca movilidad, bien estudiadas en su ecología y ciclo biológico (Cairns, 1992).

El uso de organismos indicadores de contaminación requiere conocer las tolerancias ambientales y los requerimientos de las especies, así como sus adaptaciones para resistir exposiciones agudas y crónicas.

Las investigaciones sobre organismos indicadores de contaminación comprenden estudios autoecológicos, de laboratorio y de ensayos de toxicidad; los cuales se basan en la observación, experimentación y análisis de las características ambientales de los sitios en los cuales se detectan con más frecuencia las poblaciones de organismos de cierta especie (Wilhm, 1975).

Los biomarcadores son los cambios medibles, ya sean bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a la exposición a un tóxico y se utilizan para:

- detectar la presencia de una exposición
- determinar las consecuencias biológicas de la exposición
- detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico
- identificar a los individuos sensibles de una población
- fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental (Boltovskoy, 1967 y Vega 2006).

Castillo en 2004, indica que los biomarcadores antes mencionados se pueden clasificar de acuerdo a su expresión en:

**a) Marcadores internos de dosis**

Indican que el tóxico ha entrado al organismo, proporcionan información cuantitativa sobre la exposición y corroboran el ingreso de tóxicos al organismo, son los resultados de la concentración de los xenobióticos y sus metabolitos en los medios biológicos.

**b) Marcadores de dosis biológicamente efectivas**

Indican que el tóxico ya ha producido daños en el organismo, son los compuestos de adición estables que forman el tóxico o sus productos de bioactivación con los ácidos nucleicos y proteínas.

**c) Marcadores de respuesta biológica**

Representan estados avanzados del proceso de daño, son más persistentes y a menudo representan alteraciones genéticas. Ejemplos de estos son las mutaciones de ciertos oncogenes y los intercambios entre cromatinas hermanas.

#### **d) Marcadores de enfermedades**

Son manifestaciones preclínicas o tempranas de enfermedades, representan el último paso antes de que se establezca la enfermedad que produce la exposición. Los pólipos en el colon son un marcador de enfermedad ya que la continuación de la exposición puede conducir a la generación de un cáncer.

#### **e) Marcadores de susceptibilidad**

Se utilizan para identificar a los individuos más susceptibles daños en una población. Algunos individuos tienen probabilidades más altas que otros de recorrer completo el camino exposición-enfermedad. Esto se puede deber a que tienen más activos los procesos de bioactivación o a que tienen disminuidas sus capacidades de detoxificar, de excretar o de reparar daños; los biomarcadores son muy útiles, pero es necesario validar la relación entre el nivel del biomarcador y la exposición (Castillo, 2004).

## **2.9 BIOENSAYOS**

Los ensayos de toxicidad son empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota terrestre y acuática. Los efectos tóxicos a evaluar pueden ser: mortalidad, inmovilidad, inhibición del crecimiento de la población, alteración del comportamiento, etc. Se determinan distintas variables como la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), que es la concentración letal para el 50 % de los individuos expuestos (Buikema *et al.*, 1982). Los ensayos de toxicidad permiten establecer los límites permitidos para los distintos contaminantes, evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los

ambientes que las reciben y comparar la sensibilidad de una o más especies a distintos tóxicos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico (Reish, 1985).

Los ensayos pueden ser de laboratorio (condiciones estandarizadas que reproducen sólo en forma parcial las condiciones naturales del ambiente) o del campo, los ensayos biológicos son relativamente simples, rápidos y económicos; pueden brindar información adicional sobre el riesgo potencial de daño, incluyendo efectos tóxicos, así como la generación de efectos secundarios como cáncer, mutaciones y malformaciones congénitas; además de desórdenes de conducta, efectos acumulativos y metabólicos, antagonismos y sinergismos (Baudo, 1987 y Pinilla, 1998).

Estos ensayos de toxicidad (Tabla IV), se pueden realizar con organismos de una especie (uniespecíficos) o de varias especies (multiespecíficos), simulando microecosistemas (multitróficos), con el objetivo general, de determinar qué tan perjudiciales son las sustancias xenobióticas y qué riesgo poseen para el ambiente y sus organismos asociados (Castillo, 2004). Conociendo la diversidad de ensayos de toxicidad nos podría permitir realizar estudios de carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogénicidad debido a que estos estudios están en función del tiempo en que los organismos son expuestos a los agentes contaminantes.

**Tabla IV. Escalas de observación en ensayos de toxicidad (tomado de Castillo, 2004).**

Espacial	Temporal	Organizacional	
		<i>Estructural</i>	<i>Funcional</i>
Ensayo de laboratorio uní específico	Horas a días	Organismo	Crecimiento Reproducción
Microcosmos	Días a meses	Organismo Población Comunidad	Producción Ciclo de vida  Cadena trófica
Ensayos de campo	Días a años	Organismo Población Comunidad	Ciclo de vida Cadena trófica
Monitoreo ambiental	Años	Organismo	Crecimiento y ciclo de vida

## 2.10 TERATOGENÉISIS

El termino teratógeno fue utilizado por primera vez en 1832 por Geoffroy St. Hilaire en su libro “Histoire générale et particulire des anomalies de l’organisation chez l’homme et les animaux”, que fue subtulado “**Traité de tératologie**” (Adler, 2008). La teratología es el nombre que se le da al estudio del crecimiento anormal, deriva del griego *tépaç* (monstruo) y *hóyoç* (ciencia) (Adler, 2008). Por otra parte Pérez y colaboradores (2002) definen a la teratología como el estudio de las causas, mecanismos y manifestaciones del desarrollo fetal anormal desde el punto de vista estructural o funcional.

Actualmente se define como teratogénesis o dismorfogénesis la alteración morfológica, bioquímica o funcional, inducida durante el embarazo que es detectada durante la gestación, en el nacimiento o con posterioridad. Estas alteraciones pueden clasificarse en mayores (Ej. focomelia) o menores (Ej. retraso en el desarrollo del comportamiento).

Un teratógeno es cualquier sustancia química, agente físico, agente infeccioso o estado carencial que actuando durante el período embrionario o fetal, es capaz de producir una alteración morfológica o funcional durante el desarrollo embrionario (Pérez *et al.*, 2002). Cada teratógeno actúa en un aspecto particular del metabolismo celular, por esa razón, diferentes agentes teratógenos tienden a producir diferentes efectos. Aunque actúen en el mismo periodo de desarrollo embrionario y sobre el mismo sistema, cada fármaco específico producirá un modelo o patrón específico de malformaciones. De todas formas, algunos fármacos tienen un mayor potencial teratógeno debido también a factores como dosis, metabolismo materno y transporte placentario (Nilda, 1992).

## 2.11 BIOLOGÍA DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*, Hamilton, 1822)

La biología de *D. rerio* comenzó a estudiarse en la Universidad de Oregón en los años 1970-1980 (Spitsbergen *et al.*, 2003).

*Danio rerio* pertenece:

Reino: Animalia.

Orden Cipriniformes

Familia: ciprinide

Clase: Osteictios

Subclase: Actinopterygii

Infac clase: Neopterygii

Género: *Danio*

**Especie: *Danio rerio*** (Hamilton, 1822)

Su color es dorado o plateado (según el sexo), sobre los flancos y longitudinalmente se presenta de 5 a 9 bandas de color azul oscuro que empiezan dichas franjas desde el opérculo y llegan hasta el final de la aleta caudal (Fig. 3). El opérculo es azulado y la zona ventral de un tono blanquecino rosado (Rojas, 2007).



**Fig. 3. *D. rerio* (tomado de Rojas, 2007).**

Es un buen indicador para comprobar el efecto toxicológico debido a que este organismo presenta diversas ventajas sobre otros organismos como: una salud perfecta ya que si se presenta algún patógeno en este organismo se pueden controlar por medio de cambios de temperatura y limpieza de la pecera. También se pueden mantener muy bien alimentado con comida seca, liofilizada, artemia y gusano rojo; su mantenimiento es de bajo costo, así mismo ocupan un espacio reducido por ejemplo en una pecera de 20L se pueden tener 30 individuos, su talla puede ser de 5 cm. como talla máxima, otra de las ventajas importantes que cabe mencionar es su reproducción sexual que inicia a los 4 meses después de la eclosión, su reproducción puede inducirse por factores de luz y por alimentación; en el cortejo hembras y machos se persiguen para posteriormente ser los machos los que acaban arrinconando a las hembras para provocar el desove este se produce cuando los peces están muy excitados, el macho llega a golpear el lomo de la hembra para que esta expulse los huevos y fecundarlos, presenta una descendencia que oscila entre 200-400 huevos en tan solo 2 semanas y su desarrollo embrionario va de 2-4 días conformado por siete periodos en la embriogénesis: cigoto, hendidura, blástula, gástrula, segmentación, farínula y eclosión (Kimmel,1995).

Se podría considerar como un modelo único debido a que su desarrollo es externo y la transparencia del embrión permite la investigación pormenorizada de las primeras fases del desarrollo de los vertebrados (Kimmel *et al.*, 1990).

Tanto el *D. rerio* como el ser humano son organismos diploides, es decir, tienen por duplicado las recetas necesarias para mantener el flujo constante de la información biológica de una generación a otra. Una copia es aportada por la madre y otra por el padre. En *D. rerio*, los embriones con una sola copia cromosómica (haploide) pueden desarrollarse de manera normal sólo hasta las 72 hpf (horas post-fecundación) (Sprague *et al.*, 1998). El campo de aplicación que tiene el organismo es tan grande que se utiliza desde el descubrimiento de nuevos fármacos, en modelos de enfermedades como el cáncer, en estudios patológicos dentro de la piscicultura y por su puesto en estudios de toxicogenética, este amplio ramo de aplicación hace que *D. rerio*, se le pueda considerar un excelente bioensayo ya que se puede utilizar desde una célula hasta el organismo completo para trabajos de investigación (Tabla V).

**Tabla V. Impacto del *D. rerio* en biomedicina y biotecnología  
( tomado de Rojas *et al.*, 2007).**

<b>CAMPO DE APLICACIÓN</b>	<b>EJEMPLO</b>	<b>COMENTARIO/DIANA</b>
Desarrollo de nuevos fármacos	Control de arritmia severa Regulación de señalización Cáncer	Ortólogo de HERG Proteínas G heterotriméricas Genérico
Farmacodinámica y farmacocinética	Efectos sobre la integridad del genoma	Genérico

### **Modelos de enfermedad**

Cáncer	Leucemia, Metástasis Genética y cribado	c-myc
Cardiovascular	Mutante Gridlock Insuficiencia circulatoria	<i>Hey2</i> Syndecan-2
Factores ambientales, Efecto de la dieta en la patología neurológica	Efecto de la dieta en la patología neurológica Flora bacteriana del intestino y patología Osteoporosis	Piruvato deshidrogenada Regulación de la expresión génica en el intestino Microgravedad

### **Toxigenómica**

Contaminación ambiental	Evaluación de la calidad del agua Compuestos orgánicos Metilmercurio Cadmio	Genérico Genérico Genérico HSp70
-------------------------	--	---

### **Piscicultura**

Estudio de patogénesis	Infecciones bacterianas y víricas	Estreptococo y Salmonella
Desarrollo de vacunas	Vacunas antivíricas	Virus con cápside
Mejora	Efectos secundarios poblacionales	Hormona de crecimiento en salmón
Biorreactores	Producción de proteínas de interés biomédico	FVII Genérico

El *D. rerio*, como modelo biológico para la evaluación de la calidad ambiental y ante otros modelos de vertebrados posee como ventajas:

a) Su pequeño tamaño (aproximadamente 2.5 cm) permite mantener un elevado número de ejemplares en espacios relativamente pequeños.

b) Una sola hembra madura puede poner desde docenas a cientos de huevos por lo que se puede disponer de elevadas cantidades de material genético uniforme.

c) La fertilización de los huevos es externa por lo que no se necesitan posteriores manipulaciones del embrión. De esta manera, se suprime la problemática que plantea en mamíferos el tener que implantar posteriormente los embriones en el útero de hembras pseudopreñadas.

d) Tanto el tiempo de desarrollo del embrión completo (72 horas) como el que transcurre entre distintas generaciones es muy corto (2-3 meses). Además, se pueden controlar las puestas, modificando la temperatura y/o el fotoperiodo.

e) Los embriones son transparentes por lo que se permite el análisis no invasivo del embrión y el seguimiento la expresión génica en tiempo real (en el animal vivo según se desarrolla).

f) Son más baratos de obtener y mantener que los mamíferos (Estepa, 2002).

## 2.12 DESARROLLO EMBRIONARIO

Morfológicamente y en base al desarrollo de órganos es muy similar a otros vertebrados, y de acuerdo a sus características es considerado un modelo ideal para realizar estudios teratogénicos, debido a que la embriogénesis ocurre en un ambiente externo, esto permite observar las fases completas del desarrollo, así como las primeras divisiones celulares, y la formación de capas embrionarias: ectodermo, mesodermo, endodermo, tomado de Eisen, 1996 (Oliveria y García, 2005).

Es un organismo de un desarrollo muy rápido, ya que a las 24 horas ya se aprecia la segmentación del cerebro y se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda, y los somitos (precursores de músculo y esqueleto). Es un organismo diploide y permite realizar análisis genéticos debido a la disponibilidad de embriones por pareja (100-200) y con ciclos generacionales cortos, de fácil mantenimiento y manipulación (Maldonado, 2003).

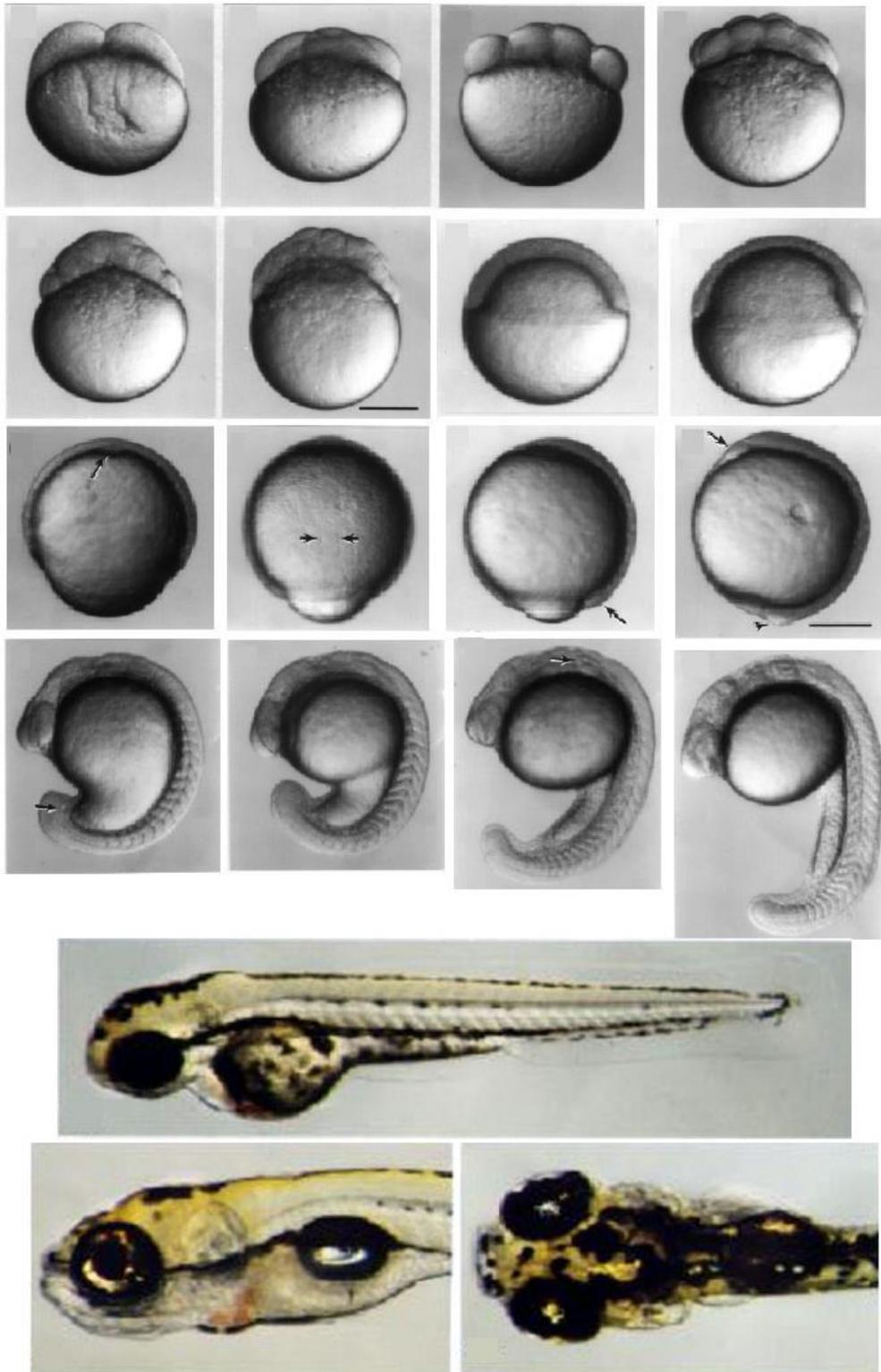
El desarrollo embrionario de *D. rerio* se divide en siete etapas:

En la figura 4 se observan de manera resumida las etapas del desarrollo embrionario de *D. rerio*. La primera se presenta minutos después de ser fertilizado el ovocito, comprendiendo las etapas de cigoto, pasando por la de segmentación y parte de la blástula, la segunda comprende la parte final de la etapa de blástula y la mitad de la gastrulación (Kimmel, 1995).

