



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

TITULO:

**Evaluación del efecto de la temperatura en la
teratogénicidad del mercurio en embriones del
pez cebrá, método (DarTa)**

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

P R E S E N T A

Peña Hernández Miguel Ángel

Director:

Dr. JUAN CARLOS GAYTÁN OYARZÚN

Índice

	Pág.
Resumen	6
1.-Introducción	7
1.1.-Contaminación del agua.	7
1.2.-Importancia de la ecotoxicología.	7
1.2.1.-Evaluación de riesgo.	8
1.3.-Estudios toxicológicos o pruebas de genotoxicidad.	11
1.3.1.-Estudios agudos.	11
1.3.2.-Estudios crónicos.	12
1.4.-Carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis.	12
1.5.-Importancia de la temperatura en estudios de toxicidad acuática.	16
1.6.-Toxicología de los metales pesados.	18
1.6.1.-Toxicología del mercurio.	18
1.6.2.-Fuentes naturales y antropogénicas del mercurio.	19
1.6.3.-Contaminación por mercurio.	20
1.6.4.-Ciclo global del mercurio.	20
1.6.5.-Ciclo local del mercurio.	21
1.7.-Bioindicadores, bioensayos y biomarcadores.	23
1.8.-Biología del (<i>Danio rerio</i> , Halminton, 1822).	24
1.8.1.-Características generales.	24
1.8.2.-Desarrollo embrionario.	24
1.8.3.-Importancia del <i>Danio rerio</i> en la ecotoxicología	31
2.- Objetivos	31
2.1.-Objetivo general.	31
2.2.-Objetivo particulares.	31
3.- Justificación	34

	Pág.
4.-Procedimiento experimental	35
4.1.-Aislamiento y selección de peces.	35
4.2.-Mantenimiento de los lotes experimentales.	37
4.3.-Lotes reproductivos.	39
4.4.-Índices de fertilidad y viabilidad (ovoposición, eclosión y sobrevivencia de alevines).	40
4.5.-Efectos teratogénicos de la temperatura en el desarrollo embrionario del <i>Danio rerio</i> .	41
4.6. Determinación del efecto de los cambios de temperatura durante el desarrollo embrionario del <i>Danio rerio</i> , sobre la teratogenicidad del cloruro de mercurio (HgCl ₂)	42
4.7.-Análisis estadísticos.	43
5.-Resultados	45
5.1 Índices de fertilidad y viabilidad (eclosión de alevines y sobrevivencia de juveniles).	45
5.2.-Evaluación del potencial teratogénico de los cambios de temperatura durante el desarrollo embrionario del <i>Danio rerio</i> .	47
5.3.-Efecto de los cambios de temperatura sobre la teratogenicidad del cloruro de mercurio (HgCl ₂) durante el desarrollo embrionario del <i>Danio rerio</i> , a través de la inducción de malformaciones en columna vertebral.	48
6.-Discusión	56
7.-Conclusión	59
8.-Bibliografía	61

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1- Estudio multidisciplinario de la ecotoxicología (Medina y Encina, 2000)	8
Figura 2- Relación entre riesgo y toxicidad (Weil, 1975)..	9
Figura 3- Relación interdisciplinaria para la evaluación de riesgo (Bristol <i>et al.</i> , 1984).	11
Figura 4- Relación entre agente químico, exposición y posibles daños ocasionados (Vega, 1990 a y b).	13
Figura 5- Fuentes antropogénicas del mercurio (Albert, 1998)	19
Figura 6- Ciclo global del mercurio (Albert, 1998 y Figueroa, 1998).	21
Figura 7- Ciclo local del mercurio (Albert, 1998 y Figueroa, 1998).	22
Figura 8- <i>Danio rerio</i> en el laboratorio.	24
Figura 9- Primer periodo del desarrollo embrionario del <i>Danio rerio</i> modificado de Kimmel <i>et al.</i> , (1995).	27
Figura 10- Segundo periodo del desarrollo embrionario del <i>Danio rerio</i> modificado de Kimmel <i>et al.</i> , (1995).	28
Figura 11- Tercer periodo del desarrollo embrionario del <i>Danio rerio</i> modificado de Kimmel <i>et al.</i> , (1995).	29
Figura 12- Cuarto periodo del desarrollo embrionario del <i>Danio rerio</i> modificado de Kimmel <i>et al.</i> , (1995).	30
Figura 13- Quinto periodo del desarrollo embrionario del <i>Danio rerio</i> modificado de Kimmel <i>et al.</i> , (1995).	30
Figura 14- Sexto periodo del desarrollo embrionario del <i>Danio rerio</i> modificado de Kimmel <i>et al.</i> , (1995).	31
Figura 15- Séptimo periodo del desarrollo embrionario del <i>Danio rerio</i> modificado de Kimmel <i>et al.</i> , (1995).	32
Figura 16- Lote experimental del <i>Danio rerio</i> en laboratorio.	36
Figura 17- Dimorfismo sexual del <i>Danio rerio</i> .	36
Figura 18- Pecera con el lote de reproducción del <i>Danio rerio</i> .	39
Figura 19- Frascos de vidrio de 100 ml con embriones del <i>Danio rerio</i> en agua en reposo.	40
Figura 20- Frascos de vidrio de 100 ml con embriones del <i>Danio rerio</i> en HgCl ₂ .	43

	Pág.
Figura 21- (a) Huevo del <i>Danio rerio</i> viable y (b) huevo del <i>Danio rerio</i> no viable.	45
Figura 22- Porcentaje de la fertilidad embrionaria, viabilidad de embriones y alevines del <i>Danio rerio</i> a diferentes intervalos de temperatura.	47
Figura 23- División arbitraria del cuerpo del <i>Danio rerio</i> (Rivera, 2006)	48
Figura 24- (a) Alevín normal del <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación sencilla en zona cefálica del alevín de <i>Danio rerio</i> .	51
Figura 25- (a) Alevín normal del <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación doble en zona cefálica y zona media de la columna vertebral del alevín de <i>Danio rerio</i> .	52
Figura 26- (a) Alevín normal del <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación múltiple en zona cefálica, zona media de la columna vertebral y zona caudal del alevín de <i>Danio rerio</i> .	52
Figura 27- (a) Alevín normal del <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación curva en la zona media de la columna vertebral del alevín de <i>Danio rerio</i> .	53
Figura 28- (a) Alevín normal del <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación en zona caudal del alevín de <i>Danio rerio</i> .	54
Figura 29- (a) Alevín normal de <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación en gancho en zona caudal del alevín de <i>Danio rerio</i> .	55
Figura 30- (a) Alevín normal del <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación en espiral en zona caudal del alevín de <i>Danio rerio</i> .	55

Índice de tablas

		Pág.
Tabla I-	Características de los carcinógenos, mutágenos y teratógenos (Vega, 1990b).	15
Tabla II-	Estados del mercurio presentes en la naturaleza (Albert, 1998 y Figueroa, 1998).	22
Tabla III-	Condiciones físicas y químicas recomendadas para el mantenimiento adecuado del <i>Danio rerio</i> (Báez, 2005 y Gonzáles, 2005).	38
Tabla IV-	Fertilidad y viabilidad de embriones y alevines del <i>Danio rerio</i> a diferentes intervalos de temperaturas.	46
Tabla V-	Efecto de los cambios de temperatura sobre la teratogenicidad del cloruro de mercurio (HgCl ₂), durante el desarrollo embrionario del <i>Danio rerio</i> .	50

Resumen

Actualmente la contaminación del agua es un problema muy serio, que requiere de un estudio multidisciplinario de diversas áreas como la ecología, la química y la toxicología entre otras, lo que permite evaluar el origen, concentración, permanencia, cinética, así como sus posibles efectos sobre los organismos y su ambiente “Ecotoxicología”.

Existe evidencia epidemiológica que vincula el aumento de enfermedades (intoxicaciones, malformaciones, etc.), con la exposición a diferentes factores ambientales, encontrándose sustancias con capacidad carcinogénica, mutagénica y/o teratogénica, además de aquellas que tienen un efecto tóxico, sin embargo, es importante mencionar que cada sustancia puede aumentar o disminuir su efecto al interactuar con otras variables como: la temperatura, el pH y la luz, entre otros. Por lo que en el presente trabajo se analizó como influye la temperatura en la teratogenicidad del cloruro de mercurio (HgCl_2), empleando embriones del *Danio rerio*.

La primera etapa consistió en evaluar como influye la temperatura sobre los índices de fertilidad y viabilidad (embrión- alevín y alevín-juvenil), observando que a temperaturas mayores a 29°C, la fertilidad disminuye considerablemente, lo cual también sucede con la viabilidad (embrión- alevín y alevín-juvenil), además de modificar el tiempo de eclosión del alevín de *Danio rerio*, sin registrar ningún tipo de malformación. Por lo se indica que la temperatura no tiene un efecto teratogénico por si sola en la embriogénesis del *Danio rerio*, al menos en los ensayos realizados.

La segunda fase consistió en evaluar como influye la temperatura en la teratogenicidad del HgCl_2 , debido a que ligeras variaciones de esta pueden influir en el metabolismo, longevidad y potencial reproductivo de los organismos. Los resultados obtenidos indican que el intervalo de temperatura ideal para desarrollar la prueba “DarTa” es 27 a 28 °C, y que ligeras variaciones de esta, ($\pm 1^\circ\text{C}$) no influyen en el potencial teratogénico del cloruro de mercurio, lo cual permite tener una metodología flexible al evaluar daño teratogénico inducido por este compuesto presente en el agua.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminación del agua

El rápido incremento de la población, la industrialización urbana y la intensificación de los cultivos, a ocasionado una crisis mundial de este recurso, haciendo responsables a las grandes ciudades como las principales fuentes contaminadoras, debido a que después de utilizarla la eliminan en forma de aguas negras, las cuales después se mezclan con las corrientes naturales hasta llegar a los océanos (GEO, 2000).

En algunos casos se ha demostrado que la introducción de contaminantes está relacionada con la lluvia, la naturaleza geológica de la cuenca y la erosión; esta última arrastra los contaminantes hasta los cuerpos de agua receptores, también suele suceder que los mantos acuíferos atraviesan zonas donde existen yacimientos de metales o sustancias sulfurosas (contaminación natural), sin embargo, la forma más común de contaminación de los mantos acuíferos ocurre por filtración, a través del suelo, de sustancias provenientes de drenajes sanitarios, o por lixiviados originados en basureros, los cuales además adicionan una elevada cantidad de materia orgánica e inorgánica (Vogel y Rivas, 1997).

Otra forma de contaminación de los mantos acuíferos es la ocasionada por microorganismos como: bacterias, y protozoos (biológica), los cuales pueden causar algunas enfermedades como: tifoidea, cólera, disentería, hepatitis infecciosa, o amibiasis, entre otras, haciendo que cada día mueran a nivel mundial, cerca de 25000 personas como resultado de una pobre calidad del agua (Espinosa *et al.*, 1998).

1.2. Importancia de la ecotoxicología

Con base a lo anterior, en los últimos años se ha desarrollado la **ecotoxicología**, la cual se enfoca al estudio multidisciplinario del origen, distribución y efectos de un agente contaminante sobre los organismos vivos,

sus poblaciones y sus comunidades (Larrain, 1995; Jorgensen, 1998 y Woolley, 2003). empleando métodos toxicológicos, químicos y ecológicos para describir la interacción entre agentes contaminantes, organismos y ecosistemas (Fig. 1).

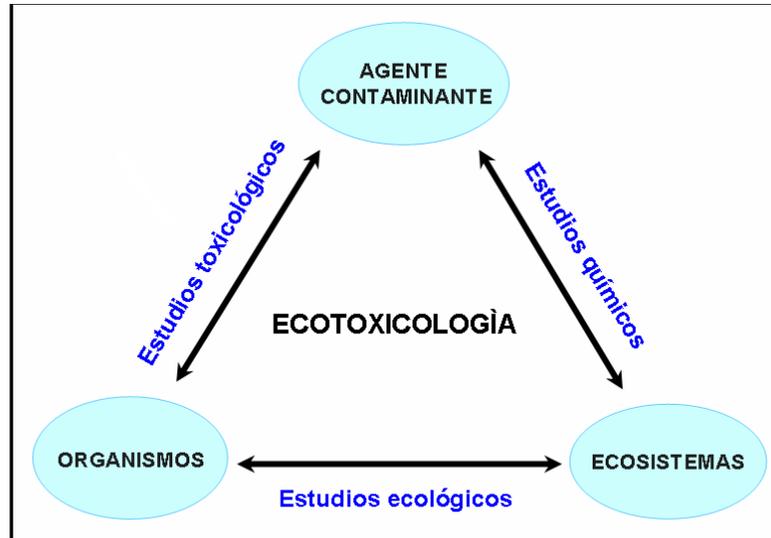


Figura 1.-Estudio multidisciplinario de la ecotoxicología (Medina y Encina, 2000).

La ecotoxicología no solo se dedica a la caracterización del agente contaminante sino también a la identificación de su origen, su concentración, su cinética y sus consecuencias tanto a nivel individual como ecológico (Vera *et al.*, 2001).

1.2.1 Evaluación de riesgo

Con el fin de evitar una crisis del ambiente es necesario establecer metodologías lo suficientemente sensibles para evaluar el “riesgo” que conlleva el empleo de agentes contaminantes, esto con el fin de impedir que se produzcan nuevos cambios que puedan dañar los ecosistemas (Martines, 1996).

En 1978 la organización mundial de la salud (OMS), definió “riesgo” como un concepto estadístico, diciendo que es la frecuencia esperada de un efecto nocivo producido por la exposición a un agente, mas adelante en el año 1983 Rodrick y Taylor, definen “evaluación de riesgo” como el proceso científico mediante el cual son identificadas y evaluadas las propiedades toxicas de una sustancia; sin embargo, debe tomarse en cuenta que la toxicidad de una sustancia esta relacionada con la vía de introducción al organismo, sus propiedades individuales y la dosis (Fig. 2), por lo tanto, el riesgo depende de cómo se usa, manipula y fabrica una sustancia (Weil, 1975).

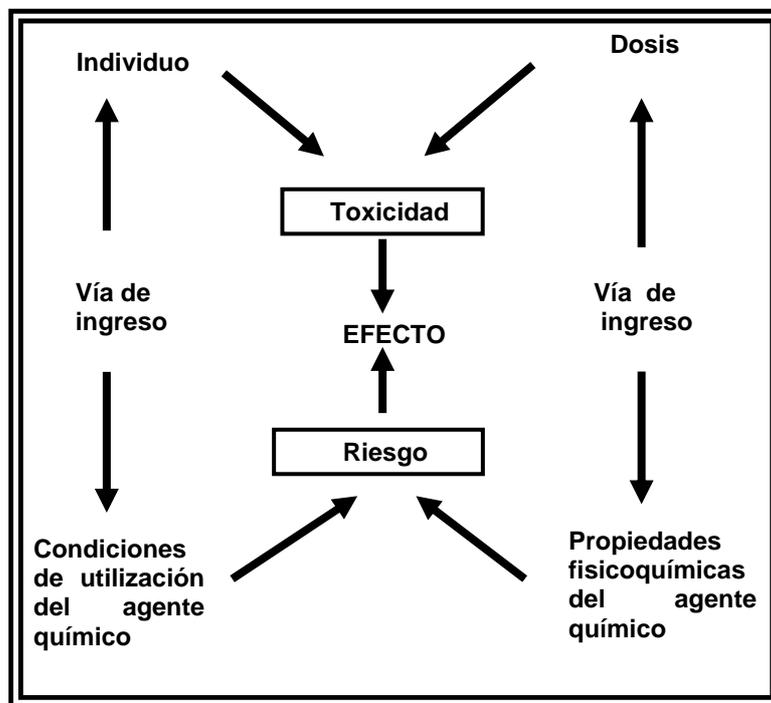


Figura 2.- Relación entre riesgo y toxicidad (Weil, 1975).

