



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**“DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE
MALFORMACIONES EN COLUMNA VERTEBRAL,
OPÉRCULO Y ALETA EN *Danio rerio* Hamilton, 1822, COMO
POSIBLES BIOMARCADORES EN LA VALORACIÓN DE
DAÑO TERATOGENICO”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

INGRID VANIA RIVERA CASTILLO

ASESORES:

Dr. JUAN CARLOS GAYTÁN OYARZÚN

M. en C. ESTELA PÉREZ CRUZ

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO JUNIO 2006

AGRADECIMIENTOS

A Dios

*A ti Padre Santo por darme el Don de la vida,
por ser la fuerza que me alienta para alcanzar una meta,
a ti Señor que nunca me abandonas y siempre me guías.*

A mi esposo

Guillermo Estrada Contreras

*Por ser el gran complemento de mi vida
que junto con mi carrera dan sentido a mi vida
y una razón más para seguir a delante.*

*Porque contigo he aprendido
a compartir sueños y luchar por ellos.*

A mis padres

Filogonio Rivera García

y

Alina Castillo Torres

*Que me enseñaron que lo que vale realmente en la vida
es sólo aquello que se consigue con sacrificio, trabajo, dedicación y amor.*

*Les Agradezco infinitamente todo el apoyo que
me han brindado a lo largo de mi vida.*

A mi hermano

Julio César Rivera Castillo

Por formar parte de mi vida y por estar conmigo en todo momento T.Q.M.

A mis Directores de Tesis

M. en C. Juan Carlos Gaytán Oyarzún

M. en C. Estela Pérez Cruz

*Con gratitud infinita,
por su invaluable apoyo y aportación
para la elaboración de esta Tesis,
por compartir sus conocimientos conmigo,
por su paciencia, tiempo y dedicación.*

A mis sinodales

Dr. Alberto José Gordillo Martínez

M. en C. Mario Segura Almaraz

Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Dra. Katia Adriana González Rodríguez

Dr. William Scott Monks Sheets

Dra. Griselda Pulido Flores

*Por la dedicación y apoyo que cada uno de ustedes me brindó,
gracias por formar parte en una etapa más en mi vida.*

A los catedráticos del Acuario de la facultad de ciencias de la UNAM

Biól. Humberto Olvera Quezada

M. en C. Ignacio Andrés Morales Salas

Por su apoyo incondicional, sus consejos y tiempo brindado en la elaboración de esta tesis, gracias por compartir conmigo sus conocimientos y enseñarme tantas cosas de los peces.

Al licenciado Marcelo Quiterio

Por la asesoría en los análisis estadísticos

A mis amigos

Jorge

Juriana

Chuy

Irving

Luis

Lorena

Mireya

Prof. Bertha

*Por compartir momentos inolvidables
y por enseñarme el verdadero significado de la amistad,
gracias por hacerme sentir parte importante de sus vidas.*

Gracias a todas las personas que creyeron en mí.

DEDICATORIA

Esta Tesis es en honor de aquellas personas que en ningún momento me dejaron llegar sola:

A mi esposo

Guillermo Estrada Contreras

A mis padres

Filogonio Rivera García

y

Alina Castillo Torres

A mi hermano

Julio César Rivera Castillo

Especialmente a un Ángel

*Que en todo momento estuvo a mi lado
y que es la estrella que ilumina mi sendero,
quien siempre vivirá en mi corazón como algo sagrado.*

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CONTAMINANTES AMBIENTALES	3
1.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOLÓGICO	5
1.3. INDICADORES BIOLÓGICOS	8
1.4. BIOMARCADORES	9
1.5. BIOLOGÍA DE <i>Danio rerio</i>	12
1.6. TERATOGENESIS	14
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. OBJETIVOS	16
3.1. OBJETIVO GENERAL	17
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	18
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	
4.1. ADQUISICIÓN Y DESINFECCIÓN DE ORGANISMOS EXPERIMENTALES	18
4.2. TRANSFERENCIA A UN ACUARIO DE MANTENIMIENTO	18
4.3. MANTENIMIENTO DE LOS PECES	21
4.4. ESTABLECIMIENTO DE LOS CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA LOTES REPRODUCTIVOS	22

4.5. NÚMERO DE INDIVIDUOS EN LOS LOTES REPRODUCTIVOS	22
4.6. CALIBRACIÓN DEL NÚMERO DE OVOPOSICIONES	23
4.7. FRECUENCIA DE APARICIÓN DE MALFORMACIONES EN COLUMNA VERTEBRAL, OPÉRCULO Y ALETA	24
4.8. SELECCIÓN DEL MEJOR BIOMARCADOR CON BASE EN LA EVALUACIÓN DE DAÑO TERATOGENICO INDUCIDO	26
4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	27
5. RESULTADOS	29
5.1. CONDICIONES FÍSICAS Y QUÍMICAS	29
5.2. ESTABLECIMIENTO DEL LOTE EXPERIMENTAL	33
5.3. INDUCCIÓN DE OVOPOSICIÓN Y DETERMINACIÓN DE TAMAÑOS DE MUESTRAS EXPERIMENTALES	34
5.4. ESTABLECIMIENTO DE CURVAS DE TOXICIDAD	37
5.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO TERATOGENICO	39
5.6. MALFORMACIONES ESPONTÁNEAS	49
6. DISCUSIÓN	51
7. CONCLUSIÓN	55
8. GLOSARIO	57
9. BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Proceso de transporte y transformación de un tóxico (Modificado de Peña y col., 2001)	5
Figura 2. <i>Danio rerio</i> en el acuario	10
Figura 3. Dimorfismo sexual en <i>Danio rerio</i> . En la parte superior de la imagen se muestra a la hembra y en la parte inferior al macho	10
Figura 4. Pecera de reproducción, de <i>Danio rerio</i> con red de maternidad	23
Figura 5. Proceso experimental de HgCl ₂ en baño maría con calentador y oxígeno adecuado	25
Figura 6. Lote experimental con peceras de mantenimiento, reproducción y con agua en reposo	33
Figura 7. (a) Huevo contaminado por hongo y (b – c) huevo contaminado por alimento	35
Figura 8. Embrión con proliferación de protozoarios	35
Figura 9. Curva de toxicidad con trióxido de cromo (CrO ₃) en adultos de pez cebra	
Figura 10. Concentración letal 50 de trióxido de cromo en huevos de <i>Danio rerio</i>	37 38
Figura 11. Concentración letal 50 de cloruro de mercurio en huevos de <i>Danio rerio</i>	38

Figura 12. División de malformaciones por zonas del cuerpo de <i>Danio rerio</i>	42
Figura 13. (a) Malformación sencilla, en la zona cefálica en forma lateral (b) posición normal de la columna con respecto a la cabeza en <i>Danio rerio</i>	43
Figura 14. (a) Posición normal de la columna vertebral en <i>Danio rerio</i> (b), Malformación doble en la zona media de la columna vertebral y en la zona caudal	44
Figura 15. (a) Posición normal de la columna vertebral en <i>Danio rerio</i> , (b) Malformación en zona cefálica lateral y zona caudal dorsal	44
Figura 16. (a) Malformaciones curvas en la zona media de la columna vertebral (b) columna vertebral de <i>Danio rerio</i> en posición normal	45
Figura 17. (a) Columna vertebral de <i>Danio rerio</i> en posición normal (b) malformación en zona caudal en espiral	46
Figura 18. (a) Columna vertebral de <i>Danio rerio</i> en posición normal, (b) Malformaciones en zona caudal muy pronunciada	46
Figura 19. (a) Columna vertebral de <i>Danio rerio</i> en posición normal (b-c) Malformaciones en gancho en la zona media de la columna vertebral y en la zona caudal	47
Figura 20. Ausencia de melanocitos en peces de <i>Danio rerio</i> con enanismo	48
Figura 21. (a) Columna vertebral de <i>Danio rerio</i> en posición normal (b) Malformaciones en el sistema óseo	48

Figura 22. (a) Posición normal del opérculo en <i>Danio rerio</i> (b) Ausencia de opérculo	49
Figura 23. (a) Posición normal de la mandíbula del <i>Danio rerio</i> (b) Ausencia de la misma	50
Figura 24. (a) Patrón normal con bandas longitudinales de <i>Danio rerio</i> , (b) patrón anormal de bandas longitudinales	50

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Condiciones físicas y químicas del agua utilizada en los acuarios	20
Tabla 2. Análisis del pH del agua utilizada en los acuarios de <i>Danio rerio</i>	20
Tabla 3. Temperatura óptima establecida experimentalmente por etapa de desarrollo de <i>Danio rerio</i>	30
Tabla 4. Datos dentro de la pecera con tiempo de duración del desarrollo embrionario de <i>Danio rerio</i>	31
Tabla 5. Resultados de viabilidad y mortandad de <i>Danio rerio</i>	32
Tabla 6. Huevos de <i>Danio rerio</i> obtenidos por lote reproductivo	36
Tabla 7. Ovoposiciones de <i>Danio rerio</i> con base en la temperatura	37
Tabla 8. Malformaciones presentes en <i>Danio rerio</i> por concentración de HgCl ₂	41
Tabla 9. Parámetro de frecuencias de malformaciones en <i>Danio rerio</i>	42

RESUMEN

En la actualidad, los organismos interactúan de manera constante con una gran cantidad de sustancias, tanto de origen natural como antropogénico, muchas de éstas pueden ser tóxicas y/o presentar efectos nocivos para la salud.

En la genética toxicológica se utiliza una variedad de organismos que manifiestan alteraciones bioquímicas, morfológicas, fisiológicas y genéticas entre otras, como respuesta a las alteraciones en el medio. Para valorar la calidad ambiental a través del impacto biológico y evaluar el riesgo a la exposición de agentes contaminantes, se requiere de indicadores biológicos y de su correlación con análisis químicos ambientales. Existiendo organismos sensibles a los agentes químicos, los cuales manifiestan una serie de cambios medibles y fácilmente visibles, denominados biomarcadores. Éstos son reproducibles e inducibles, de tal manera que se puede asociar a ellos, la exposición a un "Agente Xenobiótico".

Con base en lo anterior, actualmente se utiliza una gran cantidad de ejemplares en la evaluación del ambiente, y siempre se está en la búsqueda de más y mejores indicadores biológicos que refleje la calidad ambiental. En el presente trabajo se propone a la frecuencia de malformaciones en columna vertebral, opérculo y aleta del *Danio rerio* como biomarcadores en la valoración del efecto teratogénico inducido por contaminantes ambientales, así mismo se proponen otras estructuras que se presenten de manera natural.

En el procedimiento experimental, inicialmente se adecuaron las condiciones físicas y químicas para asegurar la viabilidad y desarrollo de los peces, posteriormente, se realizaron curvas de toxicidad con dos teratógenos positivos de referencia, el trióxido de cromo (CrO_3) y el cloruro de mercurio (HgCl_2), exponiendo a 500 adultos y 6000 huevos del pez cebra para establecer la sensibilidad del bioensayo, registrando la concentración letal 50 en partes por millón para establecer dosis subtóxicas.

La exposición del pez cebra al trióxido de cromo no presentó algún efecto desde el punto de vista genotóxico, al menos en las concentraciones y condiciones probadas tanto en adultos como huevos.