La tercera comprende la parte final de la etapa de gastrulación y el principio de la etapa en la que el organismo empieza a tomar forma, y se comenzaran a distinguir cabeza y cola. En la cuarta etapa o de formación, se evidencian las estructuras de la cabeza y ojo, el vítelo a partir de una forma esférica empieza a sufrir deformaciones por la tensión que ejerce la cola al crecer, tomando al final una forma arriñonada (Kimmel, 1995).

Para la quinta etapa la cola se desprende del vítelo, formando una nueva estructura en su porción ventral, y se alarga pudiendo observar el esqueleto (columna vertebral). La sexta es la formación de aparato digestivo (pharyngula), durante esta etapa comienza la melanogénesis con la pigmentación, el cráneo se aprecia mejor, en la parte posterior se empieza a distinguir la aleta caudal (Kimmel, 1995).

La última etapa se denomina "long pec" comprende en su totalidad el periodo en que el organismo ha eclosionado y el vítelo empieza a consumirse hasta desaparecer por completo, las aletas pélvicas y pectorales empiezan a desarrollarse (Kimmel, 1995).



**Fig. 4. Estadios de desarrollo de *Danio rerio*  
(tomado de Maldonado, 2003).**

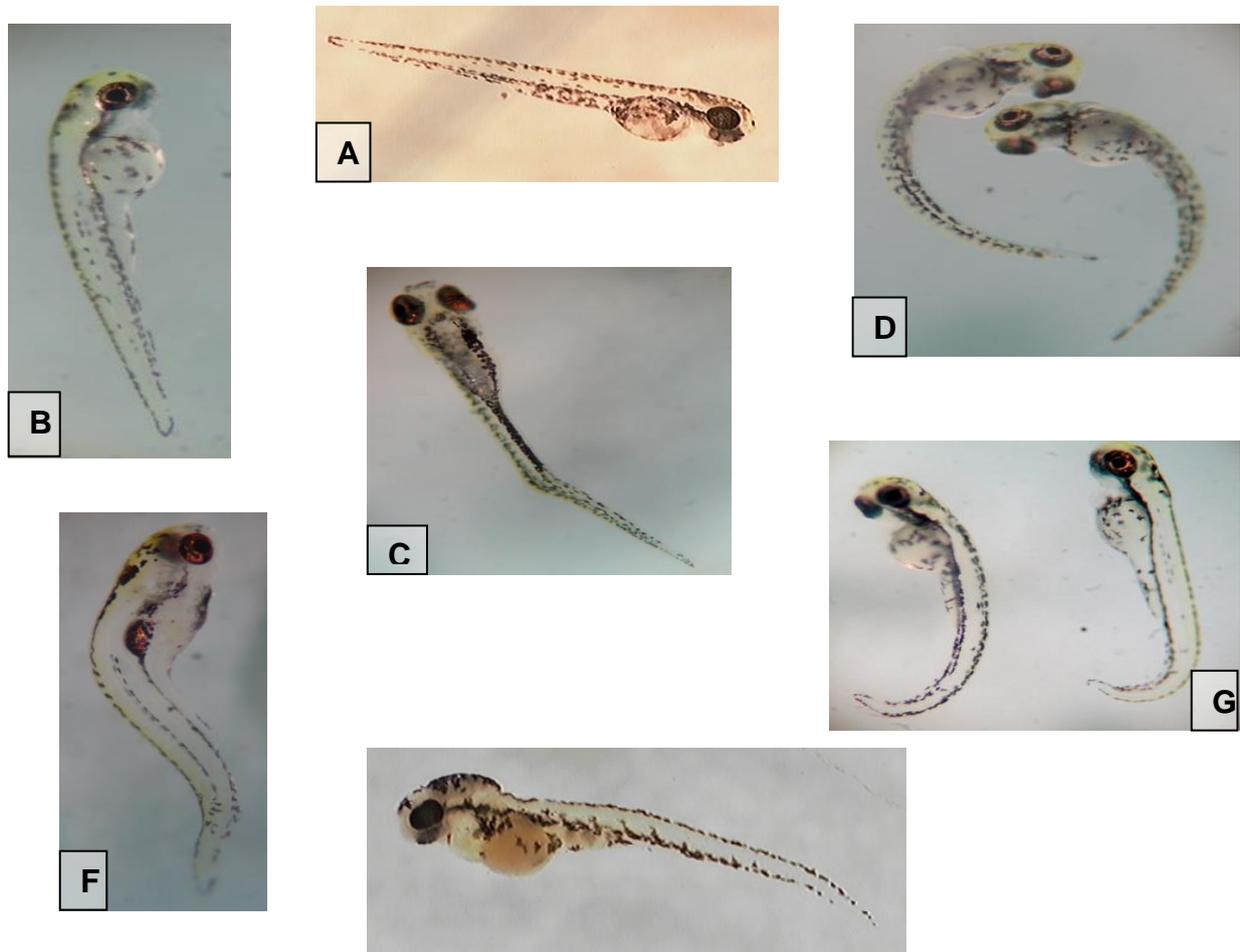
## 2.13 EVALUACIÓN DE DAÑO TEROTOGÉNICO EN *D. rerio*

El *D. rerio*, como ya se menciona presenta varias ventajas como bioensayo, para evaluar efectos reproductivos, tóxicos y teratogénico, presenta biomarcadores como las malformaciones en corazón, ojos, cabeza, aleta caudal, pigmentación, circulación sanguínea, opérculo y columna vertebral entre otros, que le permiten hacer investigación de efectos ambientales a través de una metodología denominada **DarTa** (*Danio rerio* Teratology assay), en la cual se exponen embriones del pez durante todo el desarrollo embrionario a diferentes concentraciones de distintos compuestos; evaluándose 48 horas después de la exposición, la frecuencia de malformaciones en alevines recién nacidos y juveniles, los efectos en la fertilidad y en la viabilidad de huevos (embriones) y de alevines, anomalías en el corazón, ojos, cabeza, aleta caudal, pigmentación, circulación sanguínea, etc. (Nagel, 2002).

Esta metodología tiene sus orígenes desde 1998 por Dietrich, en donde se utilizó a embriones del *D. rerio*, para evaluar daño embriotóxico y teratogénico través de la prueba denominada **DRETA** (*Danio rerio* embryotoxicity and teratogenicity assay) en muestras de agua, evaluando el daño inducido a nivel de corazón.

En la actualidad en el laboratorio de genética evolutiva y ambiental de la UAEH, se han realizado experimentos con *D. rerio* a través de la prueba ahora denominada **DarTa** (*Danio rerio* Teratology assay) en la que se ha validado como principal biomarcador las malformaciones en columna vertebral (Fig. 5) (Rivera, 2006), los momentos y tiempo de exposición más sensibles a efectos teratogénicos inducidos (González, 2005). Además de demostrar la

permeabilidad selectiva de la membrana, así como el efecto sobre la permeabilidad y teratogenicidad de varios metales pesados y otros elementos por el pH y la temperatura ambiental (Báez, 2004; Scott, 2006; García, 2008; Gaytán Oyarzun *et al.*, 2008 y Peña, 2008).



- a)** control, **b)** malformación ligera dorsoventral, **c)** malformación ligera latero ventral, **d)** malformaciones curva, **e)** malformación en zona cefálica y caudal, **f)** malformaciones múltiples y **g)** malformaciones en forma de gancho

**Fig. 5. Malformaciones de columna vertebral en *D. rerio* (tomado de Gaytán y Gordillo, 2009).**

### 3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años existe un uso indiscriminado de sustancias químicas asociadas a nuestro estilo de vida actual, mismas que pueden ser utilizadas desde un nivel laboral hasta el personal, actualmente existen más de 70,000 compuestos químicos creados por el hombre y cerca de 1,000 se suman cada año, por lo que existe una necesidad primaria de evaluar el impacto potencial de éstas al ambiente y a la salud (Hollisten *et al.*, 1979).

La presencia de manganeso (Mn) en cuerpos de agua es fundamental para que se realicen algunas reacciones metabólicas en ambientes acuáticos, a concentraciones elevadas puede causar estragos en organismos expuestos a dicho elemento, pudiendo llegar a causar alteraciones morfo-fisiológicas en la biota del lugar; lo que genera preocupación e interés científico, debido a que múltiples actividades humanas pueden generar contaminación ambiental por este elemento, debido a que es un metal bioacumulable y biodisponible en los organismos acuáticos (Merida,1999). La laguna de Metztlán se encuentra dentro de una reserva de la biosfera, es de interés conocer la calidad del agua de la misma, para favorecer el manejo de la reserva y disminuir el impacto de las actividades antropogénicas, existiendo múltiples asentamientos y actividades desde el río san Cristóbal, hasta la llegada a la laguna; a lo largo de la formación de este cuerpo de agua existen gran actividad textilera, agropecuaria, ganadera y pesquera que son la fuentes de alimento de la población local, en dichas actividades existe la presencia de Mn ( de la Lanza y García, 1998).

En la actualidad el uso de bioensayos es utilizado para evaluar la calidad ambiental, en el caso de *D. rerio*, es un bioensayo que presenta muchas ventajas técnicas y operativas que permiten evaluar los efectos biológicos de la contaminación ambiental generada por el hombre, de una manera fácil, económica, reproducible y confiable (Kimmel, 1995).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el daño teratogénico inducido en embriones *Danio rerio* a través de la prueba DarTa (*Danio rerio* Teratology assay) por manganeso a concentraciones registradas en agua de la desembocadura del pueblo de Metztitlán, Hidalgo.

#### 4.1.2. Objetivos Particular:

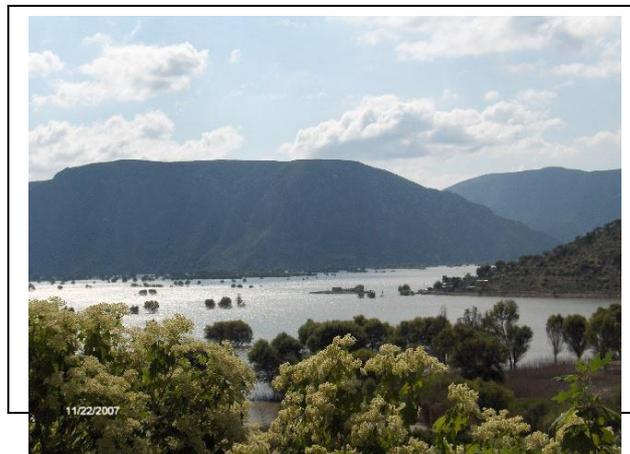
1. Evaluar la toxicidad y teratogenicidad del agua del río San Cristóbal y la desembocadura a la laguna de Metztitlán en embriones de *Danio rerio*.
2. Evaluar la toxicidad y teratogenicidad del manganeso a tres dosis subtóxicas en embriones de *Danio rerio*.
3. Correlacionar la toxicidad y teratogenicidad del manganeso con el agua del pueblo de Metztitlán, que permitan identificar efectos de los contaminantes presentes la laguna Metztitlán, Hidalgo.

## 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

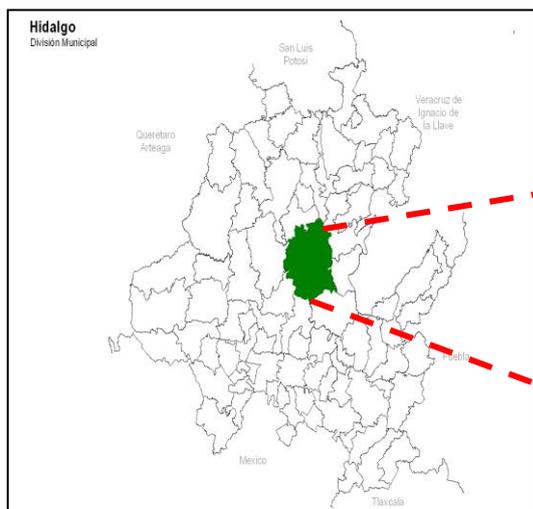
### 5.1. ÁREA DE ESTUDIO

La laguna de Metztitlán es parte de tres tramos importantes (Fig. 6). El primero al sur se conoce con el nombre de río Grande Tulancingo; río San Cristóbal, y el tercero, al norte de la Reserva, río Metztitlán y desemboca en la laguna de Metztitlán (SEMARNAT, 1998-1999). La laguna integra dos municipios, Eloxochitlán y Metztitlán (Fig. 7 y 8), siguiendo el curso de la vega de Metztitlán, la comunidad más cercana al cuerpo de agua dentro del municipio es San Cristóbal (INEGI, 2000).

La principal actividad que se realiza en esta zona, es agrícola, ganadera, y pesquera, el agua de los ríos que convergen en esta región llegan a desembocar en la laguna de Metztitlán la cual es utilizada para riego de cultivos y es utilizada para darles de beber a el ganado de la zona.



**Fig. 6. Laguna de Metztitlán.**



**Fig. 7. Mapa del Estado de Hidalgo, localización de la zona de estudio. (INEGI. 2005).**



**Fig. 8. Foto satelital sitios muestreados en Metztlán, Hidalgo, (Internet 1).**

La laguna de Metztlán se ubica a  $20^{\circ} 40'$  y  $20^{\circ} 42'$  Latitud Norte y  $98^{\circ} 50'$  a  $98^{\circ} 53'$  Longitud Oeste del estado de Hidalgo. Es producto de uno de los ríos más importantes el Metztlán que se origina en los límites del estado de Puebla con escurrimientos del Cerro Tlachaloya que forman el Río Hiscongo y da origen al Río Chico de Tulancingo, que es formado con los escurrimientos de Cuasesengo y La Paila, ambas forman el Río San Lorenzo que da origen al Río Grande de Tulancingo, el cual pasa por un gran número de municipios del estado antes de llegar a la laguna de Metztlán, Hgo. (Enciclopedia de los Municipios de México Hidalgo, 2005).

Mientras más cerca está de la laguna del río, mayor es la cantidad de sedimentos que ha recibido la laguna es producto de los escurrimientos de las laderas, la mayor concentración de sedimentos estará presente en la zonas más cercanas al río, los principales compuestos presentes por la actividad antropogènica son los fertilizantes y agroquímicos de las zonas agrícolas en la

vega que ingresan al sistema (Tabla VI). Asimismo se han incrementado las descargas de aguas de los poblados establecidos en sus márgenes, con impactos por su contenido de sedimentos, patógenos, productos químicos orgánicos y nutrientes (Anuario Estadístico Hidalgo Edición, 2000).

