



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO  
DE HIDALGO**

---

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**"ESTUDIO DE DAÑOS GENOTÓXICOS Y  
TERATOGENICOS EN PEZ CEBRA  
(*Danio rerio* Hamilton, 1822) POR ACUMULACIÓN  
DEL NIVEL DE ARSÉNICO PRESENTE EN EL AGUA  
DE ZIMAPÁN, HIDALGO"**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN QUÍMICA**

PRESENTA

***OLIVERIA ARACELI BAÉZ RAMÍREZ***

DIRECTOR: DR. FRANCISCO PRIETO GARCÍA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Pruebas del Centro de Investigaciones Químicas, en el Laboratorio de Genética del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, y en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Hidalgo.

Los resultados de esta tesis se presentaron en los siguientes foros científicos:

- X Congreso Nacional y VI internacional de Ciencias Básicas de la ANQA. 8-10 Junio 2005. Chetumal, Quintana Roo, México.
- Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética. 3-7 Octubre 2005. San Miguel Regla, Hidalgo, México.

Parte de los resultados de este trabajo fueron publicados en las siguientes revistas:

1) BIOACUMULACIÓN Y DAÑOS GENOTÓXICOS EN PEZ CEBRA (*Danio rerio*) POR ARSÉNICO EN AGUAS DE ZIMAPÁN, HIDALGO (MÉXICO). ENSAYOS EN CORTOS PLAZOS.

AUTORES: Oliveria A. Baez Ramírez, Francisco Prieto Garda; Carlos A. Galán Vidal.

REVISTA: AquaTIC, No. 21, p. 62-70.2004. España.

2) GENOTOXIC DAMAGE IN ZEBRA FISH (*Danio rerio*) BY ARSENIC IN WATERS FROM ZIMAPÁN, HIDALGO, MÉXICO.

AUTORES: Oliveria A. Baez Ramírez and Francisco Prieto García.

REVISTA: Mutagenesis, Vol. 20, No. 4, p. 291-295.2005. Inglaterra.

## ***DEDICATORIAS***

Dedico esta tesis a:

Mi querida hija Ana Laura Bello Baez, por ser el mayor de mis motivos para la superación.

Mi difunto padre, el Sr. Francisco Baez Jiménez, por su gran esfuerzo y apoyo para el bienestar de sus hijos, quién si aún viviera estaría muy feliz por el logro de su hija.

Mi amada madre, la Sra. Juana Luz Ramírez Ramírez, por su dedicación, sacrificios, apoyo y amor, para educarme y guiarme por la senda del bien y del éxito.

Mis hermanos, María Eugenia, Ivonne Esperanza, Miguel Ángel y Leticia, por ser los mejores hermanos del mundo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi eterno agradecimiento a:

Dr. Francisco Prieto García, por su apoyo y asesoría.

Dra. Armida Zúñiga Estrada y Laboratorio Estatal de Salud Pública de Hidalgo, por su gran colaboración para que se realizaran análisis fisicoquímicos y microbiológicos en dicho centro de trabajo.

Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún, por su invaluable cooperación para realizar los estudios biológicos en el Laboratorio de Genética del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH.

Mi jurado de tesis, por sus sabias sugerencias y correcciones para mejorar este trabajo.

Javier Serna Medero por su apoyo para hacer los muestreos del agua, así como por su compañía.

<b>N°</b>	<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
	ÍNDICE	i
	ÍNDICE DE CUADROS	v
	ÍNDICE DE FIGURAS	vi
I	GLOSARIO DE TÉRMINOS	1
II	LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS	3
III	RESUMEN	5
IV	ABSTRACT	6
V	INTRODUCCIÓN	7
VI	ANTECEDENTES	8
VI.1.	Industrias que liberan arsénico y compuestos.	8
VI.2.	Ciclo biogeoquímico del arsénico.	9
VI.3.	Contaminación por arsénico de las fuentes subterráneas naturales de agua potable De Zimapán.	10
VI.4.	Toxicinética.	16
VI.5.	Mecanismos de toxicidad.	19

<b>No.</b>	<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
VI.6.	Toxicidad crónica.	20
VI.7.	El arsénico en organismos acuáticos.	21
VI.8.	Genotoxicidad.	26
VI.9.	Teratogénesis.	27
VI. 10	La teratogénesis en el pez cebra.	28
VI. 11	Los biomarcadores y los peces como biomonitores.	31
Vii.	HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	36
VII.1.	Hipótesis.	36
VII.2.	Justificación.	36
VII.3.	Objetivos.	37
VII.3.1.	Objetivo general.	37
VII.3.2.	Objetivos específicos.	38
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
VIII. 1.	Caracterización microbiológica y fisicoquímica de las aguas de los pozos del estudio.	39
VIII.2.	Exposición de <i>Danio rerío</i> arseniato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).	41

<b>No.</b>	<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
VIII.3.	Genotoxicidad.	43
VIII.4.	Teratogénesis.	44
IX.	RESULTADOS.	46
IX.1.	Caracterización del agua de los pozos APZ5 y APUAEH.	46
IX.2.	Evaluación de la bioconcentración del arsénico en <i>Danio rerio</i> .	48
IX.3.	Genotoxicidad.	52
IX.4.	Desove, supervivencia y teratogénesis.	55
X.	DISCUSIÓN.	59
X.1.	Sobre la caracterización del agua de los pozos APZ5 y APUAEH.	59
X.2.	Sobre la evaluación de la bioconcentración del arsénico en <i>Danio rerio</i> .	64
X.3.	Sobre la genotoxicidad.	67
X.4.	Sobre el desove, la supervivencia y la teratogénesis.	70
XI.	CONCLUSIONES.	74
XII.	RECOMENDACIONES.	76
XIII.	BIBLIOGRAFÍA.	77

<b>No.</b>	<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
XIV.	ARTÍCULOS PUBLICADOS.	93
XIV. 1.	Bioacumulación y daños genotóxicos en pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo (México). Ensayos en cortos plazos.	93
XIV.2.	Genotoxic damage in zebra fish ( <i>Danio rerio</i> ) by arsenic in waters from Zimapán, Hidalgo, México.	93



## ÍNDICE DE CUADROS

## Página

CUADRO 1. Contenido de AS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> en muestras de jales de Zimapán, Hgo.	15
CUADRO 2. Precipitación promedio mensual en Zimapán, concentración de arsénico total, pH y temperatura en el agua del pozo "Zimapán 5".	15
CUADRO 3. Aplicaciones de la biología molecular en peces.	33
CUADRO 4. Características del pez cebra <i>{Danio rerio</i> como modelo para investigaciones en biología molecular de peces.	34
CUADRO 5. Promedio y coeficiente de variación de los análisis de caracterización del agua de los pozos APZ5 y APUAEH (Febrero 2003-Enero 2004).	47
CUADRO 6. Concentración de As promedio en muestras de aguas y peces sin branquias (en base seca) de los tratamientos negativo, APZ5 y positivo.	49
CUADRO 7. Frecuencia de micronúcleos promedio en células branquiales en función del tiempo.	54
CUADRO 8. Porcentaje de huevos no viables y viables, óvulos, eclosión, y de alevines recién eclosionados con malformación en columna ó prematuros, para los diferentes tratamientos.	55
CUADRO 9. Porcentaje de enanismo, malformación en columna y supervivencia en descendientes adultos, para los diferentes tratamientos.	57
CUADRO 10. Parámetros fisicoquímicos para la reproducción de la tilapia.	64

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

## **Página**

FIGURA 1. Naturaleza cíclica del metabolismo del arsénico en el ambiente.	10
FIGURA 2. Mapa de localizador) del pozo "Zimapán 5" (señalado con flecha roja), del distribuidor general de agua "potable" (señalado con flecha verde) y de otros pozos en la cabecera municipal de Zimapán, Hidalgo.	12
FIGURA 3. Biotransformación del arsénico inorgánico.	18
FIGURA 4. Ejemplos de mutaciones en pez cebra producidas por inyección de retrovirus.	29
FIGURA 5. Embriones de pez cebra 24 horas después de la fertilización y expuestos a As V.	31
FIGURA 6. Aspecto de peces cebra adultos en un acuario.	34
FIGURA 7. Esquema del desarrollo experimental.	42
FIGURA 8. Diagrama del procedimiento para teñir núcleos y micronúcleos.	44
FIGURA 9. Diagrama del estudio de teratogénesis.	45
FIGURA 10. Disminución de la concentración de As en el agua del control positivo en función del tiempo.	50
FIGURA 11. Disminución de la concentración de As en el APZ5 en función del tiempo.	51
FIGURA 12. Incremento de la concentración de As en peces del control positivo en función del tiempo	51
FIGURA 13. Incremento de la concentración de As en peces del APZ5 en función del tiempo.	52

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

## **Página**

FIGURA 14. Micronúcleos y otras anomalías nucleicas en células branquiales del pez cebra de los tratamientos APZ5 y positivo.	53
FIGURA 15. Cambios en la frecuencia de micronúcleos promedio en células de las branquias del pez cebra en función del tiempo.	54
FIGURA 16. a) Huevo no viable del control positivo (aumento 50X), b) Huevo no viable del tratamiento APZ5 (aumento 50X), y c) Huevos viables del control negativo (aumento 7X).	56
FIGURA 17. Alevines recién eclosionados expuestos al agua del pozo APZ5 con columna desviada (a, b y c).	57
FIGURA 18. Malformación en columna y posible tumoración (indicada con la flecha) de alevín expuesto al agua del control positivo.	57
FIGURA 19. Parte caudal de la columna vertebral de pez cebra en adultos de los tratamientos APZ5 y positivo.	58
FIGURA 20. Enanismo en pez adulto (a la izquierda) de los tratamientos APZ5 y positivo.	58
FIGURA 21. Diagrama de Piper para la clasificación de las aguas de pozo.	59

## ***I. GLOSARIO DE TÉRMINOS***

<b>TÉRMINO</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
Antropogénico	Aquello causado por el hombre.
Apoptosis	Muerte celular programada que se puede diferenciar porque se presenta una cromatina más condensada.
Bioconcentración	Acumulación de sustancias tóxicas en un organismo. Ocurre en el caso de las sustancias que después de ser absorbidas no son excretadas.
Carcinogénico	Agente químico, físico ó biológico que puede actuar sobre los tejidos vivos de tal forma que se produzca un neoplasma maligno.
Citotóxico	Dañino para las células.
Clastogénico	Aquel agente físico ó químico capaz de inducir aberraciones cromosómicas. Sustancia que causa ruptura cromosómica.
Genética	Ciencia biológica que estudia la variabilidad y la herencia de los seres vivos.
Genotóxico	Agente físico ó químico que daña a nivel genético.

Hiperqueratosis	Engrasamiento de la capa córnea de la piel ó de la epidermis.
Micronúcleos	Fragmentos cromosómicos ó cromosomas completos que no son incorporados en el núcleo hermano durante la división celular.
Mutagénico	Agente físico ó químico que induce mutaciones.
Teratas	Defectos congénitos y/o malformaciones permanentes causadas al organismo en desarrollo durante el período prenatal.
Teratogénico	Agente físico ó químico capaz de producir defectos congénitos y/o malformaciones permanentes al organismo en desarrollo durante el período prenatal, en dosis que no causan muerte a la madre. Estos defectos pueden causar aborto espontáneo.
Toxicología genética	Rama de la toxicología que identifica y analiza la acción de los agentes que a niveles subletales de exposición producen algún tipo de alteración en el material genético ó en sus componentes asociados.
Toxicinética	Es el estudio de la velocidad de cambio de la concentración de las especies tóxicas dentro de un organismo.

## **II. LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS**

<b>ABREVIATURA</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
10X	Aumento del microscopio óptico a 100 aumentos.
40X	Aumento del microscopio óptico a 400 aumentos.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
APUAEH	Agua del pozo de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
APZ5	Agua del pozo "Zimapán 5".
ATP	Adenosina trifosfato.
As	Arsénico.
°C	Grados Celsius.
CL <sub>50</sub>	Concentración letal 50.
CNA	Comisión Nacional del Agua.
CV	Coefficiente de variación.
DGG	Dirección General de Geografía.
DMA	Ácido dimetil arsínico.
Eh	Potencial redox.
FMNS	Frecuencia de micronúcleos.
GSH	Glutación reducido.
HO	Hemo-oxigenasa.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.
L/s	Litros por segundo.
mg/dL	Miligramos por decilitro.
mg/Kg	Miligramos por kilogramo

ABREVIATURA	DEFINICIÓN
mg/L	Miligramos por litro.
µg/kg	Microgramos por kilo,
µg/L	Microgramos por litro.
mm	Milímetros.
mM/L	Milimoles por litro.
MMAIII	Ácido monometil arsénico + 3.
MMA V	Ácido monometil arsénico + 5.
MNS	Micronúcleos.
µm	Micrometros.
µM	Micromolar.
mS/cm	MiliSiemens por centímetro.
ng	Nanogramos.
pb	Pares de bases.
pH	Potencial de hidrógeno.
WHO/FAO	World Health Organization/Food and Agriculture Organization.
TGI	Tracto gastrointestinal.

### **III. RESUMEN**

Se estudiaron los daños genotóxicos (inducción de micronúcleos en células de las branquias) y teratogénicos en el pez cebra (*Danio reno*), causados por la exposición a niveles subcrónicos de As en agua. Los peces se estudiaron en agua de un pozo de referencia y del pozo "Zimapán 5", el segundo con un contenido de As que varía de 395 a 630 µg/L. Para el estudio genotóxico los especímenes fueron observados durante 180 días en 3 lotes separados con 55 animales/lote: uno con agua del pozo de referencia (control negativo), otro con el agua de referencia adicionada con 5000 µg As V/L (control positivo), y otro con agua del pozo "Zimapán 5". En las aguas se obtuvo una disminución de la concentración de As con el tiempo, mientras que en los peces hubo un incremento. Después de 30 días hubo un decremento del As en el agua del control positivo de 1092.65 µg/L, mientras que en los peces hubo un aumento de 523.81 µg/L. Para el agua del pozo "Zimapán 5" el As se redujo a 211.40 µg/L, y en los peces hubo un incremento de 74.73 µg/L. Al final de los 180 días en las células branquiales de los ejemplares del control negativo hubo una inducción natural de 0.8 micronúcleos/1000 células, mientras que en el control positivo y en los peces expuestos con agua de Zimapán la frecuencia fue 163.5 y 56.25 veces mayor, respectivamente.

Para el estudio de teratogénesis se montaron 3 tratamientos iguales a los mencionados (negativo, positivo y "Zimapán 5") pero con una hembra y un macho en apareamiento en cada uno para obtener crías; resultando que a mayor concentración de As en el agua mayor porcentaje de huevos no viables y óvulos, menor eclosión y mayor tiempo para eclosionar, mayor porcentaje de alevines recién eclosionados con columna deforme ó prematuros así como de adultos con deformaciones en la columna y enanismo, y menor porcentaje de adultos supervivientes. Estos resultados demuestran la genotoxicidad y teratogénesis del As en *Danio reno* a concentraciones subcrónicas como en las aguas de pozo.



#### **IV. ABSTRACT**

Genotoxic (induction of micronuclei in cells from the gills) and teratogenic damages in zebra fish (*Danio rerio*), caused by exposure to subchronic levels of As in water were studied. Fish were maintained in water from a reference well and "Zimapán 5" well, the latter with As content ranging from 395 to 630 µg/L. In order to study genotoxicity the specimens were observed during 180 days in 3 separated lots of 55 animals/lot: in reference well water (negative control), in reference water to which was added 5000 µg As V/L (positive control), and in water from the "Zimapán 5" well. In water, the concentration of As was found to diminish with time, whereas in fish there was an increase in concentration. After 30 days the level of As in the positive control diminished in water to 1092.65 µg/L, whereas in fish it increased to 523.81 µg/L. In the water from the "Zimapán 5" well As was reduced to 211.40 µg/L, and in fish there was an increase of 74.73 µg/L. At the end of 180 days in the negative control there was a natural induction of 0.8 micronuclei/1000 cells, whereas in the positive control and in fish exposed to "Zimapán 5" well water the frequency was 163.5 and 56.25 times greater, respectively.

To study teratogenic effects of As in water, a mating pair of fish was maintained in the same conditions as in the aforementioned treatments (negative, positive and "Zimapán 5"). With the higher levels of As in water, there was a higher percentage of non-viable eggs and ovules and less hatching as well as longer time until hatching. Increased levels of As caused an increase in the percentage of recently-hatched fish with a deformed spinal column or prematures and adults with spinal column deformations and dwarfism, and lowered the life span of adults. Taken together, these results demonstrate the As genotoxic and teratogenic damages in *Danio rerio* subchronic concentrations like in well waters.

## **V. INTRODUCCIÓN**

Numerosas enfermedades humanas están directa o indirectamente asociadas a diversos agentes ambientales (físicos, químicos y biológicos) cuyos efectos están lejos de ser conocidos. La mayoría de los agentes que dañan los ácidos nucleicos, cuando existen exposiciones a dosis elevadas, causan efectos citotóxicos específicos en un variado conjunto de procesos celulares. Estimar el riesgo del daño genético que puede producir la exposición prolongada a agentes contaminantes externos es un objetivo fundamental de la toxicología genética (Brusick, 1987).

Las pruebas que se utilizan para identificar a los agentes genotóxicos no pueden ofrecer una evaluación cuantitativa de las respuestas *in vivo con* relación al daño carcinogénico o mutagénico en los tejidos blanco. Por eso, el encontrar marcadores biológicos de exposición en tejidos blanco, que puedan permitir la predicción de un daño sobre la salud en individuos, se ha convertido en un objetivo primordial de la toxicología genética; de tal manera que puedan realizarse diagnósticos, detecciones tempranas, prevenciones y explicar los mecanismos de acción de las sustancias carcinogénicas (Ehling, 1991).

## VI. ANTECEDENTES

### VI. 1. INDUSTRIAS QUE LIBERAN ARSÉNICO Y COMPUESTOS.

Algunas fuentes que más liberan As a la atmósfera son los procesos de fundición y refinación de metales no ferrosos (Pb, Zn y Cu), quemado de combustibles fósiles y aplicación de pesticidas (Katzung, 1993). Otras actividades que contribuyen a la contaminación por este metaloide son la protección de la madera por el método cobre-cromo-arsénico, la manufactura de semiconductores a base de arseniuro de galio e indio, la eliminación de aguas residuales, el almacenamiento inadecuado de desechos industriales, etc. (Albert, 1997).

Dentro de los compuestos formados por el arsénico encontramos:

A) Los derivados inorgánicos que se forman con el arsénico actuando con valencia -3 como la arsina ( $\text{AsH}_3$ ), toxicológicamente importante por ser un veneno hemolítico. También aquellos con valencia +3 como el óxido de arsénico III o anhídrido arsenioso, el arsenito de cobre o verde de Scheele ( $\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2$ ) y el cloruro de arsénico ( $\text{AsCl}_3$ ). Dentro de los compuestos que se forman con el arsénico actuando con valencia +5 destacan el anhídrido arsénico u óxido de arsénico V ( $\text{As}_2\text{O}_5$ ), el arseniato de plomo ( $\text{Pb}(\text{AsO}_4)_2$ ), el arseniato de calcio ( $\text{Ca}_3\text{AsO}_4$ ) y el arseniato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ).

B) Los derivados orgánicos por medio de enlaces covalentes con átomos de carbono, que se pueden clasificar según su esqueleto carbonado como: aromáticos, por ejemplo salvarsán ( $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{As}_2\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ ) y ácido arsanílico ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{-AsNO}_3$ ); y derivados alifáticos como trimetilarsina ( $\text{As}(\text{CH}_3)_3$ ) y los ácidos monometilarsónico y dimetilarsínico ( $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ ).

## VI.2. CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL ARSÉNICO.

El ciclo biogeoquímico del As en la superficie del océano involucra la captación de arseniato por las algas, su conversión a organoarsenicales y la liberación de arsenito así como especies metiladas en el mar. La demetilación biológica de los metilarsenicales y la oxidación del arsenito regeneran el arseniato. La actividad biológica afecta la especiación química del As en el medio marino y su distribución entre las fases particulada y disuelta (Tamaki y Frankenberger, 1992).

El As es transportado a partir de fuentes de contaminación terrestres hacia el aire, tierra y sistemas de agua dulce, donde los sedimentos funcionan como un reservorio temporal de As (Figura 1) (Woolson, 1977). La metilación del arsénico inorgánico, para dar ácidos arsenicales metilados y dimetilados, está asociada con la actividad biológica del agua. Algunos organismos marinos tienen la capacidad de transformar arsénico inorgánico en compuestos orgánicos arsenicales como arsenobetaina  $(\text{CH}_3)_3\text{AsCH}_2\text{COO}^-$ , arsenocolina  $(\text{CH}_3)_3\text{AsCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  y fosfolípidos (arsenolípidos).

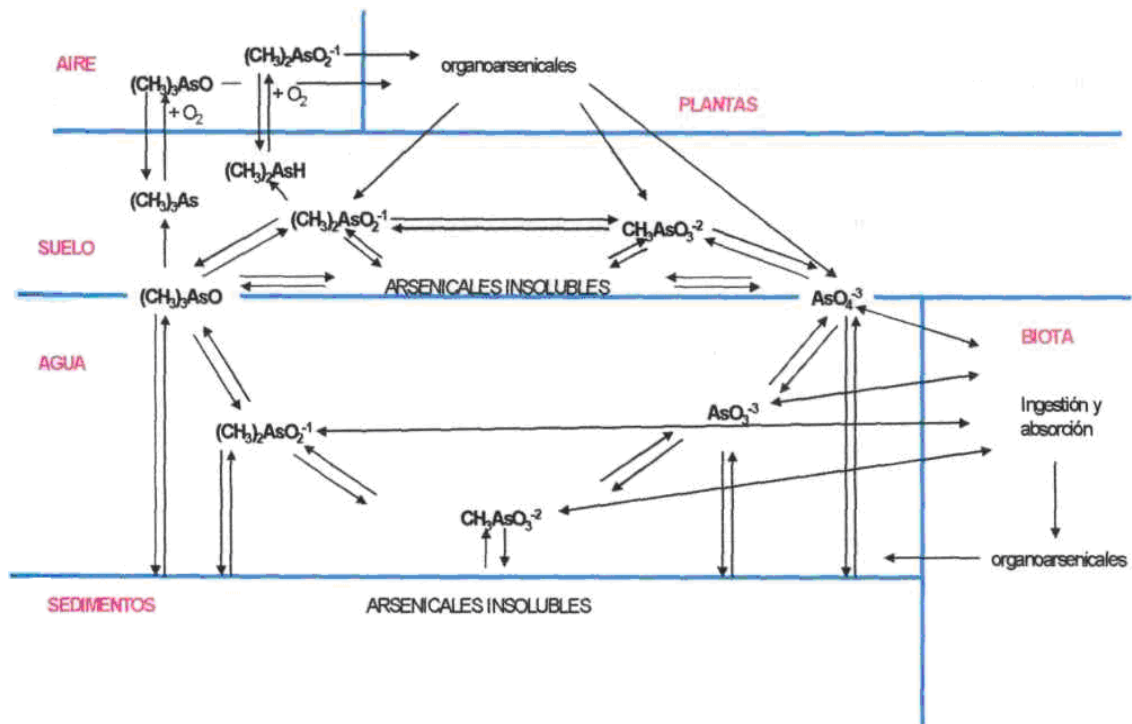


FIGURA 1. Naturaleza cíclica del metabolismo del arsénico en el ambiente. Woolson, 1977.

