



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

TÍTULO:

Evaluación del daño teratogénico inducido en embriones de *Danio rerio* Hamilton 1822, a través de la prueba DarTa por cadmio a concentraciones registradas en agua de Metztlán, Hidalgo, México.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

Arturo González Rojo

ASESOR:

DR. JUAN CARLOS GAYTÁN OYARZÚN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICA E INGENIERÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGIA

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR, UAEH

P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado al pasante de Licenciatura en Biología Arturo González Rojo quien presenta el trabajo recepcional de tesis titulado **“Evaluación del daño teratogénico inducido en embriones de *Danio rerio* Hamilton 1822, a través de la prueba DarTa por cadmio a concentraciones registradas en agua de Metztitlán, Hidalgo, México”**, que después de revisarlo en reunión de sinodales han decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Dr. Alberto José Gordillo Martínez

PRIMER VOCAL: Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún

SEGUNDO VOCAL: M. en C. René Bernardo Elías Cabrera Cruz

TERCER VOCAL: Dr. William Scott Monks Sheets

SECRETARIO: Dr. José Roberto Villagómez Ibarra

PRIMER SUPLENTE: Dra. Griselda Pulido Flores

SEGUNDO SUPLENTE: Biol. Jorge Alberto Valdiviezo Rodríguez

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

A T E N T A M E N T E
“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 06 de enero de 2010

Biol. Ulises Iturbe Acosta
Coordinador Adjunto de la Licenciatura en Biología



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de su autor y su director de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas involucradas y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

Agradecer hoy y siempre a mi familia que procura mi bienestar, está claro que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mis estudios no hubiesen sido posibles. A mis padres Justino y Margarita, mis hermanos Omar y Viridiana por el ánimo, apoyo y alegría que me brindan dándome fortaleza necesaria para seguir adelante.... ¡Por ellos y para ellos!

Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación escolar. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos, el cual no se puede concebir sin su oportuna participación. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Para mis compañeros de grupo, tengo sólo palabras de agradecimiento, especialmente por aquellos momentos en los que pude ser inferior a sus expectativas. Ha sido un camino largo y duro en el que, algunas veces, la fijación por lograr tus objetivos te hace olvidar la importancia del contacto humano. Sin embargo, como en todas las actividades de la vida, siempre al final hay algunos criterios que te permiten priorizar y es por ello que debo resaltar mis agradecimientos para algunas personas.



Quiero expresar mi agradecimiento especial a Erick y Francisco quienes son compañeros siempre dispuestos como pocos, por brindarme su apoyo, ánimo y colaboración en todo momento y sobre todo cuando más necesitaba de ellos, sin poner nunca peros o darme negativas, sino todo lo contrario

Para aquellos amigos que han compartido conmigo en el plano personal durante esta larga travesía de estudios Héctor Alberto, Maestra Carmen, Magali, Natalia, Rosalba, Su Lin, Miriam, Mary, Berenice, Mireya.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.



CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	11
1.1	Contaminación.....	11
1.1.1	Contaminación del agua	11
1.1.2	Toxicología de los metales pesados	13
1.1.3	Principales metales pesados de interés toxicológico:	14
1.2	Cadmio	16
1.2.1	Fuentes de emisión	17
1.2.2	Contaminación del aire por Cadmio	17
1.2.3	Contaminación del suelo por Cadmio	18
1.2.4	Contaminación del agua por Cadmio	18
1.2.5	Bioacumulación de Cadmio	19
1.2.6	Toxicidad del Cadmio	19
1.2.7	Toxicocinética del Cadmio	22
1.2.8	Toxicodinámica del Cadmio	24
1.2.9	Epidemiología del Cadmio	25
1.3	Monitoreo ambiental	26
1.3.1	Toxicología	27
1.3.2	Toxicología ambiental	27
1.3.3	Ecotoxicología	28
1.3.4	Genética toxicológica	28
1.4	Evaluación del efecto tóxico.....	29
1.4.1	Carcinogénesis	30
1.4.2	Mutagénesis	31
1.4.3	Teratogénesis	31
1.5	Bioindicadores	32
1.5.1	Biomarcadores	32
1.5.2	Biomonitores	34
1.5.3	Bioensayos	34
1.6	Uso de <i>Danio rerio</i> como bioensayo	36
1.6.1	La prueba DarTa (Danio rerio Teratology assay)	37
2	JUSTIFICACIÓN	40



3	OBJETIVO GENERAL	41
3.1	Objetivos particulares.....	41
4	ZONA DE ESTUDIO	42
4.1	Sitios de muestreo	43
5	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	44
5.1	Selección de organismos	44
5.2	Lote de mantenimiento de los organismos.....	44
5.3	Inducción conducta reproductiva.....	46
5.3.1	Mantenimiento de huevos y alevines	47
5.4	Índices de fertilidad, viabilidad y malformaciones espontaneas.....	49
5.5	Inducción del efecto toxico y teratogénico del Sulfato de Cadmio	50
5.5.1	Pruebas de toxicidad para determinar la concentración letal media	50
5.5.2	Tratamiento para evaluar malformaciones en columna vertebral	51
5.7	Inducción del efecto tóxico y teratogénico del agua de Metztlán	52
5.8	Análisis estadístico	54
6	RESULTADOS	56
7	DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	72
8	BIBLIOGRAFÍA	74
9	GLOSARIO	79



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción entre el tóxico y el organismo (Vega, 1985a).....	14
Figura 2. Toxicocinética del Cadmio (Kjellstrom, 1978).	24
Figura 3. Movilidad de los contaminantes en el ambiente (Vega, 1985 a).....	26
Figura 4. Cinética de un agente químico dentro del organismo (INE, 2005).	27
Figura 5. Tipos de exposiciones a agentes genotóxicos.	30
Figura 6. <i>Danio rerio</i> en acuario.	36
Figura 7. Transparencia de embriones del <i>Danio rerio</i>	37
Figura 8. Desarrollo de <i>Danio rerio</i>	38
Figura 9. Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán (CONANP, 2003).	42
Figura 10. Pecera de mantenimiento de organismos.....	44
Figura 11. Lote experimental de peces.	45
Figura 12. Medición de parámetros físico-químicos del agua.	46
Figura 13. Dimorfismo sexual de <i>Danio rerio</i>	46
Figura 14. Rank experimental con diferentes montajes.	48
Figura 15. Colocación de los frascos con huevos de <i>Danio rerio</i> en pecera.	49
Figura 16. Colocación de los frascos en una gradilla dentro de una pecera.	51
Figura 17. División arbitraria del cuerpo de <i>Danio rerio</i> (Peña, 2008).	53
Figura 18. Espectrofotómetro de absorción atómica.	56
Figura 19. Resultados de toxicidad en análisis de varianza de 1 vía (ANOVA). La concentración 0.076 µg/l indica que tiene una toxicidad mayor en comparación de las otras concentraciones probadas.	61
Figura 20. Comparación de malformaciones inducidas por concentración de Cd.	62
Figura 21. Frecuencia de malformaciones en columna vertebral a las concentraciones probadas de la mezcla compleja de Metztitlán.....	64
Figura 22. Tipo de malformaciones obtenidas.	65



Figura 23. Correlación de las frecuencias de malformaciones en las concentraciones de Cd probadas y las muestras de agua.	66
Figura 24. Correlación de efectos tóxicos de las concentraciones de Cd y mezcla compleja del agua de Metztitlán.	66
Figura 25. Resultados de toxicidad en análisis de Tukey.	67
Figura 26. Malformaciones obtenidas de tipo sencillas en columna vertebral en diferentes zonas de los alevines de <i>Danio rerio</i> , región cefálica (A y B), región caudal (C y E), región media (D y F).	68
Figura 27. Malformaciones obtenidas en aleta caudal en columna vertebral en alevines de <i>Danio rerio</i> , la imagen L muestra la ausencia de aleta en el alevín.	69
Figura 28. Malformaciones obtenidas de tipo curvo en la columna vertebral de alevines de <i>Danio rerio</i> , la imagen R muestra alteraciones en la columna vertebral de tipo curvatura doble.	70
Figura 29. Malformaciones obtenidas de tipo curvatura doble (S), de tipo gancho (T), doble con la presencia de enanismo (U), letargo en el desarrollo embrionario y persistencia de saco vitelino (V), de tipo espiral en aleta caudal (W) y curvatura simple o sencilla.	71



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de contaminación (Albert, 1988).	11
Tabla 2. Alteraciones físicas del agua (Weis, 1987).	12
Tabla 3. Alteraciones químicas del agua (Weis, 1987).	13
Tabla 4. Ejemplo de contaminantes biológicos del agua (Weis, 1987).	13
Tabla 5. Efectos biológicos causados por metales pesados (Figueroa, 2001).	15
Tabla 6. Factor de bioconcentración de algunos metales.	19
Tabla 7. Pruebas de toxicidad y sus principales objetivos.	29
Tabla 8. Características de mutágenos, carcinógenos y teratógenos.	32
Tabla 9. Principales biomarcadores en toxicología (Evenden <i>et al.</i> , 1997).	33
Tabla 10. Comparación de pruebas de toxicidad (Del Valls y Conradi, 2000).	35
Tabla 11. Condiciones físico-químicas óptimas	45
Tabla 12. Temperatura optima por etapa de desarrollo (Aguilar, 2002).	49
Tabla 13. Clasificación y descripción de malformaciones (Rivera, 2006).	53
Tabla 14. Límites de la NOM-127-SSA1-1994	57
Tabla 15. Metales pesados en el agua de Metztlán en temporada de secas (Pulido-Flores, 2005).	58
Tabla 16. Análisis del agua en época de lluvia en el año 2006	58
Tabla 17. Análisis de agua en época de sequía en el año 2006.	59
Tabla 18. Porcentaje de lotes para evaluar los índices de fertilidad.	59
Tabla 19. Frecuencia espontánea.	60
Tabla 20. Resultados de toxicidad a diferentes concentraciones de Cadmio	60
Tabla 21. Malformados en diferentes concentraciones de Cadmio	62
Tabla 22. Resultados de toxicidad con una mezcla compleja.	63
Tabla 24. Cuantificación de tipo de malformaciones en columna vertebral	64
Tabla 25. Cuantificación de malformaciones por zona de <i>Danio rerio</i>	65



RESUMEN

Para la determinación del potencial teratogénico del Cadmio; se trato a embriones de *Danio rerio* con la concentración registrada de este elemento en la zona de estudio (0.038 $\mu\text{g/l}$), así como la mitad (0.019 $\mu\text{g/l}$) y el doble de esta en el agua de Metztitlán, Hgo., (0.076 $\mu\text{g/l}$), evaluándose la frecuencia inducida de malformaciones en columna vertebral.

Por cada concentración se expuso a 1000 embriones, se colocaron en frascos de 10 individuos cada uno, con las condiciones físico-químicas adecuadas durante todo su desarrollo embrionario, registrándose la viabilidad huevo-alevín, alevín-juvenil y malformaciones en columna vertebral de organismos recién eclosionados.

Encontrando que la concentración de 0.038 $\mu\text{g/l}$ mostraba la mayor cantidad de malformaciones, y estas eran principalmente en la parte terminal de la columna vertebral, siendo una frecuencia de casi el doble de la inducida por el agua de Metztitlán por si sola; lo cual evidencia efectos antagónicos entre los más de 30 elementos encontrados en la laguna, justificándose trabajos posteriores para elucidar el o los agentes causantes de este potencial genotóxico.



1 INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación

La contaminación es la introducción de cualquier sustancia o forma de energía con potencial para provocar daños, irreversibles o no, en el medio inicial. El medio afectado puede ser aire, agua, suelo o cualquier sustrato orgánico (en ocasiones más de uno de ellos simultáneamente). Todo cambio significativo en la composición o condiciones normales de un medio, constituye una forma de contaminación. Estos cambios afectan al recurso en sí o a su uso para un fin determinado, y los agentes que lo provocan pueden ser: químicos, físicos, biológicos (Tabla 1) (Canter, 1986 y Odum, 1995).

Tabla 1. Tipos de contaminación (Albert, 1988).

Tipo	Ejemplos
Biológica	Virus, bacterias, protozoarios, hongos, vegetales y otros parásitos
Física	Calor, ruido y radiaciones
Química	Hidrocarburos, metales pesados y plaguicidas

Tal amplitud de factores involucran agentes de diferente naturaleza y acciones continuas y discontinuas, que pueden producirse espontáneamente o ser provocadas, muchas veces por la actividad del hombre en su búsqueda de recursos a consumir, asociadas con la transformación de materias primas naturales a través de procesos industriales y la acumulación de una cantidad de residuos considerables (Fernícola, 1992 a).

1.1.1 Contaminación del agua

La contaminación del agua se produce a través de la introducción directa o indirecta en los cauces o acuíferos de sustancias sólidas, líquidas, gaseosas, así como de energía calórica, entre otras. Esta contaminación es causante de daños en los organismos vivos del medio acuático, así como en las características físicas y químicas de éste (Tabla 2-4), además representa un peligro para la salud de las personas y de los animales asociados a estos cuerpos de agua (Baird, 2001).



Existen dos formas a través de las cuales se puede contaminar el agua. Una de ellas es por medio de contaminantes naturales, es decir, el ciclo natural del agua puede entrar en contacto con ciertos constituyentes contaminantes que se vierten en las aguas, atmósfera y corteza terrestre; otra forma es a través de los contaminantes generados por el hombre, y son producto de los desechos líquidos y sólidos que se vierten directa o indirectamente en el agua (Baird, 2001).

Los metales pesados son aquellos cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua, en el ambiente puede causar daños en la salud. Los metales pesados disueltos en el medio acuoso son fácilmente absorbidos por la biota acuática; es decir, tienen una alta biodisponibilidad (interacción del contaminante con medio biológico). A la relación de la concentración del contaminante en los tejidos de la biota con la concentración de ese mismo contaminante en el medio, se llama factor de bioconcentración (Vega, 1985).

Tabla 2. Alteraciones físicas del agua (Weis, 1987).

Tipo alteración	Características y contaminación que indica
Color	El agua contaminada puede tener ligeros colores rojizos, pardos, amarillentos o verdosos debido, principalmente, a los compuestos húmicos, férricos o los pigmentos verdes de las algas que contienen.
Olor y sabor	Compuestos químicos presentes en el agua como los fenoles, diversos hidrocarburos, cloro, materias orgánicas en descomposición o esencias liberadas por diferentes algas u hongos pueden dar olores y sabores muy fuertes al agua
Temperatura	El aumento de temperatura disminuye la solubilidad de gases (ej. oxígeno) y aumenta, en general, la de las sales. Aumenta la velocidad de las reacciones del metabolismo, acelerando la putrefacción.
Materia en suspensión	Partículas como arcillas, limo y otras, aunque no lleguen a estar disueltas, son arrastradas por el agua de dos maneras: en suspensión estable (disoluciones coloidales); o en suspensión que sólo dura mientras el movimiento del agua las arrastra.
Espumas	Los detergentes producen espumas y añaden fosfato al agua (eutrofización). Disminuyen mucho el poder auto depurador de los ríos al dificultar la actividad bacteriana
Conductividad	El agua pura tiene una conductividad eléctrica muy baja. El agua natural tiene iones en disolución y su conductividad es mayor y proporcional a la cantidad y características de esos electrolitos



Tabla 3. Alteraciones químicas del agua (Weis, 1987).

Tipo alteración	Contaminación que indica
pH	Las aguas contaminadas con vertidos mineros o industriales pueden tener pH muy ácido, el pH tiene una gran influencia en los procesos químicos.
Oxígeno disuelto (OD).	Si el nivel de oxígeno disuelto es bajo indica contaminación con materia orgánica, mala calidad del agua e incapacidad para mantener determinadas formas de vida.
Materia orgánica biodegradable	Es la cantidad de oxígeno disuelto requerido por los microorganismos para la oxidación aerobia de la materia orgánica biodegradable presente en el agua.
Materiales oxidables	Es la cantidad de oxígeno que se necesita para oxidar los materiales contenidos en el agua con un oxidante químico (normalmente bicromato potásico en medio ácido).
Nitrógeno total	Su presencia en las aguas en exceso es causa de eutrofización. El nitrógeno se presenta en muy diferentes formas químicas en las aguas naturales y contaminadas.
Metales pesados	De efectos muy nocivos; se bioacumulan en la cadena trófica; (se estudian con detalle en el capítulo correspondiente).

Tabla 4. Ejemplo de contaminantes biológicos del agua (Weis, 1987).

Tipo alteración	Contaminación que indican
Bacterias coliformes	Desechos fecales
Virus	Desechos fecales y restos orgánicos
Materia orgánica	Eutrofización

1.1.2 Toxicología de los metales pesados

La acción toxicológica de los contaminantes está determinada por la accesibilidad al organismo así como de las reacciones bioquímicas y fisiológicas. Como se puede ver en la Figura 1, las interacciones que hay entre el tóxico y el organismo, en donde están representadas por fases interconectadas, la R representa una sustancia reactiva que interacciona con macromoléculas, membranas, representados por la M, por lo que se producen cambios X, Y, Z, que no presentan efectos tóxicos o los cambios A,B,C con efectos tóxicos (Vega, 1985a).

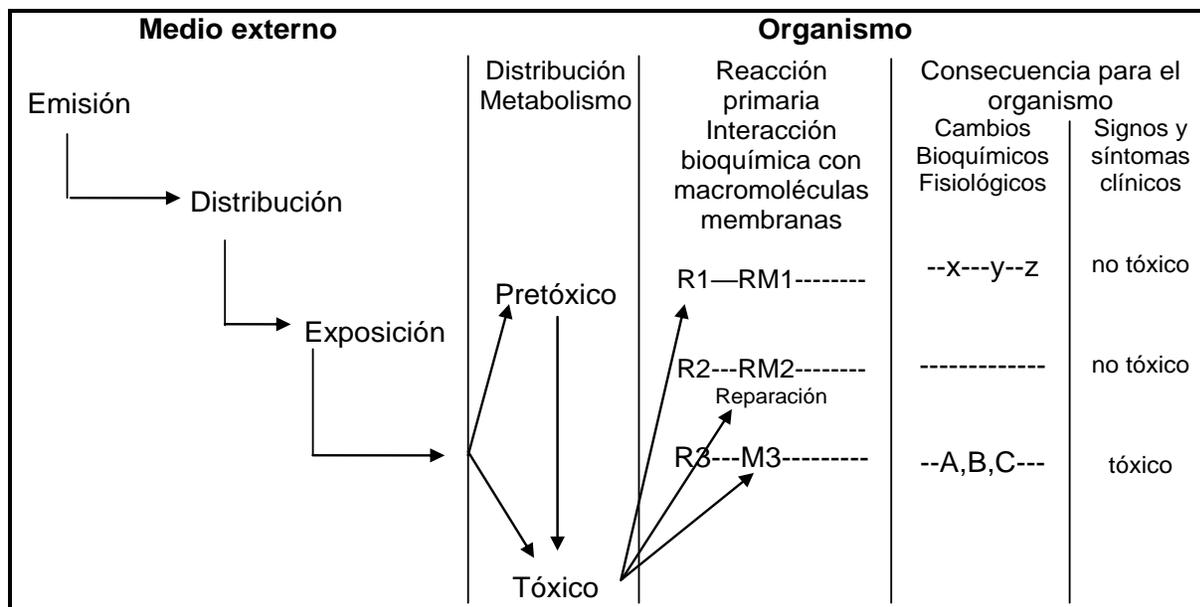


Figura 1. Interacción entre el tóxico y el organismo (Vega, 1985a).

1.1.3 Principales metales pesados de interés toxicológico:

Los siguientes metales pesados se consideran de interés toxicológico debido a que en al menos un sistema han manifestado algún efecto deletéreo y/o tóxico: Aluminio (Al), Antimonio (An), Arsénico (As), Bario (Ba), Berilio (Be), Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Estaño (Es), Hierro (Fe), Litio (Li), Manganeseo (Mn), Mercurio (Hg), Molibdeno (Mo), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Selenio (Se), Talio (Ta) y Zinc (Zn) (Harte, 1991).

Algunos metales son bioindispensables a bajas concentraciones, debido a que forman parte de sistemas enzimáticos anabólicos o catabólicos, como el cobalto, el zinc, el molibdeno o como el hierro. Su ausencia causa enfermedades así como su exceso puede causar intoxicaciones e incluso efectos letales (Fergusson, 1990). Ningún contaminante actúa de forma aislada sobre un receptor. Tiene gran influencia otras variables, como la presencia de otras sustancias, la edad, la nutrición o el embarazo. La capacidad de absorción de metales por las plantas varía con la acidez, el contenido orgánico y otras características del suelo. La absorción y la toxicidad del plomo son más altas en niños que en adultos. El cobre y el molibdeno



modifican mutuamente sus efectos. La deficiencia de hierro aumenta la absorción de cadmio (Vega, 1985)

Algunos de los efectos tóxicos son provocados por elementos presentes en sistemas acuáticos y/o biológicos (Tabla 5), que no tienen ninguna función biológica definida, como por ejemplo el mercurio y el plomo que no entran para nada en la composición de la biomateria, pero se encuentran acumulados en los sistemas biológicos debido a la exposición a diversas fuentes contaminantes (Figueruelo y Marino, 2001).