El HgCl_2 en dosis subtóxicas provoca un efecto teratógeno, principalmente en la columna vertebral. En los biomarcadores restantes, opérculo y aleta del pez cebra no se encontró ninguna malformación en el momento de la eclosión.

La temperatura es una variable importante que influye de manera significativa en cada etapa de vida de los organismos, principalmente en la ovoposición, encontrando que, a mayor temperatura, mayor número de huevos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONTAMINANTES AMBIENTALES

La contaminación ambiental, se define como aquella alteración del medio causada por la energía o los materiales de desecho descargados al ambiente, en donde pueden dañar la salud humana, así como a los ecosistemas, llegando de varias maneras: por descargas a la atmósfera y/o al agua, por la disposición de materiales contaminantes en el suelo mismo, e incluso a través de cadenas tróficas tanto simples como complejas. Por lo tanto, la contaminación puede surgir a partir de ciertas manifestaciones de la naturaleza (fuentes naturales) o bien, debido a los diferentes procesos productivos del hombre (fuentes antropogénicas) que conforman las actividades de la vida diaria (Holdgate, 1979; Canter, 1986 y Odum, 1995).

La manera de conocer el impacto de la contaminación en el ambiente, es a través de la identificación de los diferentes tipos de contaminantes, su concentración, origen, cinética ambiental, efectos biológicos y ecológicos; estimando el efecto que pueda causar a diferentes niveles y la posibilidad de que ocurra (evaluación de riesgo o risk assessment), estableciendo probabilidad y gravedad de los posibles efectos adversos, para, así poder estimar el peligro. Éste último se determina por medio de un balance entre el riesgo y la probabilidad de interactuar con algún agente nocivo a la salud (Canter, 1986 y Fernícola, 1992a).

De acuerdo con lo anterior, la evaluación de riesgo se determina en cuatro pasos (Fernícola, 1992a):

- 1) Identificación de peligro con base al efecto,
- 2) Evaluación de la dosis respuesta,
- 3) Evaluación de la vía y tipos de exposición,
- 4) Identificación del riesgo (posibilidad de interacción).

Mediante el uso de la evaluación de riesgo como una herramienta analítica para la toma de decisiones, se brinda soporte a la gestión de riesgo, en el registro y creación de bases de datos de agentes nocivos para la salud.

Una vez conocido el proceso de la valoración de riesgo se procede a la evaluación del efecto, el cual depende de la concentración del agente químico, así como del tiempo (aguda y/o crónica), del tipo (directa o indirecta) y de la vía de exposición (oral, dérmica, respiratoria y especial); para que posteriormente se realicen pruebas de toxicidad que permitan establecer dosis subtóxicas a través de la Cl_{50} (concentración letal 50), que, dé lugar a realizar una gestión de riesgo (risk management), la cual permite establecer las políticas y alternativas en la elección de acciones legales, preventivas y/o correctivas ante una contingencia de un problema ambiental (Fernícola, 1992a).

Toda medida preventiva y/o correctiva se puede realizar siempre y cuando esté sustentada en una evaluación del impacto biológico, debido a que ésta se basa en un monitoreo ambiental sistemático permanente, para advertir señales tempranas de alguna alteración en el ecosistema, teniendo una estrecha relación entre estresores y respuestas biológicas, a través de la identificación de las

causas del efecto producido en los organismos (impacto biológico), debido a que se puede presentar una acción tóxica por los contaminantes, determinada por su accesibilidad al organismo (biodisponibilidad) así como por la serie de reacciones bioquímicas y fisiológicas que se manifiestan como signos o síntomas de intoxicación propios de cada especie (Vega, 1985a; Canter, 1986 y Fernícola, 1992b).

1.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOLÓGICO

La evaluación de este efecto producido por los contaminantes a nivel biológico se determina por medio de la toxicología, en donde su objetivo principal es: establecer el uso seguro de los agentes químicos y minimizar sus efectos deletéreos en poblaciones expuestas (Trimbell, 1989; Cantú, 2000 y Vera y col., 2001).

De ésta área de estudio se desprenden ramas tales como la ecotoxicología y la toxicología genética, la primera no solo se limita a la identificación del agente contaminante ya sea físico, químico y/o biológico, sino que también a su origen, concentración, cinética y consecuencias tanto a nivel individual como ecológico, para lo cual, es necesario identificar la naturaleza, probabilidad y magnitud de los efectos adversos que puedan existir sobre un ecosistema al exponerse a un cierto estrés ambiental (Vettorazzi, 1992a y Vera y col., 2001).

Para que un tóxico ambiental cause un daño, primeramente, se debe estar expuesto a él, y posteriormente, el tóxico debe vencer las defensas y barreras del organismo que tratan de impedirle que llegue al tejido en su forma activa.

Las defensas consisten fundamentalmente en mecanismos que restringen la movilidad disminuyendo el periodo de exposición. Esto se logra, a través de presentar barreras físicas, químicas y/o metabólicas al desplazamiento y absorción (Vega, 1985b).

La Toxocinética o farmacocinética, trata a los agentes xenobióticos que son biotransformados en el organismo, su acumulación, así también los procesos de cuándo y cómo son excretados del mismo, centrándose inicialmente en seis etapas: exposición, absorción, distribución, acumulación, metabolismo y excreción.

Un área de la farmacocinética que se encarga de correlacionar la cinética del contaminante en el interior del organismo con los efectos biológicos que éste pueda manifestar es la Toxicodinámica o Farmacodinámica, la cual permite ampliar el conocimiento del impacto biológico que existe a la exposición a un agente exógeno (Vega, 1985c).

Para caracterizar el proceso de transporte y transformaciones, que experimenta el tóxico, desde la superficie epitelial de contacto hasta llegar a los órganos en los que se almacenan y en los que causa lesiones, se consideran cuatro pasos: **A**bsorción, **D**istribución, **M**etabolismo y **E**xcreción (Figura 1). El proceso se conoce por sus siglas **ADME** (Peña y col., 2001 y Vera y col., 2001).

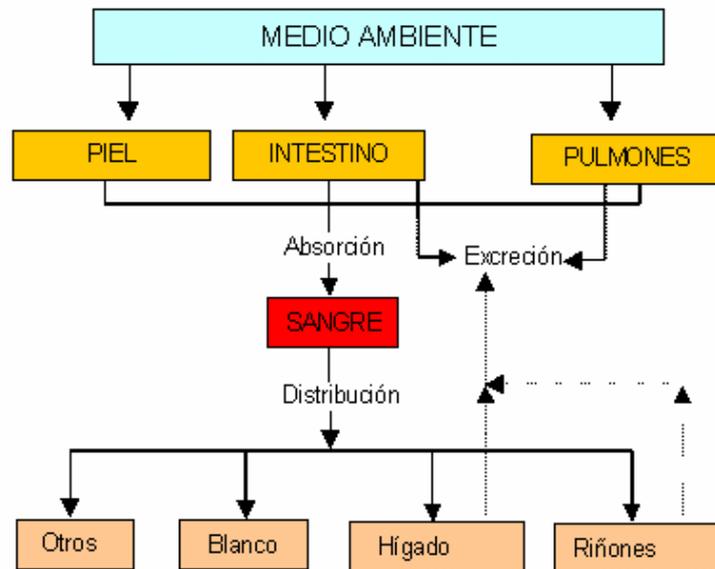


Fig.1. Proceso de transporte y transformación de un tóxico (Modificado de Peña y col., 2001)

Por lo tanto, la interacción dinámica de todos los procesos que contribuyen el ADME, determina el tiempo que permanecerá un agente dentro del organismo después de que éste se ha expuesto a una dosis determinada. De acuerdo a esto, la toxicidad se puede comprobar por medio de indicadores biológicos para evaluar la calidad del medio (Peña y col., 2001).

1.3. INDICADORES BIOLÓGICOS

La evaluación de los efectos detrimentales de los contaminantes a nivel biológico, es difícil de estimar directamente en un ecosistema, debido a que éstos son complejos, multivariados y simultáneamente expuestos a una gran variedad de estresores con efectos acumulativos que son escasamente entendidos debido a su difícil reproducción en pruebas con animales de laboratorio, para determinar la calidad del ambiente con diferentes procedencias.

Además, se debe apoyar forzosamente con análisis químicos cuantitativos y cualitativos, que permitan correlacionar la concentración y movilidad de los contaminantes con los efectos biológicos (Fernícola, 1992a; Butterworth y col., 1995 y Figueroa y Pinzón, 2000).

En cambio, el uso de organismos en la evaluación del efecto biológico es más sencillo, debido a que son organismos sensibles a los cambios ambientales, permitiendo la cuantificación de la magnitud del estrés (Fernícola, 1992a).

En diversos países, el uso de indicadores biológicos es empleado en la evaluación de la salud del ecosistema y en la determinación del impacto potencial en el humano, a través de la estimación de la evaluación de riesgo y efecto de los mismos (Fernícola, 1992b).

Un indicador biológico, es un organismo seleccionado por el grado de su sensibilidad o tolerancia a diversos tipos de contaminación o sus efectos.

Según Cairns y Dickson (1971) el uso de indicadores biológicos brinda dos beneficios para la evaluación de la calidad ambiental: 1.) Los datos biológicos son fácilmente accesibles como los físicos y químicos; 2.) La información será expresada numéricamente, para que facilite la evaluación con métodos estadísticos.

En el caso particular de los sistemas acuáticos, existen diversos indicadores de calidad del agua y criterios para cada uno de ellos. Como por ejemplo, los peces, que son animales usados comúnmente como indicadores en

programas de monitoreo biológico, de acuerdo a las siguientes ventajas y características (De la Lanza y col., 2000):

- 1.- Cuando es necesario el traslado de los peces al laboratorio, el tiempo de manipulación y procesamiento es relativamente menor, en comparación con otros grupos taxonómicos,
- 2.- Son principalmente afectados por factores ambientales, fáciles de ubicar,
- 3.- Los peces son de vida larga y por lo tanto se puede realizar una evaluación en cada etapa,
- 4.- Se identifican los cambios en la anatomía de un pez, cuando se ha sometido a algún tipo de influencia anómala, son reflejados en la producción de lesiones, tumores y/o deformidades en el cuerpo y aleta,
- 5.- El uso de peces como bioindicadores puede ser relacionado directamente en el establecimiento de políticas de pesca y manejo de los ambientes acuáticos.

Además los indicadores biológicos pueden revelar el efecto producido después de la absorción de cierta dosis de agentes químicos y el lugar donde éste ejerce el efecto dentro del organismo. Los indicadores de exposición permiten tener una estimación indirecta, es decir, el efecto que provoca un químico en un tiempo. De acuerdo a esto, los indicadores de acumulación proveen una evaluación de la concentración de la sustancia retenida en órganos pudiendo identificar alteraciones tempranas y totalmente reversibles por el organismo (Fernicola, 1992c).

1.4. BIOMARCADORES

Los biomarcadores son aquellos que detectan la presencia y la ausencia de daño; así como la magnitud de éste, por medio de cambios merísticos, ya sean bioquímicos, morfológicos o fisiológicos, que se pueden asociar a la exposición de un tóxico (Fernícola, 1992b y Guzmán, 1997).

Los biomarcadores se utilizan para detectar la presencia de una exposición, determinar las consecuencias biológicas de la exposición, manifestar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, identificar a los individuos sensibles de una población y fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental (Butterworth, 1995).