**Tabla VI. Características de la laguna de Metztlán (tomada de García, 2003).**

<b>Características físico-químicas del agua</b>		<b>Características físicas del sitio: Hidrometría de la laguna</b>	
<b>Oxígeno disuelto</b>	3-7 mg/l	<b>Área</b>	2937.2 Ha
<b>pH</b>	7.0-8.7	<b>Longitud máxima</b>	(1) 10 km
<b>Visibilidad (medida con disco de Secchi)</b>	0.20-0.28 cm	<b>Ancho máximo</b>	(b) 5.75 km
<b>Amonio</b>	0.02-1.2 mg/l	<b>Volumen</b>	326.1 mg/l/ m <sup>3</sup>
<b>Nitritos</b>	0.08-1.0 mg/l	<b>Profundidad máxima</b>	30 m
<b>Nitratos</b>	3.5-7.0 mg/l	<b>Profundidad mediana</b>	11.1 m
<b>Fósforo soluble</b>	0.35-0.46 mg/l	<b>Profundidad relativa</b>	0.5 m

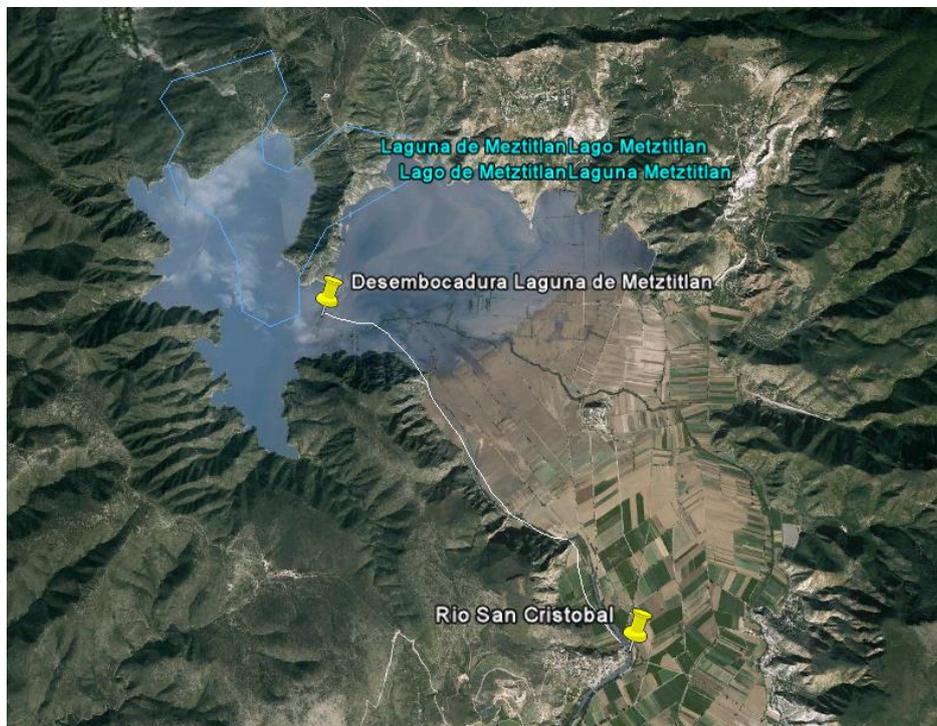
## 5.2. MUESTREO Y ANÁLISIS DE AGUA

Los sitios muestreados son el río San Cristóbal y la desembocadura a la laguna marcados en la figura 8., dichos sitios representan el aporte de actividades antropogénicas no solo de la población local sino de de un gran número de afluentes que inicia desde la formación del río; el muestreo se dividió en dos etapas, en temporada de lluvia para conocer el porcentaje de manganeso presente en la zona en condiciones de grandes volúmenes de

agua involucrando un mayor arrate de sedimentos y en temporada de estiaje para comparar las fluctuaciones del metal biodisponible a lo largo de esta temporada (Fig. 9).

**San Cristóbal:** Se encuentra ubicado a N 20° 38' 34.0" y W 98° 49' 29.5" (Fig.8-10), las condiciones del agua muestran una temperatura de 24.6 °C, un pH 6.9, salinidad 0.01 gramos de sal por litro y conductividad de 0.402 sólidos totales disueltos.

**Laguna Metztlán:** Se encuentra ubicado a N 20° 40' 45.1" y W 98° 51' 47.1" (Fig.8-10), las condiciones del agua muestran una temperatura de 24.7 °C, un pH 7.4, salinidad 0.01 gramos de sal por litro y conductividad de 0.359 sólidos totales disueltos.



**Fig. 10 Sitios muestreados en Metztlán, Hidalgo, (Internet 1).**



**Fig. 9. Muestreo de agua.**

El muestreo se realizó en las primeras horas del día procurando que los parámetros fisicoquímicos del agua no fuesen alterados por las condiciones climáticas de la zona, el muestreo consistió en sumergir botellas ámbar de 1.5 litros a una profundidad de un metro hasta ser llenadas a saturación sin dejar espacio alguno para que se almacenara oxígeno, simultáneamente a la colecta en el sitio se midió el pH, la temperatura, la salinidad y la conductividad del agua con un equipo multiparametrico para conocer las condiciones físicoquímicas del agua de la zona, el pH de las muestras se estabilizó en pH de 2 utilizando ácido nítrico mediante goteo, una vez colectada la muestra se colocaron en hieleras colocándolas sobre una ligera capa de hilo posteriormente se depositan las botellas y fueron cubiertas con otra ligera capa de hielo, todo esto con la finalidad de mantenerlas en un ambiente estable, para su posterior análisis.

### **5.3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

Para llevar a cabo el análisis de las muestras de agua deben contar con un pH estandarizado en 2 el cual se realizo utilizando acido nítrico por goteo, los análisis se llevaron a cabo utilizando el método de espectro fotómetro de absorción atómica vía húmeda en el centro de investigaciones químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

### **5.4. EVALUACIÓN DE LA TÓXICIDAD Y TERATOGENICIDAD DEL Mn**

Para determinar el efecto teratogénico de un elemento, sustancia o mezcla compleja se requiere de los siguientes pasos:

1. establecimiento del lote experimental
2. inducción de conducta reproductiva
3. identificación de tres dosis subtóxicas a través de la CL<sub>50</sub>
4. evaluación de efectos en viabilidad y fertilidad de las dosis seleccionadas
5. evaluación del efecto teratogénico a través de la inducción de malformaciones en columna vertebral

#### **LOTE EXPERIMENTAL**

Los peces son mantenidos en acuarios de 70 litros, con una temperatura que fluctúa entre 25-28 °C (Fig. 11 y 12), con aeración constante (Tabla VII) y un filtro biológico con la finalidad de que la limpieza no sea diario sino cada 8 días para evitar que los peces se sometan a estrés cotidianamente a las condiciones recomendadas bibliográficamente (González, 2005).



**Fig. 11. Pecera de 70 litros con organismos experimentales**



**Fig. 12. Medición de parámetros físico-químicos del *D. rerio* en reproducción.**

Los adultos deben ser alimentados 2 veces al día con alimento liofilizado, la cantidad está en función del tamaño de la población, procurando que todos los peces logren comer y logren un excelente desarrollo; el alimento que no es consumido en un lapso de 15 minutos por los peces se debe retirar con una red para evitar contaminación de la pecera.

El recambio de agua del acuario debe ser solo de  $\frac{3}{4}$  partes de agua al momento que se realicé la limpieza del acuario. Los peces son seleccionados y deben de pasar un por un proceso de observación al cual le denominamos “Cuarentena”, que consiste en que todos los peces entrantes se examinan físicamente y deben ser revisados diariamente durante un lapso de tres

semanas para detectar la presencia de una enfermedad y/o conductas anormales, si este fuese el caso se retira el organismo para evitar un contagio potencial sobre la demás población.

Transcurrido este periodo los peces se trasladan a una pecera con las mismas condiciones fisicoquímicas (Tabla VII), iniciando un proceso de engorde proporcionando alimento 3 veces al día incluyendo en la dieta alimento vivo (*Artemia salina*) y maduración sexual de los peces el cual es de 8-16 semanas, donde serán unificados de acuerdo al sexo y tamaño, lo cual permitirá pasar a la siguiente fase que consiste en la inducción de la conducta reproductiva.

**Tabla VII. Condiciones físico-químicas de adultos de *D. rerio* (tomado de González, 2005).**

VARIABLE	CONDICIONES RECOMENDADAS	CONDICIONES OBTENIDAS
LUZ SOLAR	No recomendada de manera directa al acuario	Evaporación formación de micro-algas · Favorece la ovoposición en adultos En alevines afecta el desarrollo embrionario
TEMPERATURA	28 ± 1 °C acuarios alejados de parrilla, estufa o equipo que produzca exceso de calor	24 a 28 °C Evaporación. · Desarrollo de protozoarios. · Formación de micro-algas.
pH	pH 7	No determinado
CORRIENTES DE AIRE	Ventanas cerradas o cualquier orificio	vaporación y alteración de condiciones optimas del acuario. Contaminación por polvos o partículas
INSTALACIONES	Mantenimiento de equipo	Revisión diaria del equipo para su mejor funcionamiento. · Lugar aislado para evitar el estrés de los peces.
ESPACIO	Suficiente para que se pueda manipular con mayor facilidad a las peceras.	Espacio intra pecera: se debe considerar un equilibrio entre capacidad de pecera con peces quedando una proporción en 1 litros por 5 peces. espacio externo de peceras: entre peceras debe tener un espacio de 10 cm. Para realizar observaciones

## INDUCCIÓN DE CONDUCTA REPRODUCTIVA

Después de unificar el lote de organismos, se selecciona los peces que presentan las tallas mas grandes; la edad a la que los organismos son más fértiles es entre los 8 y 16 meses (Tabla VIII). Para asegurar la fecundación y la ovoposición, hay que separar machos y hembras una semana antes de la fecha prevista para la puesta (ovoposición) en un acuario de 20 litros, con las mismas condiciones físico-químicas antes mencionadas, deben mantener un foto periodo constante de 12 horas luz y 12 oscuridad (Aguilar *et al.*, 2002).

Es fácil distinguir a las hembras cuando están listas para la inducción a la reproducción ya que su abdomen se abulta notablemente como consecuencia de los huevos que se acumulan en su interior. El cortejo y la ovoposición se dan al amanecer o cuando se enciende la luz del acuario y/o una exposición a rayos solares, lo cual induce al desove.

Se colocan los organismos seleccionados en un acuario de 4 litros, sin filtro biológico y con redes de maternidad, en una proporción de 3 machos y 2 hembras. Las condiciones ideales para la puesta son de 26 a 28 °C, con un pH de  $7 \pm 1$ . Una hembra puede llegar a poner hasta 200 huevos en un único desove (Kimmel *et al.*, 1995).

Los huevos no son adhesivos entre sí, ni con la superficie, por lo que los huevos son depositados en el fondo del acuario y por lo tanto, pueden ser sifonados para su recolección (Fig. 13). Posteriormente son trasladados a un acuario de mantenimiento de cría con una temperatura de  $27 \pm 1^{\circ}$  C.

La eclosión ocurre aproximadamente a las 72 horas de su desarrollo; a temperaturas bajas, el tiempo se incrementa notablemente.

Es importante resaltar que el acuario de cría es esencial una buena aeración y una limpieza estricta ya que los alevines de *D. rerio* son sensibles a los cambios físico-químicos del agua (Kimmel *et al.*, 1995., Olascoaga y Luna 2004).

**Tabla VIII. Temperatura óptima establecida por etapa de desarrollo de *Danio rerio***

<b>ETAPA DEL PEZ CEBRA</b>	<b>CRITERIOS DE SELECCIÓN</b>	<b>TEMPERATURA ADECUADA</b>
Adultos hembras y machos (lote de mantenimiento)	% Viabilidad (100%)	24-28 °C
Adultos hembras y machos (lote de reproducción)	% de ovoposición (100%)	28 °C
Huevos	% de eclosión (80%)	28 °C
Alevines	% Viabilidad (50%)	24-28 °C

### **CURVA DE TOXICIDAD**

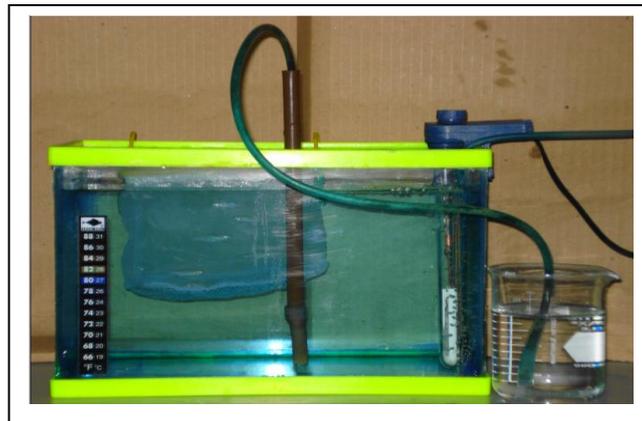
Esta fase, consiste en tratar a lotes en frascos de vidrio previamente lavados con por lo menos 10 individuos (huevos viables) con tres repeticiones y un control negativo concurrente, bajo condiciones de temperatura y aireación adecuadas, durante 24 horas a un compuesto; lo anterior permite determinar el porcentaje de individuos muertos y vivos, por lo tanto identificar la concentración del compuesto que mate menos del 50% (>LC<sub>50</sub>), a lo cual se le denomina dosis subtóxicas, lo anterior con el objetivo de poder identificar efecto secundario como la teratogenicidad de un compuesto sin que los efectos tóxicos lo incubaran (González, 2005 y Rivera, 2006).

## EVALUACIÓN DE LA FERTILIDAD Y VIABILIDAD ESPONTÁNEA

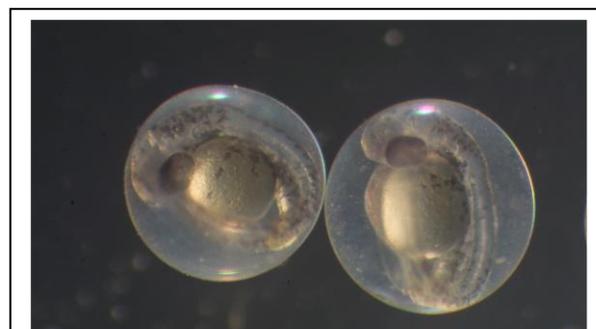
Para evaluar la fertilidad y viabilidad de los organismos experimentales, se requiere determinar la frecuencia espontánea, para restarla del resultado de un experimento y poder determinar la frecuencia inducida por un tratamiento (González, 2005).

La fertilidad se determina con el porcentaje de huevos viables a las 5 horas posteriores a una ovoposición, se hace con ayuda de un microscopio estereoscópico y en cajas petrí (González, 2005).

La viabilidad se determina en dos etapas, la primera con el porcentaje de huevos viables que eclosionan y la segunda con el número de alevines que sobreviven a las primeras 72 horas después de la eclosión (González, 2005).



**Figura 13. Recolección de huevos utilizando sifón.**



**Figura 14. Embrios en etapas de desarrollo observados con microscopio estereoscópico.**

## EVALUACIÓN DE POTENCIAL TERATOGENICO

Para la evaluación de los efectos teratogénicos en embriones de *D. rerio* se utiliza la prueba *Danio rerio* Teratology assay (DarTa), la cual consiste en tratar a embriones durante todo su desarrollo embrionario a algún agente xenobiótico y evaluar la frecuencia y tipo de malformaciones en columna vertebral, opérculo y aleta caudal en alevines recién eclosionados y en juveniles e 72 horas, de edad, esto último debido a que algunas malformaciones no son evidentes en el momento de la eclosión (Fig. 5). Para ello se requieren tres dosis subtóxicas identificadas previamente a través de una curva de toxicidad y un control negativo (González, 2005).

En este caso se partió de la concentración máxima permisible de Mn por la NOM-127-SSA-1994 que es de (0.150µg/ l) y de la concentración reportada más cercana a la permitida por la norma que fue de (0.158µg/ l), se tomaron dos dosis subtóxicas la mitad (0.079µg/ l) y al doble (0.316µg/ l) de la concentración, esto permitirá observar daños causados por Mn a concentraciones más altas y más bajas de la dosis recomendada (González, 2005., Rivera, 2005., García, 2008., Peña, 2008).