Los efectos de los metales pesados (Tabla 5) han sido ampliamente estudiados en peces y se ha reportado anomalías en el sistema respiratorio, alteración en la orientación, por otra parte también afectan el nado y la migración, entre otros efectos colaterales (Barrón, 2002).

Tabla 5. Efectos biológicos causados por metales pesados (Figueruelo, 2001).

Metal	Efectos	Organismo
Mercurio	Feto toxicidad, Infertilidad, Aborto espontáneo, Neurotoxicidad fetal, Teratogenicidad.	Humano, rata, ratón, hámster y aves
Plomo	Feto toxicidad, Infertilidad, Aborto espontáneo, Teratogenicidad	Humano, rata, ratón, hámster y aves
Arsénico	Feto toxicidad	¿Humano?, ratón, hámster y aves
Cobre	Aborto espontáneo	Ratón
Selenio	Aborto espontáneo, Teratogenicidad	¿Humano?, ratón, hámster y aves
Cadmio	Aborto espontáneo, Teratogenicidad	Rata, ratón y hámster
Níquel	Aborto espontáneo, Teratogenicidad	Rata, hámster y aves
Litio	Anomalías cardiacas	Primates



1.2 Cadmio

El Cadmio como elemento simple, es un metal relativamente raro y poco abundante, en la corteza terrestre, principalmente se halla combinado con otros elementos, como el Oxígeno, Cloro o Azufre (Sulfato y Sulfito de Cadmio), está presente naturalmente en el ambiente debido al proceso gradual de la erosión, de la abrasión de las rocas, de los suelos y de acontecimientos singulares tales como fuegos del bosque y erupciones volcánicas. Por lo tanto está presente de forma natural en todas partes, como lo es el aire, el agua, en suelos, así como en productos comestibles. Aunque podría ser un elemento químico esencial, necesario en muy pequeñas cantidades, pero esto no está claro (Fernícola, 1992a).

Desde el punto de vista toxicológico ha adquirido una gran importancia; porque está asociado a la actividad antropogénica. A partir de la mitad del siglo pasado, la producción y el uso de Cadmio al nivel industrial se ha expandido rápidamente, y su eliminación se ha convertido en un serio problema para el ambiente. Los usos más habituales son en la industria de la galvanoplastia, la fabricación de baterías y la estabilización de algunos plásticos. Aunque también se ha utilizado en la elaboración de algunos plaguicidas y fertilizantes (ATSDR, 1999).

Sin embargo; se considera uno de los metales más tóxicos (Ramírez, 2002), debido a que presenta cuatro de las características más peligrosas de un tóxico:

- Acumulación en órganos y tejidos (bioacumulación y toxicocinética).
- Efectos adversos para el hombre y el medio ambiente (toxicidad y tóxicodinámica).
- Alta persistencia en el medio ambiente (vida media amplia).
- Alta movilidad en el ambiente, viaja grandes distancias con el viento y en los cursos de agua (cinética ambiental amplia).

La exposición en los humanos se produce generalmente a través de la vía oral (por agua e ingestión de alimentos contaminados) y por inhalación, presente



principalmente en el sector de la población fumadora, debido a que es un componente principal de los cigarrillos (Ramírez, 2002).

1.2.1 Fuentes de emisión

1.2.1.1 Fuentes naturales

El Cadmio es un elemento que forma parte de la corteza terrestre, como un metal blando y de un brillo parecido al de la Plata, pero en esta forma no es muy común hallarlo en el ambiente. Se encuentra a menudo combinado con otros elementos formando compuestos sólidos, estables, que no se evaporan y que pueden encontrarse en el material particulado, como por ejemplo con Pb y Zn (Pasquali, 2003).

1.2.1.2 Fuentes antrópicas

Su presencia tiende a aumentar día a día como consecuencia de la contaminación ambiental, por la manipulación y refinado del metal; así como por sus múltiples usos industriales en el proceso de cadmiado galvánico, en la fabricación de sustancias plásticas vinílicas, fertilizantes (Aranha *et al.*, 1994), baterías de Cadmio-Níquel, semiconductores, estabilizadores y ligas metálicas (Hiscock, 1983), artículos escolares, así como tinturas y pigmentos utilizados en embalajes para alimentos (Garrido *et al.*, 1991).

1.2.2 Contaminación del aire por Cadmio

La mayoría de las emisiones a nivel atmosférico se realizan a través de la industria del metal, seguido por la combustión de residuos o basuras, combustión de carbón, industria cementera y producción de fertilizantes. Si se compara la emisión de Cadmio a partir de fuentes naturales y fuentes antropogénicas, se observa que la mayoría (90%) del flujo anual de este elemento es de origen humano (Fericola, 1992b).

La concentración de Cadmio es elevada alrededor de minas y zonas industriales, así como en zonas urbanas, concentración que disminuye a medida que uno se aleja de estas zonas, siendo menor, por ejemplo, en área rural. Así y todo, el



aire es un medio que permite el transporte de Cadmio a la cadena alimentaria de zonas muy alejadas de la civilización (Ramírez, 2002).

1.2.3 Contaminación del suelo por Cadmio

La mayor parte de Cadmio vertido al ambiente por el hombre termina en el suelo y agua (principal vía de deposición es la atmosférica con un 23% del total), el hombre genera otras fuentes de contaminación como sólidos urbanos, uso de barros industriales como fertilizantes para mejorar las características minerales de los suelos (Madeddu, 2005).

Se considera que la concentración de Cadmio en suelos es entre 0.3-0.6 µg/Kg y se piensa que esta concentración se duplicará cada 50-80 años, contando los índices actuales de emisión de origen humano (Madeddu, 2005). Actualmente, en la mayoría de suelos urbanos, es raro encontrar concentraciones inferiores a 1.0 µg/Kg. Incluso se han hallado zonas en Japón tan contaminadas que no pueden usarse ni para cultivar arroz, en Europa la mayoría de suelos contaminados, es por el uso de fertilizantes y lodos industriales, más que por la industria en sí (Madeddu, 2005).

1.2.4 Contaminación del agua por Cadmio

El Cadmio que llega al agua procede principalmente de vertidos industriales, así como vertidos urbanos. La contaminación depende también de la cercanía de superficies acuáticas cercanas a zonas urbanas. Sin embargo, parte del Cadmio atmosférico acaba siendo depositado en la superficie del agua, y representa el 23% del Cadmio contaminante que llega al agua, es decir, es la vía principal de entrada de Cadmio en agua (Madeddu, 2005).

Actualmente la Comunidad Económica Europea (CEE) establece los valores límite de emisiones mensuales permitidos por la industria, los valores permitidos en agua para compuestos de Cadmio son 0.02 mg/l (promedio mensual) (Ramírez, 2002).



1.2.5 Bioacumulación de Cadmio

La bioacumulación representa el cociente entre los niveles de un elemento en un organismo y la cantidad del mismo en el entorno en el que vive, o en las distintas especies de organismos animales o vegetales del que se alimenta. La bioacumulación de los metales pesados (Tabla 6) en un organismo es relativamente tóxica y se manifiesta con la aparición de patologías en diferentes órganos y tejidos (Vega, 1985 c).

Tabla 6. Factor de bioconcentración de algunos metales

Medio acuático				
	Arsénico	Cadmio	Mercurio	Plomo
Agua	1	1	1	1
Plantas	170	1000	1000	200
Invertebrados	330	2000	100000	100
Peces	330	200	1000	300
Medio terrestre				
Suelo	1	1	1	1
Plantas	0.01	0.03	0.4	0.07
invertebrados	0.01	17	--	0.02
Mamíferos	0.001	0.008	5	0.001
Aves	0.001	--	50	0.001

Para el estudio de las distintas fases de absorción, distribución, biotransformación y excreción del Cadmio (toxicocinética) se han propuesto varios modelos metabólicos multicompartimentales, determinando el ciclo que el metal cumple en el organismo y los compartimentos en los que se reparte según el tipo de absorción (Madeddu, 2005).

1.2.6 Toxicidad del Cadmio

Los principales efectos fisiológicos y patológicos asociados a la exposición aguda y/o crónica al Cadmio son:

Nefrotoxicidad– Teniendo en cuenta la función del riñón como órgano desintoxicador, es frecuente que se halle una mayor concentración de sustancias



tóxicas, sobre todo a nivel de los túbulos renales, que son los que tienen mayor actividad de absorción y secreción. Ciertos metales pesados, como Cd, Hg, Pb y Cr, pueden alterar las funciones renales; las alteraciones principales pueden ser de tipo tóxica, principalmente sobre el epitelio tubular al ser el más sensible la nefrona (Bello, 2001).

Hepatotoxicidad– Se ha demostrado en estudios *in vitro* que el Cadmio puede producir efectos hepáticos tanto en mamíferos, así como peces, aves y reptiles. Se ha visto que la hepatotoxicidad presenta una relación dosis-dependiente del tiempo de exposición, faltando realizar aun más estudios en humanos (Lafuente, 1999).

Osteomalacia– Esta patología ósea se describe desde 1942 en forma de fisuras óseas simétricas que aparecen sobretodo en el cuello del fémur. Si la dosis de metal acumulado aumenta, se llega a una intoxicación muy avanzada en que aparece hipercalciuria, la cual, probablemente relacionada con una alteración del metabolismo óseo, puede llegar a producir osteomalacia Se asocia a una alteración del metabolismo del Calcio, ya que afecta especialmente a las mujeres, después de la menopausia, provocando dolores violentos en pelvis y miembros inferiores (Vega, 1985a).

Hipertensión– Debido al fallo renal, se produce vasoconstricción y retención de iones de Sodio, lo cual es el responsable de la hipertensión. En los últimos años se han realizado estudios con animales de laboratorio donde se ha demostrado el efecto hipertensor del Cadmio en el sistema vascular de ratas, cuando se les ha administrado el metal en el agua de consumo (Lauwerys, 1982).

Carcinogénesis– Se están realizando estudios para demostrar la acción carcinogénica del Cadmio en el hombre. Se cree que probablemente lo sea, debido a que es uno de los metales necesarios (esenciales) para ciertas rutas enzimáticas y metabólicas, pudiendo actuar a nivel de *loops* en proteínas transformadoras, así como producir daños en el citoesqueleto, afectando a la acción de la DNA-polimerasa a nivel de biosíntesis celular (Bello, 2001).



1.2.6.1 Toxicidad del Cadmio en agua

El Cadmio, es probablemente uno de los metales más biotóxicos que existen, debido a que cuando se absorbe a través de la ingesta de alimentos o por agua, puede dañar riñón, pulmón, esqueleto, testículos y sistema nervioso central; de acuerdo al sitio de acción se denomina órganos blanco; en cambio si se clasifica en cuanto en que órgano se acumula, el riñón es su órgano afín, provocando falla renal como lesión principal (Chang y Cockerham, 1994). En el medio acuático, los crustáceos parecen ser los más sensibles a este elemento, seguido por los moluscos y poliquetos debido a que son organismos filtradores, por lo general los organismos marinos son menos sensibles a la toxicidad del Cadmio disuelto que los organismos de estuario o de agua dulce (Sadiq, 1992).

En peces, el Cadmio afecta a varios sistemas enzimáticos, como los involucrados en la neurotransmisión, en el transporte transepitelial, en el metabolismo intermediario, en la actividad antioxidante y en las oxidasas de función mixta, también se han visto deformidades en el esqueleto asociadas a exposiciones de bajo nivel; el mecanismo de acción más conocido para este elemento es a través de la interacción con el metabolismo del Calcio (Ca) en los animales, una respuesta común con vertebrados ante la exposición de Cadmio es la hipocalcemia, relacionada con el flujo de Calcio (Hall, 1998).

Existen reporte de que en peces causa hipocalcemia (es la disminución de las concentraciones de calcio total por debajo de la cifras de referencia en peces), probablemente al inhibir la ingestión de Ca del agua. Sin embargo, elevadas concentraciones de Ca en el medio acuático protegen de la ingestión de Cadmio (Hall, 1998). Por otra parte la toxicidad es variable en los peces, pero se sabe que los salmónidos son particularmente sensibles y que los estados embrionarios tempranos de alevines son los más sensibles, mientras que los huevos son los menos sensibles (WHO, 1992).



1.2.7 Toxicocinética del Cadmio

En condiciones “normales” de exposición ambiental el Cadmio absorbido se excreta principalmente por orina y en menor cantidad con la bilis, aunque pequeñas porciones puedan eliminarse con sudor, pelo y aún secreción gastrointestinal, pero el Cadmio que sale con heces en su mayor parte es el que no se absorbió (Kjellstrom, 1978). La acumulación de Cadmio en riñón e hígado depende de la intensidad, del tiempo de exposición y del estado óptimo de la función de excreción renal del organismo (Oleru, 1976).

La fuente más importante de exposición no laboral de Cadmio es la ingesta de alimentos contaminados (Oleru, 1976). En las células, el Cadmio se une a la **metalotioneína** que es el “medio de transporte” del Cadmio en el plasma sanguíneo (García, 1999). La función principal de esta micro proteína es la protección del sistema enzimático celular, aunque se le ha descrito otra función, cual es la de unirse específicamente al Cadmio y a otros metales pesados (Kido *et al*, 1991). Su síntesis en hígado, riñón e intestinos es inducida por el Cadmio y se conoce por estudios experimentales que el complejo Cadmio–metalotioneína es más tóxico para los túbulos renales que el Cadmio *per se*. Paradójicamente, cuando la metalotioneína se sintetiza en las células, las protege de la toxicidad del Cadmio, pues inactiva el metal (Kido *et al*, 1991).

El Cadmio atraviesa la barrera placentaria fácilmente, induciendo ahí la síntesis de metalotioneína, con la que forma el complejo Cadmio-metalotioneína, que se acumula progresivamente en la placenta durante el embarazo, actuando como mecanismo protector frente al transporte de Cadmio al feto, al término del embarazo, la concentración de este elemento en la placenta es aproximadamente 10 veces más que en la sangre materna. Por el contrario, la concentración de Cadmio en el cordón umbilical es alrededor de 2 a 3 veces más baja que en la sangre materna. Por ello, se infiere que puede interferir la evolución del embarazo por acción directa sobre el metabolismo de la placenta, pero no por acción directa sobre el feto (Vuori, 1979).



En exposiciones laborales, la inhalación es la ruta principal de ingreso. En grandes fumadores se ha encontrado valores adicionales de absorción por inhalación de hasta el 50% (Kjellstrom, 1978 y La Dou, 1999). En personas expuestas laboralmente, el Cadmio se encuentra también en páncreas, pulmón, aorta, corazón y músculos (Órganos afines) (Vuori, 1979).

1.2.7.1 El modelo toxicocinético

La absorción es relativamente lenta, con un promedio de 14 días en exposiciones prolongadas (Kjellstrom, 1978). Las vías de ingreso y distribución en exposición ocupacional, el Cadmio procede de dos vías de ingreso: inhalación e ingestión. La fracción que pasa a sangre se distribuye en 3 compartimentos de recambio:

- Compartimiento 1: de “recambio rápido” y, por lo tanto, no genera acumulación.
- Compartimiento 2: de “recambio medio”, constituido por los hematíes, en los que se acumula en pequeñas cantidades.
- Compartimiento 3: de “recambio lento”; aquí, una fracción significativa de Cadmio se une a la metalotioneína y va a depositarse en los órganos blancos (Ellemhorn, 1996).

Las principales vías de excreción son orina y heces. Por orina, diariamente se elimina 0.007% del contenido corporal y por heces 0,03%, (Figura 2). La vida media de excreción urinaria es de hasta 40 años. Tan sólo una pequeña fracción del Cadmio del compartimiento sanguíneo y otra del hígado, a través de la vía biliar, se elimina por heces (Kjellstrom, 1978 y Ellemhorn, 1996).

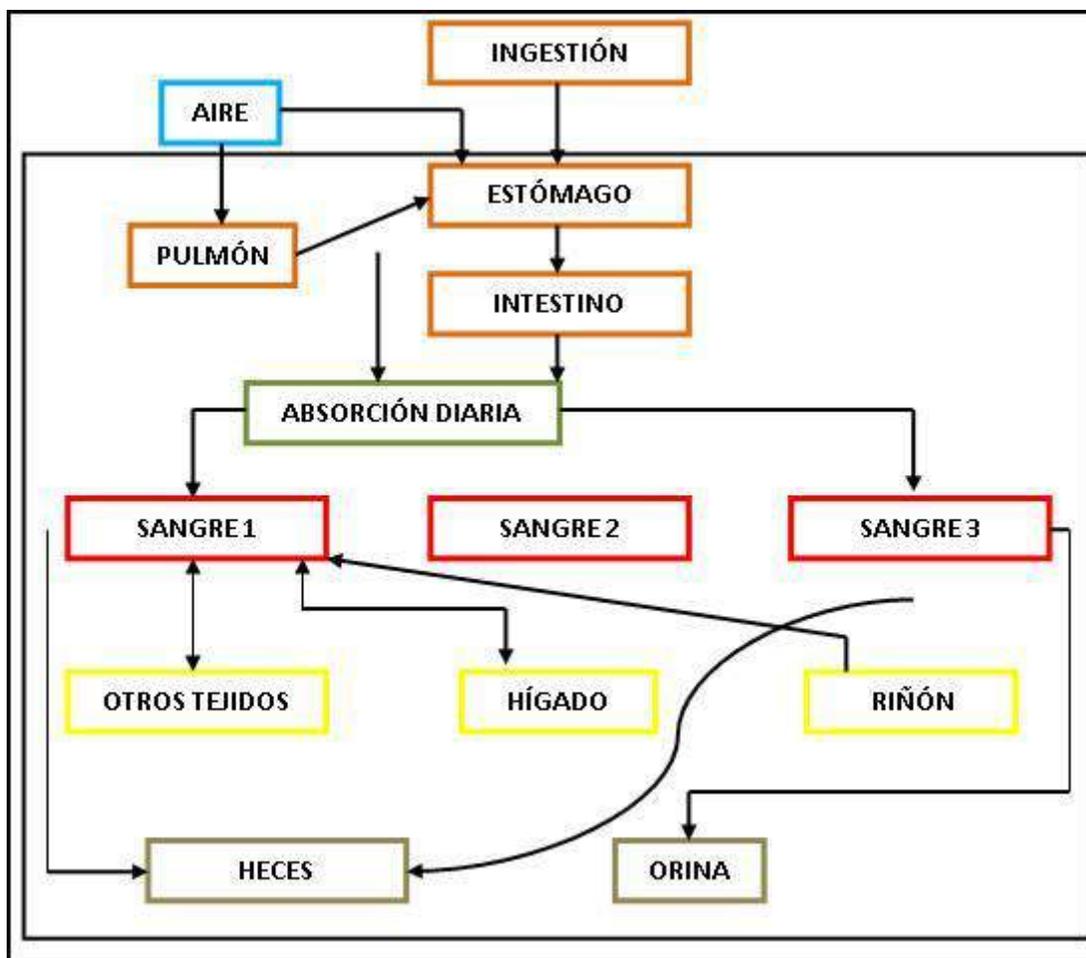


Figura 2. Toxicocinética del Cadmio (Kjellstrom, 1978).

1.2.8 Toxicodinámica del Cadmio

El Cadmio es un xenobiótico y por tanto, un metal tóxico y no esencial para el organismo, que se acumula en los tejidos humanos. Los órganos blancos son riñón y pulmón. En exposición laboral o ambiental, sus principales efectos tóxicos son: neumonitis química, disfunción renal con proteinuria y microproteinuria, además de enfisema pulmonar (González, 1988). El riñón es más sensible al Cadmio que pulmón e hígado, el epitelio del túbulo renal proximal es el punto blanco en donde ejerce su principal efecto. Su deterioro se pone de manifiesto por el incremento de proteínas de bajo peso molecular, lo que causa "proteinuria de bajo peso molecular" (Ellemhorn, 1996).



1.2.9 Epidemiología del Cadmio

En Toyama, Japón, la ingesta de arroz que fue regado con agua contaminada con Cadmio, que provenía de una explotación minera, produjo la enfermedad conocida como "Itai Itai" (Ay ay) por lo dolorosos síntomas de las fracturas múltiples producidas por osteomalacia (reblandecimiento de los huesos) (Bernand, 1984).