### VI.3. CONTAMINACIÓN POR ARSÉNICO DE LAS FUENTES SUBTERRÁNEAS NATURALES DE AGUA POTABLE DE ZIMAPÁN.

Zimapán está localizado entre los 20° 57' y 20° 34' norte y entre los 99° 33' y 99° 12' oeste, en la región occidente del Estado de Hidalgo y consta de una superficie de 905.83 km<sup>2</sup> (DGG, 1983a; INEGI, 1995). Este municipio tiene un clima templado subhúmedo con lluvias en verano en el 41.16% de su territorio y un clima semiseco-templado en el 30.72% del mismo, con una temperatura y precipitación media anual de 19.6°C y 409 mm..., respectivamente. Su vegetación es del tipo matorral crasicaule constituido principalmente por cactáceas de tallos suculentos, huisaches (*Acacias*), mezquites (*Prosopis*, etc. (Cárdenas, 1992; DGG, 1983a; Geyney cols., 1963; INEGI, 1992; INEGI, 1995; Ramos, 1996).

El pozo "Zimapán 5" está localizado en la calle Mineros No. 40, Colonia Llano Norte, en la cabecera municipal (ver figura 2), tiene una profundidad de 184 m, se encuentra en las formaciones volcánicas Tamaulipas y Soyatal, y está asociado a rocas carbonatadas fracturadas. Este pozo abastece las 24 horas del día al distribuidor general de agua potable de la cabecera municipal, con un gasto medio 5 de L/s, siendo el que actualmente aporta mayor tiempo y gasto de todos los pozos que alimentan dicho depósito.

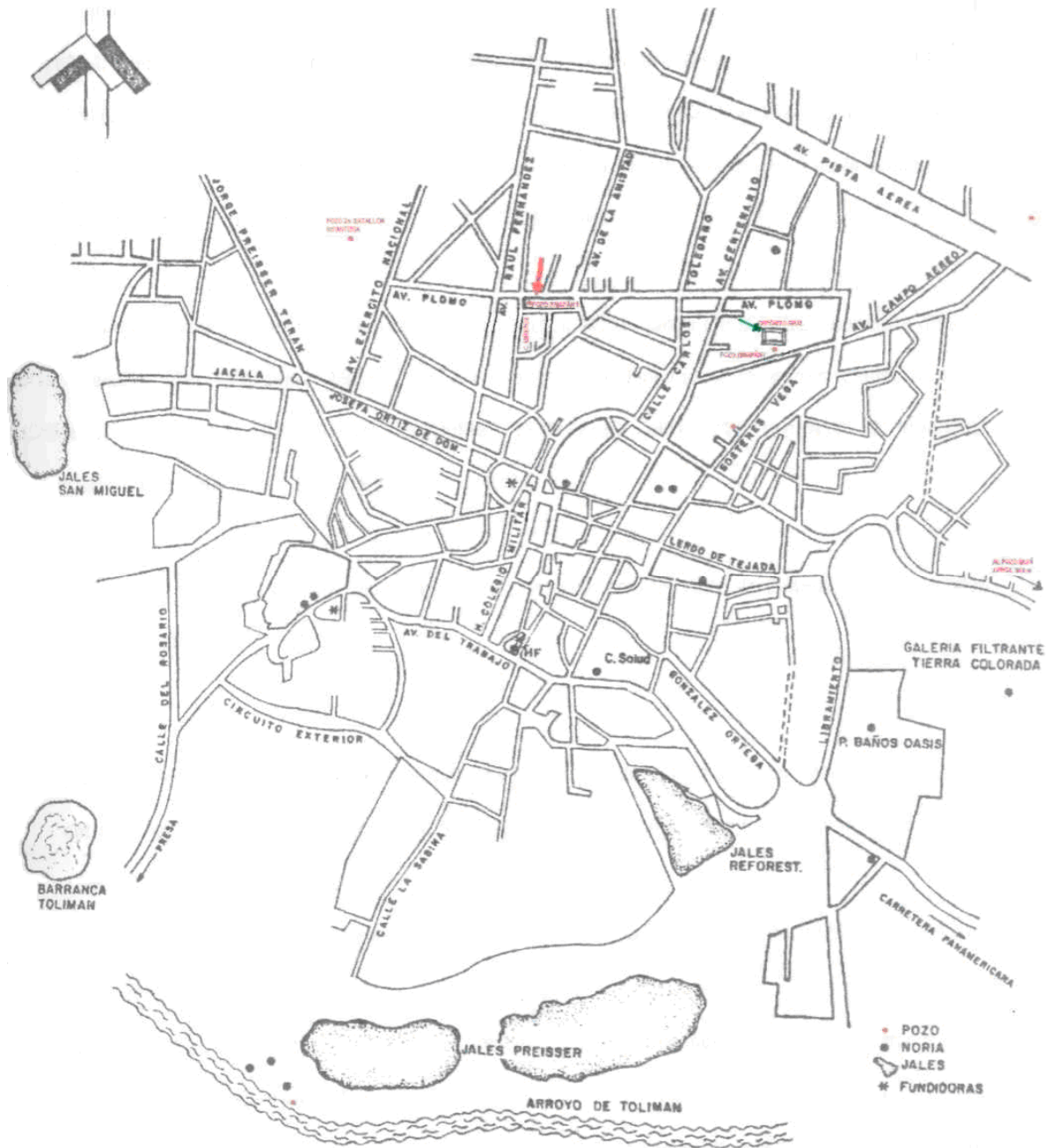


FIGURA 2. Mapa de localización del pozo "Zimapán 5" (señalado con una flecha roja), del distribuidor general de agua "potable" (señalado con flecha verde) y de otros pozos en la cabecera municipal de Zimapán, Hidalgo.

Los minerales primarios que se encuentran en la región son: pirita ( $\text{FeS}_2$ ), esfalerita ( $\text{ZnS}$ ), arsenopirita ( $\text{FeS}_2\text{FeAs}_2$ ), galena ( $\text{PbS}$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), bornita ( $\text{CuFeS}_4$ ), pirrotita ( $\text{Fe}_2\text{Si}_2$ ), magnetita ( $\text{FeOFe}_2\text{O}_3$ ), meneginita ( $\text{Cu}_{0.97}\text{Pb}_{12.67}\text{Sb}_{7.06}\text{S}_{24.20}$ ), sulfosal de plomo y antimonio, rejalgar ( $\text{AsS}$ ), oropimente ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ), lolingita ( $\text{FeAs}_2$ ) y tenantita ( $3\text{Cu}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$ ); distribuidos en un radio de 12 km del centro de la población de Zimapán (Cárdenas, 1992; Geyne cols., 1963; Martín, 2000; Ramos, 1996).

Los minerales secundarios que se encuentran en la región son: limonita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ), hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), arcillas y óxidos (Geyne y cols., 1963), también minerales arsenicales secundarios como: adamita  $\text{Zn}_2(\text{OH})\text{AsO}_4$ , mimetita  $\text{Pb}_4(\text{PbCl})(\text{AsO}_4)_3$ , escoridita  $\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , olivinita  $\text{Cu}_2(\text{OH})\text{AsO}_4$  e hidalgoita  $\text{PbAl}_3(\text{AsO}_4)\text{SO}_4(\text{OH})_6$  (Armientaycols., 1997; Ramos, 1996).

En cuanto al contenido de arsénico en las aguas subterráneas del Valle de Zimapán se presenta lo siguiente (Martín, 2000; Pérez, 2004):

- Las aguas de los pozos profundos con rocas carbonatadas presentan altos contenidos de arsénico, entre los que se encuentran El Detzaní, Muñí, Zimapán 2, Zimapán 5 y Batallón (Armienta y cols., 1993).
- Las aguas de norias en rocas carbonatadas presentan bajas concentraciones de arsénico con relación a los pozos profundos.
- Aguas de pozos y norias en rocas volcánicas presentan muy bajas concentraciones de arsénico o están por debajo del límite de detección.
- La mayoría de las aguas de manantial en cualquier tipo de roca no contienen arsénico o lo contienen en bajas concentraciones.



- Aguas con contenidos de sulfatos del orden de 1,000 mg/L contienen arsénico. Ésto es explicado como consecuencia de los procesos de oxidación de los sulfuras, que permiten la generación de acidez, liberación de metales pesados y altas concentraciones de sulfatos que podrían estar relacionados con fuentes puntuales de contaminación.

Romero y cols. (2004) reportan que en el agua natural de Zimapán hay una retención de As V soluble del 35.3 al 90% (en un rango de pH de 7 a 9) en el material acuífero rico en carbonato, asimismo que la sorción (adsorción en la calcita o minerales de la arcilla) y coprecipitación de los arseniatos de Ca pueden ser los principales procesos que controlan la movilidad del As en los acuíferos contaminados por el mismo.

En 1993 se hizo un monitoreo de las fuentes de agua potable subterráneas (pozos, norias y manantiales) de Zimapán. Los resultados de los análisis químicos de muestras de agua, minerales y jales (desechos de la extracción de minerales), indicaron que el origen del As es antropogénico y natural (Armienta y cols., 1993).

La fuente antropogénica de As la constituyen la oxidación de los jales mineros (ver cuadro 1), localizados en la parte urbana de Zimapán, y los procesos de fundición de minerales. Las fundidoras provocaron la volatilización del As durante la ignición (porque el humo contenía ácido arsenioso), éste fue acarreado en la dirección preferencial de los vientos dominantes y depositado en los suelos de las inmediaciones de las fundidoras, posteriormente se lixivió hacia las porciones someras del acuífero. La escoria de las fundidoras, acumulada en los terrenos adyacentes a las mismas, presenta un contenido de As suficiente para contaminar por lixiviación formaciones acuíferas (Armienta y cols., 1993).

**CUADRO 1. Contenido de AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en muestras de jales de Zimapán. Hgo. Amienta y cols., 1993**

LOCALIDAD*	CONTENIDO DE As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (µg/kg)
San Antonio 1	6,870,000
San Antonio 2	8,770,000
San Antonio 3	9,350,000
San Antonio 4	8,330,000
San Antonio 5	8,010,000
San Miguel 1	23,920,000
San Miguel 2	4,800,000
San Miguel 3	40,720,000
San Francisco 1	20,210,000
San Francisco 2	30,340,000
El Calvarío 1	870,000

\* El número indica diferentes puntos muestreados.

La fuente natural del As son las rocas con minerales con alto contenido de este metaloide (destacando la arsenopirita) por donde circula el agua de los pozos profundos. En los meses de mayor precipitación pluvial es menor la concentración de As en las fuentes subterráneas naturales de agua (cuadro 2).

**CUADRO 2. Precipitación promedio mensual en Zimapán, concentración de arsénico total, pH y temperatura en el agua del pozo "Zimapán 5". Armienta y cols., 1993; Báez, 2001; CNA, 1999; IIMEGI, 1995; Pérez, 2004; Ramos, 1996.**

MES/AÑO	PRECIPITACIÓN (mm)*	CONC. As (µg/L)	pH	TEMPERATURA (°C)
Mar-92	6.8	630.0	7.65	28.5
Mar-96		685.9		28.5
Abr-92	20.5	556.2	7.82	29.0
Abr-93		525.7		29.0
May-92	39.4	423.0	7.80	28.4
May-98		445.6		27.9
Jul-95	50.1	395.0	7.74	29.2
Ago-99	63.6	411.0	7.86	29.0
Dic-96	6.5	540.5	7.53	25.2
Dic-99		620.0		25.2

La contaminación por arsénico en el agua potable ha afectado seriamente la salud de grandes poblaciones en varios países del mundo como Estados Unidos de Norteamérica, México, Chile, Argentina, Bolivia, España, Hungría, China, Mongolia, Japón, Taiwán, Tailandia e India entre otros; uno de los casos más graves es el reportado en Bangladesh, India, considerado como una catástrofe mundial que ha afectado a unos 40 millones de habitantes (Pérez, 2004).

#### VI.4.TOXOCINÉTICA

La toxocinética del arsénico comprende la absorción, distribución, biotransformación y excreción, los cuales se describen a continuación:

**ABSORCIÓN.** El As inorgánico puede ser absorbido por los pulmones, sistema gastrointestinal y piel. En los seres humanos y en la mayoría de las especies animales el paso de compuestos arsenicales inorgánicos a través del tracto gastrointestinal (**TGI**) es alto (95%) y está en función de su hidrosolubilidad; los arsenitos son poco hidrosolubles y los arseniatos son hidrosolubles, por otra parte los arsenicales orgánicos son absorbidos de manera deficiente en el aparato digestivo (Katzung, 1993). Por vía respiratoria la translocación del metaloide depende del tamaño de las partículas inhaladas, de su solubilidad y de la forma química del compuesto. Las partículas mayores de 10  $\mu\text{m}$  se depositan en las vías superiores, son removidas por el movimiento ciliar y transportadas al TGI. Las partículas menores de 7 $\mu\text{m}$  se absorben en un 75 a 85% (Albert, 1997). La absorción a través de la piel está en función de su liposolubilidad, siendo la forma trivalente más liposoluble que la pentavalente (Katzung, 1993).

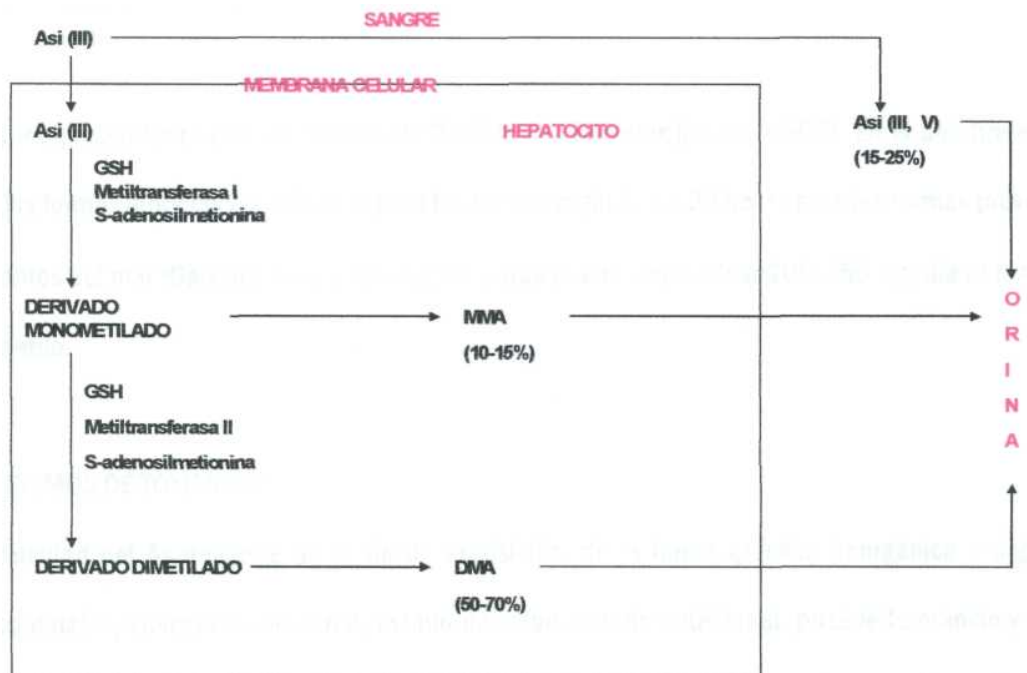
**DISTRIBUCIÓN.** Se realiza a través de la sangre por todo el cuerpo, horas después hay una alta concentración en el hígado y en los riñones que luego baja rápidamente. Pequeñas concentraciones son detectables en cerebro, corazón, útero, pulmón, pelo, dientes, uñas, piel, huesos y músculos. Con el

tiempo los arsenicales tienden a acumularse principalmente en huesos y músculos (Galváo y Corey, 1987). Los arsenitos tienen afinidad por la piel, pelo y uñas (Albert, 1997).

BIOTRANSFORMACIÓN. El metabolismo del As se realiza principalmente en el hígado y se propone que en él intervienen dos procesos (Albert, 1997):

- Reacciones de reducción que convierten el As V en As III.
- Reacciones de oxidación que transforman el As III en As V y especies metiladas.

La metilación del As requiere la reducción del As V a As III, luego la adición de un primer grupo metilo para obtener ácido monometil-arsénico (MMA V), después su reducción a ácido monometilarsónico (MMAIII), finalmente una segunda metilación para obtener el ácido dimetil arsínico (DMA) (ver figura 3). Se propone a la S-adenosilmetionina como donador de los grupos metilo y al glutatión reducido (GSH) como principal agente reductor y transportador de As. Las formas metiladas son mucho menos tóxicas que el As inorgánico (Galváo y Corey, 1987).



Asi (III) = Arsénico inorgánico + 3. GSH = Glutatión reducido. FIGURA 3.

Biotransformación del arsénico inorgánico. Albert, 1997.

Los compuestos que disminuyen el nivel de GSH, como la butiona-S,R-sulfoximina (Waldren y cols., 1997), incrementan la toxicidad del As. Varios factores pueden influir en la capacidad de metilación del As como dosis, tiempo de exposición, una dieta alta en metionina y proteínas, y el probable polimorfismo genético de las enzimas metilantes (Albert, 1997).

EXCRECIÓN. El As se elimina principalmente por el riñón en forma de DMA (50-70%), MMA (10-15%) o se excreta sin metilar en la orina (15-25%) (Albert, 1997), siendo el arseniato mas rápidamente eliminado que el arsenito debido a su pobre afinidad por los grupos tiol y por su solubilidad (Tamaki y Frankenberger, 1992).

Las sales de arsenito se excretan lentamente principalmente por la vía biliar y los arsenatos por la vía renal (Galváo y Corey, 1987).

El As inorgánico tiene una vida media de 28.6 hr en hámster (Albert, 1997). En el hombre es de 10 horas para las formas inorgánicas, 30 horas para las formas orgánicas y 20 horas para las formas provenientes de los alimentos del mar (Galváo y Corey, 1987); por lo que puede destoxificar 200-250 µg/día por la adición de grupos metilo.

#### VI.5. MECANISMOS DE TOXICIDAD

La toxicidad del As depende de la vía de exposición, de la forma química (inorgánica u orgánica, y estado de oxidación), concentración, edad, estado de salud, estado nutricional, posible tolerancia y relación tiempo-dosis. El As trivalente es más tóxico que el pentavalente. El As soluble se incrementa al disminuir el potencial de oxido-reducción y pH, habiendo un cambio en su estado de oxidación (Armienta y cols., 1993; Albert, 1997).

Los arsenicales trivalentes inorgánicos se enlazan covalentemente a átomos de azufre de grupos tiol (-SH) presentes en sitios activos de enzimas y proteínas de tejidos (como queratina), inactivándolas (Albert, 1997; Tamaki y Frankenberger, 1992), son corrosivos para el tejido epitelial de revestimiento de las vías respiratorias, gastrointestinal, piel y otros tejidos, además dañan los capilares provocando aumento de la permeabilidad, deshidratación, choque y muerte. Los órganos blanco primarios del As trivalente son el sistema nervioso, médula ósea, hígado, piel y vías respiratorias (Katzung, 1993). El As pentavalente inhibe la actividad de la succínico deshidrogenasa y puede reemplazar al fosfato en monosacáridos como glucosa-6-fosfato, produciéndose glucosa-6-arseniato, inhibiéndose la síntesis de

ATP por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (lo que estimula la actividad de la ATPasa mitocondrial) e interrumpiéndose el metabolismo energético perjudicándose reacciones que son catalizadas enzimáticamente como la síntesis del ADN. El arseniato compite con el fosfato en la fosforilación oxidativa e inhibe la reducción del NAD<sup>+</sup> en la mitocondria. Por su parte, la arsenocolina y la arsenobetaína son menos tóxicas porque no tienen la habilidad para enlazarse a los grupos tiol y son resistentes a la conversión a formas más tóxicas (Albert, 1997).

#### VI.6. TOXICIDAD CRÓNICA

En humanos la intoxicación crónica por As inorgánico puede manifestarse como perforación del tabique nasal, irritación de la piel, neuropatía sensorial, pérdida de cabello, depresión de médula ósea, infiltración grasa del hígado o daño renal. Las manifestaciones cutáneas incluyen vasodilatación y palidez (por la anemia), hiperqueratosis de las palmas y plantas de los pies, hiperpigmentación, hipopigmentación y líneas blancas en las uñas. Son comunes la conjuntivitis e irritación de las mucosas, laringe y vías respiratorias (Katzung, 1993).

El daño al hígado se manifiesta inicialmente como ictericia y puede progresar a cirrosis o ascitis. Los efectos tóxicos en las células parenquimatosas hepáticas ocasionan un incremento de enzimas del hígado en la sangre. Estudios en animales muestran granulos y alteraciones en la ultraestructura de la mitocondria incluyendo pérdida del glicógeno; se sugiere que el As daña las enzimas de ésta y el tejido respiratorio. Adicionalmente, los arsenicales son inductores de la metalotioneína, la potencia depende de la forma química siendo el As III el más potente, seguido por el As V, monometilarseniato y dimetilarseniato (Klaassen, 1996).

Por otra parte el As III afecta varias enzimas de la ruta metabólica del grupo hemo, porque inhibe la coproporfirinógeno oxidasa y la hemo sintetasa. También causa un incremento de la actividad de la sintetasa del ácido 5-aminolevulínico y de la hemo oxigenasa (HO), así como una depresión en la actividad de las descarboxilasas del uro y el coproporfirinógeno. Se presenta la porfirinuria

caracterizada por el incremento en la concentración de uroporfirina y coproporfirina (Rapaport, 1988). La HO cataliza la degradación del grupo hemo para convertirlo en biliverdina y posteriormente en bilirrubina (Albert, 1997).

El As es un agente teratogénico, mutagénico y carcinogénico (Albert, 1997; Bencko, 1977). Este metaloide no parece alterar directamente el ADN, posiblemente inhibe una o más de las enzimas que intervienen en su replicación y reparación. Asimismo, la capacidad del As V para simular al fosfato en los enlaces diéster del ADN puede dañar el material genético (Albert, 1997); al respecto Petres y cols. (1977) realizaron un análisis de los cromosomas de los linfocitos de pacientes expuestos al As encontrando frecuentes aberraciones estructurales y numéricas, aún décadas después de la última exposición, y la adición *in Vitro de* arseniato de sodio indujo los mismos cambios en los cromosomas.

Otros estudios sugieren que los compuestos de As III y V producen ruptura de los cromosomas y aberraciones en linfocitos periféricos y cultivos de piel humana (Klaassen, 1996). También se ha propuesto: a) que actúa como co-carcinógeno con otros agentes o interviene en la respuesta inmunológica de los individuos, y b) que produce radicales libres (Albert, 1997).

#### VI.7. EL ARSÉNICO EN ORGANISMOS ACUÁTICOS

En mamíferos la captación celular de As III es mayor que la de As V y éste último es transformado en la primera forma intracelularmente, inmediatamente es metilada a ácido monometilarsónico y dimetilarsónico, formas inactivas en que se excreta el As (Albert, 1997); sin embargo en organismos acuáticos puede ser diferente. Un ejemplo es la investigación que realizaron Cooney y Benson (1980) quienes cultivaron el alga *Dunaliella tertiolecta* en un medio enriquecido de agua de mar con 1  $\mu\text{M}$  de arseniato (como  $^{74}\text{As}$ ) para alimentar a la langosta juvenil *Homarus americanus*. Observaron que el  $^{74}\text{As}$  se biotransformó en el alga de la siguiente forma: 47% como fosfatidil trimetilarsenolactato, 48% en un



arsenolípido desconocido, 4% enlazado a proteínas y 1% de otra forma. En la langosta el hepatopáncreas y el tejido muscular fueron los sitios primarios de almacén de As orgánico e inorgánico, habiendo poco o nada de metabolismo en el tejido muscular; el arsenolípido desconocido desapareció, lo cual indica que fue excretado o que fue absorbido deficientemente por el sistema digestivo del animal. Por estos resultados los investigadores concluyeron que *Homarus americanus* tiene suficientes lipasas y diesterasas en el hepatopáncreas para degradar el arsenolípido a trimetilarsenolactato, careciendo de la habilidad para degradar este último a arsenobetaína.