Cuando se utiliza un organismo como bioindicador en la determinación del efecto tóxico de algún factor, se debe valorar las ventajas que éste produce al realizar el análisis de los efectos producidos por los contaminantes ambientales.

Cuando se estudian peces que provienen de aguas contaminadas (ríos, lagos, mares o de establecimientos acuicultores), se identifica a un organismo con daños secundarios por la contaminación, mientras los bioindicadores que se analizan dan a conocer alteraciones sustanciales. El estado en el que se encuentran los peces, generalmente permite presumir que cualquier desequilibrio agudo de la concentración de oxígeno, aumento de temperatura del agua o modificaciones en la masa de agua, pueden ocasionar dramáticas consecuencias para la supervivencia de éstos animales (Butterworth, 1995).

1.5. BIOLOGÍA DE *Danio rerio* Hamilton, 1822

En la Universidad de Oregon en los años 70 y 80, se constituyó el principal portal que da acceso a las tecnologías desarrolladas, en la red internacional del “pez cebra” *Danio rerio* Hamilton, 1822 (Westerfield, 1995 y Kimmel y col., 1995).

Danio rerio es una de las especies de peces más resistentes a cambios ambientales, éste es de ambiente bentopelágico de agua dulce con pH de 6 a 8, así mismo los intervalos de dureza son de 5 a 19, Es de clima tropical con una temperatura de 18 a 24°C y es quizás el pez más fácil de criar entre los ovíparos, se distribuye en Asia: Pakistan, India, Bangladesh, Nepal y Myanmar (Kimmel y col., 1995; Aqua Guía, 2004, y Froese y Paulv, 2006).

Su morfología es fusiforme y alargada, presenta un par de barbillas en ambos lados de la boca que le permite mover los fondos en busca de comida. Ostenta de 31 a 32 vértebras; el color de su cuerpo es dorado o plateado (según el sexo), sobre los flancos y longitudinalmente se presenta de cinco a nueve bandas de color azul oscuro que empiezan desde el opérculo y llegan hasta el final de la aleta caudal. El opérculo es azulado y la zona ventral de un tono blanquecino rosado. *Danio rerio* habita en corrientes de agua, canales, y charcas. Se alimenta de gusanos y pequeños crustáceos y de larvas de insectos (Figura 2).



Fig.2 *Danio rerio* en el acuario

(Tomado de [www.bbe-moldaenke.de/ img/zebrafish.jpg](http://www.bbe-moldaenke.de/img/zebrafish.jpg))

Los ejemplares de *Danio rerio* presentan dimorfismo sexual bajo los siguientes criterios (Figura 3):

Hembras: son de mayor tamaño que los machos y en el abdomen, las líneas presentan curvaturas.

Machos: de menor tamaño que las hembras, no presentan curvaturas en las líneas de su cuerpo por que no hay prolongación de abdomen.



Fig. 3. Dimorfismo sexual en *Danio rerio*. En la parte superior de la imagen se muestra a la hembra y en la parte inferior al macho

Éste organismo en condiciones de laboratorio presenta diversas ventajas sobre otros organismos como: una salud óptima, controlándola por medio de cambios de temperatura y limpieza de la pecera. Puede mantenerse muy bien alimentado con comida comercial de marca Wardley y Tetra Min y así mismo comida liofilizada de *Tubifex* y *Artemia*; su mantenimiento es de bajo costo; así mismo, ocupa un espacio reducido, por ejemplo, en una pecera de 20 litros se pueden tener 30 individuos, debido a su talla de 5 cm. Otra de las ventajas importantes es que su reproducción sexual inicia a los 4 meses, después de la eclosión, su reproducción puede inducirse por factores de luz y es controlable por alimentación. En el cortejo, hembras y machos se persiguen mutuamente para ser los machos los que acaban arrinconando a las hembras para provocar el desove; éste se produce cuando los peces están muy excitados, el macho llega a golpear el lomo de la hembra para que esta expulse los huevos para fecundarlos. Su descendencia oscila entre 200-400 huevos en tan sólo dos semanas y su desarrollo embrionario va de dos a cuatro días, conformado por siete periodos en la embriogénesis: cigoto, hendidura, blástula, gástrula, segmentación, faríngrula y eclosión (Weinberg, 1992; Sohn, 1994; Kimmel y col., 1995 y Froese y Paulv, 2006).

Una característica que no se debe dejar de mencionar, es que el huevo tiene una cubierta delgada, semipermeable y transparente, que permite observar cualquier alteración durante el desarrollo embrionario, como malformaciones congénitas producidas por agentes teratógenos (Vega, 1985c; Galicia y col., 1998 y Rocha y col., 2001).

1.6. TERATOGENESIS

El término teratogénesis proviene del griego teratos que significa monstruo, ésta palabra se refiere a malformaciones anatómicas macroscópicas. En donde, un teratógeno, es cualquier agente químico, físico o infeccioso, actuando durante el desarrollo embrionario, que sea capaz de producir una alteración morfológica o funcional en el periodo postnatal (Hughes, 1996).

Un ejemplo es el caso del cromo, el cual es un agente teratogénico positivo, ampliamente distribuido en la corteza terrestre (Hughes, 1996).

En condiciones naturales el cromo se presenta casi siempre en forma trivalente mientras que el cromo VI es generado por las actividades antropogénicas, el cual es un agente oxidante que en contacto con la materia orgánica se reduce a cromo III (Vera y col., 2001).

El cromo principalmente se presenta en las aguas superficiales y muy poco en agua potable, por lo que las concentraciones elevadas de cromo en el agua es consecuencia de las actividades industriales o de aguas servidas. Las pruebas *in vitro* han mostrado que el cromo VI es mutagénico mientras que el cromo III no (Vega, 1985d y Vera y col., 2001).

Otro de los teratógenos relevantes por sus efectos es el mercurio, siendo un elemento químico presente en el ambiente, se origina de los escapes industriales, del empleo de combustibles fósiles (principalmente carbón, lignita, petróleo y gas natural), de la desgasificación natural de la corteza terrestre y de los océanos (Galvão y col., 1987).

El mercurio se puede presentar de forma metálica, sales inorgánicas y orgánicas. En su forma metálica, en mamíferos atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y la placenta; mientras que las sales inorgánicas de mercurio como por ejemplo el cloruro de mercurio (HgCl_2) son compuestos corrosivos y que en bajas concentraciones se absorben por vía gástrica. En la piel el mercurio causa irritaciones graves. Después de la absorción estos compuestos pasan a tejidos sanguíneos; distribuyéndose por igual entre el plasma y los eritrocitos. Por otra parte, la afinidad del mercurio metálico y las sales inorgánicas de mercurio por el riñón se debe a la proteína metalotioneína de bajo peso molecular (Galvão y col., 1987).

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, varios trabajos proponen al pez cebra como un buen indicador biológico en ambientes acuáticos, debido a que puede reflejar retrospectivamente y/o prospectivamente las modificaciones a través del impacto biológico.

Existe una gran diversidad de datos, en donde se utiliza el bioensayo de *Danio rerio* como un bioindicador de calidad ambiental. Un ejemplo es el trabajo de Gong, y col., (2003) en donde crearon peces genéticamente modificados que cambian de color en presencia de aguas contaminadas.

Desde 1986 se sugirió al pez cebra como un modelo con múltiples ventajas para el análisis genético del desarrollo embrionario en vertebrados, lo cual, sustentó estudios de ecotoxicología que proponen el uso de embriones de éste organismo para evaluar daño teratogénico inducido por contaminantes ambientales. Ésta propuesta ha evolucionado, a través de varios ensayos que culminan en la prueba denominada “*Danio rerio* Teratology Assay” DarTa (Dietrich y col., 1998, Oberemm, 2000 y Nagel, 2002). El uso del modelo DarTa permite evaluar la calidad ambiental a través de malformaciones en biomarcadores como columna vertebral, opérculo, aleta y corazón, entre otros; que se expresan de manera natural y que puede influir en su frecuencia de malformaciones a través de la exposición a agentes xenobióticos. Llegando a considerar al *Danio rerio* como la *Drosophila* para los vertebrados; debido al

amplio grado de conocimiento que se tiene de su genoma, la anatomía y su desarrollo, de ahí su amplia aplicación en estudios de la calidad ambiental.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de malformaciones en columna vertebral, opérculo y aleta en *Danio rerio*, para postularlos como posibles biomarcadores en la valoración de daño teratogénico.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Adecuar las condiciones físicas y químicas de cada una de las etapas de desarrollo embrionario, de *Danio rerio* que asegure la viabilidad de huevos y alevines para su posterior análisis.
- Establecer condiciones físicas, químicas y biológicas, que aseguren la conducta reproductiva de *Danio rerio* para calendarizar periodos de ovoposición y tamaños de muestra.
- Determinar daño con un teratógeno positivo y malformaciones congénitas más evidentes, registrando frecuencia de aparición, variabilidad, porcentaje de eclosión y porcentaje de sobrevivencia, que permitan detectar efectos letales de exposición temprana y tardía, para elegir cual es el mejor biomarcador propuesto, de columna vertebral, opérculo y aleta del pez cebra.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. ADQUISICIÓN Y DESINFECCIÓN DE ORGANISMOS PERIMENTALES

La desinfección de los organismos experimentales *Danio rerio* adquiridos comercialmente, se llevó a cabo en un periodo de dos semanas agregando previamente 6 gotas de azul de metileno y un gramo de granos de sales marinas, ésta desinfección se realizó con el propósito de eliminar todo aquel pez que presentara alguna enfermedad, así como para lograr la eliminación de parásitos. Ésta etapa se llevó a cabo en una pecera de 70 litros de capacidad, con un filtro biológico de (grava y tezontle), calentador de temperatura controlada, entre $26^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ y bombas de oxígeno.

Posteriormente, los peces cebra se separaron de acuerdo a su sexo, en dos peceras bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente, para que llegado el momento se colocaran en una pecera de reproducción, identificándolos morfológicamente gracias a que presentan dimorfismo sexual.

4.2. TRANSFERENCIA A ACUARIO DE MANTENIMIENTO.

Las condiciones para el mantenimiento de los peces no radica en querer reproducir al máximo en el laboratorio su ambiente natural, sino proporcionarles un medio suficientemente aceptable cuyas características se encuentren cercanos a las condiciones físicas y químicas en cuestión para los organismos empleados; debido a esto, se colocaron en un lote experimental el cual está constituido por:

El primer compartimiento, cuenta con una pecera de 70 litros con agua en reposo, durante 24 h, con aireación constante (bomba de oxígeno) y un calentador automático con la finalidad de eliminar cloro.

En el segundo compartimiento se colocó el lote de mantenimiento en una pecera con el mismo volumen, filtro biológico que consiste en una capa de tezontle y una capa de grava, calentador automático y bomba de oxígeno.

En el tercer compartimiento se colocaron dos peceras de cuatro litros de capacidad las cuales fueron nombradas “peceras de reproducción”, contando con redes de maternidad, un calentador y oxígeno.

Por último, en el cuarto compartimiento se colocaron dos peceras de cuatro litros de capacidad llamadas “peceras de maternidad”, con un calentador y aireación constante, para el mantenimiento de los embriones obtenidos. Por otra parte, los huevos y alevines se colocaron en diversos frascos debidamente etiquetados con el número de individuos, fecha de ovoposición y la pecera de maternidad de donde provienen, estos frascos se cubrieron con una malla delgada para que no se revuelvan con los demás y así poder llevar un registro de viabilidad de cada pecera de maternidad.