En la década de 1940, durante la fabricación de baterías alcalinas de níquel-Cadmio, varias personas murieron en Suecia por la acción del óxido de Cadmio, cuya concentración en el aire era de algunos miligramos por metro cúbico (Bernand, 1984).

En Shipham, una población cercana a una mina de Zinc en Inglaterra, se observó que los habitantes tenían signos de toxicidad por Cadmio, presentando en el hígado niveles de metal de hasta cinco veces superior a los encontrados en habitantes de áreas no contaminadas, así mismos las verduras cultivadas en el área cultivada contenían más de 7 mg/kg de peso seco, concentración muy superior al contenido de Cadmio encontrado en la intoxicación de Japón (Fenicola, 1992).

En Suecia, hubo una intoxicación oral aguda en una escuela, donde los niños consumieron un zumo de fruta procedente de una máquina expendedora en la que el depósito estaba enchapado con Cadmio (Bernand, 1984).

1.3 Monitoreo ambiental

La importancia de evaluar las causas y efectos ocasionados por la contaminación ambiental es esencial, esto lleva a que el monitoreo ambiental sea absolutamente necesario para identificar riesgos en la salud humana y en el ecosistema (Figura 3) (Fernícola, 1992b y Lewtas, 2000). Cuando se habla de un monitoreo ambiental deben tomarse en cuenta que existen diferentes estrategias que tienen como finalidad, determinar los efectos causados por las diferentes fuentes de contaminación (Fernícola, 1992a).

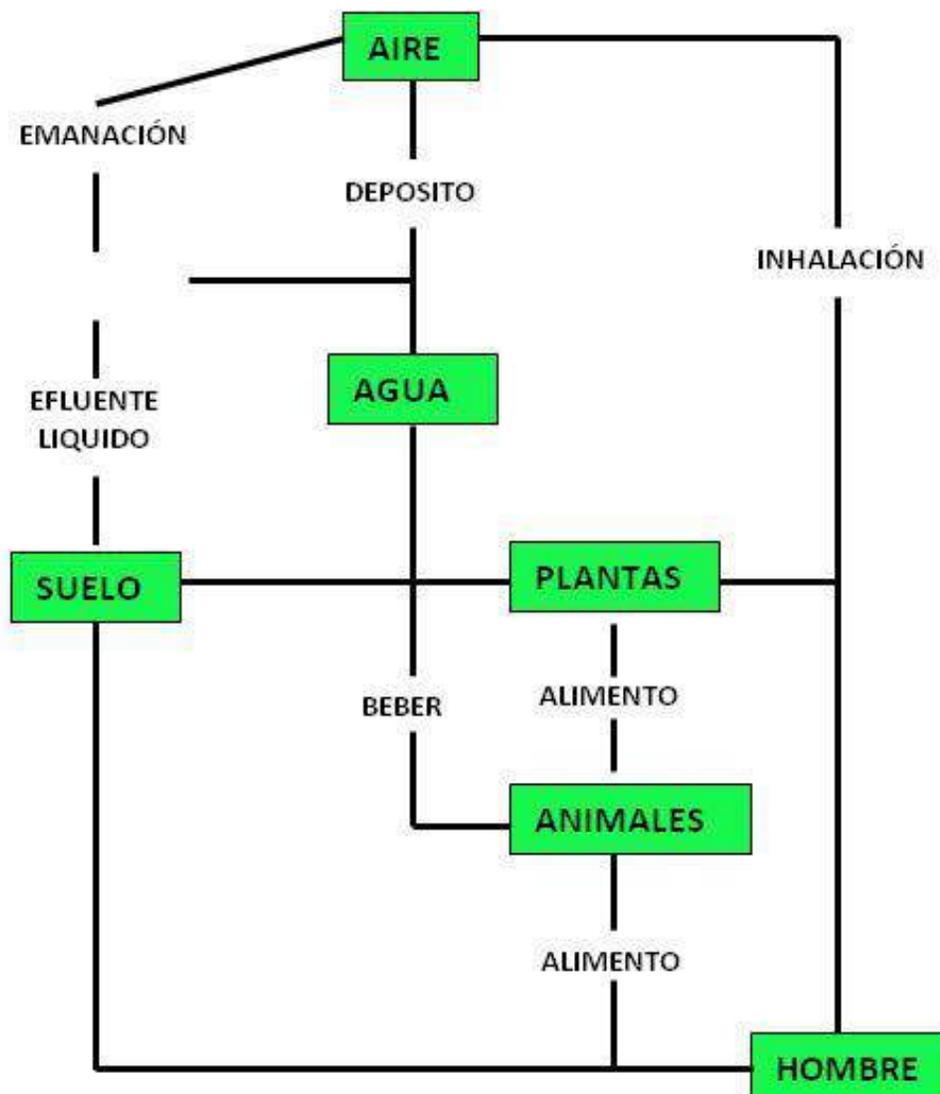


Figura 3. Movilidad de los contaminantes en el ambiente (Vega, 1985 a).

1.3.1 Toxicología

Podría definirse a la Toxicología como la ciencia que estudia los efectos nocivos de los agentes químicos (agentes tóxicos) en los sistemas biológicos y que establece, además, la magnitud del daño en función de la exposición de los organismos vivos a dichos agentes. Estudia el origen, los mecanismos de acción y la evaluación de los diversos cambios biológicos producidos por los agentes nocivos, su objetivo principal es evaluar el riesgo y establecer el uso adecuado de los agentes químicos (Figura 4) (Fernícola, 1992).

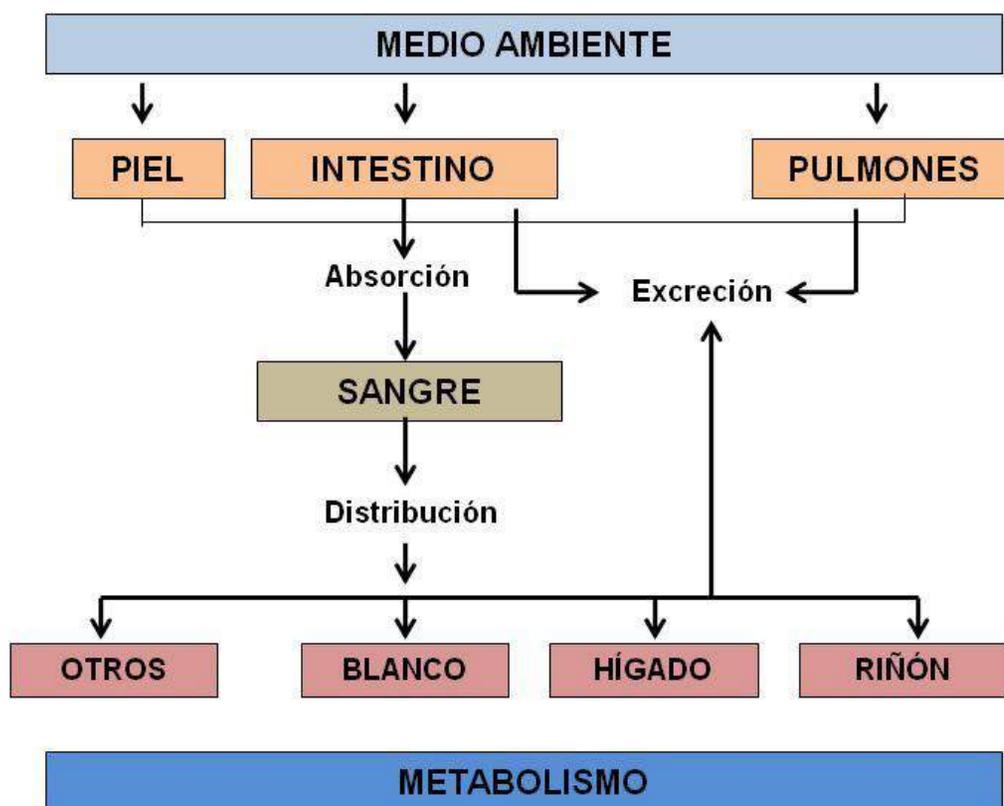


Figura 4. Cinética de un agente químico dentro del organismo (INE, 2005).

1.3.2 Toxicología ambiental

La toxicología ambiental estudia los daños causados al organismo por la exposición a los tóxicos que se encuentran en el medio ambiente. Su objetivo principal es evaluar los impactos que producen en la salud pública la exposición de la población a los tóxicos ambientales presentes en un sitio contaminado. Es



conveniente recalcar que se estudian los efectos sobre los humanos, aunque pudieran existir, en el sitio de estudio, otros blancos de los tóxicos tales como microorganismos, plantas y animales, entre otros (Vega, 1985).

1.3.3 Ecotoxicología

La ecotoxicología es la ciencia que propone la evaluación, el monitoreo y la predicción del destino y efectos xenobióticos en el ambiente y se propone proveer una base científica que permitirá que las sustancias sean evaluadas con una cantidad razonable de esfuerzo y costo (Moriarty, 1988). Se basa en ciertas pruebas para apoyarse en alcanzar sus objetivos, los ensayos de toxicidad (Tabla 7). La información obtenida provee la base para evaluaciones que permitan determinar que sustancias podrán ser liberadas al ambiente, cuáles de ellas serán ambientalmente tolerables y en qué cantidades (Rombke y Moltmann, 1997). La ecotoxicología prospectiva evalúa la toxicidad de las sustancias antes de su producción y uso. La ecotoxicología retrospectiva se ocupa de confirmar si la sustancia produce daños en el ecosistema (Vera *et al*, 2001). El efecto causado por un tóxico dependerá de su toxicidad inherente (capacidad de causar algún efecto nocivo sobre un organismo vivo), del grado de exposición, que a su vez dependerá de la cantidad que ingrese, de cuánto pase a los distintos compartimientos del ecosistema y de su persistencia (Fericola, 1992).

1.3.4 Genética toxicológica

La Genética toxicológica es una rama de la Genética o de la Toxicología que identifica y analiza la acción de un grupo de agentes tóxicos que son capaces de interactuar con el material genético de los organismos (compuestos genotóxicos). Su objetivo primordial es, detectar y entender las propiedades de los agentes físicos y químicos genotóxicos que producen efectos hereditarios desde deletéreos hasta letales (Vega, 1985).



Tabla 7. Pruebas de toxicidad y sus principales objetivos

Pruebas	Objetivos
Toxicidad aguda	<ul style="list-style-type: none">• Determinar la dosis letal 50 (DL₅₀)• Determinar las manifestaciones clínicas y patológicas de la intoxicación aguda
Biotransformación y toxicocinética	<ul style="list-style-type: none">• Determinar cualitativamente la interacción entre el toxico y el organismo• Determinar la variación en la respuesta al toxico, en una o entre varias especies animales.• Definir características farmacocinéticas de la sustancia toxica: absorción, distribución y eliminación
Toxicidad genética	<ul style="list-style-type: none">• Demostrar cualitativamente la presencia o ausencia de actividad mutagénica o carcinogénica• Servir de guía para la evaluación y cuantificación del riesgo genético humano• Determinar el efecto a varios regímenes de dosificación• Demostrar efectos reproductivos y teratogénicos• Desarrollar datos que puedan sustentar la evaluación de riesgo reproductivo para el humano
Toxicidad crónica	<ul style="list-style-type: none">• Encontrar y caracterizar los efectos tóxicos que solo se manifiestan después de una exposición prolongada, en particular los efectos que son irreversibles y progresivos• Desarrollar datos relacionados con los obtenidos en los estudios de biotransformación y toxicocinética sirvan para evaluar el riesgo de daños que se manifiestan tardíamente
Evaluación cuantitativa de riesgo	<ul style="list-style-type: none">• Evaluar 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

1.4 Evaluación del efecto tóxico

El efecto toxico es el producido por uno o varios agentes tóxicos sobre un organismo, población o comunidad que se manifiesta por cambios biológicos. Su grado se evalúa por una escala de intensidad o severidad y su magnitud está relacionada con la dosis (cantidad de sustancia administrada, expresada generalmente por unidad de peso corporal) o la concentración (sustancia aplicada en el medio) del agente tóxico (Vera *et al*, 2001).



Los efectos tóxicos a evaluar pueden ser: mortalidad, inmovilidad, inhibición del crecimiento de la población, alteración del comportamiento, etc. Las condiciones de los cultivos y los ensayos deben estar altamente estandarizadas para permitir la comparación de los resultados (Vermeire, 1992). Los organismos empleados para los ensayos deben tener alta sensibilidad a los tóxicos, ya que al establecer las concentraciones seguras para ellos se espera proteger a todo el ecosistema, pero hay que tener en cuenta que distintas especies tienen diferente sensibilidad a distintas sustancias químicas (Figura 5) (Vermeire, 1992).

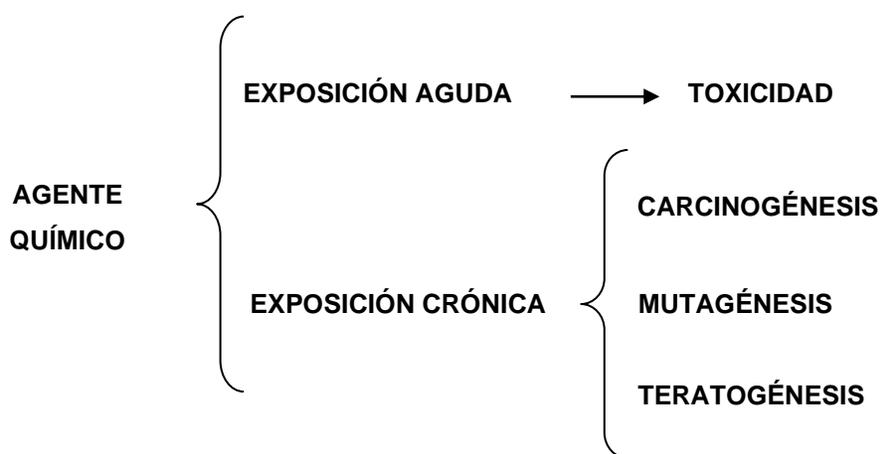


Figura 5. Tipos de exposiciones a agentes genotóxicos.

1.4.1 Carcinogénesis

La carcinogénesis (Tabla 8) se refiere al origen de los procesos carcinógenos, y el cáncer lo entendemos como la proliferación incontrolada de células y la colonización de estas a otros territorios, la cual da como resultado final el inadecuado funcionamiento de la población normal de células. Existen diferentes tipos de carcinógenos, pero no todos afectan de igual manera a los individuos. Esto depende de un polimorfismo genético que influye en la expresión de xenobióticos, enzimas encargadas de la detoxificación de sustancias carcinogénicas. De esta forma no todas las sustancias son detoxificadas con igual eficacia en los individuos. Lo cual lleva a la existencia de sustancias más o menos tóxicas para un individuo dependiendo de su propia capacidad enzimática para metabolizar los carcinógenos (Lozano *et al*, 2000).



1.4.2 Mutagénesis

La mutagénesis son las alteraciones heredables inducidas en las células germinales, las cuales generalmente se originan en organismos empleados experimentalmente como en bioensayos, de hecho, la mayoría de los agentes genotóxicos, se han detectado a través de los cambios transmisibles a las generaciones sucesivas de manera experimental (Lozano *et al*, 2000).

1.4.3 Teratogénesis

La teratogénesis se refiere específicamente a las alteraciones metabólicas y morfológicas ocurridas durante el desarrollo embrionario. La ciencia encargada de estudiar esto es la teratología que se encarga de estudiar las malformaciones congénitas o mutaciones, ya sean inviábiles (abortos) o viables. Las malformaciones o anomalías congénitas suelen desarrollarse en etapa embrionaria, por lo que es importante un suficiente conocimiento de la disciplina conocida como embriología. Se denominan teratógenos aquellos agentes que pueden inducir o aumentar la incidencia de las malformaciones congénitas cuando se administran o actúan en un animal preñado durante su organogénesis. Las muertes intrauterinas y las reabsorciones no siempre son incluidas como efectos teratológicos (Perez-Landeiro, 2002). El desarrollo embrionario y fetal puede ser alterado por diferentes factores externos (Radiaciones, calor, sustancias tóxicas, virus entre otros) o internos (Alteraciones genéticas y/o cromosómicas). También los defectos congénitos pueden ser el resultado de los dos conjuntos de factores relacionados: el acervo génico (genoma) y los factores ambientales (Dicke, 1989).



Tabla 8. Características de mutágenos, carcinógenos y teratógenos

Agente	Células susceptibles	Periodo susceptible a la exposición	Duración de la exposición y dosis
Mutágeno	Germinales	Todos los estadios de la gametogénesis	Aguda o prolongada, todas las dosis
Carcinógeno	Somáticas	Incierto, probablemente todos los estadios del ciclo celular	Prolongada, todas las dosis
Teratógeno	De tejidos inmaduros	Mayor durante los periodos de diferenciación temprana en el embrión	Aguda, dosis por arriba de la dosis máxima no efectiva

1.5 Bioindicadores

Los bioindicadores son atributos de los sistemas biológicos que se emplean para descifrar factores de su ambiente, también denominadas como especies indicadoras son aquellos organismos (o restos de los mismos) que ayudan a descifrar cualquier fenómeno o acontecimiento actual (o pasado) relacionado con el estudio de un ambiente. Las especies tienen requerimientos físicos, químicos, de estructura del hábitat y de relaciones con otras especies (Butterworth, 1995). Un indicador biológico debe tener varias características para que sea eficaz, por ejemplo: ser altamente sensible, poco costoso, capaz de evaluar mezclas complejas, así como diferentes ambientes (agua, suelo y aire) y que reporte resultados en un corto plazo (Butterworth, 1995).

1.5.1 Biomarcadores

Hulka (1990) define a los biomarcadores como cualquier alteración biológica que puede ser medible en tejidos, células, o fluidos corporales. Estas alteraciones pueden ser usadas como indicadores de exposición ambiental que reflejan los efectos adversos tempranos tales como daño celular (Guzmán, 1997).

Los biomarcadores (Tabla 9) constituyen una herramienta de evaluación de efecto tóxico muy útil en los estudios de evaluación de riesgo toxicológico y ecotoxicológico. El término biomarcador se refiere a cambios fisiológicos,



bioquímicos, histológicos y de comportamiento, entre otros, que se pueden detectar como consecuencia del contacto con los xenobióticos, desde el nivel de organización molecular y celular en adelante (Boudou y Ribeyre, 1997). Se reconocen tres principales tipos de biomarcadores: de exposición, de efecto y de susceptibilidad (Lagadic *et al*, 1997). Los biomarcadores pueden dividirse en genéticos (cambios medibles, heredables y fácilmente cuantificables), de dosis (miden la concentración del agente xenobiótico), de respuesta biológica (el tipo de daño, el cual puede ser tóxico, teratógeno, mutágeno y cancerígeno, entre otros.) y de susceptibilidad (dependiendo el organismo) (Markert *et al.*, 1995). Según Hulka (1990), estos son utilizados para:

- Detectar la presencia de una exposición.
- Determinar las consecuencias biológicas de la exposición.
- Detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico.
- Identificar a los individuos sensibles de una población.
- Fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

Tabla 9. Principales biomarcadores en toxicología (Evenden *et al.*, 1997).

Nivel de organización	Marcador Biológico	Tipo de Marcador
Moléculas biológicas	Efectos en el ADN: formación de ductos; rompimiento de cadena; mutaciones en genes importantes	Marcadores de exposición
	Expresión de genes importantes: regulación celular y proteínas de defensa (HSPs, p53, p21, oncoproteínas, MXR proteínas, enzimas detoxificantes y esterasas)	
Organelos	Inducción de micronúcleos, aberraciones cromosómicas e ICH	Marcadores de efectos
	Degradación de lisosomas y apoptosis	
Células	Alteraciones hematológicas	
Tejidos	Disturbio de células inmunes	
Órganos	Función de órganos; cardíaco, renal, tiroideo, adrenal y pituitario	
	Termorregulación y osmoregulacion	
Individuo	Funciones metabólicas: glucólisis, biosíntesis de aminoácidos y respiración	
	Cambios en las esferas de crecimiento	
	Reducción de rango de crecimiento	
	Cambios locomotores y conductuales	
	Cambios en el ciclo reproductivo	



	Cambios en la eficiencia de la fertilidad	
Poblaciones	Cambios en la fecundidad y abortos	Marcadores de cambios biológicos
	Reducción en la viabilidad de la progenie	
	Deformaciones	
	Muerte	
	Decaimiento numérico de la población	
	Evidencia de endemismos	
	Cambios en la densidad de población	
Comunidades	Perdida de la variación genética: frecuencia de análisis de aloenzimas, genética de dedos de zinc, RPFL y RAPD mitocondrial	Marcadores de cambios evolutivos
	Análisis de ADN	
Ecosistema	Micro y minisatélites	
	Reducción de la biodiversidad y diversidad de especies	

1.5.2 Biomonitores

Hay una diversidad de organismos que son utilizados para estudiar el efecto teratogénicos entre ellos están insectos, ratones y peces entre otros; estos últimos son de reciente interés en el ambiente científico, debido a que pueden ser eficaces para detectar contaminantes en sistemas acuáticos (Butterworth, 1995).