Por otra parte, el arseniato administrado oralmente a la trucha café (*Salmo trutta*) de agua dulce es convertido a una forma orgánica (probablemente metilado) por la microflora intestinal e inmediatamente absorbido. El arseniato inyectado intramuscularmente es inicialmente detectado en la sangre como As inorgánico y es lentamente convertido a un organoarsenical. Ambas formas se acumulan en el hígado y son excretadas por la bilis (TamakiyFrankenberger, 1992).

El trióxido de arsénico causa muerte en los peces con una  $CL_{50}$  a las 96 horas de 50-100 mg/L para el pez dorado, de 30-40 mg/L para la carpa, de 20-25 mg/L para la trucha, y de 25-30 mg/L para otros, los arsenitos penetran al cuerpo del pez más rápido que los arseniatos. La máxima concentración de arsenitos y arseniatos considerada como segura para peces y otros organismos acuáticos es de 15-23 mg/L (Metlev y cols., 1983). El As presente en el agua se absorbe por las branquias, por el tracto gastrointestinal y por la piel, luego se distribuye en hígado, riñón, piel, escamas (debido a la afinidad de los arsenitos por la queratina) y músculo, donde el As inorgánico se biotransforma en As orgánico lipo e hidrosoluble (Lenihan y Fletcher, 1977; Oladimeji y cols., 1984). En los órganos con más bajo Eh y pH (como el hígado y el riñón) el As III es más hidrosoluble.

Diversos estudios demuestran que el As presente en el agua se bioconcentra en plantas y animales acuáticos; los niveles típicos de As total en bivalvos marinos, lenguados y peces de agua dulce están en el rango de 1.00-2.00, 0.75-2.50 y 0.10-0.25 mg/L en peso húmedo, respectivamente. En peces marinos y mariscos más del 85% del As de la porción comestible es orgánico (arsenobetaina AsB, arsenocolina AsC y ácido dimetilarsínico DMA) y aproximadamente el 10% es inorgánico (USEPA, 2003).

Entre los estudios que demuestran la capacidad del As para bioconcentrarse se encuentra el de Lacayo y cols. (1992) quienes determinaron el As total en agua y peces del Lago Xolotlán, Managua, Nicaragua, obteniendo concentraciones de 0.010-0.030 mg/L en agua superficial, 5.295 a 16.700 mg/L en el agua liberada por una planta geotérmica, 0.206 mg/L en el manantial caliente Titipapa y menos de 0.370 mg/kg en músculo húmedo de *Cichlasoma citrinellum* y *Cichlasoma managüense*. Otro estudio es el realizado por Sekulic y cols. (1993) que determinaron As total en músculo húmedo de la langosta noruega *Nephrops norvegicus* L (en ambos sexos) de la Bahía Kvameric del noreste adriático (Croacia), y en el primer caso fue de 13.26 mg/kg y 14.20 mg/kg para hembra y macho, respectivamente. En el hepatopáncreas la concentración fue de 17.12 y 13.34 mg/kg, respectivamente.

Otra investigación que evidencia que el As se bioconcentra es la realizada por Bou-Olayan y cols. (1995). En este trabajo se determinó el As total en el camarón *Metapenaeus affinis* y en la langosta *Penaeus semisulcatus* en diferentes sitios del Golfo de Arabia, obteniéndose una concentración de As que varió de 0.45 a 1.11 mg/L y de 0.59 a 1.90 mg/L en peso húmedo, respectivamente. Asimismo, Navarro y cols. (1992) determinaron As total en muestras liofilizadas de pez de la Costa de Granada, España, obteniendo concentraciones de 0.396 a 45.716 mg/kg. Por otra parte, Schmitt y Brumbaugh (1990) participaron en un programa nacional de biomonitorio de la contaminación en Estados Unidos en 1984, donde se colectaron 315 muestras de peces de agua dulce de 109 estaciones de todo el país

encontrándose una concentración máxima de As total en organismo completo de 1.5 mg/kg (peso húmedo).

La bioconcentración del As depende de la velocidad de absorción y eliminación en un organismo, Naqvi y cols. (1990) midieron la captación y depuración del As en cangrejos de río *Procambarus clarkii* adultos. En este estudio expusieron a estos organismos a 0.5, 5 y 50 mg/L del herbicida metanoarseniato de monosodio (MM) en el agua por 8 semanas (captación). Por otra parte otros 3 lotes fueron expuestos a las mismas concentraciones y tiempo, y después fueron transferidos a agua sin As por 8 semanas adicionales (depuración). En el primer caso, la captación fue dependiente de la dosis ya que la cantidad de As presente en el tejido variaba de 230 a 930, 1420 a 4290, y 2810 a 4600 µg/L (base húmeda) en cada tratamiento al final de las 2 y 8 semanas, respectivamente. En la depuración, la mayoría del metal acumulado durante la captación fue rápidamente perdido en las primeras 2 semanas. Baéz (2001) expuso tilapias sanas (*Oreochromis niloticus*) a 0,0.05 y 15.73 mg/L de As adicional (administrado como trióxido de arsénico) en el agua del pozo "Zimapán 5" durante 96 horas, obteniendo un incremento de la concentración del metaloide en pez completo de 435,465 y 10,044 µg/L (base seca), respectivamente.

Existen informes del daño producido por el As en la reproducción de diferentes animales después de la administración de sales inorgánicas. Naqvi y Flagge (1990) llevaron a cabo estudios con el cangrejo rojo americano de río *Procambarus clarkii*. En esta investigación, treinta y seis organismos de ambos sexos fueron expuestos a 100 mg/L del herbicida metanoarseniato de monosodio (MM) por 12 semanas; los machos se retiraron después de la fecundación pero las hembras se intoxicaron por 12 semanas más. Se registró el número de huevos en los pleopodos de cada hembra. Treinta días después de la eclosión, veinte crías fueron expuestas en una solución de 15 mg/L de MM por 37 semanas. La

eclosión fue del 78.08% para los huevos control y de! 16.97% para los tratados con el herbicida, por lo que se concluyó que el MM la redujo drásticamente. También sugieren que el As tuvo un efecto inhibitorio en la hemocianina del cangrejo.

En peces, el As puede dañar la médula ósea y por lo tanto la producción de células rojas disminuye. Al respecto Oladimeji y cols. (1984) realizaron un estudio de las cinéticas de acumulación del arsenito de sodio y su efecto en el crecimiento de la trucha *Salmogairdneri*. Cuatro grupos de peces fueron expuestos a 0,10,20 y 30 mg As/kg en el alimento. Después de 8 semanas de exposición, el hígado acumuló los más altos niveles de As siguiéndole la piel (donde el As pudo haberse enlazado a los grupos sulfhidril de la piel y escamas). La concentración de As en el músculo húmedo de aquellos expuestos a 20 y 30 mg As/kg ascendió hasta 1590 y 2400 µg/L después de 4 y 2 semanas, respectivamente. Se observó una disminución en el crecimiento que pudo deberse a la inhibición de enzimas, así también como a una reducida capacidad de transporte de oxígeno en la sangre, que resultó en una ineficiente utilización del alimento.

El As causa daños neuromotores lo cual fue demostrado por McGeachy y Dixon (1992) que determinaron el tiempo promedio para la pérdida de equilibrio en la trucha *Oncorhynchus mykiss* expuesta a 240 y 120 mg arseniato/l a 5 °C, así también como a 60 y 120 mg/l a 15 °C, el cual fue de 32.2, 56.8,210 y 34.8 horas, respectivamente. A estos tiempos promedio los peces presentaron concentraciones de As de 13.5, 8.6,8.1 y 8.6 mg/kg en base húmeda. En otro estudio, Kotsanis e Iliopoulou (1999) inyectaron una solución con 21 ng de AsCl<sub>3</sub> en el saco vitelino de truchas *Oncorhynchus myk/ssy* las mantuvieron 6 meses a 12-15 °C, observándose una mortalidad de crías del 64.3% después de 28 días. A los 6 meses de la inyección los peces sobrevivientes fueron sacrificados observándose lesiones en el riñón en el 39.6% de ellos. En el hígado se observaron lesiones proliferativas y no neoplásicas, también un gran desarrollo de hepatocitos y colangiocitos de una manera desorganizada.

## VI.8. GENOTOXICIDAD

Entre los modelos para evaluar genotoxicidad se encuentran bioindicadores como la frecuencia de núcleos lobulados ó hendidos, binúcleos, micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas, etc. Los micronúcleos (MNS) se forman por apoptosis, fagocitosis, por la pérdida de fragmentos acéntricos o cromosomas enteros que no son incorporados en el núcleo hermano en la mitosis, entre otros mecanismos (Heddle y cols., 1991). Cavas y Ergene-Gözükara (2003) expusieron al pez *Oreochromis nüticus* al 5, 10 y 20% de un efluente textil por 3,6 y 9 días, obteniendo un incremento en la frecuencia de micronúcleos (FMNS) en células branquiales a mayor dosis y tiempo de exposición.

En otros organismos, Basu y cols. (2002) evaluaron la formación de MNS en células de mucosa oral, células uroteliales y linfocitos sanguíneos periféricos de individuos expuestos al arsénico por medio de agua de pozo potable (con 368.11  $\mu\text{g/l}$  de As) en el Oeste de Bengala, India, y estos mostraron un incremento estadísticamente significativo en la FMNS en células de mucosa oral, células uroteliales y linfocitos (5.15/1000, 5.74/1000 y 6.39/1000 células, respectivamente) cuando se compararon con los controles (0.77/1000, 0.56/1000 y 0.53/1000 células, respectivamente). Gonsebatt y cols. (1997) estudiaron la presencia de MNS en células epiteliales exfoliadas obtenidas de la mucosa oral y muestras de orina en habitantes expuestos de Santa Ana, Coahuila, donde el agua potable contiene 408.17  $\mu\text{g/L}$  de As, encontrando un incremento significativo de MNS en células epiteliales orales y urinarias (siendo los hombres mas afectados que las mujeres) así como un mas alto número de células orales micronucleadas en individuos con lesiones en la piel.

Otros metales inducen micronúcleos también; Kapka y cols. (2004) evaluaron la FMNS en 67 niños de 9 años de edad expuestos al plomo de la región de Silesia, con una concentración de plomo en sangre de 4.8 mg/dL comparada contra 2.5 mg/dL en los controles, encontrando una FMNS de 2.8

contra 1.0 respectivamente. Joardar y Sharma (1990) administraron a ratones con diferentes dosis orales de  $\text{MnSO}_4$  y  $\text{KMnO}_4$  por 3 semanas obteniendo que las frecuencias de aberraciones cromosómicas en células de médula ósea así como de micronúcleos se incrementaron significativamente, y sus efectos clastogénicos estuvieron directamente relacionados con las concentraciones usadas, siendo la primera sal más clastogénica que la segunda.

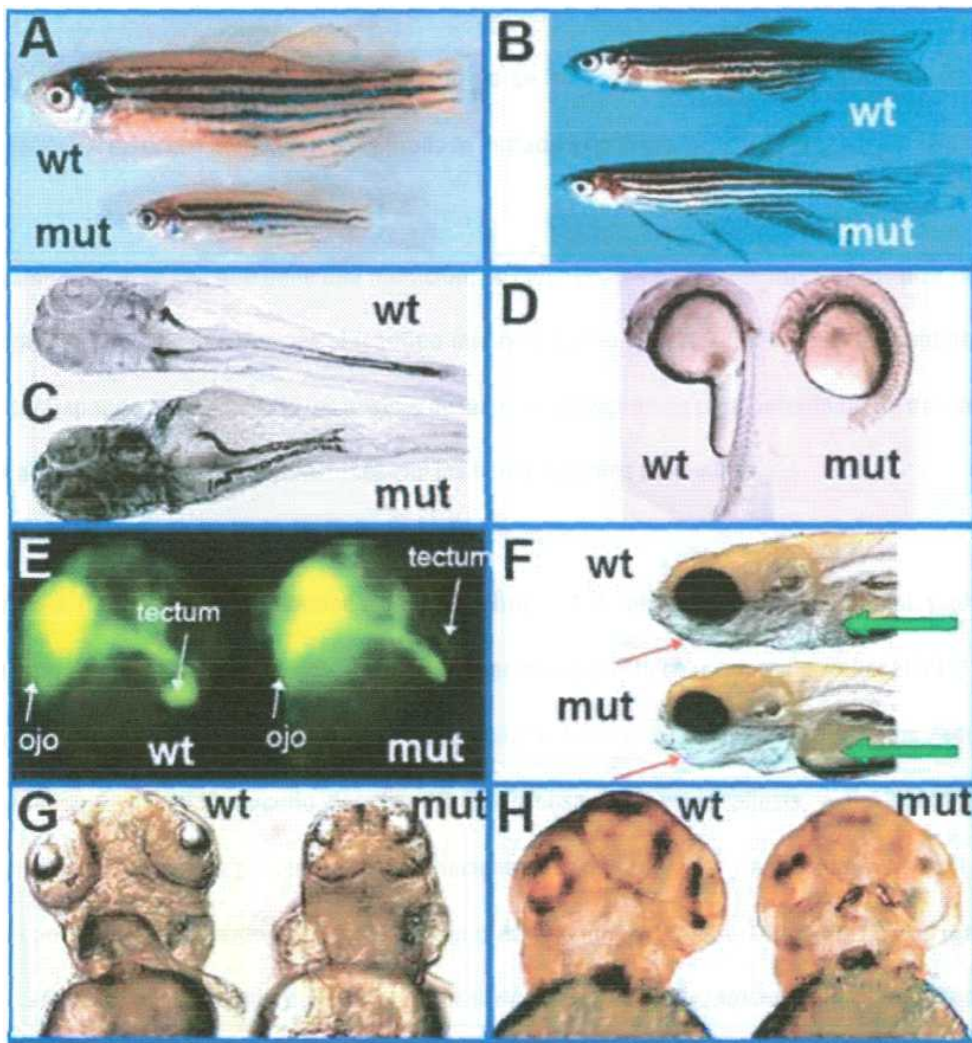
#### VI.9.TERATOGENESIS

Respecto a la teratogénesis causada por el As, Bencko (1977) reporta la aparición de teratomas malignos y benignos en embriones de rata transplantados en la cavidad peritoneal de madres cuya agua de beber contenía arsénico, y que las células embrionales son especialmente sensitivas a éste provocándoles degeneración aún en una concentración de 0.25 microg/L en el medio de cultivo. También reporta su teratogenicidad en hámsters dorados, ratones y ratas, donde las principales malformaciones fueron defectos de ojo (anoftalmia y microftalmia), exencefalia, agenesis renal y gonadal, así como malformaciones en costillas y vértebras. Asimismo, cuando se introduce en huevos de pájaro fertilizados, el arsénico causa malformaciones en pico y cerebro. Fowler (1977) reporta que la inyección de  $\text{As}^{+5}$  en hámsters, ratones y ratas, durante la gestación, produce toxicidad embrional a altas dosis, y anomalías en el desarrollo a bajas dosis, así también reporta una correlación entre la concentración de As en la placenta y cordón umbilical con malformaciones fetales. Hood y Vedel-Macrande (1984) inyectaron ratones preñados intraperitonealmente, en el día 9 ó 12 de gestación, con 12 mg/kg de arsenito obteniendo malformaciones esqueléticas y muertes prenatales. Waldren y cols. (1997) reportan que el arsénico ( $\text{NaAsO}_2$ ) es mucho más mutagénico en células de hámster chino que el cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) y el plomo ( $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ). Quiterio (2005) sometió ratas preñadas a 0.50, 943.95 y 1887.90 mg/L de arseniato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ ) en el agua de beber, encontrando que con la dosis mas alta hubo mayor daño reproductor en la madre debido a las reabsorciones que impedían la continuación del

desarrollo embrionario, y con las otras dosis hubo falta de osificación en costillas, esternones, metacarpos, falanges anteriores, metatarsos, falanges posteriores y vértebras sacras, en los fetos.

#### VI.10. LATERALOGÉNESIS EN EL PEZ CEBRA

Amsterdam y cols. (1997) llevaron a cabo la mutagénesis insercional en pez cebra que consiste en aplicar un retrovirus que infecta las células de los embriones e inserta aleatoriamente fragmentos de DNA en su genoma, algunas de estas inserciones se colocan interrumpiendo genes del desarrollo, produciendo imitantes, e identificándose fácilmente a los genes responsables de la mutación. En un ensayo piloto en el que se obtuvieron ocho mutantes (Allende y cols., 1996; Amsterdam y cols., 1997; Gaiano y Hopkins, 1996; Lin y cols., 1994), se demostró que por cada 100 inserciones se puede generar una mutante en el desarrollo del pez cebra. En la figura 4 se pueden observar algunos ejemplos de los resultados de éstos estudios.



**FIGURA 4.** Ejemplos de **mutaciones** en **pez cebra** producidas por **inyección** de retrovirus. **Wt:** normal, **mut:** mutante. Maldonado, 2003.

Los fenotipos observados corresponden a un menor crecimiento general (A) y un crecimiento exagerado de las aletas (B). En C se observan alevines de 3 días de edad en los que se aprecian defectos en el desarrollo del pronefros (precursor del riñon en peces), el gen mutado corresponde a HNF1p. En O se observa el efecto de la mutación del factor caudal en embriones de 24 horas de desarrollo. En E la falta del gen N-caderina tiene efectos en la formación del cerebro del pez, aquí se aprecia como los axones que van del ojo al tectum están alterados. En F hay un mutante con defectos en la formación de la mandíbula (flechas rojas) y en donde



el hígado no se forma (flecha verde), el gen mutado no se ha estudiado con anterioridad. En G y H, por la inserción retroviral en el gen neurogenina, se produce mutación en el ojo.

Para identificar el gen que tiene una mutación, se corta el DNA en fragmentos y se localiza el fragmento que alberga la inserción y que provoca el fenotipo mutante. Como el DNA que flanquea por ambos lados a la inserción corresponde al gen mutado, es posible basarse en su secuencia para determinar de qué gen se trata, lo anterior se logra a partir de comparaciones con las bases de datos genómicas.

Maiwald (1997) expuso embriones de pez cebra a 1.2 mg/L de p-tert-butilfenol y observó una hipopigmentación de todos los pigmentos celulares dependiente de la concentración, Zeller (1995) los expuso a 1000 mmol/L de propanolol y presentaron espina bífida. Asimismo, Bachmann (2002) los expuso a 0.24 mmol/L de cloruro de metilmercurio durante 48 horas observándose escoliosis, a 0.12 mM/L de ácido valproico durante 24 horas se presentaron deformaciones de cola y cabeza, y a 62.2 mM/L de dietilen glicol dimetil éter por 120 horas retardo del crecimiento en el embrión. Por otro lado, Oberemm (2000) los sometió a 0.1% de un extracto acuoso crudo del alga verde azul *Aphanizomenon flosaquae liofilizada*, obteniendo una exogastrulación, defectos en el tubo neural y retardo en el desarrollo del embrión.

Por otra parte, Beckman y Twichell (2004) incubaron embriones de pez cebra, con cortón y sin cortón, en 9.29, 18.58, 37.16, 74.33 y 148.67 mg de As V (como arseniato de sodio), observando que a las 96 horas después de la fertilización no hubo deformidades y que la mortalidad no mostró correlación con la concentración de As, excepto malformaciones aisladas 24 horas después de la fertilización como embriones prematuros a 148.67 mg y un embrión carente de la parte caudal a 18.58 mg de As (ver figura 5). También mencionan que en otras investigaciones sugieren que se requiere descorionar los huevos para una exposición efectiva del embrión a ciertos químicos y que el cortón retarda el libre intercambio de solutos dentro y fuera del espacio intercoriónico.

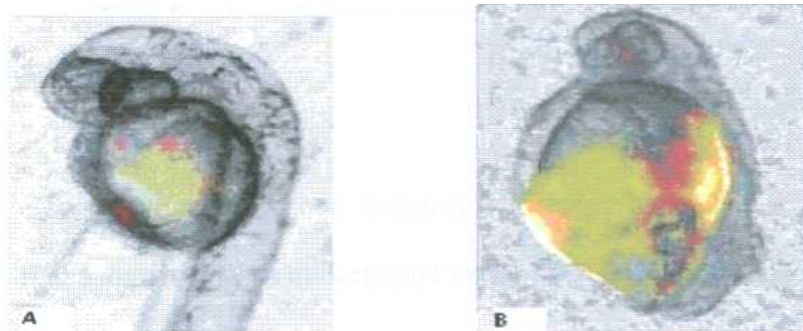


FIGURA 5. Embriones de pez cebra 24 horas después de la fertilización y expuestos a As V. A) Embrión prematuro en 148.67 mg de As, B) Embrión carente de la parte caudal en 18.58 mg de As.

#### VI. 11. LOS BIOMARCADORES Y LOS PECES COMO BIOMONITORES

Cuando deseamos conocer la identidad de los agentes mutagénicos presentes en el ambiente, la magnitud de la exposición, la dosis biológicamente activa y los cambios biológicos que inicialmente provocan, se deben utilizar metodologías que permitan evaluarlos. Para ello resulta útil encontrar marcadores de daño a la salud del individuo que puedan traducirse en la detección temprana y prevención (Guzmán, 1997).

Un biomarcador se define como cualquier alteración biológica que puede ser medible en tejidos, células o fluidos corporales (Hulka, 1990); estas alteraciones pueden ser usadas como indicadores de exposición ambiental que reflejen los efectos adversos tempranos, tales como daño celular. Esto es importante para los casos de estudios poblacionales donde existe un período de latencia que generalmente es muy largo entre la exposición y la aparición del efecto. Los biomarcadores tienen la ventaja de poder cuantificar los efectos iniciales en células y tejidos expuestos a agentes citotóxicos, genotóxicos u otros. Estos

parámetros se pueden clasificar de manera general en:

Indicadores de exposición: permiten conocer las dosis de exposición de los organismos a contaminantes ambientales externos o internos.

Indicadores de efectos: alteraciones que sufren los sistemas biológicos a nivel bioquímico, fisiológico y genético (estructural o numérico) y se utilizan para evaluar el riesgo potencial o efectivo por la exposición a un agente xenobiótico.

Indicadores de susceptibilidad: son marcadores biológicos que permiten conocer una limitación heredada o adquirida de la capacidad de un organismo para responder a la exposición de un agente xenobiótico específico.

Respecto a los biomonitores, los peces se han utilizado en estudios de biología molecular como modelos de enfermedades humanas, detección de contaminantes, biofactorías de productos farmacéuticos y mejora como alimento (ver cuadro 3) (Burkhart, 2000; Hackett y Alvarez, 2000).