Las condiciones físicas y químicas de los lotes de mantenimiento se establecieron con base en González, (2005) y Baez y col., (2004 y 2005), (ver tabla 1 y 2) las cuales marcan los siguientes factores como determinantes: luz solar y temperatura, siendo agentes importantes que inciden en los ritmos biológicos de las especies, teniendo un efecto directo en sus hábitos

conductuales, alimenticios y reproductivos. Por otra parte, también se fijaron las condiciones de aireación, tamaño del estanque y ubicación dentro del laboratorio para evitar la alteración de la viabilidad y fecundidad de los organismos experimentales (Galicia y col.1998).

Para el seguimiento de condiciones físicas y químicas se monitoreó diariamente la temperatura, presencia de aireación, pH mensual y presencia de luz (12 h/luz y 12 h/oscuridad).

Tabla 1. Condiciones físicas y químicas del agua utilizada en los acuarios

VARIABLE	CONDICIONES RECOMENDADAS
ILUMINACIÓN	No recomendada de manera directa al acuario
TEMPERATURA	La temperatura recomendada es de 28°C Los acuarios deben permanecer alejados de equipos que produzcan exceso de calor (parrilla, estufa, etc.)
pH	pH 7
CORRIENTES DE AIRE	Mantener ventanas cerradas o cualquier orificio
INSTALACIONES	El equipo a utilizar debe estar en condiciones favorables
ESPACIO	Suficiente para que se pueda manipular con mayor facilidad a las peceras

Tabla 2. Análisis del pH del agua utilizada en los acuarios de *Danio rerio*

MESES	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	SEP	NOV	DIC	ENE
pH	8.16	7.14	10.36	7.75	7.36	8.22	7.91	8.32	8.13	8.08

4.3. MANTENIMIENTO DE LOS PECES CEBRA.

El monitoreo de las condiciones óptimas recomendadas bibliográficamente se realizó de forma sistemática y permanente cada día. Se eliminaron los desechos orgánicos producidos por los peces después de cada alimento para evitar contaminación de microorganismos. El alimento se administró en función de los requerimientos nutricionales específicos de los peces, es decir, de acuerdo a la etapa de desarrollo en el que se encontraban, por lo que se alimentó a los organismos adultos tres veces al día con alimento seco, agregándoles la cantidad necesaria para alimentarlos durante cinco minutos con Wardley y Tetra Min; para la etapa de reproducción se requiere un mayor aporte de lípidos y carbohidratos, es por ello que su dieta se complementó con alimento vivo (*Artemia* sp.) para obtener mayor número de huevos en cada ovoposición y así cumplir con los nutrientes necesarios. Por otro lado, los alevines recién eclosionados tienen una reserva de vitelo que proveerá por un periodo una alimentación endógena. Posteriormente se alimentaron con tetramin especial para alevines, el cual proporcionó proteínas, carbohidratos, grasas y fibras.

Así mismos, se realizó un cambio de agua en cada pecera, eliminando el 50% de la misma y agregando agua en reposo para el llenado, este recambio se llevó a cabo una vez a la semana, en la pecera donde se encontraba el lote de mantenimiento y dos veces a la semana en las peceras con lotes reproductivos.

4.4. ESTABLECIMIENTO DE LOS CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA LOTES REPRODUCTIVOS

Como criterio de selección de los organismos experimentales se estableció que:

- 1.- Los ejemplares *Danio rerio* fueron adultos de aproximadamente 3 meses de edad.
- 2.- La selección de machos y hembras se realizó con base en el dimorfismo sexual de la especie.
- 3.- Se consideró que todos los ejemplares de *Danio rerio* no presentaran alguna malformación evidente y/o alguna evidencia de enfermedad.

4.5. NÚMERO DE INDIVIDUOS EN LOS LOTES REPRODUCTIVOS

Los peces se colocaron en las peceras de reproducción de cuatro litros de capacidad con una malla pequeña, en una proporción 3:2 macho - hembra respectivamente, con la finalidad de obtener suficiente número de huevos para someterlos a la etapa experimental (Figura 4).

Cuando el número de huevos obtenidos con la proporción 3:2 no fue suficiente, se realizaron cruza masivas, utilizando una red de maternidad grande, colocada en una pecera de 70 litros de capacidad, con 50 hembras y 70 machos, para obtener el mayor número de huevos posibles.



Fig. 4. Pecera de reproducción, de *Danio rerio* con red de maternidad

4.6. CALIBRACIÓN DEL NÚMERO DE OVOPOSICIONES

Se determinó el número promedio de ovoposiciones (huevos) por lote reproductivo y así mismo calendarizando el tiempo en que una hembra puede seguir ovopositando.

En la mañana del día siguiente del desove se recolectaron los huevos del fondo de la pecera con un sifón. Posteriormente, los huevos se colocaron en cajas Petri, para ser analizados y determinar el número de huevos viables y el número de ovoposiciones de cada lote reproductivo, manteniendo la temperatura de los lotes reproductivos entre 27 °C a 28 °C, ya que es la temperatura idónea para el desove de los peces.

Posteriormente, se colocaron cien huevos de cada ovoposición en peceras de 5 litros a temperatura, aireación y luz óptima, para favorecer su desarrollo, evitando siempre el contacto de los adultos con los huevos para evitar conductas de canibalismo.

4.7. FRECUENCIA DE APARICIÓN DE MALFORMACIONES EN OPÉRCULO, ALETA Y COLUMNA VERTEBRAL

Una vez determinadas las condiciones físicas y químicas de mantenimiento así como las de inducción de la conducta reproductiva, se estableció la frecuencia de daño teratogénico inducido por agentes químicos de referencia, como el Trióxido de Cromo (CrO_3) y Cloruro de Mercurio (HgCl_2). Para ello, previamente, se diseñaron varios experimentos que permitieron establecer las concentraciones subtóxicas a partir de la concentración letal ($=\text{Cl}_{50}$), la cual evalúa un daño teratogénico sin que los efectos tóxicos lo oculten, partiendo de las concentraciones máximas permisibles por la norma oficial Mexicana NOM-001 Ecol. 1996, para agua potable 0.001 ppm en HgCl_2 y CrO_3 0.05 ppm.

4.7.1| CURVAS DE TOXICIDAD:

Para determinar la concentración letal 50 (Cl_{50}) del trióxido de cromo y cloruro de mercurio se necesitó iniciar calculándola en adultos, y a partir de ésta, tomarla como referencia, para determinar en huevos recién ovopositados. Para ello, inicialmente se utilizaron 30 organismos adultos hembras por cada

concentración elegidas al azar (0, 10, 100 y 1000 ppm), realizándose en cada caso tres repeticiones concurrentes.

Dependiendo de los resultados obtenidos con las cuatro concentraciones antes mencionadas con base en el porcentaje de individuos sobrevivientes a las 24 h en organismos adultos, y de todo el desarrollo embrionario, se realizaron más experimentos con concentraciones intermedias hasta determinar la Cl_{50} en cada caso y a partir de ella identificar dos dosis subtóxicas (Cl_{25} y $Cl_{12.5}$).

Los adultos se colocaron en frascos de 1000 ml con boca ancha y se cubrieron con una malla alrededor del vaso sujeta con una liga para evitar que los peces brincaran debido al estrés ocasionado por la manipulación; así mismo, se utilizó la liga para sujetar la manguera que adiciona oxígeno en cada vaso, estos se colocaron en baño maría para mantener la temperatura constante a $24 \pm 2^\circ$ C por medio de un calentador de 10 watts (Figura 6). En el caso de los huevos, la única variante, es que el recipiente utilizado fue de 60 ml por cada tratamiento y se dejó hasta la eclosión.



Fig. 5. Proceso experimental de $HgCl_2$ en baño maría con calentador y oxígeno adecuado

4.8. SELECCIÓN DEL MEJOR BIOMARCADOR CON BASE EN LA EVALUACIÓN DE DAÑO TERATOGENICO INDUCIDO

Después de determinar las concentraciones subtóxicas a las que se puede exponer los huevos de *Danio rerio* para evaluar el daño teratogénico, sin que la toxicidad del compuesto encubra dichos efectos; se procedió a tratar entre 180 a 200 huevos crónicamente durante todo su desarrollo embrionario con trióxido de cromo a las concentraciones letales de 50, 25 y 12.5 respectivamente, en lotes de 30 huevos por frasco para evitar contaminación por protozoarios, con las condiciones físicas y químicas antes mencionadas. Después de la eclosión se evaluó en los embriones las malformaciones en columna vertebral, opérculo y aleta, seleccionando al mejor biomarcador con base en:

- Frecuencia de huevos ovopositados (fertilidad).
- Frecuencia de huevos eclosionados (Viabilidad del embrión).
- Duración de la eclosión.
- Número y tipo de malformaciones evidentes al momento de la eclosión (Frecuencia de daño y variabilidad de expresión).
- Facilidad de registro y evaluación de las malformaciones.

Y se colocaron en peceras para su posterior desarrollo, hasta la etapa juvenil para determinar:

- Frecuencia de alevines que llegan a la etapa juvenil (Viabilidad de alevín).
- Número y tipo de malformaciones evidentes hasta la etapa juvenil (tardías).
- Facilidad de registro y evaluación de las malformaciones

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos en la elaboración de cada experimento se sometieron a un análisis estadístico, utilizando las pruebas recomendadas bibliográficamente:

a) Prueba de Kruskal-Wallis: Ésta prueba estadística es la alternativa no paramétrica del método *ANOVA*, que permite determinar, si existe diferencia significativa entre alguno de los tratamientos, mediante las siguientes hipótesis (Ronald y Myers, 1999):

Hipótesis nula (H_0): control = 0.1Cl_{12.5} = 0.2 = 0.3 Cl₂₅ = 0.4 = 0.5Cl₅₀ = 0.6 = 0.7 = 0.8. Todas las concentraciones son iguales al control.

Hipótesis alternativa (H_a): control \neq 0.1Cl_{12.5} \neq 0.2 \neq 0.3Cl₂₅ \neq 0.4 \neq 0.5Cl₅₀ \neq 0.6 \neq 0.7 \neq 0.8. Al menos una de las concentraciones es distinta al control, existiendo diferencias significativas.

b) Prueba de Dunnett: Esta segunda prueba se llevó a cabo cuando el análisis estadístico de Kruskal-Wallis resultó positivo, es decir, si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Siendo una prueba estadística de comparación múltiple, la cual sirve para determinar que tratamientos o concentraciones son significativamente diferentes con respecto al control (Canavos, 1988 y Ronal y col. 1999).

c) Prueba de t de student: Es un análisis para variables cuantitativas y se sustenta en datos de medias y varianzas de dos conjuntos de datos, que permiten determinar, si existe diferencia significativa entre el número de huevos ovopositados a diferentes temperaturas, mediante las siguientes hipótesis (Sokal y Rohlf, 1999):

Hipótesis nula (H_0): Experimental = control. El número de huevos ovopositados no varía con respecto al control, independientemente de que se cambie la temperatura.

Hipótesis alternativa (H_a): Experimental \neq control. El número de huevos ovopositados varía con respecto al control, cuando se cambia la temperatura.