Los peces en general, muestran un conjunto de patrones reproductivos extraordinariamente diversos; variando en tiempo, conducta y recursos utilizados. Dentro de la gama de patrones reproductivos que se han reportado para peces, algunos ovíparos presentan la ventaja de que todo su desarrollo embrionario se da fuera de la madre y son incubados en el ambiente acuático, lo que permite un manejo y exposición controlada de sus huevecillos y embriones (Pérez *et al*, 2000).

1.5.3 Bioensayos

Los bioensayos o ensayos de toxicidad son organismos empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. Los bioensayos permiten medir el efecto de uno o más contaminantes sobre uno o más especies de organismos (Del Valls y Conradi, 2000). Estos organismos están bajo condiciones controladas de laboratorio (Tabla 10), que permiten evaluar el grado de afectación que un agente xenobiótico tiene en organismos y su ambiente. Además se dispone



de grupos de control (que no se exponen al tóxico), que permiten diferenciar los efectos inducidos de los espontáneos (Rodríguez y Esclapés, 1995).

A través de tratamientos agudos se puede cuantificar las concentraciones letales de un xenobiótico ante una especie en particular y determinar así concentración letal media (CL_{50}), que corresponde a la concentración de un xenobiótico que causa la muerte al 50 % de la población experimental al cabo de un tiempo determinado y que sirve como parámetro de referencia con otros agentes y organismos (Del Valls y Conradi, 2000). Por otra parte los tratamientos permiten estimar la relación entre la concentración y algún efecto secundario a través de la “Concentración Efectiva” media de la sustancia de prueba (CE_{50}), es decir la concentración que es capaz de inducir un efecto al 50 % de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado (Rodríguez y Esclapés, 1995). Al elegir un ensayo de toxicidad se deben tener en cuenta los siguientes elementos: los resultados deben ser relevantes a nivel ecológico y estar relacionados con los sucesos ocurridos en el ecosistema objeto de estudio; el ensayo y las variables a estudiar deben ser suficientemente sensibles para identificar el problema y distinguir entre los distintos puntos o sitios considerados; las pruebas deben ser rápidas, reproducibles y la respuesta del control predecible; la metodología debe ser estándar; las variables a medir en las pruebas deben responder de manera similar a sustancias químicas parecidas (Del Valls y Conradi, 2000).

Tabla 10. Comparación de pruebas de toxicidad (Del Valls y Conradi, 2000).

Tipo	Ventajas	Desventajas
Laboratorio	Disponibilidad de metodologías estandarizadas	Deficiencia de realismo
	Comparación de especies de diferentes niveles tróficos	Incapacidad de predecir efectos bajo condiciones de campo
	Posibilidad de utilizar las especies más sensibles	Aplicable solo en especies probadas
Campo	Los resultados pueden correlacionarse con los datos físico-químicos	Incapacidad de aislar los factores causantes
	Proporciona evidencia incuestionable del deterioro	No utilizable para pruebas de hipótesis
	Indica los contaminantes responsables de la afectación	



1.6 Uso de *Danio rerio* como bioensayo

La biología de *Danio rerio* (Figura 6) comenzó a estudiarse en la Universidad de Oregón entre los años 1970-1980 y allí se constituyó el principal portal que da acceso a las tecnologías desarrolladas desde entonces en la red internacional del *Danio rerio* (Kimmel, 1995), como modelo experimental en el área de biología del desarrollo (hasta entonces se utilizaban fundamentalmente el ratón y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*).



Figura 6. *Danio rerio* en acuario.

Se han realizado investigaciones genéticas en *Danio rerio* y su desarrollo embrionario (Gaiano y Hopkins, 1996) las características más importantes de *Danio rerio* como modelo experimental que han sido la causa de su elección por muchos grupos de investigación son las siguientes:

Su pequeño tamaño y alta tasa de reproducción lo hace un bioensayo económico y versátil (Figura 6), es un vertebrado, y por lo tanto, presenta una alta homología genética con el resto de vertebrados, el hombre incluido, ciclo de vida corto, ovoposiciones inducibles, la fertilización y desarrollo externo, permiten que la observación del huevo sea mucho más fácil que con otros modelos animales. Presenta corión semipermeable, y al igual que los embriones es transparente (Figura 7), lo que permite observar fácilmente a los órganos internos con un microscopio sin matar o alterar al embrión y tiene varios biomarcadores fáciles de distinguir en

diferentes etapas (Figura 8) y aparentemente inducibles por agentes químicos (Kimmel, 1995).

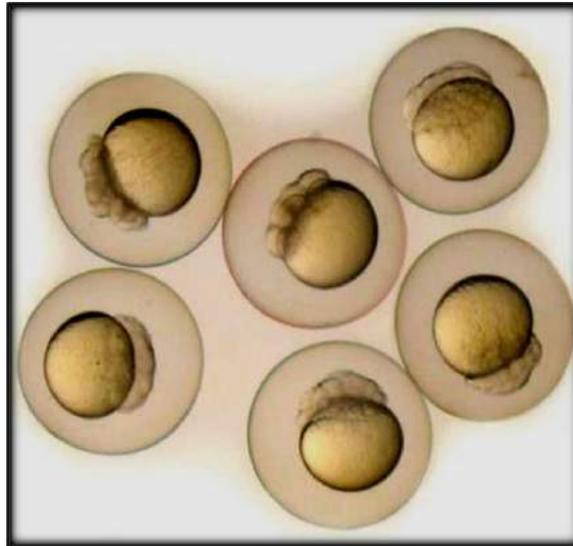


Figura 7. Transparencia de embriones del *Danio rerio*.

1.6.1 La prueba DarTa (*Danio rerio* Teratology assay)

Danio rerio es un bioindicador modelo para evaluar efectos letales y teratogénicos mediante una metodología llamada DarTa (*Danio rerio* teratology assay), en la cual se exponen embriones del pez durante todo el desarrollo embrionario (Figura 8) a diferentes concentraciones de distintos compuestos; los resultados muestran que después de 48 horas de exposición los embriones presentaban daños morfo-fisiológicos, por ejemplo: anomalías en el corazón, ojos, cabeza, aleta caudal, pigmentación, circulación sanguínea, etc. (Nagel, 2002).

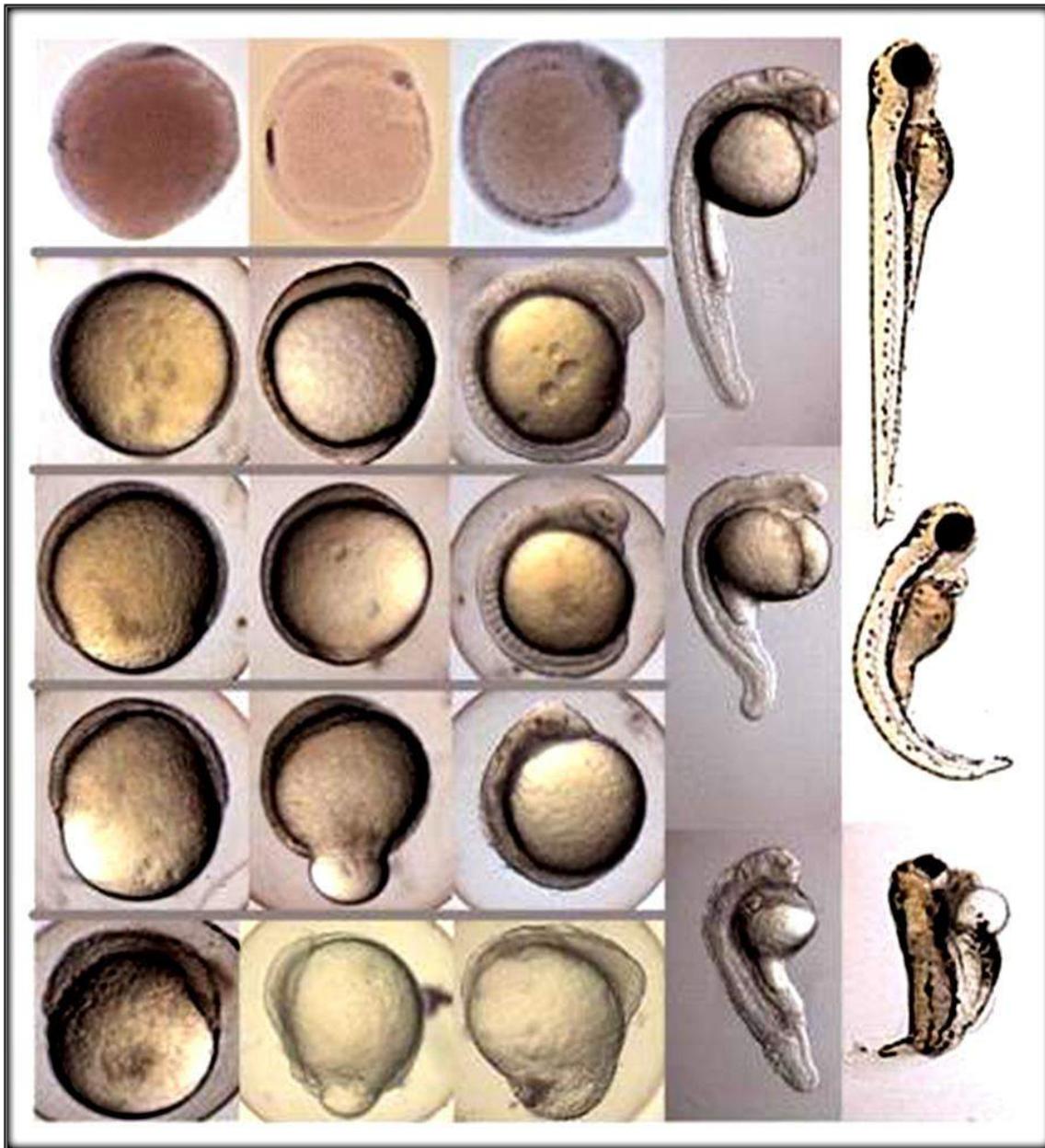


Figura 8. Desarrollo de *Danio rerio*.

Desde el enfoque toxicológico, uno de los primeros trabajos reportados es el de Dietrich en 1998, en donde utilizó a esta especie para evaluar daño embriotóxico y teratogénico de muestras de agua a través de la prueba denominada DRETA (*Danio rerio* embryotoxicity and teratogenicity assay), evaluando el daño inducido a nivel de corazón en estos organismos.

Por otra parte Oberemm (2000), sugiere el uso de embriones del *Danio rerio* como un buen bioensayo en la evaluación de elementos tóxicos presentes en el



agua. Describe las principales características del desarrollo embrionario de este organismo, así como las ventajas que presenta el empleo de los embriones de éste, en la evaluación de efectos causados por compuestos químicos de interés toxicológico, además, sugiere el uso de embriones en estado juvenil, debido a que son más sensitivos que los organismos adultos.

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

Estudios recientes, efectuados en el Laboratorio de Genética Evolutiva y Ambiental de la UAEH, realizados por González (2005), indican que la etapa de “alevín” es la más sensible a la acción teratogénica Cloruro de mercurio ($HgCl_2$). Posteriormente, Rivera (2006), sugiere la columna vertebral del *Danio rerio* como el biomarcador más sensible a la acción teratogénica del mismo compuesto.

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



2 JUSTIFICACIÓN

La evaluación de la calidad del agua ha tenido un lento desarrollo; sin embargo hoy en día, la importancia tanto de la cantidad como de la calidad del agua está fuera de toda duda, aunado a las grandes cantidades de agentes químicos, que se encuentran de manera natural o se vierten en los sistemas. La laguna de la reserva de la biosfera de Barranca de Metztitlán, Hidalgo, están contaminados con varios metales pesados que sobrepasan los límites que están en la NOM-127-SSA1-1994, por lo que el estudio del agua de la desembocadura de la laguna de esta reserva ecológica es importante, debido a que el agua de esta área se usa para riego y actividades de pesca, así como acuacultura, por lo que el hombre pudiera estar expuesto al Cadmio y/o a otros elementos de manera directa e indirecta.

Por esta razón es conveniente realizar bioensayos utilizando organismos vivos en condiciones controladas de laboratorio (Villamar, 1996). En los últimos años el *Danio rerio* ha tenido un uso como bioensayo pues presenta algunas ventajas muy notables con respecto a otros, entre las cuales están su bajo costo, la fácil reproducción, el amplio número de descendientes, su corión semipermeable y translucido, embriones transparentes y biomarcadores de fácil identificación y susceptibles a cambios ambientales (Kimmel, 1995).



3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto teratogénico del Cadmio a concentraciones presentes en aguas de Metztitlán, Hidalgo, a través de la prueba **DarTa** en la columna vertebral de embriones de *Danio rerio*.

3.1 Objetivos particulares

- Identificación del sitio y temporada con mayor contaminación de Cd en la zona de estudio a través de un análisis preliminar de la calidad del agua del río en la localidad de San Cristóbal y en la desembocadura en la Laguna de Metztitlán, mediante la técnica de “Espectrofotometría de Absorción Atómica Vía Húmeda (EAA)”.
- Determinación de frecuencias espontáneas de malformaciones en columna vertebral de los lotes experimentales de *Danio rerio*.
- Determinar las dosis subtóxicas de Cadmio y del agua de la zona y temporada seleccionada en el sitio de estudio, para establecer las concentraciones experimentales y evaluar el efecto teratogénico.
- Identificar el posible daño teratogénico del Cadmio a 3 concentraciones subtóxicas, así como del agua de la zona y temporada seleccionada en el sitio de estudio.
- Analizar la posible correlación entre los efectos inducidos por el Cadmio y por el agua de la zona y temporada seleccionada en el sitio de estudio. Para identificar posibles efectos sinérgicos y/o antagónicos de los contaminantes reportados en el agua de Metztitlán, Hgo.

4 ZONA DE ESTUDIO

La Reserva de la Biosfera “Barranca de Metztitlán, Hidalgo” (Figura 9) se localiza al parte central del estado de Hidalgo, al este de la ciudad de Pachuca, incluye los municipios de Acatlán, Atotonilco el Grande, Eloxochitlán, Huasca de Ocampo, Metepec, Metztitlán, San Agustín Metzquititlán y Zacualtipán de Ángeles; Su extensión es de 96,043 hectáreas. Se ubica en la región hidrológica número 26 del río Pánuco, presenta gradientes altitudinales que van desde los 1,000 hasta los 2,000 msnm y es hábitat de un conjunto de ecosistemas frágiles de zonas áridas que contienen una gran riqueza en flora y fauna silvestre de importancia biológica, científica, económica, social y cultural (CONANP, 2003). La fauna se encuentra representada por diferentes especies de mamíferos, aves, reptiles y anfibios, en este último grupo, la mayoría endémicos de México (CONANP, 2003).

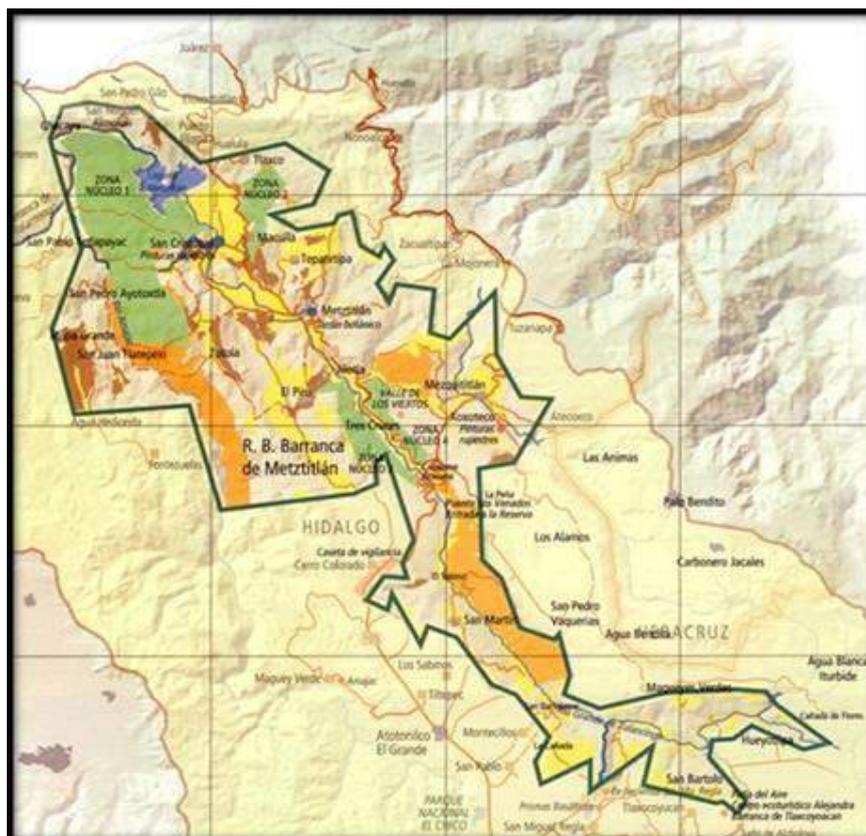


Figura 9. Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán (CONANP, 2003).



4.1 Sitios de muestreo

El presente trabajo partió de la elección de 4 sitios de muestreo, tres a lo largo del río (Puente Venados, Jilotla y San Cristóbal) y el último en la desembocadura del río en la laguna de Metztitlán; con base a poder determinar cómo se modifica la concentración del Cadmio en el río y si se diluye al entrar a la laguna, con el objetivo de identificar él o los mejores puntos para muestrear con un menor gasto de esfuerzo, tiempo y energía, para ello se recurrió al apoyo, asesoría y análisis de las muestras de agua, por parte del Químico Martín Alamilla Medel de la Compañía Minera Real del Monte, con ayuda de un equipo Perkin Elmer 3000 para Absorción Atómica por vía húmeda, con el objetivo de identificar el sitio de mayor concentración de Cd y otros elementos en dos temporadas del año.

5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto tóxico del Cadmio y los efectos sinérgicos y/o antagónicos de los otros elementos contaminantes presentes en el agua de Metztitlán, se requiere contar con los organismos experimentales (*Danio rerio*), lograr su mantenimiento e inducir su conducta reproductiva, para hacer los tratamientos de las muestras de agua, según los resultados preliminares de los estudios analíticos de la calidad del agua.

5.1 Selección de organismos

Se toman en cuenta los criterios de inclusión y exclusión de los organismos experimentales, como lo es el tamaño, estado de salud y conducta. En el caso de *Danio rerio*, se recomienda un periodo de 10 días de observación, en el cual se debe tener un acuario de 70 litros acondicionado con un filtro biológico, aeración constante, calentador con temperatura controlada entre 26 ± 1 °C, una gota de azul de metileno por cada cuatro litros de agua como desinfectante (Figura 10). En esta etapa se debe observar su crecimiento, las características físicas; así como el comportamiento de los individuos y la posible aparición de signos de enfermedades, para excluir los organismos que no cumplan los requerimientos (Kimmel *et al*, 1995).



Figura 10. Pecera de mantenimiento de organismos.

5.2 Lote de mantenimiento de los organismos

Al terminar el periodo de aislamiento, los organismos se transfieren a un acuario de mantenimiento, en donde serán unificados. Se recomienda utilizar un acuario de 70 litros, con un filtro biológico, en las mismas condiciones físico-

químicas que el acuario de aislamiento (Figura 11). El acuario no debe exceder los 60 individuos y se deben eliminar los residuos de alimento 15 minutos después de habérselos dado para evitar la contaminación diaria.

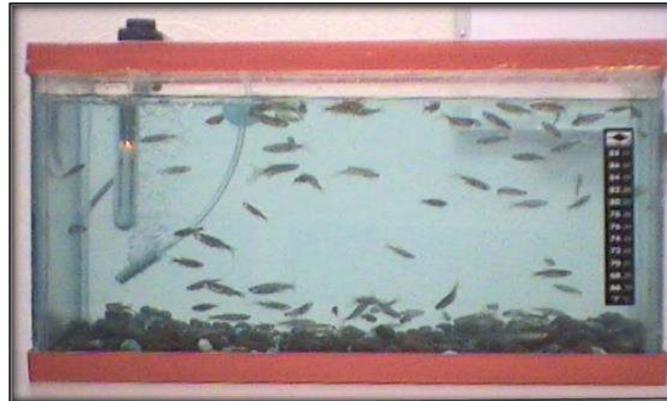


Figura 11. Lote experimental de peces.

Las condiciones físico-químicas (Temperatura, luz, foto periodo, dureza, ruidos del ambiente, instalaciones, espacio) que se observan en la Tabla 11 deberán mantenerse para lograr un buen desarrollo de los peces (Westerfield, 1995).