La evaluación de riesgo, se basa en hechos verdaderos, los cuales definen los efectos ocasionados en la salud de los organismos o materiales expuestos a situaciones o sustancias peligrosas. Esta metodología hace un análisis rutinario de tejidos humanos o excretas para evidenciar directamente o indirectamente la exposición a sustancias químicas (Almeida, 1992 y Fernícola, 1992a).

La evaluación de riesgo se basa en cuatro pasos que tratan de identificar las relaciones existentes entre agentes peligrosos, individuos o poblaciones expuestas, dosis, concentración, tiempo, biodisponibilidad, susceptibilidad biológica y daño biológico:

1. Identificación del peligro

Proceso mediante el cual se determina si la exposición a un agente puede producir un aumento en la incidencia de un efecto, el principal objetivo de esta fase es demostrar que el agente induce un efecto adverso en la salud.

2. Evaluación dosis-respuesta

Proceso que caracteriza la relación entre la dosis administrada de un agente químico y la incidencia de efecto adverso en la población expuesta. En este proceso se considera la intensidad de la exposición, la época de la exposición, sexo, estilo de vida, metabolismo y otros factores que pueden afectar la respuesta.

3. Evaluación de la exposición

Es el proceso de medida o estimación de la intensidad, frecuencia y duración de la exposición a un agente presente en el medio ambiente.

4. Identificación del riesgo

Es el proceso de estimar la incidencia de los efectos sobre la salud bajo varias condiciones de exposición (NCR, 1983).

Bristol *et al.*, (1984) menciona que la evaluación de riesgo requiere del conocimiento de las distintas fases del estudio toxicológico, el cual se divide en: identificación y cuantificación de la exposición, toxicocinética del compuesto y toxodinámica (Fig. 3).

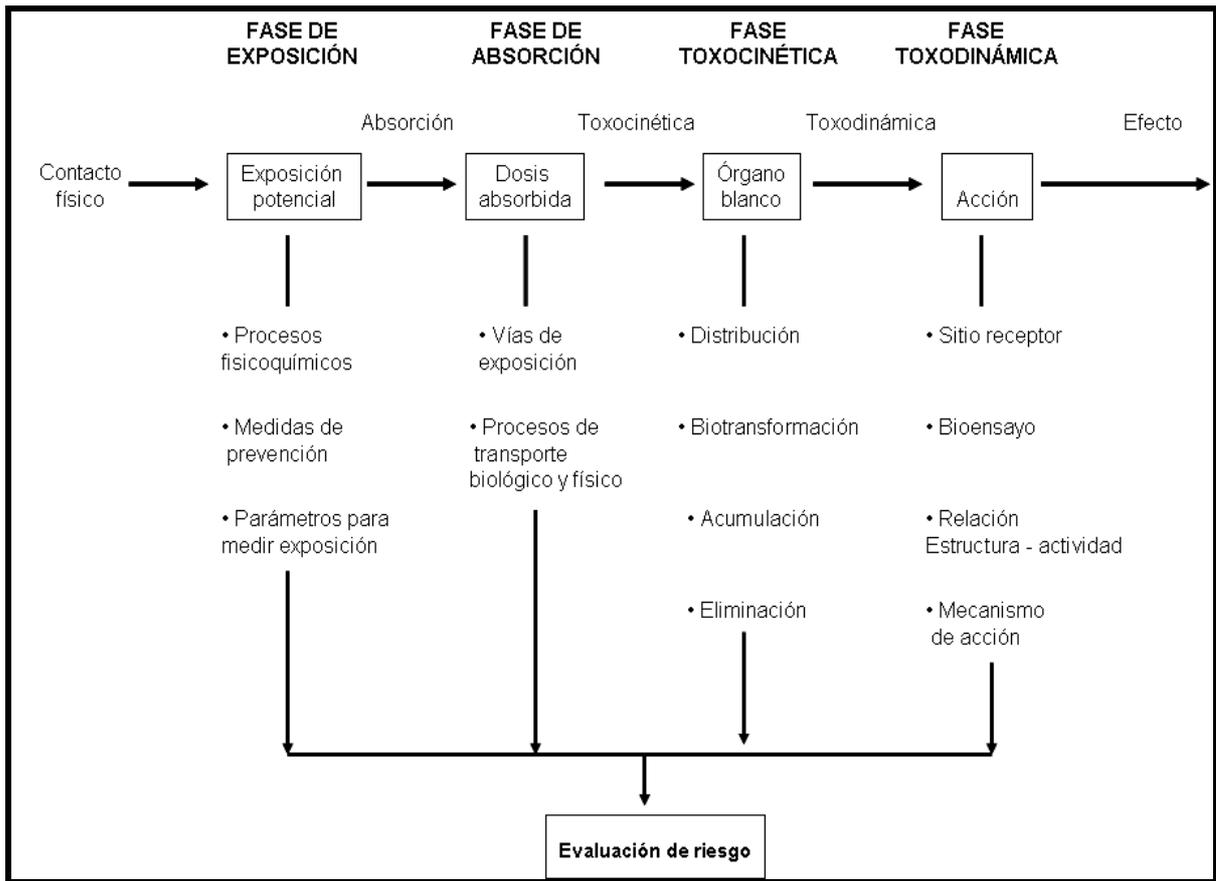


Figura 3.-Relación interdisciplinaria para la evaluación de riesgo
(Bristol *et al.*, 1984).

1.3. Estudios toxicológicos o pruebas de genotóxicidad

1.3.1-Estudios agudos

Las pruebas de corta duración (agudo) son muy empleadas debido a que responden en corto tiempo, según el bioensayo empleado y a la capacidad de una sustancia de ejercer un efecto toxico en un sistema biológico y se miden a través de mortandad (Vega, 1990b), sustentan estudios de exposiciones repetidas o accidental (crónicas), además de que permiten identificar las manifestaciones clínicas y patológicas asociadas, así como la concentración letal cincuenta (CL₅₀), empleada para estudios crónicos o subcrónicos posteriores (PNUMA y OMS, 1980; Vettorazzi, 1992 y Moreira, 1995).

1.3.2. Estudios crónicos

Los estudios de larga duración (crónicos), permiten evaluar efectos carcinogénicos y teratogénicos de algunas sustancias, en lapsos de tiempo que van de meses hasta años, según el bioensayo empleado, se llevan a cabo principalmente *in vivo* (Medina y Encina, 2003). Ayudan a localizar y caracterizar los efectos tóxicos que se manifiestan después de una exposición prolongada, en particular aquellas que son irreversibles y progresivas, además permiten determinar órganos con mayor susceptibilidad (órganos–blanco) o con mayor afinidad (órgano–afín), así como la relación dosis–respuesta según el bioensayo empleado (Vega, 1990b). En estos estudios son de particular importancia las sustancias químicas que tienen tendencia a persistir o concentrarse en el organismo y/o en el ambiente, dando como resultado efectos desde el nivel individual hasta el poblacional (PNUMA y OMS, 1980 y Vettorazzi, 1992).

1.4. Carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis

Actualmente existen suficientes evidencias epidemiológicas, que vincula el aumento en la frecuencia de enfermedades y malformaciones congénitas con la exposición a diferentes factores ambientales (Fig.4), entre estos, se han considerado sustancias con capacidad carcinogénica, mutagénica y/o teratogénica, además de aquellas que tienen un efecto tóxico (Vega, 1990 a y b y Albert, 1998).

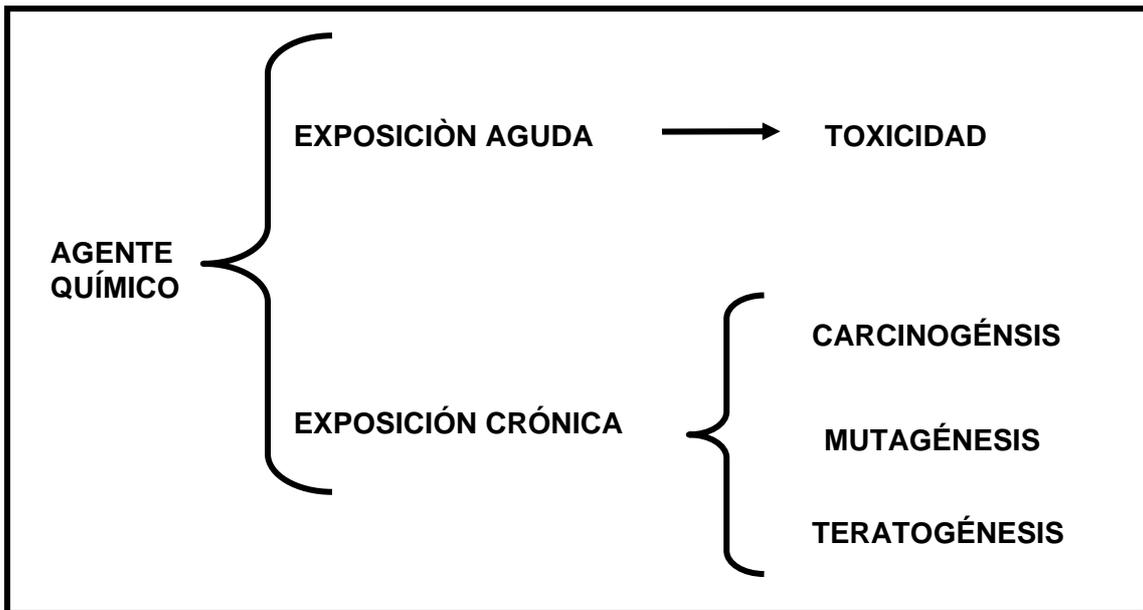


Figura 4.-Relación entre agente químico, exposición y posibles daños (Vega, 1990 a yb).

El cáncer es una de las causas más importantes de mortalidad en el mundo, recientes estudios revelan que algunos factores ambientales tienen un efecto directo en la incidencia de cáncer en el hombre; por ejemplo, los tumores de la vejiga urinaria están relacionados con trabajadores expuestos a aminas aromáticas, el cáncer de pulmón esta relacionado con trabajadores expuestos a éter diclorometílico, así como por los casos de cáncer de pulmón, relacionados con el habito de fumar cigarrillos (PNUMA y OMS, 1980 y Woolley, 2003). Los procesos cancerígenos contemplan la conversión de células normales en células malignas, con alteraciones bioquímicas, estructurales, y con una capacidad indefinida de crecimiento (metástasis), con frecuencia este proceso con lleva a un desenlace fatal para el portador del conjunto de células alteradas denominada neoplasia (Cortinas, 1985; Vega 1990 a y b y Albert. 1998).

Resultados obtenidos de estudios experimentales de carcinogénesis confirman el efecto directo de algunas sustancias químicas con estos procesos; sin embargo, no existe una correlación directa entre toxicidad aguda y carcinogenicidad; una sustancia química de alta toxicidad puede no ser potencialmente carcinogénica o presentar una actividad muy reducida; mientras

que, una sustancia química que produce un efecto tóxico muy pequeño o no evidente en experimentos de toxicidad agudos, puede ser un carcinógeno muy potente (PNUMA y OMS, 1980 y Cortinas, 1998).

Actualmente existe evidencia experimental que vincula la actividad carcinogénica de diversas sustancias químicas con la capacidad de ejercer un efecto mutagénico, lo cual ha llevado a postular la relación entre carcinogénesis y mutagénesis (Miller, *et al.*, 1971; Cortinas, 1985; Albert, 1998 y Cortinas, 1998), entendiendo este último, como cualquier mutación o cambio en el material genético, estos cambios pueden afectar generaciones siguientes, siempre y cuando la mutación se presente en el material genético transmitido a los descendientes (Kamrin, 1990); dicha relación hasta ahora se ha limitado a cambios del genotipo que aparecen como consecuencia de cambios estructurales de los ácidos nucleicos, no se ha demostrado que todos los mutágenos químicos sean carcinógenos, sin embargo, se ha comprobado que muchos carcinógenos, varios de los cuales producen cáncer en el hombre, son mutágenos (PNUMA y OMS, 1980), por ejemplo: las mutaciones ionizantes, que son capaces de producir rupturas en la hélice del ADN y se asocian con procesos cancerígenos en diversos órganos; o los rayos ultravioleta que forman dímeros de timina y se asocian con procesos cancerígenos en piel (Albert, 1998).

Kamrin (1990), menciona que un evento mutagénico puede afectar moléculas que son necesarias para la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario e interferir en el correcto desarrollo del producto, ocasionando efectos teratogénicos; los cuales se refieren a los defectos de nacimiento (malformaciones estructurales, alteraciones fisiológicas, entre otras), a menudo como resultado de la exposición a un tóxico durante el embarazo. Estas anomalías pueden pasar por una serie de pasos consecutivos que generalmente culminan con alteraciones en el desarrollo celular y comúnmente con la muerte del embrión o feto.

La teratogénesis es usualmente clasificada como un efecto crónico, a un cuando el toxico aparezca durante periodos relativamente cortos e irrelevantes, comparados con el ciclo de vida del organismo. Sin embargo, los agentes teratogénicos son específicos, a tal grado, que un tipo particular de defecto de nacimiento esta relacionado a la exposición particular de un químico, por otro lado los defectos de nacimiento pueden ser heredables y aparecer en generaciones futuras (Kamrin, 1990).

Tabla I, muestra las principales células blanco de los distintos procesos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos, estableciendo sus principales diferencias en el periodo de susceptibilidad, tiempo de exposición, lo cual permite establecer las diferencias entre cada uno de estos procesos y por lo tanto entre los agentes potencialmente peligrosos.

Tabla I.-Características toxicologicas de los carcinógenos, mutágenos y teratógenos (Vega, 1990b).

Agente	Células blanco	Periodo susceptible a la exposición	Duración de la exposición y dosis
Carcinógeno	Somáticas	Todos los estadios del ciclo celular	Crónica, todas las dosis
Mutágenos	Germinales	Todos los estados de la gametogénesis	Aguda o crónica, todas las dosis
Teratógeno	Tejidos inmaduros	Organogénesis	Aguda, todas las dosis

Como ya se menciona anteriormente las alteraciones que ocurren durante el desarrollo embrionario se denominan efectos teratogénicos, según Vega (1990 b) sus efectos actúan principalmente durante tres etapas bien diferenciadas de la embriogénesis en humanos:

- a) Etapa de fertilización e implantación: En esta etapa se inicia la diferenciación celular, si un agente actúa en este momento se puede provocar un daño masivo que se evidencia como un aborto espontáneo.
- b) Etapa de desarrollo embrionario: En esta etapa abarca la diferenciación celular y organogénesis, se ha demostrado experimentalmente que esta etapa, es la más sensible a la acción de los teratógenos, sin afectar la viabilidad.
- c) Etapa del desarrollo fetal: Esta etapa comprende la fase final del desarrollo, si un agente ocasiona algún daño, puede no ser evidente, salvo la reducción de tamaño y del número de células, sin embargo, el toxico puede provocar alteraciones bioquímicas y genéticas que más adelante se pueden evidenciar.

1.5. Importancia de la temperatura en estudios de toxicidad acuática.

El cambio climático es un problema mundial, resultado de adición de agentes contaminantes a la atmósfera, los cuales han modificando su composición química, ocasionando que la temperatura de la superficie terrestre se modifique constantemente (1-2°C anualmente), causando que el nivel del mar aumente gradualmente debido al descongelamiento de los polos, así como el cambio en las corrientes de los océanos (Molina, 1999).