5. RESULTADOS

5.1. CONDICIONES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Una vez culminada la etapa de desinfección, se aplicaron los criterios de inclusión mencionados en la metodología; encontrándose que estos permiten una salud óptima de los organismos experimentales y de reproducción; existiendo una restricción del 50 % del uso de azul de metileno, debido a que tiende a acumularse en el abdomen de los alevines, provocando su muerte.

En cuanto a las variables físicas y químicas utilizadas en los lotes de mantenimiento y reproducción, es importante resaltar que aunque existe una gran variedad de estudios realizados con *Danio rerio*, marcando un parámetro de temperatura de 24 a 28 °C, éste solo es aplicable a los organismos adultos en las peceras de mantenimiento; en cuanto a las peceras de reproducción la temperatura se tuvo que modificar de acuerdo a su desarrollo de vida, es decir, los organismos se mantuvieron a 28 °C debido a que se logró inducir una mayor ovoposición por lote reproductivo; así mismo, los huevos requieren de igual temperatura durante todo su desarrollo embrionario para facilitar la eclosión. Finalmente los alevines se encontraron expuestos entre 26 a 28 °C para una mayor viabilidad. Por lo tanto, si la temperatura excede de los 28 °C existe una mayor proliferación de micro algas, evaporación y formación de protozoarios, por otro lado, si disminuye de 24°C se presenta un letargo en el desarrollo de los peces (Tabla 3).

Tabla 3. Temperatura óptima establecida experimentalmente por etapa de desarrollo de *Danio rerio*

ETAPA DEL PEZ CEBRA	CRITERIOS DE SELECCIÓN	TEMPERATURA ADECUADA
Adultos hembras y machos (lote de mantenimiento)	Viabilidad (100%)	24°C a 28°C
Adultos hembras y machos (lote de mantenimiento)	% de ovoposición (100%)	28°C
Huevos	% eclosión (80%)	28°C
Alevines	Viabilidad (50%)	26°C a 28°C

En las condiciones físicas y químicas de luz solar y pH, se encontró que al colocar a las peceras de manera directa con la primera condición se fomentaba la evaporación del agua, y, por lo tanto, la generación de sales en los bordes de las peceras alterando condiciones como el pH, el cual favorecía la proliferación de micro algas y protozoarios, principalmente en los meses de marzo, mayo y septiembre.

Con base en la bibliografía, el pH recomendado es en condición neutra, sin embargo en el presente trabajo, se encontró que es una condición difícil de mantener debido a que los desechos orgánicos aumenta el pH entre 7.5 y 8, condición que aparentemente no afectó la ovoposición y el desarrollo de los organismos; lo anterior es posible siempre y cuando, las peceras se laven cada tercer día, eliminando el 50 % del volumen de agua y llenándolas con agua en reposo. Si éste proceso no se lleva a cabo, el pH se incrementa hasta intervalos cercanos a 10 por lo que se recomienda realizar estudios posteriores que

indiquen claramente los efectos del pH en el porcentaje de ovoposiciones, así como la viabilidad de huevos y alevines.

En cuanto al flujo de corrientes de aire, se pudo observar que éstas favorecen la contaminación por polvos y partículas; así mismo, la evaporación.

La última variable considerada, es el espacio tanto “dentro de la pecera como fuera de ella”; en el primer caso, se considera como un equilibrio entre el volumen del agua y el número de organismos; en donde se encontró prácticamente que la sobrevivencia y desarrollo de los organismos, se favorecía teniendo una proporción de 10 peces por cada litro de agua, debido a que se observó que los organismos no se desarrollaban satisfactoriamente y sufrían un letargo en su desarrollo si el número de peces era mayor (Tabla 4).

Tabla 4. Datos dentro de la pecera con tiempo de duración del desarrollo embrionario de *Danio rerio*

CAPACIDAD DE LA PECERA	NÚMERO DE ORGANISMOS	TIEMPO DE CRECIMIENTO	TIEMPO DE CRECIMIENTO NORMAL
70 litros	250 peces machos y hembras juveniles	5 meses	3 meses
4 litros	60 peces machos y hembras alevines	3 meses	1 mes
4 litros	100 huevos	7 días	3 días

Con base a la práctica y a lo antes mencionado, se recomienda para una mejor manipulación; establecer como mínimo: un espacio de un metro lineal y colocar dos peceras de 4 litros o bien una de 70 litros de capacidad.

Como se muestra en la tabla 5, en el momento de establecer cada una de las condiciones físico químicas antes mencionadas, se obtuvo un porcentaje muy alto de mortandad de adultos y alevines, una vez establecida cada condición, las cifras de viabilidad cambiaron satisfactoriamente a un 90 %.

Tabla 5. Resultados de viabilidad y mortandad de *Danio rerio*

PECERAS	TOTAL DE HUEVOS (Equivalencia 100%)	VIABILIDAD				MORTANDAD	
		ALEVINOS		ADULTOS		TOTAL	EQUIV. %
		TOTAL	EQUIV. %	TOTAL	EQUIV. %		
A	2050	41	2.00%	27	1.32%	1982	96.68%
B	1575	10	0.63%	44	2.79%	1521	96.57%
C	1157	42	3.63%	19	1.64%	1096	94.73%
D	101	0	0.00%	0	0.00%	101	100.00%
E	154	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%

5.2. ESTABLECIMIENTO DEL LOTE EXPERIMENTAL

Como se mencionó en la metodología, para el montaje de cada una de las etapas de mantenimiento, reproducción, tratamiento y desarrollo de alevines; se necesitó de un conjunto mínimo de peceras denominadas “Lote experimental” (Figura 6), el cual, fue funcional en el presente proyecto, como se postuló inicialmente, pero con base en la experiencia, se requiere de al menos una pecera por cada ovoposición para realizar observaciones a lo largo de su desarrollo, y así poder detectar alteraciones que no sean evidentes en el momento de la eclosión.



Fig. 6. Lote experimental con peceras de mantenimiento, reproducción y con agua en reposo

5.3. INDUCCIÓN DE OVOPOSICIÓN Y DETERMINACIÓN DE TAMAÑOS DE MUESTRAS EXPERIMENTALES

El criterio de selección preestablecido, de tres machos y dos hembras por lote reproductivo fue satisfactorio, debido a que se obtuvo un buen número de ovoposiciones por lote reproductivo (100 a 200 huevos cada tercer día).

Así mismo, con base en la experiencia adquirida de montaje de maternidades durante la realización del presente trabajo, se encontró que las ovoposiciones mejoraban cuando se colocaban a los organismos adultos hembras y machos en las redes de maternidad un día antes del experimento, agregando unas gotas de azul de metileno y sales marinas, debido a que se aumenta la conductividad, se favorece que el agua tenga una menor proporción de aniones y cationes.

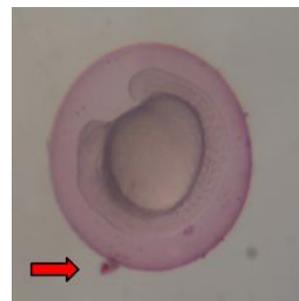
En cuanto a la sobrevivencia de los huevos, se detectó a través de la frecuencia de eclosión, que ésta se favorecía cuando los huevos eran sifoneados a un cristalizador, inmediatamente después de la ovoposición en un intervalo no mayor de 3 h; periodo en que se eliminan los huevos no viables que se presentan en cada ovoposición de manera natural; así mismo, el exceso de comida y heces, provocó la proliferación biológica de hongos y protozoarios (Figura 7).



a)



b)



c)

Fig. 7. (a) Huevo contaminado por hongo y (b – c) huevo contaminado por alimento

Independientemente del aseo periódico de las peceras, también se observó que a temperaturas mayores de 28 °C, se registró una alta proliferación de protozoarios, los cuales penetraron el corion y se comieron al embrión de *Danio rerio*, afectando significativamente el porcentaje de huevos viables (Figura 8).



Fig. 8. Embrión con proliferación de protozoarios

La ovoposición es un factor importante que cabe mencionar, puede influir en el número de huevos obtenidos por cada lote reproductivo, debido a que se observó que existe una estrecha relación entre huevos ovopositados y número de ovoposiciones, por eso es recomendable que, los peces en etapa reproductiva se cambien por otros adultos en un término de cada 15 días para obtener mejores desoves (Tabla 6).

Tabla 6. Huevos de *Danio rerio* obtenidos por lote reproductivo

NÚMERO DE OVOPOSICIONES	HUEVOS OVOPOSITADOS $X \pm 1S$
1° ovoposición	212 \pm 10
2° ovoposición	185 \pm 6
3° ovoposición	151 \pm 14
4° ovoposición	88 \pm 24

Como se observa en la tabla 7, también se registró, que la temperatura es un factor que contribuye a la formación de la ovoposición variaba durante el periodo de ovoposición, el número de huevos se modificó estadísticamente, lo cual indicó después de ser sometidos los datos a un prueba de t student para aceptar la hipótesis alternativa (ha): donde al menos una de las temperaturas es diferente al control, es decir, a una mayor temperatura mayor ovoposición.

Tabla 7. Ovoposiciones de *Danio rerio* con base en la temperatura

TEMPERATURA (° C)	HUEVOS OVOPOSITADOS $X \pm 1S$
(-) 24	43 \pm 17
(-) 25	43 \pm 17
(-) 6	99 \pm 13
(+) 27	218 \pm 3
28 (Control)	226 \pm 2

(+) = positivo, (-) = negativo.

Prueba estadística de t student (Prueba estadística de una cola)

5.4. ESTABLECIMIENTO DE CURVAS DE TOXICIDAD

Como parte de los resultados de este trabajo, se obtuvieron tres curvas de toxicidad: la concentración letal 50 del trióxido de cromo en adultos y huevos, por otro lado, no se realizó la curva de toxicidad en adultos debido a que solo se necesitaba la concentración letal en huevos.

1.- Trióxido de cromo CrO₃

En la figura 9, se observa que la concentración letal 50 se encontró en 235 ppm de CrO₃ en organismos adultos.

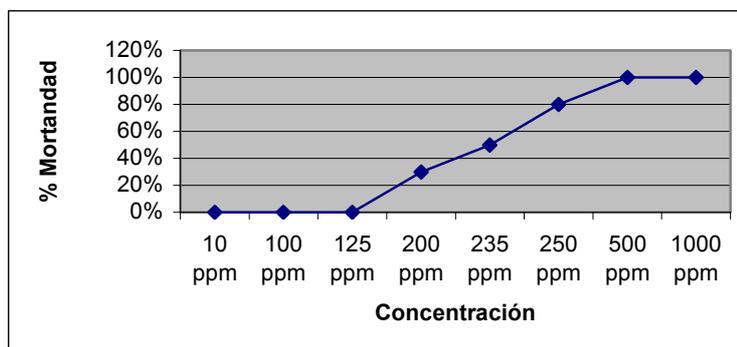


Figura 9. Curva de toxicidad con trióxido de cromo (CrO₃) en adultos de pez cebra

Por lo tanto, el parámetro para obtener las dosis subtóxicas con CrO₃ en huevos, fue la concentración letal 50 en adultos (235 ppm), a partir de la cual, se utilizó como la concentración más alta para determinar la concentración letal 50 en huevos siendo 50 ppm (Figura 10).