Antes de iniciar cualquier prueba todo el material de cristal se lavo con una solución de Extran MA01 (alcalino concentrado) de pH 2%, para eliminar la presencia de materia orgánica o algunos metales pesados y excesos de materia orgánica, debido a que al vidrio se le adhieren este tipo de compuestos (Ortega, 1991). Una limpieza de rutina consta de preparar una mezcla de Extran al 2% en agua; para una suciedad más acentuada se prepara una mezcla mayor al 20% en agua, para acelerar el proceso y tener mejores

resultados se ponen en “Baño María”, a una temperatura mayor de 50° para acelerar el proceso de limpieza.

Para realizar las curvas de toxicidad antes mencionadas, así como los tratamientos y obtener las concentraciones letales (CL) y efectos teratogénicos, se utilizan frascos de 250 ml con agua y la muestra a analizar; se colocan 20 embriones por concentración con 3 repeticiones, dando un tamaño de muestra de 500 individuos; en cada frasco se colocan embriones de no más de 48 horas de desarrollo embrionario (Fig.15) por ser la etapa más sensible (González, 2005). Los frascos son depositados en una pecera con agua de manera que cubra los frascos hasta el nivel de agua depositado, cada frasco cuenta con aireación constante y temperatura de 29° C y se probaron tres concentraciones y un control negativo durante un periodo de 24 horas, al termino del tratamiento se realizo un análisis microscópico para cuantificar el índice de mortandad de los embriones y sus frecuencia y tipo de malformaciones.



**Fig. 15. Embriones en tratamiento con oxígeno y temperatura controlada.**

## **5.5. EVALUACIÓN DEL AGUA DE METZTITLÁN**

La evaluación del agua de Metztitlán permite correlacionar los efectos tóxicos que presenta el manganeso por sí sólo y en una mezcla compleja (agua de la laguna y del río) donde la presencia de otros elementos y al combinarse los efectos pueden aumentar o ser inhibidos (sinergismos y o antagonismo).

Para evaluar la toxicidad y teratogénicidad de las muestras de agua, se realizó exactamente el mismo procedimiento anterior, haciendo una curva de toxicidad del agua y diluyéndola en caso de mostrar una toxicidad mayor del 50%, tratando a tres concentraciones subtóxicas y utilizando un control negativo (González, 2005; Rivera, 2005; García, 2008 y Peña, 2008).

Para probar la toxicidad del agua es necesario que las muestras de agua que fueron colectadas y llevadas al laboratorio se estén oxigenando, una vez que se tienen las muestra de agua, se filtro la cantidad de agua a utilizar para evitar la presencia de protozoarios, cada prueba se realizó con 20 embriones y 3 repeticiones, con su control negativo (testigo), durante un periodo de 24 horas en condiciones controladas en el laboratorio, tanto para el agua de San Cristóbal y la desembocadura de la laguna Metztitlán hasta completar un tamaño de muestra de 500 individuos de cada una, con la finalidad de conocer los efectos que tiene al agua antes y después de llagar a la laguna.

## 5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron de acuerdo que siguen una distribución normal; las pruebas utilizadas fueron, Análisis de Varianza (ANOVA) y Análisis Kruskal Wallis y Tukey, con una probabilidad de  $p \geq 0.05$  utilizando el programa "ESTADISTICA Y NCSS", (2000).

**Análisis de Kruskal Wallis:** es una prueba no paramétrica que se utiliza en datos que no tienen una distribución normal, para determinar las diferencias que existe entre el daño provocado por el manganeso a las dosis probadas, mediante las hipótesis estadísticas:

**Análisis de Varianza (ANOVA):** es una prueba paramétrica que se aplica en datos que siguen una distribución normal, para determinar si existen diferencias significativas en las concentraciones de manganeso, mediante las siguientes hipótesis estadísticas:

**Hipótesis nula (Ho):** Todas las concentraciones son iguales y no hay diferencias significativas en malformaciones en columna vertebral de embriones de *D. rerio* (para una distribución no paramétrica).

**Hipótesis alternativas (Ha):** Una o más concentraciones de Manganeso son distintas y presentan diferencia significativa en malformaciones de columna vertebral en embriones de *D. rerio*.

## 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Como se describe en la metodología, el presente trabajo parte de un análisis químico del agua del río Metztitlán y de la desembocadura en la laguna para determinar las concentraciones de manganeso presentes en el agua Metztitlán tanto en temporada de lluvias como de secas; a través de la prueba de espectrofotometría de absorción atómica vía humedad.

La tabla IX, muestra las concentraciones de manganeso presentes en la zona de estudio, en donde se observa que en temporada de estiaje (secas) los niveles de Mn son mayores que en temporada de lluvias, dichas concentraciones sobrepasan los niveles máximos permisibles por la NOM-127 SSA-1994; dicho metal es producto de actividad antropogénica que se tiene durante la formación del río hasta llegar a desembocar en la laguna de Metztitlán como destino final, de acuerdo a lo reportado se sabe que las concentraciones sobrepasan los límites máximos permisibles por la NOM-127.

El evaluar la fertilidad y la viabilidad de embriones y alevines, permite evidenciar si el tratamiento pudiera afectar en estos dos parámetros y no se pueda observar el efecto teratogénico. Como se muestra (Tabla X), se estableció la frecuencia de fertilidad y viabilidad espontánea durante 1 mes para después poder comparar con los tratamientos, en donde el número de huevos ovopositados es de 192, de estos sólo 6 son infértiles del total de huevos ovopositados el 96.6% eclosionan y de estos últimos el 98.3% llegan a la etapa de juvenil que corresponde a las 72 horas, después de la eclosión.

**Tabla IX. Concentraciones de manganeso observadas en la zona de estudio.**

<b>Temporada de lluvia</b>				
<b>Parámetro</b>	<b>San Cristóbal</b>	<b>Laguna Metztitlán</b>	<b>Unidades</b>	<b>NOM-127-SSA-1994</b>
Manganeso	0.037	0.316	µg/l	0.15
<b>Temporada de estiaje</b>				
<b>Parámetro</b>	<b>San Cristóbal</b>	<b>Laguna Metztitlán</b>	<b>Unidades</b>	<b>NOM-127-SSA-1994</b>
Manganeso	0.158	0.900	µg/l	0.15

**San Cristóbal;** ubicado a N 20° 38''34.0' y W 98° 49' 29.5'', las condiciones del agua exigen una temperatura de 24.6 °C, un pH 6.9, salinidad 0.01 gramos de sal por litro y conductividad de 0.402 sólidos totales disueltos.

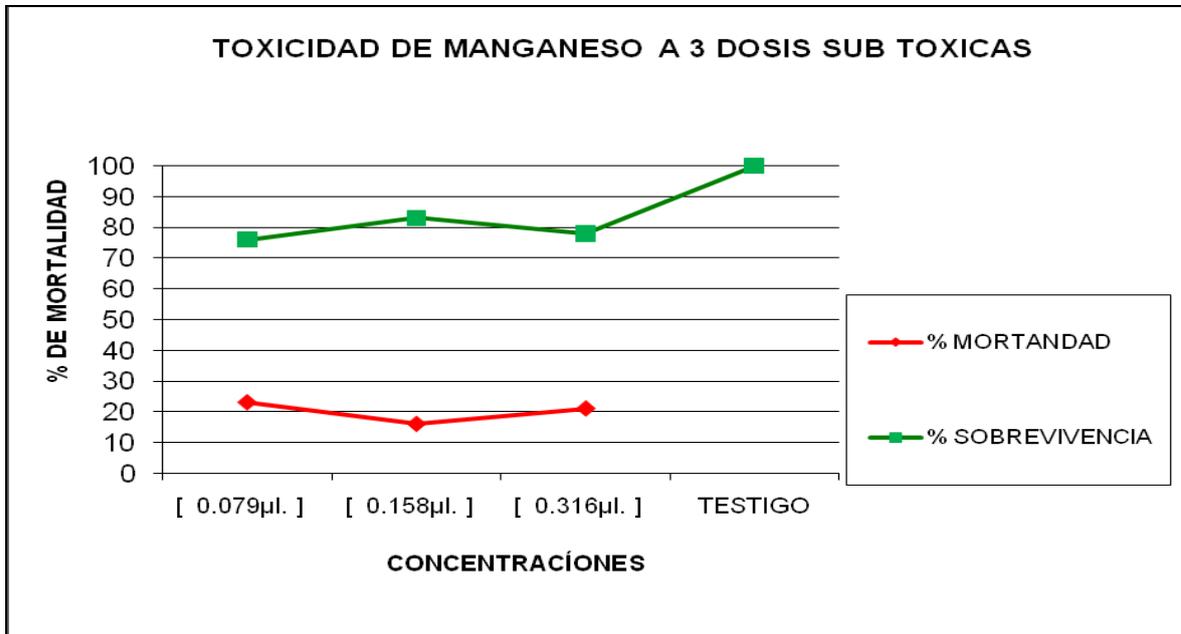
**Laguna Metztitlán;** ubicada a N 20° 40''45.1' y W 98° 51' 47.1'', las condiciones del agua exigen una temperatura de 24.7 °C, un pH 7.4, salinidad 0.01 gramos de sal por litro y conductividad de 0.359 sólidos totales disueltos.

**Tabla X. REGISTRO DE OVOPOSICIONES**

FECHA	# DE HUEVOS COLECTADOS	# DE HUEVOS INVIABLES	# DE HUEVOS ECLOSIONADOS
4\Septiembre\06	160	0	160
13\Septiembre\06	185	0	185
4\Octubre\06	400	5	395
11\ Octubre\06	167	17	150
18\Octubre\06	112	10	110
31\Octubre\06	140	0	140
10/Noviembre/06	180	0	180
20/noviembre/06	120	0	120
13/Diciembre/06	120	0	120
19/Febrero/07	270	9	260
28/Febrero/07	420	20	400
11/Marzo/07	210	15	180
05/Junio/07	120	0	120
07/Junio/07	120	0	120
09/Junio/07	160	0	160
18/junio/07	280	18	260
21/Junio/07	160	0	160
06/Julio/07	193	13	180
19/Julio/07	260	0	260
25/Octubre/07	128	8	128
02/noviembre/07	172	12	160
15/Noviembre/07	153	13	140

Posteriormente, se realizó la curva dosis-respuesta para evaluar la toxicidad a 24 horas de tratamiento; lo que permitió seleccionar las tres dosis subtóxicas y evaluar la fertilidad, la viabilidad, así como el porcentaje y tipo de malformaciones observadas. Como se muestra (Fig. 16) y (Tabla XI, la toxicidad de las tres concentraciones probadas de Mn, con tamaño de muestra de 500 individuos por tratamiento y su control negativo, permiten identificar tres concentraciones subtóxicas: **0.316, 0.158, 0.079** µg/l que corresponden a CL<sub>21</sub>,

CL<sub>18</sub> y CL<sub>23</sub> respectivamente, muy por debajo de lo reportado en el agua de la zona de estudio.



**Fig. 16. Curva de toxicidad de Mn en embriones de *D. rerio* a 24 horas de tratamiento.**

Por otra parte, también se muestra (Tabla XI) que a las tres concentraciones subtóxicas probadas, no tienen un efecto negativo al momento de la eclosión, la viabilidad de huevos eclosionados, es de 94.9% y de huevos a alevines presentan 95.1%, esto refleja que las concentraciones subtóxicas no presentan daños significativos al momento de la eclosión de los embriones, obteniendo altos porcentajes de sobrevivencia.

**Tabla XI. Resultados de fertilidad y viabilidad observada con Mn en embriones de *D. rerio***

<b>Tratamiento</b>	<b>Total Huevos fértiles</b>	<b>% de huevos eclosionados (viabilidad)</b>	<b>% de huevos - alevines a las 72 hrs. (viabilidad)</b>
Mn (0.079 µg/l)	500	76.9%	76.1%
Mn (0.158 µg/l)	500	84%	83%
Mn (0.316 µg/l)	500	78.4%	78%
<b>Control concurrente</b>	<b>500</b>	<b>94.9%</b>	<b>95.1%</b>

La tabla XII concentra todos los datos obtenidos al realizar las pruebas de teratogenicidad del manganeso a las tres dosis probada, dichos datos fueron analizados con los paquetes estadísticos ESTATISTICA Y NCSS 2000, se contabilizó el número de individuos que presentan daños en columna vertebral en las tres dosis subtóxicas probadas con Mn, a 72 horas de tratamiento (lo que dura el desarrollo embrionario), en donde se observa como disminuye la frecuencia de 71 a 39 embriones malformados por cada 500 embriones tratados conforme se disminuye la concentración de manganeso, cabe mencionar que la concentración más alta está muy por debajo de la concentración observada en la zona de estudio, dichas concentraciones no se evalúan por su alto grado de toxicidad (Tabla XII y XIII).

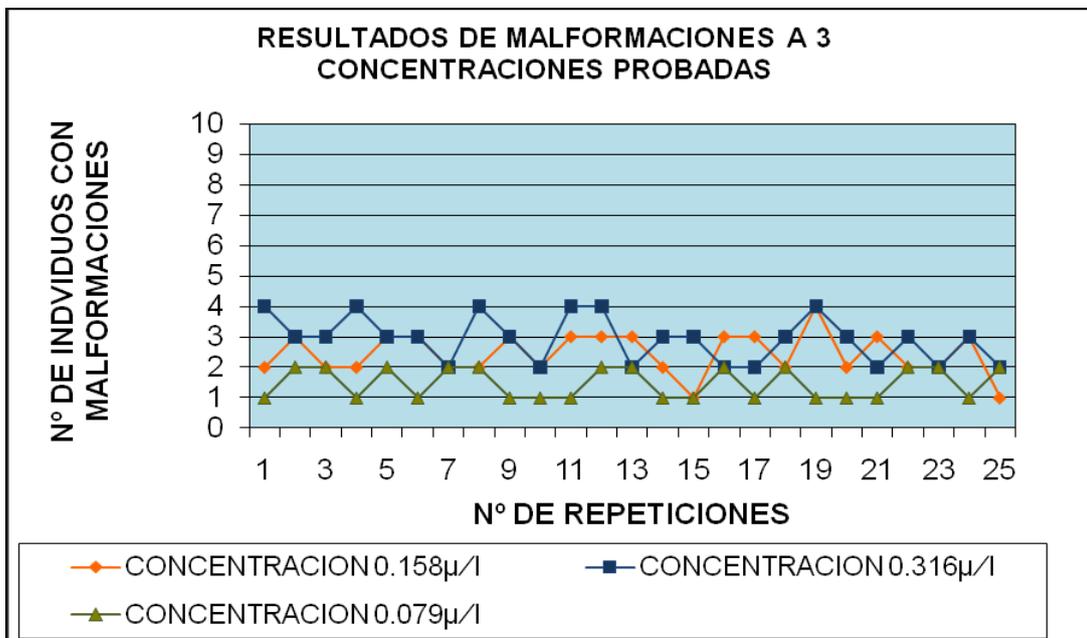
**Tabla XII. Datos para realizar el análisis de varianza (ANOVA) reportando las CL de cada concentración y los porcentajes de malformaciones.**

<b>Nº Muestras</b>	<b>Vivos</b>	<b>Malformaciones [0.079 µg/l] (CL<sub>23</sub>)</b>	<b>Malformaciones [0.158 µg/l] (CL<sub>16</sub>)</b>	<b>Malformaciones [0.316 µg/l] (CL<sub>21</sub>)</b>
1	20	1	2	4
2	20	2	3	3
3	20	2	2	3
4	20	1	2	4
5	20	2	3	3
6	20	1	3	3
7	20	2	2	2
8	20	2	2	4
9	20	1	3	3
10	20	1	2	2
11	20	1	3	4
12	20	2	3	4
13	20	2	3	2
14	20	1	2	3
15	20	1	1	3
16	20	2	3	2
17	20	1	3	2
18	20	2	2	3
19	20	1	4	4
20	20	1	2	3
21	20	1	3	2
22	20	2	2	3
23	20	2	2	2
24	20	1	3	3
25	20	2	1	2
<b>Total</b>	<b>500</b>	<b>39</b>	<b>62</b>	<b>71</b>

**Tabla XIII. Porcentaje y número de individuos *D. rerio* que presentan daño teratogénico de las 3 dosis subtóxicas con 72 horas de tratamiento durante el desarrollo embrionario**

Concentración	Total de Individuos	% de Individuos con Malformaciones	% de Individuos sin Malformaciones
[0.079 µg/l] (CL 23)	500	7.4% ( 39 )	92.2% ( 463 )
[0.158 µg/l] (CL 16)	500	12.2% ( 62 )	87.8% ( 439 )
[0.316 µg/l] (CL 21.66)	500	14.6% ( 73 )	85.4% ( 427 )

Se muestra (Fig. 17) que de manera constante la concentración de 0.316 µg/l presenta mayor índice de malformaciones en embriones de *D. rerio*, las pruebas muestran que a mayor concentración de manganeso el número de malformaciones en columna vertebral es mayor en relación al resto de concentraciones.