Las variaciones actuales en las temperaturas ambientales pueden influir en la permanencia y movilidad de un agente químico en el ambiente, así como en el deterioro de la salud y/o en una mayor susceptibilidad y resistencia a infecciones; además de variación en las respuestas fisiológicas por la acción de sustancias químicas tóxicas. Por lo tanto la absorción, distribución, transformación metabólica, excreción y reactividad con sitios receptores dependen de diversas reacciones termodependientes, por lo que cabria esperar que la toxicidad, teratogénicidad, carcinogénicidad y genotóxicidad de algunas sustancias se vea fácilmente influida por los cambios de temperatura (PNUMA y OMS, 1980).

Los ensayos de toxicidad acuática realizados a temperaturas superiores a 30 °C, pueden ocasionar que la temperatura tenga efectos semejantes a los producidos por agentes físicos o químicos. Por lo tanto las fluctuaciones en la temperatura puede dar lugar a cambios funcionales y estructurales por si solos, lo que podría atribuirse erróneamente a la acción de algún otro agente extresor. Por otra parte la temperatura también puede favorecer (sinérgicos) o inhibir (antagónicos) los efectos propios de agentes químicos y físicos, afectando su potencial toxico, teratogénico, carcinogénico y/o genotóxico, así como a su absorción, metabolismo y excreción, por lo que la combinación de múltiples variables puede dar lugar a una amplia gama de respuestas biológicas (PNUMA y OMS, 1980).

La temperatura es una variable en el agua, por lo que es muy importante su control en procesos experimentales en sistemas acuáticos; en los sistemas vivos los limites de tolerancia y funcionabilidad son demasiado estrechos, por lo tanto la temperatura debe mantenerse constante en todo tipo de pruebas de toxicidad acuática, debido a que ligeras variaciones en la misma, pueden provocar que se presenten diferencias fisiológicas dando como resultado una evaluación errónea (Muñoz, 1996).

Fry (1960) y Lloyd (1980), emplearon peces salmónidos para evaluar el efecto de la temperatura en la toxicidad del zinc, se mostró que a temperaturas mayores a 19°C, aumenta la disolución de este elemento, influyendo directamente en su efecto tóxico y afectando principalmente las branquias de los peces; sin embargo, estos peces son capaces de acelerar su metabolismo y de esta forma ser mas tolerantes a la acción tóxica del zinc, evidenciándose lo anterior en la disminución de la mortandad de los peces. En contraste, los peces que fueron expuestos a rangos de temperatura menores a 19°C y se observo un incremento en el porcentaje de mortandad, debido a que al bajar la temperatura, el zinc se bioacumula en el agua afectando severamente las branquias de los peces, ocasionando su muerte, lo que permitió concluir que la temperatura afecta la solubilidad, transporte y bioacumulación del zinc, influyendo directamente sobre su potencial tóxico.

1.6. Toxicología de los metales pesados

Comprende más de 40 elementos químicos, entre los más importantes por sus propiedades toxicológicas se encuentran: aluminio, arsénico, cobre, cromo, mercurio, plomo, entre otros. La toxicidad de estos metales tiene características comunes a todos ellos y efectos específicos de cada uno. La mayoría de estos metales tienen la capacidad de combinarse con una gran variedad de moléculas orgánicas, especialmente con los grupos sulfhidrilos (-SH) de las proteínas. Estos, al unirse producen la inhibición de numerosas enzimas del organismo. El transporte de estos metales a través de las membranas celulares difiere según las características del compuesto metálico y del tejido (Vega, 1985).

1.6.1. Toxicología del mercurio

Los efectos tóxicos del mercurio se remontan desde la edad media, cuando los escritores empleaban este elemento como pigmento para la ilustración de textos o en el caso de los sombrereros, quienes de igual forma utilizaban este metal desde inicios del siglo XVI hasta comienzos del siglo XX para la fabricación de terciopelo a partir de pelo de conejo (Doadrio, 2004). La mayor preocupación por sus efectos fue hasta este siglo (XXI), a mediados de los cincuenta, después del accidente ocurrido en la bahía de Minamata, Japón, en el que cientos de personas sufrieron daños irreversibles ocasionados por la ingestión de derivados de mercurio (Vega, 1990 b y Figueroa, 1998). En esta bahía una industria descargaba cloruro de mercurio al agua, el cual se metila por acción de microorganismos acuáticos; dando como resultado metilmercurio el cual es absorbido por la flora y fauna acuática, donde a su vez se bioconcentra; la intoxicación ocurrió cuando la población consumió pescado que contenía grandes cantidades de metilmercurio; Las autopsias hechas en personas y animales intoxicados mostraron como principal daño la destrucción masiva del cerebelo, de la corteza calcárina y de los ganglios basales cerebrales. Por otra parte, los niños que estuvieron expuestos al metilmercurio durante su desarrollo fetal nacieron con síndrome de parálisis cerebral (Vega, 1985).

1.6.2. Fuentes naturales y antropogénicas del mercurio

Las fuentes naturales del mercurio son el vulcanismo, la desgasificación de la corteza terrestre, la erosión y la disolución de los minerales de las rocas.

La principal fuente antropogénica del mercurio es la minería, seguido por su uso industrial y por último su empleo en la agricultura. La minería contribuye con el 50 % y el resto proviene de actividades industriales (Fig. 5) como: elaboración de instrumentos científicos (termómetros y barómetros), equipo eléctrico (medidores, interruptores, baterías), tubos de rayos X, seda artificial, válvulas de radio, soldaduras de plomo y estaño, en la industria química se utiliza como cátodo líquido para la producción de sosa cáustica, ácido clorhídrico y acético; curtiduría, elaboración de fieltro, fotografía, fotograbado y en la elaboración de pinturas y pigmentos, así como en la industria farmacéutica. En el caso de la agricultura este se emplea en distintos fungicidas y plaguicidas usados para el mejoramiento de granos y semillas (Albert, 1998 y Figueroa, 1998).

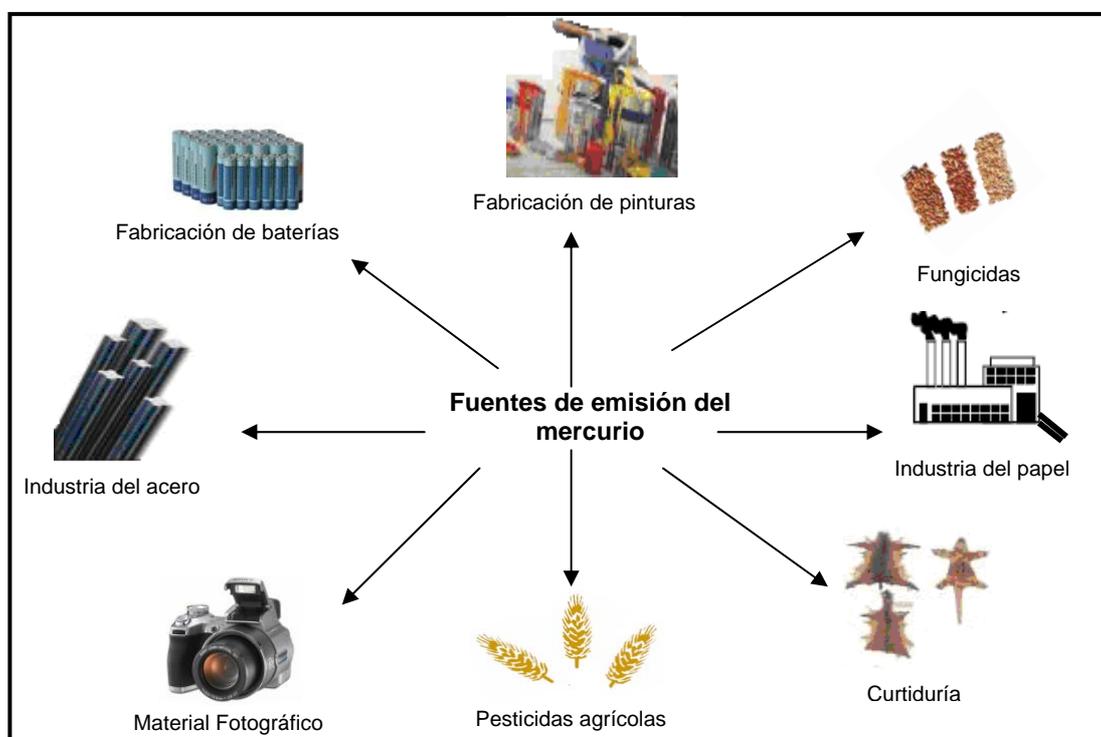


Figura 5.-Fuentes antropogénicas del mercurio (Albert, 1998).

1.6.3. Contaminación por mercurio

La contaminación del aire por mercurio proviene principalmente de industrias vinculadas con su extracción e industrialización, así como de la aplicación en fungicidas mercuriales, al igual que con procesos de combustión de hidrocarburos, en la fabricación de cemento y fosfatos.

En relación a la contaminación de ríos, lagos y bahías por este elemento, esta se ha atribuido a la descarga de efluentes industriales, mientras que para el suelo, se ha asociado al empleo de compuestos mercuriales como pesticidas en el tratamiento de semillas y plantas “ej. etilmercurio y metilmercurio” (Albert, 1998; Figueroa, 1998 y Doadrio, 2004).

1.6.4. Ciclo global del mercurio

El ciclo global del mercurio (Fig. 6) se define, como la distribución de un elemento alrededor del mundo, en el caso particular del mercurio, depende de la circulación atmosférica de los vapores del ión mercurio metálico, provenientes de la actividad volcánica y del proceso de desgasificación del mercurio metal, además de diversas actividades antropogénicas y naturales. Estos vapores circulan a partir de los continentes hasta llegar a los océanos, durante este ciclo, los gases suben por evaporación y caen en forma de lluvia (Albert, 1998 y Doadrio, 2004).

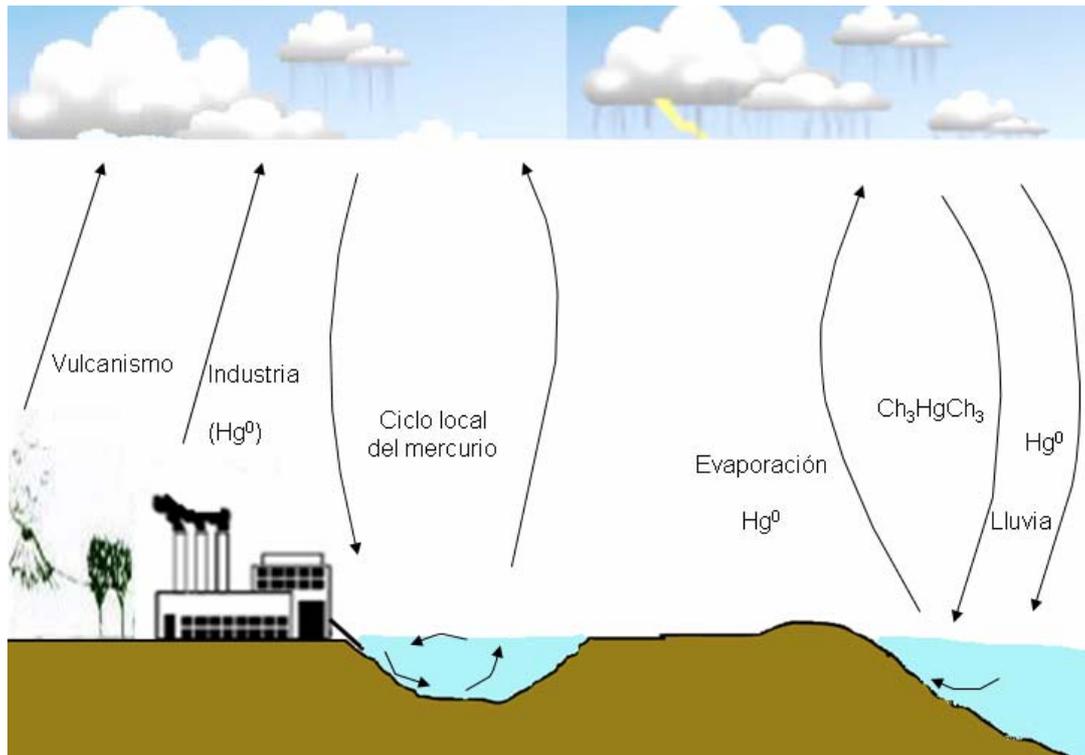


Figura 6.- Ciclo global del Mercurio (Albert, 1998 y Figueroa, 1998).

1.6.5. Ciclo local de mercurio

El ciclo local de un elemento abarca toda la cinética ambiental en periodos cortos de distancia, y en el caso particular del mercurio, este compuesto, es liberado en sus diferentes estados físico o químico (Tabla II), principalmente por el ser humano, y puede entrar en un ciclo atmosférico, debido a los vertidos industriales atmosféricos o por la combustión de carbones, desde donde se introduce al ciclo del agua y a las cadenas tróficas, una vez que ingreso al agua y en presencia de oxígeno, casi todas las formas de mercurio incluso la metálica, se pueden oxidar u ionizar, una vez ionizado el mercurio forma una gran cantidad de compuestos, por otra parte en ambiente anoxigenicos, el Hg^{2+} se puede reducir para dar mercurio metálico (Hg^0), reacción que llevan acabo bacterias del genero *Pseudomonas*. Además, de manera secundaria puede ocurrir otra reacción en aguas continentales o en litorales, donde el Hg^{2+} se puede transformar en CH_3Hg^{1+} (metilmercurio) y $CH_3-Hg-CH_3$ (dimetilmercurio), tal reacción se lleva acabo por dos vías, una aerobia y otra anaerobia, ambas de manera natural no inducida (Fig. 7), (Albert, 1998 y Figueroa, 1998).

Tabla II.- Estados del mercurio presentes en la naturaleza
(Albert, 1998 y Figueroa, 1998).

Mercurio elemental	Hg^0	Mercurio metálico
Compuestos inorgánicos	Hg^{1+} Hg^{2+}	Estados iónicos del mercurio
Compuestos orgánicos	CH_3Hg^{1+} CH_3HgCH_3	Metilmercurio Dimetilmercurio

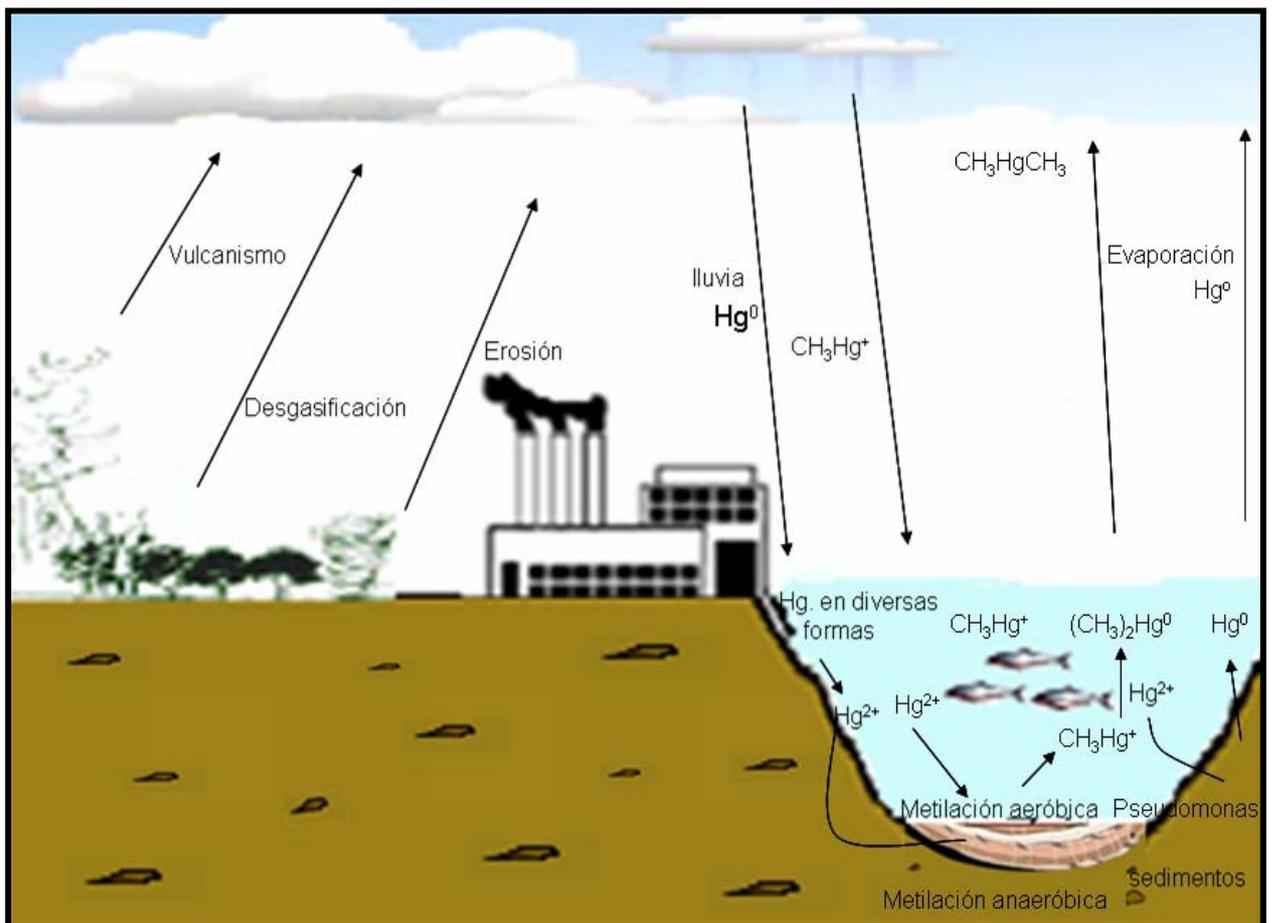


Figura 7.- Ciclo local del mercurio (Albert, 1998 y Figueroa, 1998).