**CUADRO 3. Aplicaciones de la biología molecular en peces. Rocha y cols., 2001.**

APLICACIONES	EJEMPLOS	ESPECIES
Mutantes como modelos biomédicos	- Anemia - Talasemia - Porfiria - Malformaciones en corazón - Diabetes	Pez cebra Medaka
Detección de contaminación	- Metales - Aromáticos - Compuestos electrófilos	Pez cebra Medaka
Biofactorías	- Productos farmacéuticos (antiviricos, bióticos, vacunas, hormonas) - Productos industriales (pegamentos, etc.)	Salmón Trucha Dorada Lobina Rodaballo
Mejoras para alimento (Acuicultura)	- Biología (crecimiento, % carne, conversión pienso, fecundidad) - Apariencia externa (sabor, olor, textura, ácidos grasos)	Salmón Trucha Dorada Lobina Rodaballo

En pez cebra (ver figura 6) se conocen estudios en el desarrollo del órgano pineal, la retina, el sistema olfatorio y el sistema mandibular. En trabajos recientes, en que se aprovechan sus ventajas para estudios genéticos y celulares, hay avances en el entendimiento de las bases genéticas del desarrollo de los órganos sensoriales. Este modelo genético es un puente entre los animales más estudiados: entre la *Drosophila* (mosca)/ *Caenorhabditis* (gusano) y el ratón/hombre. Dicho pez es único para obtener y mantener miles de mutantes gracias a sus especiales características (cuadro 4), y se conoce casi la completa secuenciación de su genoma. Muchos de sus mutantes se parecen a enfermedades genéticas caracterizadas en el hombre, por lo que es un poderoso instrumento para ahondar en las correspondientes patologías humanas (Rocha y cols., 2001).



FIGURA 6. Aspecto de peces cebra adultos en un acuario.

CUADRO 4. Características del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo para investigaciones en biología molecular de peces. Rocha y cols., 2001.

CONCEPTOS	VALORES
Mantenimiento	Bajo costo
Espacio	Pequeño: 30 animales/20 L
Maduración sexual	A los 4 meses después de la eclosión
Reproducción	Controlable por alimentación y luz
Descendencia	200-400 huevos/hembra/2 semanas
Desarrollo embrionario	Documentado a nivel genético
Tiempo de desarrollo del embrión	3-4 días
Características de los embriones	Transparentes
Alimentación	Seco y vivo
Stock de mutantes	Actualmente miles
El genoma del pez cebra es de $\sim 1.7 \times 10^9$ pb (el del humano es de $\sim 3 \times 10^9$ pb).	

Por ejemplo, uno de sus estudios permitió el aislamiento del gen SAU; los mutantes de este gen tenían células rojas en la sangre pero no fabricaban hemoglobina. Pacientes humanos con mutaciones en su correspondiente gen tienen una enfermedad muy similar al mutante SAU del pez cebra, llamada anemia sideroblástica congénita. Ello permitió establecerlo como el primer modelo animal de esta enfermedad genética humana. Otros fenotipos de mutantes de pez cebra se han descubierto con enfermedades paralelas en humanos tales como la porfiria,  $\beta$ -talasemia, anemia hipocrómica, deformaciones de la aorta, riñón policístico, etc. (Barbazuk y cols., 2000). Actualmente se estudian diferentes órganos y sus mutantes para detectar similitudes entre el pez cebra y el hombre, lo que aportará posibles soluciones a numerosas enfermedades genéticas (Zon, 2000). Aunque se sabía que el genoma del hombre y el del ratón contenían regiones de genes muy similares (sinténicos), no se esperaba que las estructuras de los cromosomas del pez cebra se parecieran tanto a las humanas (Barbazuk y cols., 2000). Es por ello que se pueden buscar genes candidatos a enfermedades en regiones cromosómicas humanas definidas por mutaciones en dicho pez, ya que no es posible ni deseable experimentar en humanos (Dooley y Zon, 2000).

Además, se han utilizado para estudiar los efectos de los contaminantes, ya que los peces cebra modificados genéticamente expresan una proteína fácilmente detectable cuando aumentan los niveles de metales pesados, compuestos aromáticos o electrófilos, los cuales inducen los promotores de éstas proteínas (Amsterdam, y cols., 1995; Peters y cols., 1995). Cuando aumenta la concentración, por ejemplo de cadmio, el promotor se activa y se produce B-galactosidasa en el pez (Carvan y cols., 2000)

## VII HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### Vil. 1. HIPÓTESIS

Sí en la zona de Zimapán hay contaminación por arsénico, entonces el agua del pozo "Zimapán 5" causará bioconcentración del metaloide, genotoxicidad así como teratogénesis en el pez cebra (*Danio rerio*).

### VII.2. JUSTIFICACIÓN

El arsénico (As) es un carcinógeno al que están expuestos numerosos grupos humanos en el mundo y cuya actividad genotóxica ha sido demostrada en grupos de individuos expuestos (Del Razo, 1990). Es absorbido por el pulmón, sistema gastrointestinal y piel, cruza la barrera placentaria y provoca daño fetal (Galváo y Corey, 1987; Katzung, 1993).

La Organización Mundial de la Salud ha llegado a la conclusión de que uno de cada 10,000 habitantes tiene riesgo de adquirir cáncer de piel debido a la ingestión diaria de agua con una concentración de 0.002 mg de As/L (Batsheba, 1996); por consiguiente, el límite máximo permisible de arsénico para el agua destinada al consumo humano se ha reducido hasta en 0.010 mg/L (WHO, 1997) y en México a 0.025 mg/L (Secretaría de Salud, 2000).

La cabecera municipal de Zimapán consta de 11,818 habitantes (INEGI, 2000) los cuales están expuestos al agua, contaminada principalmente por As, que es utilizada para el consumo humano y algunas actividades agropecuarias. En el agua "potable" del pozo "Zimapán 5" (APZ5), que abastece al distribuidor general de la cabecera municipal las 24 horas del día, se han detectado concentraciones de

As de 395 a 630 ( $\mu\text{g/L}$ ) (Armienta y cols., 1993; Ramos, 1996; Pérez, 2004) según la época del año, lo cual excede de 39.5 a 63 veces más el límite establecido de 10  $\mu\text{g/L}$  (WHO, 1997). Estas concentraciones son mayores a las encontradas en otras zonas de México y en otros países donde se han reportado daños importantes a la salud acuática y al hombre. A partir de diversos estudios epidemiológicos se ha concluido que se requieren más de 400  $\mu\text{g}$  de As por día para causar afectaciones en la salud, por ejemplo, en Bengala se observó la aparición de hiperpigmentación en la población debido a la ingestión de agua con una concentración de 200  $\mu\text{g As/L}$  durante un año (Stohrer y Gerhard, 1991).

Hasta la fecha (2005) el As en el agua "potable" del pozo "Zimapán 5" no se ha eliminado y la población de la cabecera municipal ya tiene más de 12 años consumiéndola desde que se conocieron los niveles de contaminación. Armienta y cols. (1997) muestrearon 120 habitantes de Zimapán y encontraron que 96 presentaban algún grado de afectación en la piel (hiperpigmentación, hipopigmentación e hiperqueratosis).

Por lo anterior se considera importante evaluar la bioconcentración, así como el daño genotóxico y teratogénico que el As del pozo "Zimapán 5" causa, utilizando un biomonitor con estructuras cromosómicas muy parecidas a las del hombre como el pez cebra.

### VII.3. OBJETIVOS

#### VII.3.1. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la bioconcentración, así como el efecto genotóxico y teratogénico inducido por el arsénico presente en el agua "potable" del pozo "Zimapán 5", utilizando al pez cebra (*Danio rerio*) como biomonitor.



### VII.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- A) Determinar y caracterizar las propiedades fisicoquímicas del agua del pozo "Zimapán 5" (APZ5) y del pozo de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (APUAEH) como control negativo.
  
- B) Analizar y evaluar la concentración de As total en el agua y la bioconcentración de éste en pez cebra, de acuerdo a los tratamientos, como parte del estudio de genotoxicidad.
  
- C) Determinar la frecuencia de inducción de micronúcleos en células branquiales del pez cebra, como un bioindicador de genotoxicidad.
  
- D) Cuantificar el porcentaje de huevos no viables y óvulos, eclosión, recién eclosionados y adultos con malformaciones, así como el porcentaje de adultos supervivientes, en el estudio de teratogénesis.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### VIII. 1. CARACTERIZACIÓN MICROBIÓLOGO Y FISCOQUÍMICA DE LAS AGUAS DE LOS POZOS DEL ESTUDIO.

Se realizaron muestreos mensuales del APZ5 y del APUAEH, el segundo localizado en Ciudad Universitaria (Pachuca, Hidalgo, México), durante los meses de Febrero 2003 a Enero del 2004. La conductividad, temperatura y turbidez se midieron en campo con un analizador multiparamétrico marca Horiba modelo U-10, el sabor y olor se detectaron por análisis sensorial *in situ*. Se realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos y microbiológicos, de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas y métodos estándar internacionales: bicarbonatos (por diferencia entre la dureza total y la dureza calcica), cloro residual libre (NOM-201-SSA1-2002, método volumétrico con n,n-dietil-p-difenildiamina), cloruros (NMX-AA-073-SCFI-2001, método volumétrico con  $\text{AgNO}_3$ ), conformes fecales y totales (NOM-112-SSA1-1994, técnica del número mas probable), color (NOM-201-SSA1-2002, con comparador de discos), dureza calcica (American Public Health Association y cols. 1998, método volumétrico del EDTA), dureza total  $\text{CaCO}_3$  (NMX-AA-072-SCFI-2001, método volumétrico del EDTA), mesófilos aerobios (NOM-092-SSA1-1994, método de cuenta en placa), nitrógeno de nitrato (NMX-AA-079-SCFI-2001, método colorimétrico), nitrógeno de nitrito (NOM-201-SSA1-2002, método colorimétrico con sulfanilamida), pH (NMX-AA-008-SCFI-2000, método potenciométrico), sólidos disueltos totales y sólidos totales (NMX-AA-034-SCFI-2000, método gravimétrico) y sulfatos (American Public Health Association y cols. 1998, método turbidimétrico con  $\text{BaCl}_2$ ).

ARSÉNICO. Para la determinación de As se obtuvieron muestras de agua de 100 ml por triplicado, se preservaron en ácido nítrico al 3%, se les hizo una prereducción (para convertir el  $\text{As}^{+5}$  en  $\text{As}^{+3}$ ) y luego se analizaron por espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros (en un

espectrofotómetro marca Varían modelo SpectrAA 880), previa elaboración de una curva estándar con los siguientes patrones: 0,5,10, 20,30,40, 50, 60 y 70  $\mu\text{g/L}$  de As. Para la prereducción, a 10 ml del APUAEH o a 5 ml del APZ5 se le agregaron 2 ml de ácido nítrico concentrado, 2 ml de ácido clorhídrico concentrado, 2 ml de KI al 25% y 2 ml de ácido ascórbico al 25%, con posterior aforo a 50 y a 100 ml con agua desionizada, respectivamente, de la misma manera se preredujeron los patrones aforando a 50 ml. La generación de hidruros se realizó con borohidruro de sodio al 0.6%-NaOH al 0.5% y HCl 5 M (American Public Health Association y cols., 1998; Nólte, 1991).

MERCURIO. Se analizó por espectroscopia de absorción atómica con vaporino con las mismas muestras de agua preservadas al 3% en ácido nítrico sin diluir, utilizando como agente reductor SnCb al 25% en HCl al 25%. Previamente se preparó una solución madre de 10,000  $\mu\text{g/L}$  y una solución intermedia de 100 ( $\mu\text{g/L}$  de Hg, a partir de la cual se hizo una curva con los siguientes patrones: 0,4,6,10,20,40 y 50  $\mu\text{g/L}$  de Hg (Evans y cols., 1986).

OTROS METALES. La determinación de otros metales se realizó por espectroscopia de emisión con acoplamiento inductivo de plasma (ICP), en un equipo Perkin Elmer modelo Óptima 300 XL, con las mismas muestras de agua preservadas al 3% en ácido nítrico, a partir de las cuales se tomó una alícuota de 10 ml a la que se le agregó 1 ml de ácido nítrico concentrado y se aforó a 25 ml con agua. Para este análisis previamente se preparó una solución madre multielemento con una concentración de 25 mg/L de Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb y Zn, a partir de la cual se prepararon los siguientes patrones multielemento de 25 ml para elaborar una curva: 0.00, 0.05, 0.10, 0.30, 0.50, 1.00, 1.50 y 3.00 mg/L, preservados con 1 ml de ácido nítrico concentrado (Cunniff, 1995).

## VIII.2. EXPOSICIÓN DE *Danio rerio* A ARSENIATO DE SODIO DIBÁSICO ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

Para este estudio se obtuvieron peces cebra de 4 meses de edad con un peso promedio de 0.2 g. Cincuenta y cinco ejemplares fueron colocados en cada uno de 3 tratamientos; uno para el control negativo (APUAEH sin adición de As), otro para el control positivo (APUAEH con una concentración de 5055 microg/L de As total, previa adición de 5047  $\mu\text{g}$  As/L como arseniato de sodio dibásico de la marca Baker analyzed lote 641366), y finalmente el tratamiento con el APZ5 (con una concentración inicial de As de 451.40  $\mu\text{g/L}$ ). Durante 180 días los peces fueron mantenidos a  $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ , con aireación permanente, iluminación natural y artificial, 20 L de agua por tratamiento, y alimentación con hojuelas secas Tetramin 2 veces al día (Hepher y Pruginin, 1998; Nagel, 2002). El primer cambio total de agua fue hasta los 30 días y posteriormente cada 5 días.

Se determinó la concentración de As total en aguas y peces sin branquias (en base seca) a los 0,1,2,3, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días por espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros (con  $\text{NaBH}_4$  al 0.6%- $\text{NaOH}$  al 0.5% y  $\text{HCl}$  5 M) previa prerreducción con 1 ml de  $\text{HCl}$  conc, 1 ml de  $\text{KI}$  al 25% y 1 ml de ácido ascórbico al 25% aforando después a 25 ml con agua desionizada (American Public Health Association y cols., 1998; Nólte, 1991).

Antes de la prerreducción, las alícuotas de agua muestreadas fueron preservadas y diluidas en matriz nítrica al 3%. Por su parte, a 5 peces de cada tiempo y tratamiento se les extrajeron las branquias (para ocuparlas en el estudio de inducción de micronúcleos), se secaron a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  en estufa, luego se digirió cada pez seco en un horno de microondas (marca CEM modelo MARSX a 170 PSI de presión máxima,  $200\text{ }^\circ\text{C}$ , con 10 min para equilibrar la presión y temperatura, 5 min de digestión y 5 min de enfriamiento) con 5 ml de ácido nítrico concentrado y posteriormente se hizo la prerreducción del digestado. De la misma manera se analizó en una sola ocasión el contenido de As total en 0.5 g de

alimento seco para alevín y pez adulto, por triplicado. Por otra parte se digieren en una sola ocasión 0.5 g de alimento y peces secos (antes de iniciar el experimento), por triplicado, para los análisis de Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Hg, y Pb.

La metodología del experimento se muestra en la figura 7:

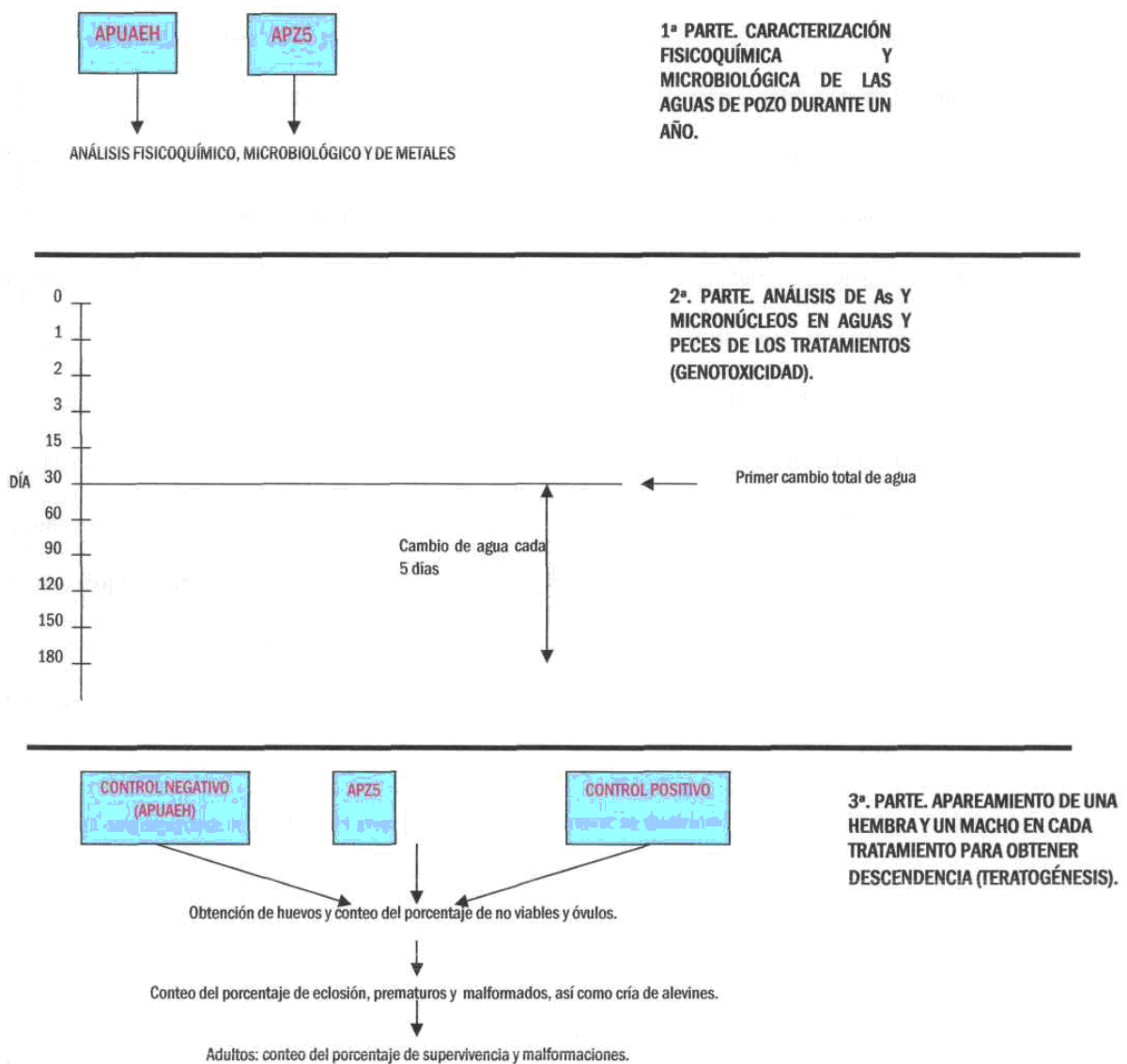


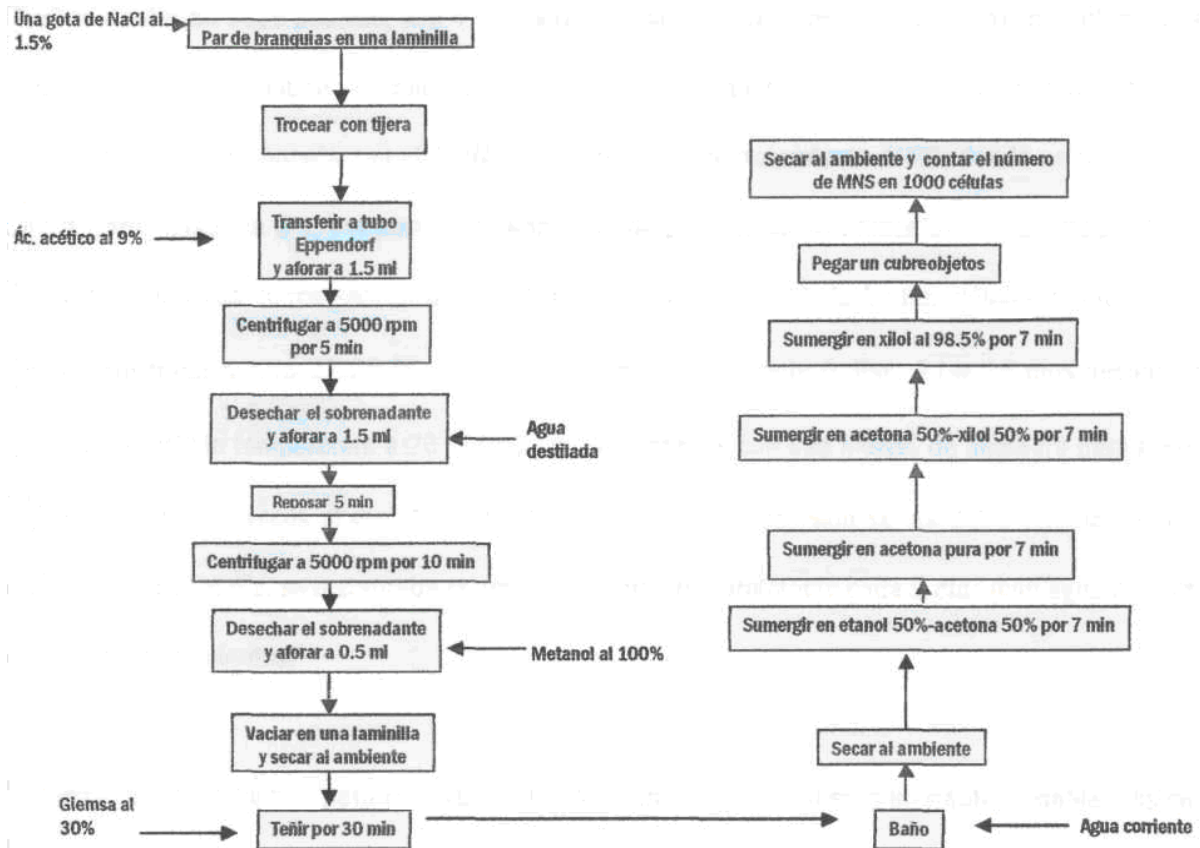
FIGURA 7. Esquema del desarrollo experimental.

### VIII.3. GENOTOXICIDAD.

Se analizó la FMNS en células branquiales a los 0,1,2,3,15,30,60,90,120,150 y 180 días, para lo cual se obtuvieron 5 ejemplares de cada tiempo y tratamiento, a los que se les extrajeron las 2 branquias.

Cada par de branquias fue colocada en una laminilla con una gota de solución de NaCl al 1.5%, luego se trocearon finamente con una tijera, se transfirieron a un tubo Eppendorf, se aforó a 1.5 ml con ácido acético al 9%, se centrifugó 5 min a 5000 rpm, se desechó el sobrenadante, se aforó a 1.5 ml con agua destilada, se dejó reposar 5 min, se centrifugó nuevamente 10 min a 5000 rpm, se desechó el sobrenadante, se aforó a 0.5 ml con metanol al 100%, se agitó y se vació el contenido en una laminilla, se dejó secar a temperatura ambiente, luego se sumergió la laminilla en un baño de colorante Giemsa al 30% (diluyendo 30 ml de la solución concentrada comercial de Giemsa con 70 ml de solución amortiguadora de Sorenson\*) durante 30 min, luego se retiró el exceso de colorante colocando la laminilla en un baño de agua corriente, se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se sumergió la laminilla 7 min en cada uno de los siguientes baños: 50% etanol a 99° y 50% acetona pura, acetona pura, acetona al 50% y xilol al 50%, finalmente xilol al 98.5%. Posteriormente se pegó a la laminilla un cubreobjetos con resina, se dejó secar y se contaron 1000 células en un microscopio óptico con una magnificación 400 X para registrar el número de micronúcleos (frecuencia en 1000 células). Los núcleos y micronúcleos se apreciaron de un color morado. En la figura 8 se muestra un diagrama de esta metodología.

\* La solución amortiguadora de Sorenson se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 0.4535 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.8935 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  con agua destilada, se aforó a 100 ml, se homogenizó y finalmente se ajustó el pH a 7.4.