**Fig. 17. Numero de organismos con malformaciones por tratamiento.**

Una vez conocida la frecuencia de malformaciones se realizó un análisis de Tukey para determinar las diferencias entre las concentraciones de manganeso, y una prueba de comparación de Kruskal-Wallis, por concentraciones expuesta a embriones de *D. rerio* a 3 dosis subtóxicas de manganeso con una  $p \geq 0.05$ , como se menciona en el procedimiento experimental, en la cual se hace la comparación de la media estadística y se denotan diferencias significativas (Tablas XIV-XVI., Fig. 19).

De lo anterior, muestra que por lo menos dos concentraciones presenta diferencias significativas (0.079µg/l y 0.316µg/l ) en las medias estadísticas en cuanto al control para la inducción de malformaciones en columna vertebral; destacando que las concentraciones de manganeso evaluadas están muy por debajo de las observadas, se podría inferir que las concentraciones presentes en la zona de estudio produce efectos tóxicos en los embriones y a concentraciones menores de este elemento causa efectos teratogénicos.

**Tabla XIV. Resultados de Prueba de Tukey HSD test; utilizando como variable organismos con malformaciones, con  $p \leq 0.500$  y alfa 0.050.**

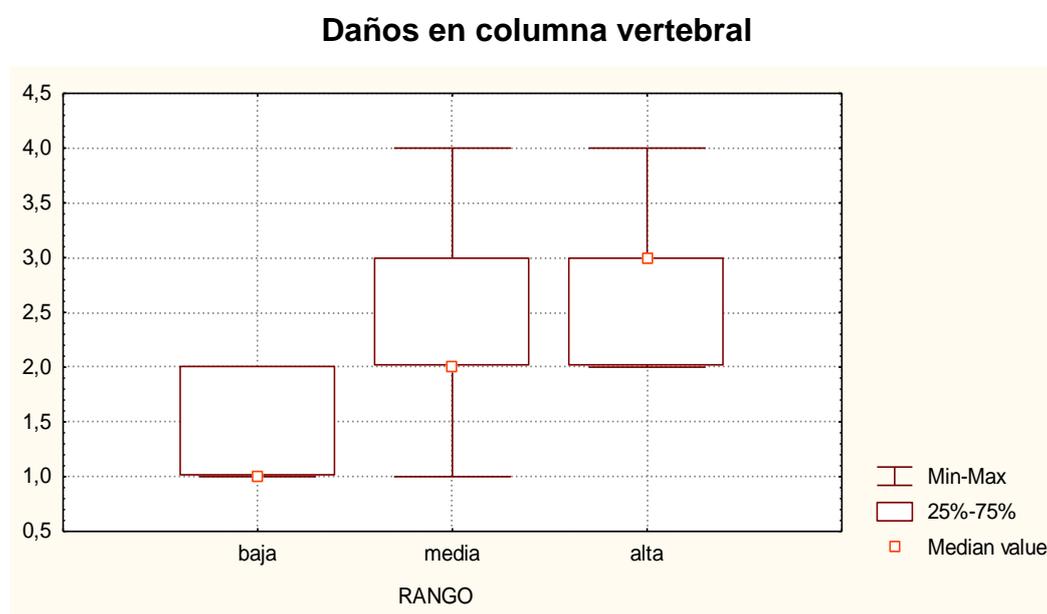
<b>Concentración de Mn</b>	<b>° Libertad</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>Medias</b>	<b>Error Std.</b>	<b>Alfa</b>
<b>Baja ( 0.079µg/l )</b>	2	25	1.48	0.1338324	0.05
<b>Media (0.158µg/l)</b>	2	25	2.44	0.1338324	0.05
<b>Alta ( 0.316µg/l)</b>	2	25	2.92	0.1338324	0.05

De acuerdo con la prueba realizada demuestra que en por lo menos 2 concentraciones son diferentes significativamente en el número de peces que presentan daños en columna vertebral, de acuerdo con las medias de la concentración (0.079µg/l) y alta (0.316µg/l), (Tabla XV).

**Tabla XV. Comparación de medias estadísticas en las 3 concentraciones de Mn.**

	(1) M=1,4800	(2) M=2,4400	(3) M=2,9200
baja (1)		<b>0.000118</b>	<b>0.000111</b>
media (2)	0.000118		<b>0.035382</b>
alta (3)	0.000111	<b>0.035382</b>	

Resumen de las pruebas estadísticas que demuestran que por lo menos dos concentraciones presentan diferencias significativas, en este caso la concentración más baja es (0.079µg/l) es significativamente diferente a la más alta que es de (0.316µg/l) con una media de 2.98, (Fig. 18).

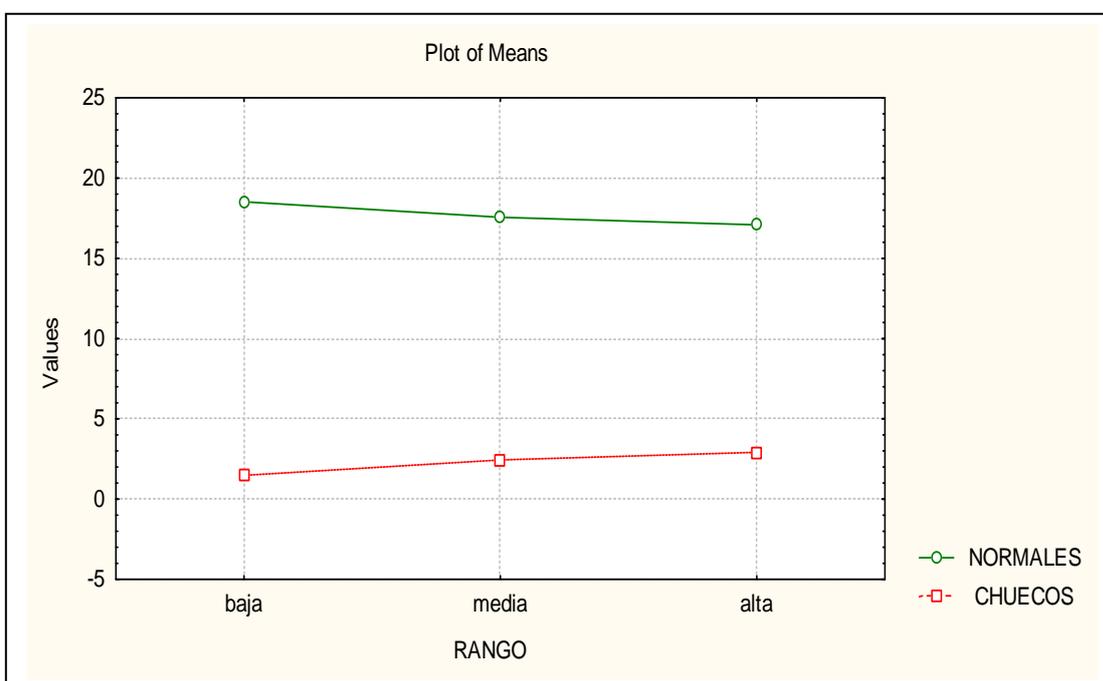


**Fig. 18. Representación de las diferencias significativas que exhiben las concentraciones probadas.**

**Tabla XVI. Resultados de las pruebas estadísticas y las diferencias de medias.**

Suma de Medias

Cocentracion.	NORMALES				MALFORMADOS			
	Medias	N	Std.Dev.	Varianza	Medias	N	Std.Dev.	Varianza
baja : baja	18.52000	25	.509902	.260000	1.480000	25	.509902	.260000
med : med	17.56000	25	.711805	.506667	2.440000	25	.711805	.506667
alta : alta	17.08000	25	.759386	.576667	2.920000	25	.759386	.576667



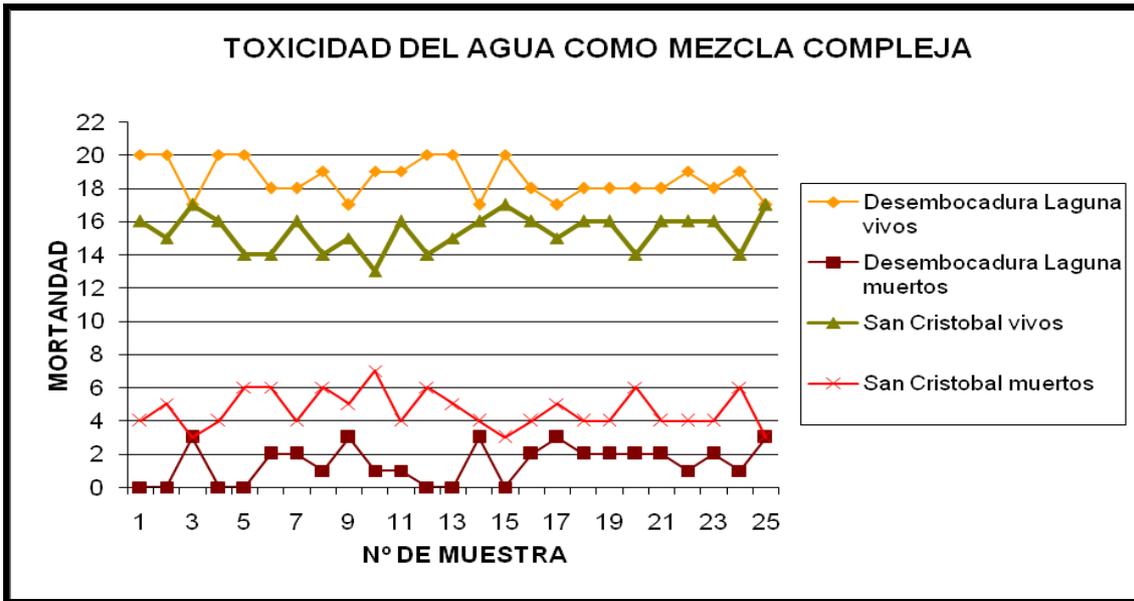
**Figura 19. Frecuencia de malformaciones en columna vertebral a las tres concentraciones probadas en embriones de *D. rerio*.**

Se evaluó las muestras de agua de los sitios de muestreados para conocer la toxicidad y teratogénicidad como una mezcla compleja y así inferir si existen elementos presentes en el agua que potencialmente estén manifestando efectos sinérgicos y o antagónicos. Como se muestra (Tabla XVI, y Fig. 20), hay diferencias en el número de peces muertos y malformados entre las dos localidades, manifestándose un mayor efecto toxico en San Cristóbal que en la desembocadura de la laguna, y de acuerdo al número de

malformaciones en agua de San Cristóbal presenta mayor número de casos, cabe mencionar que el agua de la laguna de metztitlán no presenta daños en columna vertebral sino que hace que el desarrollo del embrión se vea aletargado con un periodo de 72 horas (Fig. 21).

**Tabla XVII. Toxicidad y daño teratogénico del agua como mezcla compleja.**

Nº de muestra	SAN CRISTÓBAL			DESEMBOCADURA DE LA LAGUNA		
	VIVOS	MUERTOS	CHUECOS	VIVOS	MUERTOS	DESARROLLO ALETARGADO
1	16	4	3	20	0	4
2	15	5	1	20	0	2
3	17	3	1	17	3	4
4	16	4	2	20	0	2
5	14	6	2	20	0	4
6	14	6	2	18	2	2
7	16	4	2	18	2	3
8	14	6	3	19	1	1
9	15	5	2	17	3	1
10	13	7	0	19	1	1
11	16	4	1	19	1	2
12	14	6	2	20	0	1
13	15	5	1	20	0	1
14	16	4	3	17	3	3
15	17	3	0	20	0	2
16	16	4	1	18	2	1
17	15	5	1	17	3	2
18	16	4	2	18	2	2
19	16	4	1	18	2	1
20	14	6	1	18	2	2
21	16	4	0	18	2	1
22	16	4	3	19	1	2
23	16	4	1	18	2	1
24	14	6	1	19	1	3
25	17	3	2	17	3	1
<b>Total</b>	<b>384</b>	<b>116</b>	<b>38</b>	<b>464</b>	<b>36</b>	<b>49</b>

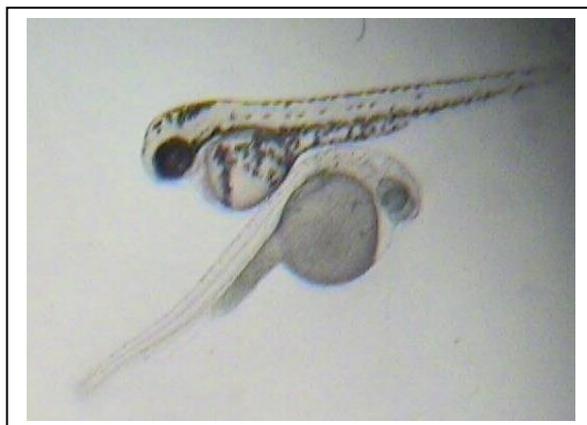


**Fig. 20. Grafica de toxicidad de agua de los localidades de Metztlán, Hidalgo.**

Se realizaron 25 repeticiones cada uno con 20 individuos como muestra, total de 500 individuos tratados por concentración, el agua de San Cristóbal presentan una toxicidad del 23.2% (116 individuos) de mortandad y 76.8% (384 individuos) de sobre vivencia; el agua de la desembocadura de la laguna de Metztlán Hgo. arroja una toxicidad del 7.2% (36 individuos de mortandad) y 92.8% (464 individuos) de sobre vivencia. El testigo muestra un índice de sobre vivencia del 99.2% (496 individuos) (Fig. 20), por otra parte también se puede evidenciar que la aparición de malformaciones es constante a lo largo de los 25 tratamientos.

Los análisis realizados para evaluar daño teratogénico, nos arrojan que el agua de San Cristóbal presenta 38 individuos con malformaciones del total del tamaño de muestra (Tabla XVIII); a diferencia de la desembocadura de la Laguna de Metztlán, Hgo., esta no presenta malformaciones en columna vertebral sino que el desarrollo de los embriones se ve afectado, es decir se

retrasa 72 horas tomando en consideración la pigmentación del la muestra testigo como se muestra en la (Fig. 21).