1.7. Bioindicadores, bioensayos y biomarcadores

Los ecosistemas actuales están expuestos a una gran cantidad de estresores ambientales, lo cual ha llevado a una calidad ambiental cada vez más decadente; mediante el empleo de bioindicadores o indicadores biológicos se puede medir y/o cuantificar la presencia de diversos tóxicos en un ambiente específico. Su empleo en diferentes países está enfocado no solo para medir la salud de un ecosistema característico, sino también para determinar el impacto en el ámbito de la salud humana, por lo tanto, un indicador es un organismo selecto por el grado de sensibilidad o tolerancia a diversos tipos de contaminantes y sus efectos (Fernícola, 1992b y de la Lanza, 2000).

El uso de organismos en condiciones controladas *in vivo* o *in vitro* (bioensayos), ofrece múltiples ventajas, como: pueden manifestar propiedades adversas de una droga o sus metabolitos, en varios sistemas biológicos, dar respuestas moleculares, bioquímicas y fisiológicas que produce la presencia de un agente contaminante presente en un organismo determinado y la extrapolación de los resultados puede ser llevada al ser humano (Moreira, 1995 y Matínes, 1996). Estos organismos van desde los más simples hasta los más cercanos en la escala evolutiva al ser humano (Gaytán, 1993). En el caso de bioensayos con organismos acuáticos, estos ofrecen la única forma de determinar el grado de toxicidad de efluentes y agentes químicos aislados (Olvera, 1998).

Mediante el uso de más y mejores bioensayos se pueden proponer nuevos biomarcadores; entre los más empleados se encuentran: ácidos nucleicos, proteínas (enzimas), organelos, células, tejidos y órganos (Medina y Encina, 2003)

Butterworth (1995), indica al respecto que los bioindicadores, bioensayos y biomarcadores para ser eficaces deben cumplir con varias características como: ser altamente sensibles, poco costosos, capaces de evaluar mezclas complejas, así como diferentes ambientes (agua, aire y suelo), además de dar resultados a corto tiempo.

1.8. Biología del pez cebra (*Danio rerio*, Halminton, 1822).

1.8.1. Características generales

El pez cebra es un ciprínido tropical dulceacuícola, su morfología es fusiforme y alargada, su cuerpo es dorado o plateado presentando de cinco o nueve bandas de color azul oscuro, las cuales corren longitudinalmente sobre los costados de su cuerpo y su talla no excede los 5 cm (Fig. 8), permitiendo tener hasta 30 individuos en una pecera pequeña de 30 l (Rivera, 2006).

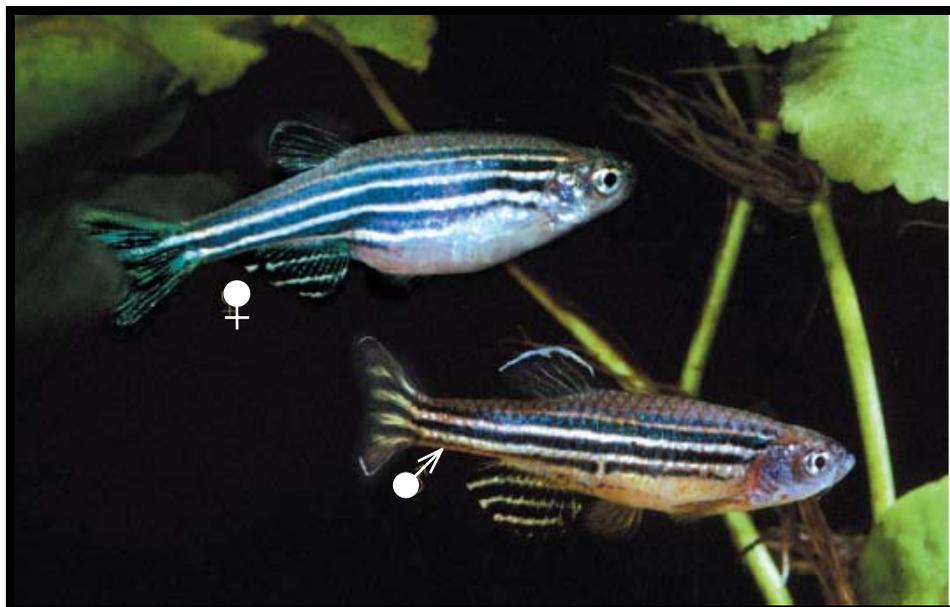


Figura 8.-*Danio rerio* en el laboratorio.

1.8 2. Desarrollo embrionario

Dentro de sus ventajas como bioindicadores se tiene que presentan un corto tiempo entre generaciones, gran producción de huevos, el embrión se desarrolla fuera de la madre, embriones transparentes, lo cual permite accesibilidad a todos los estados del desarrollo, no requiere de grandes instalaciones y su costo por mantenimiento es muy bajo (Tawil-Abadi y Ortiz, 2004). La embriogénesis del *Danio rerio* se conforma de siete periodos (cigoto,

hendidura, blástula, gástrula, segmentación, faríngula y eclosión), bien diferenciados y establecidos que se describen a continuación (Kimmel *et al.*, 1995).

Primer Periodo: Inicia minutos después de que el huevo ha sido fertilizado hasta el estadio de esfera (4 hrs), este periodo se caracteriza por la proliferación celular en el polo animal (Fig. 9)

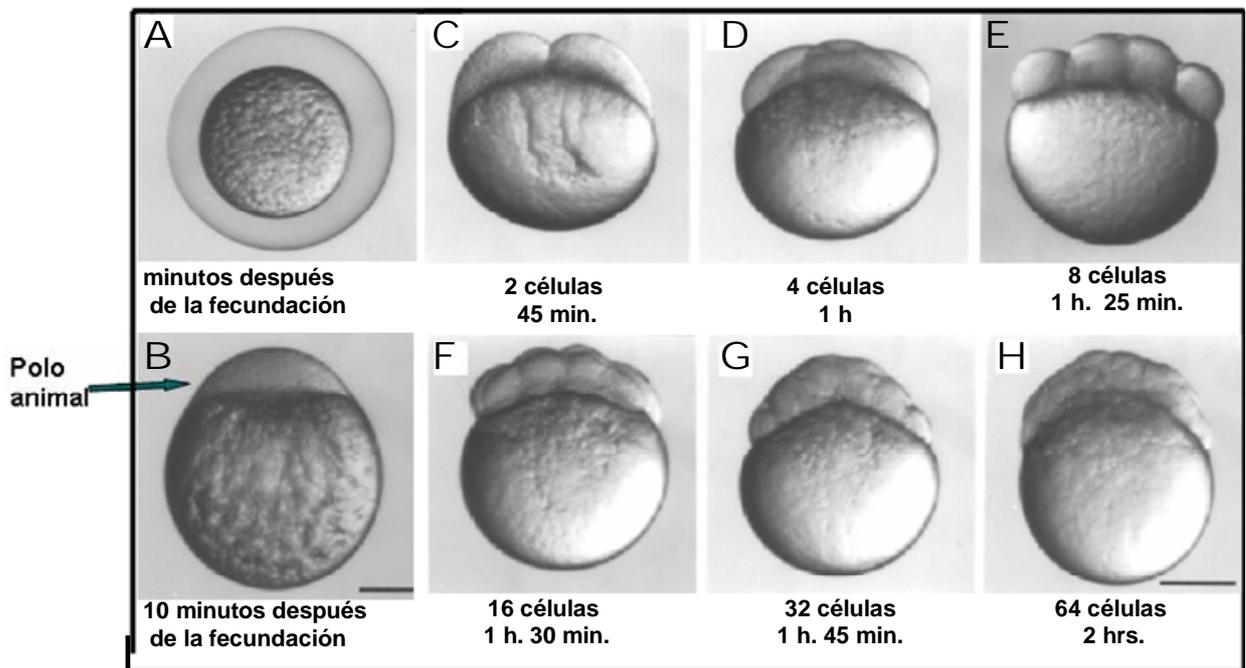


Figura 9.- Primer periodo del desarrollo embrionario del *Danio rerio*, modificado de Kimmel *et al.*, (1995)

Segundo Periodo: Inicia cuando las células se encuentran en el polo animal formando una bóveda (estadio de domo 4 hrs), hasta el estadio de escudo (6 hrs). Durante este periodo se observa la migración celular del polo animal hacia los lados del huevo, adelgazándose ligeramente la parte central y ensanchándose los lados (Fig. 10).

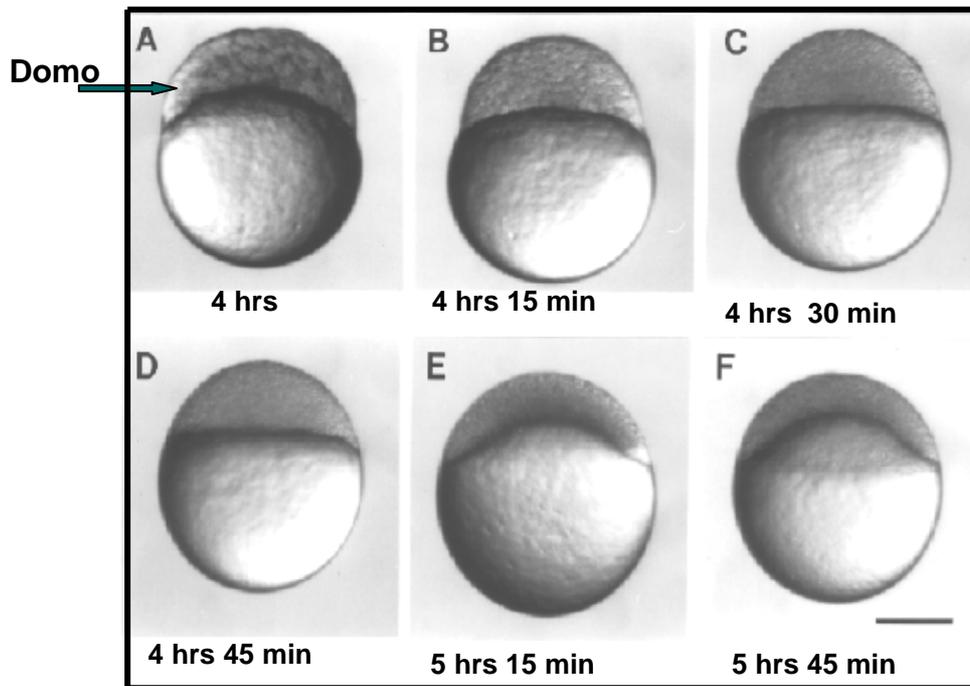


Figura 10.- Segundo periodo del desarrollo embrionario del *Danio rerio*, modificado de Kimmel *et al.*, (1995).

Tercer periodo: Inicia con el 70% del estadio de epibolia, hasta el estadio que presenta dos somitas (estructuras redondeadas que derivan del mesodermo y a partir de las cuales se forma la mayor parte del esqueleto). Comprende la parte final de la etapa de gastrulación y el principio de la etapa en la que el organismo empieza a adquirir forma. Durante este periodo el embrión comienza a adquirir una forma ovalada, existiendo distinción morfológica entre cabeza y cola (Fig. 11).

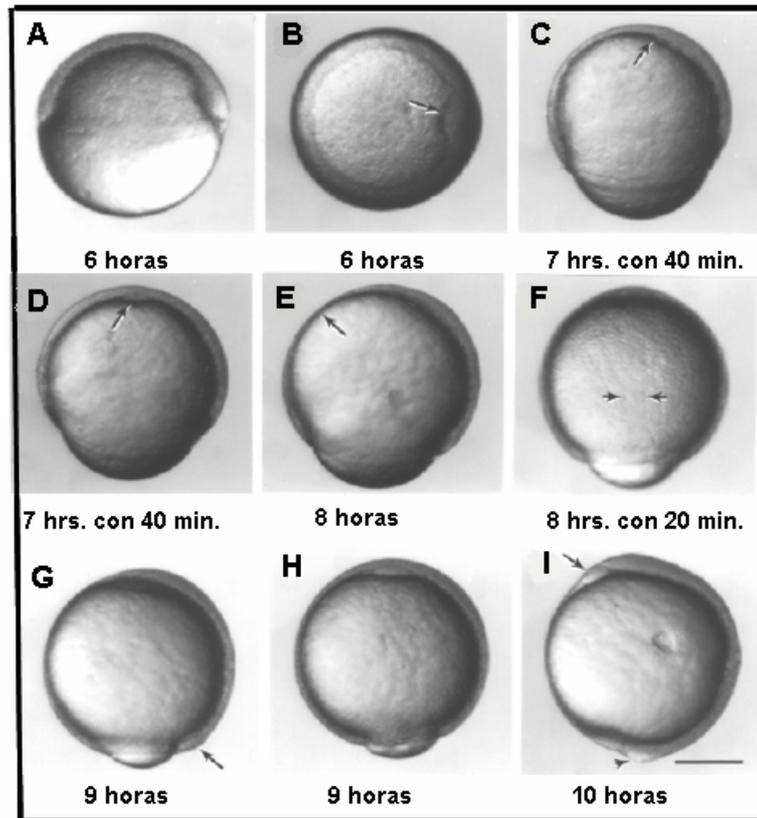


Figura 11.- Tercer periodo del desarrollo embrionario del *Danio rerio*, modificado de Kimmel *et al.*, (1995).

Cuarto periodo: Inicia con el estadio que presenta cuatro somitas (11 hrs 18 min) hasta que el organismo presenta 15 somitas (16 hrs 30 min). Durante este periodo se puede observar la cabeza, así como el número de somitas y el vitelo. Por otra parte el embrión cambia de una forma esférica a una forma arriñonada, debido a la fuerza que ejerce la cola al crecer (Fig. 12).

