



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

TÍTULO:

**Influencia del pH en la inducción de daño teratogénico producido por
MnCl₂ en embriones de *Danio rerio*, a través de la prueba
DarTa.**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

Horacio García Arteaga

ASESOR:

Dr. JUAN CARLOS GAYTÁN OYARZÚN

**Mineral de la Reforma, Hidalgo
2008**

| ÍNDICE | Pág. |
|--|-------------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1. ANTECEDENTES | 3 |
| 1.1 CONTAMINACIÓN | 3 |
| 1.2 TOXICOLOGÍA | 4 |
| 1.2.1 PRUEBAS DE TOXICIDAD | 5 |
| 1.3 ECOTOXICOLOGÍA | 8 |
| 1.3.1 MOVIMIENTO DE CONTAMINANTES | 11 |
| 1.3.2 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL AGUA RELEVANTES EN ESTUDIOS DE ECOTOXICOLOGÍA | 12 |
| 1.3.2.1 TEMPERATURA | 12 |
| 1.3.2.2 pH | 13 |
| 1.3.2.3 CONDUCTIVIDAD | 14 |
| 1.3.2.4 SOLUBILIDAD | 15 |
| 1.3.2.5 DUREZA | 15 |
| 1.3.2.6 TURBIDEZ | 15 |
| 1.4 TOXICOLOGÍA DE LOS METALES PESADOS | 15 |
| 1.5 MANGANESO | 17 |
| 1.6 EVALUACIÓN BIOLÓGICA | 19 |
| 1.7 BIOINDICADORES | 19 |
| 1.8 BIOMARCADORES | 21 |
| 1.9 BIOENSAYOS | 21 |
| 1.9.1 <i>Danio rerio</i> | 21 |
| 1.9.1.1 Desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i> | 22 |
| 1.9.2 TERATOGENÉESIS EN <i>Danio rerio</i> | 25 |
| 1.9.3 Clasificación de malformaciones en columna vertebral (Rivera, 2006) | 26 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 31 |
| 3. OBJETIVOS | 32 |
| 3.1 Objetivo general | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2 Objetivos específicos | 32 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS | 33 |
| 4.1 Condiciones óptimas del agua | 33 |
| 4.2 Peceras de mantenimiento y aislamiento de organismos | 33 |
| 4.3 Alimentación | 34 |
| 4.4 Actividad de la conducta reproductiva | 35 |
| 4.5 Mantenimiento de huevos y alevines | 36 |
| 4.6 Evaluación de la influencia del pH en fertilidad y viabilidad de los embriones | 38 |
| 4.7 Inducción del efecto teratogénico en pez cebra (<i>Danio rerio</i>) expuesto a diferentes valores de pH | 39 |
| 4.8 Inducción del efecto teratogénico en pez cebra (<i>Danio rerio</i>) expuesto a MnCl ₂ , a diferentes valores de pH. | 39 |
| 4.9 Preparación del compuesto | 41 |
| 4.10 Análisis estadísticos | 43 |
| 5. Resultados | 44 |
| 6. Discusión y Conclusión | 54 |
| 7. Bibliografía | 57 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Vía potencial de inducción de teratogénesis (Modificado de Finnel, 1995) | 6 |
| Figura 2. Respuesta de un ecosistema a los efectos adversos de los agentes tóxicos en los organismos (Solís y López, 2003) | 10 |
| Figura 3. Cinética de contaminantes ambientales (Vega, 1985a) | 12 |
| Figura 4. Interacción entre una sustancia tóxica y un organismo (Vega, 1985c) | 16 |
| Figura 5. Dimorfismo sexual en <i>Danio rerio</i> (a) Macho, (b) Hembra | 22 |
| Figura 6. Estadios de desarrollo de <i>Danio rerio</i> (Maldonado, 2003) | 24 |
| Figura 7. (a) Alevín normal de <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación sencilla en zona cefálica de alevín de <i>Danio rerio</i> | 26 |
| Figura 8. (a) Alevín normal de <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación doble en zona cefálica y zona media de la columna vertebral de alevín de <i>Danio rerio</i> | 27 |
| Figura 9. (a) Alevín normal de <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación múltiple en zona cefálica, zona media de la columna vertebral y zona caudal de alevín de <i>Danio rerio</i> | 27 |
| Figura 10. (a) Alevín normal de <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación curva en la zona media de la columna vertebral de alevín de <i>Danio rerio</i> | 28 |
| Figura 11. (a) Alevín normal de <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación en zona caudal de alevín de <i>Danio rerio</i> | 29 |
| Figura 12. (a) Alevín normal de <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación en gancho en zona caudal de alevín de <i>Danio rerio</i> | 30 |
| Figura 13. (a) Alevín normal de <i>Danio rerio</i> y (b) Malformación en espiral en zona caudal de alevín de <i>Danio rerio</i> | 30 |
| Figura 14. Agua en reposo para recambio bajo condiciones físico-químicas controladas | 33 |
| Figura 15. Lote experimental con aprox. 100 peces | 34 |
| Figura 16. Pecera de maternidad con una proporción 3 machos, 2 hembras | 35 |
| Figura 17. Lote experimental con montaje de maternidades y | 37 |

| | |
|--|----|
| aislamiento de embriones hasta la etapa de eclosión | |
| Figura 18. Pecera de tratamiento con frascos de 100 ml | 38 |
| Figura 19. Montaje de experimentos para evaluar el efecto teratogénico del pH | 40 |
| Figura 20. Montaje de experimentos con MnCl ₂ | 40 |
| Figura 21. Dosis tóxicas y subtóxicas de MnCl ₂ | 41 |
| Figura 22. Esquema de dilución para la elaboración de concentraciones experimentales | 42 |
| Figura 23. Permeabilidad de la membrana pH 6 con azul de metileno | 44 |
| Figura 24. Influencia del pH en viabilidad y fertilidad de embriones de Pez cebra a diferentes valores de pH | 46 |
| Figura 25. División arbitraria del cuerpo de <i>Danio rerio</i> (Rivera, 2006; Peña, 2008) | 47 |
| Figura 26. Índice de frecuencias de malformaciones a dos concentraciones de MnCl ₂ a tres valores de pH | 47 |
| Figura 27. Malformación sencilla observada en etapa experimental | 49 |
| Figura 28. Malformación doble observada en etapa experimental | 49 |
| Figura 29. Malformación curva observada en etapa experimental | 49 |
| Figura 30. Malformación múltiple observada en etapa experimental | 50 |
| Figura 31. Malformación en aleta caudal observada en etapa experimental | 50 |
| Figura 32. Malformación tipo gancho observada en etapa experimental | 50 |
| Figura 33. Influencia del pH en la inducción de daño teratogénico en dos concentraciones de MnCl ₂ | 52 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla I. Tipos de contaminación (Modificado de Albert, 1988) | 4 |
| Tabla II. Niveles de efectos adversos (Sánchez, 2003) | 9 |
| Tabla III. Composición de nutrimentos del alimento en hojuela (Tetra Min) | 34 |
| Tabla IV. Condiciones físico-químicas para inducir la conducta reproductiva (Oberemm, 2000) | 35 |
| Tabla V. Características físico-químicas óptimas del agua para la reproducción del pez cebra (Rivera, 2006) | 44 |
| Tabla VI. Frecuencia de ovoposiciones en pez cebra a diferentes valores de pH | 45 |
| Tabla VII. Porcentaje de viabilidad y fertilidad de embriones de pez cebra a diferentes valores de pH | 45 |
| Tabla VIII. Registro de malformaciones de columna vertebral al ser tratadas a dos concentraciones subtóxicas de $MnCl_2$ a diferentes valores de pH | 48 |

RESUMEN

La genética toxicológica esta en la búsqueda de mas y mejores bioensayos que reflejen la calidad del ambiente y sus efectos biológicos. El presente trabajo evaluó el efecto del pH sobre la teratogenicidad del cloruro de manganeso ($MnCl_2$) a través de la inducción de daño teratogénico en embriones del pez cebrá (*Danio rerio*, Hamilton, 1822), como un proceso de validación de la prueba DarTa (*Danio rerio* Teratology assay), para ello se trabajo inicialmente determinando el rango ideal de pH, el cual se encuentra entre 6-8, y se determinó a través de los índices de fertilidad y viabilidad, encontrándose muerte ácida a pH 5 y baja viabilidad a pH 9.

El siguiente paso fue determinar la influencia del pH, en la inducción de daño teratogénico del $MnCl_2$ (teratógeno de regencia) a dos concentraciones (0.158 $\mu g/l$, y 0.316 $\mu g/l$).Teniendo como resultado una mayor frecuencia de malformaciones en pH 6 con la concentración menor, disminuyendo el efecto teratogénico a valores de pH más altos. Para la concentración mayor del compuesto, el efecto fue inverso; esto es, a pH 8 fue mayor el número de malformaciones presentes y disminuían conforme bajaban los valores de pH. Por lo tanto se concluyó que el pH influye de manera determinante en el efecto teratogénico del $MnCl_2$, mostrando una correlación entre la concentración del compuesto y los diferentes valores de pH analizados.

INTRODUCCION

En años recientes, se ha dado gran importancia a los efectos nocivos producidos por los contaminantes, tanto en ecosistemas como en un sistema biológico en particular. En la actualidad las investigaciones en toxicología evalúan los efectos nocivos producidos por agentes xenobióticos a nivel biológico, debido a que los contaminantes ambientales han ido aumentando considerablemente en su número y concentración, favoreciendo la interacción de estos con los diferentes organismos de un ecosistema (Fericola, 1992a). La problemática de la contaminación ambiental, se ha convertido en un tema de vital importancia para la humanidad, debido a la gravedad de los efectos de las diferentes sustancias químicas al propagarse e interactuar con los seres vivos (Fericola, 1992b).

Estos agentes pueden manifestar efectos tóxicos, mutagénicos, teratogénicos y/o carcinogénicos. Para la evaluación de dichos efectos, existen pruebas de detección de daño, las cuales se basan en la utilización de bioensayos y bioindicadores que permitan determinar la calidad ambiental (Duffus, 1983). Los bioensayos y biomonitores han sido empleados como sistemas de alerta ante cambios ambientales generados por la presencia de diversos compuestos tóxicos (Butterworth, 1995). Dentro de estos, el pez cebra (*Danio rerio*) es uno de los mejores bioindicadores para evaluar la calidad ambiental en sistemas acuáticos, es un organismo con diversas ventajas metodológicas, genéticas y morfológicas que facilitan su estudio (Nagel, 2000). Aunado a que, las propiedades físico-químicas del agua influyen en la movilidad de los compuestos. Por ejemplo el pH en sistemas acuáticos puede afectar tanto la solubilidad como la biodisponibilidad de agentes químicos (Reyes y Almeida, 1992). Recientemente el manganeso se considera un compuesto químico peligroso desde el punto de vista ambiental del que no se dispone mucha información en lo referente a sus efectos y modos de acción en el ambiente (Crosby, 1998). Por lo que es necesario estudiar sus posibles efectos en el entorno.

1.- ANTECEDENTES

1.1 CONTAMINACIÓN

Durante las últimas décadas se ha dado un gran enfoque a problemas relacionados con la contaminación a nivel mundial, basados principalmente en evitar la contaminación ambiental e impedir la entrada de contaminantes al ambiente, así como aplicar sistemas de tratamiento hacia agentes químicos ajenos al agua, aire, suelo, flora y fauna (Solís y López, 2003).

En la actualidad, debido al aumento de sustancias que entran al ambiente, se ha rebasado la capacidad de los sistemas para asimilar, transformar o bien eliminar estas sustancias, lo que deriva en una acumulación de materia o energía, acumulación que se conoce con el nombre de contaminación (Albert, 1997).

Recientemente se han detectado más de 100,000 tipos de sustancias que afectan o alteran los sistemas biológicos. Estas que pueden ser de origen natural o por la actividad antropogénica (la industrialización, el crecimiento demográfico), y ha ido aumentando la presencia de agentes que por su alta concentración son dañinos tanto para los organismos como para los ambientes (Vega, 1985a).

El movimiento de contaminantes a través de agua, el aire, la tierra y la biota, así como sus interacciones y modificaciones en cada uno de estos ámbitos han sido poco estudiados debido a su grado de complejidad y dependencia de factores múltiples como concentración, temperatura, propiedades físicas y químicas del compuesto, entre otros (Albert, 1997).

Las formas de materia que exceden las concentraciones naturales y causan efectos adversos en un sistema se consideran como contaminante tóxico. (Albert, 1997). Los efectos adversos ocurren, por que las sustancias no pueden eliminarse fácilmente del sistema y se acumulan de manera excesiva.

Se distinguen tres tipos de contaminación en cuanto a la naturaleza del agente contaminante (Tabla I).

Tabla. I Tipos de contaminación (Modificado de Albert, 1988)

| Tipo | Ejemplos | Medidas de Prevención y Control |
|-------------|--|---|
| Biológica | Virus Bacterias Protozoarios Otros parásitos Hongos Vegetales | Vacunación Higiene y saneamiento |
| Física | Calor Ruido Radiaciones | Elimina las fuentes de origen Implantar medidas de protección pertinentes |
| Química | Hidrocarburos Metales Plaguicidas | Eliminar, controlar o disminuir la producción y su uso. Medidas de protección ambiental y humana Legislación |

1.2 TOXICOLOGÍA

La toxicología es la ciencia que estudia los efectos nocivos producidos por los agentes químicos sobre los organismos, cuyo objetivo es evaluar el riesgo y establecer el uso adecuado de los agentes químicos (Fernicola, 1987).

La toxicidad se define como la capacidad inherente a un agente químico de producir un efecto nocivo sobre el organismo, por lo que se requiere de tres elementos básicos para esta interrelación: primero, un agente químico definido como cualquier sustancia orgánica e inorgánica con una estructura definida que sea capaz de producir un efecto, en segundo lugar se necesita también un sistema biológico con el cual el agente químico pueda interactuar para producir el efecto y en tercer lugar un medio para que puedan ponerse en contacto e interactuar (Fernicola, 1987).