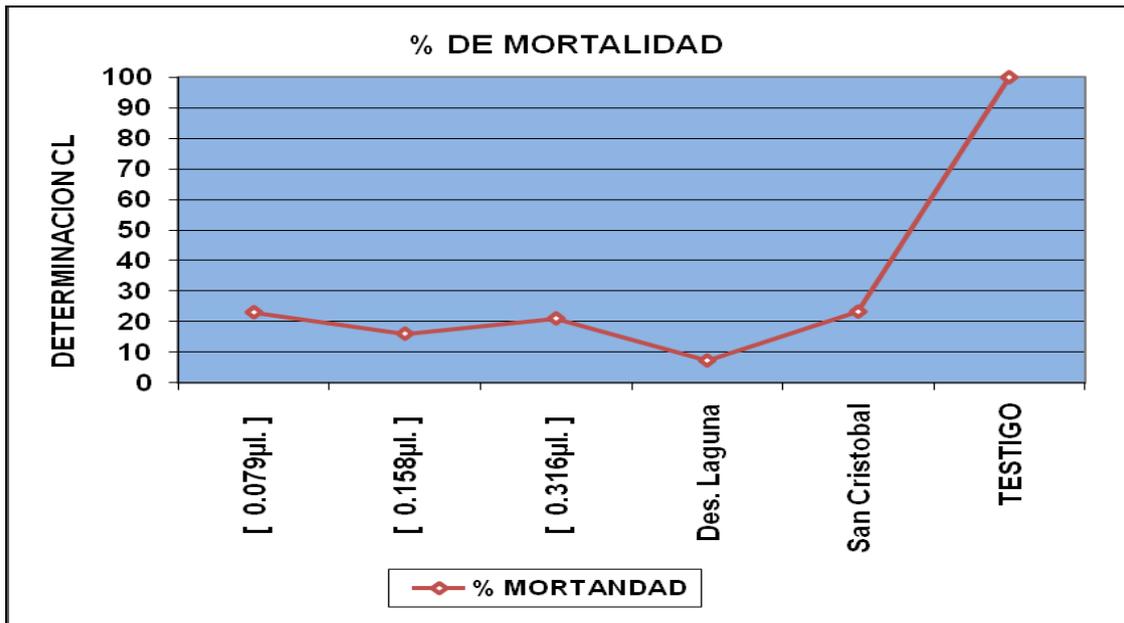


**Fig. 21. Comparación de alevines de pez cebra referente al retraso de pigmentación.**

**Tabla XVIII. Porcentaje y número de malformaciones inducidas por tratamientos con agua de Metztitlán, Hgo.**

<b>Localidad</b>	<b>Total de Individuos Tratados/muertos</b>	<b>% de Individuos con Malformaciones</b>	<b>% de Individuos sin Malformaciones</b>
<b>San Cristóbal</b>	500 /116	7.6%	92.4%
<b>Desembocadura</b>	500 / 36	2.0%	98.0%

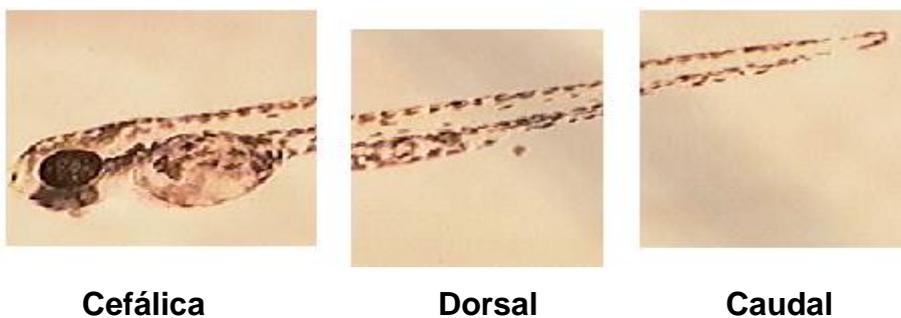
Al comparar la relación de toxicidad que hay entre las diferentes muestras, arrojan que la toxicidad más alta del manganeso está presente en el agua de San Cristóbal obteniendo 116 individuos muertos de un tamaño de muestra de 500 individuos, de igual forma el efecto teratogénico es notablemente mayor en agua de San Cristóbal que en la desembocadura de la laguna de Metztitlán, (Tablas XII y XVI).



**Fig. 22. Correlación de efectos tóxicos de las concentraciones de Mn y de las aguas de Metztlán.**

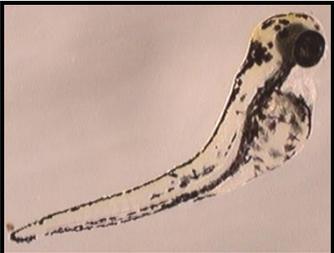
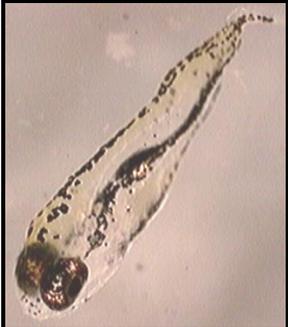
### REGISTRO Y CLASIFICACIÓN DE MALFORMACIONES

Las malformaciones reportadas en columna vertebral, se clasificaron de acuerdo a González (2005) y Rivera (2006), en donde se dividió al organismo en tres áreas: cefálica, media y caudal (Fig. 23), misma que clasifica e identifica el número y tipo de malformaciones sobre la columna vertebral, clasificándolas en sencillas, dobles, múltiples, curvas, en espiral, en aleta caudal y en forma de gancho (Tabla XVIII), (Peña ,2008).



**Fig. 23. Embrión de pez dividido en tres zonas cebra a 72 horas de desarrollo.**

**Tabla XVIII. Clasificación y descripción de malformaciones (tomado de Rivera, 2006).**

<b>Malformación</b>	<b>Descripción</b>	<b>Imagen</b>
<b>Malformaciones sencillas</b>	Las malformaciones sencillas son aquellas en las que el embrión del <i>Danio rerio</i> presento un solo doblez (malformación), ya sea lateral o dorsal, estas se observaron en la zona cefálica, media (columna vertebral) y/o caudal.	
<b>Malformaciones dobles</b>	Las malformaciones dobles son aquellas en las que el embrión del <i>Danio rerio</i> presento dos dobleces, una en la zona media de la columna vertebral y otra en la zona caudal, ya sea lateral o dorsal.	
<b>Malformaciones múltiples</b>	Las malformaciones múltiples son aquellas en las que el embrión del <i>Danio rerio</i> , presento tres o más dobleces, en la zona cefálica, media y/o caudal, ya sea lateral o dorsal	
<b>Malformaciones curvas</b>	Las malformaciones curvas son aquellas en las que el embrión del <i>Danio rerio</i> , presento una curvatura en la zona cefálica, media y/o caudal, lo cual ocasiona que el embrión nade en círculo.	

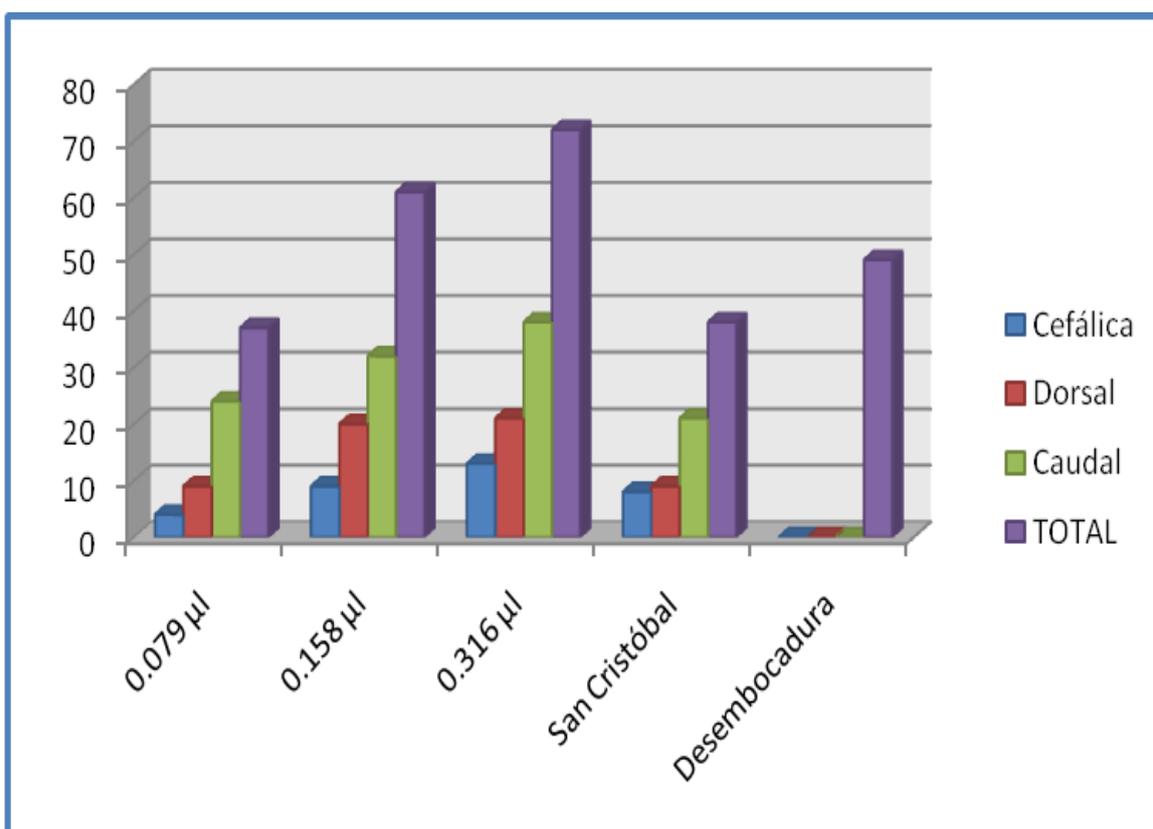
**Tabla XVIII. Continuación, clasificación y descripción de malformaciones tomado de (Rivera, 2006).**

<p><b>Malformaciones en aleta caudal</b></p>	<p>Las malformaciones en aleta caudal son aquellas en las que el embrión del <i>Danio rerio</i>, presenta un pequeño doblez en la zona caudal.</p>	
<p><b>Malformaciones en gancho</b></p>	<p>Las malformaciones en gancho son aquellas en las que el embrión del <i>Danio rerio</i>, presento un pequeño doblez en la zona media (columna vertebral) y/o zona caudal, dando el aspecto de gancho al pez.</p>	
<p><b>Malformaciones en espiral</b></p>	<p>Las malformaciones en espiral son aquellas en las que el embrión del <i>Danio rerio</i>, presento un enroscamiento en forma de espiral en la zona caudal.</p>	

Como se muestra (Tabla XIX), el tipo principal de malformación que induce el manganeso es la de tipo caudal con mayor frecuencia a la concentración más alta (0.316µl/l), así mismo siendo el daño caudal con mayor frecuencia como se muestra en la (Fig. 24), en la localidad de la desembocadura de la laguna lo que se obtuvo fue un desarrollo aletargado en relación a los resultados obtenidos por malformaciones (Fig. 25-28).

**Tabla XX. Cuantificación de malformaciones en columna vertebral.**

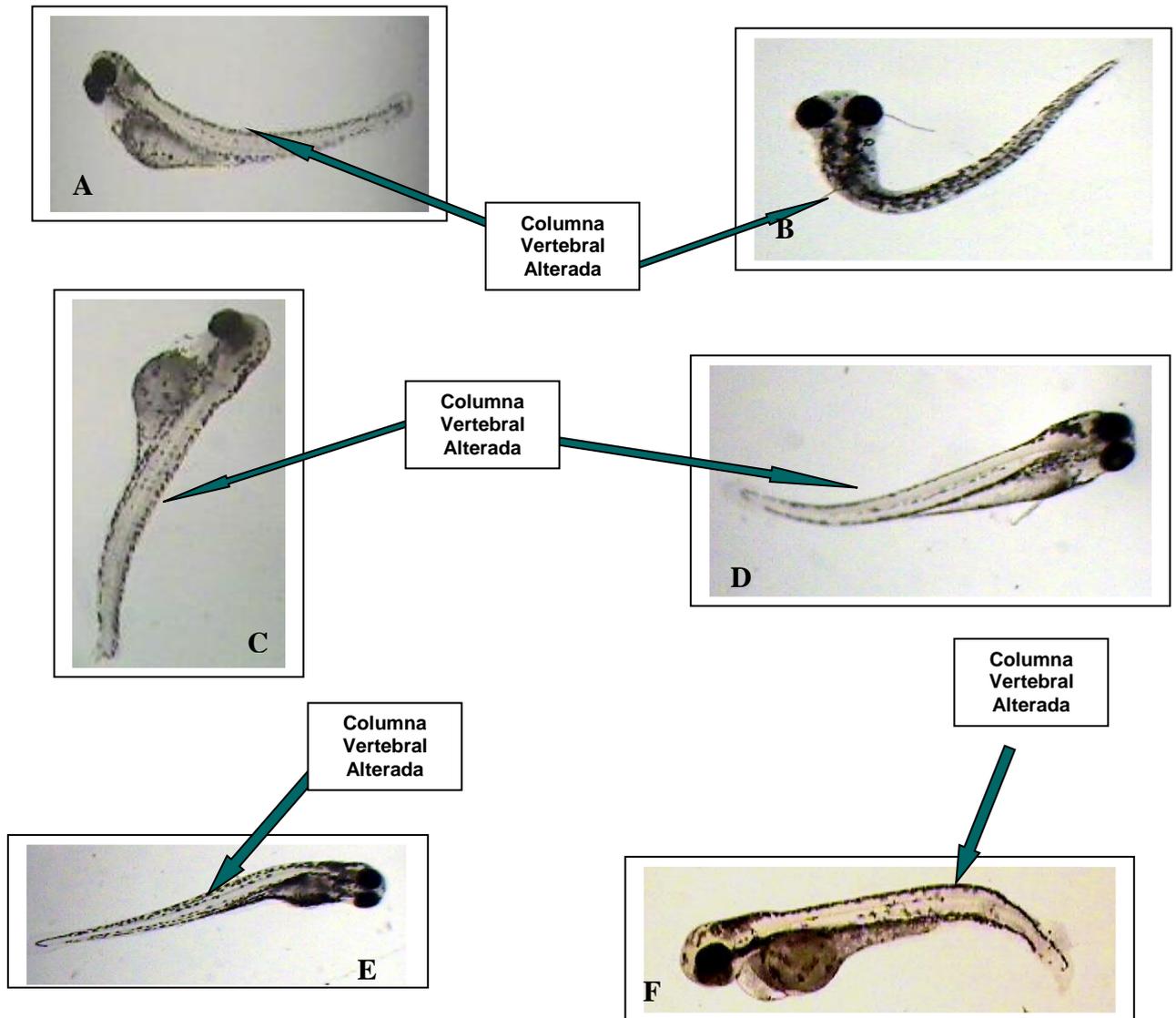
Tipo de malformación Concentración	Cefálica	Dorsal	Caudal	TOTAL
0.079 µl/l	4	9	24	37
0.158 µl/l	9	20	32	61
0.316 µl/l	13	21	38	72
San Cristóbal	21	9	8	38
Desembocadura de laguna	0	0	10	49
<b>TOTAL</b>	<b>34</b>	<b>59</b>	<b>115</b>	<b>257</b>



**Fig. 24. Correlación de las frecuencias de malformaciones en las concentraciones de Mn probadas y las muestras de agua.**



Alevin *Danio rerio* testigo negativo.