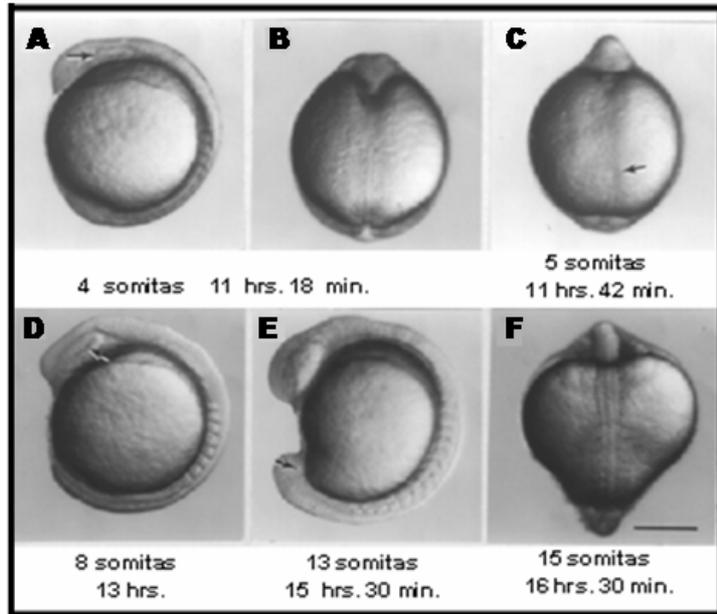


Figura 12.- Cuarto periodo del desarrollo embrionario del *Danio rerio*, modificado de Kimmel *et al.*, (1995).

Quinto periodo: Inicia con el estadio de 17 somitas (17 hrs 30 min) hasta el estadio de 25 somitas (21 hrs 30 min). Comprende la parte final de la etapa de formación. Durante este periodo la cola se desprende del vitelo y se alarga permitiendo observar el esqueleto (columna vertebral). Además en la región anterior se observa un ensanchamiento debido a la formación del sistema nervioso central de la porción cefálica (Fig. 13).



Figura 13.- Quinto periodo del desarrollo embrionario del *Danio rerio*, modificado de Kimmel *et al.*, (1995).

Sexto periodo: Inicia desde las 24 hrs hasta las 42 hrs. Durante este periodo se forma completamente el aparato digestivo, inicia la melanogénesis, la cual comienza de la zona cefálica hasta la zona caudal, comienza a separarse cada vez más del vitelo por que el cráneo se aprecia mejor, y en la parte posterior se distingue claramente la aleta caudal (Fig. 14).

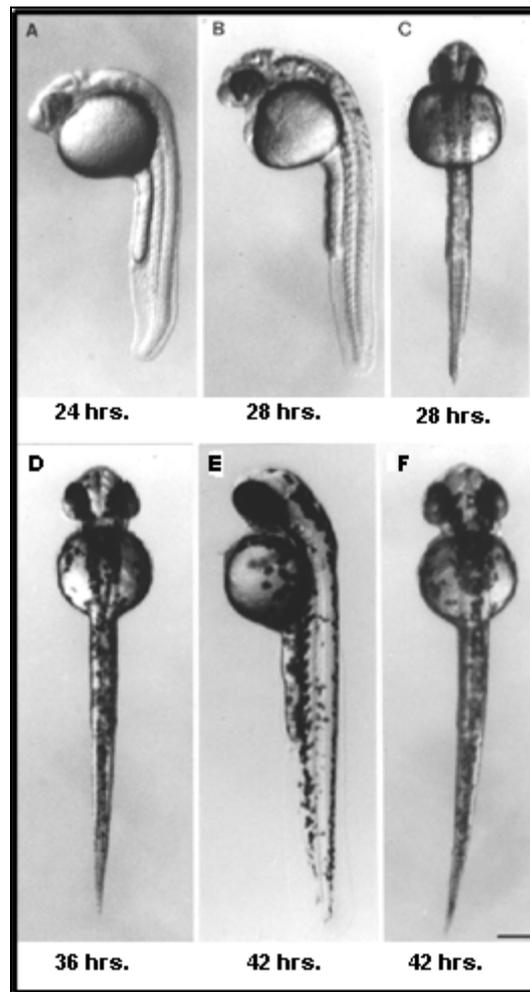


Figura 14.-Sexto periodo del desarrollo embrionario del *Danio rerio*, modificado de Kimmel *et al.*, (1995).

Séptimo periodo: Inicia desde las 48 hrs hasta que se tiene un estadio larval temprano. Este periodo se caracteriza por la eclosión; el vitelo se consume hasta desaparecer por completo, la mandíbula se forma a las 72 hrs y el ojo toma la apariencia de un ojo típico de pez, con los bordes brillosos, ya que anteriormente se encontraba completamente pigmentado, las aletas pélvicas y pectorales inician su desarrollo (Fig. 15).



Figura 15.-Séptimo periodo del desarrollo embrionario del *Danio rerio*, modificado de Kimmel_ *et al.*, (1995).

1.8. Importancia del *Danio rerio* en estudios de ecotoxicología

Kimmel *et al.*, (1994) y (1995), menciona la importancia de la temperatura en la incubación de huevos del *Danio rerio*, debido a que las fluctuaciones de esta variable puede ocasionar cambios en el desarrollo embrionario de este organismo, lo cual fue evidenciado al someter los huevos a diferentes intervalos de temperatura, estableciendo como temperatura mínima 25°C y 33°C como la temperatura máxima. Destacando de este estudio, que la incubación de huevos del pez a una temperatura superior a 33°C puede provocar embriones con anomalías, además, indica que la incubación a diferentes intervalos de temperatura puede producir diferencias en las distintas fases del desarrollo embrionario, así como modificar el tiempo de embriogénesis.

Desde el enfoque toxicológico, uno de los primeros trabajos reportados es el de Dietrich (1998), quien utilizó al *Danio rerio* para evaluar daño embriotóxico y teratogénico de muestras de agua a través de la prueba denominada DRETA (*Danio teño* embryotoxicity and teratogenicity assay) evaluando el daño inducido a nivel del corazón en estos organismos. Por otra parte Oberemm (2000), sugiere el uso de embriones del *Danio rerio* como un buen bioensayo en la evaluación de elementos tóxicos presentes en el agua, también, describe las principales características del desarrollo embrionario de este organismo, así como las ventajas que presenta el empleo de los embriones de éste, en la evaluación de efectos causados por compuestos químicos de interés toxicológico, además, sugiere el uso de embriones en estado juvenil, debido a que son más sensibles que los organismos adultos.

Nagel (2002), utilizó embriones del *Danio rerio* para evaluar el efecto letal, subletal y teratogénico de una lista de 34 compuestos tóxicos, a través, de una metodología llamada DarT (*Danio rerio* toxicology assay), mediante la cual expuso embriones del pez durante todo su desarrollo embrionario a diferentes concentraciones de distintos compuestos; los resultados mostraron que después de 48 horas de exposición los embriones presentaban algún tipo de daño, entre los cambios más sobresalientes registrados se encuentran:

anormalidades en el corazón, ojos, cabeza, aleta caudal, pigmentación, circulación sanguínea, entre otros.

Estudios recientes, efectuados en el laboratorio de genética evolutiva y ambiental de la UAEH, realizados por González (2005), indican que la etapa de "alevín" es la más sensitiva a la acción teratogénica $HgCl_2$; Posteriormente, Rivera (2006), sugiere la columna vertebral del *Danio rerio* como el biomarcador más sensitivo a la acción teratogénica del mismo compuesto.

Del mismo modo, Báez (2004), empleó células branquiales del *Danio rerio* para evaluar el efecto genotóxico del arsénico presente en el agua del municipio de Zimapán, Hgo. Encontrando una relación positiva entre la exposición de embriones y el efecto genotóxico generado en las células branquiales del pez, lo cual sugiere a esta estructura como un biomarcador eficaz.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la temperatura sobre la teratogenicidad del cloruro de mercurio (HgCl_2) en embriones del pez cebra a través de la prueba *Danio rerio* Teratology assay (DarTa).

2.2. Objetivos particulares:

- Identificar y cuantificar en el *Danio rerio* los efectos fisiológicos de los cambios de temperatura durante el desarrollo embrionario a través de los índices de fertilidad y de viabilidad (ovoposición, eclosión y sobrevivencia de alevines).
- Determinar los posibles efectos teratogénicos de los cambios de temperatura durante el desarrollo embrionario del *Danio rerio*.
- Determinar el efecto de los cambios de temperatura durante el desarrollo embrionario del pez cebra, sobre la teratogenicidad del cloruro de mercurio (HgCl_2) a través de la inducción de malformaciones de columna vertebral usando la prueba “*Danio rerio* Teratology assay” (DarTa).

3.-Justificación

El empleo del *Danio rerio* en la evaluación de daño teratogénico es uno de los ensayos más utilizados, debido a que este organismo presenta múltiples ventajas al evaluar contaminantes presentes en el agua, entre las que destacan: embriogénesis corta (72 h), membrana del huevo semipermeable y translúcida, lo cual permite identificar cualquier malformación durante su desarrollo embrionario; los adultos son de tamaño pequeño (5 cm de largo), permitiendo tener grandes poblaciones en espacios pequeños, su costo de mantenimiento es muy reducido, además, la ovoposición puede ser inducida con 24 hrs. de anticipación, lo cual permite programar tratamientos (González, 2005 y Rivera, 2006).

Estudios anteriores realizados por Oberem, (2000) y Nagel, (2002), sugieren que el *Danio rerio* es un buen indicador en la evaluación de daño teratogénico inducido por contaminantes ambientales, empleando como biomarcadores la columna vertebral y el corazón, como estructuras sensibles a la presencia de agentes contaminantes presentes en el agua.

Estudios realizados en el laboratorio de “Genética evolutiva y ambiental” de la UAEH, han evidenciado la sensibilidad de este bioensayo al cloruro de mercurio ($HgCl_2$), además se ha demostrado la permeabilidad selectiva de la membrana del huevo y la sensibilidad diferencial de las diferentes etapas del desarrollo embrionario; teniendo como línea principal de investigación el validar la prueba DarTa, a través, de evaluar el efecto de diferentes variables como la temperatura, el ph, la salinidad, entre otros. Debido a que no existen reportes del efecto de la temperatura en la teratogenicidad del ($HgCl_2$); sin embargo, se sabe que la temperatura afecta la disolución de algunas sustancias, además, ligeras variaciones de está, pueden provocar diferencias en la maduración, longevidad y potencial reproductivo de los organismos. Sugiriendo la prueba DarTa como una alternativa más económica que la reportada por Fry (1960) y Lloyd (1980), quienes emplearon peces salmónidos para evaluar el efecto de la temperatura en la toxicidad del zinc, reportando que la temperatura puede afectar la disolución, absorción y bioconcentración de algunas sustancias y por ende aumentar su potencial toxico.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para la evaluación de los efectos fisiológicos de los cambios de temperatura en el desarrollo embrionario del *Danio rerio* es necesario determinar de manera inicial las condiciones que aseguren la salud, viabilidad y conducta reproductiva de los peces; para ello, cada vez que se adquiere un lote experimental, se requiere pasar por una fase de aislamiento y selección de peces, que aseguren a través de los criterios de inclusión tener las características adecuadas para entrar en una fase experimental, posteriormente establecer las características fisicoquímicas de mantenimiento así como de reproducción, que permitan determinar finalmente los índices de fertilidad y viabilidad (ovoposición, eclosión y sobrevivencia de alevines).

4.1 Aislamiento y selección de peces

Los peces adquiridos comercialmente deben ser aislados inicialmente durante un periodo de 2 semanas en una pecera de 50 litros de capacidad, con agua previamente reposada por 24 h (con la finalidad de eliminar el cloro presente en el agua), equipada con un calentador automático de 50 W y una bomba de oxígeno, con azul de metileno (1 gota por cada 4 litros), sulfato de cobre (1 gota por cada 2 litros) y verde de malaquita (1 gota por cada 2 litros), así como 1 gr de sales marinas, estos últimos con el propósito de eliminar parásitos y microorganismos patógenos para los peces (González,2005).

Después de transcurrir las dos semanas de aislamiento, se eliminan aquellos organismos que no presenten un buen estado de salud, la edad adecuada y las características específicas de la especie y variedad seleccionada (Fig. 16).



Figura 16.-Lote experimental del *Danio rerio* en laboratorio.

De tal forma, que los organismos seleccionados deben ser machos y hembras sexualmente maduros, de entre 4 y 5 cm de longitud y sin alguna alteración fisiológica o morfológica aparente (Fig. 17); con el objetivo dividir en dos lotes a los organismo separando hembras y machos, en peceras 25 litros con agua en reposo, cada una de éstas, con un calentador automático de 50 W y una bomba de oxígeno; asegurando las condiciones fisicoquímicas óptimas para el desarrollo de los peces, esto último, para asegurar que en los lotes reproductivos exista una mayor posibilidad de fecundación y por ende un mayor número de huevos ovopositados (Rivera, 2006).



Figura 17.-Dimorfismo sexual del *Danio rerio*.

4.2. Mantenimiento de los lotes experimentales

Antes de iniciar la fase reproductiva, es necesario establecer en cada uno de los lotes de hembras y machos las condiciones fisicoquímicas que aseguren su viabilidad “Lote de mantenimiento” (Tabla 4), además es necesario monitorear de manera continua y sistemática la temperatura, el pH, la salinidad, la cantidad de oxígeno disuelto y su fotoperíodo para asegurar que no varíen estas condiciones debido a que puede influenciar directamente en los hábitos conductuales, alimenticios y reproductivos de los peces y por ende en su desarrollo y reproducción (Báez, 2005 y González, 2005).

Cada uno de los lotes de mantenimiento se debe alimentar dos o tres veces al día con alimento seco, agregándoles hojuelas de alimento comercial (Wardley y/o TetraMin); eliminando los excesos para evitar contaminación de hongos y protozoarios; cuando se encuentren en una etapa previa a una selección para montar lotes reproductivos, se requiere que con una semana de anticipación se cambie la dieta, a una rica en proteínas, carbohidratos, lípidos y fibras; esto se logra a través de complementar su alimentación con alimento vivo (*Daphnia sp.* y/o *Artemia sp.*), lo cual permitirá obtener mayor número de huevos en cada ovoposición una vez que se monten los lotes reproductivos (Oberemm, 2000).

Tabla III.-Condiciones físicas y químicas recomendadas para el mantenimiento adecuado del *Danio rerio* (Báez, 2005 y Gonzáles, 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° C ± 1°C Acuarios alejados de parrilla, estufa o equipo que produzca exceso de calor	24° C a 28 ° C Evaporación Desarrollo de protozoarios. Formación de micro-algas.
pH	pH 7	No determinado
CORRIENTES DE AIRE	Ventanas cerradas o cualquier orificio	Evaporación 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 litros – 5 peces. Espacio externo de peceras: entre peceras debe tener un espacio de 10 cm. Para realizar observaciones

4.3. Lotes reproductivos

Los “Lotes reproductivos” consisten en peceras de 5 litros, donde se llevo a cabo la reproducción de los peces, las cuales están equipadas cada una con un calentador automático de 50 W, el cual mantuvo la temperatura del agua a 28 ± 1 °C y con oxigenación continua; colocando 10 organismos de talla grande y sexualmente maduros (en una proporción de 4 hembras y 6 machos), dentro de una pequeña red de maternidad (Fig. 18).