1.2.1 PRUEBAS DE TOXICIDAD

Para evaluar los efectos antes mencionados se requieren de pruebas de toxicidad como por ejemplo:

- a) **Toxicidad aguda:** Se determina a partir de la dosis letal (LD₅₀) las manifestaciones clínicas y patológicas de la intoxicación aguda, y es una de las pruebas preliminares de cualquier estudio de este tipo.
- b) **Biotransformación y toxicocinética:** La cual determina cualitativamente la interacción entre el "tóxico" y el "organismo"; la variación en la respuesta al tóxico entre una o varias especies, y sirve para definir las características farmacocinéticas de la sustancia tóxica como absorción, distribución y eliminación.
- c) **Toxicidad genética:** Esta prueba permite demostrar cualitativamente la presencia o ausencia de actividad mutagénica o carcinogénica; sirve de guía para la evaluación y cuantificación del riesgo genético humano; demuestra efectos reproductivos y teratogénicos y desarrolla datos que puedan sustentar la evaluación de riesgo reproductivo (Fornicola, 1992a).
- d) **Toxicidad crónica:** Esta prueba caracteriza los efectos tóxicos que sólo se manifiestan después de una exposición prolongada, en particular los efectos que son irreversibles y progresivos; desarrolla datos que están relacionados con los obtenidos en los estudios de biotransformación y toxicocinética; por último sirve para evaluar el riesgo de daños cuyos efectos se manifiesta de manera tardía como el cáncer.
- e) **Evaluación cuantitativa de riesgo:** Mediante esta prueba se evalúa la probabilidad de obtener en el humano efectos tóxicos similares a los obtenidos experimentalmente, pero bajo las condiciones de los niveles reales de la exposición humana (Fornicola, 1992a).

Las sustancias que pueden encontrarse en el ambiente como resultado de actividades antropogénicas y conforme a su origen se clasifican en naturales y sintéticas (xenobióticas). Las sustancias tóxicas interactúan con los organismos de diferentes formas, produciendo diversos efectos tales como: **mutagénicos** que causan alteraciones cromosómicas en células germinales; **carcinogénicos**, que se asocian con el origen del cáncer, provocando un crecimiento desordenado de células somáticas, que pueden invadir y/o destruir

los tejidos (metástasis). Por último, los efectos **teratogénicos**, que causan alteraciones congénitas durante el desarrollo embrionario (Duffus, 1983).

Las sustancias sintetizadas por el hombre han ido en aumento hoy en día, y sólo se han podido estudiar aquellas sustancias xenobióticas o sintéticas de uso común que representan menos del 2%, por lo que es necesario establecer criterios para definir el perfil de riesgo potencial que presenta una sustancia en particular (Duffus, 1983).

Para conocer algunos efectos relacionados con la exposición a agentes tóxicos, la teratogénesis requiere investigar las causas, mecanismos, manifestaciones y desviaciones en el desarrollo embrionario (Fig. 1), teniendo como objetivo estudiar principalmente malformaciones y/o alteraciones fisiológicas, producidas por la administración de agentes químicos. Debido a que durante la etapa embrionaria, las células experimentan una diferenciación, movilización y cambios en su organización; en este período existe una mayor susceptibilidad de daño a los agentes xenobióticos (Chamorro, 1997).

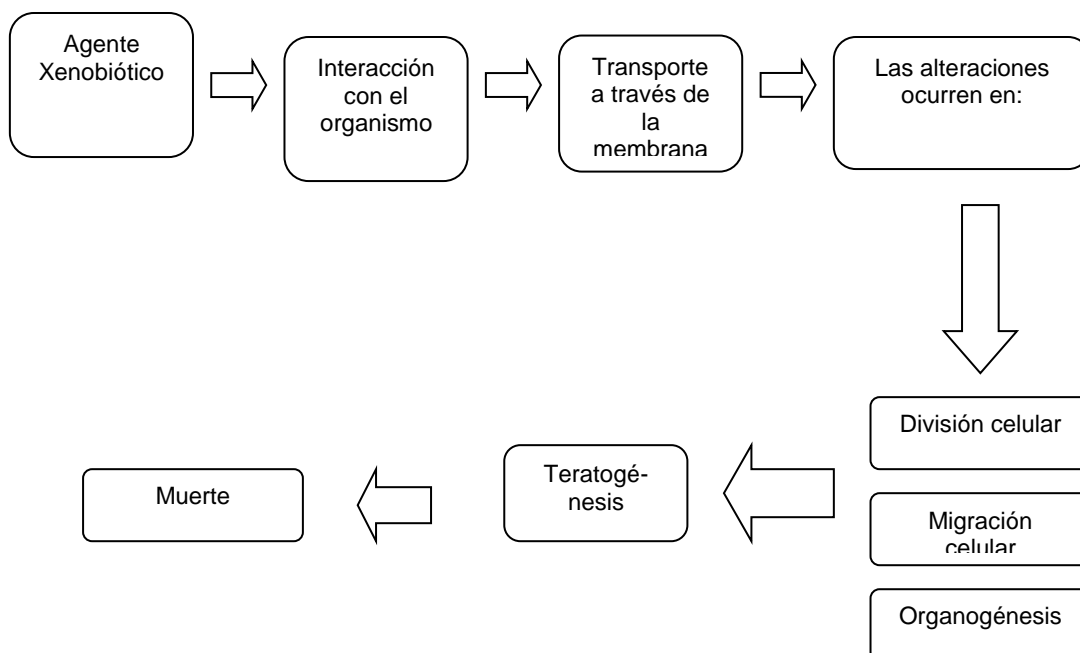


Figura 1. Vía potencial de inducción de teratogénesis (Modificado de Finnel, 1995.)

Para la evaluación de los efectos antes mencionados, se requiere tener en cuenta las variables de una exposición, por ejemplo, si varía el tiempo de contacto del agente xenobiótico con el organismo o con la concentración:

- **Exposición aguda:** la cual se produce por una exposición de corta duración, en donde el agente químico es absorbido rápidamente, ya sea en una o varias dosis, en un período corto (depende del ciclo de vida del organismo expuesto) por lo que los efectos se evidencian de manera inmediata.
- **Exposición subaguda:** producida ante exposiciones frecuentes o repetidas durante varios días o semanas, a concentraciones altas o intermedias, por lo que los efectos se evidencian de forma retardada.
- **Exposición crónica:** producida por exposiciones repetidas de varias dosis y a concentraciones bajas en un rango amplio de tiempo. Los efectos se producen, porque el agente y/o sus metabolitos se acumulan en el organismo, por lo que la cantidad eliminada es menor que la absorbida, y sus efectos producidos se pueden sumar (Cantu, 2000).

El objetivo de la toxicología es evaluar el riesgo relacionado con el uso de las sustancias químicas, y establecer los límites de seguridad en el uso de las mismas; la cual se alcanza evaluando la toxicidad de cada agente químico y sus posibles interacciones en diferentes organismos, denominados también como bioensayos (Fenicola, 1992b).

Fenicola (1992c) menciona que existen diferentes áreas de la toxicología que permiten evaluar los efectos en el hombre, al interactuar con agentes xenobióticos asociados a su estilo de vida actual, por ejemplo:

- Toxicología de alimentos
- Toxicología ambiental
- Toxicología de medicamentos
- Toxicología ocupacional
- Toxicología social

- Toxicología genética

La toxicología presenta tres especialidades de gran interés debido a que se reflejan en diferentes campos de acción:

- **Toxicología experimental:** que se encarga de llevar a cabo experimentos *in vivo* e *in vitro*, utilizando animales, órganos y células con el objetivo de determinar el potencial tóxico de las sustancias químicas (Vettorazzi, 1987).
- **Toxicología prospectiva:** encargada del proceso de evaluación de seguridad de las sustancias químicas, incluyendo valoración de riesgo y los aspectos epidemiológicos para confirmar datos prospectivos experimentales (Vettorazzi, 1987).
- **Toxicología de la reglamentación:** relaciona toxicología ambiental con los aspectos de reglamentación que se enfocan a la preservación del medio ambiente (Vettorazzi, 1987).

La valoración toxicológica es la clave para el progreso en el conocimiento del potencial tóxico de las sustancias químicas extrañas (xenobiótico) a cualquier sistema biológico viviente (Vettorazzi, 1992a).

De tal manera que la toxicología ambiental se encarga de estudiar los efectos de las sustancias tóxicas que se encuentran en ambientes naturales. La evaluación de la toxicidad se basa en la medida de letalidad a corto plazo y en la concentración letal (CL), que es del 50% de la población después de ser expuesta por un período continuo de 48 horas (Duffus, 1983).

1.3 ECOTOXICOLOGÍA

La ecotoxicología se deriva de la toxicología, y es una ciencia que se encarga no solo de evaluar los efectos de exposiciones a nivel organismo, sino que se preocupa en evaluar efectos a otro nivel como poblaciones o comunidades. Para ello, se preocupa de identificar fuentes de contaminación, cinética ambiental, vida media etc. (Moriarty, 1999).

También desarrolla todos los pasos implicados en la evaluación del riesgo ecológico, utilizando métodos toxicológicos, químicos y ecológicos, para describir la interacción entre agentes contaminantes y organismos; agentes contaminantes y ecosistemas y entre organismos y ecosistemas, respectivamente (Medina y Encina, 2003).

La ecotoxicología tiene como propósito evaluar, monitorear y predecir el destino de las sustancias xenobióticas, y por consiguiente integrar el conocimiento de otras ciencias como química, toxicología, farmacología, epidemiología, ecología etc., para determinar el comportamiento de un contaminante desde que se libera a partir de una fuente, las vías de transporte así como su destino final en el ambiente (Sánchez, 2003).

La exposición de un organismo a un contaminante depende de la vía de exposición, su concentración, la frecuencia, el tiempo, así como de variables físico-químicas del compuesto, las cuales también pueden afectar el efecto biológico final (Sánchez, 2003).

El efecto tóxico es producido por un metabolito derivado de un compuesto original y los efectos pueden identificarse desde el nivel molecular hasta el nivel de un ecosistema (Tabla II). Es importante entender la respuesta tóxica que presenta un organismo a una sustancia contaminante del ambiente. Por otra parte, la recuperación de información sobre los efectos que se observan en organismos del medio nos permite conocer el impacto que ha tenido el uso inadecuado de una sustancia (Duffus, 1983).

Tabla. II Niveles de efectos adversos (Sánchez, 2003).

| AREA | EFECTOS |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Toxicología | <ul style="list-style-type: none"> ○ Molecular ○ Subcelular ○ Tejido ○ Órgano ○ Sistema |
| <ul style="list-style-type: none"> • Ecotoxicología | <ul style="list-style-type: none"> ○ Organismo ○ Poblaciones ○ Comunidades ○ Ecosistemas |

Los estudios ecotoxicológicos se basan en el uso de datos para entender la respuesta tóxica que presenta un organismo a una sustancia contaminante del ambiente, así como de los efectos que se observan en organismos presentes en el medio, esto permite saber la susceptibilidad del organismo hacia agentes contaminantes ajenos al sistema (Duffus, 1983).

Los efectos de un agente tóxico se pueden manifestar en un ecosistema, como consecuencia de una serie de eventos en forma de cascada (Fig. 2), que van desde la liberación del agente tóxico a partir de una fuente de emisión, su distribución, transporte en el ambiente, la exposición e interacción con el organismo (Solís y López, 2003).

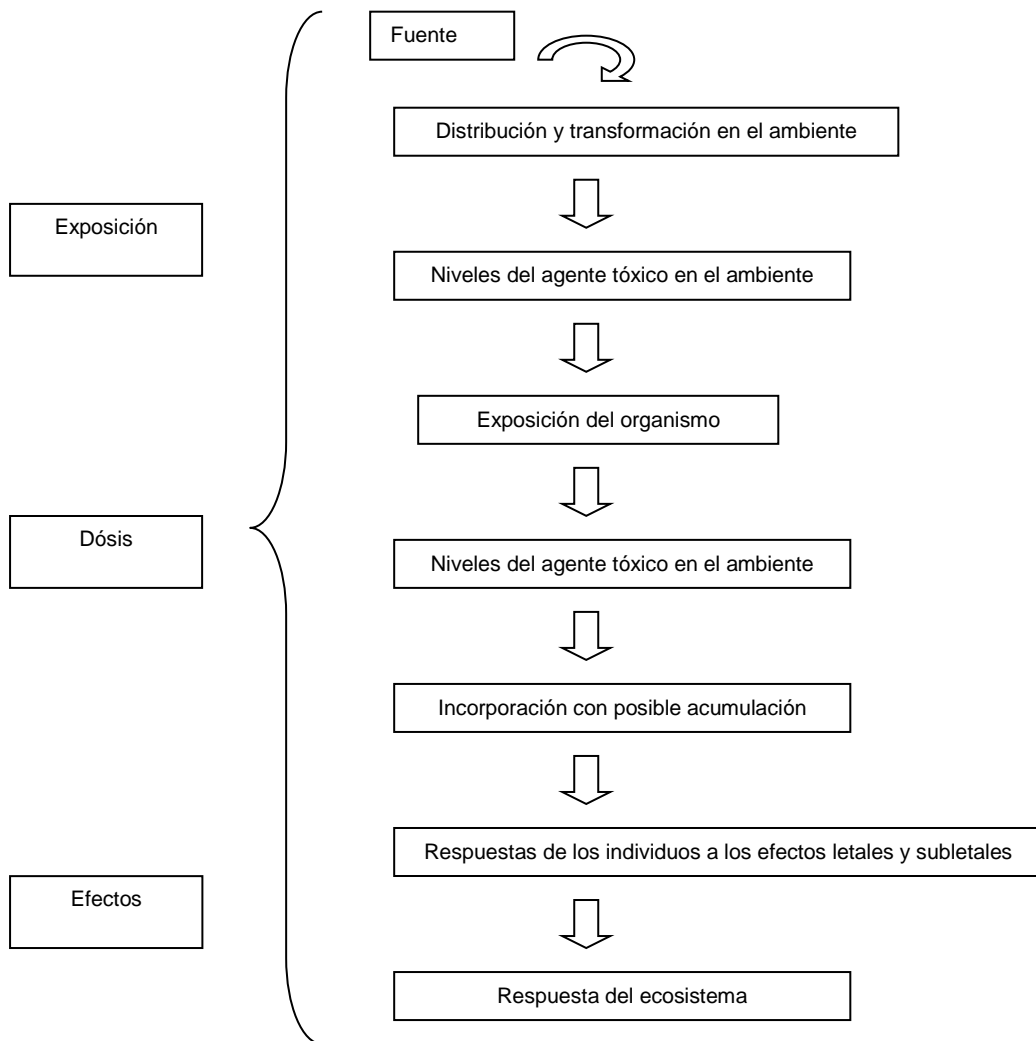


Figura 2. Respuesta de un ecosistema a los efectos adversos de los agentes tóxicos en los organismos (Solís y López, 2003).