Tabla 11. Condiciones físico-químicas óptimas

Variable	Condiciones recomendadas	Efectos
Luz solar	No recomendada de manera directa al acuario	Evaporación, formación de algas, favorece la ovoposición de adultos, en alevines afecta el desarrollo embrionario
Temperatura	28+-1°C en acuarios alejados de parrilla, estufa o equipos que produzcan calor	Evaporación, desarrollo de protozoarios, formación de micro-algas
pH	pH 7	No determinado
Corrientes de aire	Ventanas cerradas o cualquier orificio	Evaporación y alteración de las condiciones optimas del acuario contaminación por polvos o partículas
Instalaciones	Mantenimiento del equipo	Revisión diaria para buen funcionamiento Lugar aislado para evitar el estrés de los peces
Espacio	Suficiente para que se puedan manipular con facilidad las peceras	Espacio intra pecera: se debe considerar un equilibrio entre capacidad de pecera con peces quedando una proporción en 1 litro- 5 peces Espacio inter peceras: entre peceras deben tener un espacio de 10 cm. Para realizar observaciones



Figura 12. Medición de parámetros físico-químicos del agua.

5.3 Inducción conducta reproductiva

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

Como se observa en la figura 13 es fácil de distinguir a las hembras cuando están listas para la puesta, ya que su abdomen se abulta notablemente como consecuencia de los huevos que se acumulan en su interior; el cortejo y la puesta se dan al amanecer o cuando se enciende la luz del acuario y/o hay una exposición a rayos solares, lo cual induce al desove (Aguilar *et al.*, 2002).



Figura 13. Dimorfismo sexual de *Danio rerio*.



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

Los huevos no son adhesivos entre sí, ni con la superficie, por lo que los huevos son depositados en el fondo del acuario y por lo tanto, pueden ser sifonados para su recolección. Posteriormente son trasladados a un acuario de mantenimiento de cría con una temperatura de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Aguilar *et al*, 2002). La eclosión ocurre aproximadamente a las 72 horas de su desarrollo; a temperaturas bajas, el tiempo se incrementa notablemente. Es importante resaltar que en el acuario de cría es esencial una buena aeración y una limpieza estricta (Kimmel *et al*, 1995).

5.3.1 Mantenimiento de huevos y alevines

Se colocaron dos peceras de 6 litros (Fig. 15), la primera con temperatura superior a los $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ donde se mantenía a los huevecillos hasta la eclosión, en la segunda la temperatura oscilaba de 23 a 26 °C (Tabla 12) donde se da mantenimiento a los alevines. El recambio de agua para cada pecera se realiza eliminando el 50% del agua para todas las peceras y posteriormente agregando agua en reposo para el llenado, este recambio se realiza 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 (Rivera, 2006).

Para la desinfección y eliminación de formación de iones, se agrega 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).

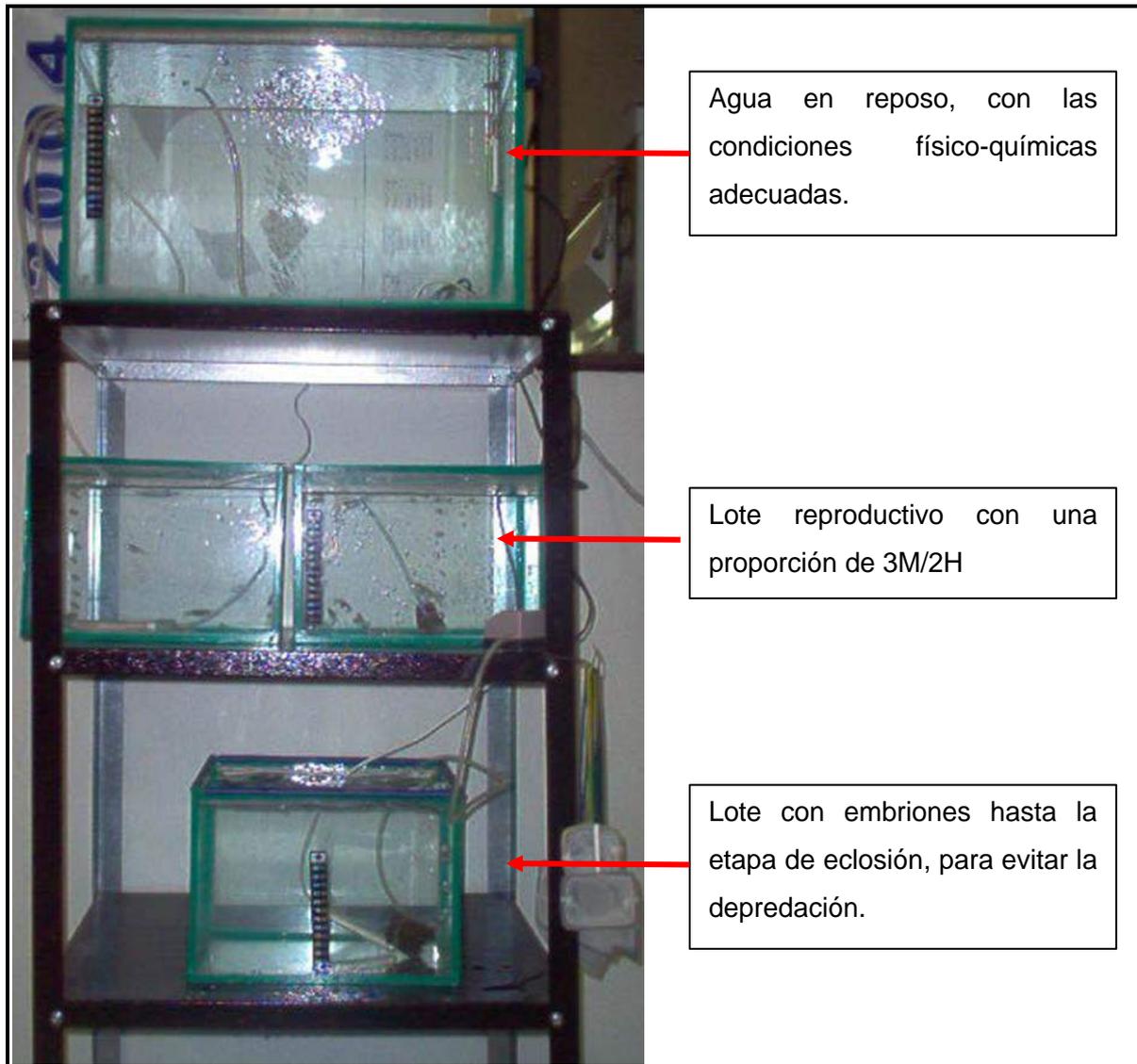


Figura 14. Rank experimental con diferentes montajes.

Con esta metodología se obtienen buenos resultados en cuanto a mantenimiento, y reproducción de *Danio rerio* se pueden realizar análisis de bajo costo, descendencia abundante y lo más importante obtener ovoposiciones programables. Lo que permite realizar experimentos con un número de muestra significativa.

Tabla 12. Temperatura optima por etapa de desarrollo (Aguilar, 2002).

Etapa del Danio rerio	Criterios de selección	%	Temperatura adecuada
Adultos hembras y machos (Lote de mantenimiento).	Viabilidad	(100%).	24 a 28°C
Adultos hembras y machos (Lote de mantenimiento).	% de ovoposición	(100%).	28°C
Huevos	% eclosión	(80%).	28°C
Alevines	Viabilidad	(50%).	24 a 28°C

5.4 Índices de fertilidad, viabilidad y malformaciones espontaneas.

Para evaluar los efectos fisiológicos de los tratamientos, se requiere establecer los parámetros de referencia que permitan identificar y cuantificar los índices de fertilidad (% de ovoposición) y viabilidad (% de eclosión y sobrevivencia de alevines) de *Danio rerio*; para obtener los índices de fertilidad se colocan los organismos seleccionados en un acuario de 4 litros, sin filtro biológico y con redes de maternidad, en una proporción de 3 machos y 2 hembras, con agua en reposo, en condiciones físico químicas adecuadas.

Para evaluar el índice de viabilidad los huevos obtenidos se colocaron en frascos y se taparon con una malla fina, sellados con una liga y sumergidos en una pecera de 4 litros (Figura 15), con agua en reposo, la cual, debe tener todas las condiciones fisicoquímicas optimas antes mencionadas para el desarrollo de los huevos.



Figura 15. Colocación de los frascos con huevos de *Danio rerio* en pecera.



5.5 Inducción del efecto toxico y teratogénico del Sulfato de Cadmio

Se realizaron pruebas de toxicidad con el agua de los sitios de muestreo seleccionados a partir de los análisis de química analítica del agua, así como con la concentración del Cadmio registrada en la muestras de agua preliminares hasta determinar la “Concentración Letal Media” (CL_{50}) a partir de ésta seleccionar una o dos dosis sub toxicas que permitan determinar el posible efecto teratogénico de las muestras de agua y del Cadmio.

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

5.5.1 Pruebas de toxicidad para determinar la concentración letal media

Se analizó el agua de Metztlán a través de la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, donde se encontró la concentración donde se muere el 50% de los individuos a las 24 hrs después del tratamiento, a lo que se le denominó “Concentración Letal Media” (CL_{50}), de igual forma que en los experimentos anteriores se utilizaron 1000 huevos viables por concentración, dando un total de 4000 huevos a evaluar; éstos fueron repartidos en lotes de 10 huevos, en frascos de vidrio de 100 ml con agua de reposo, tapados con una malla fina, sellados con una liga y sumergidos en una pecera de 5 litros con agua de reposo, la cual debe tener todas las condiciones fisicoquímicas optimas antes mencionadas para el desarrollo de los huevos.

5.5.2 Tratamiento para evaluar malformaciones en columna vertebral

Se emplearon 150 embriones de entre 48 y 72 hrs de embriogénesis (que corresponde a antes de eclosionar), divididos en tres muestras de 50 embriones (5 frascos con 10 embriones cada uno) por concentración de Sulfato de Cadmio (CdSO_4), las cuales corresponden a la concentración letal media, a la mitad y al doble de ésta, según técnicas previamente descritas por González, 2005 y Rivera, 2006, más un control concurrente del mismo tamaño, dando un total de 200 huevos analizados por lote experimental.

Posteriormente se colocaron sobre una gradilla, la cual se introdujo en la pecera con la finalidad de evitar que se sumerjan hasta el fondo, además a cada uno de los frascos se les colocó una manguera que administra oxígeno a los embriones y alevines después de eclosionar (Figura 16). La pecera contó con agua en reposo, una bomba de oxígeno que recircula el agua, permitiendo que la temperatura del agua fuera homogénea en toda la pecera, mediante un calentador regulable de 50 W (dependiendo cada experimento), durante las 72 hrs posteriores a la exposición a los embriones (Peña, 2008).



Figura 16. Colocación de los frascos en una gradilla dentro de una pecera.

El registro de la frecuencia y tipo de malformaciones se realizó cada 12 hrs durante las primeras 72 hrs, posteriormente cada día hasta las dos semanas de edad, cuando los alevines pasan a estado juvenil; lo anterior se sustenta en que algunas malformaciones no son evidentes desde el momento de la eclosión; por otra



parte la periodicidad de estas observaciones se justifica en que en el periodo de alevín a juvenil se pueden morir los organismos experimentales y perder un registro de alguna alteración, siendo más frecuente la mortandad en las primeras 72 hrs de edad (Peña, 2008).

5.7 Inducción del efecto tóxico y teratogénico del agua de Metztitlán

La evaluación del agua de Metztitlán permitió correlacionar los efectos tóxicos que presenta el Cadmio por sí solo y en una mezcla compleja de la zona de estudio, en donde hay otros elementos, que al combinarse puede haber efectos sinérgicos y/o antagónicos.

Se analizó el agua de dos sitios de muestreo, que corresponden a la localidad de San Cristóbal y la desembocadura del río en la laguna, en dos épocas del año, la temporada de lluvias y temporada la de secas (de estiaje), para determinar el sitio en donde la concentración más alta de Cadmio presentes en el sitio de estudio; eligiéndose la concentración más alta encontrada, la cual se utilizará para los análisis genotóxicos posteriores.

Con la concentración elegida, se realizaron pruebas de toxicidad con la muestra de agua seleccionada para determinar su toxicidad a través de su la "Concentración Letal" y poder determinar el posible efecto teratogénico de la muestra de agua, a partir de una dosis subtóxica. El registro de la frecuencia y tipo de alteraciones morfológicas de columna vertebral, opérculo y aleta caudal en embriones, así como de su viabilidad, se realiza de igual forma que el apartado anterior (Oberemm, 2000).

Las malformaciones reportadas en columna vertebral, se analizaron mediante la clasificación propuesta por González (2005) y Rivera (2006), la cual se basa en dividir al cuerpo del organismo en tres áreas: cefálica, media y caudal (Figura 17), para ubicar la parte del organismo en donde ocurre la malformación a evaluar; en cuanto a las malformaciones (Tabla 13), estas se clasificaron en sencillas, dobles, múltiples, curvas, en espiral, en aleta caudal y en forma de gancho, manifestando si

son dorsales y/o laterales. Además de que se registra la frecuencia de expresión de cada una de las malformaciones, según la técnica señalada por Peña en el 2008.

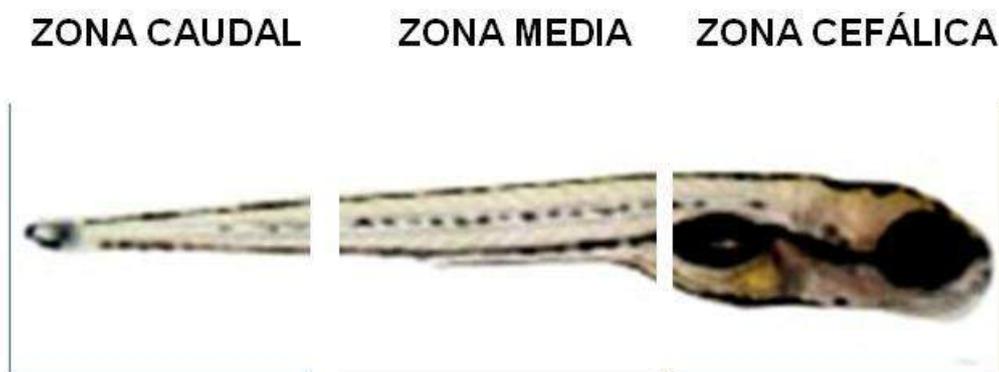
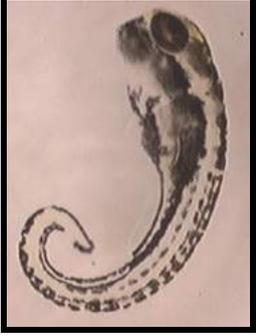


Figura 17. División arbitraria del cuerpo de *Danio rerio* (Peña, 2008).

Tabla 13. Clasificación y descripción de malformaciones (Rivera, 2006).

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



Malformaciones Curvas	Las malformaciones curvas son aquellas en las que el embrión del <i>Danio rerio</i> , presento una curvatura en la zona cefálica, media y/o caudal, lo cual ocasiona que el embrión nade en circulo.	
Malformaciones en aleta caudal	Las malformaciones en aleta caudal son aquellas en las que el embrión del <i>Danio rerio</i> , presenta un pequeño doblez en la zona caudal.	
Malformaciones en gancho	Las malformaciones en gancho son aquellas en las que el embrión del <i>Danio rerio</i> , presento un pequeño doblez en la zona media (columna vertebral) y/o zona caudal, dando el aspecto de gancho al pez.	
Malformaciones en espiral	Las malformaciones en espiral son aquellas en las que el embrión del <i>Danio rerio</i> , presento un enroscamiento en forma de espiral en la zona caudal.	

5.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron de acuerdo a si siguen o no una distribución normal; las pruebas utilizadas fueron Análisis de Varianza (ANOVA) y Análisis Kruskall Wallis y Tukey, utilizando el programa ESTATISTICA Y NCSS 2000.

Análisis de Kruskall Wallis: es una prueba no paramétrica que se utiliza en datos que no tienen una distribución normal, para determinar las diferencias que existe



entre el daño provocado por el cadmio a las dosis probadas, mediante las hipótesis estadísticas:

Hipótesis nula (H₀): Todas las concentraciones son iguales y no hay diferencias significativas (para una distribución no paramétrica).

Hipótesis alternativas (H_a): Una o más concentraciones de cadmio son distintas y presentan diferencia significativa.

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

Hipótesis nula (H₀): Todas las concentraciones son iguales y no hay diferencias significativas (para una distribución paramétrica)

Hipótesis alternativas (H_a): Una o más concentraciones de cadmio son distintas y presentan diferencia significativa.

6 RESULTADOS

Para el análisis de las muestras de agua de la zona de estudio, se usó la técnica de "Espectrofotometría Absorción Atómica Vía Húmeda (EAA)", y como referencia se tomo a la NOM-127-SSA1-1994 de "Salud ambiental, para agua de uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización" (Tabla 14), la cual establece los límites permisibles de metales pesados y se señalan en la tabla 14 con un asterisco los elementos que sobrepasa esta norma (Tabla 15).

Para llevar a cabo el análisis de las muestras de agua las muestras deben contar con un pH estandarizado en 2, los análisis se llevaron a cabo utilizando el método de espectrofotómetro de absorción atómica vía húmeda (EAA). Esta técnica usa la absorción de la luz para medir la concentración de la fase gaseosa de átomos. Ya que la mayoría de las muestras son sólidas o líquidas, los átomos o iones de los analitos deben ser vaporizados a la flama o en un horno de grafito. Los átomos adsorben luz visible o ultravioleta y hacen transiciones a niveles de energía más altos. La concentración del analito es determinada por la cantidad de absorción.



Figura 18. Espectrofotómetro de absorción atómica.

Las mediciones de concentración son generalmente determinadas de una curva de calibración, después de haber calibrado el aparato con los estándares de concentración conocida (Figura 18) (Havey, 2000). Las muestras de agua se analizaron en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.



Tabla 14. Límites de la NOM-127-SSA1-1994

Elemento	Límite permisible mg/l
Aluminio	0.2
Arsénico	0.05
Bario	0.7
Cadmio	0.005
Cobre	2
Hierro	0.3
Fluoruros	1.5
Manganeso	0.15
Mercurio	0.001

Se realizaron análisis preliminares en 4 sitios de muestreo para conocer el sitio de mayor concentración de Cd y otros elementos en dos temporadas del año, obteniéndose los siguientes resultados de la Tabla 15, los cuales fueron realizados Pulido-Flores (2005) en el laboratorio de Morfología Animal de la UAEH y corresponden a la temporada de lluvias en el año 2005.

En la tabla 15 se presentan los resultados de al menos 8 metales pesados, todos ellos de interés genotóxicos y por ende de interés en este trabajo, el elemento más abundante fue el Al, en la localidad de San Cristóbal, se reportó la concentración más alta de Cd, Be, Cr, Hg y Mn, tomando como referencia estos datos preliminares se decidió muestrear los sitios de San Cristóbal y la desembocadura en las dos temporadas del año, para poder identificar la mayor concentración potencial del elemento a estudiar en este trabajo (Cd); además se decidió monitorear simultáneamente a Hg, Al, Mn como principales elementos de interés toxicológico y por estar por encima de la NOM antes mencionada, y que pudieran ayudar a identificar posibles efectos sinérgicos y/o antagónicos



Tabla 15. Metales pesados en el agua de Metztitlán en temporada de secas (Pulido-Flores, 2005).

Metales	Puente Venados	Jilotla	San Cristóbal	Desembocadura de la Laguna Metztitlán
Aluminio	0,228 µg	0,285 µg	0,329 µg*	0,214 µg
Arsénico	0,030 µg*	0,030 µg*	0,028 µg*	0,010 µg*
Berilio	0,004 µg	0,004 µg	0,005 µg	0,002 µg
Cadmio	0,034 µg*	0,036 µg*	0,038µg*	0,001 µg
Cromo	0,017 µg	0,018 µg	0,021 µg	0,012 µg
Manganeso	0,142 µg	0,153 µg*	0,158 µg*	0,900 µg*
Mercurio	0,006 µg*	0,006 µg*	0,007 µg*	0,001 µg
Vanadio	0,093 µg	0,090 µg	0,088 µg	0,001 µg

Las concentraciones de los elementos antes mencionados en la tabla 16 para la temporada de lluvias y la tabla 17 para la temporada de sequía, encontrándose la concentración más alta de Cd en la localidad de San Cristóbal en la temporada de secas (0.038 µg/l), así como el doble y la mitad de esta concentración, tomándose como referente para su evaluación toxicológica y teratogénica.