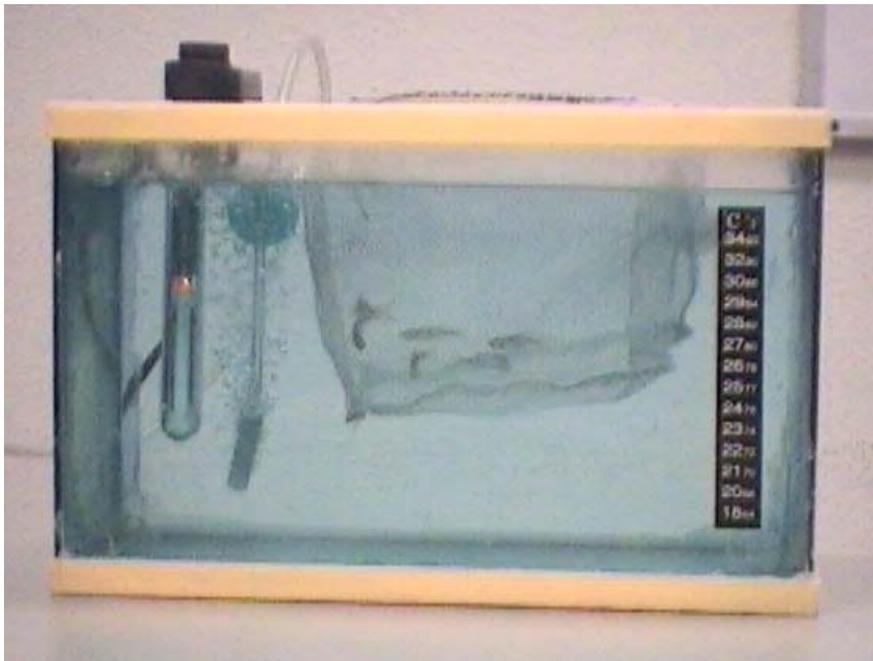


Figura.-18 Pecera con el lote de reproducción del *Danio rerio*.

La red de maternidad evita que al ovopositar, los adultos puedan ingerir sus propios huevos; inmediatamente los huevos son retirados del fondo de la peceras mediante la técnica de sifoneo, posteriormente, a través de un microscopio estereoscópico a un aumento de 40x, son separados los huevos no viables de los viables, éstos últimos se separan de los desechos orgánicos para evitar contaminación por hongos y protozoarios, a continuación son colocados en frascos de vidrio transparente de 100 ml con agua en reposo, cada uno con 50 huevos como máximo, donde continúan su desarrollo embrionario en condiciones de oxigenación y temperatura adecuados (Rivera, 2006).

4.4. Índices de fertilidad y viabilidad (ovoposición, eclosión y sobrevivencia de alevines).

Para evaluar los efectos fisiológicos de la temperatura durante el desarrollo embrionario, fue necesario establecer parámetros de referencia que permitan identificar y cuantificar los índices de fertilidad (% de ovoposición) y viabilidad (% de eclosión y sobrevivencia de alevines) del *Danio rerio*; para ello, se ocuparon 200 huevos viables por tratamiento, cada uno con dos repeticiones, dando un total de 600 huevos evaluados; éstos, fueron repartidos en lotes de 50 huevos, en frascos de vidrio de 100 ml con agua en reposo, tapados con una malla fina, sellados con una liga y sumergidos en una pecera de 5 litros con agua en reposo, la cual, debe tener todas las condiciones fisicoquímicas optimas antes mencionadas para el desarrollo de los huevos (Fig. 19).



Figura 19.-Frascos de vidrio de 100 ml con embriones del *Danio rerio* en agua en reposo.

La temperatura optima para el desarrollo embrionario del *Danio rerio* es 28 ± 0.5 °C (Westerfield, 1995 y Oberemm, 2000), por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto de la temperatura sobre los Índices de fertilidad y viabilidad a dos grados centígrados por arriba y dos por debajo de la temperatura ideal (26, 27, 28, 29 y 30 °C); lo cual se sustenta en la falta de

información reportada de los efectos fisiológicos y/o teratogénicos provocados por los cambios de temperatura durante el desarrollo embrionario, como ya se me menciono anteriormente.

4.5. Efectos teratogénicos de la temperatura durante el desarrollo embrionario del *Danio rerio*.

Con base a los ensayos mencionados anteriormente, se analizo aquellas temperaturas en donde se presente un índice de sobrevivencia mayor al 50 %, evaluándose sus posibles efectos teratogénicos a nivel de columna vertebral, opérculo y aleta caudal, en embriones del pez cebra (*Danio rerio*).

Durante esta fase se utilizo 200 huevos viables como tamaño de muestra inicial, con dos repeticiones concurrentes, de manera independiente al experimento anterior dando un total de 600 huevos evaluados por temperatura.

De igual forma que en el experimento anterior, los huevos empleados son repartidos en frascos de vidrio transparente de 100 ml con agua en reposo, cada uno con 50 huevos viables, en las mismas condiciones fisicoquímicas que el lote reproductivo.

El registro de la frecuencia y tipo de alteraciones morfológicas de columna vertebral, opérculo y aleta caudal en embriones, así como de su viabilidad, se debe realizar desde el momento de la eclosión, siendo mas evidente las alteraciones de columna desde el momento de la eclosión, mientras que para poder evidenciar las alteraciones de opérculo y aleta caudal se requiere de esperar al menos dos semanas para que culminen el desarrollo tanto de aletas como de aparato digestivo y se hagan evidentes (Oberemm, 2000).

4.6. Determinación del efecto de los cambios de temperatura durante el desarrollo embrionario del *Danio rerio*, sobre la teratogénicidad del cloruro de mercurio (HgCl₂)

Estudios realizados anteriormente por Báez (2005); González (2005) y Rivera (2006), refieren al pez cebra como un buen bioindicador, proponiendo la columna vertebral, opérculo y aleta caudal como buenos biomarcadores a través de la prueba denominada “*Danio rerio* Teratology assay” (DarTa), además sugieren la etapa de eclosión, como la más sensible o sensitiva en la evaluación de daño teratogénico. Por lo que en el presente trabajo se propuso el empleo de 150 embriones antes de eclosionar (de entre 48 y 72 hrs de embriogénesis), divididos en tres muestras de 50 embriones cada uno, más un control del mismo tamaño que las muestras anteriores, dando un total de 200 huevos analizados por concentración de cloruro de mercurio (HgCl₂), las cuales por criterio de comparación serán las mismas que se utilizaron en experimento anteriores del Laboratorio de Genética Evolutiva y Ambiental de la UAEH, México y que corresponden a 0.01, 0.1 y 0.3 ppm (González,2005 y Rivera, 2006).

Los embriones empleados fueron repartidos en frascos de vidrio transparente con cloruro de mercurio (HgCl₂) a las distintas concentraciones antes mencionadas, posteriormente los frascos fueron colocados sobre una gradilla, la cual se colocó dentro de la pecera con la finalidad de evitar que los frascos se sumergieran hasta el fondo, además a cada uno de los frascos se les colocó una manguera que administró de oxígeno a los embriones y alevines después de eclosionar (Fig. 20). Al igual que en pruebas anteriores la pecera contó con agua en reposo, una bomba de oxígeno que recircula el agua, permitiendo que la temperatura del agua fuera homogénea en toda la pecera, mediante un calentador regulable de 50 W, (dependiendo cada experimento) durante 72 hrs posteriores a la exposición de los embriones.

El registro de la frecuencia y tipo malformaciones se realizo cada 12 hrs durante las primeras 72 hrs, posteriormente cada día hasta las dos semanas de edad, cuando los alevines pasan a estado juvenil; lo anterior se sustenta en que algunas malformaciones no son evidentes desde el momento de la eclosión; por otra parte la periodicidad de estas observaciones se justifica en que en el periodo de alevín a juvenil se pueden morir los organismos experimentales y perder un registro de alguna alteración, siendo más frecuente la mortandad en las primeras 72 hrs de edad.



Figura 20.-Frascos de vidrio de 100 ml con embriones del *Danio rerio* en HgCl_2 .

4.7. Análisis Estadísticos

Los datos obtenidos de la fase experimental fueron sometidos a dos pruebas estadísticas:

1.- Anova de dos vías, con variable de respuesta binomial; este tipo de prueba se utiliza en datos que no siguen una distribución normal, permite comparar dos eventos dependientes o independientes, cada uno con un numero indeterminado de variables, haciendo todas las combinaciones posibles y

detectando las combinaciones que presentan las principales diferencias significativas.

2.-JI-cuadrada de independencia, este tipo de prueba se emplea en estudios donde se busca comparar distribuciones de tipo multinomial, permitiendo identificar si existe dependencia entre las variables, mediante las siguientes hipótesis (Ronger y Montgomery, 2003)

Hipótesis nula (H_0): Las variables son independientes.

Hipótesis alternativa (H_a): Las variables son dependientes.

5. RESULTADOS

5.1 Índices de fertilidad y viabilidad (eclosión de alevines y sobrevivencia de juveniles).

Para establecer el efecto de la temperatura en la fertilidad, se determino el número de huevos viables después de 24 hrs. de la ovoposición (Fig. 21 huevo viable y no viable) y para la viabilidad, se realizaron dos mediciones: el % eclosión y la sobrevivencia de alevines a juveniles. Con base a los resultados obtenidos (tabla IV) y dependiendo de la temperatura, se observo que a los 30 °C la fertilidad y la viabilidad (embrión – alevín y alevín – juvenil), es mínima o casi nula, lo que permite establecer a esta temperatura como un parámetro máximo de sobrevivencia no solo de huevos, alevines y juveniles, sino incluso de adultos, debido a que también se observo detrimento en la población adulta, además de que existe a esta temperatura una alta proliferación de hongos y protozoarios asociados. Por otra parte se puede determinar que a 27 y 28° C se encuentra la temperatura ideal que permite mayor viabilidad de huevos y la mayor sobrevivencia de alevines, corroborándose lo reportado bibliográficamente (González,2005 y Rivera, 2006).



(a)



(b)

Figura 21 (a) Huevo del *Danio rerio* viable y (b) huevo del *Danio rerio* no viable.

Tabla IV.- Fertilidad y viabilidad de embriones y alevines del *Danio rerio* a diferentes intervalos de temperatura.

Temp. (°C)	Número de embriones empleados	Número de repeticiones	Fertilidad 1	Fertilidad 2	Viabilidad (embrión – alevín) (%)	Viabilidad (embrión-alevín) X±S	Viabilidad (alevín – juvenil) (%)	Viabilidad (alevín – juvenil) X±S
30	200	3	30 (15)	10 ± 1.41	7.3 (3.6)	7.33 ± 1.02	0	0
29	200	3	65 (32.5)	65 ± 10.8	61 (30)	61 ± 8.37	42 (21)	42.66 ± 5.2
28	200	3	191 (95.5)	191 ± 4.54	190 (95)	190 ± 1.63	187 (93.5)	187.3 ± 3.1
27	200	3	189 (94.5)	189 ± 1.69	185 (92.5)	185 ± 1.63	180 (90)	180 ± 1.2
26	200	3	135 (67.5)	135 ± 7.84	124 (62)	124 ± 7.92	117 (58.5)	117 ± 7.1

Fertilidad 1: Número de huevos viables a 24 hrs. (%) cada 200 huevos

Fertilidad 2: Promedio y desviación estándar de de huevos viables a 24 hrs. cada 200 huevos

De manera complementaria, se puede observar gráficamente en la figura 22, que el intervalo de temperatura en donde se localiza el mayor número de huevos fértiles después de las 24 hrs de haber ocurrido la ovoposición, esta entre los 27 y 28 °C; la viabilidad embrión-alevín y la de alevín-juvenil se comportan de la misma manera, registrando sus mayores índices de expresión en el mismo rango de temperatura.

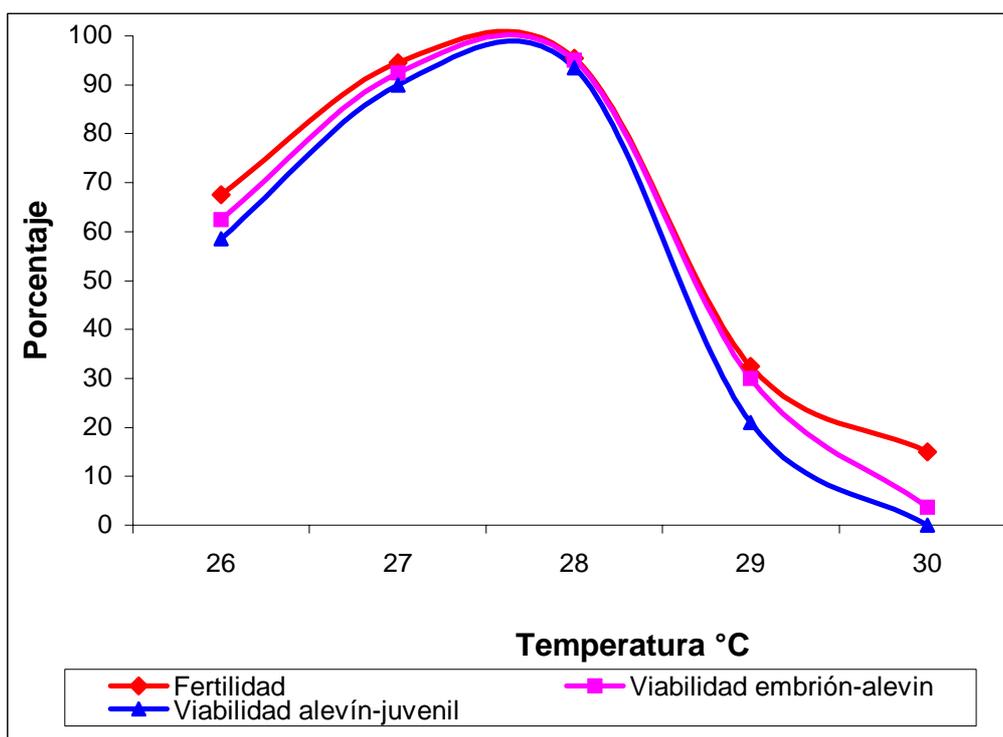


Figura 22.-Porcentaje de la fertilidad embrionaria, viabilidad de embriones y alevines del *Danio rerio* a diferentes intervalos de temperatura.

5.2- Evaluación del potencial teratogénico de los cambios de temperatura durante el desarrollo embrionario del *Danio rerio*.

Al igual que en el ensayo anterior y de forma independiente, se analizó la frecuencia de malformaciones inducidas en embriones del pez cebra por los diferentes rangos de temperatura; empleando un total de 600 huevos en cada intervalo, dando un total de 3 mil; sin registrar ninguna malformación durante y después del tratamiento, lo cual descarta la posibilidad que los cambios de temperatura analizados (30, 29, 28, 27 y 26°C) ocasionen por si solas posibles malformaciones en el desarrollo embrionario del pez cebra, enfatizando que los lotes reproductivos empleados para la elaboración de este proyecto se encontraron en perfectas condiciones de salud, lo cual se reflejó en el buen estado de embriogénesis de los embriones del pez, en el número de huevos ovopositados y eclosionados, salvo los 30°C donde disminuyó significativamente el porcentaje de ovoposición y eclosión.

Por otra parte los resultados antes mencionados en este apartado, permitieron la siguiente etapa de la fase experimental; en donde se expuso en los mismo rangos de temperatura a los organismos, pero ahora con un teratogeno de referencia, el cloruro de mercurio (HgCl_2), si aparecen malformaciones en esta etapa será por el agente químico y no por la temperatura, y si varia (aumenta) la expresión entre los diferentes intervalos será el efecto de la temperatura sobre la teratogenicidad del compuesto.

5.3- Efecto de los cambios de temperatura sobre la teratogenicidad del cloruro de mercurio (HgCl_2) durante el desarrollo embrionario del *Danio rerio* a través de la inducción de malformaciones en columna vertebral

La inducción de malformaciones en columna vertebral en embriones del *Danio rerio*, sometidos a diferentes intervalos de temperatura (29, 28, 27 y 26°C) y a diferentes dosis subtoxicas (0.01, 0.1 y 0.3 ppm) de cloruro de mercurio (HgCl_2), fue positiva en todos los intervalos y en las diferentes concentraciones (Tabla V), registrando un porcentaje de 5 % de malformaciones de un total de 2000 embriones analizados en los distintos tratamientos. Con base a la diversidad de malformaciones obtenidas en columna vertebral, se utilizo la clasificación de Gonzáles(2005) y Rivera (2006), en donde dividen el cuerpo del pez en tres áreas: Cefálica, media y caudal (Fig. 23), por otra parte dicha clasificación también identifica el número y tipo de curvaturas sobre la columna vertebral, clasificándolas en sencillas, dobles, múltiples, curvas, en espiral, en aleta caudal y en forma de gancho.