La presencia de contaminantes naturales o antropogénicos influyen en la distribución y sobrevivencia de los organismos, a su vez produce alteraciones en la integridad fisiológica y morfológica de los organismos. Por lo que, es importante reconocer sitios donde las fuentes de contaminación sean fijas, con emisiones constantes y que sean a largo plazo, para que se puedan reflejar las adaptaciones de los organismos (Würgler y Kramers, 1992).

1.3.1 MOVIMIENTO DE CONTAMINANTES

El movimiento de contaminantes (cinética ambiental) a través de agua, aire, suelo y biota, así como sus interacciones y modificaciones en cada uno de estos ámbitos han sido poco estudiados, debido a su grado de complejidad (Vega, 1985a).

Aire

Las principales fuentes de contaminación del aire se clasifican en fijas y móviles, las primeras comprenden las emisiones provenientes de procesos mineros e industriales y las segundas son provenientes de las emisiones de los vehículos de combustión interna. De manera alternativa y poco significativa el aire también se puede contaminar por sustancias provenientes del suelo y de las aguas.

Agua y suelo

En aguas y suelos, en cambio, se vierte una diversidad de sustancias principalmente de origen antropogénico líquido y sólido, de la actividad agrícola así como contaminante atmosférica arrastrados por la lluvia, la mayor trascendencia la tienen los residuos industriales líquidos y la actividad agrícola. La contaminación de agua, aire y suelo (Fig. 3) crea un riesgo adicional para el hombre que corresponde a la incorporación de los contaminantes existentes en dichos medios a los alimentos y cadenas alimentarias que culminan en el consumo humano (Vega, 1985a).

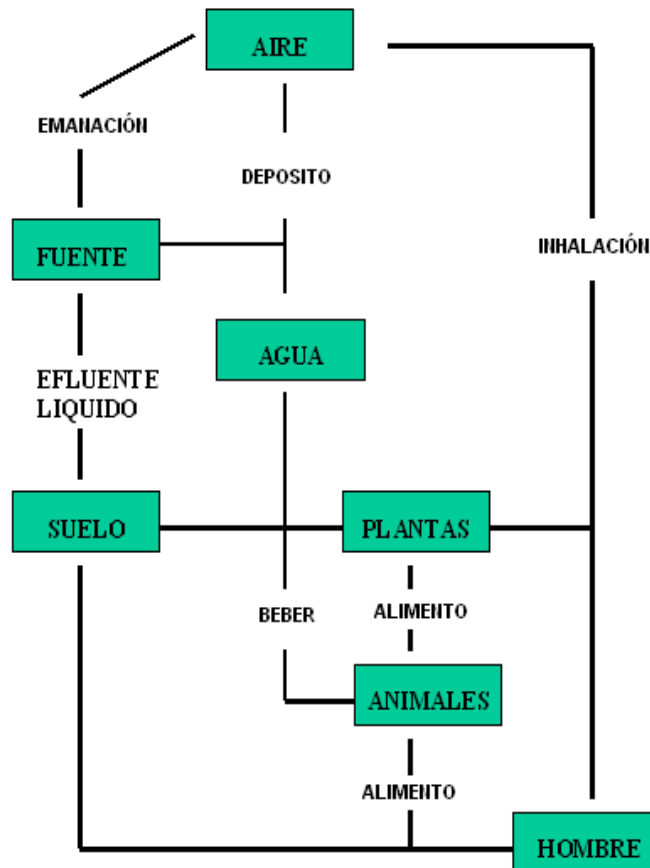


Figura 3. Cinética de contaminantes ambientales (Vega, 1985a).

1.3.2 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL AGUA RELEVANTES EN ESTUDIOS DE ECOTOXICOLOGÍA

Las propiedades físico químicas del agua, pueden influir en varios factores relevantes desde el punto de vista de la ecotoxicología, sobre todo en ambientes acuáticos, como por ejemplo, la movilidad de los compuestos en el ambiente (cinética ambiental), en su biodisponibilidad, y en factores reproductivos de los organismos, entre otros (Vega, 1985c).

1.3.2.1 Temperatura

Determina la estabilidad y la estratificación del agua, es decir, cambia de temperatura con lentitud debido a su poder calorífico, debido a que almacena gran cantidad de calor sin un gran cambio en su temperatura. La densidad de los compuestos disueltos en el agua depende fundamentalmente de la temperatura, es decir, si temperatura disminuye la densidad también; de igual

forma puede afectar su cinética ambiental, debido a que la evaporación favorece la concentración de compuestos en el agua y el acarreo de otros en sus vapores. Influye en los sistemas biológicos, afectando la permeabilidad de la membranas, así como otros factores biológicos, como por ejemplo, el ciclo de vida de los organismos acuáticos, su conducta reproductiva e incluso factores de distribución entre otros (Colin y Jiménez 2003; Peña, 2008).

1.3.2.2 pH

El pH es una medida de acidez de soluciones acuosas, debido al ion hidrónico (H_3O^+), por tanto el pH es una medida de concentración de iones hidrónico, que se expresa en forma logarítmica.

$$pH = -\log_{10} (H_3O^+)$$

El pH es un coeficiente fundamental de la química del agua ya que influye en el equilibrio en la concentración de amoníaco, ácido nitroso y dióxido de carbono, así como el grado de nitrificación (Gargas, 1995).

El pH esta influenciado por cambios en la alcalinidad del agua, la cual expresa la suma de aniones capaces de neutralizar un ácido, determinada por la concentración de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos en agua. Las aguas alcalinas tienen un pH alto así como elevados niveles de sólidos disueltos, por lo que es importante reconocer la diferencia entre acidez y la alcalinidad que se refiere a la alta capacidad de aceptar protones en el medio (Colin y Jiménez, 2003).

El pH puede influir en la cinética y biodisponibilidad de algunos contaminantes ambientales, como por ejemplo los metales pesados, que a pH ácidos se precipitan en ambientes acuáticos y a pH básicos se solubilizan, favoreciendo su movilidad y biodisponibilidad al atravesar más fácilmente las membranas biológicas. Por otra parte, se sabe que el pH puede afectar las propiedades físicas y químicas de los compuestos con los que interactúe y por ende sus efectos biológicos (Vega, 1985c; Wittaker, 1981).

La absorción de metales en el agua esta fuertemente influenciada por el pH del medio. Dicho efecto es a nivel de la biodisponibilidad de iones metálicos en su forma absorbible en solución y a nivel de la activación de grupos funcionales en la superficie del absorbente La formación hidroxocomplejos de metales en solución acuosa, condiciona la especie química en la cual el catión se encuentra presente. Dicho comportamiento es regulado por el pH, entendido como el equilibrio de los iones hidronio e oxhidrilo en solución; de tal forma que proporciona los ligandos a los que estará unido el ion metálico. (Navarro *et al.*, 2006).

La química acuosa del ion metálico es el papel más importante que desempeña el pH en la absorción de iones metálicos. Los metales de transición, entre los cuales se encuentran la mayoría de los metales pesados, se caracterizan por su habilidad en la formación de complejos de coordinación con ligandos que poseen pares de electrones libres, en busca de la estabilización de sus vacantes (Navarro *et al.*, 2006).

Como menciona Navarro (2006), la molécula de agua es catalogada como un excelente ligando y la formación de aquocomplejos con cationes metálicos en solución acuosa es inevitable. La formación de complejos con el agua es regulada por el pH, ya que a altos valores de pH, la concentración de iones oxhidrilo aumenta en la solución y es capaz de formar hidroxocomplejos, los cuales no sólo aumentan el volumen del catión sino que disminuyen su carga neta, disminuyendo también su afinidad con el absorbente.

1.3.2.3 Conductividad

La conductividad es la capacidad para conducir la corriente eléctrica y es proporcional a la concentración de iones en solución (sales inorgánicas). Esta asociada a la concentración de sales y afecta factores biológicos como la absorción en las raíces de las plantas y membranas biológicas y la reproducción. La conductividad puede variar según la temperatura (Arratia, 2004)

1.3.2.4 Solubilidad

La solubilidad del agua muestra que es un buen solvente de compuestos iónicos así como de compuestos polares. Uno de los factores más importantes sobre la solubilidad es la condición iónica, que se define como la cantidad de un soluto requerida para formar una solución saturada en una cantidad definida de algún disolvente en condiciones de temperatura y presión específicas (Wittaker, 1981).

1.3.2.5 Dureza

La dureza total es la suma de la concentración de cationes bivalentes disueltos en el agua, son expresados como partes por millón (ppm) de carbonato de calcio (CaCO_3). El ion calcio (Ca^{2+}) y el ion magnesio (Mg^{2+}), son los únicos cationes bivalentes que se encuentran comúnmente en las aguas de acuario. La dureza del agua es un factor importante dado que la reproducción de algunas especies de peces no tendrá gran éxito en el agua dura, y aún cuando esto ocurra, la incubación de los huevos será muy poco viable (Gargas, 1995).

1.3.2.6 Turbidez

La turbidez esta en función de la presencia de materia orgánica en suspensión, la cual se dispersa y absorbe luz; esta relacionada con la actividad fotosintética y por ende de la oxigenación del agua, sobretodo en aguas con poco movimiento, que afectan la distribución y conducta de algunos organismos (Colin y Jiménez, 2003).

1.4 TOXICOLOGÍA DE LOS METALES

Los metales tienen la capacidad de combinarse con una gran cantidad de moléculas orgánicas, el grupo de los denominados metales pesados comprende 40 elementos químicos que tienen una densidad mayor a 5, la toxicidad de estos metales presenta características comunes y específicas de cada uno (Vega, 1985c).

Dentro de las principales fuentes de contaminación del agua se encuentran los metales pesados cuya principal fuente de emisión son la

industria metalúrgica, petrolera, automotriz y química. Su importancia radica en su concentración y en el estado de oxidación que presenten cuando se encuentran contaminando el ambiente, que por su concentración pueden producir efectos negativos en la salud humana, flora y fauna (Solís y López, 2003).

La acción toxicológica de los contaminantes esta determinada por su biodisponibilidad, así como de las reacciones bioquímicas y fisiológicas (Fig. 4). La interacción entre el tóxico y el organismo esta representada por varias fases interconectadas, donde la "r" representa una sustancia reactiva que interacciona con macromoléculas y membranas, representados por la "M", por lo que se producen cambios (X), (Y), (Z), que no presentan efectos tóxicos; por el contrario los cambios A,B,C con efectos tóxicos (Vega, 1985c).

El transporte de metales a través de las membranas celulares difiere según la composición y propiedades físico-químicas del compuesto así como de los organismos con los que interactúa. Por tanto la concentración de un metal tóxico en la célula esta en función del tiempo de exposición como de los patrones toxicocinéticos del metal (Vega, 1985c).

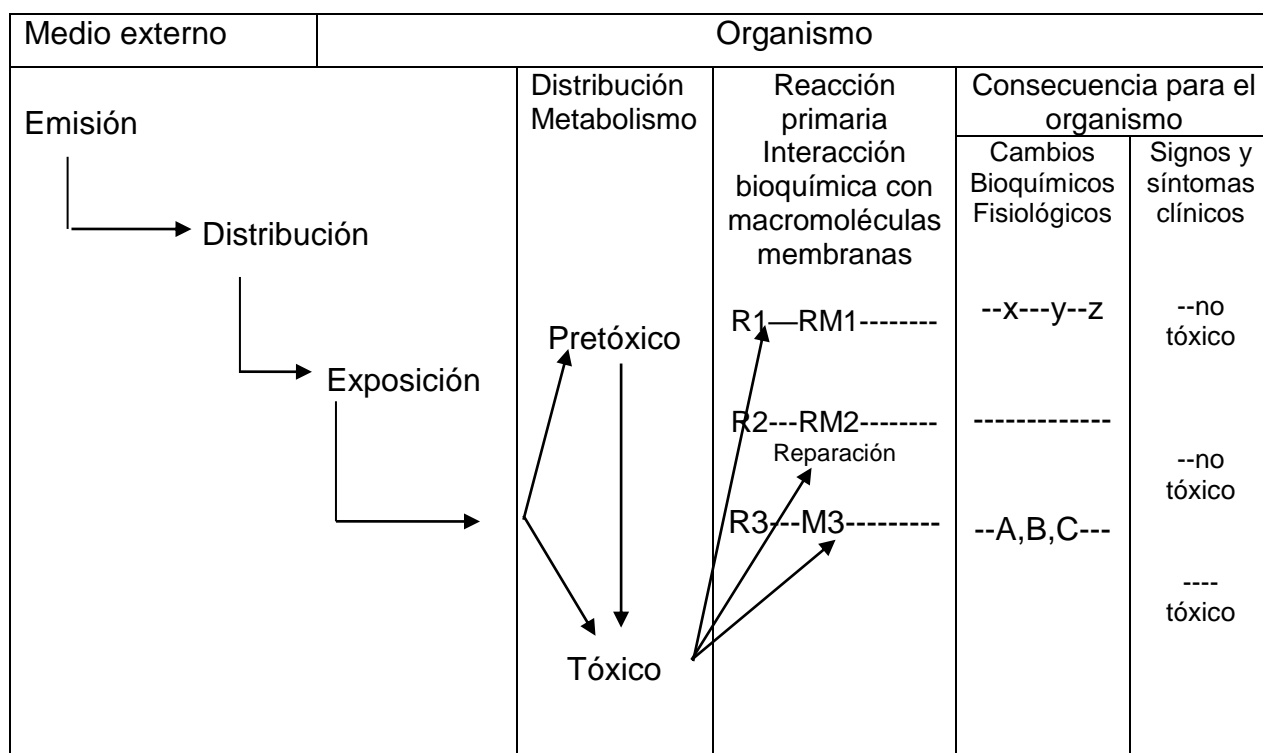


Figura 4. Interacción entre una sustancia tóxica y un organismo (Vega, 1985c)

1.5 MANGANESO

El manganeso (Mn) es un elemento químico, de número atómico 25 y peso atómico 54.938; es uno de los metales de transición del primer período largo de la tabla periódica, es un metal bastante reactivo y uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre. Se encuentra en la tierra, los sedimentos, las rocas, el agua y los productos biológicos. (Wittaker, 1981)

Entre los minerales que contienen manganeso, los óxidos, carbonatos y silicatos son las formas más importantes. El manganeso puede presentarse en ocho estados de oxidación diferentes, de los que los más importantes son: +2, +3 y +7 (Förstner y Wittman, 1983).