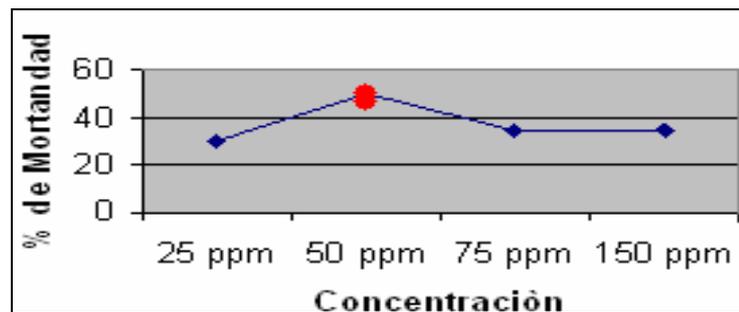


Figura 10. Concentración letal 50 de trióxido de cromo en huevos de *Danio rerio*

2.- Cloruro de mercurio HgCl₂

Como se puede observar en la figura 11, se determinó que la concentración letal 50 de cloruro de mercurio (HgCl₂) se registró a una concentración de 0.5 ppm en huevos.

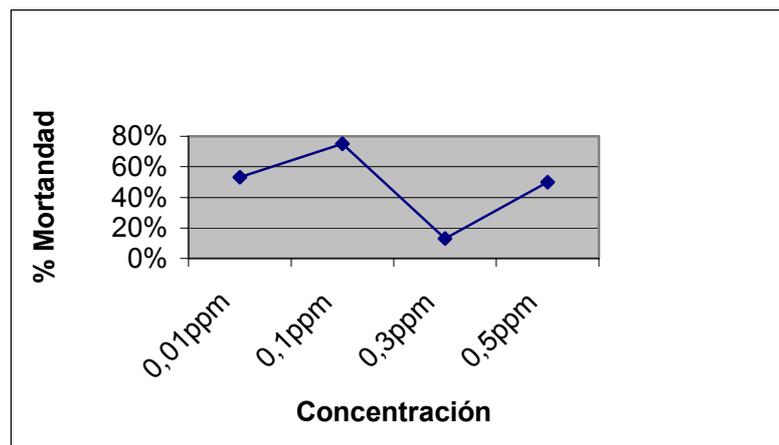


Figura 11. Concentración letal 50 de cloruro de mercurio en huevos de *Danio rerio*

5.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO TERATOGENICO

1.- Trióxido de cromo CrO₃

Partiendo de la concentración letal 50 (50 ppm) en huevos, se procedió a montar los lotes experimentales con tres dosis subtóxicas 12.5, 25 y 50 ppm, correspondientes a las concentraciones letales 12.5, 25 y 50 respectivamente, como se mencionó en el procedimiento experimental, cada tratamiento se llevó hasta completar 180 huevos por concentración y un control. Al no registrarse ninguna malformación inducida por el trióxido de cromo, se puede deducir que éste es inocuo para este bioensayo, para las concentraciones de 12.5, 25 y 50 ppm en la inducción de daño teratogénico. Cabe mencionar que a concentraciones mayores a 50 ppm, se registró un efecto letal, el cual encubre cualquier otro efecto secundario que pudiera manifestarse.

2.- Cloruro de mercurio HgCl₂

Al igual que con el compuesto anterior, se partió de la concentración letal 50 (50 ppm) determinada en huevos con CrO₃ para establecer la concentración letal 50 (0.5 ppm) con HgCl₂, posteriormente se procedió a montar los lotes experimentales con tres dosis subtóxicas 0.1, 0.3 y 0.5 ppm, correspondientes a las concentraciones letales 12.5, 25 y 50 respectivamente. Como se mencionó en el procedimiento experimental, cada tratamiento se llevó hasta completar 180 huevos por concentración y un control, las cuales presentaron una gama de malformaciones en columna vertebral al igual que, en todas las concentraciones evaluadas desde la curva de toxicidad (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y

1 ppm), siendo estadísticamente significativa la inducción de éstas, lo que lleva a aceptar la hipótesis alternativa (H_a), después de realizar la prueba de Kruskal-Wallis, comprobándose que al menos a las concentraciones evaluadas con cloruro de mercurio ($HgCl_2$) es capaz de inducir un efecto teratógeno a nivel del desarrollo de la columna vertebral. El registro positivo de ésta prueba, se realizó la prueba de Dunnett, obteniendo como resultado que sólo las malformaciones múltiples, espiral y aleta caudal no presentan diferencia significativa con respecto al control (Tabla 8).

Por otro lado, no se registró en éstas concentraciones y con este tamaño de muestra, ninguna malformación en opérculo ni aletas, lo que no excluye algún efecto teratógeno por éste compuesto.

Tabla 8. Malformaciones presentes en Danio rerio por concentración de HgCl₂

[] en ppm.	No. De peces utilizados por ()	MALFORMACIONES EN COLUMNA VERTEBRAL							Alteración de Pigmento (#) y %	Malf. en Sist. Óseo (#) y %
		Senc. (#) y %	Dob. (#) y %	Mult. (#) y %	Curv. (#) y %	Espiral (#) y %	Aleta Caudal (#) y %	Ganch o (#) y %		
0.1 Cl _{12.5}	180	(20) 11.1 1%(+)	0 % (i)	0 % (i)	(9) 5 % (+)	(1) 0.5 % (-)	(1) 0.5 % (-)	(12) 16.6 % (+)	(6) 3.3 % (+)	(13) 7.2 % (+)
0.2	180	(8) 4.4 % (-)	(3) 1.6 % (+)	0 % (-)	(12) 6.6 % (+)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	(3) 1.6 % (-)
0.3 Cl ₂₅	180	(12) 6.6 % (+)	0 % (i)	0 % (-)	(10) 5.5 % (+)	0 % (-)	(4) 2.2 % (-)	(15) 1.5 % (+)	0 % (-)	(7) 3.8 % (-)
0.4	180	(2) 1.1 % (-)	0 % (i)	(2) 1.1 % (-)	(3) 1.6 % (-)	0 % (-)	(2) 1.1 % (-)	(2) 1.1 % (-)	0 % (-)	(8) 4.4 % (-)
0.5 Cl ₅₀	180	(6) 3.3 % (-)	0 % (i)	(2) 1.1 % (-)	(6) 33.3 % (-)	0 % (-)	(3) 1.6 % (-)	(3) 1.6 % (-)	0 % (-)	(6) 3.3 % (-)
0.6	180	(3) 1.6 % (-)	0 % (i)	0 % (-)	(3) 1.6 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	(15) 8.3 % (+)
0.7	180	(2) 1.1 % (-)	0 % (i)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	(7) 3.8 % (-)
0.8	180	(3) 1.6 % (-)	0 % (i)	0 % (-)	(2) 1.1% (-)	0 % (-)	(3) 1.6 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	(4) 2.2 % (-)
control	180	0 % (i)	0 % (i)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)	0 % (-)

Prueba de Dunnett: (+) = positivo, (-) = negativo, (i) = Indeterminado Nivel de probabilidad: alfa = beta = 0.05
Senc. = sencilla, dob. = doble, mult. = múltiple y curv. = curva

Para llevar a cabo una mejor identificación de las malformaciones presentes en el pez cebra, se realizó una división imaginaria del cuerpo en tres zonas: cefálica, zona media de la columna vertebral y caudal. La zona cefálica comprende el inicio de la cabeza hasta el final de la máxima prolongación del vitelo, la zona media de la columna vertebral empieza desde el vitelo reducido,

hasta un tercio de la columna y la zona caudal se localiza en la cuarta parte de la columna hasta el final de la aleta caudal (Figura 12).



Fig.12. División de malformaciones por zonas del cuerpo de *Danio rerio*

El registro de las malformaciones no se presentó igual, su expresión vario de dos formas: dorsal o lateral; así mismo, las malformaciones fueron tenues o pronunciadas, donde la primera fue poco evidente menos de 45° y la segunda se identificó con mayor facilidad debido a que presentó un ángulo mayor de 46° . Por otro lado, la frecuencia de aparición de cada malformación se clasificó en baja, media y alta frecuencia, de acuerdo a su porcentaje de aparición (Tabla 9).

Tabla 9. Parámetro de frecuencias de malformaciones en *Danio rerio*

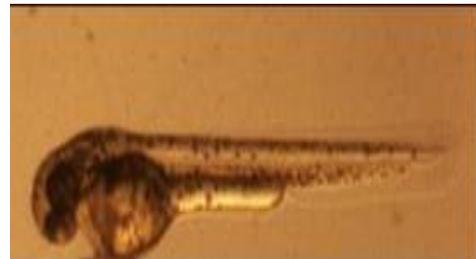
FRECUENCIA	PORCENTAJE DE APARICIÓN
FRECUENCIA BAJA	1 a 20 %
FRECUENCIA MEDIA	21 a 50 %
FRECUENCIA ALTA	51 a 100 %

En cuanto a la diversidad de malformaciones en columna vertebral registradas, se clasificaron bajo los siguientes criterios:

La malformación sencilla (Senc.), es aquella que presentó un solo doblez en la zona cefálica, zona caudal del pez y/o zona media de la columna vertebral, ya sea lateral o dorsal, existiendo una malformación tenue y/o muy pronunciada, con una frecuencia de aparición alta (Figura 13).



(a)



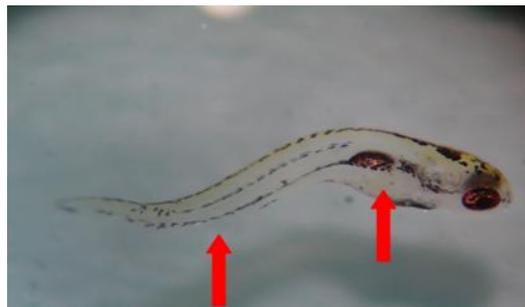
(b)

Fig. 13. (a) Malformación sencilla, en la zona cefálica en forma lateral, (b) Posición normal de la columna con respecto a la cabeza en *Danio rerio*

Malformación doble (Dob.), es aquella que presentó dos dobleces, uno en la zona media de la columna vertebral y otro en la zona caudal del pez. Puede ser lateral o dorsal, existiendo al igual que en el anterior, una variabilidad de tenues a pronunciadas, con una frecuencia de aparición baja (Figura 14).



(a)



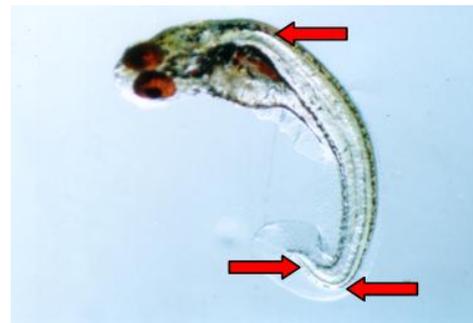
(b)

Fig. 14. (a) Posición normal de la columna vertebral en *Danio rerio*, (b) Malformación doble en la zona media de la columna vertebral y en la zona caudal

Malformación múltiple (Mult.), es aquella que presentó tres o más dobleces en la zona cefálica, zona caudal y zona media de la columna vertebral, puede ser lateral, dorsal, tenue o pronunciada, con una frecuencia baja (Figura 15).