Figura 23.-División arbitraria del cuerpo de *Danio rerio* (Rivera, 2006)

En los distintos intervalos de temperatura analizados se observó que cerca del 80 % del total de malformaciones registradas se puede dividir en tres, las de mayor incidencia son las del tipo sencillas (2.8 %), en las que el embrión del pez solo presentó un doblez en la columna vertebral, ya sea lateral o ventral (fig.24), estas se observaron en la zona cefálica y media principalmente; seguido por las malformaciones del tipo curva (0.65 %), las cuales consisten en una curvatura en cualquiera de las tres zonas (fig. 27), lo cual ocasiona que el embrión nade en círculo; finalmente las malformaciones del tipo gancho, observadas con un porcentaje de 0.55 %, estas últimas son aquellas en las que el embrión presentó un pequeño doblez en la zona media y/o zona caudal, dando el aspecto de gancho al pez (fig. 29); independientemente de que se encontraron en menor frecuencia otros tipos de malformaciones.

De acuerdo con los resultados estadísticos obtenidos del análisis de anova de dos vías con variable de respuesta binomial no existen diferencias significativas que demuestren que la interacción temperatura-concentración influya en el potencial teratogénico del cloruro de mercurio (HgCl_2), por otra parte el análisis dice que la concentración de 0.01 ppm presenta diferencias significativas más notorias, así como las malformaciones del tipo sencillas.

Según el análisis de Ji-cuadrada de independencia realizado, la X^2 calculada es menor que la X^2 de tablas, por lo tanto se acepta la hipótesis nula. Por lo que las variables son independientes, lo cual indica que la temperatura no ejerce un efecto en el potencial teratogénico del cloruro de mercurio (HgCl_2).

Tabla V.-Efecto de los cambios de temperatura sobre la teratogenicidad del cloruro de mercurio (HgCl₂) durante el desarrollo embrionario del *Danio rerio*,

Temperatura °C	Concentración	Numero de embriones por repetición	Numero de repeticiones	Numero de malformaciones por repetición			Promedio ± Desviación standard	Total de malformaciones	Numero y tipo de malformaciones						
				R ₁	R ₂	R ₃			S	D	M	C	E	A	G
29	0.01	50	3	4	3	3	3.33±0.47	10	6		1		1		2
	0.1	50	3	4	4	3	3.66±.473	11	10					1	
	0.3	50	3	5	4	3	4.00±.816	12	10			2			
	Control	50	1	0	0	0	0	0							
28	0.01	50	3	3	3	2	2.66±.470	8	4	1	1		1		1
	0.1	50	3	3	3		2.00±1.41	6	3		1	1		1	
	0.3	50	3	2	1	3	2.00±.816	6	3			2			1
	Control	50	1	0	0	0	0	0							
27	0.01	50	3	1	3	3	2.33±.939	7	3			2		1	1
	0.1	50	3	2		3	1.66±1.24	5	3	1		1			
	0.3	50	3		4	3	2.33±1.70	7	5			1		1	
	Control	50	1	0	0	0	0	0							
26	0.01	50	3	3	4	4	3.66±.473	11		2	1	3	2		3
	0.1	50	3	4	2	2	2.66±.941	8	4			1		1	2
	0.3	50	3	3	2	3	2.66±.470	8	5		2				1
	Control	50	1	0	0	0	0	0							

S= Malformación sencilla, D= Malformación doble, M=Malformación múltiple, C= Malformación curva, E= Malformación en espiral, A= Malformación en aleta caudal, G= Malformación en gancho

Malformaciones sencillas

Las imágenes que a continuación se muestran fueron obtenidas al exponer embriones del *Danio rerio* a cloruro de mercurio (HgCl_2) a las concentraciones antes mencionadas; destacando que ningún tipo de malformación obtenida es exclusiva de alguna concentración, es decir, se registro los siete tipos diferentes de malformaciones en las tres distintas concentraciones analizadas.

Las malformaciones sencillas son aquellas en las que el embrión del pez cebra (*Danio rerio*) solo presento un solo doblez (malformación), ya sea lateral o dorsal, estas se observaron en la zona cefálica, media (columna vertebral) y/o caudal (Rivera, 2006).

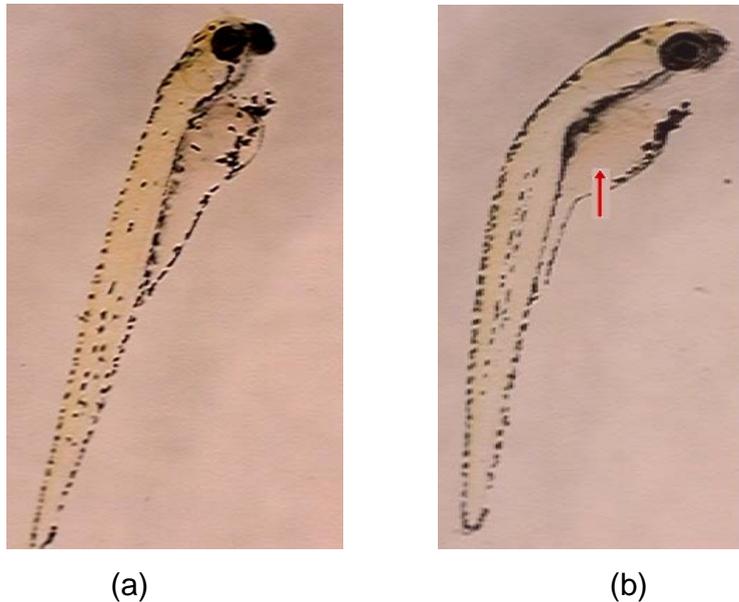


Figura 24 (a) Alevín normal de *Danio rerio* y (b) malformación sencilla en zona cefálica del alevín del *Danio rerio*.

Malformaciones dobles

Las malformaciones dobles son aquellas en las que el embrión del *Danio rerio* presento dos dobleces, una en la zona media de la columna vertebral y otra en la zona caudal, ya sea lateral o dorsal (Rivera, 2006).

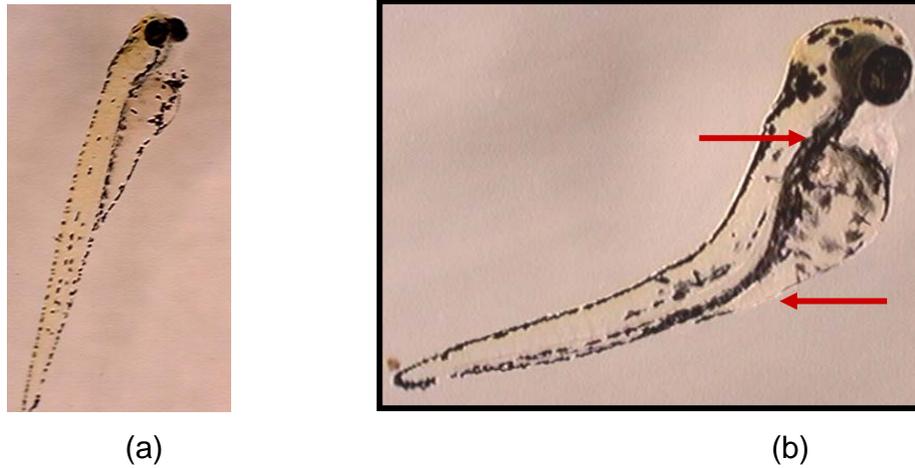


Figura 25 (a) Alevín normal del *Danio rerio* y (b) malformación doble en zona cefálica y zona media de la columna vertebral del alevín del *Danio rerio*.

Malformaciones múltiples

Las malformaciones múltiples son aquellas en las que el embrión del pez cebra (*Danio rerio*), presenta tres o más dobleces, en la zona cefálica, media y/o caudal, ya sea lateral o dorsal (Rivera, 2006).

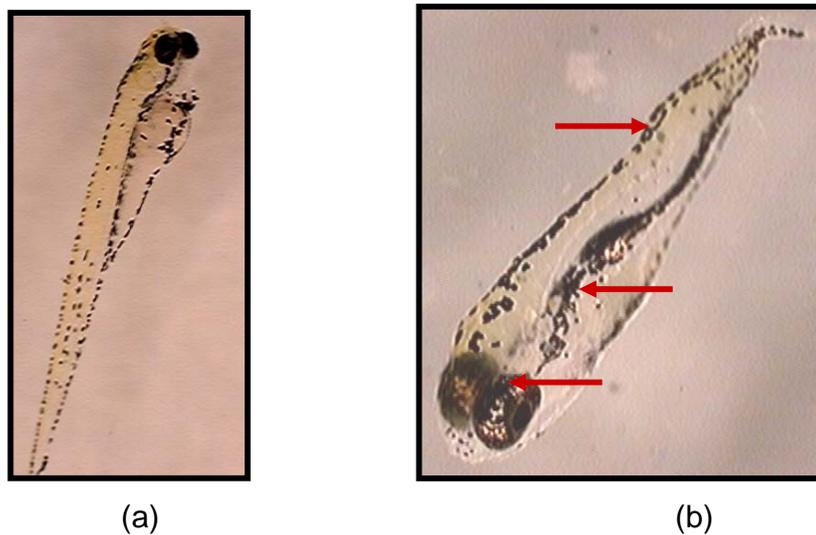
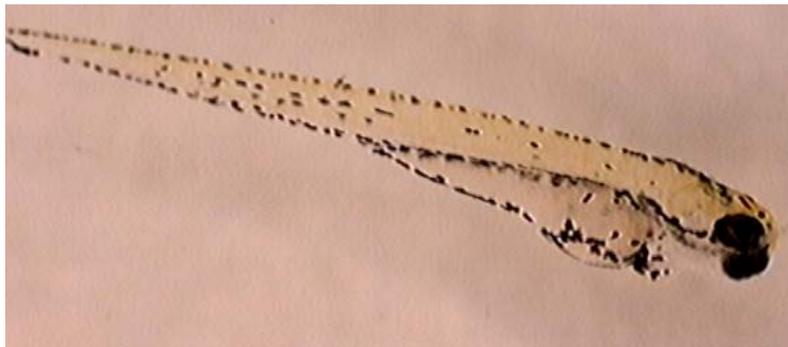


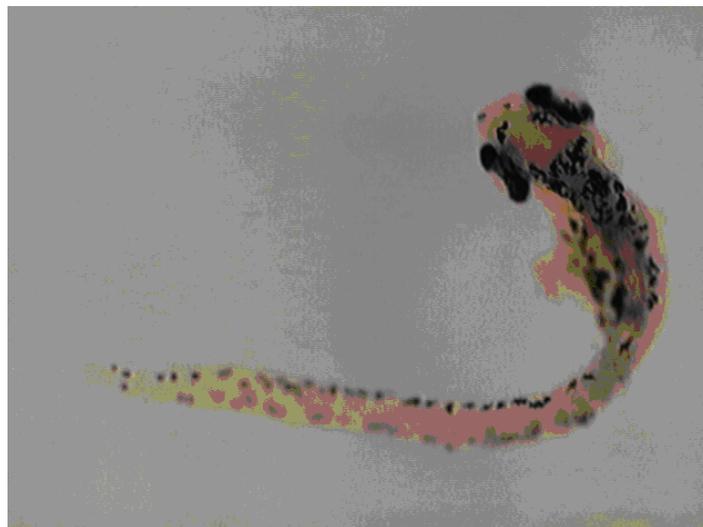
Figura 26 (a) Alevín normal del *Danio rerio* y (b) Malformación múltiple en zona cefálica, zona media de la columna vertebral y zona caudal del alevín del *Danio rerio*.

Malformaciones curvas

Las malformaciones curvas son aquellas en las que el embrión del *Danio rerio*, presenta una curvatura en la zona cefálica, media y/o caudal, lo cual ocasiona que el embrión nade en círculo (Rivera, 2006).



(a)



(b)

Figura 27 (a) Alevín normal del *Danio rerio* y (b) Malformación curva en la zona media de la columna vertebral del alevín del *Danio rerio*.

Malformaciones en aleta caudal

Las malformaciones en aleta caudal son aquellas en las que el embrión del *Danio rerio*, presenta un pequeño doblez en la zona caudal (Rivera, 2006).

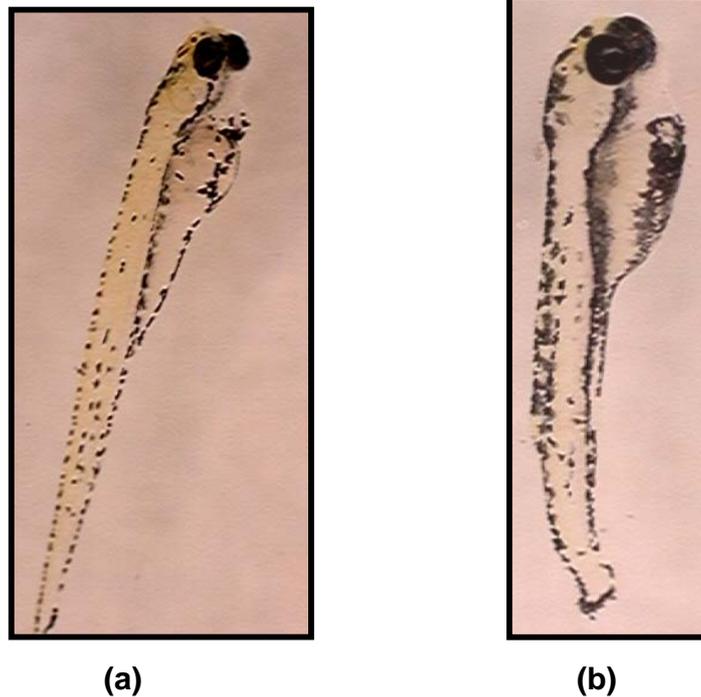


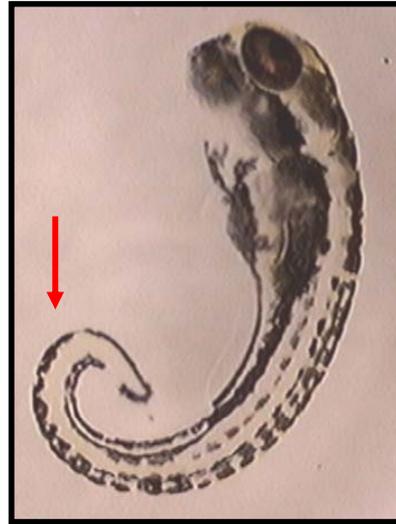
Figura 28 (a) Alevín normal de *Danio rerio* y (b) Malformación en zona caudal del alevín *Danio rerio*.

Malformaciones en gancho

Las malformaciones en gancho son aquellas en las que el embrión del pez cebra (*Danio rerio*), presento un pequeño doblez en la zona media (columna vertebral) y/o zona caudal, dando el aspecto de gancho al pez (Rivera, 2006).



(a)

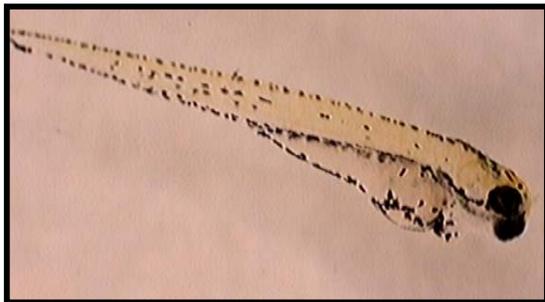


(b)

Figura 29 (a) Alevín normal del *Danio rerio* y (b) Malformación en gancho en zona caudal del alevín del *Danio rerio*.