El uso del manganeso está ampliamente extendido, los principales productores son Rusia, India, Brasil y Ghana. El 95% de la producción de Mn se consume en Estados Unidos con fines metalúrgicos, 2.5% en pilas secas y 1.2% para reactivos químicos (Wittaker, 1981). Se utiliza en la producción de acero como reactivo para reducir el oxígeno y el azufre, y como agente de aleación para la fabricación de aceros especiales, aluminio y cobre. En la industria química se utiliza como agente oxidante y para la producción de permanganato de potasio y otros productos químicos derivados del manganeso (Nordberg, 2001).

Se utiliza como recubrimiento de electrodos en varillas de soldadura, en los trituradores de rocas y en las agujas y cambios de vía de los ferrocarriles. También se emplea en la fabricación de cerámica, cerillas, vidrio y tintes. Algunas sales de manganeso se utilizan como fertilizantes y como secantes para el aceite de linaza, en la fabricación de vidrio, como decolorantes de textiles y en el curtido de pieles (Nordberg, 2001).

La toxicidad de los distintos compuestos de manganeso parece depender del tipo de ion manganeso y de su estado de oxidación. Cuanto

menos oxidado esté el compuesto, mayor será su toxicidad. La intoxicación crónica por manganeso puede tener manifestaciones nerviosas o pulmonares, producen desórdenes neurológicos y psiquiátricos durante exposición laboral a este compuesto, principalmente por inhalación (Donaldson, 1987; Nordberg, 2001).

Tras su inhalación el manganeso absorbido se elimina rápidamente de la sangre y se distribuye principalmente en el hígado. El exceso de metal se puede distribuir en otros tejidos, como los riñones, el intestino delgado, las glándulas endocrinas y los huesos. El manganeso se acumula en los tejidos ricos en mitocondrias y atraviesa las barreras hematoencefálica y placentaria (Nordberg, 2001).

Biológicamente es un micronutriente esencial para todos los organismos; en cantidades excesivas, tiene un efecto dual, es decir, que puede tener efectos negativos, provocando en algunos organismos calambres, temblores, alucinaciones y disfunción renal (Duffus, 1983). 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; 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).

La temperatura puede influenciar en la solubilidad de un compuesto así como en la disponibilidad de este en los sistemas biológicos, el equilibrio entre todas las formas, está fuertemente influenciado por el pH, dándose preeminencias estacionales entre las formas manganosas y mangánicas que están asociadas a los procesos biológicos (Zajic, 1969).

El distrito de Molango, en el estado de Hidalgo, posee uno de los mayores yacimientos de manganeso del mundo. La exploración y extracción del mineral, iniciada en 1960, generó preocupación cuando se hizo evidente la contaminación proveniente de las minas y de las plantas procesadoras. Actualmente existen proyectos que analizan los impactos ambientales y sobre

la salud de la minería de manganeso utilizando un enfoque ecosistémico (IDRC, 2006).

Estos examinan las fuentes de contaminación del agua y el aire, junto con muestras de sangre de los habitantes de las comunidades cercanas a las minas. Y encontraron que el aire más que el agua era la principal fuente de exposición al manganeso y que había una fuerte correlación entre la exposición y el desarrollo de deficiencias motoras, especialmente en mujeres y niños. El daño neurológico derivado de la exposición produce síntomas similares a la enfermedad de Parkinson (IDRC, 2006).

1.6 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

La evaluación biológica se realiza en muestras del organismo expuesto, identificando su biotransformación, producto de la asimilación de agentes químicos presentes en el ambiente. Estos agentes químicos causan efectos tóxicos en los organismos y se ven reflejados cuando presentan daños a nivel genético, expresándose en su morfología externa (Vega, 1985b).

La biodisponibilidad y la concentración de los agentes contaminantes son superiores en el medio acuoso respecto al terrestre y al aéreo, existiendo una mayor concentración de contaminantes e interactuando con diferentes organismos en este medio (Vega, 1985b).

1.7 BIOINDICADORES

Un bioindicador se define como un organismo característico de un ambiente que puede cuantificar la magnitud del estrés, características del hábitat, grado de exposición al estresor o el grado de respuesta biológica, desde el nivel molecular, poblacional y de comunidad. Los bioindicadores permiten determinar la evaluación de riesgo por la exposición de agentes contaminantes, estableciendo una magnitud de daño; utilizando alteraciones como cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos (Vega, 1985 b).

Los bioindicadores deben tener características específicas como: altamente sensible, bajo costo de mantenimiento, que sea capaz de evaluar mezclas complejas así como diferentes ambientes (agua, suelo, aire) y que den resultados en un corto plazo (Butterworth, 1995).

La práctica con bioindicadores para evaluar la calidad del ambiente tiene una larga historia remontándose al uso de canarios por los mineros para detectar concentraciones altas de monóxido de carbono en las minas (Butterworth, 1995).

Otro ejemplo muy particular de la exposición de un agente químico cuyos efectos biológicos resaltaron fue en 1959. En esta década se presentaron varios sucesos; en Marruecos, la adulteración de aceite de olivo con petróleo (que contenía triortocresil-fosfato), el cual produjo diversos grados de parálisis por desmineralización en 10, 000 personas; en Minamata Japón, una fábrica que vertió desechos que contenían dimetil mercurio a un afluyente, provocó la contaminación de las fuentes primarias de alimentos como peces, moluscos y crustáceos, induciendo afecciones neurológicas de carácter teratogénico (Cantú, 2000).

Sin duda, estos acontecimientos no sólo pasan a ser parte de las estadísticas, sino que producen efectos tóxicos agudos a corto y a largo plazo como cáncer, alteraciones a nivel reproductivo, malformaciones, o bien, mutaciones que se pueden presentar en los mismos descendientes; de tal manera que los bioindicadores permiten identificar organismos sensibles; así como organismos tolerantes a diversos tipos de contaminación, valorando el impacto biológico a nivel ambiental e individual (Fericola, 1992b).

En algunos casos, el hombre es el principal objeto de estudio de los efectos de los agentes contaminantes ambientales. Por ejemplo, el monóxido de carbono es uno de los contaminantes del aire, en el cual el organismo actúa como un mecanismo continuo de muestreo, por lo que la carboxihemoglobina en sangre está en relación con la concentración del monóxido de carbono en el aire (OMS, 1986).

1.8 BIOMARCADORES

Los biomarcadores son los cambios medibles (bioquímicos, fisiológicos y/o morfológicos) asociados a la exposición de un tóxico, que permiten estimar los efectos a través de la evaluación de parámetros biológicos significativos como caracteres genéticos, enzimáticos, fisiológicos, morfológicos, o bien, cambios en los niveles estructurales o funcionales, que indican influencias medioambientales como la acción de contaminantes en particular tanto cualitativa como cuantitativamente (Hulka, 1990).

Los biomarcadores se utilizan para advertir señales tempranas de algún problema ambiental, detectar la presencia de una exposición, determinar consecuencias biológicas de la exposición, identificar individuos sensibles de una población y permiten identificar la evaluación de riesgo tanto a nivel individual como ambiental (Butterworth, 1995).

1.9 BIOENSAYOS

Los bioensayos son otro tipo de indicadores biológicos que en condiciones controladas ya sea *in vivo* o *in vitro*, permiten correlacionar el efecto del agente físico y/o químico a nivel biológico (Markert, *et al* 1995).

1.9.1 *Danio rerio*

En la actualidad se han utilizado diferentes bioindicadores para evaluar la presencia de agentes tóxicos en un sistema biológico en particular, como son peces, insectos, ratones, etc. Estos organismos permiten evaluar los efectos de los contaminantes a diferentes niveles, ya sea tóxicos, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos, entre otros (Albert, 1997).

En particular el pez cebra (*Danio rerio*) es un organismo ideal para estudiar efectos toxicológicos durante el desarrollo embrionario. Este pez, presenta características muy específicas que facilitan su estudio, como un

desarrollo embrionario ampliamente descrito, un huevo traslúcido, ciclos de reproducción cortos, ovoposiciones inducibles, membrana traslúcida y semipermeable; además de ser de bajo costo de mantenimiento y descendencia abundante; así como, biomarcadores evidentes y de fácil análisis e identificación (Westerfield, 1995; Eisen, 1996)

Las hembras y machos del pez cebra presentan un dimorfismo sexual (Fig.5) cuando están sexualmente maduros. El macho puede distinguirse de la hembra por la forma del cuerpo, muestran una forma alargada y una baja coloración amarilla, especialmente en la aleta caudal y ventral. Por el contrario, las hembras son más robustas en la parte del vientre y presentan tonalidades plateadas lo que facilita estudios en donde se requiera identificar sexos y/o hacer cruza determinadas, como es el caso de la genética y genética toxicológica (Oberemm, 2000).



Figura 5. Dimorfismo sexual en *Danio rerio*
(a) Macho, (b) Hembra

1.9.1.1 Desarrollo embrionario de *Danio rerio*

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

Es un organismo de un desarrollo muy rápido, pues a las 24 horas puede apreciarse la segmentación del cerebro y se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda, y los somitos que son precursores de músculo y esqueleto (Kimmel, *et al* 1995). Por otra parte, el pez cebra es 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; Westerfield, 1995).

El desarrollo embrionario del pez cebra se divide en siete etapas, estas etapas se observan de manera resumida en la figura 6.

Etapa 1: se presenta minutos después de ser fertilizado el ovocito, comprendiendo las etapas de cigoto, pasando por la de segmentación y parte de la blástula (Kimmel, *et al* 1995).

Etapa 2: comprende la parte final de la etapa de blástula y la mitad de la gastrulación (Kimmel, *et al* 1995).

Etapa 3: 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 empiezan a distinguir la cabeza y la cola.

Etapa 4: se empiezan a evidenciar las estructuras de la cabeza y el 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 *et al*, 1995).

Etapa 5: la cola se desprende del vítelo formando una nueva estructura en su porción ventral, y se alarga pudiendo observar el esqueleto (columna vertebral).

Etapa 6: denominada estadio "prim 5" formación de aparato digestivo (pharyngula). Durante esta etapa comienza la melanogénesis con la pigmentación y una mejor apreciación del cráneo; en la parte posterior se empieza a distinguir la aleta caudal (Kimmel, *et al* 1995).

Etapa 7: esta última etapa se denomina "long pec". Comprende en su totalidad el período de "hatching". A partir de esta etapa el organismo ha eclosionado y el vítelo empieza a consumirse hasta desaparecer por completo, las aletas pélvicas y pectorales empiezan a desarrollarse (Kimmel, *et al* 1995).

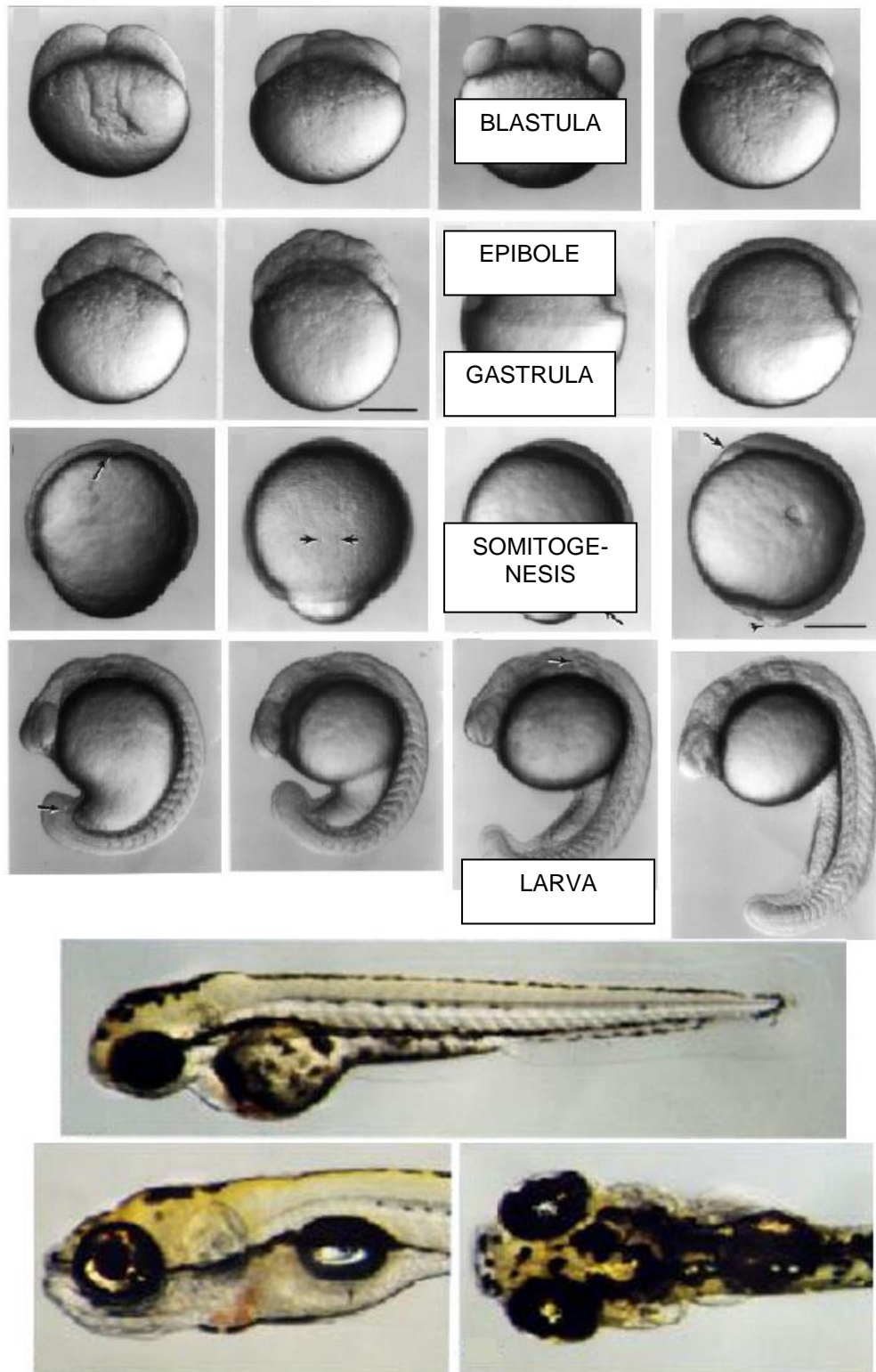


Figura 6. Estadios de desarrollo de *Danio rerio* (Maldonado, 2003).