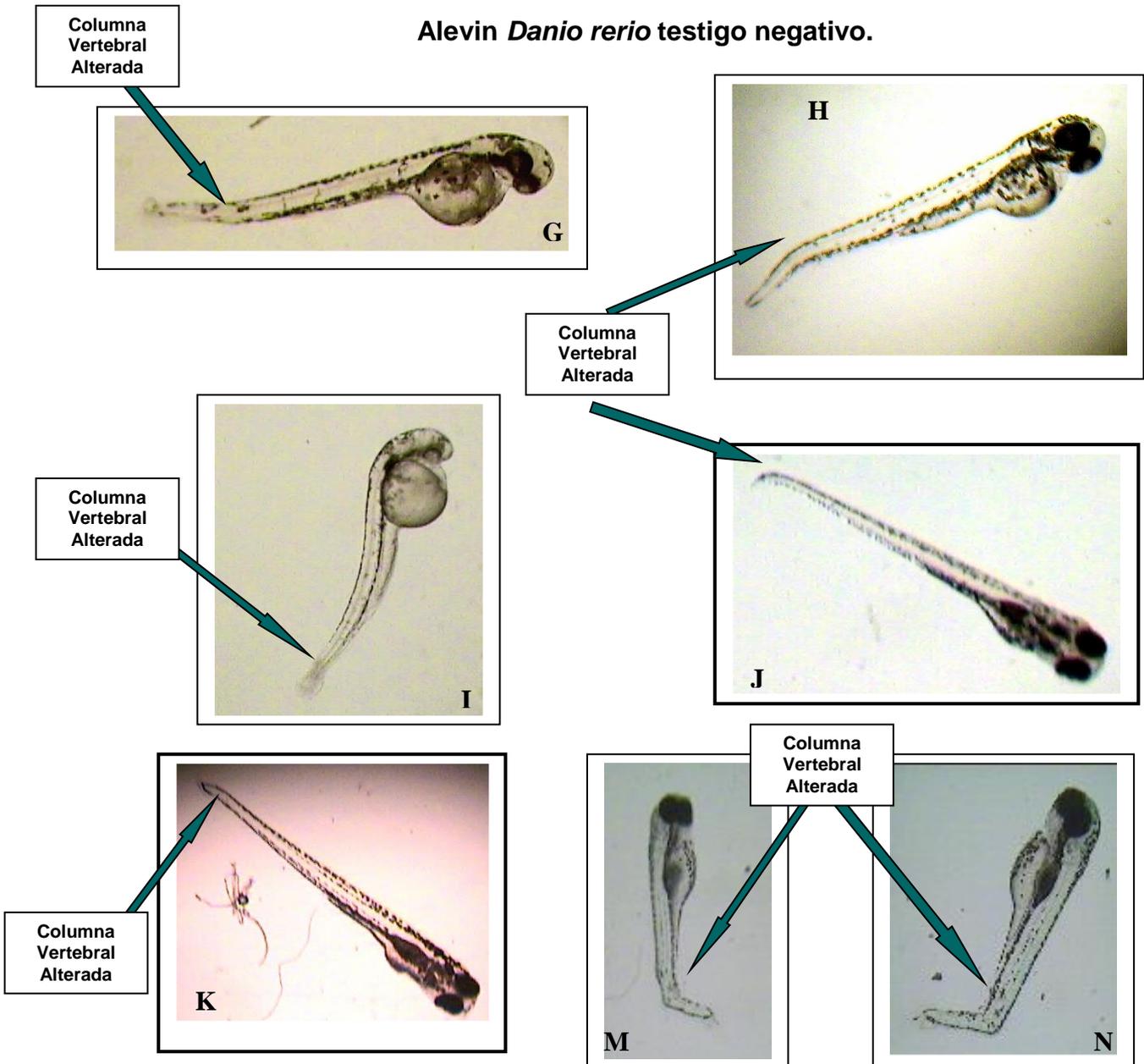


A, C, D, E, F malformacion sencilla, (lateral o dorsal, estas se observaron en la zona cefálica, media). B, malformaciones cuerpo curvo (presento una curvatura en la zona cefálica, media y/o caudal).

**Fig. 25.** Malformaciones sencillas y malformaciones cuerpo curvo en columna vertebral en alevines de *D. rerio*.



Alevin *Danio rerio* testigo negativo.

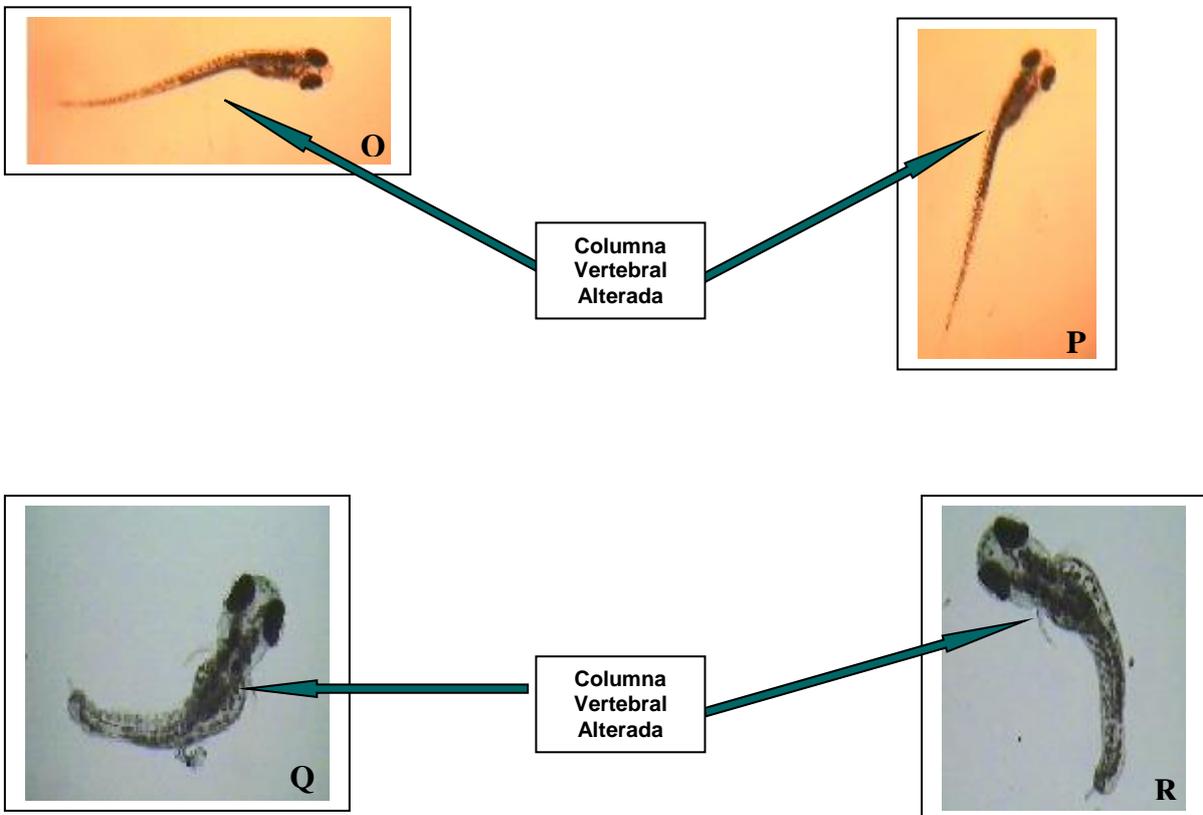


G,H,J,K,M,N. malformaciones cuerpo curvo (presenta un pequeño doblez en la zona caudal). I, malformaciones dobles (presento dos dobleces, una en la zona media de la columna vertebral y otra en la zona caudal).

**Fig. 26.** Malformaciones en aleta caudal y malformaciones dobles en columna vertebral en alevines de *D. rerio*.



Alevin *Danio rerio* testigo negativo.

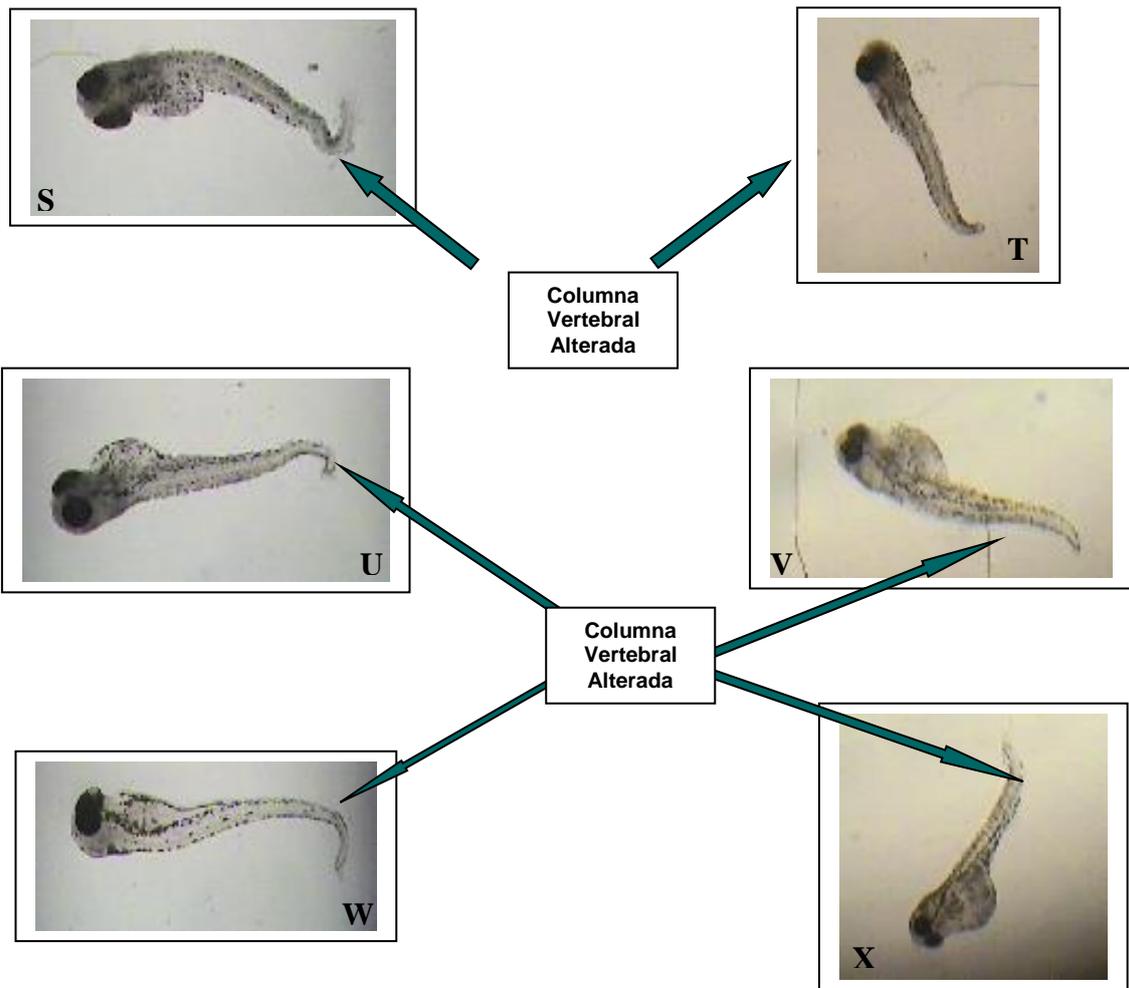


O,P,R. malformacion sencilla, (presenta malformacion en la zona lateral o dorsal, estas se observaron en la zona cefálica o media). Q, malformaciones múltiples (presento tres o más dobleces, en la zona cefálica, media y/o caudal, ya sea lateral o dorsal).

**Fig. 27.** Malformaciones sencillas y malformaciones múltiples en columna vertebral de alevines de *D. rerio*.



**Alevin *Danio rerio* testigo negativo.**



S,U,V,W. malformaciones dobles (presento dos dobleces, una en la zona media de la columna vertebral y otra en la zona caudal). T, X. malformaciones curvas en columna vertebral (presento una curvatura en la zona cefálica, media y/o caudal.)

**Fig. 28.** Malformaciones dobles y malformaciones en aleta caudal de alevines de *D. rerio*.

## 7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Actualmente existen pocos reportes científicos sobre la toxicidad del manganeso en ambientes acuáticos y de sus efectos biológicos colaterales, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el daño teratogénico inducido por el manganeso en embriones de *Danio rerio* a través de la prueba DarTa (*Danio rerio* Teratology assay) a concentraciones registradas en agua de la desembocadura de la laguna en Metztitlán, Hidalgo; tomando como sitios de muestreo la localidad de San Cristóbal y la desembocadura en la laguna, para identificar lo que aporta el río y lo que se acumula o diluye en la laguna.

El manganeso presente en la zona de estudio, posiblemente está asociado a actividades antropogénica, más que a contaminación natural; debido a que a lo largo de este cuerpo de agua, existe actividad ganadera, agrícola e industrial sobre todo de tipo textil, las cuales arrojan desechos como materia orgánica, fertilizantes, agroquímicos y catalizadores de pinturas entre otros al río y por ende llegan a la laguna (Anuario estadístico de Hidalgo, 2000).

El primer objetivo de este trabajo consistió en una determinación de la presencia y/o ausencia del Manganeso total y otros metales pesados en la zona estudio, a través de un análisis de química analítica mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica vía húmeda (Tabla IX), para corroborar la presencia de estos elementos elucidados a través de las actividades antropogénicas antes mencionadas en la zona de estudios.

Encontrándose que el Mn y otros elementos se concentran más en la desembocadura de la laguna Metztlán que en la localidad de San Cristóbal; lo anterior se puede deber a que la menor oxigenación del agua que existe en la desembocadura del río a la laguna, permite que exista una menor oxidación en el agua, y por lo tanto una menor precipitación de éste elemento, dando como resultado una mayor presencia del Mn en el agua debido a que es más soluble (Mahan, 1997 y Barrerio, 1991).

Por otra parte, para la determinación del Mn en la zona de estudio, se contemplo establecer si hay diferencia entre la época de lluvia y estiaje; encontrándose una mayor concentración en estiaje, lo cual se explica de igual forma que lo anterior, debido a que los niveles de oxígeno disminuyen en temporada de secas, haciendo que exista una reducción, es por ello se hace más soluble el Mn, por ende más biodisponible (Barrerío, 1991).

Cabe mencionar que la concentración registrada en la desembocadura del río en la laguna y en la temporada de secas (Tabla IX ) ambas están por arriba de la NOM-127, la cual refiere a la concentración máxima permisible para aguas de uso y consumo humano, no existiendo referencia en las normas mexicanas para aguas residuales (International Manganese Institute, 2007); por lo que se determino trabajar en las pruebas genotóxicas con muestras de agua de San Cristóbal y de la desembocadura en temporada de secas.

Para la fase experimental primeramente, se identificaron y probaron 3 dosis subtóxicas (0.158, 0.079 y 0.316  $\mu\text{g/l}$ ) en embriones de *D. rerio*, correspondientes a la CL<sub>16</sub>, CL<sub>23</sub> y CL<sub>21</sub> respectivamente, siendo 0.15  $\mu\text{g/l}$  la concentración máxima permitida en la norma antes mencionada (Diario oficial de la federación, 1996).

De los efectos teratogénicos inducidos por las tres concentraciones antes mencionadas (Tabla XIII), presentaron principalmente daños en columna vertebral de tipo sencillas (Fig. 25) en un porcentaje de 10, 8.3 y 13% respectivamente, mientras que para el agua de de San Cristóbal, se observó una toxicidad mayor de 23% (CL<sub>23.2</sub>) con una frecuencia de malformaciones del 7.6% (Tabla 18), siendo las principales las malformaciones de tipo sencillo (Fig. 26), pero apareciendo malformaciones tipo doble, que son poco frecuentes y que solo se han observado con este bioensayo en trabajos anteriores con mercurio y no con arsénico y cadmio probados en otros trabajos (Gonzales-Ledesma, 2005; Rivera, 2006 y Gonzales y Téllez, 2008; Peña, 2008).

Por otra parte el agua de la desembocadura presenta una mayor concentración del Mn y una menor toxicidad (CL<sub>7.2</sub>) aparente, debido a que existe además de los embriones muertos, un efecto de aletargamiento durante el desarrollo de los embriones que al final no eclosionan o tardan mucho en eclosionar, lo que también es un efecto tóxico (Fig. 21), además de presentar principalmente las malformaciones de tipo sencillo con una frecuencia del 2%, que es menor a las otras observadas, lo que se puede explicar a pesar de que

hay más concentración del Mn en agua, debido a la posible saturación de canales y mecanismos de transporte a nivel de membrana, que la hacen menos permeables debido a la actividad iónica de este elementó, en donde interviene el tamaño del ion y su carga (Cabrera, 2009).

Las variaciones de pH, la oxigenación y la temperatura entre otros pueden afectar la permeabilidad de membrana del embrión y por lo tanto aumentar o disminuir su efecto biológico (García, 2008 y Peña, 2008), lo que obliga a experimentos posteriores al presente trabajo con diferentes elementos y a diferentes condiciones ambientales. Además de que el pH, tiene una mayor influencia sobre la velocidad de las reacciones químicas y biológicas en cuanto a la absorción y oxidación (Tisdale, 1991).