Malformaciones en espiral

Las malformaciones en espiral son aquellas en las que el embrión del *Danio rerio*, presenta un enroscamiento en forma de espiral en la zona caudal (Rivera, 2006).



(a)



(b)

Figura 30 (a) Alevín normal del *Danio rerio* y (b) Malformación en espiral en zona caudal del alevín del *Danio rerio*.

6. DISCUSIONES

El presente trabajo es parte de un proyecto mayor que pretende validar la prueba DarTa con embriones de pez cebra, para evaluar la calidad ambiental a través de la inducción de malformaciones durante el desarrollo embrionario.

Estudios preliminares basados en la validación de esta prueba, realizados por Gonzáles (2005) y Rivera (2006) sugieren intervalos de temperatura que oscilan de 24 a 28°C para las diferentes etapas del desarrollo del pez cebra, sin embargo, no existen datos que indiquen un intervalo de temperatura ideal para la incubación de huevos, así como los posibles efectos que pudiera ejercer ésta sobre la embriogénesis del pez. Además es importante mencionar que los huevos presentan una alta mortandad natural posterior a las 24 horas de ovoposición, sin mencionar el efecto de la temperatura antes y después de haber transcurrido este lapso de tiempo, por lo tanto, solo se emplearon huevos que después haber transcurrido 24 hrs eran fértiles, incrementando significativamente la fertilidad, y la sobrevivencia de alevines y juveniles.

La temperatura limite para la incubación de huevos del *Danio rerio* evaluada en el presente trabajo fue a 30°C, sin embargo, a este rango de temperatura se registró un porcentaje de sobrevivencia mínimo o casi nulo, además de favorecer la proliferación de hongos y protozoarios, los cuales afectan directamente la fertilidad y la viabilidad. Por otra parte el desarrollo embrionario del pez se acorta de forma significativa a temperaturas mayores a los 28°C, pasando de 72 a 48 ± 2 horas, en contraste, a temperaturas mas bajas (menores a 26°C) el desarrollo embrionario se alarga pasando de las 72 a 84 ± 2 horas; sin embargo, de acuerdo a los ensayos realizados, se recomienda a 27 y 28°C, como el intervalo de temperatura ideal para la incubación de huevos del *Danio rerio*, factor importante de considerar cuando se contemplan tiempos de exposición y evaluación de daño teratogénico.

En cuanto al segundo objetivo, relacionado con el efecto de la temperatura sobre el biomarcador a evaluar (columna vertebral), fue necesario identificar si la temperatura por si sola puede o no inducir malformaciones, para diferenciar entre el daño generado por la temperatura u alguna otra variable; por ejemplo algún agente químico. Con base en lo anterior, no se observó ningún tipo de malformación en los diferentes intervalos de temperatura analizados en 3000 mil embriones.

Independientemente de que la temperatura no indujo por si sola algún efecto teratogénico, aun era necesario evaluar su efecto conjunto con algún teratógeno de referencia, ya que pueden ejercer efectos sinérgicos o antagónicos, debido a que como se mencionó anteriormente la temperatura afecta la disolución algunas sustancias y por ende en su biodisponibilidad, estabilidad y permanencia, además de que también afecta los procesos biológicos como la absorción, el metabolismo, la acumulación y la excreción; combinados de múltiples formas dan posibilidad a una amplia gama de respuestas biológicas a evaluar (PNUMA Y OMS, 1980).

El control de la temperatura es una variable de vital importancia en la valoración del ensayo denominado (DarTa), así como en todo tipo de pruebas de toxicidad, debido a que ligeras variaciones de la misma puede provocar que se presenten diferencias en la maduración, longevidad y potencial reproductivo de los organismos (Muñoz, 1996). Por lo que en el presente trabajo se emplearon embriones del pez cebra (*Danio rerio*) para evaluar como influye la temperatura en los índices de fertilidad y viabilidad (sobrevivencia de alevines y juveniles), posteriormente en la teratogenicidad del HgCl_2 , y por ende en el número y tipo de malformaciones obtenidas, registrando una relación positiva en todas las concentraciones y en todos los intervalos de temperatura analizados, obteniendo siete tipos diferentes de malformaciones (tabla V), sin embargo, no hay una relación directa entre el número y tipo de malformaciones registradas, con alguna de las concentraciones, es decir, se puede registrar cualquier tipo de malformación en cualquiera de las concentraciones;

En cuanto a las tres concentraciones analizadas (0.01, 0.1 y 0.3 ppm), se observó que la concentración de 0.01 ppm de HgCl_2 presentó un porcentaje estadísticamente significativo en cuanto al potencial teratogénico generado, en comparación con las dos concentraciones restantes (0.1 y 0.3 ppm.), lo cual puede atribuirse que al ser la concentración mas pequeña, está puede diluirse con mayor rapidez, además al ser una molécula más pequeña, su movimiento y transporte se facilita, lo cual probablemente pudo favorecer la generación de malformaciones. Por otra parte se registró que las malformaciones del tipo sencillos son las de mayor incidencia.

Por otra parte, se sugiere probar con otros compuestos o elementos de interés toxicológico para conocer si la temperatura tiene un efecto teratogénico al interactuar; los organismos, la temperatura y un compuesto químico, o se comporta de igual forma que el HgCl_2 ; donde al menos en los ensayos realizados no se observo un incremento en el número y tipo de malformaciones registradas. Lo cual permite que la prueba DarTa, sea más sencilla al evaluar daño teratogénico en embriones del Danio rerio, debido a que la temperatura puede fluctuar dentro del intervalo de 26-29°C, sin modificar el potencial teratogénico del HgCl_2 .

7. CONCLUSIONES

El presente trabajo parte de la premisa de que la temperatura puede afectar la solubilidad, transporte y bioacumulación de los compuestos, influyendo directamente sobre su potencial teratogénico. Lo que nos permite concluir que:

Al menos en el *Danio rerio* y en las condiciones experimentales probadas la temperatura no mostró capacidad de inducir malformaciones en columna vertebral.

Que el intervalo de 27°C a 28°C es ideal para desarrollar la prueba DarTa sin que la temperatura altere el potencial teratogénico del HgCl₂.

Por otra parte se demostró que el intervalo de temperatura (27°C –28°C) es ideal para obtener mejores índices de fertilidad y viabilidad, que se requiere para el diseño y programación de un experimento.

Además se evidenció que la temperatura influye directamente en la duración del desarrollo embrionario en el pez, observando que a temperaturas mayores a 28°C se acelera, pasando de 72 hrs. A 48 hrs., y a temperaturas menores a 26°C disminuye, pasando de 72 hrs. A 84 hrs., permitiendo conocer su duración exacta a diferentes intervalos de temperatura, lo que mejora el diseño y programación de un experimento.

En cuanto a la validación de la técnica DarTa, se recomienda que para pruebas de toxicidad se trabaje con embriones viables después de 24 hrs de edad, para evitar confundir los muertos naturalmente y los inducidos por alguna variable experimental.

Finalmente se puede concluir que el presente trabajo contribuye de manera importante en la validación de la *Danio rerio* Teratology assay (DarTa), debido a que esta y en otras pruebas toxicológicas es importante identificar las variables que pueden afectar las respuestas a evaluar.

Por otra parte también es importante resaltar este tipo de estudios porque son un requisito de la genética toxicológica, la cual tiene entre uno de sus principales objetivos encontrar y validar, más y mejores pruebas y bioensayos que permitan evaluar mejor el ambiente de una manera rápida, económica y confiable, a la par de estudios analíticos lentos, costosos y complejos

REFERENCIAS

- Albert, L. (1998) Curso básico de toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Ed. Noriega. México. 180 pp.
- Almeida, W. y F. Reyes (1992) Toxicología prospectiva y seguridad química. Ed. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. México. 231 pp.
- Tawil-Abadi y G. Ortiz (2004) *Danios y Brachidanios*. Aqua Guía. Ed. Antártica. México. 24 pp.
- Báez-Ramírez, A. y F. Prieto-Garza. (2005) Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, México. *Mutagenesis* 20:291-295.
- Báez-Ramírez, A., Prieto-García, F. y A. Galán-Vidal. (2004) Bioacumulación y daño genotóxico en pez cebra (*Danio rerio*) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo (México). *Ensayos en cortos plazos. AquaTic*. 21:62-70.
- Bristol, D., Mac Leond, K. y R. Lewis (1984) Evaluación de riesgo en: Toxicología prospectiva y seguridad química. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Ed. Almeida. W. y F. Reyes (ECO) México. p. 56-59.
- Butterworth, F. (1995) Introduction to Biomonitors and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. Ed. Plenum Press. EUA. p. 313.
- Cortinas, C. (1985) Carcinogénesis Ambiental. en: Curso básico de toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Albert, L. Ed. (Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos). México. p. 23-38

- Cortinas, C. (1998) Carcinogénesis Ambiental. en: Curso básico de toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Albert, L. Ed. Noriega. México. p. 23-39.
- de la Lanza, G. (2000) Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (Bioindicadores). Ed. Plaza y Valdes. México. p. 17-20.
- Doadrio, A (2004) Ecotoxicología y acción química del mercurio. Anales de la Real Academia de Farmacia. 44:933-959.
- Espinosa, E., Lezama, F., Mirza, Y., Moneda, J., Morales, E. y I. Soto (1998) Medio ambiente y educación. Ed. Universidad Autónoma de Puebla. México. p.74-87.
- Fernícola, N. (1992a) Evaluación de riesgo. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Panamericana de la Salud. México. p. 23-30.
- Fernícola, N. (1992b) Evaluación Biológica de la Exposición Humana. en: Toxicología prospectiva y seguridad química. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Ed Almeida. W. y F Reyes, (ECO) México. p. 23-34.
- Figueroa, A. (1998) Mercurio y Metilmercurio. en: Curso básico de toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Albert, L. Ed. Noriega. México. p. 123-1411.
- Fry, (1960) Background on abiotic characteristics of water. en: Fundamentals of Aquatic Toxicology, Methods and Applications. Rand. G. y Petrocelli, S. (1985). Ed. Hemisphere publishing corporation. EUA. p. 133-139.
- Gaytán, J. (1993) Modulación del efecto genotóxico de la mitomicina C (MMC) por la vitaminas A y C en células meristemáticas de ala en Drosophila melanogaster. Tesis para obtener el grado de maestro en Ciencias (Biología), Universidad Autónoma Nacional de México. México. 80pp.

- GEO, (2000) Perspectivas y Medio Ambiente Mundial. Ed. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. España. 500 pp.
- Gonzáles, L. (2005) Evaluación del efecto del cloruro de mercurio (HgCl₂) en la inducción de malformaciones de columna vertebral del pez cebra (*Danio rerio* Hamilton, 1822) durante diferentes etapas del desarrollo embrionario. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 94 pp.
- Jorgensen, S., Sorensen, H. y H. Mahler (1998) Handbook of Estimation methods in Ecotoxicology and Environmental Chemistry. Ed. Lewis Publishers. EUA. p. 145-157.
- Kamrin, M. (1990) Toxicology. Ed. Lewis Publishers. 4^a. Edición. EUA. p. 33-42.
- Kimmel, C., Balla, W., Kimmel, S., Ullmann, B. y T. Schilling (1995) Stage of embryonic developmental of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. 203:253-310.
- Larraín, A. (1995) Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. *Ciencia y Tecnología del Mar*, Comité Oceanográfico Nacional (CONA). Chile. p. 39-47
- Lloyd, (1980) Background on abiotic characteristics of water. en: Fundamentals of Aquatic Toxicology, Methods and Applications. Rand. G. y Petrocelli, S. (1985). Ed. Hemisphere Publishing Corporation. EUA. p. 133-139.
- Martines, L. (1996) Toxicología Acuática. Departamento de toxicología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas- Instituto Politécnico Nacional. México. p. 193-195.
- Medina, M. y F. Encina (2003) Incorporación de la evaluación de riesgo ecológico en el sistema de evaluación de impacto ambiental para ecosistemas acuáticos en Chile. *Ambiente y Desarrollo del Centro de Investigación y Planificación del Medio Ambiente*. 19: 3-4.

- Miller, E., Miller J. y M. Enomotor (1971) en: Criterios de salud ambiental 6, Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte 1. Ed. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y Organización Mundial de la Salud. EUA. p. 264-265.
- Molina, M. (1999) El problema del cambio climático mundial trascendió lo puramente científico. *Investigación*. 88:60-62
- Muñoz, G. (1996) Factores ambientales de importancia en las pruebas de toxicidad acuática. Instituto Nacional de Ecología. México. p. 211-214
- Moreira, E. (1995) Fundamentos metodológicos de los bioensayos de toxicidad/carcinogenicidad. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. *Revista cubana de Enfermería*. 1158:1-7
- Nagel, R. (2002). DART: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19:38-48.
- NCR-Nacional Research Council. (1983) en:Toxicología prospectiva y seguridad química. Ed. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. México. p. 159-165.
- Oberemm, A. (2000) The use of a refined zebrafish embryo bioassay for the assessment of aquatic toxicology. *Lab. Animal*. 29 (7):32-40.
- Olvera, H. (1998) Bioensayos para toxicidad acuática. Laboratorio Acuario. Universidad Nacional Autónoma de México. México. p. 1-5
- PNUMA y OMS-Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y Organización Mundial de la Salud (1980) Criterios de salud ambiental 6, Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte 1. Ed. PNUMA y OMS. EUA. 269 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. 73pp.

- Rodricks, J. y M. Taylor (1983) Toxicología prospectiva y seguridad química. Ed. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. México. p. 53-56.
- Ronger, G. y D. Montgomery (2003) Probabilidad y estadística aplicada a la ingeniería. 2 ° edición. Ed. Limusa. Mexico. 450 pp.
- Vega, S. (1985) Toxicología III: Aspectos específicos de la toxicología de algunos contaminantes. Ed. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. México. 198 pp.
- Vega, S. (1990a) Toxicología IV Carcinogénesis química. Ed. Limusa. México. p. 423-481.
- Vega, S. (1990b) Toxicología V Genotoxicidad y daño al sistema reproductor. Ed. Limusa. México. p. 485-552.
- Vettorazzi, G. (1992) Ensayos necesarios para la valoración toxicológica de las sustancias químicas. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas y Organización Mundial de la Salud. Suiza. p. 67-75.
- Vera, G., Tam, J., Vera, V. y E. Pinto (2001) Pruebas ecotoxicológicas con cromo y cromo usado en postlarvas del pejerrey *Odontedhes (Austromenidia)* regia regia Hildebrand. Facultad de Ciencias Biológicas. Mutagenesis 20:291-295.
- Vighi, M. (1989) Incorporación de la evaluación de riesgo ecológico en el sistema de evaluación de impacto ambiental para ecosistemas acuáticos en Chile. Ambiente y desarrollo del Centro de Investigación y Planificación del Medio Ambiente. 19: 3-4.
- Vogel, E. y E. Rivas, (1997) Contaminación del agua en: Ciencia Ambiental y Desarrollo Sostenible. Enkerlin, E., Cano, G., Garza, R. y E. Vogel, Ed. Thomson. México. p. 401-413.
- Weil, (1975) en: Toxicología prospectiva y seguridad química. Ed. Programa internacional de seguridad de las sustancias químicas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. México. p. 55.

- Westerfield. M. (1995) El libro del pez cebrá: Una guía de laboratorio para el uso del *Danio rerio* (*Brachidanio*). Instituto de neurología. Universidad de Oregon. EUA.
- Woolley, A. (2003) A Guide to practical toxicology, Evaluation, Prediction and risk. Ed. Taylor y Francis. EUA. p. 11-134.
- WHO- World Health Organization (1978) en: Toxicología prospectiva y seguridad química. Ed. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. México. p. 53.