(a)



(b)

Fig. 15. (a) Posición normal de la columna vertebral en *Danio rerio*, (b) Malformación en zona cefálica lateral y zona caudal dorsal

Malformación curva (Curv.), como su nombre lo dice, presentó una curvatura en la zona cefálica, zona caudal del pez o zona media de la columna vertebral. Puede ser lateral, relativamente frecuente en comparación de las anteriores y provoca que los alevines naden en círculo, presentándose con una frecuencia de aparición media (Figura 16).



(a)



(b)

Fig. 16. (a) Malformaciones curvas en la zona media de la columna vertebral (b) Columna vertebral de *Danio rerio* en posición normal

Malformación en espiral como su nombre lo indica, se presenta a lo largo de la zona caudal, en forma espiral, se registró en baja frecuencia con respecto a la malformación doble y ésta malformación es poco viable (Figura 17).



(a)



(b)

Fig. 17. (a) Columna vertebral de *Danio rerio* en posición normal, (b) Malformación en zona caudal en espiral

Malformación en aleta caudal del pez cebra, consiste en un pequeño doblez en la zona caudal, con una baja frecuencia de aparición (Figura 18).



(a)



(b)

Fig. 18. (a) Columna vertebral de *Danio rerio* en posición normal, (b) Malformaciones en zona caudal muy pronunciada

Malformación en gancho ésta malformación se puede observar en la zona media de la columna vertebral o bien, en la zona caudal, presentando una frecuencia de aparición media (Figura 19).



(a)



(b)



(c)

Fig. 19. (a) Columna vertebral de *Danio rerio* en posición normal, (b-c) Malformaciones en gancho en la zona media de la columna vertebral y en la zona caudal

Otra de las alteraciones registradas en biomarcadores no propuestos o considerados, como parte de éste estudio es la ausencia de melanocitos (pigmentación) (Figura 20), donde ésta alteración se presentó en una baja frecuencia de aparición, otra de las alteraciones registradas fue en el sistema

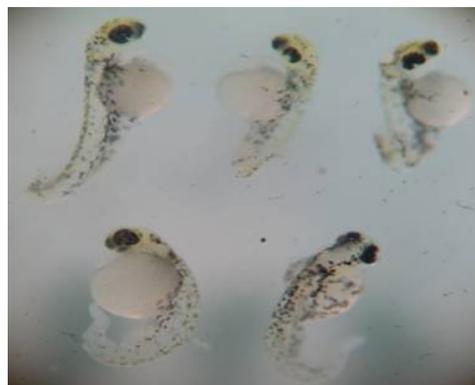
óseo llamado enanismo, con una frecuencia alta de aparición (Figura 21), el cual ésta asociado con un efecto letal para cada ejemplar que presentó éste tipo de malformación.



Fig. 20. Ausencia de melanocitos en peces de *Danio rerio* con enanismo



(a)



(b)

Fig. 21. (a) Columna vertebral de *Danio rerio* en posición normal, (b) Malformaciones en el sistema óseo

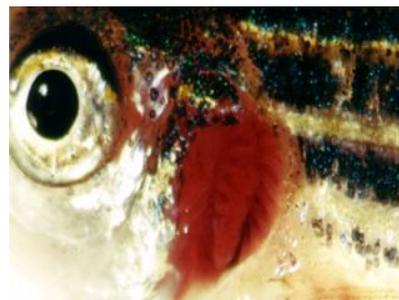
5.6. MALFORMACIONES ESPONTÁNEAS

Independientemente que la selección de los tres biomarcadores antes mencionados (columna vertebral, opérculo y aleta) se registraron, malformaciones espontáneas que aparecieron durante el desarrollo del presente trabajo con los mismos criterios, sustentado en la hipótesis de que cualquiera de las malformaciones que se presente en nuestro organismo experimental pueden ser sujetas a evaluarse para determinar su sensibilidad como biomarcador para la calidad ambiental.

Debido a esto, dentro de los lotes de mantenimiento del pez cebra, previos a la exposición de HgCl_2 , se pudo observar un daño espontáneo en las siguientes estructuras de su cuerpo: opérculo (Figura 22), ausencia de mandíbula (Figura 23) y daño en la columna vertebral (Figura 24); ésta última, se presentó con un grado muy ligero de alteración, poco evidente, en el patrón de pigmentación de las bandas laterales de los ejemplares.



(a)



(b)

**Fig. 22. (a) Posición normal del opérculo en *Danio rerio*,
(b) Ausencia de opérculo**



(a)



(b)

**Fig. 23. (a) Posición normal de la mandíbula del *Danio rerio*,
(b) Ausencia de la misma**



(a)



(b)

**Fig. 24. (a) Patrón normal con bandas longitudinales de *Danio rerio*,
(b) patrón anormal de bandas longitudinales**

Bajo los criterios de exclusión, estos ejemplares fueron eliminados y no contemplados para la etapa experimental, debido a que la frecuencia de aparición de estas malformaciones fue muy baja. En caso de que se hubiera obtenido una frecuencia alta de malformaciones espontáneas previas al experimento, se eliminaría por completo el lote adquirido. Esto permitió asumir que las malformaciones pueden estar asociadas a una endogamia o bien a que estos embriones fueron ovopositados por padres viejos (más de un año de vida).

6. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo, fue determinar la frecuencia de malformaciones en columna vertebral, opérculo y aleta de *Danio rerio*, como posibles biomarcadores en la valoración de daño teratogénico por contaminantes ambientales. Ello implica un constante monitoreo de condiciones físicas y químicas del agua para mantener las condiciones favorables de sobrevivencia y reproducción.

La temperatura es un factor determinante en el desarrollo y viabilidad del pez. Ésta fue modificada experimentalmente de acuerdo a cada etapa de vida, en un intervalo de 24 a 28 °C, es decir, los peces de mantenimiento adultos hembras y machos se mantuvieron bajo ese intervalo, de acuerdo a González (2005), mientras que los peces en etapa reproductiva se mantuvieron a 28 °C para tener una mayor ovoposición y los alevines a una temperatura de 26 a 28 °C

El pez cebra es un bioensayo que ofrece varias ventajas sobre otros organismos. Por ejemplo: es un organismo acuático, el huevo presenta una permeabilidad selectiva, cuenta con biomarcadores fáciles de evaluar y se puede inducir las ovoposiciones, entre otras (Weinberg, 1992; Kimmel y col., 1995 y Galicia y col., 1998).

Para evaluar daño teratogénico durante cualquier etapa del desarrollo embrionario, el cual se utiliza recientemente para apoyar estudios de ecotoxicología en donde el uso de éste organismo ha evolucionado, en varias

metodologías utilizando diversos biomarcadores como son ojo, corazón, columna vertebral y cabeza entre otros, que, en conjunto, han permitido culminar recientemente en el proceso de validación de la prueba denominada “*Danio rerio* Teratology Assay” (DarTa), la cual evalúa el daño teratogénico inducido en embriones de pez cebra (Dietrich y col., 1998, Oberemm, 2000 y Nagel, 2002).

Se utilizaron dos teratógenos de referencia trióxido de cromo y cloruro de mercurio, el primero de ellos no presentó sensibilidad alguna, el segundo fue capaz de inducir malformaciones en columna vertebral y no en aleta y opérculo del pez cebra.

Por lo tanto, dentro de los biomarcadores evaluados, la columna tuvo una mayor frecuencia, estadísticamente significativa, además de que presentó varias ventajas de análisis, registro y diversidad con respecto a los otros dos biomarcadores.

Entre las ventajas más sobresalientes para utilizar a la columna vertebral como el mejor biomarcador destacan las siguientes:

Permite evaluar malformaciones presentes en estadios previos y posteriores a la eclosión del desarrollo embrionario (Galicia y col., 1998).

De los tres biomarcadores propuestos sólo en la columna vertebral se lograron realizar observaciones en el desarrollo embrionario gracias a que el corion tiene una cubierta delgada y transparente, hasta que se lleve a cabo el proceso de eclosión (Galicia y col., 1998).

Permite evaluar una gran diversidad de malformaciones, analizando mecanismos de acción de los agentes químicos que se exponen del organismo.

En las tres concentraciones subtóxicas 0.1, 0.3 y 0.5 ppm de cloruro de mercurio, se encontró malformaciones de siete formas diferentes en la columna vertebral, con alta frecuencia de aparición. Esto permitió un registro eficiente, sin embargo, en los biomarcadores propuestos opérculo y aleta no se logró inducir a través del compuesto cloruro de mercurio alguna malformación, solo fueron evidentes de manera espontánea en el lote de mantenimiento. Estas estructuras son de difícil análisis debido a que en el opérculo solo se puede realizar observaciones después de 4 semanas y en cuanto a las aletas son translúcidas y no se distingue claramente. Por lo anterior, se sugiere utilizar una variable del pez cebra llamado cola de velo, en experimentos posteriores para, ver si con este biomarcador es más fácil expresar alguna malformación.

En el caso de la aleta y opérculo, el análisis debe esperar hasta una etapa juvenil, debido a que existe mortandad natural en los alevines recién eclosionados que llegan a la etapa juvenil, lo que implica tener que aumentar el tamaño de muestra, aunado esto, a su baja frecuencia de expresión y a su difícil identificación.

Por otra parte, en éste trabajo se evaluaron alevines recién eclosionados, mientras que en otros trabajos tales como el de Dietrich y col., (1998) se han empleado embriones no descorionizados.

Las ventajas de utilizar alevines recién eclosionados permite describir puntualmente las malformaciones presentes de columna vertebral debido a que es la estructura que primero se identifica y es más fácil de evaluar, en comparación con la aleta y el opérculo, debido a que dichas estructuras se podrían evaluar solo hasta una etapa juvenil, lo que da una ventaja considerable a la columna vertebral con respecto al tiempo para realizar una evaluación biológica de las alteraciones provocadas por el teratógeno utilizado, permitirán de la misma forma profundizar en los diferentes mecanismos de acción de agentes xenobióticos.

7. CONCLUSIÓN

En este trabajo, se dio el establecimiento de las condiciones físicas y químicas por cada una de las etapas del desarrollo embrionario para el mantenimiento y su reproducción de las fases experimentales.

Otro de los alcances del presente trabajo es que *Danio rerio* presenta ventajas para evaluar daño toxicológico en un organismo no mamífero.

En cuanto a la evaluación de los tres biomarcadores elegidos, la columna vertebral es sensible al cloruro de mercurio a dosis subtóxicas manifestándose una gran diversidad de malformaciones y diferentes frecuencias de expresión.

Las ventajas presentes en la evaluación de malformaciones en columna vertebral de organismos recién eclosionados, en comparación, con estudios previos en organismos no eclosionados es evidente, dando apertura al desarrollo de trabajos posteriores, permitiendo también, tener mayor sensibilidad debido a que se pueden evaluar de esta forma malformaciones pequeñas, múltiples y con más diversidad.

Se requiere continuar validando el bioensayo y los biomarcadores propuestos, así como otros no contemplados, con distintos teratógenos de referencia, para encontrar un mejor biomarcador que sea sensible a diferentes compuestos químicos, que sea fácil de identificar y de evaluar, y que refleje mecanismos de acción de los agentes contaminantes y, por lo tanto, de la calidad ambiental.

Utilizar el *Danio rerio* como un buen indicador trae diversas ventajas debido a que: evalúa sistemas acuáticos, sus estructuras pueden ser utilizadas como biomarcadores y al organismo como un bioensayo, su mantenimiento es sumamente económico; así mismo, presenta una descendencia abundante, ovoposiciones inducibles y por lo tanto se pueden programar o calendarizar cada ovoposición. Los huevos son manipulables, transparentes y semipermeables, esto último permite que no exista manipulación al aplicar un compuesto.