1.9.2 TERATOGENESIS EN *Danio rerio*

El pez cebra (*Danio rerio*) es un bioindicador para evaluar efectos letales y teratogénicos mediante metodologías denominadas: DRETA (*Danio rerio* embryotoxicity and teratogenicity assay) y DarTa (*Danio rerio* teratology assay) que son pruebas muy similares, con diferentes biomarcadores finales, en donde se exponen embriones del pez durante todo el desarrollo embrionario a diferentes concentraciones de distintos compuestos, evaluándose los efectos morfo-fisiológicos en los embriones tratados, como por ejemplo: anomalías en el corazón, ojos, cabeza, aleta caudal, opérculo, pigmentación, circulación sanguínea, etc. (Dietrich 1998; Nagel, 2002; Báez, 2004; Gonzáles, 2005; Rivera, 2006; Peña, 2008).

Actualmente, en el laboratorio de Genética evolutiva y ambiental del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, se han realizado experimentos con el pez cebra a través de la prueba DarTa en la que se usa como principal biomarcador a las malformaciones en columna vertebral (Rivera, 2006); donde se han hecho varias investigaciones validando la prueba, comprobando la permeabilidad selectiva de la membrana, los momentos de eclosión, los mejores biomarcadores y principios de monitoreo ambiental con metales pesados (Báez, 2004; Gonzáles, 2005; Rivera, 2006; Peña, 2008).

De manera particular, estos estudios han reflejado efectos como los reportados por Báez (2004), en donde se utilizaron células branquiales de *Danio rerio* para evaluar el efecto genotóxico del arsénico presente en el agua del municipio de Zimapán, Hidalgo, en el cual se encontró una relación positiva entre la exposición de embriones y el efecto genotóxico generado en las células branquiales del pez; hasta los reportes recientes de Peña (2008), en donde se evaluó el efecto de la temperatura sobre el potencial teratogénico del cloruro de mercurio (HgCl₂)

1.9.3 Clasificación de malformaciones en columna vertebral (Rivera, 2006)

La siguiente clasificación fue propuesta por Rivera (2006), para el análisis de malformaciones en columna vertebral del pez cebra (*Danio rerio*), basadas en el número de malformación, posición y tipo de estas.

Malformaciones sencillas (Fig. 7)

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



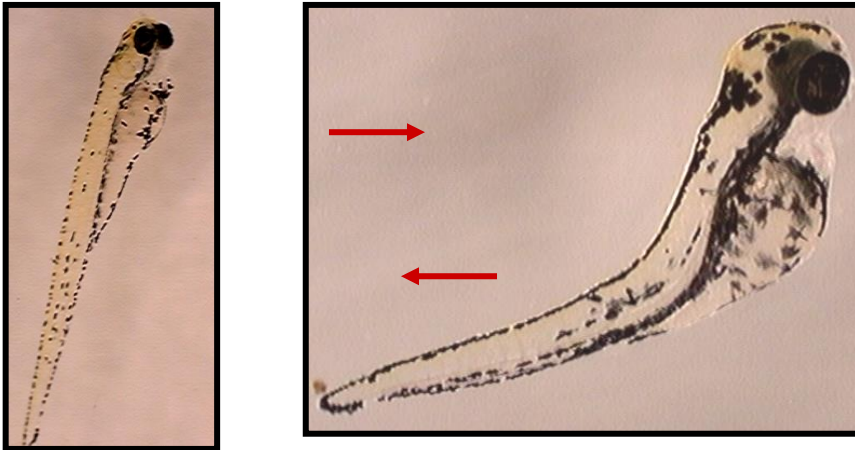
(a)

(b)

Figura 7. (a) Alevín normal de *Danio rerio* y (b) Malformación sencilla en zona cefálica de alevín de *Danio rerio*.

Malformaciones dobles (Fig. 8)

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



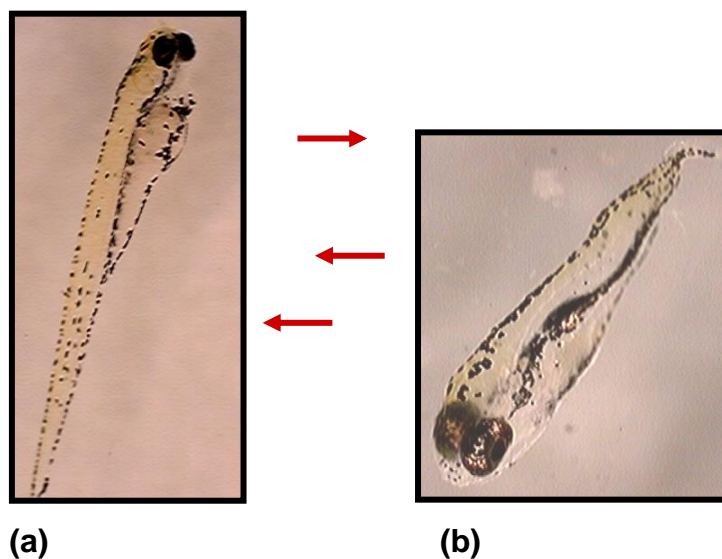
(a)

(b)

Figura 8. (a) Alevín normal del *Danio rerio* y (b) Malformación doble en zona cefálica y zona media de la columna vertebral de alevín de *Danio rerio*.

Malformaciones múltiples (Fig. 9)

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



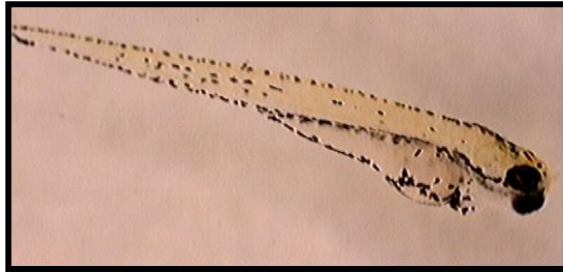
(a)

(b)

Figura 9. (a) Alevín normal de *Danio rerio* y (b) Malformación múltiple en zona cefálica, zona media de la columna vertebral y zona caudal de alevín de *Danio rerio*.

Malformaciones curvas (Fig. 10)

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



(a)



(b)

Figura 10. (a) Alevín normal de *Danio rerio* y (b) Malformación curva en la zona media de la columna vertebral de alevín de *Danio rerio*.

Malformaciones en aleta caudal (Fig. 11)

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



(a)

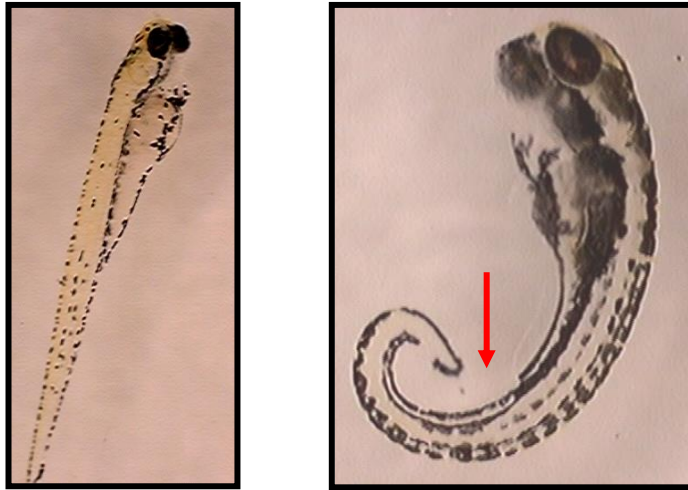


(b)

Figura 11. (a) Alevín normal de *Danio rerio* y (b) Malformación en zona caudal de alevín de *Danio rerio*.

Malformaciones en gancho (Fig. 12)

Las malformaciones en gancho son aquellas en las que el embrión de *Danio rerio*, presentó 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 12. (a) Alevín normal de *Danio rerio* y (b) Malformación en gancho en zona caudal de alevín de *Danio rerio*.

Malformaciones en espiral (Fig. 13)

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



(a)



(b)

Figura 13. (a) Alevín normal del *Danio rerio* y (b) Malformación en espiral en zona caudal de alevín de *Danio rerio*.

JUSTIFICACIÓN

En años recientes la toxicología se ha enfocado en evaluar los efectos nocivos producidos por la contaminación a nivel biológico, debido al aumento notable de los contaminantes ambientales (Duffus, 1983). Los biomonitores han sido empleados como sistema de alerta ante cambios ambientales generados por la presencia de compuestos tóxicos, ya sean de origen natural o antropogénicos (Butterworth, 1995)

Actualmente el pez cebra es considerado un buen bioensayo para evaluar ambientes acuáticos, debido a sus características biológicas, como son: huevo traslúcido, una gran variedad de malformaciones espontáneas que son susceptibles e inducibles en presencia de agentes xenobióticos de fácil reproducción y sobre todo con susceptibilidad hacia factores ambientales, ya sean químicos, físicos y/o biológicos (Nagel, 2002; Gonzáles, 2005 y Rivera, 2006).

Estudios realizados en el laboratorio de “Genética evolutiva y ambiental” del CIB-UAEH, muestran ciertas características de este bioensayo como son: la permeabilidad selectiva de la membrana, aplicando tratamientos en las primeras etapas del desarrollo embrionario, utilizando biomarcadores evidentes como la columna vertebral y demostrando la susceptibilidad al cloruro de manganeso ($MnCl_2$), manifestados en efectos teratogénicos, mediante el proceso de validación de la prueba *Danio rerio* teratology assay (DarTa) mediante la evaluación de diferentes variables físico-químicas, como la temperatura y el pH, así como la susceptibilidad hacia otros compuestos.

Debido a que se sabe que el pH en sistemas acuáticos puede afectar tanto la solubilidad como la biodisponibilidad de agentes químicos y por ende sus efectos biológicos; por ello, en proyectos de monitoreo ambiental cuando se evalúa la calidad del agua, se determina el pH entre otros parámetros físicos y químicos (Reyes y Almeida, 1992)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Determinar la influencia del pH, en la inducción de daño teratogénico de $MnCl_2$ en embriones del pez cebra a través de la prueba “*Danio rerio* Teratology assay” (DarTa).

3.2 Objetivos específicos

- Determinar el valor de pH ideal para reproducción y mantenimiento de los organismos experimentales, a través de índices de fertilidad y viabilidad.
- Evaluar los posibles efectos teratogénicos de los cambios de pH durante el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*).
- Determinar el efecto de los cambios de pH durante el desarrollo embrionario del pez cebra, sobre la teratogenicidad $MnCl_2$ a través de la inducción de malformaciones de columna vertebral usando la prueba “*Danio rerio* Teratology assay” (DarTa).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Condiciones óptimas del agua

Se colocaron dos peceras de 40 litros de agua en reposo (Fig. 14), cada una con oxigenación continua, con un calentador automático para regular la temperatura a $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, empleadas para los recambios de las peceras cuando se les haga limpieza. Se midieron y estabilizaron las condiciones físico-químicas reportadas de una pecera utilizada posteriormente para inducción a conducta reproductiva (pH, conductividad, oxígeno disuelto, temperatura, salinidad). Utilizando sales como bicarbonato de sodio y cloruro de calcio, para estabilizar propiedades físico-químicas del agua necesarias para la ovoposición de los peces. (González, 2005 y Rivera, 2006).



Figura 14. Agua en reposo para recambio bajo condiciones físico-químicas controladas

4.2 Peceras de mantenimiento y aislamiento de organismos

En una pecera de 40 litros se dio mantenimiento a un lote aproximadamente de 100 peces que se encuentran en etapa de desarrollo y maduración reproductiva (Fig. 15), proporcionándoles limpieza de dos a tres veces por semana, con alimentación continua durante todo el día, brindándoles alimento vivo periódicamente. Estos organismos se emplean experimentalmente después de cumplir un período de 15 días de aislamiento,

para asegurar la salud de los peces; así como, hábitos alimentarios y reproducción.



Figura 15. Lote experimental con aprox. 100 peces

4.3 Alimentación

Se basa principalmente en alimento en hojuela seco (Tetra Min), ya que este les proporciona los nutrientes esenciales (Tabla III) para un sano desarrollo y rápido crecimiento, se les suministró por períodos de dos a tres veces por día, una vez alimentados, se eliminaron los excesos del fondo para evitar contaminación por microorganismos (Rivera, 2006).

Tabla III. Composición de nutrientes del alimento en hojuela (Tetra Min),

| Composición | Porcentaje |
|----------------|------------|
| Proteína cruda | 46% |
| Grasa cruda | 8% |
| Fibra cruda | 2% |
| Humedad | 6% |
| Fósforo | 1.3% |
| Vitamina C | 193 mg/Kg. |

Para inducir la conducta reproductiva y obtener un mayor número de embriones por ovoposición se cambiaron los hábitos alimentarios, es decir, se proporcionó una dieta con mayor nivel de proteínas, carbohidratos, lípidos etc., se les suministró alimento vivo, en este caso se utilizó Artemia (*Daphnia spp.*), debido a que este tipo de alimento les proporciona una gran cantidad de

proteínas, así como diferentes compuestos vitamínicos y hormonales que favorecen su desarrollo (Oberemm, 2000).

4.4 Actividad de la conducta reproductiva

El siguiente paso, consintió en inducir la conducta reproductiva (Fig. 16), para ello, se utilizaron peceras de 5 litros en donde se colocaron maternidades de tela sin fondo, esto para que los huevecillos cayeran en la base de la pecera, y evitar ser consumidos por los peces adultos; se introdujeron 5 organismos adultos de pez cebra, en una proporción de tres machos y dos hembras por pecera, para asegura la fecundación. Se seleccionaron peces previamente aislados que mostraban tallas más grandes del lote experimental, para asegurar la ovoposición, con un alto índice de huevos fecundados (Gonzáles, 2005).

El cortejo y el desove inician cuando entran los primeros rayos de luz después de un periodo de oscuridad, se espera por ovoposición de cada lote aproximadamente entre 100 y 200 huevos (Kimmel, *et al* 1995).



Figura 16. Pecera de maternidad con una proporción 3 machos, 2 hembras.

Se midieron diariamente las propiedades físico-químicas del agua, estabilizándolas según la literatura consultada como se muestra en la tabla IV.