Tabla 16. Análisis del agua en época de lluvia en el año 2006

Parámetro	San Cristóbal	Laguna Metztitlán	Unidades	NOM-127-SSA_1994
Aluminio	0.001	0.001	µg/l	0.20
Cadmio	0.0	0.0	µg/l	0.005
Manganeso	0.037	0.316	µg/l	0.15
Mercurio	0.0	0.0	µg/l	0.001

Los resultados obtenidos en la tabla 15 contienen los datos registrados por Pulido-Flores (2005); por otra parte es importante mencionar que la concentración del Cd en la temporada de lluvia fue nula posiblemente a que aumenta la cantidad de agua y los elementos presentes se diluyen; la posible presencia de este elemento puede por las actividades antropogénicas en la zona estudio, como por ejemplo las actividades textiles asociadas al río y el uso de pesticidas, entre otros.



Tabla 17. Análisis de agua en época de sequía en el año 2006

Parámetro	San Cristóbal	Laguna Metztitlán	Unidades	NOM-127-SSA_1994
Aluminio	0,329	0,214	µg/l	0.20
Cadmio	0,038	0,001	µg/l	0.005
Manganeso	0.158	0.900	µg/l	0.15
Mercurio	0,007	0,001	µg/l	0.001

La evaluación del efecto biológico, se realizó con base al porcentaje de fertilidad y viabilidad, se analizaron 1525 embriones (100%), de los cuales 1406 embriones fueron viables, representando un promedio de 92.23% (Tabla 18), estos resultados permiten utilizar estos lotes para realizar las pruebas teratogénicas.

Tabla 18. Porcentaje de lotes para evaluar los índices de fertilidad.

Lotes	Numero de huevos ovopositados	Numero de huevos viables	Porcentaje
1	370	349	94.32 %
2	402	357	88.80 %
3	358	329	91.89 %
4	395	371	93.92 %
Total	1525	1406	Media 92.23 %

De igual forma se registraron las malformaciones espontáneas de columna vertebral, opérculo y aleta, para determinar la frecuencia espontánea de estos biomarcadores (Tabla 19).

De los embriones viables que se obtuvieron en los lotes experimentales mencionados en la tabla 18, se continuó con el desarrollo de los mismos para observar las malformaciones espontáneas que presentaban y la ocurrencia de las mismas, así se tiene que de los 1406 embriones viables se obtuvieron 28 alevines con un grado de malformación en alguno de los biomarcadores antes mencionados.



Tabla 19. Frecuencia espontánea

Lotes	Numero de huevos viables	Numero de malformados	Porcentaje
1	349	5	1.4 %
2	357	6	1.6 %
3	329	7	2.1 %
4	371	10	2.6 %
Total	1406	28	Media 1.9 %

Para determinar el efecto teratogénico inducido, fueron expuestos 50 embriones por concentración repartidos en frascos de 100 ml con la concentración de Cadmio a evaluar y/o las muestras de dos sitios para la mezcla compleja de agua, en un periodo de 24 horas y con un control negativo (50 embriones), este procedimiento se repitió hasta alcanzar la cantidad de 1000 embriones por concentración (Peña, 2008).

De los tratamientos anteriores, primeramente se registraron el porcentaje de individuos vivos y muertos a cada tratamiento para determinar la toxicidad propia del compuesto, las concentraciones que mataron menos del 50% de los individuos tratados fueron la de 0.038 µg/l y 0.019 µg/l de Cd, y tomando como concentración máxima la de 0.076 µg/l de Cd por ser la que más se acercó a la CL₅₀ (Tabla 20).

Tabla 20. Resultados de toxicidad a diferentes concentraciones de Cadmio

Tratamiento	Concentración	Total de individuos	% individuos vivos
1	0.076 µg/l	1000	34.6% (346)
2	0.038 µg/l	1000	51% (510)
3	0.019 µg/l	1000	58.8% (588)
	Testigo	1000	96.3% (963)

En la figura 19 se muestra la diferencia entre los tres tratamientos realizados, en donde se compara la relación de toxicidad que existe entre ellos a través de un análisis de varianza o ANOVA el cual sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. Típicamente, el análisis de varianza se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de

otro grupo de puntuaciones. El tratamiento 1 corresponde a la concentración 0.076 $\mu\text{g/l}$, en donde hay poca sobrevivencia de embriones y una alta tasa de mortalidad, el tratamiento 2 es la concentración 0.038 $\mu\text{g/l}$ y la tasa de sobrevivencia es más alta que la tasa de mortalidad y el tratamiento 3 corresponde a la concentración 0.019 $\mu\text{g/l}$ en la que se observa una viabilidad de embriones muy alta, en contraparte presenta una baja tasa de toxicidad del Cadmio.

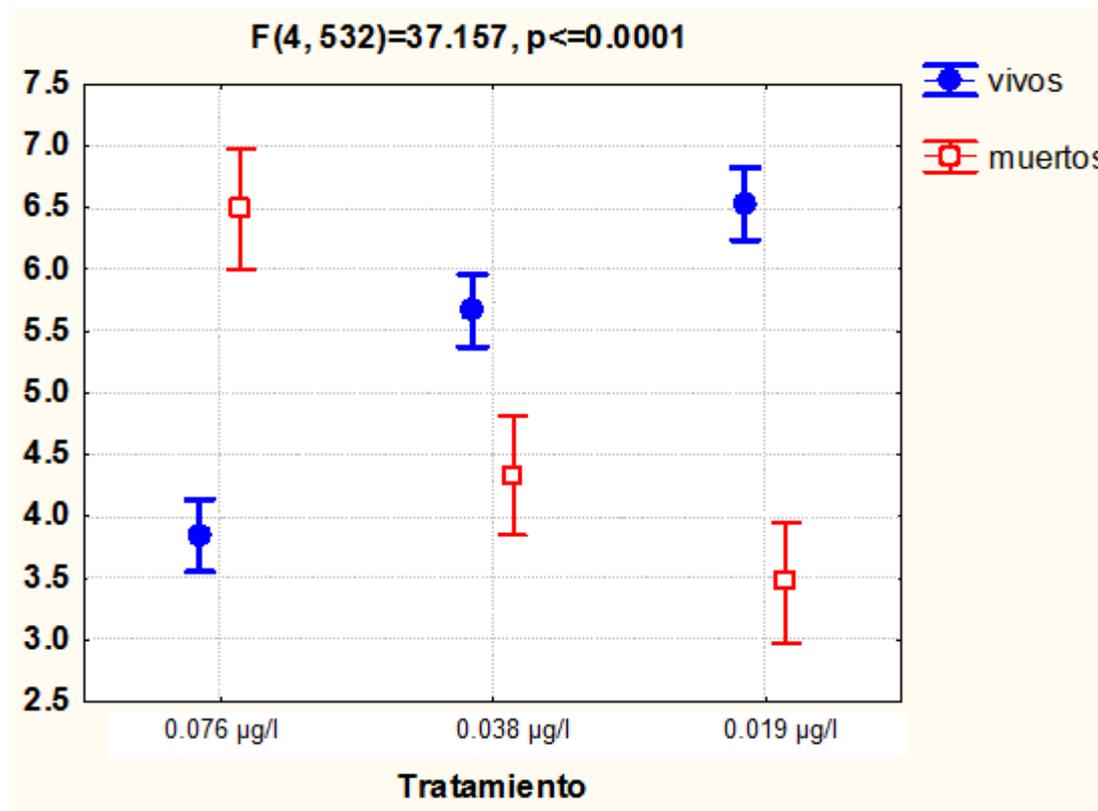


Figura 19. Resultados de toxicidad en análisis de varianza de 1 vía (ANOVA).

La concentración 0.076 $\mu\text{g/l}$ indica que tiene una toxicidad mayor en comparación de las otras concentraciones probadas.

Con base en los resultados anteriores, las tres concentraciones anteriores (0.076 $\mu\text{g/l}$, 0.038 $\mu\text{g/l}$ y 0.019 $\mu\text{g/l}$) eran cercanas a la CL_{50} . y/o subtóxicas, se procedió a evaluar su efecto teratogénico, para lo cual se les dejó a los embriones en contacto con los tratamientos durante todo su desarrollo embrionario hasta su eclosión; evaluándose en los alevines recién eclosionados la presencia y frecuencia de malformaciones en columna vertebral, refiriendo algunos registro hasta la etapa de alevín cuando no eran lo suficientemente evidentes (Tabla 21). Observándose que en la concentración más alta hay solo 3.3 % de malformaciones y en la



intermedia hay hasta 10.1% de malformaciones, posiblemente debido que no llegan a expresarse todas las malformaciones por la toxicidad de la concentración mayor, que esta ligeramente por encima del 55%.

Tabla 21. Malformados en diferentes concentraciones de Cadmio

Tratamiento	Concentración	Total de individuos expuestos	% de individuos con malformaciones
1	0.076 µg/l	1000	3.3% (33)
2	0.038 µg/l	1000	10.1% (101)
3	0.019 µg/l	1000	6.3% (63)
Control	0.0 µg/l	1000	1.4% (14)

En la Figura 20 se observa que el aumento de concentración de Cadmio hay un número mayor de malformaciones, sin embargo los resultados de la concentración de 0.076 µg/l es enmascarada por la toxicidad del compuesto.

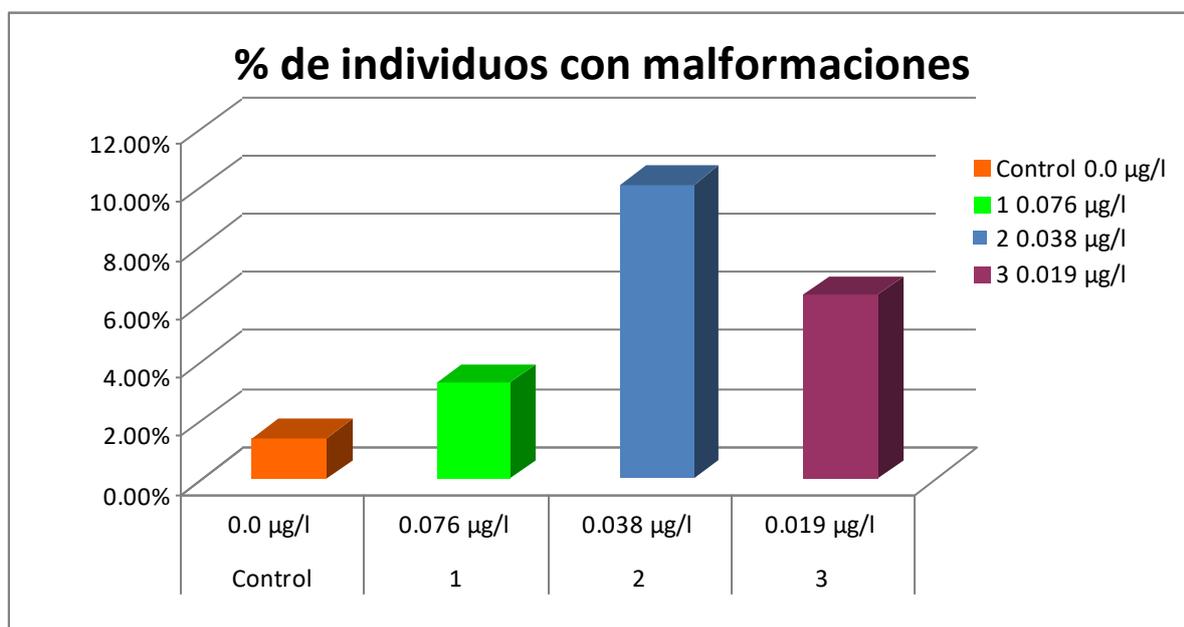


Figura 20. Comparación de malformaciones inducidas por concentración de Cd.

De la misma manera con la que se analizo el potencial teratogénico del Cd, se hizo con los dos sitios de muestreo (San Cristóbal y la desembocadura) en temporada de secas por ser donde existe mayor concentración del Cd y de los otros efectos a estudiar con base al estudio de química analítica del agua antes



mencionada, esto es para determinar si la muestra de agua presentaba sinergismos o antagonismos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes, para toxicidad se probaron 500 embriones por sitio de muestreo, resultando el agua de San Cristóbal con más individuos muertos que la de la desembocadura (Tabla 22).

Tabla 22. Resultados de toxicidad con una mezcla compleja.

Concentración	Total de individuos	% individuos vivos	% individuos muertos
San Cristóbal	500	76.8% (384)	23.2% (116)
Desembocadura	500	92.8% (464)	7.2% (36)
Total	1000	848	152

Se observa una mayor toxicidad en el sitio de San Cristóbal, y en la desembocadura hay poca mortandad de embriones, debido posiblemente a que al llegar el agua del río al delta de la laguna se diluyen los elementos presentes. Para los resultados de malformaciones, se continuó con el desarrollo de los individuos vivos obtenidos de la prueba de toxicidad, obteniendo que en el agua de la desembocadura se presentan más malformaciones (Tabla 23).

Tabla 23. Resultados de malformados con una mezcla compleja.

Concentración	Total de individuos	% individuos vivos	% individuos malformados
San Cristóbal	500	76.8% (384)	9.8% (38)
Desembocadura	500	92.8% (464)	10.56% (49)
Total	1000	848	87

Se compara la toxicidad de los sitios de muestreo de mezcla compleja y el potencial teratogenico que tienen con un índice de alevines malformados establecido por Rivera 2006.

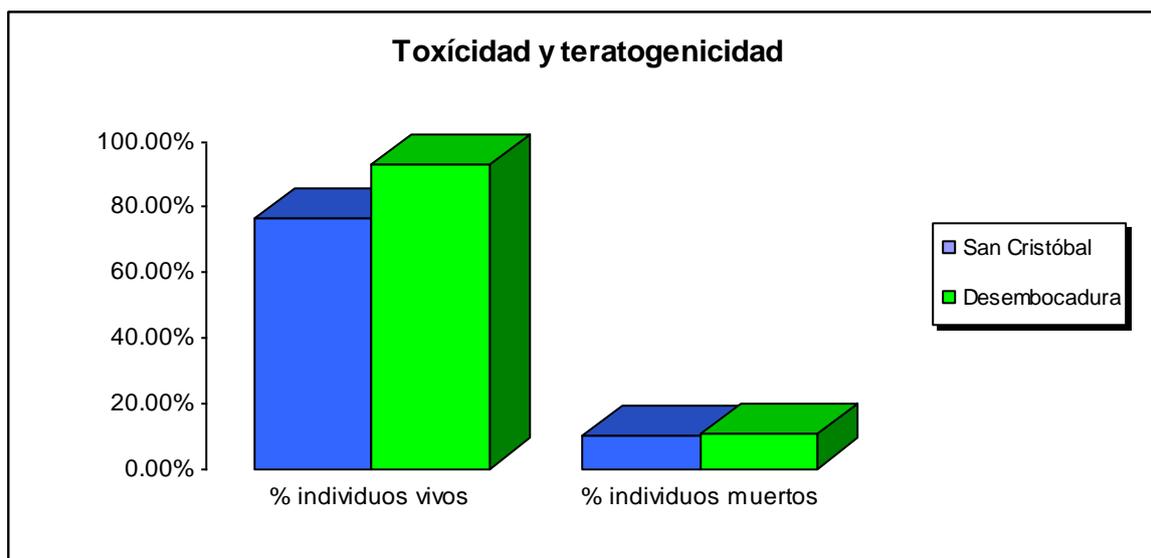


Figura 21. Frecuencia de malformaciones en columna vertebral a las concentraciones probadas de la mezcla compleja de Metztlán.

Las malformaciones obtenidas con las muestras de agua, son mayores a las obtenidas con el experimento de tres concentraciones subtóxicas de Cadmio, lo cual puede estar asociado a la presencia en el agua de más de 8 elementos, potencialmente peligrosos desde el punto de vista genotóxico (Tabla 15), lo que puede atribuirse a algún efecto sinérgico de algún de los otros elementos presentes en el agua de Metztlán.

Tabla 24. Cuantificación de tipo de malformaciones en columna vertebral

Concentración	Total de malformaciones	Numero y tipo de malformaciones						
		S	D	M	C	E	A	G
0.076 µg/l	33	21	1	3	4	1	0	3
0.038 µg/l	101	77	5	4	5	3	1	6
0.019 µg/l	63	48	3	3	4	0	1	4
San Cristóbal	38	27	5	2	1	0	0	3
Desembocadura	49	42	4	2	1	0	0	0
Control	14	9	2	1	1	0	0	1
Total	298	224	20	15	16	4	2	17

Como se observa en la tabla 24 y figura 22, el tipo principal de malformación obtenida por el efecto teratogénico del Cadmio es de tipo sencilla con mayor frecuencia en la concentración media (0.038 µl).

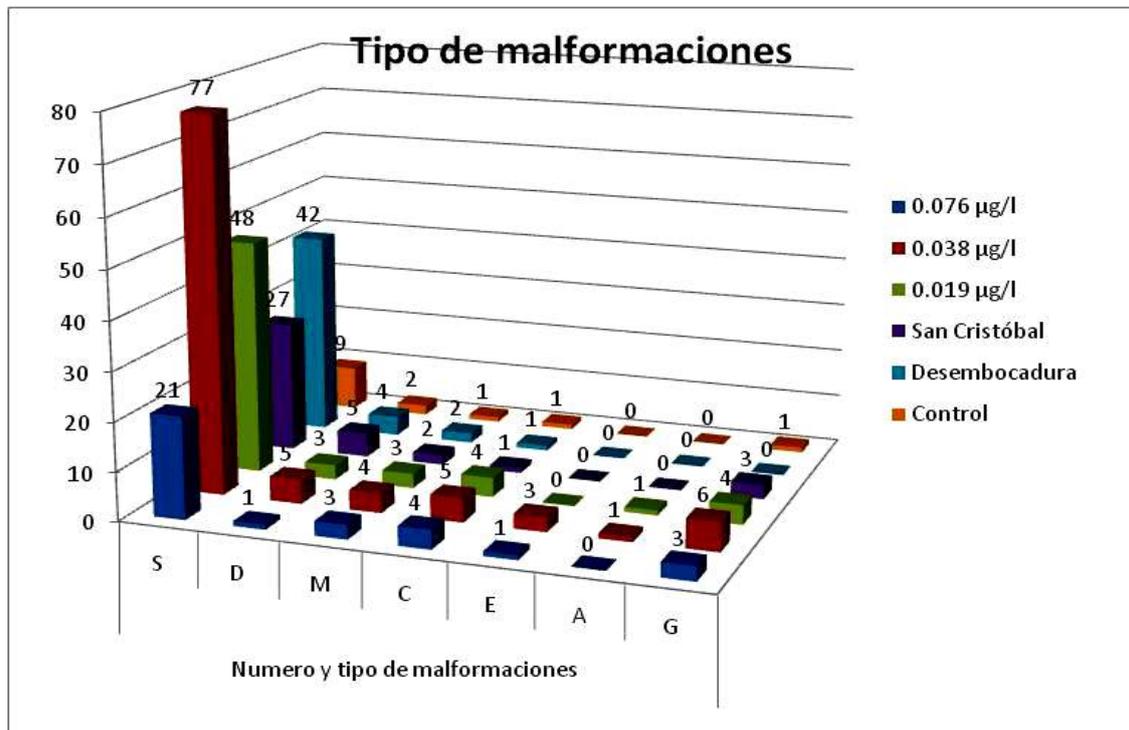


Figura 22. Tipo de malformaciones obtenidas.

En la tabla 25, la principal zona donde el Cadmio induce el efecto teratogénico es en la región cefálica con la concentración de 0.038 µl, así mismo siendo con mayor frecuencia en la localidad de la desembocadura de la laguna, en la que se obtuvo un desarrollo aletargado en relación a los resultados obtenidos por malformaciones.