8. GLOSARIO

ABSORCIÓN: Es cuando una sustancia xenobiótica atraviesa las membranas biológicas dependiendo de su concentración, de sus propiedades físicas y químicas de la sustancia. Por ejemplo la solubilidad, el tamaño de la partícula, si son o no ionizadas y las eficiencias de los mecanismos de absorción, metabolismo y excreción, pueden variar de un organismo a otro y afectar el proceso de absorción (Vega, 1985a).

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, 1985b).

AGENTES EXÓGENOS: Que resulta o procede de materiales externos al organismo (Vettorazzi, 1992b).

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, 1985a).

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 y col., 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 cualitativo (Markert y col., 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 y col., 1995).

BIOTRANSFORMACIÓN: Cualquier transformación química de una sustancia en el interior de un organismo a través de un proceso biológico (Vega, 1985b).

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

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

CARCINÓGENO: 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 blastocisto y su implantación en el útero (Kimmel y col., 1995).

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

CL₅₀: 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, 1985c).

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 pez cebra (*Brachydanio rerio*) para detectar efectos nocivos por sustancias xenobióticas (Nagel, 2002).

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

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

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, 1985b).

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

ECLOSIÓN: nacimiento del alevín del saco (Kimmel y col., 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).

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

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

EMBRIÓN: Producto de la concepción, desde el momento de la implantación del óvulo fertilizado hasta el final de la semana séptima u octava en que pasa a denominarse feto (Kimmel y col., 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 y col., 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 (Fernícola, 1992a).

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 (Fernícola, 1992a).

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, 1992b).

EXCRECIÓN: Es el proceso de eliminación del producto original y/o de sus metabolitos del cuerpo, mediante vías urinarias, sudoración, lagrimeo, leche materna e intestinal (Vega, 1985a).

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, 1985b).

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, 1985 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, 1985b).

FARÍNGULA: Etapa del desarrollo embrionario que se caracteriza por la formación del aparato digestivo (Kimmel y col., 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 y col., 1995).

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

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

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

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).

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 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, 1985c).

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 Commings, 1998).

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).

OVOPÒSICIÓN: En peces corresponde a la expulsión de las ovas (huevos) por parte de la hembra (kimmel y col., 1995).

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

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, 1992c).

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).

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

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

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

9. BIBLIOGRAFÍA

Aqua Guía, (2004) *Danios y Brachydanios*. Ed. Antártica. México. Dir. Gral. Raúl Tawil Abadi Dir. C. Editorial M.V.Z. Carlos Ortiz Guzmán. 24 pp.

Báez-Ramírez, O. A., y F. Prieto-García. (2005). Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapán, Hidalgo, México. *Mutagenesis* **20**:291-295.

Báez-Ramírez, O. A., y F. Prieto-García, y C. A. Galán-Vidal. (2004). Bioacumulación y Daño genotóxico en pez cebra (*Danio rerio*) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo (México). *Ensayos en cortos plazos. AquaTIC* **21**:62-70

Brailowsky, S. (1995). Las sustancias de los sueños: Neuropsicofarmacología. Ed. Omega. México, D. F. 280 pp.

Butterwort, F. (1995). Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Enviromental Change. Plenum Prees. New York. 313 pp.

Canavos, G. (1988). Probabilidad y estadística. Ed. Mc. Graw Hill. México. 651 pp.

Canter, L. (1986). *Environmental Health Impact Assessment*. México: PAHO/WHO. 345 pp.

Cantú, M. (2000). Toxicología. *Revista Salud Pública y Nutrición (FASPYN)*. Monterrey, Nuevo León. México. 1 (2): 1-8

De la Lanza, E. G., Hernández, P. S. y Carvajal, P. L. (2000). Organismos Indicadores de la Calidad del Agua y de la Contaminación (Bioindicadores) Ed. Secretaria de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. SEMARNAP. p. 9-15

Dietrich, D., Prietz, A. y Kiamos, M. (1998). *Danio rerio* embryotoxicity and teratogenicity assay (DRETA) for detecting waterborne embryo-toxicants and teratogens. *Toxicologist* 42: 259-260.

Fernícola, G. (1992a). Evaluación de Riesgo. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud. Metepec, México. p. 23-30.

Fernícola, G. (1992b). Evaluación Biológica de la Exposición Humana en: Toxicología Prospectiva y Seguridad Química: Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (PISSQ/PNUMA-OIT-OMS). Reyes, F. y A. Waldemar. Ed. ECO. México. p. 23-34

Fernícola, G. (1992c) Nociones Básicas de Toxicología. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud. Metepec, México. 113 pp.

Figuroa G. y Pinzón, N. S. (2000). Evaluación de la calidad del agua utilizando macroinvertebrados bénticos en la zona de Atlixco, Puebla. Tesis profesional para obtener el título de licenciatura en Biología, especialidad en ecología. Universidad de las Américas, Puebla. Escuela de Ciencias, departamento de química y biología. México. 122 pp.

Froese, R. y Paulv, D. (2006) FishBase. Word wide web electronic publication. www.fishbase.org. version (02/2006).

Galicia, L., Gaytán J. C., Pérez M. E., Olvera H. Y Ramos, P. (1998). Avances de la calibración para evaluar el daño teratogénico por contaminantes ambientales en pez cebra (*Brachydanio rerio*). III Congreso Nacional Estudiantil de Toxicología Genética. Toluca Edo. México. 3-6 Mayo. Res. 28 pp.

Galvão, C. y Corey, G. (1987) Serie vigilancia 7: Mercurio. Centro Panamericano de Ecología Humana y salud. Metepec, México. 79 pp.

González, A. J. (1998) Los efectos biológicos de las dosis bajas de radiación ionizante. Edición N° 15 Marzo. Ed. Seguridad Radiológica, Madrid. 364 pp.

González, L. L. (2005). Evaluación del efecto del cloruro de mercurio (HgCl_2) en la inducción de malformaciones de columna vertebral del pez cebra (*Danio rerio*; Hamilton 1822) durante diferentes etapas del desarrollo embrionario. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Gong, Z., H. Wan, T. L. Tay, H. Wang, M. Chen, y T. Yan. (2003). Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **308**:58-63.

Guzmán, D. (1997). Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales como prueba para detectar exposición crónica al arsénico. Tesis profesional para obtener el Grado de Maestría (Biología). UNAM. México. 227 pp.

Hoüillon, C. (1977). Embriología. Ed. Omega. Barcelona. 184 pp.

Holdgate, M. W. (1979). A perspective of environmental pollution. UK: Cambridge University Press. 214 pp.

Hughes, W. (1996). Essentials of Environmental Toxicology; The Effects of Environmentally Hazardous Substances on Human Health. Ed. Taylor & Francis. California, EUA. 176 pp.

Kimmel, C. B., Balla, W.W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. y Schilling, T. S. (1995). Stage of embryonic developmental of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. 203:253-310.

Klug, W. y Cummings, M. (1998). Conceptos de Genética. Ed. Prentice Hall. España. 814 pp.

Lewtas, J. (2000). Environmental Monitoring Using Genetic Bioassays. in: Genetic Toxicology. Ed, CRC. Florida, EUA. p. 359 – 374.

Markert, B., Ochlmann, J. y Roth, M. (1995). General Aspects of Heavy Metal Monitoring by Plants and Animals en: *Environmental Biomonitoring: Exposure Assessment and Specimen Banking*. Subramanian, K y G. Iyengar. Ed. American Chemical Society. Washington. EUA. p. 19-29.

Nagel, R. (2002). DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19:38-48.

Nom–(1996). Norma Oficial Mexicana Nom-001. ECOL. Calidad de agua. Limites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el lunes 6 de enero de 1996.

- Oberemm, A.** (2000). The use of a refined zebrafish embryo bioassay for the assessment of aquatic toxicity. *Lab Animal*. 29 (7):32-40.
- Odum, E. P.** (1995). *Ecología: El vínculo entre las ciencias naturales y las sociales*. Ed. CECOSA. México. 295 pp.
- Peña, P. y Subarzo, P.** (1975). *La contaminación por mercurio*. Tesis profesional. México, Facultad de Ciencias, UNAM. 94 pp.
- Peña, E. C., Carter, E. y Ayala-Fierro, A.** (2001). *Toxicología ambiental: evaluación del riesgo y restauración ambiental*. The University of Arizona, Center For Toxicology. Superfound. 37 pp.
- Ronal, W. y Myers R.** (1999). Probabilidad y estadística para ingenieros. Ed. Prentice – Hill, Hispanoamericana S. A. México. 739 pp.
- Silano, V.** (1985). *Evaluación de riesgo para la salud pública asociados con accidentes causados por agentes químicos*; Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud ECO/OPS, México, 120 pp.
- Sokal, R. y Rohlf, J.** (1999). Introducción a la bioestadística. Ed. Reverté S. A. España. 362 pp.
- Sohn, J.** (1994). *Tropical Fish Hobbgist: Development of the fish embryo*. Vol. XLII, p.70-75
- Trimbell, J.** (1989). *Introduction to toxicology*. Taylor & Francis Inc. p. 94-110.

Vega, S. G. (1985a). Toxicología 111: Aspectos específicos de la toxicología de algunos contaminantes. Ed. Centro panamericano de ecología humana y salud. México. 198 pp.

Vega, S. G. (1985b). Toxicología VI: Evaluación del riesgo en la exposición a sustancias tóxicas en: Evaluación Epidemiológica de Riesgos Causados por Agentes Químicos Ambientales. Ed. Centro panamericano de ecología humana y salud. México. 18 pp.

Vega, S. G. (1985c). Toxicología V: Genotoxicidad y daño al sistema reproductor. Ed. Centro panamericano de ecología humana y salud. México. 47 pp.

Vega, S. G. (1985d). Toxicología I: Cinética y efectos de los contaminantes tóxicos del ambiente. Ed. ECO. México, D.F. 133 pp.

Vera, G., Tam, J., Vera, V. y Pinto, E. (2001). Pruebas ecotoxicológicas con cadmio y cromo usando postlarvas del pejerrey *Odontesthes (Austromeniidae) regina regina* Hildebrand. Facultad de Ciencia Biológicas UNMSM. 8(2):1-9

Vettorazzi, G. (1992a). Toxicología Prospectiva: base lógica, manera de abordar y aplicaciones prácticas en: Toxicología Prospectiva y Seguridad Química: Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (PISSQ/PNUMA-OIT-OMS). Reyes, F. y A. Waldemar. Ed. ECO. México. p. 9-21

Vettorazzi, G. (1992b). Xenobiotic substances harmonization of toxicological conclusions. en: Toxicología Prospectiva y Seguridad Química: Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (PISSQ/PNUMA-OIT-OMS). Reyes, F. y Waldemar, A. Ed. ECO. México. p. 97-105

Weinberg, E. S. (1992). Analysis of early development in the zebra fish embryo. *Results. Prob. Cell. Dif.* 18:91-150

Westerfield, M. (1995). El libro de zebrafish: Una guía para el uso del laboratorio del río de *Danio* del zebrafish (*Brachydanio*). Instituto de la neurología. Universidad de Oregon.