Tabla. IV Condiciones físico-químicas para inducir la conducta reproductiva (Oberemm, 2000).

| pH | Conductividad μS/cm | Oxígeno Disuelto mg/l | Temperatura °C | Salinidad % | Obscuridad/ Luz |
|----|------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------|--------------------|
| 8 | 700-800 | 4.41 | 27± 1 | .03 | 14\10 |

Los huevos son depositados en el fondo de la pecera y su desarrollo embrionario es totalmente independiente del medio, una vez ovopositados ,se

utiliza el método de sifonéo para extraer los residuos de alimento acumulado, para evitar ser contaminados por protozoarios y hongos; posteriormente los huevos se separaron con la misma técnica y se contaron los embriones viables y no viables, para determinar el índice fertilidad con la ayuda de un microscopio estereoscópico a un aumento de 40 X. (González , 2005).

La eclosión se presenta a las 72 horas de desarrollo aproximadamente, dependiendo de la temperatura, es decir, a temperaturas bajas se alarga la etapa de eclosión y se acelera a temperaturas por encima del valor promedio., registrando el número de huevos que eclosionan (índice de viabilidad) (González, 2005; Peña, 2008)

Los embriones se aislaron y mantuvieron en frascos de 100 ml cada uno con 50 embriones, donde continuaron su desarrollo, bajo condiciones de oxigenación y temperatura constantes (Rivera, 2006).

4.5 Mantenimiento de huevos y alevines

Se colocaron dos peceras de 6 litros (Fig. 17), la primera con temperatura superior a los $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ donde se mantuvo a los embriones hasta la eclosión, en la segunda la temperatura osciló de 23 a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ donde se dio mantenimiento a los alevines. Temperaturas recomendadas según Peña (2008), para su óptimo desarrollo, dependiendo si es huevo o alevín.



← Agua en reposo para la distribución a las peceras con maternidad, bajo condiciones fisicoquímicas específicas

← Peceras con lote reproductivo en una proporción tres machos por cada dos hembras

← Aislamiento de huevos hasta la etapa de eclosión para evitar contaminación

Figura 17. Lote experimental con montaje de maternidades y aislamiento de embriones hasta la etapa de eclosión

El recambio de agua para cada pecera, se realizó eliminando el 50% del agua para todas las peceras y posteriormente agregando agua en reposo para el llenado, este recambio se realizó una vez a la semana, en la pecera donde se encuentra el lote de mantenimiento y dos veces a la semana en las peceras con lotes reproductivos (Olvera, 1998; Rivera, 2006).

Para la desinfección y eliminación de formación de iones, se agregó azul de metileno es decir una gota por cada 10 litros del lote de mantenimiento y una gota a las peceras de reproducción así como sales marinas en ambas peceras (Rivera, 2006).

Con esta metodología, se obtuvieron excelentes resultados en cuanto a mantenimiento y reproducción del pez cebra (*Danio rerio*), pudiendo realizar análisis de bajo costo, con descendencia abundante y con ovoposiciones inducibles, lo que permitió realizar experimentos programables con un número de muestra significativo.

4.6 Evaluación de la influencia del pH en fertilidad y viabilidad de los embriones

Para obtener valores de pH mas exactos en un medio acuoso se llevaron acabo titulaciones ácido-base, la cual es la adición sistemática de un ácido o de una base de concentración conocida, utilizando ácido clorhídrico, para lograr un medio ácido e hidróxido de sodio para estabilizar el medio alcalino (Wolfc, 1996).

Para lograr lo anterior, se analizaron 100 embriones por cada valor de pH evaluado (5, 6, 7, 8 y 9), cada uno de los valores se corrieron con su control concurrente (repetición simultanea), en total se analizaron 1000 embriones; cada lote se distribuyó en frascos de 100 ml. (Fig. 18), introducidos en una pecera de 6 litros, con temperatura regulada con baño maría a $27^{\circ}\text{C} \pm 1$ y con oxigenación constante (Gonzáles, 2005).



Figura 18. Pecera de tratamiento con frascos de 100 ml.

Para establecer los índices de fertilidad y viabilidad se registró el número de huevos ovopositados, el número de estos que son fértiles y el número de éstos que eclosionan reportando los datos en porcentajes para índices de comparabilidad (Rivera, 2006).

4.7 Inducción del efecto teratogénico en pez cebra (*Danio rerio*) expuesto a diferentes valores de pH.

Como se mencionó anteriormente, debido a las características específicas que muestra el pez cebra (*Danio rerio*), en el laboratorio de Genética ambiental del CIB-UAEH, estudios realizados por Báez (2005), Gonzáles (2005), Rivera (2006) y Peña (2008), se postuló a la columna vertebral como un biomarcador ideal para determinar efectos teratogénicos en este organismo (pez cebra), utilizando como biomarcadores secundarios por su frecuencia y facilidad de registro al opérculo y a la aleta caudal.

En este caso se establecieron tres valores de pH (6, 7 y 8), que corresponden a uno por encima y uno por debajo del valor neutro, debido a que en el pH 5 y 9 casi no hubo viabilidad de los embriones, se registró el número y tipo de malformaciones en columna vertebral observado en los alevines en el momento de la eclosión según la clasificación de Gonzáles en el 2005; pero el tamaño de muestra varió en cada tratamiento. Se utilizaron 110 embriones viables por valor de pH, con tres repeticiones y un control concurrente, teniendo como total de muestra 110 embriones X 3 repeticiones=330 X 3 valores de pH dando un total de 990 embriones analizados. Repartidos en frasco o matraces con 100 ml. de solución bajo condiciones de pH antes mencionado. Sumergidos a baño maria en una pecera de 40 litros (Fig. 19), con temperatura regulada a 27 ± 1 °C y oxigenación constante para evitar aglomeración de los embriones.

4.8 Inducción del efecto teratogénico en pez cebra (*Danio rerio*) expuesto MnCl₂, a diferentes valores de pH.

De igual forma que en el experimento anterior, en un medio acuoso, se establecieron diferentes valores de pH, pero solo a tres valores (6, 7 y 8), debido a que en pH 5 y 9 casi no hubo viabilidad de los embriones, se registró el número y tipo de malformaciones en columna vertebral observado en los alevines en el momento de la eclosión según la clasificación de Gonzáles (2005); pero el tamaño de muestra varió en cada tratamiento, se utilizaron 110

embriones por valor de pH, por cada concentración del compuesto, con tres repeticiones y un control de embriones viables, teniendo como total de muestra 110 embriones X 3 repeticiones=330 X 2 concentraciones de $MnCl_2$ que es el teratógeno de referencia (control positivo) =660 X 3 valores de pH dando un total de 1980 embriones analizados. Repartidos en frasco o matraces con 100 ml. de solución bajo condiciones de pH y concentración del compuesto específicas. Sumergidos a baño María en una pecera de 40 litros (Fig. 20), con temperatura regulada a 27 ± 1 °C y oxigenación constante para evitar aglomeración de los embriones



Figura 19. Montaje de experimentos para evaluar el efecto teratogénico del pH



Figura 20. Montaje de experimentos con $MnCl_2$

Las dosis subtóxicas de $MnCl_2$, que se eligieron se determinaron a partir de la curva dosis respuesta siguiente (Fig. 21), en donde se muestra la toxicidad de tres concentraciones probadas, que corresponde a la LD_{23} la concentración **0.079** $\mu g/l$, la LD_{16} a la concentración de **0.158** $\mu g/l$ y la LD_{21} de **0.316** $\mu g/l$., determinándose la concentración más baja, presenta la mayor toxicidad que el resto (Villafuentes-Tellez, en prensa).

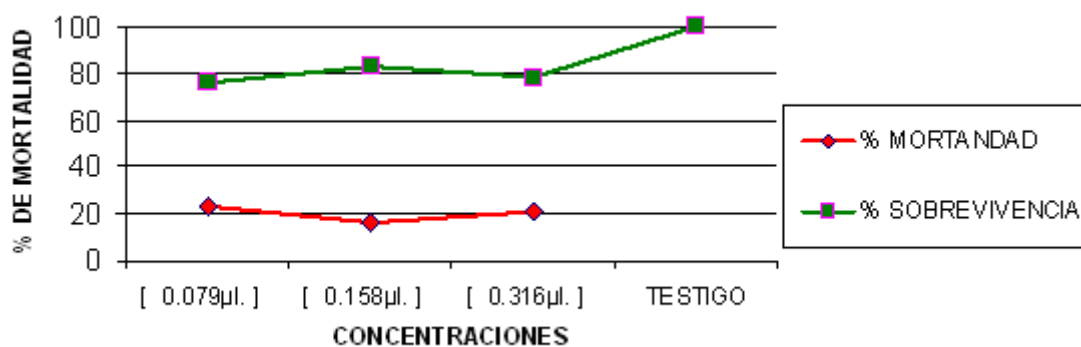


Figura 21. Dosis tóxicas y subtóxicas de $MnCl_2$

Las concentraciones utilizadas fueron 0.158 $\mu g/l$, y 0.316 $\mu g/l$, con base a los experimentos antes mencionados, de un trabajo colateral en el Laboratorio de “Genética evolutiva y ambiental” de la UAEH (Villafuentes-Tellez, en prensa).

4.9 Preparación del compuesto

Para estabilizar los diferentes valores de pH en el agua, se utilizó bicarbonato de sodio para crear un ambiente alcalino y ácido clorhídrico para ambientes ácidos, de tal manera que se obtuvieron dos soluciones madre una con pH 5 y una con pH 9, teniendo como valor inicial pH 7.6 mismo que se estabilizó a la concentraciones deseadas (6, 7,8) mediante el método de goteo de solución ácida o alcalina según sea el caso.

Diluciones por cada concentración del compuesto

Debido a que la sensibilidad de la balanza analítica, que no permitía el peso directo del compuesto para las dos concentraciones antes mencionadas de cloruro de manganeso (0.158 $\mu\text{g/l}$, y 0.316 $\mu\text{g/l}$), se elaboraron a través de diluciones continuas (Fig. 22), de la siguiente manera:

Agregar MnCl_2 (g)

| | | | |
|----------|--------------|----------------|-----------------|
| 0.0158 g | 0.000158 g/l | 0.00000158 g/l | 0.000000158 g/l |
| 0.0316 g | 0.000316 g/l | 0.00000316 g/l | 0.000000316 g/l |

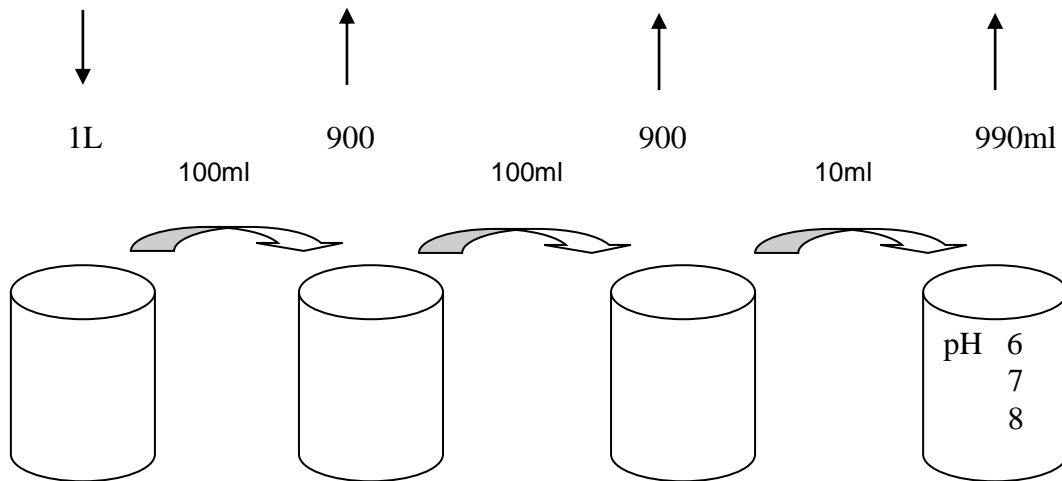


Figura 22. Esquema de dilución para la elaboración de concentraciones experimentales.

4.10 Análisis estadísticos:

Los datos fueron analizados para probar la normalidad de su distribución usando la prueba Shapiro- Wilk, y se uso un análisis de varianza de dos vías para determinar el efecto del factor pH y el factor concentración de $MnCl_2$. El primer factor tuvo tres valores (pH 6, 7,8) y el segundo factor dos concentraciones (0.158 y 0.316) del compuesto. Debido a que el tratamiento control no tuvo ningún resultado (Tabla VIII) no se utilizo en los análisis. Los datos fueron transformados usando el \log_{10} del número de malformaciones y los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SYSTAT versión 12

-Shapiro- Wilk: Se utiliza para comprobar si una muestra de datos siguen una distribución normal o no; en caso de tener la distribución normal el análisis paramétrico a través de una prueba de Anova con análisis factorial de varianza y en caso de no tener una distribución normal se utiliza Anova de dos vías, con variable de respuesta binomial (SYSTAT V. 12).

1) ANOVA de dos vías (análisis factorial de varianza)

- Es una prueba estadística para elevar el efecto de dos o mas variables independientes sobre una variable dependiente,
- Evalúa los efectos por separado de cada variable independiente y los efectos, conjuntos de dos o mas variables independientes
- Representa el efecto conjunto de dos variables independientes, aislado de los demás posibles efectos de las variables independientes (Individuales o de conjuntos). La suma de los efectos de todas estas interacciones suele proporcionarse
- En un análisis factorial no solo pueden estudiarse los efectos de los factores individuales si no también pueden estudiarse la interacción entre los factores (Hernández, 1991; Zar, 1999).

2) 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 número indeterminado de variables, haciendo todas las combinaciones posibles y detectando las combinaciones que presentan las principales diferencias significativas (Zar, 1999).

5. Resultados

Los resultados del presente trabajo parten de estudios preeliminares realizados en el laboratorio de “Genética evolutiva y ambiental” del CIB-UAEH en donde se comprobó la permeabilidad selectiva de la membrana del corion al ser expuesta a diferentes colorantes (básicos y ácidos) y a diferentes pH (Fig. 23)

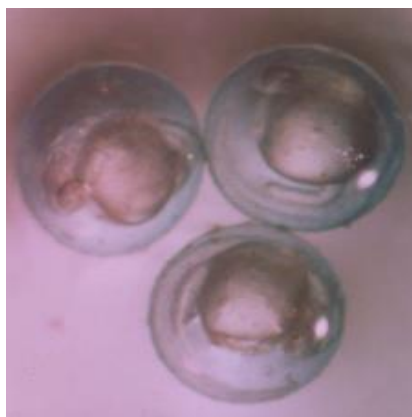


Figura 23. Permeabilidad de la membrana pH 6 con azul de metileno

La tabla V muestra las propiedades físico-químicas recomendadas por Rivera (2006) ideales para la obtención de ovoposiciones programadas, con un alto número de embriones viables, encontrándose en el presente trabajo que el valor de pH ideal varía del 7-8, encontrando mejores resultados en valores de pH de 7.5 a 8.5 debido a que se encontraron mejores índices de fertilidad y viabilidad.