Tabla 25. Cuantificación de malformaciones por zona de *Danio rerio*

Concentración	Tipo de malformación			Total
	Cefálica	Dorsal	Caudal	
0.076 µg/l	14	11	8	33
0.038 µg/l	22	46	33	101
0.019 µg/l	19	27	17	63
San Cristóbal	10	17	11	38
Desembocadura	21	16	12	49
Control	4	7	3	14
TOTAL	90	124	84	298

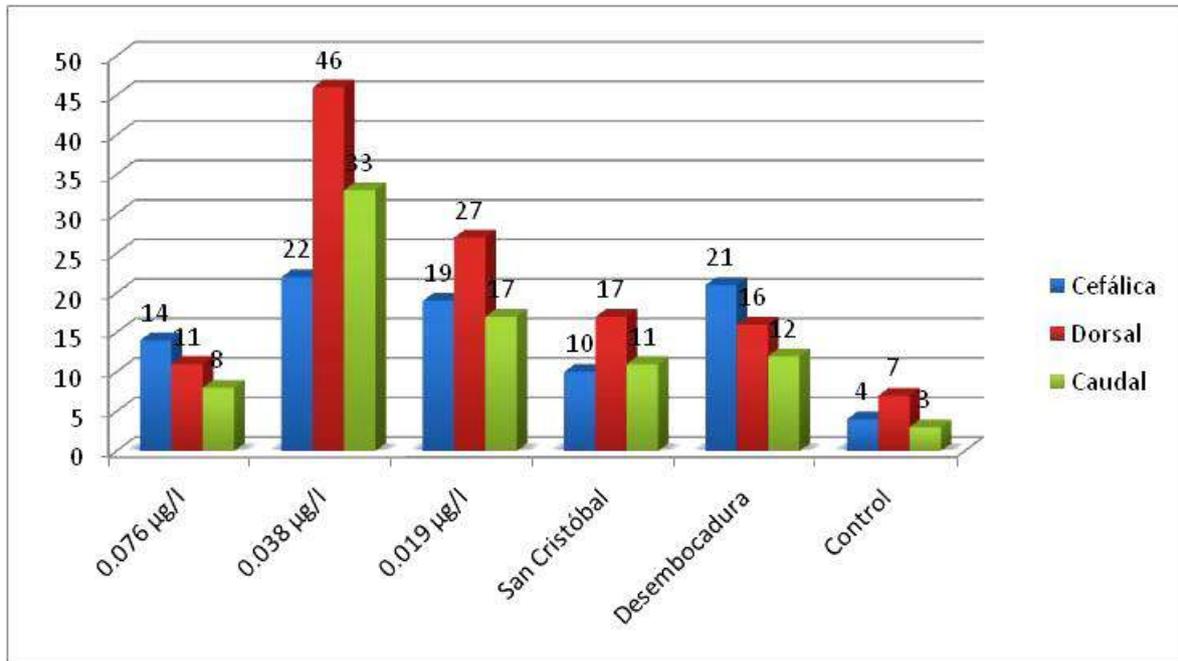


Figura 23. Correlación de las frecuencias de malformaciones en las concentraciones de Cd probadas y las muestras de agua.

Al comparar la relación de toxicidad entre las diferentes muestras, se observa que la toxicidad más alta del Cadmio es la de la concentración 0.076 y el resto de las muestras pueden considerarse subtóxicas al tener una toxicidad menor al 50% de los individuos expuestos (Figura 24)

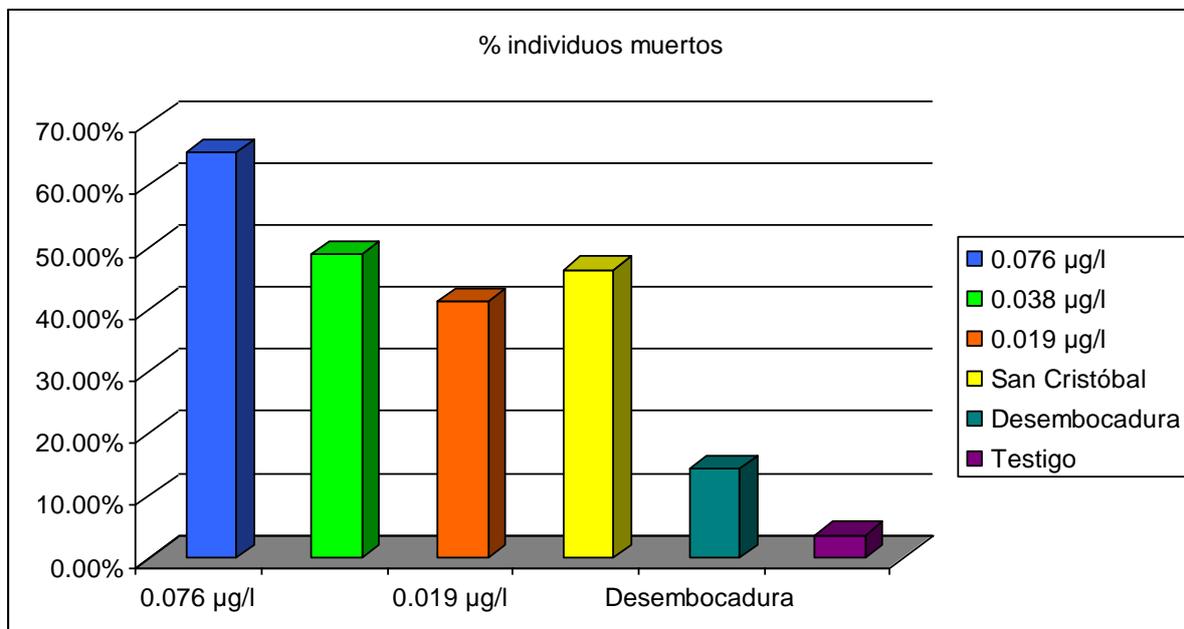


Figura 24. Correlación de efectos tóxicos de las concentraciones de Cd y mezcla compleja del agua de Metztitlán.



Una vez determinado la frecuencia de malformaciones se realizó un análisis de Tukey para conocer las diferencias entre las concentraciones de Cadmio y una prueba de comparación de Kruskal-Wallis, por concentración de Cadmio expuesta a embriones de *Danio rerio*, como se menciona en el procedimiento experimental. Cuando en un análisis de varianza se observa un efecto significativo, la prueba de Tukey, provee un nivel de significancia global de α cuando los tamaños de las muestras son iguales y de b cuando no son iguales. Se basa en la construcción de intervalos de confianza de las diferencias por pares. Si estos intervalos incluyen al 0, entonces no se rechaza la hipótesis nula. Mediante la prueba de Tukey se pueden obtener las diferencias entre las medias de cada grupo, con respecto al control, con sus respectivos intervalos de confianza:

Los resultados del analisis de la prueba de Tukey, las malformaciones obtenidas (Figura 25) en el tratamiento 1 (0.076 $\mu\text{g/l}$) se obtienen pocas malformaciones puesto que existe mas mortandad de alevines, por lo que no llegan a expresarse todas las malformaciones que pudieran obtenerse, el tratamiento 2 (0.038 $\mu\text{g/l}$) se obtiene al menos 1 malformación de cada 10 embriones expuestos a la concentración de Cadmio y en el tratamiento 3 (0.019 $\mu\text{g/l}$) se obtienen menos malformaciones que el tratamiento anterior (0.038 $\mu\text{g/l}$) esto se atribuye que la concentración disminuye y no es suficiente para provocar mas efectos adversos.

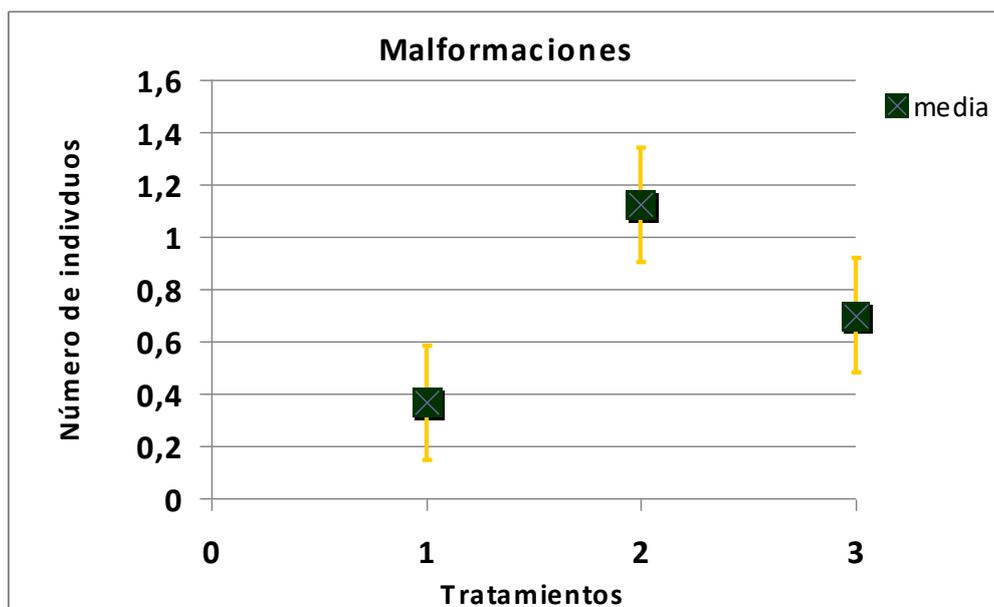
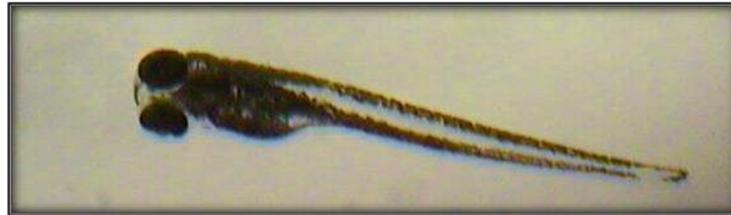


Figura 25. Resultados de toxicidad en análisis de Tukey.

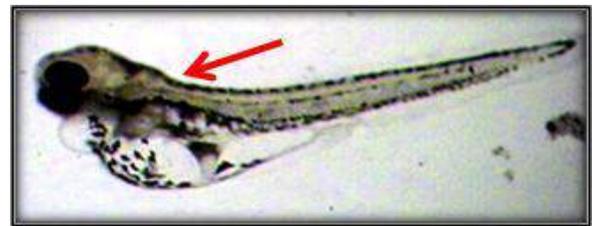
En los experimentos realizados con todas las concentraciones probadas, se obtuvieron diferentes tipos de malformaciones, que se clasificaron de acuerdo a la propuesta por González (2005) y Rivera (2006), a continuación se dan algunos ejemplos del tipo de malformaciones obtenidas.



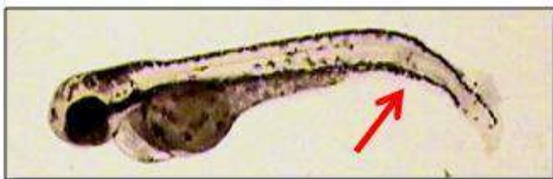
Alevín sano,



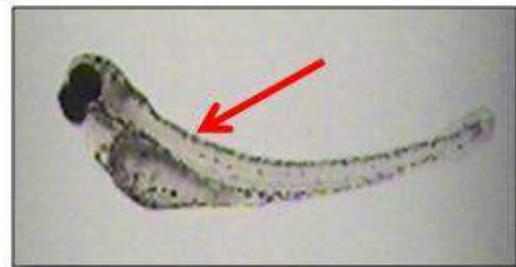
A



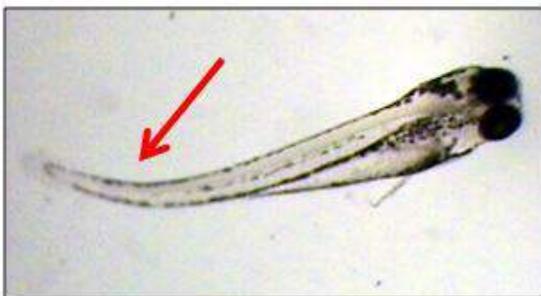
B



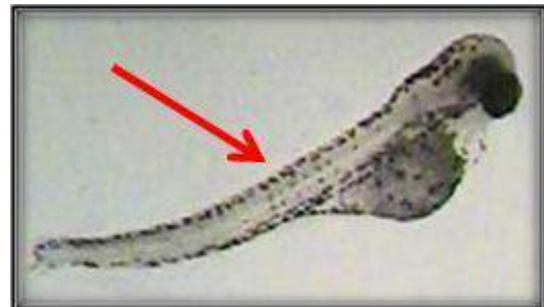
C



D

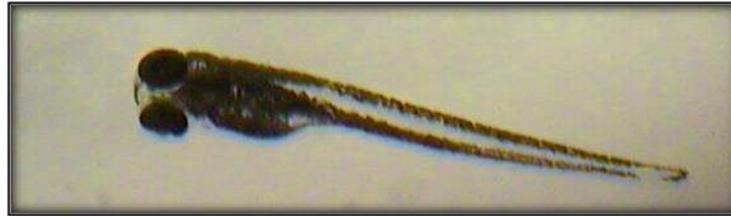


E



F

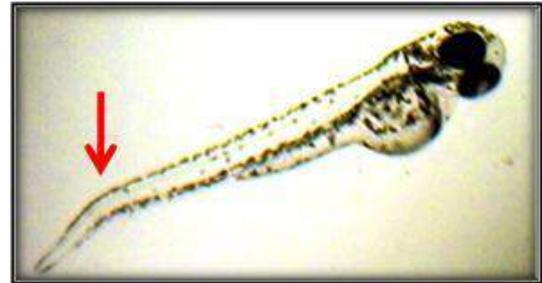
Figura 26. Malformaciones obtenidas de tipo sencillas en columna vertebral en diferentes zonas de los alevines de *Danio rerio*, región cefálica (A y B), región caudal (C y E), región media (D y F).



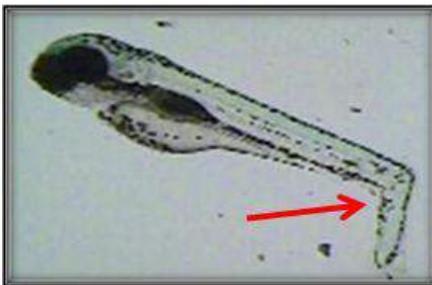
Alevín sano,



G



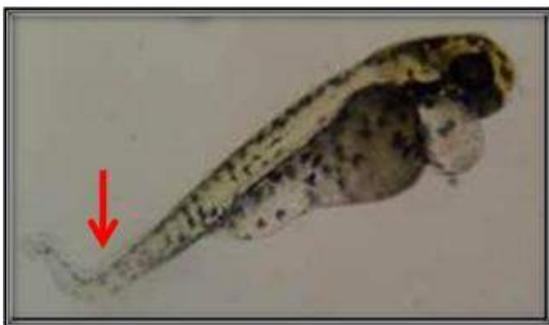
H



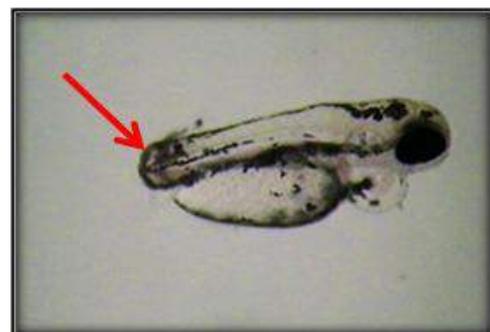
I



J

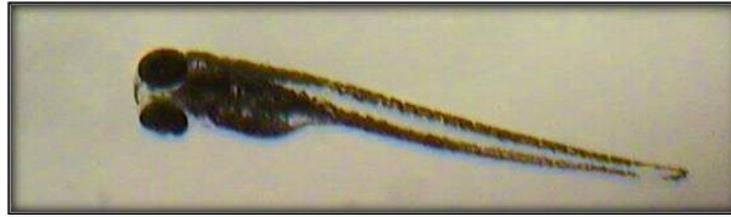


K



L

Figura 27. Malformaciones obtenidas en aleta caudal en columna vertebral en alevines de *Danio rerio*, la imagen L muestra la ausencia de aleta en el alevín.



Alevín sano,



M



N



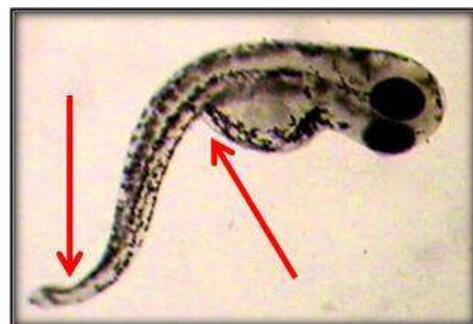
O



P



Q



R

Figura 28. Malformaciones obtenidas de tipo curvo en la columna vertebral de alevines de *Danio rerio*, la imagen R muestra alteraciones en la columna vertebral de tipo curvatura doble.



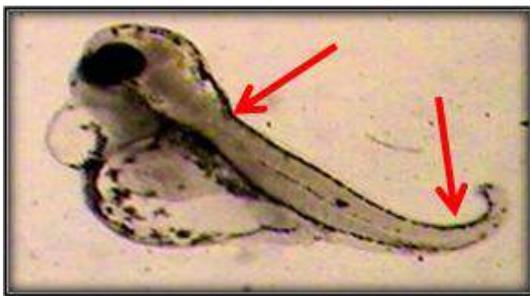
Alevín sano,



S



T



U



V



W



X

Figura 29. Malformaciones obtenidas de tipo curvatura doble (S), de tipo gancho (T), doble con la presencia de enanismo (U), letargo en el desarrollo embrionario y persistencia de saco vitelino (V), de tipo espiral en aleta caudal (W) y curvatura simple o sencilla.



7 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Se determinó la presencia de Cd y otros elementos potencialmente peligrosos en el área de estudio, así como sus posibles efectos biológicos asociados.

Con el primer objetivo particular se pretendió identificar del sitio y temporada con mayor contaminación de Cd en la zona de estudio. A través de un análisis preliminar de la calidad del agua del río en la localidad de San Cristóbal y en la desembocadura en la Laguna de Metztitlán, mediante la técnica de "Espectrofotometría de Absorción Atómica Vía Húmeda (EAA)". Se registró al Cd junto con al menos ocho metales pesados de alto interés genotóxico, principalmente tres, como son el Al, Mg y Hg. Cabe destacar que no solo fueron encontrados estos elementos, sino que su concentración está por encima de la NOM-127-SSA1-1994, y que pueden estar asociados a efectos biológicos potencialmente perjudiciales.

En cuanto a la presencia y concentración de metales pesados; además de evidenciarse que en temporada de secas se encontró la mayor concentración de Cd, la cual corresponde a que la concentración de **0.038 µg/l** en la localidad de San Cristóbal, poco antes de la desembocadura, posiblemente por que en la época de secas al evaporarse el agua se concentran los elementos y principalmente los contaminantes en el agua, además de que en la desembocadura, el agua se diluye al entrar a la laguna, por lo que la concentración de Cd y otros elementos disminuye.

Una vez que se determinó con que concentración de Cd se trabajaría se requirió determinar tres dosis subtóxicas de Cd, la frecuencia espontáneas de malformación de columna vertebral en el lote experimental, así como los índices de fertilidad y viabilidad para determinar el daño inducido.

Las concentraciones subtóxicas de Cd y del agua de la desembocadura de la Laguna de Metztitlán, Hgo., fueron 0.019 µg/l, 0.038 µg/l y 0.076 µg/l que corresponden a concentraciones letales: LC₃₁, LC₄₉ y LC₅₅ respectivamente, lo que permite evidenciar un efecto aparentemente acumulativo de la toxicidad del Cd en este bioensayo. Además de establecer el efecto teratogénico en la columna vertebral de *Danio rerio*.



Se obtuvo daño teratogénico inducido por el Cadmio a 3 concentraciones subtóxicas, así como con el agua de la zona en ambos sitios de muestreo en la temporada de secas. Se encontró más daño en la concentración de 0.038 $\mu\text{g/l}$ (intermedia) que la 0.076 $\mu\text{g/l}$, posiblemente al efecto tóxico manifestado en las pruebas preliminares de toxicidad en donde este encubre el efecto teratogénico no dejándolo expresar.

El análisis de los diferentes tipos de malformaciones observadas con base a la clasificación de González (2005) y a la de Rivera (2006) se observó que las más frecuentes fueron las malformaciones de tipo sencilla en la región dorsal.

La posible correlación entre los efectos inducidos por el Cadmio y por el agua de 2 sitios de muestreo de Metztlán, Hgo., para identificar posibles efectos sinérgicos y/o antagónicos de los contaminantes reportados, se obtuvieron resultados de toxicidad y malformaciones de ambos sitios, sin embargo no se puede llegar a la conclusión si el Cadmio es el causante de estos resultados o si los otros elementos presentes están actuando al mismo tiempo.

Los resultados de química analítica, evidencian en la zona de estudio la presencia de otros elementos como aluminio, manganeso y mercurio, que son de gran interés toxicológico y genotóxico; que comprometen a realizar más investigaciones de sus efectos biológicos y ecológicos en esta reserva, sustentado en su importancia por múltiples asentamientos humanos, desde el punto de vista económico y del sector salud; así como por ser una reserva de la biosfera, que pudieran impactar y sustentar la toma de decisiones para su manejo sustentable.

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

Por otra parte los resultados del presente trabajo contribuyen y ayudan a validar el uso del *Danio rerio* a través de la prueba DarTa, para evaluar efectos teratogénicos de elemento *per se* y/o en mezclas complejas en agua.