**FIGURA 8. Diagrama del procedimiento para teñir núcleos y micronúcleos.**

El siguiente criterio fue aplicado: a) los MNS deben estar a menos de 1/3 del diámetro del núcleo principal, b) estar en el mismo plano de enfoque, c) tener el mismo color, textura y refracción que el núcleo principal, d) tener forma oval o redonda, y e) estar claramente separados del núcleo principal.

#### VHI.4.TERATOGENESIS

Para este estudio se prepararon 3 peceras con los tratamientos control negativo, control positivo y APZ5. En cada una se colocó una maternidad con una hembra y un macho a 28-29 °C, con aireación permanente, iluminación natural y artificial 12 h/día, 7.3 L de agua, alimentación con hojuelas Tetramin dos veces al día y

cambio total de agua cada 5 días. Cuando había desove los huevos se contaban con un microscopio y se colocaban dentro de otras peceras, con 4 L de agua, en las mismas condiciones de los tratamientos de sus padres. Cuando erosionaban se contaban los alevines y se mantenían en las mismas condiciones, pero restaurando el agua evaporada con el APUAEH (excepto para el tratamiento APZ5, donde se restauraba con agua del pozo "Zimapán 5"), y a partir del cuarto día de la eclosión se alimentaban tres veces al día con aumento para alevines marca será. A partir del noveno día después de la fertilización se mantenían en las mismas condiciones pero a 27-28 °C, con cambio total de agua cada 6 días. A los 24 días después de la eclosión se reducía la temperatura a 26 ±1 °C y se alimentaban con una mezcla de alimento para alevines y hojuelas Tetramin dos veces al día. A los 30 días después de la eclosión se les daba solamente hojuelas Tetramin dos veces al día, se restauraba el agua y se cambiaba totalmente cada 5 días (con agua del APUAEH para todos los tratamientos).

Se contaron los huevos para el cálculo del porcentaje de óvulos, huevos no viables y viables. Asimismo, se contaba el porcentaje de recién eclosionados totales y malformados, adultos supervivientes totales y con malformaciones, así como el tipo de malformación. En la figura 9 se muestra un esquema del estudio de teratogénesis.

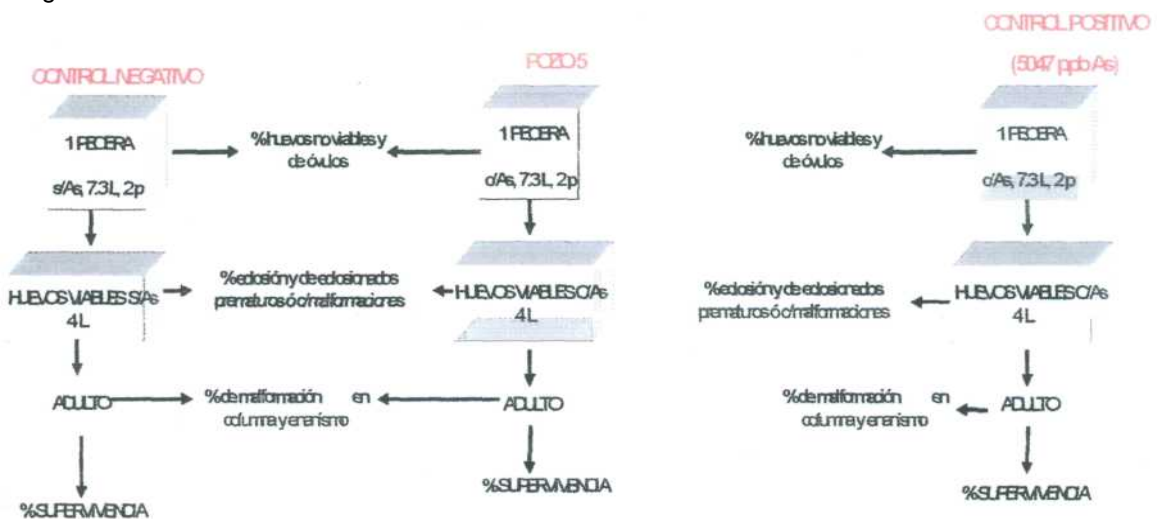


FIGURA 9. Diagrama del estudio de teratogénesis.



## ***IX. RESULTADOS***

### **IX. 1. CARACTERIZACIÓN DEL AGUA DE LOS POZOS APZ5 Y APUAEH.**

Los resultados de la caracterización de las aguas se presentan en el cuadro 5. En todos los casos se reportan resultados de tres réplicas por mes, durante 12 meses ( $n = 36$ ). Se observa que parámetros tales como pH, conductividad, sólidos disueltos totales, sólidos totales, nitratos, nitritos, cloruros, entre otros, resultan más altos en el APUAEH que en el APZ5, lo que pone de manifiesto que la primera está más salinizada pero cumple con los parámetros establecidos por la norma mexicana para agua de uso y consumo humano (Secretaría de Salud, 2000). En ambas aguas la mayoría de los parámetros evaluados se encuentran por debajo de los límites permisibles establecidos por dicha norma. En ambos casos se trata de aguas bicarbonatadas cálcico-magnésicas, indicándose que el APUAEH es de mayor contenido calcico que magnésico.

CUADRO 5. Promedio y coeficiente de variación de los análisis de caracterización del agua de los pozos APZ5 y APUAEH (Febrero 2003-Enero 2004).

ANÁLISIS	NOM	APZ5	APUAEH
Al ( $\mu\text{g/L}$ )	< 200	22.00 (6.10)	2.19 (54.35)
As ( $\mu\text{g/L}$ )	< 25	* 480.00 (2.20)	* 8.55 (79.66)
Ba ( $\mu\text{g/L}$ )	< 700	48.00 (3.10)	9.44 (16.40)
Ca <sup>2+</sup> (mg/L)	NN	28.32 (38.62)	17.69 (27.12)
Cd ( $\mu\text{g/L}$ )	< 5	< 2	2.085 (0.004)
Cl <sup>-</sup> (mg/L)	< 250	1.11 (7.00)	23.56 (36.16)
Cl <sub>2</sub> residual (mg/L)	0.2-1.5	< 0.02	< 0.02
Coliformes fecales (NMP/100 ml)	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Coliformes totales (NMP/100 ml)	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Color (UPC)	<20	5 (80.12)	2.25 (104.82)
Conductividad (mS/cm)	NN	0.47 (21.67)	0.62 (20.28)
Cr ( $\mu\text{g/L}$ )	<50	4 (0.004)	< 0.219
Cu ( $\mu\text{g/L}$ )	<2000	11 (0.016)	< 0.48
Dureza cálcica (mg/L)	NN	106.60 (2.80)	103.17 (21.97)
Dureza total (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	<500	348.60 (0.90)	199.75 (16.63)
Fe ( $\mu\text{g/L}$ )	<300	260.00 (2.40)	79.01 (11.01)
HCO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (mg/L)	<300	242.00 (8.59)	96.58 (34.79)
Hg ( $\mu\text{g/L}$ )	<1	0.50 (2.68)	< 0.39

\* Diferencia estadísticamente significativa entre medias del APZ5 y APUAEH ( $\alpha = 0.05$ )

**CUADRO 5 (CONTINUACIÓN). Promedio y coeficiente de variación de los análisis de caracterización del agua de los pozos APZ5 y APUAEH (Febrero 2003-Enero 2004).**

ANÁLISIS	NOM	APZ5	APUAEH
K <sup>+</sup> (mg/L)	NN	2.24 (2.20)	2.27 (30.73)
Mesofílicos aerobicos (UFC/ml)		< 100	< 100
Mg <sup>2+</sup> (mg/L)	NN	6.81 (8.04)	9.22 (19.68)
Mn (µg/L)	<150	* 330.00 (2.00)	* 10.11 (57.18)
Na <sup>+</sup> (mg/L)	<200	5.70 (6.35)	7.06 (7.74)
N-NO <sup>2-</sup> (mg/L)	< 1	< 0.002	0.011 (10.1)
N-NO <sup>3-</sup> (mg/L)	<10	0.04 (0.43)	3.61 (62.43)
Olor	Agradable	Agradable	Agradable
Pb (µg/L)	<10	12 (4.00)	< 0.32
pH (Unidades)	6.5-8.5	7.30(0.40)	8.14 (10.11)
Sabor	Agradable	Agradable	Agradable
Salinidad	NN	0.01 (1.50)	0.03 (8.13)
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/L)	<400	48.48 (2.12)	108.43 (70.54)
Sólidos disueltos totales (mg/L)	<1000	244.30 (3.10)	485.80 (14.71)
Sólidos totales (mg/L)	NN	307.30(7.10)	537.73 (11.50)
Temperatura (°C)	NN	25.60 (2.50)	21.52 (7.74)
Turbiedad (UTN)	<5.0	0.50 (1.30)	0.055 (108.68)
Zn (µg/L)	<5000	8.00 (6.20)	4.08 (44.05)

\* Diferencia estadísticamente significativa entre medias del APZ5 y APUAEH ( $\alpha = 0.05$ )

NOM: Límites establecidos por la NOM-127-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 2000).

APZ5: agua del pozo "Zimapán 5". APUAEH: agua del pozo "Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo".

NN: No Normado. Los valores entre paréntesis indican coeficiente de variación:

$CV = (\sum(X_i - X_m)^2 / (n-1))^{0.5} (100) / X_m$  donde  $X_i$  = valor/réplica,  $X_m$  = promedio,  $n$  = número de réplicas/análisis.

## IX.2. EVALUACIÓN DE LA BIOCONCENTRACIÓN DEL ARSÉNICO EN *Danio rerio*.

La exposición al As se inicio en el mes de Septiembre/2003 y concluyó en Marzo/2004, con 6 meses de evaluación. Los resultados se muestran en el cuadro 6.

CUADRO 6. Concentración de As promedio en muestras de aguas y peces sin branquias (en base seca) de los tratamientos negativo, APZ5 y positivo.

CONCENTRACIÓN DE As EN AGUAS EN $\mu\text{g/L}$ Y CV			
Días	Control negativo	APZ5	Control positivo
0	* <1.12	* 451.40 (1.92)	* 5055.96 (1.06)
1	* <1.12	* 429.60 (0.31)	* 4937.20 (0.64)
2	* <1.12	* 417.20 (1.30)	* 4926.10 (0.60)
3	* <1.12	* 388.00 (1.29)	* 4799.30 (1.05)
15	* <1.12	* 322.20 (2.46)	* 4512.40 (0.90)
30 (1er. cambio total de agua)	* <1.12	* 240.00 (2.38)	* 3963.31 (1.17)
60	* <1.12	* 246.69 (2.65)	* 4149.88 (4.51)
90	* <1.12	* 233.11 (3.91)	* 3922.89 (2.54)
120	* <1.12	* 228.33 (4.11)	* 4048.51 (1.96)
150	* <1.12	* 231.67 (3.74)	* 4032.34 (2.80)
180	* <1.12	* 237.19 (2.04)	* 4042.29 (6.49)
CONCENTRACIÓN DE As EN PECES SIN BRANQUIAS EN $\mu\text{g/L}$ Y CV			
Días	Control negativo*	APZ5*	Control positivo*
0	<1.12	<1.12	<1.12
1	* <1.12	* 3.34 (4.18)	* 15.12 (2.12)
2	* <1.12	* 4.87 (1.52)	* 30.75 (4.62)
3	* <1.12	* 10.25 (0.96)	* 50.92 (2.51)
15	* <1.12	* 40.28 (9.16)	* 300.45 (6.79)
30	* <1.12	* 75.85 (1.84)	* 524.93 (10.20)
60	* <1.12	* 101.69 (10.42)	* 1068.25 (6.09)
90	* <1.12	* 212.19 (2.71)	* 2375.73 (3.85)
120	* <1.12	* 223.63 (3.00)	* 2896.03 (4.10)
150	* <1.12	* 364.57 (3.11)	* 3570.08 (3.52)
180	* <1.12	* 397.76 (4.48)	* 4051.93 (1.69)

\* Diferencia estadísticamente significativa entre medias del control negativo, APZ5 y control positivo ( $\alpha = 0.05$ ) (Daniel,

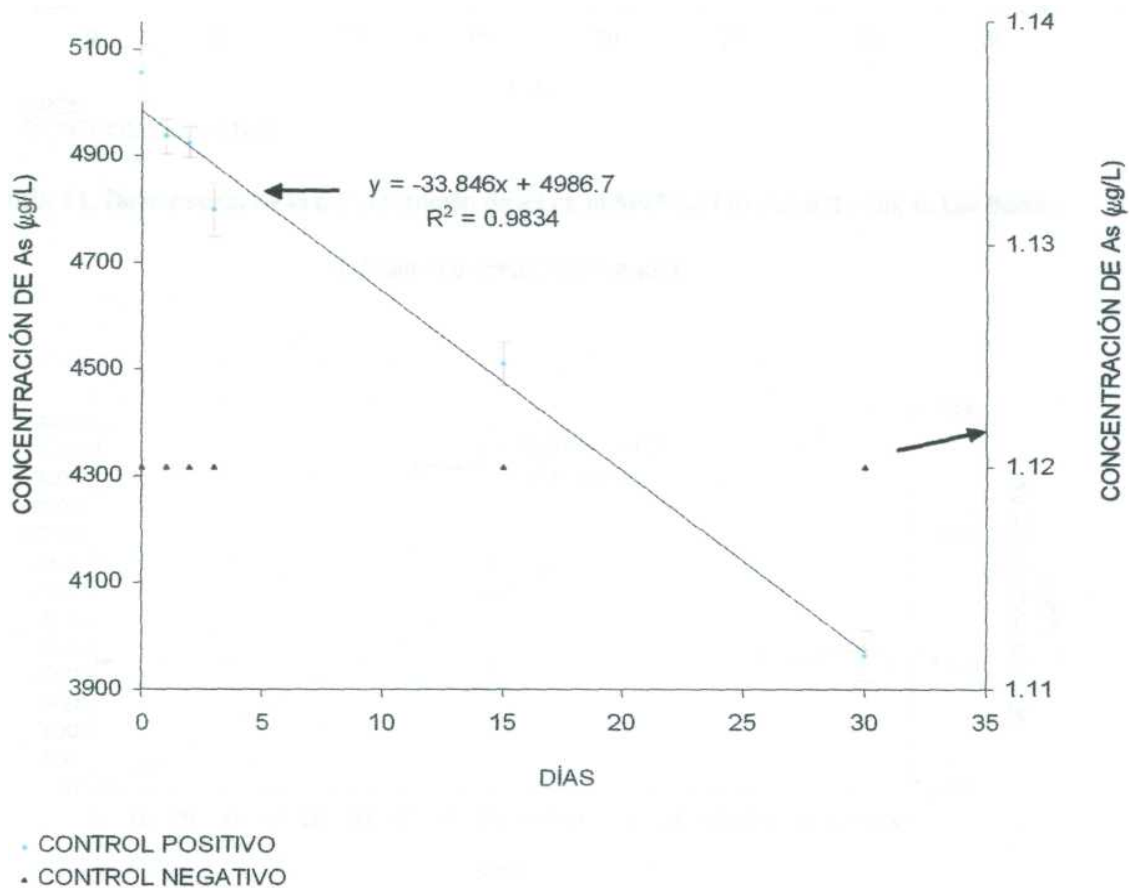
2002).

CV: coeficiente de variación =  $(\sum(X_i - X_m)^2 / (n-1))^{0.5} / X_m$  donde  $X_i$  - valor/réplica,  $X_m$  = promedio,  $n$  = número de réplicas. APZ5: agua del pozo "Zimapán 5".

Los resultados corresponden al promedio de 3 y 5 réplicas para aguas y peces, respectivamente.

Límite de detección = 1.12  $\mu\text{g/L}$

Se pudo observar en el tratamiento APZ5 y positivo el decrecimiento de la concentración de As en el agua con el tiempo, en tanto que en peces se produce un incremento (ver cuadro 6). A los 30 días se observó en el control positivo que 47.94% del As que disminuyó en el agua fue bioacumulado por el pez y el resto fue eliminado por excreción en los sedimentos; similarmente eso pasó con el tratamiento APZ5 donde el 35.35% del As que disminuyó en esta agua fue bioacumulado. En las figuras 10,11,12 y 13 se muestran las disminuciones e incrementos en aguas y peces, así como la ecuación lineal y coeficiente de correlación.



**FIGURA 10.** Disminución de la concentración de As en el agua del control positivo en función del tiempo.

Las barras indican la desviación estándar.

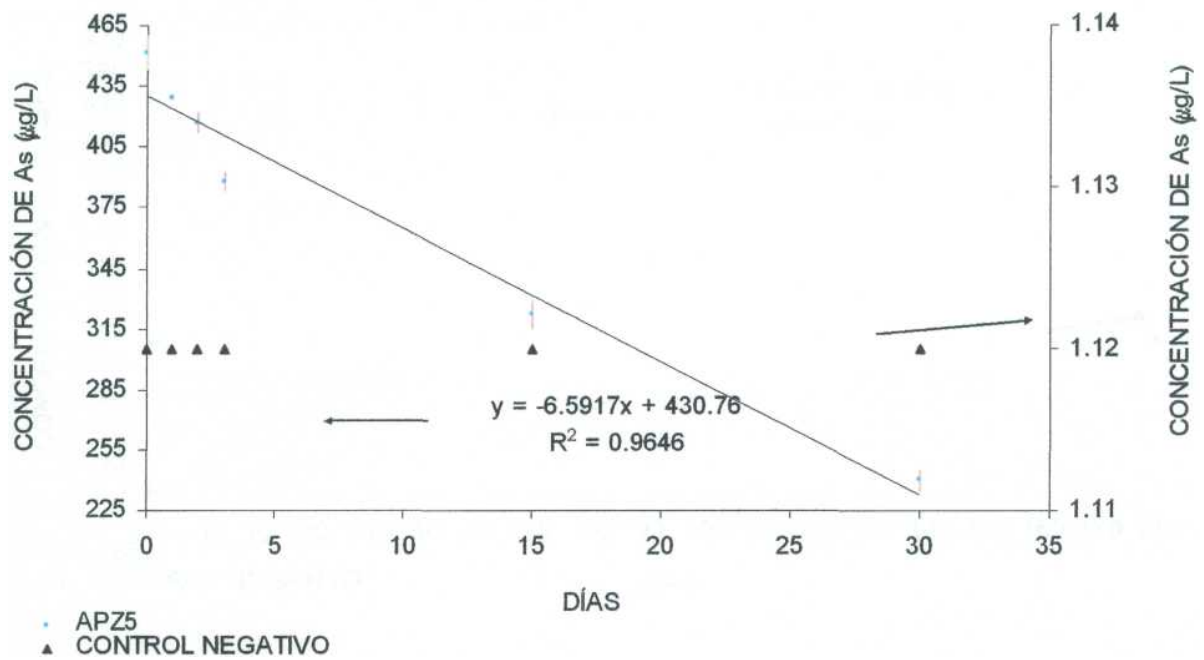


FIGURA 11. Disminución de la concentración de As en el APZ5 en función del tiempo. Las barras indican la desviación estándar.

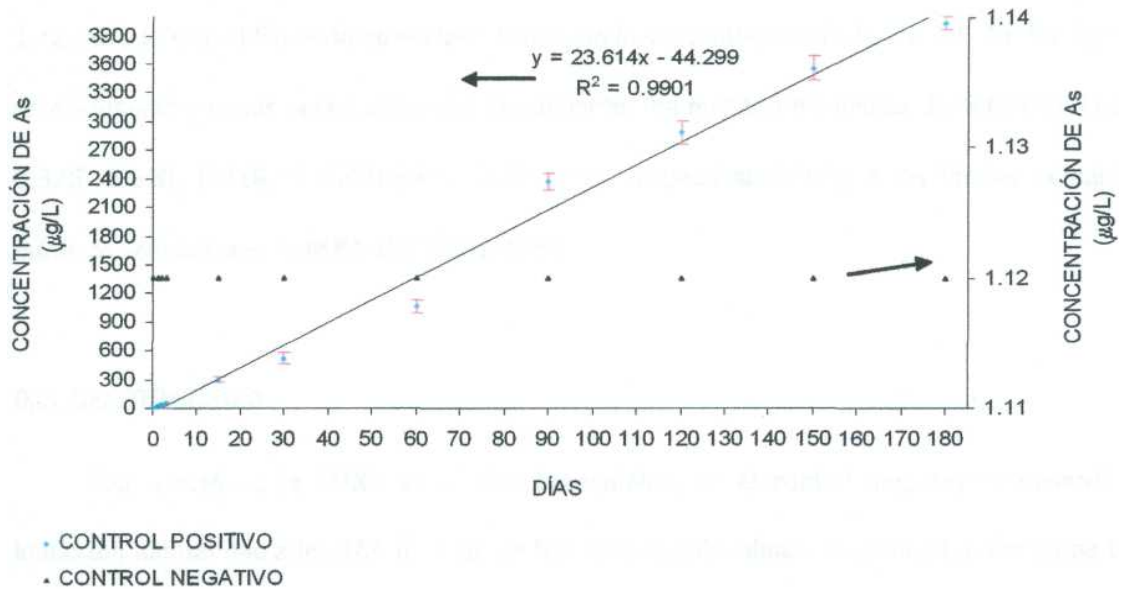
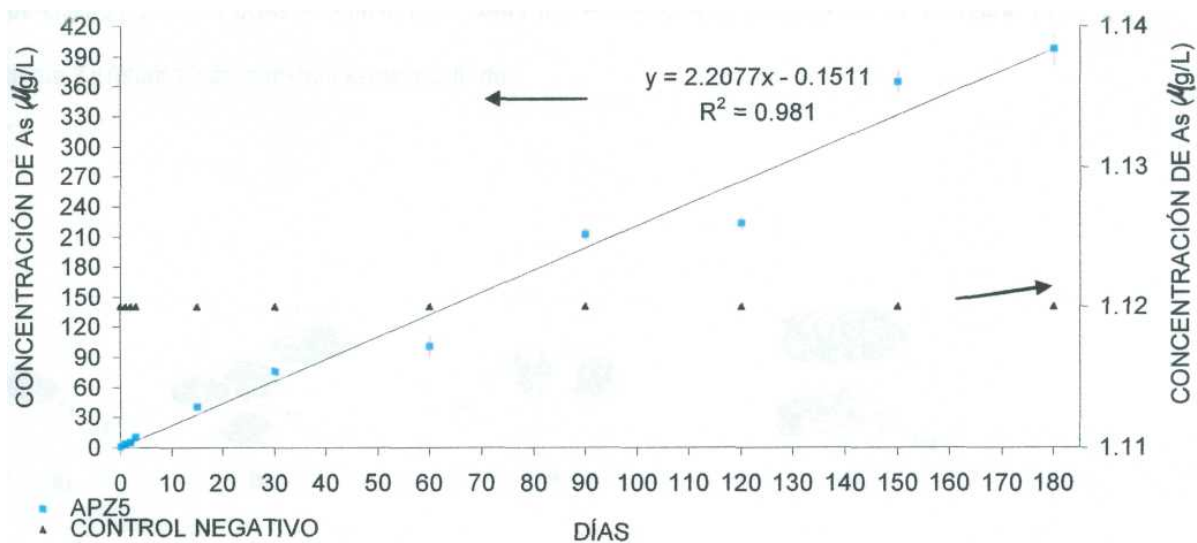


FIGURA 12. Incremento de la concentración de As en peces del control positivo en función del tiempo. Las barras indican la desviación estándar.