Tabla. V Características físico-químicas óptimas del agua para la reproducción del pez cebra (Rivera, 2006).

| Variable | Condiciones |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| pH | 7-8 |
| Conductividad $\mu\text{S}/\text{cm}$ | 800-900 |
| Oxígeno Disuelto mg/l | 4-5 |
| Temperatura $^{\circ}\text{C}$ | 28 |
| Salinidad % | .03 |
| Obscuridad\Luz | 14/12 |
| Densidad | 2 hembras/3 machos |
| Dureza | Inferior a 4 $^{\circ}$ TAC |

Lo anterior se sustentó en los resultados de la tabla VI, en donde se puede observar que se obtiene mayor número de embriones a pH 8, en un número menor de ovoposiciones lo que permite altos índices de fertilidad y viabilidad

Tabla VI. Frecuencia de ovoposiciones en pez cebra a diferentes valores de pH

| pH | Embriones | Num. de ovoposiciones | Embriones fértiles |
|----|-----------|-----------------------|--------------------|
| 5 | 30 | 5 | 0 |
| 6 | 200 | 4 | 200 |
| 7 | 200 | 3 | 200 |
| 8 | 200 | 2 | 200 |
| 9 | 20 | 3 | 200 |

Como se puede observar en la tabla VI y figura 25, que el pH 5 y 9 presentaban una nula o baja fertilidad y viabilidad “efecto denominado muerte acida o alcalina según sea el caso” (Whitaker, 1981), lo que sustentó la decisión de que en los experimentos del presente trabajo relacionados con la genotoxicidad, solo fueron con tres valores de pH (6,7 y 8) con los que se trabajó.

Tabla VII Porcentaje de viabilidad y fertilidad de embriones de pez cebra a diferentes valores de pH

| pH | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|--------------------------------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Fertilidad Num. (%) | 30 | 200 (100%) | 200 (100%) | 200 (100%) | 200 (100%) |
| Viabilidad Num. (%) | 0 | 104 (52%) | 172 (86%) | 198 (99%) | 93 (46%) |

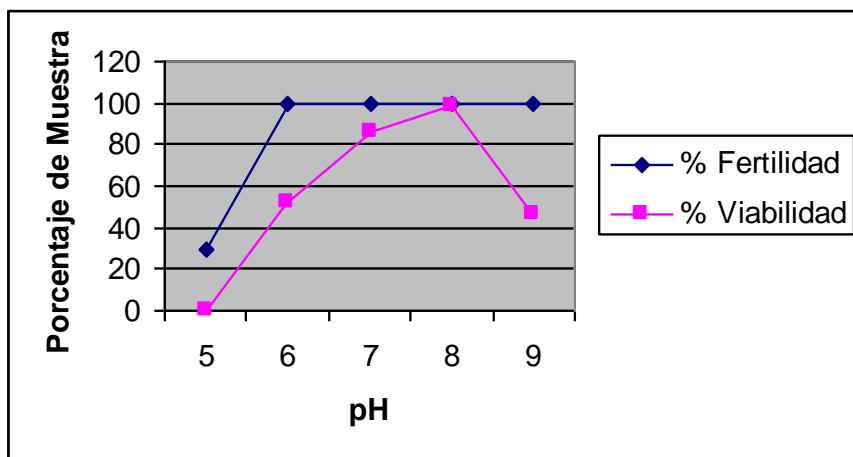


Figura 24. Influencia del pH en viabilidad y fertilidad de embriones de pez cebra a diferentes valores de pH

En cuanto a la inducción de malformaciones en columna vertebral en embriones del *Danio rerio*, sometidos a tres diferentes valores de pH (6, 7,8), para evaluar el potencial teratogénico del pH por sí sólo, se puede concluir que al menos en el valor en donde no se afecta la viabilidad de los embriones, tampoco se observa un efecto teratogénico en cuanto a la inducción de malformaciones en columna vertebral, debido a que en todos los experimentos antes mencionados, que abarcaron un tamaño de muestra de 990 embriones analizados, no se observó ni una sola malformación.

Por otra parte la inducción de malformaciones en columna vertebral en embriones del pez cebra, sometidos a tres valores de pH (6, 7,8), a dos concentraciones subtóxicas (0.158, 0.316), de $MnCl_2$, se analizaron con base a las malformaciones reportadas en columna vertebral mediante la clasificación de Gonzáles (2005) y Rivera (2006), en donde se dividió al organismo en tres áreas: cefálica, media y caudal (Fig.26), misma que clasifica e identifica el número y tipo de curvaturas sobre la columna vertebral, clasificándolas en sencilla, doble, múltiple, curva, en espiral, en aleta caudal y en forma de gancho (Rivera, 2006;Peña ,2008).

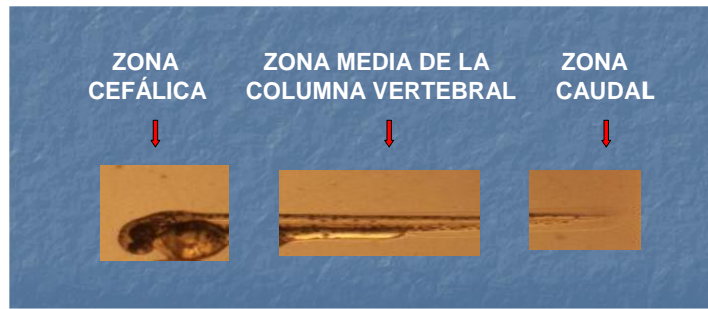
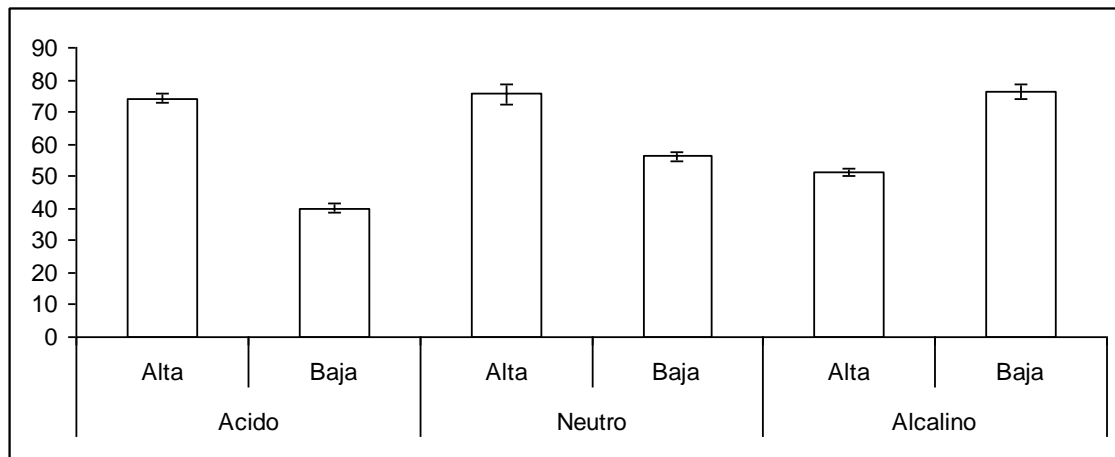


Figura 25. División arbitraria del cuerpo de *Danio rerio* (Rivera, 2006; Peña, 2008)

Como se puede observar en la figura 27 y en la tabla VII se obtuvo mayor número de malformaciones en la concentración menor de $MnCl_2$ a pH 6 y conforme el pH incrementaba sin variar la concentración del compuesto el número de malformaciones disminuyó de una manera estadísticamente significativa; a diferencia de este, la concentración más alta del compuesto, mostró un efecto inverso al variar el pH, el mayor número de malformaciones se observó a pH 8 (medio ligeramente alcalino) lo que implica la importancia del pH en una evaluación de este tipo.

Malformaciones



pH

Figura 26. Índice de frecuencias de malformaciones a dos concentraciones de $MnCl_2$ a tres valores de pH

Tabla VIII Registro de malformaciones de columna vertebral al ser tratadas a dos concentraciones subtóxicas de MnCl₂ a diferentes valores de pH

| pH | Concentración | Número de embriones por repetición | Número de repeticiones | Número de malformaciones por repetición | | | Promedio Desviación Standard | Total de malformaciones | Número y tipo de malformaciones | | | | | | |
|----|----------------|------------------------------------|------------------------|---|----------------|----------------|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|----|----|-----|---|----|---|
| | | | | R ₁ | R ₂ | R ₃ | | | S | D | M | C | E | A | G |
| 6 | 0.158 | 110 | 3 | 76 | 85 | 72 | 74.3±2.0 | 233 | 142 | 6 | 0 | 85 | 0 | 0 | 0 |
| | 0.316 | 110 | 3 | 37 | 41 | 42 | 40±2.6 | 120 | 48 | 3 | 8 | 38 | 0 | 23 | 0 |
| | Control | 110 | 1 | 0 | 0 | 0 | | 0 | | | | | | | |
| 7 | 0.158 | 110 | 3 | 70 | 81 | 76 | 75.6±5.5 | 227 | 134 | 21 | 5 | 54 | 0 | 13 | 0 |
| | 0.316 | 110 | 3 | 54 | 56 | 59 | 56.3±2.5 | 169 | 87 | 5 | 0 | 68 | 0 | 9 | 0 |
| | Control | 110 | 1 | 0 | 0 | 0 | | 0 | | | | | | | |
| 8 | 0.158 | 110 | 3 | 51 | 53 | 49 | 51±2 | 153 | 92 | 9 | 13 | 28 | 0 | 10 | 1 |
| | 0.316 | 110 | 3 | 72 | 78 | 79 | 76.3±3.7 | 229 | 47 | 16 | 66 | 85 | 0 | 12 | 3 |
| | Control | 110 | 1 | 0 | 0 | 0 | | 0 | | | | | | | |
| | | | | | | | | 1221 | 550 | 60 | 92 | 358 | 0 | 67 | 4 |

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

Lo anterior se corrobora con las siguientes figuras (28-33), en donde se pudo observar las seis principales malformaciones observadas y reportadas en la tabla VIII, en donde cabe mencionar que la malformación de tipo gancho solo se observa a pH 8 en ambas concentraciones de $MnCl_2$, lo que puede ser simplemente una particularidad pero que aporta datos para estudios futuros, en donde se intente correlacionar tipo de malformación contra tipo de agentes xenobióticos.



Figura 27. Malformación sencilla observada en etapa experimental



Figura 28. Malformación doble observada en etapa experimental



Figura 29. Malformación curva observada en etapa experimental



Figura 30. Malformaciones múltiples observadas en etapa experimental



Figura 31. Malformación en aleta caudal observada en etapa experimental



Figura 32. Malformaciones tipo gancho observada en etapa experimental

Los resultados estadísticos del análisis de Shapiro-Wilk mostraron una p con valor de 0.057 misma que muestra el \log_{10} del número de malformaciones siguen una distribución normal.

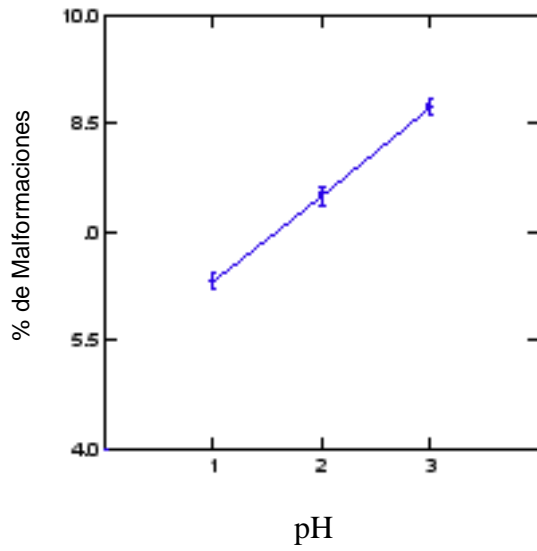
Los datos se analizaron mediante la prueba de ANOVA de dos vías (análisis factorial de varianza) se registraron diferencias entre la concentración de pH ($F=15.0$, $P=0.001$) y la concentración de $MnCl_2$ ($F=42.2$, $P=<0.001$).

La interacción entre el pH y la concentración del teratógeno fue significativo ($F141.0$, $P<0.001$) lo que demostró que en una concentración menor del compuesto a pH 7 (ligeramente ácido) los efectos teratogénicos de $MnCl_2$, presentan mayor frecuencia de malformaciones.

A concentraciones más altas del compuesto se muestra una mayor susceptibilidad de los embriones hacia ambientes ligeramente alcalinos, es decir pH 8, predominando malformaciones de tipo curva y presentándose seis tipos de malformaciones diferentes para los tres valores de pH y para ambas concentraciones del compuesto, como se observa en la tabla VIII.

Se presentó un alto porcentaje de malformaciones para las dos concentraciones del compuesto en los 3 valores de pH (6, 7 y 8), aumentando el número de malformaciones en la concentración menor conforme aumentó el pH, mientras que para la concentración mayor, en los mismos valores de pH el porcentaje de malformaciones fue menor conforme disminuyó el pH, como se aprecia en la siguiente grafica (Fig. 33)

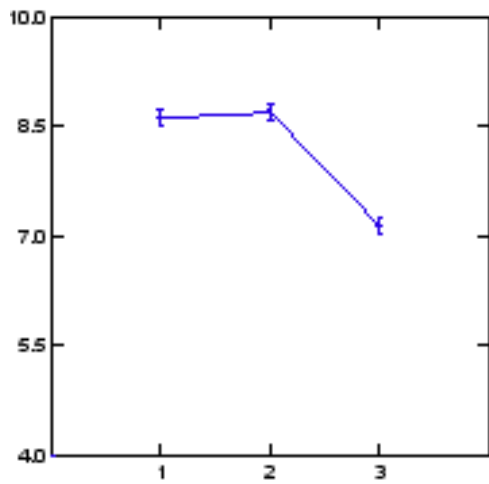
Concentración 1



Concentración 2

% de Malformaciones

pH



Factor pH 1=6, 2=7, 3=8, Factor concentración de $MnCl_2$ 1= 0.158, 2= 0.316,

Figura 33. Influencia del pH en la inducción de daño teratogénico en dos concentraciones de $MnCl_2$

Se observó que a la concentración de $0.158\mu l$ de $MnCl_2$, se registró mayor índice de malformaciones en columna vertebral presentándose solo de 3 tipos (sencilla, doble, curva) en pH 6, con altos índices de viabilidad, se observó retardo de algunos embriones en la fase de eclosión, lo que significa que al término de las 72Hrs. después de la ovoposición algunos organismos no habían eclosionado.