8 BIBLIOGRAFÍA

- (ATSDR) Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. 1999.** Reseña Toxicológica del Cadmio (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EEUU., Servicio de Salud Pública en <http://www.atsdr.Cadmioc.gov>
- (WHO) World Health Organization 1992.** "Environmental Health Criteria 135: Cadmium - Environmental Aspects pp 30". .
- Aranha, S.; Nishikawa, A. M.; Taka, T. & Salioni, E. M. C. 1994.** Niveles de Cd y Pb en hígado y riñones de bovinos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, pp. 54:16-20,
- Baird, C. (2001)** Química Ambiental. Ed. Reverte, S.A. Barcelona España. 622 pp.
- Barron, M. 2002.** Contaminantes ambientales alteran el comportamiento. Behavioural Ecotoxicology. Dell'Omo, G. Ed. John Wiley & Sons. Ontario, Canada. pp.167 - 185
- Bello, J., López de Cerfin, A. 2001.** Fundamentos de cinética toxicológica. Edit. Díaz de Santos. Madrid, España pp 213- 219
- Bernard, A., Lauwerys, R 1984.** Cadmio en la población humana. Experientia 40, pp. 143.
- Butterworth, F. 1995.** Introduction to biomonitors and biomarkers as indicators of environmental change. Editorial Plenum Press. EUA. pp. 313.
- Chang, LW; Cockerham, LG. 1994.** Toxic metals in the environment. Basic Environmental Toxicology.. CRC Press, Inc.: Boca Ratón, Florida, USA. pp. 627
- Ellemhorn, MJ. 1996** Medical Toxicology. 2nd Edition. Baltimore, USA: Williams & Wilkins.
- Evenden, A.J. y Depledge, M.H.. 1997** Genetic susceptibility en Ecosystems: The challenge for ecotoxicology. Environmental Health Perspectivas. Suppl. 4 105: 849-854



- Fergusson, J.F., 1990.** The heavy elements. Chemistry, Environmental Impact and Health Effects. Pergamon Press
- Fernicola, N. 1985.** Nociones básicas de toxicología / Nilda A.G.G de Fernicola. Edit. ECO. México. 113 pp.
- Figueruelo, J.E y Davila, M.M. 2001.** Química física del medio ambiente. Edit. Reverde, México. 333 pp.
- Friberg, L.; Elinder, C.G.; Kjellström, T. & Nordberg, G.C. 1986** Cadmium and health: a toxicological and epidemiological appraisal. Boca Raton, CRC Press. Vol. 2.
- Gaiano, N. y N. Hopkins 1996.** Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in Zebrafish. Nature, 383:829-832
- García Rico, L; Roblesburgueño MR y Valenzuela Soto EM. 1999** Las metalotioneínas y su relación con la toxicidad del Cadmio en los mamíferos Rev. Int. Contam. Ambient. 15 (2). 113120,
- Garrido, N. S.; Pregnalatto, N. P.; Murata, L. T. F.; Silva, M.R.; Nunes, M. C. D.; Antunes, J. L. F. & Tinglea, P. 1991** Avaliação dos níveis de arsênio, chumbo e cádmio em corantes e pigmentos utilizados em embalagens para alimentos no período de 1982 a 1989. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 51: 63-8,.
- González Fernández E 1988.** Toxicocinética y evaluación de riesgos para la salud producidos por exposición a Cadmio. Medicina y Seguridad del Trabajo. XXXV: 3-17.
- González L. (2005)** Evaluación del efecto del cloruro de mercurio en la inducción de malformaciones de columna vertebral del pez cebra (*Danio rerio* Hamilton, 1822) durante diferentes etapas del desarrollo embrionario. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de Soto, Hidalgo. 96 pag.
- Hall, LW; Sott, MC; Killen, WD 1998.** "Ecological risk assessment of copper and cadmium in surface waters of Chesapeake Bay Watershed". *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol 17,nº 6, pp. 1172-1189.



- Harte, J., C. Holden, R. Schneider, C. Shirey, 1991.** Toxics A to Z. A guide to everyday pollution hazards. Univ. of California Press.
- Hiscock, S. A. 1983** Trends in the use of cadmium (1970-1979). *Ecotoxicol. Environm. Saf.*, 7:25-32,
- J. A Lozano. 2000** Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud Mc Graw-Hill 2 edición
- Kido T, Shaikh ZA, Kito H, Honda R, Nogawa K 1991.** Dose–response relationship between urinary cadmium and metallothionein in a Japanese population environmentally exposed to cadmium. *Toxicology*; 65: 325–32.
- Kimmel C.B. Balla W.W. Kimmel S.R. Ullmann B. y T.S. Schilling 1995.** Stage Of Embryonic Development Of The Zebrafish. *Developmental Dynamics*. 203:253-310
- Kjellstrom T, Nordberg GF 1978.** A kinetic model of Cadmium metabolism in the human being. *Environ Res*; 16: 248–69.
- La Dou J 1999.** *Medicina Laboral y Ambiental*. 2ª. Edición. México: Ed. El Manual Moderno.
- Lafuente A. y Mouteira RC 1999.** Cadmium toxicity to rainbow trout hepatocytes. Protective activity of zinc and selenium. . *Revista AET (Asociación Española de Toxicología)*., Vol.16 n.1.
- Lauwerys RR 1986.** L'impact sanitaire de la pollution par le cadmium en Belgique: Etat de la question. *Mémoires de l'Académie Royale de Médecine de Belgique*; 141: 453-9.
- McCarthy JF & LR Shugart 1990.** *Biomarkers of environmental contamination*, Lewis Publ., Boca Raton.
- Nagel R 2002.** Dart: The Embryo Test With The Zebrafish *Danio Rerio* – A General Model In *Ecotoxicology And Toxicology*. *Alex* 19:38-48
- Oleru UG 1976.** Kidney, liver, hair and lungs as indicators of cadmium absorption. *Am Ind*



Hyg Assoc J; 37: 617-30.

Pasquali, Ricardo. 2003. Química Ambiental. Primera edición, Akadia Editorial, Buenos Aires

Perez-Landeiro. A., M.A Allende-Bandres, M.J. Agustin Fernandez, P. Palomo Palomo. 2002 Teratogenesis: clasificaciones. Farmacia hospitalaria Vol. 26 No. 3, pp 171-177, España

Pickering, !; Carle, DO; Pilli, A; Willingham, T; Lazorchak, JM 1989. Effect of pollution on freshwater organisms. *J. WPCF 61: 998-1041.*

Piotrowski JK, Coleman DO 1990. Environmental hazards of heavy metals: summary evaluation of Pb, Cd and Hg". Marc Report N° 20, MARC, Chelsea College, University of London. London.

Pulido-Flores. G., Monks, W., J. A. Gordillo-Martinez 2005 Monitoreo de bajo costo en la evaluación de la calidad ambiental. Memorias del X Congreso Nacional y IV Internacional de Ciencias Básicas. Revista Internacional de Ciencias Ambientales. Vol 21 Suplemento 1. pp 578-583

Rodríguez, J. y Esclapés, M. 1995. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas. Versión 1.0. Gerencia General de Tecnología. Departamento de Ecología y Ambiente. INTEVEP. PDVSA. Venezuela. 109 pp.

Sadiq, M 1992. "Environmental science and pollution control series vol. 1. Toxic metal chemistry in marine environments". Environmental Science and Pollution control series, vol. 1. Toxic metalchemistry in marine environments. Vii+390p. Marcel Dekker, inc..

Salinas-Flores, Pedro, Alberto José Gordillo-Martínez, Scott Monks y Griselda Pulido-Flores. 2005. Evaluación de metales pesados en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo. Ponente en el IV Congreso Internacional de Ciencias Ambientales, Academia Nacional de Ciencias Ambientales, Chetumal, Quintana Roo, México (9-10 junio, 2005).

U.S. Environmental Protection Agency 1985. "Ambient Water Quality Criteria Doc:



Cadmium p.59". EPA 440/5-84-032

- Vega, S.G 1985 a.** Toxicología I: Cinética y efectos de los contaminantes tóxicos del ambiente. Edit. ECO. México, D.F. 133 pp.
- Vega, S.G 1985 b.** Toxicología V: Genotóxicidad y daño al sistema reproductor Edit. ECO. México, D.F 47 pp.
- Vega, S.G 1985 c.** Toxicología VI: Evaluación del Riesgo en la exposición A Sustancias Tóxicas. ECO. México, D.F 18 pp.
- Vermeire, T. G. 1992.** Initial assessment of the hazards and risks of new chemicals to man and the environment. Nat. Inst. Publ. Health Env. Prot.: 115 pp
- Vettorazzi, G. 1987** Ensayos necesarios para la valoración tóxicológica de las sustancias químicas. Programa internacional de seguridad de las sustancias químicas. Organización Mundial de la salud. Ginebra, Suiza.
- 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
- Villamar, F. 1996.** Bioensayo de Toxicidad (CL₅₀) del dispersante de petróleo BP 1100 WD, con fitoplancton marino (*Tetras elmis sp*). Acta Oceanográfica del Pacífico. INDOCAR, Ecuador, 8(1):. 67-73.
- Vuori R, Huunan–Seppala A, Kilpio JO, Salmela SS.** 1979 Biologically active metals in human tissues: II. The effect of age on the concentration of Cadmium in aorta, heart, kidney, liver, lung, pancreas and skeletal muscle. Scand J Work Environ Health; 5: 16-48.
- Wren, CADMIO; Harris, S; Harttrup, N. 1995.** "Ecotoxicology of Mercury and Cadmium" cap 17 del libro "Handbook of Ecotoxicology" aut. David J. Hoffman, Barnett A. Rattner, G. Allen Burton, Jr y John Cairns, Jr. CRC press, Inc.



9 GLOSARIO

ACUMULACIÓN: Sucesivas retenciones de una sustancia por un organismo, un órgano o parte del ambiente, que conducen a un aumento de la cantidad o la concentración de la sustancia en los mismos (Vega, 1885 b).

BIOACUMULACIÓN: Aumento progresivo de la cantidad de una sustancia de un organismo, o parte de él como consecuencia de que el ritmo de absorción supera la capacidad del organismo para eliminar la sustancia (Hughes, 1996).

BIODISPONIBILIDAD: Capacidad de un agente xenobiótico de interactuar con el sistema biológico (Vega, 1985 a).

BIOENSAYO: Son indicadores biológicos que pueden ser desde virus hasta cultivo de tejidos humanos, que en condiciones controladas (in vivo e in vitro) permiten correlacionar el efecto del agente físico y/o químico a nivel biológico (Markert *et al*, 1995).

BIOINDICADORES: Son organismos los cuales son el reflejo fiel del medio en el que crecen, y se desarrollan siendo indicadores de la calidad o de las características del medio, estos nos proporcionan información de tipo cualitativa (Markert *et al*, 1995).

BIOMARCADORES: Es cualquier alteración biológica que puede ser medible en tejidos, células, o fluidos corporales. Estas alteraciones pueden ser usadas como indicadores de exposición ambiental que reflejan los efectos adversos tempranos tales como daño celular (Guzmán, 1997).

BIOMONITORES: Son organismos que se utilizan como sistemas de alerta entre cambios ambientales generados por la presencia de diversos compuestos tóxicos de origen natural o antropogénico, a concentraciones mayores a las normales, estos nos proporcionan información de manera cuantitativa de la calidad ambiental y de su efecto biológico (Markert *et al*, 1995).

BIOTRANSFORMACIÓN: Cualquier transformación química de una sustancia en el interior de un organismo a través de un proceso biológico (Vega, 1885 b).



BLÁSTULA: Período del desarrollo embrionario consecutivo a la segmentación del huevo constituido por el blastodermo que rodea una cavidad central (Kimmel *et al*, 1995).

CALIDAD AMBIENTAL: Es el estado actual o previsible de algún componente básico, que permite al ambiente desempeñe adecuadamente (Vega, 1985 a).

CARCINOGENO: Agente químico, físico o biológico relacionado con el origen y la incidencia de neoplasias malignas (Klug y Commings, 1998).

CIGOTO: Huevo fecundado originado por la unión de dos gametos con fusión de sus núcleos, hasta el momento de pasar a la forma de blastocito y su implantación en el útero (Kimmel *et al*, 1995).

CINÉTICA AMBIENTAL: Es la movilidad, dispersión e interacción de un contaminante con los elementos del ambiente (Vega, 1985 a).

CL 50: Es la concentración a la cual el 50% de la población de organismos ensayados produce una respuesta en un período definido de tiempo, generalmente 12, 24 ó 96 horas (Vega,1985 c).

CONTAMINACIÓN: Se define como la presencia en el ambiente de cualquier agente químico, físico y/o biológico o de una combinación de varios agentes, en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la salud y seguridad de sistemas biológicos (González, 1998).

DarTa: Prueba que utiliza los huevos fertilizados del Danio rerio (*Brachydanio rerio*) para detectar efectos nocivos por sustancias xenobióticas (Nagel, 2002).

DESARROLLO EMBRIONARIO: Proceso de desarrollo de un embrión desde el estado de cigoto (Houillon, 1977).

DISPERSIÓN: Es la capacidad de distribución de un contaminante en el ambiente (Vega, 1885 a).



DISTRIBUCIÓN: Fase de una sustancia que es absorbida por un organismo, órgano o el ambiente; que va desde la absorción o introducción al sistema hasta alcanzar el equilibrio de concentraciones; si se produce almacenamiento puede ocurrir una redistribución antes de la eliminación (Vega, 1885 b).

DOSIS SUBTÓXICAS: Son todas las concentraciones menores al valor de la CI 50, las cuales van a causar un efecto nocivo (Vega, 1985 c).

ECLOSIÓN: Nacimiento del alevín del saco (Kimmel *et al*, 1995).

ECOTOXICOLOGÍA: Rama de la toxicología que trata del estudio de químicos persistentes que pueden ejercer varios efectos tóxicos en varios sitios de un ecosistema (Silano, 1985).

EFFECTO AMBIENTAL: Una consecuencia medible sobre algún componente básico del ambiente, provocada o inducida por cualquier acción del hombre (Fericola, 1992 a).

EFFECTO: Es el cambio biológico producido por la exposición a un factor externo, químico, físico o biológico (Vega, 1985 c).

EMBRIÓN: Producto de la concepción, desde el momento de la implantación del óvulo fertilizado hasta el final de las semanas séptima u octava en que pasa a denominarse feto (Kimmel *et al*, 1995).

ESTADÍO: Se le llama así a cada una de las etapas marcadas que se observan en un proceso de desarrollo embrionario de los organismos (Kimmel *et al*, 1995).

EVALUACIÓN AMBIENTAL: Es la actividad sistemática, continua o repetitiva, relacionada con la medición de agentes contaminantes en el ambiente, a fin de evaluar la exposición y el riesgo que representan para la salud cuando se compara con una referencia apropiada (Fericola, 1992 a).

EVALUACIÓN BIOLÓGICA: Es la medida y evaluación de los agentes químicos y/o de sus productos de biotransformación, en tejidos, secreciones, excreciones, aire exhalado o alguna combinación de éstos; para estimar la exposición o riesgo a la salud cuando son comparados con alguna referencia apropiada (Fericola, 1992 a).



EVALUACIÓN DE RIESGO: Uso de datos obtenidos de hechos reales, para definir los efectos sobre la salud en la exposición de individuos o poblaciones a sustancias o situaciones peligrosas (Fernícola, 1992 b).

EXPOSICIÓN AGUDA: Es aquella que se produce por la administración de cantidades elevadas de un agente químico en una o varias exposiciones, en un periodo de 24 horas, produciendo un efecto nocivo inmediato (Vega, 1885 b).

EXPOSICIÓN CRÓNICA: Es aquella que se produce por la administración de pequeñas cantidades de un agente químico durante periodos largos, pudiendo aparecer efectos nocivos inmediatamente después de cada aplicación o efectos crónicos (Vega, 1885b).

EXPOSICIÓN: Situación en la cual una sustancia puede incidir, por cualquier vía, sobre una población, organismo, órgano, tejido o célula; usualmente se expresa en términos de cuantitativos de concentración, duración y frecuencia (para a agentes químicos y microbiológicos). y de intensidad (para a gentes físicos) (Vega, 1885 b).

FARINGULA: Etapa del desarrollo embrionario que se caracteriza por la formación del aparato digestivo (Kimmel *et al*, 1995).

FARMACOCINÉTICA: es la ciencia que estudia el paso de los fármacos a través del cuerpo, mide la velocidad del paso del fármaco dentro de un organismo así como la reacción que tiene el organismo bajo los fármacos (Brailowsky, 1995).

FECUNDACIÓN: Fusión de los núcleos de dos gametos para formar un cigoto diploide (Kimmel *et al*, 1995).

FOTOPERIODO: Ciclo día-noche de luz y oscuridad. Sumamente necesario para conservar psíquicamente saludable e un animal en cautiverio (Kimmel *et al*, 1995).

GASTRULA: Forma de embrión primitivo formado por la invaginación de la blástula y se compone de una capa externa de ectodermo y una interna de mesodermo, que más adelante se diferencia en el mesodermo y el endodermo y dos cavidades, una entre las dos capas y otra formada por una invaginación del endodermo (arquenterón). que comunica con el exterior por una abertura (blastoporo) (Kimmel *et al*, 1995).



HENDIDURA: Etapa intermedia de la blástula y gástrula, se caracteriza por migración celular del polo animal hacia los lados del huevo, adelgazándose ligeramente en la parte central y ensanchándose hacia los lados (Kimmel *et al*, 1995).

IMPACTO BIOLÓGICO: Es una forma de medición del efecto de un agente xenobiótico a nivel biológico (Vega, 1985 a)

***In vitro*:** Estudio de laboratorio realizado sobre células, tejidos, u órganos aislados o con sistemas subcelulares o bioquímicos (enzimas) (Hughes, 1996).

***In vivo*:** Estudio de laboratorio realizado en organismos vivos Hughes, 1996).

INOCUIDAD: Característica de una sustancia o compuesto de no producir daño o efecto alguno en los sistemas biológicos (Vega,1985 c).

MALFORMACIONES CONGÉNITAS: Es una anomalía en la estructura, funcionamiento o metabolismo presente desde el nacimiento que provoca una discapacidad física o mental, o incluso la muerte en algunos casos (Klug y Cummings, 1998).

MERCURIO: (Hg). Es un elemento químico, con número atómico 80 y peso atómico 200.59, puede encontrarse en una diversidad de minerales y yacimientos y en una gran variedad de estados físicos y químicos (Peña y Subarzo, 1975).

METALES PESADOS: Son metales que tienen una densidad mayor a 5, y están conformados por un grupo de 40 elementos químicos (Vega, 1985 c).

MITOSIS: División celular característica de las células somáticas, que produce dos células hijas que serán genéticamente idénticas a la célula progenitora (Kimmel *et al*, 1995).

MONITOREO AMBIENTAL: La recolección, el análisis y la evaluación sistemática de muestras ambientales, tales como aire, agua o alimentos, en busca de contaminantes (Lewtas, 2000).

MUTÁGENO: Capacidad de un agente biológico, químico o físico para inducir cambios heredables (mutaciones) (Klug y Cummings, 1998).



OVOPOSICIÓN: En peces corresponde a la expulsión de las ovas (huevos). por parte de la hembra (Kimmel *et al*, 1995).

PLACENTA: Es el órgano que permite la difusión de nutrientes, oxígeno, y anticuerpos desde la sangre materna hacia la del hijo (Hib, 1984).

SEGMENTACIÓN: Etapa del desarrollo embrionario que se caracteriza por la formación media del cuerpo de un organismo durante el desarrollo embrionario (Kimmel *et al*, 1995).

TERATOGENESIS: Proceso a través del cual se forman alteraciones fisiológicas, conductuales y anomalías estructurales graves durante el desarrollo fetal; ya sea de manera espontánea o inducida por agentes xenobióticos (Klug y Commings, 1998).

TERATÓGENO: Cualquier sustancia química, agente físico, o agente infeccioso que actuando durante el periodo embrionario o fetal es capaz de producir una alteración (Hughes, 1996).

TERATOLOGÍA: Ciencia que estudia cualquier daño genético, morfológico o fisiológico que ocurra durante el desarrollo embrionario ya sea de manera espontánea o inducida por teratógenos (Hughes, 1996).

TOXICIDAD: Capacidad inherente de un agente xenobiótico de producir un efecto nocivo sobre los organismos (Fernícola, 1992 c).

TOXODINÁMICA: Es el estudio de la salud de un organismo causado por un tóxico, correlacionado con su toxicocinética (Hughes, 1996).

TOXICOCINÉTICA: Es el estudio de los cambios que ocurren a través del tiempo en la absorción, distribución y eliminación de toda sustancia tóxica en el organismo (Vega, 1885b).

VALORACIÓN TOXICOLOGICA: Es la determinación del potencial toxico de una sustancia xenobiótica (Vettorazzi, 1992 a).

XENOBIÓTICO: Sustancia que no aparece naturalmente en el organismo, o está a diferentes concentraciones de lo normal (Vettorazzi, 1992 b).