**FIGURA 13. Incremento de la concentración de As en peces del APZ5 en función del tiempo. Las barras indican la desviación estándar.**

Por otro lado, la concentración de As en el alimento utilizado para el experimento fue menor a 1.12 µg/L (o sea, el límite de detección). Asimismo la concentración de Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Hg y Pb, en el alimento y en los peces, antes del experimento, fue menor a los límites de detección (1.066, 0.326, 2.000, 0.219, 0.480, 0.390 y 0.32 µg/L, respectivamente) y a los límites permisibles máximos señalados en la NOM-127-SSA1-1994.

### IX.3. GENOTOXICIDAD

Con relación a la FMNS en células branquiales, en el control negativo se observó una inducción natural que a los 180 días fue de 0.8 MNS/1000 células, en promedio. Por su parte, el control positivo presentó una FMNS 163.5 veces mayor que el control negativo, en tanto que en los peces del APZ5 hubo un incremento en la FMNS 56.25 veces mayor que en el control negativo, apareciendo también otras

anormalidades como núcleos lobulados y hendidos. En la figura 14, cuadro 7 y figura 15 se muestran estos resultados.

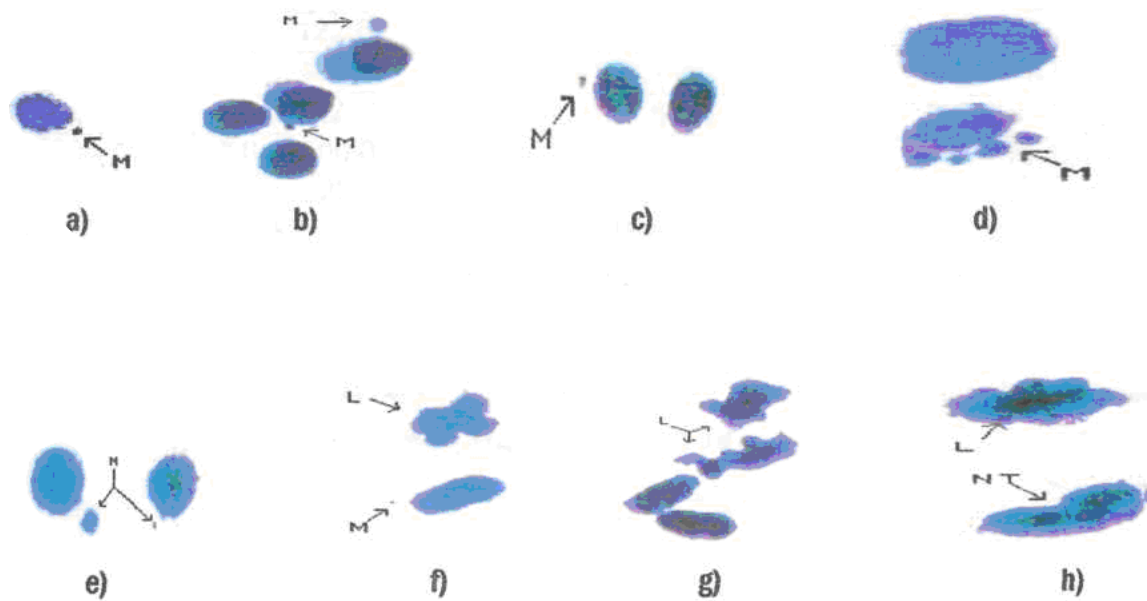


FIGURA 14. Micronúcleos y otras anomalías nucleares en cántalos branquiales del pez cebra de los tratamientos APZ5 y positivo, a, b, c, d, e y f muestran micronúcleos; f, g y h muestran otras anomalías nucleares. M = micronúcleos, NT- núcleo hendido, L = núcleo lobulado. La ampliación es 1000 x.



CUADRO 7, Frecuencia efe micronúcleos promedio en cálalas branquiales en fundón del tiempo.

DÍAS	CONTROL NEGATIVO	APZ5	CONTROL POSITIVO
	MNS/1000 células (CV)	MNS/1000 células (CV)	MNS/1000 células (CV)
0	0.4 (122.5)	0.4 (122.5)	0.4 (122.5)
1	0.8 (50.0)	1.2 (97.2)	2.0 (70.7)
2	* 0.6 (81.6)	2.0 (54.8)	* 2.6 (71.3)
3	* 0.4 (122.5)	* 2.4 (42.5)	* 6.0 (29.8)
15	* 0.6 (81.6)	* 4.4 (49.0)	* 12.0 (19.0)
30	* 0.4 (122.5)	* 10.2 (20.9)	* 24.8 (14.3)
60	* 0.4 (122.5)	* 18.4 (17.7)	* 48.0 (7.5)
90	* 0.4 (122.5)	* 27.6 (13.7)	* 80.2 (5.0)
120	* 0.2 (200.0)	* 32.8 (11.8)	* 95.4 (5.1)
150	* 0.4 (122.5)	* 40.8 (10.0)	* 110.4 (4.9)
180	* 0.8 (50.0)	* 45.0 (14.1)	* 130.8 (4.1)

\* Diferencia estadísticamente significativa entre medias del control negativo, APZ5 y control positivo ( $\alpha = 0.05$ ) (Daniel, 2002).

CV: Coeficiente de variación =  $(\sum(X_i - X_m)^2 / (n-1))^{0.5} / X_m$ , donde  $X_i$  = valor/réplica,  $X_m$  = promedio,  $n$  = numero de réplicas. Los resultados corresponden al promedio de 5 réplicas. APZ5; agua del pozo "Zimapán 5",

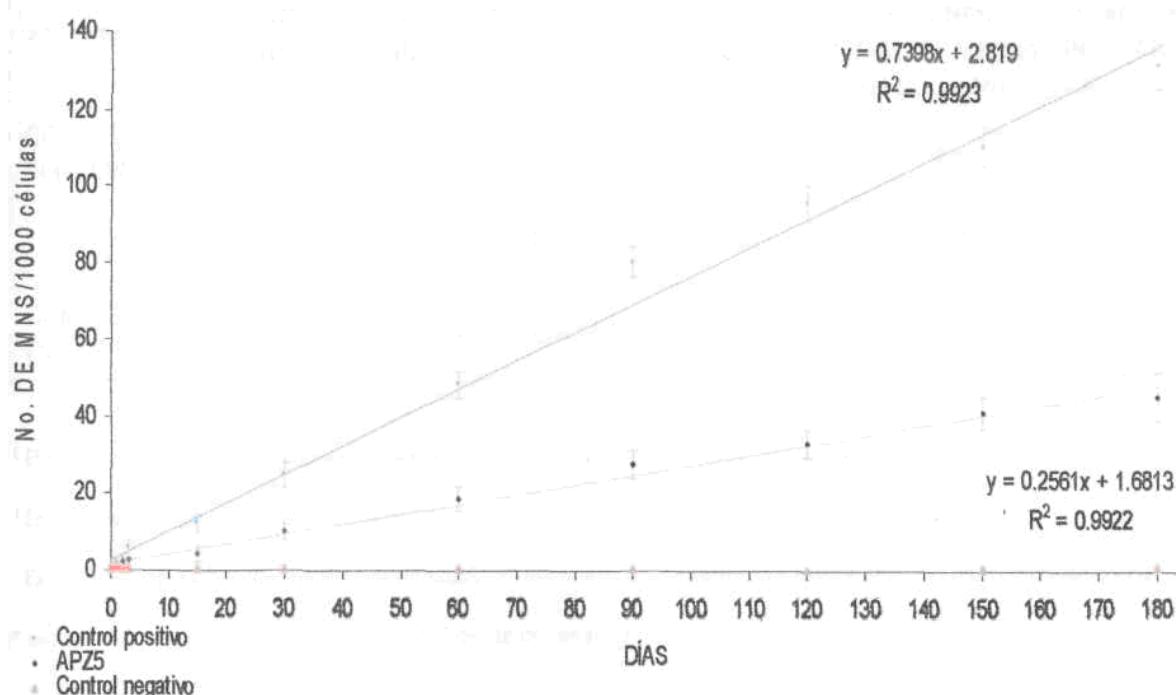


FIG. 15, Cambios en la frecuencia de micronúcleos promedio en células de las branquias del pez cebra en función del tiempo. (Las barras indican la desviación estándar).

#### IX.4. DESOVE, SUPERVIVENCIA Y TERATOGENÉISIS

Se observó que a mayor concentración de As en el agua (237.19-451.40 y 4042.29-5055.96 µg/L en el tratamiento APZ5 y positivo, respectivamente), mayor porcentaje de huevos no viables y óvulos, menor porcentaje de eclosión, mayor porcentaje de alevines recién eclosionados con columna desviada ó prematuros, así como de adultos con columna desviada y enanismo, y menor porcentaje de adultos supervivientes, lo cual se puede observar en los cuadros 8 y 9. Asimismo en los tratamientos APZ5 y positivo el tiempo para eclosionar (a 28-29 °C) fue de 3 días, en contraposición con el control negativo que fue de 2 días.

CUADRO 8. Porcentaje de huevos no viables<sup>1</sup> y viables, óvulos, eclosión<sup>2</sup>, y de alevines recién eclosionados con malformación en columna o prematuros<sup>3</sup>, para los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTO	% HUEVOS NO VIABLES	% HUEVOS VIABLES	% ÓVULOS	% ECLOSIÓN	% ALEVINES C/MALFORMACIÓN EN COLUMNA	% ALEVINES PREMATUROS
CONTROL NEGATIVO	0.7 (15.91)	99.1 (1.2)	0.1 (21.61)	98.2 (1.6)	0	0
APZ5	4.1 (13.29)	96.3 (6.0)	0.3 (19.28)	92.0 (7.9)	2.5 (5.94)	0
CONTROL POSITIVO	18.4 (2.41)	81.5 (5.6)	0.3 (20.55)	78.0 (10.6)	13.6 (8.37)	10.4 (5.05)

<sup>1</sup> El porcentaje de huevos no viables y óvulos se obtuvo en base a la suma total de huevos y óvulos desovados.

<sup>2</sup> Es el porcentaje de eclosión que se obtuvo del total de los huevos viables.

<sup>3</sup> Es el porcentaje de alevines recién eclosionados con malformación en columna ó prematuros, del total de eclosionados.

\* Los números entre paréntesis indican el coeficiente de variación.

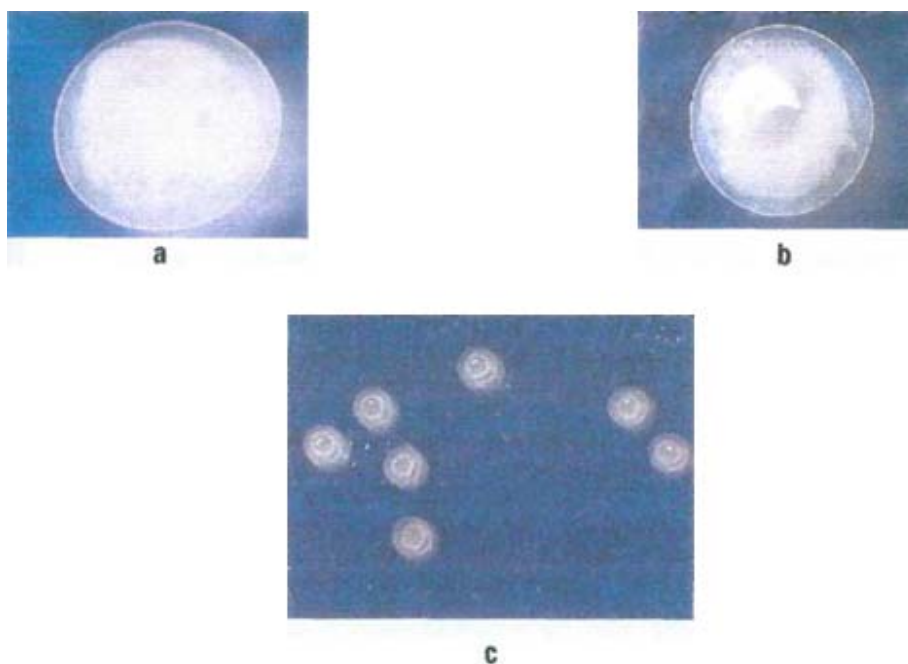
**CUADRO 9. Porcentaje de enanismo<sup>1</sup>, malformación en columna<sup>1</sup> y supervivencia<sup>2</sup> en descendientes adultos, para los diferentes tratamientos.**

TRATAMIENTO	% ENANISMO	% C/MALFORMACIÓN EN COLUMNA	% SUPERVIVENCIA A LOS 6 MESES DE EDAD
CONTROL NEGATIVO	0.0	0.0	12.0
APZ5	100.0	16.0	6.4
CONTROL POSITIVO	100.0	54.5	2.4

<sup>1</sup> Es el porcentaje de adultos con enanismo ó malformación en columna del total de adultos supervivientes.

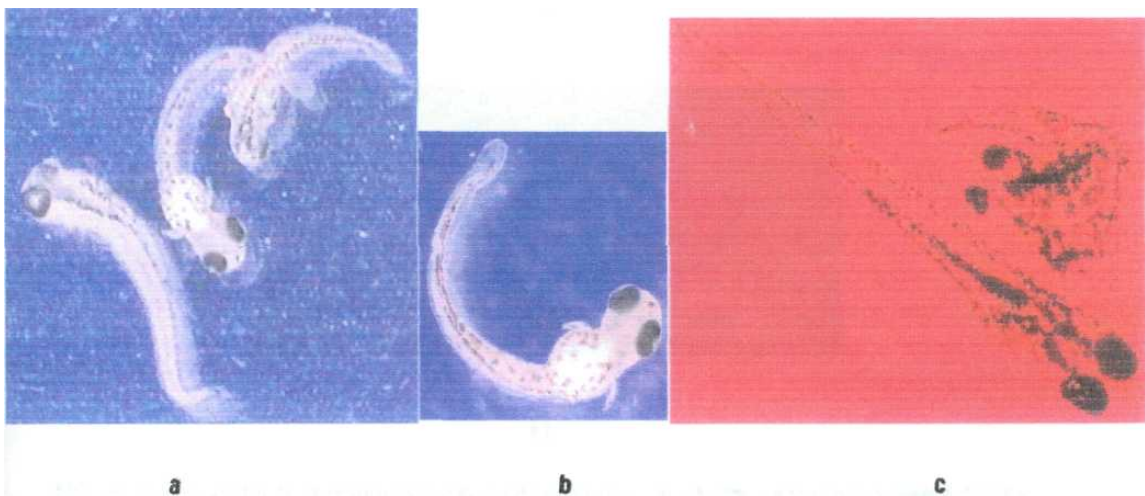
<sup>2</sup> Es el porcentaje de adultos supervivientes del total de alevines eclosionados.

Los huevos viables y no viables del control negativo, positivo y tratamiento APZ5 se pueden observar en la figura 16.



**FIGURA 16. a) Huevo no viable del control positivo (aumento 50X), b) Huevo no viable del tratamiento APZ5 (aumento 50X), y c) Huevos viables del control negativo (aumento 7X).**

En las figuras 17 y 18 se aprecian los alevines recién eclosionados con columna desviada del tratamiento APZS y positivo, asimismo en la figura 18 se observa el caso de un alevín del control positivo con una posible tumoración en la cabeza. Se presentó una teratogénesis más marcada en el control positivo, donde también se encontró un alevín con la parte caudal no desarrollada. No se detectaron malformaciones en aletas y operón.



**FIGURA 17.** Alevines recién eclosionados expuestos al agua del pozo APZ5 con columna desviada (a, b y c). En c también se observa un alevín normal (Aumentos 25X y 40X respectivamente).



**FIGURA 18.** Malformación en columna y posible tumoración (indicada con la flecha) de alevín expuesto al agua del control positivo. (Aumento 40X).

La malformación en columna y enanismo de los descendientes adultos se ilustra en las figuras 19 y 20.



a)



b)

FIG. 19, Parte caudal de la columna vertebral de pez cebra en adultos de los tratamientos APZS y positivo, a) Normal, b) Columna deformada.



FIG. 20. Enanismo en pez adulto (a la izquierda) de los tratamientos APZS y positivo.

## X DISCUSIÓN

### XI. SOBRE LA CARACTERIZACIÓN DEL AGUA DE LOS POZOS APZ5 YAPUAEH

El agua del pozo APUAEH resultó ligeramente más salinizada que la del pozo APZ5, ambas aguas se clasifican como bicarbonatadas calcico magnésicas según el diagrama de Piper (ver figura 21), y la mayoría de los parámetros fisicoquímicos estuvieron por debajo de los límites señalados en la norma oficial para agua de consumo humano. En relación al contenido de As, el APZ5 mostró una concentración de 480  $\mu\text{g/L}$  la cual es 19.2 veces mayor de lo que permite la norma NOM-127-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 2000), este parámetro representa una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tipos de aguas, y además que este resultado es parecido al reportado por Amienta y cols. (1993), Pérez (2004) y Ramos (1996). Es de señalar que el APUAEH no había sido caracterizada con anterioridad y que su concentración de As entra en el intervalo de un agua dulce no contaminada (1-10  $\mu\text{g/L}$ ).

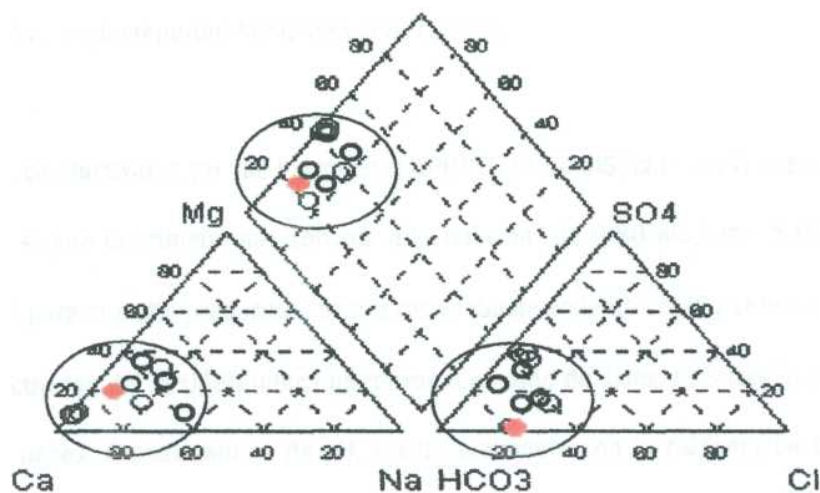


FIG. 21. Diagrama de Piper para la clasificación de las aguas de pozo. B agua del APUAEH (simbolizada con  $\bullet$ ) se clasifica como bicarbonatada calcica magnésica al igual que el agua del APZ5 (simbolizado con  $\circ$ ). Se presentan resultados de los doce meses muestreados (febrero 2003-enero 2004).

El efecto tóxico del As puede variar ampliamente según su estado de oxidación y formación de complejos o sales; lo cual depende del pH, temperatura, presencia de sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas, dureza, actividad biológica de organismos acuáticos, además de otros factores. La forma disuelta es mas rápidamente bioconcentrada que la particulada (ya que la captación de esta por los organismos acuáticos es limitada) (USEPA, 2003).

El As existe en las aguas naturales como As,  $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_4^{-2}$  y  $\text{HAsO}_4^{2-}$ , con estados de oxidación 0, III, IV y V, respectivamente. Si el agua contiene especies de azufre disuelto, el  $\text{AsS}_2^-$  puede ser una especie importante del As (III) a bajos potenciales de reducción (Armienta, 1993), lo cual no ocurrió en el presente experimento porque el agua era permanentemente aireada para mantener una concentración de oxígeno disuelto de aproximadamente 6.24 mg/L (alto potencial de oxidación).

Con respecto a los bicarbonatos, la concentración fue mayor en el APZ5 (242.00 mg/L) que en el APUAEH (96.58 mg/L). La alta concentración de éstos en el APZ5 puede deberse a que proviene de rocas carbonatadas, según reportan Armienta y cols. (1993).

La relación conductividad-pH fue mayor en el APUAEH (0.62 mS/cm - 8.14) que en el APZ5 (0.47 mS/cm - 7.30), siendo la primera más cercana a la relación de 0.80 mS/cm - 8.00 reportada por Oberemm (2000) para una alta producción de huevos y robustecimiento del pez cebra a 26 °G, además de que la conductividad del APUAEH indica un mayor contenido de sales disueltas lo cual aporta más nutrientes a los peces. A esos valores de pH, y adicionalmente con la oxigenación del agua, en el presente experimento la especie disuelta predominante fueron los arseniatos ( $\text{HASO}_4^{2-}$ ) los cuales pueden ser biotransformados por los peces a derivados metilados menos tóxicos (Tamaki y Frankenberger, 1992).

Un pH alto causa una proporción elevada de amoníaco. Por el contrario, por cada unidad de disminución del pH la concentración de NH<sub>3</sub> se reducirá 10 veces, ya que éste se convierte a NFV (NH<sub>3</sub> + H<sup>+</sup> => NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) que es una forma iónica no tóxica. Sin embargo, una disminución del pH también puede incrementar la concentración del dióxido de carbono (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> + H<sup>+</sup> => HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sup>+</sup> => H<sub>2</sub>O + CO<sub>2</sub>) y del ácido nitroso (si el ion nitrito se encuentra en concentraciones elevadas), los cuales son tóxicos para los peces. Por lo que para el cultivo de peces tropicales se recomienda un pH de 6.5 a 7.5 (Sera, 1999); el agua con un pH menor a 4 produce muerte acida, con un pH menor a 5 se precipita el Fe coloidal lo que impide la función respiratoria de las branquias, de 5.0-5.5 puede ser dañina para la reproducción de los peces puesto que los huevos y los alevines son más sensibles al pH bajo que los peces más grandes (Arista, 1993; Hephery Pruginin, 1998). En un intervalo de 5.5-6.5 la producción de peces es baja debido a un efecto directo sobre los peces ó a un efecto sobre los organismos que constituyen el alimento de los peces. A un pH superior a 9.0 los huevos y los alevines pueden ser afectados (Hepher y Pruginin, 1998), y a pH 11 se produce muerte alcalina (Arista, 1993). El APZ5 presentó un pH que entra dentro del intervalo ideal (6.5-7.5) para el cultivo de peces tropicales.

En el agua, el amoníaco y ion amonio son oxidados a nitritos por las bacterias del género *Nitrosomonas* y los nitritos son oxidados a nitratos (los cuales no son tóxicos) por las bacterias del género *Nitrobacter*, tanto el amoníaco como los nitritos, y el NH<sub>4</sub>OH no disociado, son tóxicos para los peces. Cuando se producen nitritos, el pH del agua debe mantenerse mayor a 6 para prevenir la formación de ácido nitroso, el cual se absorbe más rápido por las branquias que el nitrito (Gargas, 1995). Los nitritos son el resultado de la descomposición proteica, de los excrementos, de la orina y de la urea, y bloquean la distribución de oxígeno en el cuerpo de los peces; o sea que cuando hay una alta concentración de nitrito (> 0.3 mg/L) los peces se sofocarán por falta de oxígeno (Sera, 1999). En las



aguas de los pozos APUAEH y APZ5 la concentración de nitritos fue menor a 0.011 mg/L, por lo que no hubo riesgo para los peces, y además fueron adecuadamente oxigenadas para favorecer la oxidación a nitratos.

Por otra parte, la dureza total (348.60 mg CaCO<sub>3</sub>/L) en el APZ5 la clasifica como agua muy dura por ser mayor a 200 mg CaXh/L (Arista, 1993) y puede contribuir a reducir la toxicidad por As, ya que los iones no tóxicos Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup> compiten con los metales por los sitios de enlace protegiendo del daño a las lámelas de las branquias (Welch, 1980). Adicionalmente, el agua más dura disminuye el trabajo osmótico requerido para reponer los electrolitos de la sangre que se pierden a través de la orina desechada por los peces de agua dulce (Arista, 1993).