A pH 7, el índice de malformaciones disminuyó con respecto al pH 6, pero a su vez eclosionaron en su totalidad todos los embriones dentro de las 72 h posteriores a la ovoposición, manifestándose malformaciones de tipo sencilla, doble, múltiple, curva y de aleta caudal.

A pH 8, se presentaron malformaciones diversas, pero en menor proporción con respecto a los dos valores de pH 6 y 7, de igual manera eclosionaron todos los organismos a su tiempo, cabe mencionar que en esta prueba se obtuvo de manera particular un tipo de malformación denominada tipo gancho. en ambas concentraciones del compuesto.

Para la concentración $0.316\mu l$ de $MnCl_2$ se observó un efecto inverso a la concentración de $0.158\mu l$ para los mismos valores de pH analizados; esto es, a pH 6 (ligeramente ácido), se presentó un bajo índice de malformaciones en columna vertebral pero de diferentes tipos (sencillo, doble, múltiple, curva y de aleta caudal), retardándose también la etapa de eclosión, a pH 7 aumento el número de malformaciones con respecto a pH 6 presentándose solo de tipo sencilla, doble, curva y de aleta caudal, la fase de eclosión fue dentro de las 72 h,

Por último para un medio ligeramente alcalino pH 8, en esta prueba se presentó un mayor número de malformaciones con respecto a las otras dos concentraciones de pH, mostrándose malformaciones de tipo curvo, sencillo, doble, múltiple y de aleta caudal.

Se obtuvieron un total de 1221 malformaciones, mostrándose con mayor frecuencia las sencillas (550) en los tres valores de pH a las dos concentraciones el compuesto, por otra parte se observaron diferentes tipos de malformaciones: dobles, múltiples, curvas, de aleta caudal y gancho.

6. Discusión y Conclusión

El presente trabajo parte de condiciones físico-químicas óptimas de mantenimiento y reproducción de los organismos experimentales, mediante la validación de la prueba DarTa con embriones de *Danio rerio*, para evaluar la calidad ambiental a través de la inducción de malformaciones durante el desarrollo embrionario.

Se han analizado variables como la temperatura y el pH, evaluando el efecto teratogénico hacia contaminantes ambientales, Peña (2008), reporta que al variar la temperatura no se vea afectada la viabilidad y fertilidad de los organismos, Gonzáles (2005) y Rivera (2006) reportan que a una temperatura de 28.5 °C y valores de pH entre 7 y 8 son las condiciones óptimas para la viabilidad y fertilidad de embriones.

Los valores de pH analizados para la reproducción, fertilidad y viabilidad de embriones de *Danio rerio* evaluados en el presente trabajo fueron a cinco valores 5, 6, 7, 8,9. Registrando mayor número de embriones fértiles y viables en un número menor de ovoposiciones con un valor de pH 8. De igual manera se registraron porcentajes de viabilidad nulos para pH 5 así como porcentajes de viabilidad menores al 50% en pH 9. Observando que en medios ligeramente ácidos (pH6) los embriones eclosionaban después de un periodo de 72 horas. Estableciendo valores de pH 6, 7, 8 para las siguientes pruebas, debido a que en este intervalo se presentó un alto porcentaje de fertilidad y por consiguiente mayor número de embriones viables.

Para determinar el efecto del pH sobre la teratogenicidad inducida en embriones *Danio rerio*, utilizando como biomarcador a la columna vertebral, fue necesario identificar si el pH por si solo puede o no inducir malformaciones, analizando embriones en tres valores de pH (6, 7 y 8), y se pudo observar que el pH por si solo no provoca efectos teratogénicos, lo que podría evidenciar la preferencia de la membrana hacia ambientes ácidos o básicos para permitir el paso de una sustancia ajena a la célula, dependiendo de la concentración del

compuesto a evaluar, por lo que el siguiente paso fue utilizar un teratógeno de referencia para determinar los posibles efectos producidos por $MnCl_2$

Se observó, que en los tres valores de pH (6, 7 y 8), a las dos concentraciones de $MnCl_2$, se obtuvieron diversas malformaciones en columna vertebral, utilizando embriones en las primeras etapas de desarrollo y analizándolas después de la fase de eclosión. Mostrando diferente sensibilidad de los embriones del pez cebra al cloruro de manganeso a diferentes ambientes (ácidos, neutros y alcalinos), dentro del valor en donde el pH no afecta la fertilidad y viabilidad de los embriones, o que la biodisponibilidad del manganeso es más susceptible de provocar efectos en pH alcalinos a concentraciones altas.

A menor pH, bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, es decir en un medio ácido aumenta el número de malformaciones a concentraciones más bajas del agente químico; mientras que a concentraciones más altas el compuesto interactúa con el valor de pH en un medio alcalino por lo que se presenta un efecto sinérgico aunque opuesto en las dos concentraciones con respecto al pH. El pH en sistemas acuáticos influye de manera dominante en los efectos teratogénicos asociados a un agente xenobiótico, determinado por el número y tipo de malformaciones manifestadas en embriones del pez cebra (*Danio rerio*).

Se observó claramente que el $MnCl_2$ presentó su mayor capacidad de absorción a pH 6, esto se explica por el efecto del pH en la especiación química del ion hidronio en solución acuosa. Asimismo, se observa que la capacidad de absorción decae a pH altos a concentraciones menores del $MnCl_2$. Si bien el ion Mn está bajo su forma Mn^{+2} a $pH > 7$, también es cierto que a pH bajos, la concentración de iones hidronio (H_3O^+) aumenta y compite con el catión metálico por los sitios activos, favorecido por su alta movilidad iónica (Navarro *Et al.*, 2006).

También se observaron los efectos teratogénicos del pez cebra, los cuales presentaron su máxima capacidad de absorción de $MnCl_2$ a pH 6 y 8 en una concentración menor y mayor respectivamente, debido a la acidez y alcalinidad del medio acuoso. De tal manera que la evaluación del efecto del pH con respecto a la concentración de $MnCl_2$, elucida la gran complejidad de la química acuosa de los iones metálicos, cuya especie química predominante, depende fuertemente de la acidez o alcalinidad del medio, necesaria para competir con otros iones por los sitios activos en la superficie del absorbente. (Navarro *Et al.*, 2006).

7. Bibliografía

- Albert, A. L. (1997) Introducción a la Toxicología Ambiental. Centro Panamericano de Ecología. México. 454 pp
- Arratia, J. P. (2004) Efecto de la conductibilidad del agua de riego, Rev. Market – Manager (Mercado de agricultura). España. 180 pp.
- Báez-Ramírez, A., Prieto-García, F. y Galán-Vidal A. (2004) Bioacumulación y daño genotóxico en pez cebra (*Danio rerio*) por arsénico en aguas de Zimapàn, Hidalgo (México). Ensayos en cortos plazos. AquaTic. 21:62-70.
- Báez-Ramírez, A. y F. Prieto-García. (2005) Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, México. Mutagenesis 20:291-295.
- Butterwort, F. (1995) Introduction to Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Enviromental Change. Enviromental Science Research, 50:1-7
- Cantu, P.C. (2000) Salud publica y nutrición, Toxicología nociones generales, ASPIN 1(2): 78-79
- Colin C. A. y M. C. Jiménez (2003) Química Ambiental; en Solís Segura Luz María, López Arriaga Jerónimo Amado, Principios Básicos de Contaminación ambiental, 1º ed. México D.F. 120 pp.
- Crosby, D.G. (1998) Environmental toxicology and chemistry. Lewis Publishers 150 pp.
- Chamorro C. G. (1997) Estudios de toxicología preclínica para nuevos fármacos, Archivos de Neurociencia 1:118-121
- Daniel, W. (1994) Bioestadística, Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa México D.F.320 pp.
- Dietrich, D.R. (1998) Danio rerio enbryotoxicity and terotogenicity assay (DRETA) for detecting waterborne embryo- toxicants and teratogens. Toxicologist 42(1) 259-260
- Donaldson, J. (1987) The physiopathologic significance of manganese in brain: Its realtion to schizophrenia and neurodegenerative disorders. Neurotoxicology. 8(3): 451-462

- Duffus, J.H. (1983) Toxicología ambiental. Ed. Omega. Barcelona España. 173-180 pp.
- Eisen, J.S. (1996) Zebrafish make a big splash. *Cell*, 87 (6): 969-977
- Fernicola N. (1992a) Nociones básicas en toxicología. en: Toxicología Prospectiva y seguridad química. Programa Internacional de Seguridad de las sustancias químicas. Centro Panamericano de Ecología Humana y salud. Programa de Salud, Organización Mundial de la salud. México. p. 1-8
- Fernicola 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. Programa de Salud, Organización Mundial de la salud. México. p. 23-21
- Fernicola N. (1987) Aspecto toxicológico de las sustancias peligrosas. Memorias del Seminario sobre desastres tecnológicos asociados con agentes químicos. Secretaria de Salud. Centro Panamericano de Ecología Humana y salud. México p. 27-29
- Forstner, U. y G.T. Wittmann. (1983) Metal pollution in the aquatic environment. Second revised Edition. Springer-Verlag. Freiland-Graves EUA. 180 pp.
- Gargas, J. (1995) "La salud de los peces. La química del agua: principios básicos para lo aficionados a los peces de agua dulce, en especial para aquellos que mantienen discos". *Aqua guía*, 9:16-19
- Garza A. V., (1995) Indicadores de contaminación y bioindicadores, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 158 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.
- Hernández, R (1991) Metodología de la investigación, Segunda edición, McGraw-Hill México D.F. 180 pp.

- Hulka, B. S. (1990) Overview of biological markers. En biological Markers in epidemiology, eds. B. Hulka, T. Wilcolsky and J. Griffith. New York. Oxford University Press. p:1-15
- IDRC (2006) Centro Internacional de investigaciones para el desarrollo Ciencia para la humanidad. Canada. 4pp
- Kimmel, C., Balla, W., Kimmel, S., Ullmann, B. y T. Schilling (1995) Stage of embryonic developmental of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. 203 (3):253-310.
- Maldonado, E. (2003) Experimentación en el pez cebrá, un modelo de biología del desarrollo. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F. 345pp.
- Markert, B. (1995) General Aspects of heavy metal monitoring by plants and animals, en: Enviromental biomonitoring: Exposure Assessment and Specimen Banking. Subramanian, K. y G. Iyengar. Ed. American Chemical Society. Washington, EUA. P. 19-29
- Medina M., y M. Encina. (2003) Incorporación de la Evaluación de Riesgo Ecológico en el SEIA para ecosistemas acuáticos en Chile. ambiente y desarrollo de CIPMA 9(3):19-27
- Moriarty F. (1999) Ecotoxicology. The estudy of pollutants in ecosystem, 2º ed. Academic Press, New York. 190 pp.
- Nagel, R. (2002) DART: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19:38-48.
- Navarro, A. E., R. Karim P., Campos, K., H. J. Maldonado (2006) Elucidación del efecto del pH en la adsorción de metales pesados mediante biopolímeros naturales: cationes divalentes y superficies activas. *Iberoamericana de Polímeros* 7(2):113-126
- Norberg, G. (2001) Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo: guía de sustancias químicas. Tercera edición. Volumen 4. Organización internacional del trabajo. Ministerio de trabajo y asuntos sociales. España. 663pp
- 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

- Organización Mundial de la Salud (1986) Investigaciones sobre contaminación del medio. Serie de informes técnicos N. 406 Ginebra. Suiza 90 pp.
- Peña, M. (2008) Evaluación del efecto de la temperatura sobre la teratogenicidad del Cloruro de Mercurio (HgCl₂) 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. 66 pp.
- Reyes, G.R. y Almeida G. (1992) Toxicología prospectiva y seguridad química. Ed. Por el Programa Internacional de las sustancias químicas (PISSQ/PNUMA-OIT-OMS). México 231 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.
- Sánchez M. (2003) Principios Básicos de Ecotoxicología; En Solís S. L., y A. J. López, Principios Básicos de Contaminación ambiental, 1º ed., México D.F. 230 pp.
- Solís S. L., y A. J. López (2003) Principios básicos de contaminación ambiental, 1º ed., México, 270 pp.
- Vega G. S. (1985a) Evaluación Epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales, Generalidades. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. México. 40 pp
- Vega G. S. (1985b) Evaluación Epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales, Toxicología II. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud.
- Vega G. S. (1985c) Evaluación Epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales, Toxicología III. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud

- Vettorazzi, G. (1987) Ensayos necesarios para la valoración toxicológica de las sustancias químicas. Programa internacional de seguridad de las sustancias químicas. Organización Mundial de la salud. Ginebra, Suiza. 180 pp.
- Vettorazzi, G. (1992a) Toxicología prospectiva: base lógica, manera de abordar y aplicaciones practicas. En: Toxicología Prospectiva y seguridad química: Programa Internacional de Seguridad de las sustancias químicas (PISSQ/PNUMA-OIT-OMS). Editorial ECO. México. 200 pp.
- Villafuentes-Tellez H. (En prensa) Evaluación del daño teratogénico inducido en embriones del pez cebra (*Danio rerio*) a través del la prueba Danio rerio Teratology assay (DarTa) por manganeso a concentraciones encontradas en aguas de Metztitlán, Hgo. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 80 pp.
- Westerfield, M. (1995) The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) 186 pp.
- Whittaker, M. R. (1981) Química General, Compañía editorial continental, décima segunda impresión, México. 220 pp.
- Wolfc, H. D. (1996) Química General Orgánica y Biológica, segunda edición. Mc Graw Hill, México.757 pp
- Wurgler, F. E. y P. G. Kramers, (1992) Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology). *Mutagenesis* 7: 321-327
- Zagic, J.E. (1969) Microbial biochemistry. en: IPCS (International Programme on Chemical Safety) (1981) Environmental Health Criteria 17. Manganese. World Health Organization. Geneva. 156 pp.
- Zar, J.H. (1999) Bioestadistical Analisis. Prentice Hall, New Jersey 663pp