Lo antes mencionado, permite inferir que las malformaciones más susceptibles son las de tipo sencillo y en la zona caudal (Fig. 25-28), lo cual permite reafirmar lo señalado en trabajos anteriores como un buen biomarcador de daño en este bioensayo (Gonzales-Ledesma, 2005; Rivera, 2006 y Gonzales y Téllez, 2008; Peña, 2008), además de reafirmar las ventajas de este modelo biológico, sin dejar de mencionar la presencia de malformaciones dobles en este trabajo, que no son comunes y que pudieran en un futuro correlacionarse con algún o algunos elementos y/o compuestos.

## 8. Literatura citada

- Adler, R. (2008) Biología del desarrollo y malformaciones congénitas. Universidad de Texas. Ed. Librería "El Ateneo". EUA. 185 p.
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). (2000) Toxicológica del Manganeso. Reseza. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. 7-13 p.
- Aguilar, R. (2002) Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Instituto Mexicano de Tecnología del agua. Ed. Gabriela Castillo Morales. México. D.F. 189 p.
- Anuario Estadístico Hidalgo Edición (2000) Gobierno del Estado de Hidalgo (Secretaría de Desarrollo Social) INEGI.
- Báez, A., Prieto, G. y A. Galán, (2004) Bioacumulación y daño genotóxico en pez cebra (*Danio rerio*) por arsénico en aguas de Zimapàn, Hidalgo (México). Ensayos en Cortos Plazo. AquaTic. 21:62-70 p.
- Baird, C. (2001) Química ambiental. Ed. Reverte, S.A. Barcelona España. 622 pp.
- Barrerio, R. (1991) Estudio en metales pesados en medio y romanismos de un ecosistema de río. Tesis doctoral. Universidad de Santiago. 248 pp.
- Barrón, M. (2002) Environmental Contaminants Altering Behaviour en: Behavioural Ecotoxicology. 157 pp.
- Baudo, R. (1987) Ecotoxicological Testing with Daphnia, en Daphnia. Mem. Ist. Ital. Idrobiol. Peters, R. y Bernardi, R. (Eds.). 45: 461 – 482 p.
- Boltovskoy, E. (1978) Problemas de los indicadores biológicos en oceanografía. En. Acad. Cienc. Ex. Fís. Nat., Bs. As. 30: 229 – 251p.
- Boltovskoy, E. (1967) Indicadores biológicos en la oceanografía. Cienc. Inv. (Bs. As.) 23 (2): 66 – 75 p.
- Birge, W.J., Black, J.A. y A.G. Westerman (1979) Evaluation of aquatic pollutants using fish and amphibian eggs as bioassay organisms. In: S.W. Nielsen, G. Migaki and D.G. Scarpelli (Eds.), Symp. Animals Monitors Environ. Pollut, 1977, Storrs, CT 12: 108-118. En: AQUIRE (Aquatic toxicity Information Retrieval) database. U.S. Environmental

Protection Agency, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Mid-Continent Ecology Division, Duluth, Minnesota

- Buikema, A. Niederlehner B. y J. Cairns, (1982) Biological monitoring. Part IV. Toxicity Testing. *Water Res.* 16: 239 – 262 p.
- Cabrera, R. (2009) Comunicación personal. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Cairns, J. y P. McCormick (1992) Developing an ecosystem-based capability for ecological risk assessments. *The Environmental Professional.* 14:186 – 196 pp.
- Castillo, G. (2004) Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, - México: IMTA, 22-29 pp.
- Castillo, V. (1999) Sistema de explotación por corto y relleno de tepetate del bloque 830-950 en la mina acuatitla de la unidad de molango, de la compañía minera Autlan. Memoria. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. UAEH. 80 p.
- CNA. Consultado, 2005-12-08 Ciudad de México <http://www.sagan-gea.org/hojared/CAgua.html>
- Colin A, Barrera, C. y H. Pérez (2001) El agua: una visión global para el III milenio. *Revista internacional de Contaminación Ambiental.* 35-41pp.
- Cortinas, C. (2005) La evaluación de riesgos para la salud humana, Instituto Nacional de Ecología. México DF. 89-95 pp.
- Crosby, D.G. (1998) *Environmental toxicology and chemistry.* Lewis Publishers.
- Cuaderno de Información Básica Metztitlán Estado de Hidalgo, INEGI. (2000) Dirección General de Planeación, Edición 2000. 24-36 pp.
- Donaldson, J. (1987) The physiopathologic significance of manganese in brain: Its relation to schizophrenia and neurodegenerative disorders. *Neurotoxicology.* 8(3): 451-462 pp.
- De la Lanza, G., y J. García (1998) Lagos y presas de México. AGT. Editor. México D. F. 24-29 pp.

- Enciclopedia de los Municipios de México, Hidalgo (2005) Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Hidalgo.
- Estepa, A. (2002) ¿Porqué el Pez Cebra? Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández. (Alicante). España. 66-78 pp.
- Fernicola, N. (1992) Nociones Básicas de Toxicología en: toxicología prospectiva y seguridad química: programa internacional de seguridad de las sustancias químicas (PISSQ / PNUMA – OIT / OMS) Ed. ECO. México. 96 p.
- Figueruelo, J. y M. Marino (2001) Química Física del medio ambiente. Ed. Reverte. México 333 p.
- Gabilondo, T. (2005) Toxicidad aguda oral y subcrónica en ratas de un extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. Revista de Toxicología. Órgano Oficial de la Asociación Española de Toxicología. 22: (3) 21-29 pp.
- Gad, S. y P. Chengelis (1998) Acute toxicology testing Ed. Academia Press. EUA. 534 p.
- García, C. (2003) El Lago de Metztitlán, Hidalgo. Departamento de Hidrobiología. UAM Iztapalapa. 31-35 pp.
- García, H. (2008) Influencia del pH en la inducción de daño teratogénico producido por cloruro de manganeso (HgCl<sub>2</sub>) a través de la prueba con embriones del pez cebra (*Brachidanium rerio*)“*Danio rerio* Teratology Assay” (DART). Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 68 p.
- García, M. y I. Oliveira (2005) Citotoxicidad sobre *artemia salina* de aceites esenciales recolectados en la república argentina. Ed. Ciencias Médicas. Cuba. 57 p.
- García, J. (2002) “Estado actual de la contaminación por metales pesados y pesticidas organoclorados en el parque natural de monfragüe”, para optar al grado de doctor. Universidad de Extremadura Facultad de Veterinaria Departamento de Medicina y Sanidad Animal. España. 131 p.

- Gaytan, J., Gonzalez, L., Pulido, G., Scott, W., Gordillo, A., y E. Pérez (2003) Evaluación de la calidad del agua de la reserva de la biosfera “Barranca de Metztitlán, Hidalgo” en México, a través de la inducción de malformaciones en columna vertebral en pez cebrá (*Danio rerio*; Hamilton 1822). En. Estudios biológicos en las áreas naturales del estado de Hidalgo. Ed. Griselda Pulido Flores, Ana Lucia López Escamilla y María Teresa Pulido Escamilla. UAEH. Pachuca, Hidalgo, México. 17-24 pp.
- Gaytan, J. y A. Gordillo (2009) Uso de técnicas de química analítica para evaluar la calidad del agua y su impacto biológico en el estado de Hidalgo, México. En. Estudios biológicos en las áreas naturales del estado de Hidalgo. UAEH. Pachuca, Hidalgo, México. 23-38 pp.
- González, L. (2005) Evaluación del efecto del cloruro de mercurio en la inducción de malformaciones de columna vertebral del pez cebrá (*Danio rerio* Hamilton, 1822) durante diferentes etapas del desarrollo embrionario. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Hidalgo. 96 p.
- González, A. y H. Villafuentes (2008) Evaluación de daños teratogénicos inducidos en embriones de pez cebrá a concentraciones encontradas de Cadmio y Manganeso en Metztitlán, Hidalgo. En. Congreso Nacional de Genética, Zacatecas. México. 54-58 pp.
- González, R. (1998) Contaminación del agua en: contaminación Novaro, Ed. El colegio nacional. México. D.F. 93 p.
- Gunnar, N. (2001) Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, Organización Internacional del Trabajo, Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Capitulo 33 Tercera Edición. 127 p.
- Hollisten, M., J. Angrosanto, y N. Nidols (1979) Short-term tests for carcinogens and mutagens en *Mutation Res.*, 65:133-226 pp.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2000) Hidalgo, Gobierno del Estado, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, H. Ayuntamiento Constitucional de Metztitlán. México: INEGI c1995.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2005) Metztitlán, Hidalgo - Condiciones sociales – Estadísticas. México: INEGI c1995.
- International Manganese Institute (2007) (<http://www.manganese.org>) Investigación y Ciencia.

- Kimball, G. (1978) The effects of lesser known metals and one organic to fathead minnows (*Pimephales promelas*) and *Daphnia magna*. Manuscript. Dep. of Entomology, Fisheries and Wildlife, University of Minnesota, Minneapolis, En: AQUIRE (Aquatic toxicity Information Retrieval) Environmental Protection Agency. Minnesota EUA. 88 p.
- Kimmel, C., Balla, B., Kimmel, W., Ullmann, S. y T. Schilling, (1995) Stage of embryonic developmental of the cebrafish. *Developmental Dynamics*. 203:253-310 pp.
- Kimmel, C. Warga, R. y T. Schilling, (1990) Development Origin and organization of the zebrafish fate map. Institute of Neuroscience, University of Oregon, USA. 108: 581-594 pp.
- Lagarto, A., Tillán J., Bueno V., Chávez I., Guerra I., y M. Lechuga, (2002) Estudio de daños genotóxicos en tejidos celulares sensibles por presencia de arsénico en aguas y suelos de Zimapan, Hidalgo. Tesis para obtener grado de licenciado en química. UAEH. Hidalgo, México. 64p.
- Los Municipios de México, Información para el Desarrollo. CEDEMUN, edición 1998. 107-124 pp.
- Mahan, B. (1967) Química. Universidad Nacional de San Marcos, Lima. Segunda Edición. Ed. Fondo educativo interamericano. México, D.F. 813 p.
- Maldonado, E. (2003) Experimentación en el pez cebra, un modelo de biología del desarrollo, Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología de la UNAM. *Mensaje Bioquímico* Vol. XXVII. 17-25 pp.
- Méndez, T., Rodríguez, L. y S. Palacios (2000) Impacto del riego con aguas contaminadas, evaluando a través de la presencia de metales pesados en suelos. Universidad Autónoma de Chapingo. México D.F. 97p.
- Mineral Comodity Sumaries (2004) USGS (U.S. Geological Survey) [//minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2004](http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/2004).
- Molina, M. (2005) Manual de evaluación de calidad del agua, centro nacional del medio ambiente (CENMA) Lab. Microbiología y Bioensayos. Santiago de Chile. Facultad de ciencias. 97p.
- Nagel, R. (2002) DarT: The Embryo Test with the Zebrafish *Dario rerio*- a General Model in Ecotoxicology and Toxicolgy. Institut für Hydrobiologie. 93 p.
- NCSS 2000. Dr. Jerry L. Hintze, Kaysville, Utha 84037.

- Nelson, F. (2001) Toxicología Laboral, Criterios para la Vigilancia de los Trabajadores Expuestos a Sustancias Químicas Peligrosas. 34-41pp.
- Nilda, A. (1992) Toxicología Prospectiva y Seguridad Química. Ed. Felix G.R. Reyes, Waldemar F. Almeida. Metepec, Estado de Mexico.79 p.
- Norma Oficial Mexicana nom-127-ssa1-1994, "salud ambiental, agua para uso y consumo humano-limites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". Diario Oficial de la Federación. 22 de noviembre de 2000.
- Organización Mundial de la Salud (2006) Investigaciones sobre contaminación del medio. Serie de Informes Técnicos N. 406 Ginebra.
- Olascoaga, J. y J. Luna (2004) Aprovechamiento de alimento vivo *Culex quinquefasciatus* en la dieta del pez cebra *Brachidanio rerio* (Pisces: Cyprinidae) con énfasis en la reproducción. Laboratorio de Acuicultura, Departamento de Biología, Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Revista AquaTIC, 22:20-25 pp.
- Oliveria, A. y F. García (2005) Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, México. Mutagenesis 20 (4): 291-295 pp.
- Ortega, J. y F. Quevedo (1991) Garantía de la Calidad de los Laboratorios de Microbiología Alimentaria. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud.65-69 pp.
- Peña, C., Dean E. y F. Ayala (2001) Toxicología Ambiental, Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental, The University of Arizona. 45-69 pp.
- Peña, M. (2008) Evaluación del efecto de la temperatura sobre la teratogenicidad del Cloruro de Mercurio (HgCl<sub>2</sub>) en embriones del pez cebra, a través de la prueba *Danio rerio* Teratology assay (DarTa). Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 69 p.
- Pérez, L., Allende, M., y A. Apalomo (2002) Teratogénesis: clasificaciones Servicio de Farmacia. Clínica Quirón de Zaragoza. España. 26:(3)47-51 pp.
- Pinilla, G. (1998) Indicadores biológicos en ecosistemas acuáticos continentales de Colombia. Universidad de Bogotá. 241 p.

- Ramos, P. (1994) Efectos genotóxicos de algunas sales arsénico en *Drosophila melanogaster*. Tesis profesional para obtener el grado de doctor en UNAM. D.F. México. 142 p.
- Reish, D. y P. Oshida (1985) Manual of methods in aquatic environment research. Part 10 - Short-term static bioassays. FAO Fish. Tech. 247: 62 pp.
- Rivera, I. (2006) Determinación de la frecuencia de malformaciones en columna vertebral, opérculo y aleta en *Danio rerio* Hamilton 1822, como posibles bioindicadores en la valoración de daño teratogénico. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 73 p.
- Rojas, A., Bernad, A. y J. Izpisúa (2007) El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. Madrid, España. 1-17 pp.
- Rojas, R., Sabido, P. y A. Rodríguez (2003) Programa de municipios saludables. comunicación de riesgos a la salud ocasionados por la exposición a manganeso en ocho comunidades de la cuenca manganecifera del estado de hidalgo, México. ed. Secretaría de Salud, Instituto de Salud, Ambiente y Trabajo, s. c. Servicios de Salud de Hidalgo. 110 p.
- Ruza, T., Marques, V., Fuentes, B., Álvarez, A., Torralba, C., Gómez, A., Sarda, F., Salcedo, F., Villaverde, M., Martín, F., Montero, M. y J. Sanz (1984) Tratado del medio ambiente. tomos I y II. Ed. E.R. Lafer. 437 p.
- Scott, W. (2004) El uso de bioensayos para evaluar la calidad del agua en el estado de Hidalgo. UAEH. En. Estudios biológicos en las áreas naturales del estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México. 24-38 pp.
- Singleton, I. (1994) Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research. j. chem. tech. biotechnol. 59: 9 – 23 pp.
- Spitsbergen, J. y M. Kent (2003) The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research —advantages and current limitations. Toxicologic Pathology. 31:62–87 pp.

- Sprague, J., Clements, D., Conlin, T., Edwards, P., Frazer, K., Schaper, K., Segerdell, E., Song, P., Sprunger, B. y M. Westerfield(1998) The zebrafish information network (zfin): The zebrafish model organism database. the zebrafish international resource center, University of Oregon, Eugene, USA. 177 p.
- Tisalde S. y W. Nelson (1991) Fertilidad de los suelos y fertilizantes, grupo noriega editores, primera edición México D.F. 85 p.
- Vega, G. (1985) Toxicología III: Aspectos específicos de la toxicidad de algunos contaminantes en: evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Ed. ECO. México. 198 p.
- Vega, G. (1985b) Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales, toxicología. centro panamericano de ecología humana y salud, organización panamericana de la salud y organización mundial de la salud.
- Vega, L. (2006) Natural arsenic ingroundwaters of latin américa, sección externa de toxicología. Centro de Investigaciones del Instituto Politécnico Nacional de México, Ed. j. bundschu. méxico D.F. (52) 342p.
- Vettorazzi, G. (1992) Toxicología prospectiva: base lógica, manera de abordar y aplicaciones prácticas en toxicología prospectiva y seguridad química: Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (PISSQ / PNUMA – OIT / OMS) Ed. ECO. México. 148 p.
- Wilhm, J. (1975) Biological indicators of pollution. Ed. river ecology. blackwell sci. publ., Oxford: 725 p.