Respecto a los metales, hubo una mayor concentración de Ca en el APZ5 (28.32 mg/L) que en el APUAEH (17.69 mg/L), por lo que en el presente experimento el pH y las condiciones oxidantes hacen suponer la presencia de arseniato de calcio en el tratamiento APZ5 y control positivo. Por su parte, el Fe es un micronutriente que se necesita para el metabolismo respiratorio, ya que es un componente de la hemoglobina que precipita automáticamente en forma de Fe(OH)<sub>3</sub> a valores de pH de 7.5 a 7.7, en condiciones oxidantes. De acuerdo al pH y estado de oxidación del APZ5 la forma predominante debió ser el Fe(OH)<sub>3</sub>, el cual adsorbe y coprecipita los metales e iones arsenato, reduciendo su toxicidad. La cantidad normal de hierro en aguas oxigenadas con pH de 5 a 8 es de 50 a 200 µg/L, con casi nada en forma iónica (Wetzel, 1981), por lo que el APUAEH se encuentra en este intervalo (79.01 µg/L), no así el APZ5 con 260.00 µg/L. Por otra parte, el manganeso es un catalizador esencial de numerosos sistemas enzimáticos. En los lagos y ríos del mundo la concentración promedio (en µg/L) de los siguientes metales solubles es: Mn 35, Cu 10 y Zn 10; comparando con el APUAEH ésta presentó una concentración menor en todos, no así el APZ5 que excedió la concentración de Mn (330

µg/L) y Cu (11 µg/L). El Cu, Fe, Mn y Zn forman complejos estables con compuestos orgánicos (Wetzel, 1981) y en el presente estudio probablemente formaron complejos con organoarsenicales del APZ5 y control positivo.

Respecto a los sólidos disueltos, una alta concentración puede impedir el desarrollo de huevos y recién eclosionados. Como ejemplo, la trucha requiere para su cultivo e incubación del huevo una concentración de sólidos disueltos totales de 12-904 mg/L (Arista, 1993); y las aguas de los pozos estudiados presentaron concentraciones de 244.30 (APZ5) y 485.80 mg/L (APUAEH), las cuales entran en ese intervalo, por lo que se supone que los niveles de sólidos disueltos en dichas aguas no impidieron el desarrollo de huevos y recién eclosionados.

Por otro lado, el sulfato es reducido a grupos sulfhidrilo (-SH) en la síntesis proteica. En el agua, el SH<sub>2</sub> experimenta una serie de reacciones oxidativas hasta dióxido de azufre, trióxido de azufre y ácido sulfúrico. La concentración normal de sulfates en las aguas naturales varía de 5 a 30 mg/L, y las aguas de pozo estudiadas excedieron el límite superior (Wetzel, 1981), lo cual beneficia la síntesis proteica del pez cebra, pero podría causar un daño si hubiera una excesiva formación de ácido sulfúrico.

Respecto a la turbiedad del agua, es causada por un alto contenido de sólidos suspendidos como minerales de barro, lo que daña las branquias (Hephery Pruginin, 1998) porque se obstaculiza la respiración. En ambas aguas este parámetro fue menor a 0.5 UTN, la cual fue muy baja y menor a 5 UTN (límite máximo permisible por la NOM-127-SSA1-1994), por lo que se supone que no afectó las branquias de los peces estudiados.

Finalmente, en el cuadro 10 se presentan los parámetros fisicoquímicos para la reproducción de la tilapia. un pez tropical de agua dulce y con algunos requerimientos parecidos al pez cebra.

CUADRO 10. Parámetros fisicoquímicos para la reproducción de la tilapia. Díaz, 1991

PARÁMETROS	INTERVALO ÓPTIMO	INTERVALO NO ACEPTABLE
Temperatura (°C)	24-29	< 22 y > 32
Oxígeno disuelto (mg/L)	> 5	< 3
CO <sub>2</sub> (mg/L)	< 30	> 50
Salinidad (mg/L)	< 20	> 20
pH	6.5-8.5	< 6.5 y > 8.5
Turbidez (UTN)	< 25	> 30
Amonio (mg/L)	< 0.1	> 0.1
Nitritos (mg/L)	< 4.6	5

En los experimentos realizados se mantuvieron las maternidades de 28 a 29 ° C, con un pH promedio de las aguas de pozo de 7.30 (APZ5) y 8.14 (APUAEH), una concentración de oxígeno disuelto de aproximadamente 6.24 mg/L, salinidad < 0.03 %, turbidez < 0.50 UTN y nitritos < 0.011 mg/L, parámetros que entran en las condiciones ideales para la reproducción de la tilapia y del pez cebra.

## X.2. SOBRE LA EVALUACIÓN DE LA BIOCONCENTRACIÓN DEL ARSÉNICO EN *Danio rerio*

Alien y cols. (2004) suministraron trióxido de arsénico al pez *Channa punctatus* encontrando que la concentración de As se incrementó exponencialmente en el hígado, riñón, branquias y músculos durante 60 días de exposición, lo cual declinó a los 90 días, aumentando también la lipoperoxidación que posteriormente disminuyó a los 60 días y se incrementó de nuevo a los 90 días, asimismo (Alien y Rana, 2004) encontraron que la actividad de las enzimas glutatión-S-transferasa, glutatión peroxidasa,

glutación reductasa y catalasa, disminuyeron en el hígado y el riñón como resultado del incremento inicial de la concentración de As en los mismos. Las enzimas antioxidantes, especialmente las que dependen del glutación, tienen un papel protector contra el estrés oxidativo que induce el As.

En otros organismos, Schiller y cols. (1977) suministraron con 20, 40 y 85 mg/L de As (como arseniato de sodio) a ratas, en el agua para beber por 3 y 6 semanas, resultando que la actividad total de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial hepática fue inhibida en 14,15 y 28%, respectivamente, a las 3 semanas. Un comportamiento similar fue observado a las 6 semanas, asimismo se observó una disminución de la velocidad del crecimiento en los animales expuestos a 85 mg/L As.

En la presente investigación hubo una bioconcentración del As en peces y una disminución en aguas en función del tiempo encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la concentración de As promedio de los tratamientos, para cada tiempo. A los 30 días se observó en el control positivo una reducción de la concentración de As en el agua de 1092.65  $\mu\text{g/L}$ , mientras en peces hubo un incremento de 523.81  $\mu\text{g/L}$ . Así también el agua del APZ5 mostró una disminución de 211.40  $\mu\text{g/L}$  y los animales un incremento de 74.73  $\mu\text{g/L}$ . La velocidad de la concentración de As en los peces del control positivo fue más alta que la del tratamiento APZ5, observándose una bioconcentración del 47.94 y 35.35%, respectivamente, del As perdido del agua. Como se observa en las figuras 10 y 11, fueron obtenidas pendientes negativas de disminución de As en aguas con valores de -33.846 y -6.5917  $\mu\text{g/L/día}$  que corresponden al tratamiento positivo y APZ5, respectivamente.

Por otro lado, a los 180 días, la velocidad de bioconcentración del As puede ser expresada con las pendientes obtenidas de 23.614 y 2.2077 ( $\mu\text{g/L/día}$  para los peces del tratamiento positivo y APZ5 (ver

figuras 12 y 13), respectivamente, con una tendencia lineal que no concuerda con la tendencia exponencial del trióxido de arsénico obtenida en hígado, riñón, branquias y músculos del pez *Chauna pufictatuspoi* Alien y cols. (2004). Se observa una mayor velocidad para el control positivo, presentando las regresiones una  $R^2 > 0.981$  por lo que hubo una buena correlación entre la concentración de As en pez y el tiempo.

A los 180 días de exposición la concentración de As en peces sin branquias del tratamiento A.PZ5 fue de 397.76 µg/L (base seca), la cual es cercana a la reportada por Baez (2001) de 435 µg/L (base seca) en pez completo (incluidas las branquias) a las 96 horas de exponer *Oreochromis niloticus* la misma agua, por lo que se supondría que el segundo lo bioconcentró más rápidamente y/o las branquias lo concentran mucho más. Por otro lado, la concentración de As de 4051.93 µg/L en peces del control positivo fue aproximada a la reportada por Naqvi y cols. (1990) de 4290 µg/L en tejido fresco del cangrejo de río *Procambarus clarkii* expuesto a 5 mg/L del herbicida metanoarseniato de monosodio en el agua por 8 semanas, comprobándose otra vez que otros organismos bioconcentran más rápidamente el As que *Danio rerio*. Estas concentraciones entran en el intervalo encontrado (396 a 45,716 µg/L) por Navarro y cols. (1992) en muestras liofilizadas de pescado de la Costa de Granada, España.

Finalmente, hay concordancia con que la máxima concentración de arsenitos y arseniatos en el agua, considerada como segura para peces y otros organismos acuáticos, es de 15,000 a 23,000 µg/L (Metelev y cols., 1983), ya que la concentración del arseniato en los 3 tratamientos fue menor a 9,374.99 (µg/L y no causó letalidad. El As presente en el APZ5 y control positivo debió absorberse por las branquias, tracto gastrointestinal y piel, y probablemente se distribuyó en hígado, riñón, músculo y

huesos, entre otros, biotransformándose una parte en As orgánico lipo e hidrosoluble.

### X.3. SOBRE LA GENOTOXICIDAD

Respecto a los micronúcleos en peces, Cavas y cols. (2005) sometieron a la carpa común (*Cyprinus carpio*), carpa prusiana (*Carassius gibelio*) y cory apimentado (*Corydoras paleatus*) a diferentes dosis de cadmio (5-100 µg/L) y cobre (10-250 µg/L) por 21 días, con un control positivo de cromo hexavalente a una dosis de 5000 µg/L, resultando que las especies de peces y sus tejidos presentaron una diferente sensibilidad a los metales pesados después de 21 días con un incremento significativo en las FMNS y binúcleos, donde las células branquiales y hepáticas mostraron más altos valores que los eritrocitos. En otro estudio, Cavas y Ergene-Gözükara (2003) evaluaron los efectos genotóxicos del insecticida piretroide lambda-cihalotrin en el ciprínido *Garra rufa* expuesto a concentraciones de 0.005, 0.010 y 0.050 µg/l por 36 h, obteniendo que la frecuencia de eritrocitos micronucleados se incrementó significativamente y que a los 90 y 180 minutos de exposición los parámetros nucleolares (el número promedio de nucléolos por célula, el volumen de un solo nucléolo y el porcentaje de células con nucléolos apareados heteromórficos ) fueron reprimidos en las células epiteliales de la orilla de la aleta caudal.

En otros organismos, Lechuga (2002) colocó raíces de haba, durante 6 horas, en agua de Pachuca (control negativo con < 8 µg As/L) y en agua del distribuidor general de Zimapán (con 300 µg As/L promedio), obteniendo una inducción de la FMNS en células meristemáticas de 1/1000 y de 11/1000, respectivamente.

Noda y cols. (2002) reportan que el ácido dimetilarsínico induce daño al DNA en el pulmón por la formación de varias especies de radicales peroxil. Jan y cols. (1997) afirman que el arsenito incrementa el óxido nítrico celular, el cual puede reaccionar con el superóxido celular para generar peroxinitrito, y que éste oxidante es el probable responsable de la inducción de micronúcleos. También reportan que el arsenito incrementa el nitrito (producto del óxido nítrico) y los micronúcleos, y que ambos pueden ser suprimidos por la N-nitro-L-arginina metil éster, así también que estos micronúcleos podrían ser reducidos por la superóxido dismutasa. Por otro lado Fowler (1977) reporta que el As causa fragmentación y reconstrucción de cromosomas durante la mitosis, causando mutación o muerte celular; que los arsenicales inorgánicos provocan aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos *in Vitro*, defectos en la división celular, incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas y daña el mecanismo natural de reparación de cromosomas (por ejemplo bloqueando los grupos SH de las enzimas involucradas en tal reparación).

Es importante mencionar que el APZ5 tuvo mayor concentración de Mn (330 µg/L), Pb (12 µg/L), Cr (4 µg/L) y Cu (11 µg/L) que el APUAEH, y estos metales inducen MNS también (Cavas y cols., 2005; Kapka y cols., 2004). Sin embargo, el Cr y Cu no excedieron el límite máximo permisible (NOM-127-SSA1-1994) y aunque el Mn y Pb lo excedieron 2.0 y 1.2 veces (respectivamente) no se comparan con el As que lo excedió 19.2 veces, sin embargo la exposición conjunta al As y Pb presenta efectos aditivos en el tejido respiratorio y en el sistema nervioso central (Galvao y Corey, 1987). Con respecto al Cd, ambas aguas de pozo tuvieron una concentración menor a 2.085 µg/L, la cual es menor al límite máximo permisible y a las concentraciones que incrementaron las FMNS en los peces intoxicados por Cavas y cols. (2005), aunque Fowler (1977) sugiere que el cadmio potencia la toxicidad arsenical.

Por otra parte, en esta investigación hubo un incremento de la FMNS con el tiempo y con la concentración de As en el agua, siendo en el control positivo mayor que en los peces del tratamiento APZ5, induciéndose en ambos casos otras anormalidades nucleicas también. En ambos tratamientos el As promovió un cambio celular con tendencia lineal a concentraciones subcrónicas, con una velocidad de 0.7398 y 0.2561 MNS/1000 células/día (ver las pendientes de las rectas en la fig. 15), respectivamente, lo cual está en una proporción 2.88:1 o sea 0.7398/0.2561. En general, hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las FMNS promedio de los tratamientos, para cada tiempo. Probablemente una de las causas de la inducción de estos micronúcleos fue porque se produjo glucosa-6-arseniato y se inhibió la síntesis del ATP por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, perjudicándose la síntesis del ADN.

Comparando la FMNS de 10.2/1000 células a los 30 días en el tratamiento APZ5, es casi igual a 10.16/1000 células reportado por Cavas y Ergene-Gözükara (2003) en células branquiales a los 3 días de exponer al pez *O. niloticus* al 10% de un efluente textil, por lo que en este pez se indujeron mas rápidamente los micronúcleos tal vez por ser mas sensible o por que el efluente era más tóxico que el APZ5; este nivel de FMNS también es cercano al que reporta Lechuga (2002) de 11/1000 en células meristemáticas de haba, a las 6 horas de exponer las raíces en agua del distribuidor general de Zimapán (con 300 fig As/L), por lo que también en esta leguminosa se indujeron mas rápidamente estas anormalidades nucleicas. Por otro lado la FMNS de 4.4 MNS/1000 células a los 15 días en el mismo tratamiento, es cercana a 5.15 MNS/1000 células encontrada por Basu y cols. (2002) en células de mucosa oral de individuos expuestos a 368.11 µg/L de As en agua potable de pozo. Por otra parte, en el control positivo la FMNS de 12.00/1000 células, a los 15 días, es cercana a la reportada (12.83/1000 células) por los primeros autores a los 9 días de exponer a *O. niloticus* al 20% de un efluente textil.



#### X.4. SOBRE EL DESOVE, LA SUPERVIVENCIA Y LA TERATOGENESIS

Bodammer (1993) reporta que en los embriones de peces expuestos a los contaminantes pueden ser inducidas teratas como deformación axial (anormalidades del notocordio), defectos craneofaciales, defectos del cerebro y ojo (exoftalmia, microftalmia, ciclopodia), defectos cardiovasculares (tubo del corazón) y deformación espinal (anormalidades vertebrales). La exposición de embriones de *Menidia beryllina* a 2,4-dinitrofenol y al naftaleno, durante la división y blastulación hasta 8 días post fertilización, resultó en defectos craneofaciales, cardiovasculares y esqueléticos. Por otra parte la N-nitroso-N-metilurea, así como la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y la N-nitrosodietilamina, causan mortalidad en embriones del pez medaka (*Oryzias latipes*) en la etapa de blástulas, son teratogénicos al principio de la organogénesis y tienen poco efecto en embriones a punto de eclosionar, las teratas son anisoftalmia, edema pericardial del tubo del corazón, y anormal desarrollo de la vejiga natatoria (falla para inflarse). La exposición del embrión al cadmio puede: 1) modificar la permeabilidad de la membrana del huevo antes y después de la fertilización; 2) interrumpir la gastrulación y axiación durante las etapas medias y últimas de la embriogénesis; 3) retardar el crecimiento, desarrollo, y organogénesis; 4) reducir el ritmo cardiaco; 5) reducir o modificarla movilidad embrionaria; 6) disminuir la actividad de varias enzimas biosintéticas en la última etapa del embrión; 7) interrumpir la osteogénesis normal, resultando en malformaciones esqueléticas; 8) reducir el tamaño del saco vitelino vía efectos osmóticos en el fluido perivitelino, como resultado de que el Cd afecta las membranas del huevo; y 9) una prematura o dilatada eclosión.

Por su parte el zinc causa cambios degenerativos en músculo y cerebro de embriones de peces, como: hinchazón mitocondrial, vacuolización citoplásmica, hinchazón del retículo endoplásmico o sarcoplásmico, y otros cambios degenerativos asociados con la muerte celular. A una concentración de 12 mg/L de zinc hay necrosis de las células epiteliales, las células cloro tienen menos mitocondrias, el

aparato de Golgi esta ausente y se observa un retículo endoplásmico liso congestionado. El autor concluye que la exposición de embriones a concentraciones de zinc de 6 a 12 mg/L puede dañar la capacidad osmoregulatoria (células cloro), respiratoria (células epidérmicas), muscular y neural del alevín recién eclosionado. En embriones expuestos a hidrocarburos aromáticos, organoclorados y metales pesados, se ha observado el retardo metabólico y la inefectiva utilización de la energía. Se plantea la hipótesis de que algunos contaminantes tienen su efecto bloqueando la fosforilación oxidativa, lo que causa la inhibición de la formación de adenosina trifosfato que se necesita para el metabolismo normal.

En el estudio realizado se encontró que a mayor concentración de As en el agua mayor porcentaje de huevos no viables y óvulos, menor porcentaje de eclosión así como mayor tiempo para eclosionar, mayor porcentaje de recién eclosionados con columna deformada y prematuros, así como de adultos con deformación en columna y enanismo, y menor porcentaje de adultos supervivientes. La reducción en la producción total de huevos concuerda con lo reportado por Diekmann y cols. (2004) que expusieron peces cebra a 0.1, 0.3, 1.1 y 2.9 µg/L de 4-nitroquinolina-l-óxido desde la etapa de huevo hasta la madurez sexual. El menor porcentaje de eclosión concuerda con lo reportado por Naqvi y Flagge (1990) con el cangrejo *Procambarus clarkii* m el cual se obtuvo una eclosión del 16.97% con el herbicida metanearsonato de monosodio; por Hood y Vedel -Macrander (1984) con ratones en los cuales el arsenito provocó muertes prenatales; por Bodammer (1993) con el pez medaka en el cual la N-nitroso-N-metilurea, la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y la N-nitrosodietilamina causaron mortalidad en embriones de pez; y por Quiteño (2005) con ratas preñadas en las cuáles el arseniato de sodio impidió la continuación del desarrollo embrionario. Por otra parte el dilatado tiempo para eclosionar (retardo en el desarrollo del embrión) obtenido en el control positivo y tratamiento APZ5 concuerda con lo que reporta Bodammer (1993) respecto a la exposición de embriones de pez ai cadmio; con Oberemm

(2000) y con Bachmann (2002) que expusieron embriones de pez cebra al 0.1% de un extracto acuoso del alga *Aphanizomenon flosaquae* y al dietilen glicol dimetil éter, respectivamente.

Los descendientes con malformación en columna, obtenidos en los tratamientos APZ5 y positivo, concuerdan con lo reportado por Bencko (1977) sobre las malformaciones inducidas por el As en vértebras de hámsters, ratones y ratas; por Hood y Vedel-Macrandar (1984) sobre las malformaciones esqueléticas inducidas por el arsenito en ratones; por Bodammer (1993) sobre la deformación espinal en embriones de peces; y por Bachmann (2002) sobre la escoliosis en pez cebra producida por la exposición de los embriones al cloruro de metilmercurio. Esto pudo ser debido a una falta de osificación, como lo obtuvo Quiteño (2005) en su experimento con ratas preñadas expuestas al arseniato. El enanismo en adultos concuerda con lo reportado por Maldonado (2003) en pez cebra, así como por Oladimeji y cols. (1984) quienes expusieron la trucha *Salmo gairdneri* al arsenito de sodio y sugieren que se debió a una inhibición de enzimas y a una reducida capacidad de transporte de oxígeno en la sangre, que resultó en una ineficiente utilización del alimento. Adicionalmente, al igual que Beckman y Twichell (2004) en el control positivo de este estudio se obtuvieron alevines prematuros (como los de la fig. 5A) y un caso sin desarrollo de la parte caudal.

Por lo que es probable que el As atravesó el corión de los huevos y causó daño embrional, lo cual sería similar a lo que reportan Galváo y Corey (1987) así como Katzung (1993) respecto a que este metaloide cruza la barrera placentaria y provoca daño fetal.

La mortalidad de crías, a los 6 meses de la eclosión, fue del 96.8% para el tratamiento APZ5 y del 98.8% para el control positivo, lo cual fue mayor a lo reportado por Kotsanis e Iliopoulou (1999) que inyectaron una solución con 21 µg de AsCl<sub>3</sub> en el saco vitelino de truchas *Oncorhynchus mykiss* las

mantuvieron 6 meses a 12-15 °C, obteniendo una mortalidad de crías del 64.3% después de 28 días.

Probablemente el As indujo a la metalotioneína, la cual amortiguó parcialmente la genotoxicidad y teratogénesis. Por otra parte, el arseniato pudo sustituir al fosfato de los enlaces diéster del ADN causando ruptura de los cromosomas, micronúcleos en las células branquiales así como escoliosis en los descendientes.

Otra suposición es que parte del arseniato pudo ser biotransformado intracelularmente en As III, y que la fracción de As III que se haya bioconcentrado pudo inactivar enzimas involucradas en la mitosis (causando daños a mecanismos como el de reparación natural de cromosomas), así como afectar el desarrollo embrionario y crecimiento del pez; contribuyendo a la inducción de MNS, escoliosis, mortalidad de crías y enanismo. Otra parte del arseniato pudo ser convertida (probablemente metilada) en organoarsenicales y luego ser excretada.

## **XI. CONCLUSIONES**

La mayoría de los parámetros fisicoquímicos analizados en las aguas de pozo se encontraron por debajo de los límites señalados en la norma oficial mexicana para agua de consumo humano NOM-127-SSA1-1994, excepto el APZ5 que tuvo una concentración de As, Mn y Pb, 19.2, 2.0 y 1.2 veces mayor de lo que permite dicha norma, respectivamente.

- En el estudio de bioconcentración se obtuvo un incremento de la concentración de As en peces sin branquias y una disminución en el agua, en función del tiempo, en los tratamientos APZ5 y positivo.

En el estudio de genotoxicidad se obtuvo que a mayor concentración de As en el agua mayor incremento de la FMNS, en función del tiempo.

En el estudio teratogénico se obtuvo que a mayor concentración de As en el agua mayor porcentaje de huevos no viables y óvulos, menor porcentaje de eclosión así como mayor tiempo para eclosionar, mayor porcentaje de recién eclosionados prematuros ó con deformaciones en la columna y de adultos con columna deformada, así como menor porcentaje de adultos supervivientes.

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que *Danio rerio* puede ser utilizado como biomonitor para evaluarla bioconcentración, genotoxicidad y teratogénesis del As del agua del pozo APZ5.

La conclusión **final** es que hubo una bioconcentración de As del APZ5 y del control positivo en el pez cebra, y que éste metaloide causó el mayor daño genotóxico y teratogénico durante 180 y 3 días, respectivamente, en células branquiales y en descendientes a concentraciones subcrónicas.

## **XII. RECOMENDACIONES**

Se recomienda un tratamiento al agua del pozo APZ5 con la finalidad de reducir la concentración de As, Mn y Pb por abajo del límite permisible máximo. Para minimizar la concentración de As en el agua hay técnicas como:

- Adición de citrato de sodio e hierro, oxidación solar, sedimentación y filtración, con una reducción de As V del 99% (Cornejo y cols. 2004).
- Adición de un hidrogel de hidróxido de aluminio, agitación, sedimentación y decantación, con una reducción total del As (Lujan, 2001).
- Adición de cloro y cloruro férrico para que se adsorba el As, luego se filtra con carbón activado y arena, obteniéndose una concentración < 0.01 mg/L (Granada y cols., 2003).
- Pasando el agua por resina de intercambio aniónico (Pérez, 2004).

Dichos tratamientos también reducen la concentración de Mn y Pb.

### **XIII. BIBLIOGRAFÍA**

Albert, L. A. (1997) "Introducción a la toxicología ambiental". Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, División de Salud y Ambiente, Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud y Secretaría de Ecología. Metepec, Estado de México, México.

Alien, T. y Rana, S. V. S. (2004) "Effect of arsenic (As III) on glutathione-dependent enzymes in liver and kidney of the freshwater fish *Channa punctatus*". *Biological Trace Element Research*, 100,1: 39-48.

Alien, T.; Singhal, R. y Rana, S. V. S. (2004) "Resistance to oxidative stress in a freshwater fish *Channa punctatus* after exposure to inorganic arsenic". *Biological Trace Element Research*, 98, 1: 63-72.

Allende, M. L. y cois. (1996) "Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential".

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF). (1998) "Standard methods for the examination of water and wastewater". 20 th edition.

Amsterdam, A.; Lin, S. y Hopkins, N. (1995). "The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos". *Developmental Biology*, 123-129.



Amsterdam, A.; Yoon, C; Allende, M.; Becker, T.; Kawakami, K.; Burgess, S.; Gaiano, N. y Hopkins, N. (1997) "Retrovirus-mediated insertional mutagenesis in zebrafish and Identification of a molecular marker for embryonic germ cells" [In Process Citation]. *ColóSpringHait Symp QuantBiol*, 62:437-450.

Arista, H. T. A. (1993) "Técnicas propuestas de análisis fisicoquímicos de aguas utilizadas en piscicultura en el Estado de Hidalgo". Memoria de experiencia profesional. Instituto Tecnológico de Pachuca, México.

Armienta, H. M. A.; Rodríguez, C. R. y Cruz, O. (1997) "Arsenic content in hair of people exposed to natural arsenic polluted groundwater at Zimapán, México". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59:583-589.

Armienta, H. M. A.; Rodríguez, C. R. y Villaseñor, G. (1993) "Estudio de reconocimiento de la contaminación por arsénico en la zona de Zimapán, Hgo.". Universidad Nacional Autónoma de México. México

Bachmann, J. (2002). "Entwicklung eines teratogenitäts-screening-tests mit embryonen des zebraablings *Danio rerio*". Tesis doctoral, TU Dresden, Germany.

Baez, R. O. A. (2001) "Toxicidad del arsénico de fuentes subterráneas naturales de agua potable y presa Fernando Hiriart Balderrama de Zimapán, Hgo. en *Oreochromis niloticus*". Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. México.

Barbazuk, W. B.; Korf, I.; Kadavi, C; Heyen, J.; Tate, S.; Wun, E.; **Bedel**, J. A.; McPherson, J. D. y Johnson, S. L. (2000). "The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes". *Genome Research*, 10:1351-1358.

Basu, A.; Mahata, J.; Roy, A. K.; Sarkar, J. N.; Poddar, G.; Nandy, A. K.; Sarkar P. K.; Dutta, P. K.; Banerjee, A.; Das, M.; Ray, K.; Roychaudhury, S.; Natarajan, A. T.; Nilsson, R. y Giri, A.K. (2002) "Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India". *Mutation Research*, 516:29-40.

Batsheba A. G. (1996) "Drinking water regulations in the United States of America", p. 1-15.

Beckman, J. y Twichell L (2004) "Effect of inorganic arsenic (V) on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryos". Swarthmore College.

Bencko, V. (1977) "Carcinogenic, teratogenic, and mutagenic effects of arsenic". *Environmental Health Perspectives*, 19:179-182.

Bodammer, J. E. (1993) "The teratological and pathological effects of contaminants on embryonic and larval fishes exposed as embryos: a brief review". *American Fisheries Society Symposium*, 14: 77-84.

Bou-Olayan, A. H.; Al-Yakoob, S. y Al-Hossaini, M. (1995) "Arsenic in shrimp from Kuwait". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54:584-590.

Brusick, D. (1987). "Principles of genotoxicology". 2da. Ed. Plenum, Press, Londres, p.1-2.

Burkhardt, J. G. (2000). "Fishing for mutations". *Nature Biotechnology* 18, 21.

Cárdenas, V. J. (1992) "Monografía geológico-minera del Estado de Hidalgo". Secretaría de Energía, Minas e Industria Paraestatal, Subsecretaría de Minas e Industria Básica. Consejo de Recursos Minerales. Pub. M-3e. Hidalgo, México. 96 p.

Carvan, M. J.; Solís, W. A.; Gedamu, L y Nebert, D. W. (2000). "Activation of transcription factors in zebrafish cell cultures by environmental pollutants". *Archives Biochemistry Biophysics* 376, 320-327.

Cavas, T. y Ergene-Gözükara S. (2003) "Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent". *Mutation Research*, 538:81-91.

Cavas, T.; Garanko, N. N. y Arkhipchuk V. V. (2005) "Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate". *Food and Chemical toxicology*, 43,4:569-574.

CNA (Comisión Nacional del Agua, Gerencia Regional Golfo Norte, Gerencia Estatal en Hidalgo). (1999) "Comisión Nacional del Agua. Metales pesados en fuentes de abastecimiento en el Municipio de Zimapán, Hgo. (1992-1998)". Informe inédito.

Cooney, R. V. y Benson, A. A. (1980) "Arsenic metabolism in *Homarus americanus*". *Chemosphere*, 9:335-341.

Cornejo, L; Figueroa, L; Mansilla, H. y Yañez, J. (2004) "Reducción de la concentración de arsénico en agua de consumo humano en zonas rurales". Universidad de Tarapaca y Universidad de Concepción, Chile.

Cunniff, P. (1995) "Chapter 11. Waters and salts". In: Official Methods of Analysis of AOAC International". 16a ed. Arlington Editorial, Virginia, E.U.A. 1-31.

Daniel, W. W. (2002) "Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud". 4<sup>a</sup> edición. Editorial Limusa.

Del Razo, L. M.; Arellano, M. A. y Cebrián, M. E. (1990) "The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenic area of northern México". *Environ. Pollut*, 64:143-153.

DGG (Dirección General de Geografía). (1983a) "Carta Hidrogeológica de aguas superficiales. Escala 1:250,000. Pachuca F-14-11". Ed. Secretaría de Programación y Presupuesto. México.

Díaz, M. A. (1991) "La tilapia en México. Biología, cultivo y pesquerías". 1<sup>a</sup> ed. AGT Editor, S. A.

Diekmann, M.; Hultsch, V. y Nagel, R. (2004) "On the relevance of genotoxicity for fish populations I: effects of a model genotoxicant on zebrafish (*Danio rerio*) in a complete life-cycle test". *Aquat. Toxicol.*, 68 (1): 13-26.

Dooley, K. y Zon, L. I. (2000). "Zebrafish: a model system for the study of human disease". *Current Opinión Genetics Development*, 10,252-256.

Ehling, U. H. (1991). "Genetic risk assessment". *Ann. Rev. Genet*, 25, p. 218-224.

Evans, S. J.; Johnson, M. S. y Leah, R. T. (1986) "Determination of mercury in fish tissue, a rapid, automated technique for routine analysis". *AA instrumente atwork-Varian*, No. AA-60.

Fowler, B. A. (1977) "International conference on environmental arsenic: an overview". *Environmental Health Perspectives*, 19:239-242.

Gaiano, N. y Hopkins, N. (1996) "Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish". *Nature*, 383: p. 829-32.

Galvão, L. A. C. y Corey, G. (1987) "Arsénico". Serie Vigilancia 8. Ed. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud, p. 103.

Gargas, J. (1995) "La salud de los peces. La química del agua: principios básicos para los aficionados a los peces de agua dulce, en especial para aquellos que mantienen discos". *Aqua guía*, 9:16-19.

Geyne, A. R.; Fries, C. Jr.; Segerstrom, K.; Black, R. F. y Wilson, Y. F. (1963) "Geología y yacimientos minerales del Distrito de Pachuca-Real del Monte, Estado de Hidalgo, México. Ed. Consejo de Recursos Naturales no Renovables. Páb. 5E.

Gonsebatt, M. E.; Vega, L.; Salazar, A. M.; Montero, R.; Guzmán, P.; Blas, J.; Del Razo, L. M.; García-Vargas, G.; Albores, A.; Cebrián, M. E.; Kelsh, M. y Ostrosky-Wegman, P. (1997) "Review: Cytogenetic effects in human exposure to arsenic". *Mutation Research*, 386,219-228.

Granada, M. J. A.; Cerda, A. W. E. y Godoy, A. D. A. (2003) "ESSAN: El camino para reducir notoriamente el arsénico en el agua potable". *Revista AIDIS-Chile Artículos Técnicos*, Diciembre, 44-49.

Guzmán, D. P. (1997) "Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales como prueba para detectar exposición crónica a arsénico". Tesis de maestría. UNAM, México, D.F., p. 5-6.

Hackett, P. B. y Alvarez, M. C. (2000) "The molecular genetics of transgenic fish. Recent advances in Marine Biotechnology". Ed. Fingerman, M. Nagabhushanam. R. 4: *Aquaculture*. part B Fishes, 77-145.

Heddle, J. A.; Cimino, M. C.; Hayashi, M.; Romagna, F.; Shelby, M. D.; Tucker, J. D.; Ph. Vanparys y MacGregor, J. T. (1991) "Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future". *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18,277-291.

Hepher, B. y Pruginin, Y. (1998) "Cultivo de peces comerciales". Editorial Limusa.

Hood, R. D. y Vedel-Macrande, G. C. (1984) "Evaluation of the effect of BAL (2,3-dimercaptopropanol) on arsenite-induced teratogenesis in mice". *Toxicology and applied pharmacology*, 73,1:1-7.

Hulka, B. S. (1990). "Overview of biological markers". En *biological Markers in epidemiology*, eds. B. Hulka, T. Wilcolsky and J. Griffith. New York. Oxford University Press, p. 1-15.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). (1992) "Síntesis geográfica del Estado de Hidalgo". Ed.INEGI.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). (1995) "Zimapan de Reyes-Estado de Hidalgo-Cuaderno estadístico municipal-Edición 1994". México.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). (2000) "XII censo general de población y vivienda". Ed. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México.

Jan, K. Y.; Shugene, L y Gurr, J. R. (1997) "Arsenite induces micronuclei by generation of nitric oxide". *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 379, 1, 1: 174.

Joardar, M. y Sharma, A. (1990) "Comparison of clastogenicity of inorganic manganese administered in cationic and anionic forms in vivo". *Mutation Research*, 240,159-163.

Kapka, L; Anderson, D.; Kruszewski, M.; Siwinska, E.; Oldak, T. y Mielzynska, D. (2004) "DNA damage in children exposed to lead". *Gliwickie Spotkania Naukowe*, 19-20, November.

Katzung, B. G. (1993) "Farmacología básica y clínica". 4ª ed. Editorial O Manual Moderno.

Klaassen, C. D. (1996) "Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons". Capítulo 23. 5a. ed. Internacional. Editorial Me Graw Hill.

Kotsanis, N. e Iliopoulou, G. J. (1999) "Arsenic induced liver hyperplasia and kidney fibrosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by microinjection technique: a sensitive animal bioassay for environmental metal-toxicity". *Bulletin of environmental contaminaron and toxicology*, 62: 169-178.

Lacayo, M. L; Cruz, A.; Calero, S.; Lacayo, J. y Fomsgaard, I. (1992) "Total arsenic in water, fish and sediments from Lake Xolotlán, Managua, Nicaragua". *Bulletin of Environmental Contaminador! and Toxicology*, 49:463-470.

Lechuga, V. M. A. (2002) "Estudio de daños genotóxicos en tejidos celulares sensibles por presencia de arsénico en aguas y suelos de Zimapán Hidalgo". Tesis de licenciatura. Instituto de Ciencias Básicas e ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

Lenihan, J. y Retener, W. W. (1977) "The Chemical environment". Vol. 6 Environment and man. Blackie Glasgow and London.



Lin, S.; Gaiano, N.; Culp, P.; Burns, J. C; Friedmann, T.; Yee, J. K. y Hopkins, N. (1994) "Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish". *Science*, 265 (5172): p. 666-669.

Lujan, J. C. (2001) "Un hidrogel de hidróxido de aluminio para eliminar el arsénico del agua". *Rev. Panam. Salud Pública/Pan. Am.J. Public Health*, 9,5:302-305.

Maiwald, S. (1997) "Wirkung von Lösungsvermittlern und lipophilen Substanzen auf die embryonale Entwicklung des Zebrafisches (*Brachydanio rerio*)". Tesis de maestría en ciencias, TU Dresden, Germany.

Maldonado, E. (2003) "Experimentación en el pez-cebra, un modelo de biología del desarrollo". *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVII: 147-156.

Martín, R. F. 2000. "Interacción de aguas contaminadas con arsénico con rocas calizas de Zimapán, Hidalgo". Tesis de Maestría. Programa de Postgrado en Ciencias de la Tierra. Instituto de Geología. UNAM. México.

McGeachy, S. M. y Dixon, D. G. (1992) "Whole body arsenic concentrations in rainbow trout during acute exposure to arsenate". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 24:301-308.

Metlev, V. V.; Kanaev, A. I. y Dzasokhova, N. G. (1983) "Water toxicology". Amerind Publishing Co. New Delhi.

Nagel, R. (2002) "*Dan*: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio*- a general model in ecotoxicology and toxicology". TU Dresden, Institut für Hydrobiologie, D-Dresden. *Altex*, 19,38-48.

Naqvi, S. M. y Flagge, C. T. (1990) "Chronic effects of arsenic on american red crayfish, *Procambarus clarkii*, exposed to monosodium methanearsonate (MSMA) herbicide". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 45:101-106.

Naqvi, S. M.; Flagge, C. T. y Hawkins, R. L (1990) "Arsenic uptake and depuration by red crayfish, *Procambarus clarkii*, exposed to various concentrations of monosodium methanearsonate (MSMA) herbicide". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 45:94-100.

Navarro, M.; López, H. y López, M. C. (1992) "Determination of arsenic in fish by hydride generation atomic absorption spectrometry". *Journal of Analytical Toxicology*, 16 (5-6): 169-171.

Noda, Y.; Suzuki, T.; Kohara, A.; Hasegawa, A.; Yotsuyanagi, T.; Hayashi, M.; Sofuni, T.; Yamanaka, K. y Okada, S. (2002) "In vivo genotoxicity evaluation of dimethylarsinic acid in Muta™ Mouse". *MutaOon Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 513,1-2:205-212.

Ndite, J. (1991) "Continuous-flow hydride generation combined with conventional nebulization for ICP-AES determination". *Atomic Spectroscopy*, 12,199-203.

Oberemm, A. (2000) "The use of a refined zebra fish embryo bioassay for the assessment of aquatic toxicity". *Research note*, 29,7,32-40.

Oladimeji, A. A.; Qadri, S. U. y deFreitas A. S. W. (1984) "Long-term effects of arsenic accumulation in rainbow trout, *Salmo gairdneri*" *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 32: 732-741.

Pérez, M. F. (2004) "Dinámica del arsénico en aguas subterráneas de pozos y sedimentos del distribuidor general de agua potable de Zimapán, Hidalgo". Tesis doctoral. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Peters, K. G.; Rao, P. S.; Bell, B. S. y Kindman, L. A. (1995) "Green fluorescent fusion proteins: powerful tools for monitoring protein expression in live zebrafish embryos". *Developmental Biology* 171,252-257.

Petres, J.; Barón, D. y Hagedorn, M. (1977) "Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation: cytogenetic and biochemical studies". *Environmental Health Perspectives*, 19:223-227.

Quiteño, P. M. (2005) "Determinación del efecto teratogénico en el desarrollo del tejido óseo en rata (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar), inducido por la presencia de arsénico en aguas". Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Ramos, L. J. A. (1996) "Parámetros estructurales que controlan la hidrodinámica de las aguas subterráneas en el área de Zimapán, Hgo.". Tesis de maestría. Instituto de geofísica, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Rapaport, S. I. (1988) "Introducción a la hematología". 2<sup>a</sup>. ed. Salvat editores S. A.

Rocha, A.; Ruiz, S.; Estepa, A. y Coll, J.M. (2001) "Biología molecular de los peces: Interés y aplicaciones". *Aquatic*, 15:7-15. España.

Romero, F. M.; Armienta, M. A. y Carrillo, Ch. A. (2004) "Arsenic sorption by carbonate-rich aquifer material, a control on arsenic mobility at Zimapán, México". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47', 1:1:13.

Schiller, C. M.; Fowler, B. A. y Woods, J. S. (1977) "Effects of arsenic on pyruvate dehydrogenase activation". *Environmental Health Perspectives*, 19:205-207.

Schmitt, C. J. y Brumbaugh, W. G. (1990) "National contaminant biomonitoring program: concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, mercury, selenium and zinc in U. S. freshwater fish, 1976-1984". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19:731-747.

Secretaría de Comercio y Fomento Industrial-Dirección General de Normas. (2000) "NMX-AA-008-SCFI-2000 Análisis de agua-determinación del pH-método de prueba (cancela a la NMX-AA-008-1980)". México.

Secretaría de Economía. (2000) "NMX-AA-034-SCFI-2000 Análisis de agua-determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-método de prueba (cancela a las NMX-AA-020-1980 y NMX-AA-034-1981)". México.

Secretaría de Economía. (2001) "NMX-AA-072-SCFI-2001 Análisis de agua- determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-método de prueba (cancela a la NMX-AA-072-1981)". México.

Secretaría de Economía. (2001). "NMX-AA-073-SCFI-2001 Análisis de agua-determinación de cloruros totales en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-método de prueba (cancela a la NMX-AA-073-1981)". México.

Secretaría de Economía. (2001) "NMX-AA-079-SCFI-2001 Análisis de aguas-determinación de nitratos". México.

Secretaría de Salud. (1995) "Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa". *Diario Oficial de la Federación*, 12 de Diciembre de 1995. México.

Secretaría de Salud. (1995) "Norma oficial mexicana NOM-112-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinaciones de bacterias conformes. Técnica del número mas probable". *Diario Oficial de la Federación*, 19 de Octubre de 1995. México.

Secretaría de Salud. (2000) "Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse para su potabilizaron". *Diario Oficial de la Federación*, 22 de Noviembre del 2000. México.

Secretaría de Salud. (2002) "Norma oficial mexicana NOM-201-SSA1-2002, productos y servicios. Agua e hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias". *Diario oficial de la federación*, 18 de Octubre del 2002. México.

Sekulic, B.; Sapunar, J. y Bazulic, D. (1993) "Arsenic in Norway Lobster (*Nephrops norvegicus* L) from Kvarneric Bay Northeastern Adriatic". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 51:460-463.

Sera (1999) "Cuidados del acuario y filtrado del agua de manera natural". Sera manual. Spiegel M

R (1970) "Theory and problems of statistics" Ed. Schaum NewYork pp 181-183

Stohrer, J. y Gerhard, T. (1991) "Arsenic: opportunity for risk assessment". *Archives of toxicology*, 65: 525-531.

Tamaki, S. y Frankenberger, W. T. (1992) "Environmental biochemistry of arsenic". *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 124:79-109.

USEPA (U. S. Environmental Protection Agency). (2003) "EPA-822-R-03-032 Technical summary of information available on the bioaccumulation of arsenic in aquatic organisms". Office of Science and Technology, Office of Water. Washington, U. S.

Waldren, Ch.; Mcgraw, M.; Vannais, D.; Carvalho, F. y Gustafson, D. (1997) "The number and kind of mutants induced in mammalian cells by arsenic, cadmium and lead". *Mutation Research/fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 379,1,1:109.

Welch, E. B. (1980) "Ecological effects of wastewater. Applied limnology and pollutant effects" 2.2a. ed. Editorial Chapman & Hall.

Wetzel, R. G. (1981) "Limnología". Ediciones Omega S. A.

WHO (World Health Organization). (1997) "Guidelines for drinking-water quality". 2a. ed. Vol 2. Health criteria and other supporting information. Geneva, World Health Organization.

Woolson, E. A. (1977) "Fate of arsenicals in different environmental substrates". *Environmental health perspectives*, 19:73-81.

Zeller, Y. (1995) "Einfluß von herzwirk-samen pharmaka auf die embryonalentwicklung des zebrabarblings, *Brachydanio rerio*, unter besonderer berücksichtigung von cardiogenen effekten". Diplomarbeit. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität

Zon, L (2000) "Zebrafish: a new model for human disease". *Genome Research*, 9,99-100.

## **XIV. ARTÍCULOS PUBLICADOS**

A continuación se presentan los dos trabajos relacionados al estudio realizado y que se publicaron en revistas arbitradas:

**XIV. 1. BIOACUMULACIÓN Y DAÑOS GENOTÓXICOS EN PEZ CEBRA (*Danio rerio*) POR ARSÉNICO EN AGUAS DE ZIMAPÁN, HIDALGO (MÉXICO). ENSAYOS EN CORTOS PLAZOS.**

**AUTORES:** Olivería A. Baez Ramírez, Francisco Prieto García; Carlos A. Galán Vidal.

**REVISTA:** AquaTIC, No. 21, p. 62-70.2004. España.

**XIV.2. GENOTOXIC DAMAGE IN ZEBRA FISH (*Danio rerio*) BY ARSENIC IN WATERS FROM ZIMAPÁN, HIDALGO, MÉXICO.**

**AUTORES:** Olivería A. Baez Ramírez and Francisco Prieto García.

**REVISTA:** Mutagenesis, Vol. 20, No. 4, p. 291-295.2005. Inglaterra.



## Bioacumulación y daños genotóxicos en Pez Cebra (*Danio rerio*) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo (México). Ensayos en cortos plazos

Oliveria A. Báez Ramírez, Francisco Prieto García, Carlos A. Galán Vidal

Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
 Carretera Pachuca-Tulancingo, km 4,5, Ciudad Universitaria, Pachuca, Hidalgo (México)  
 e-mail: prietog@uaeh.reduaeh.mx

### Resumen

En aguas bicarbonatadas cálcico-magnésicas, pozo UAEH y pozo V de Zimapán, ésta última con contenidos de arsénico de 0,50 mg/l, fue estudiada la bioacumulación de este elemento en Pez Cebra (*Danio rerio*) y los probables daños genotóxicos en células de branquias, evaluando la inducción de micronúcleos. Los ejemplares del Pez Cebra fueron estudiados durante 30 días en tres lotes separados (control negativo en agua del pozo UAEH, control positivo de 5 mg/l de As(V) y las aguas del pozo V de Zimapán), con 50 ejemplares por cada lote. En las aguas se observó la disminución de las concentraciones de As en el tiempo en tanto que en peces se produce un incremento. A los 30 días se había producido una disminución en las aguas del control positivo de 1,000 mg/l (0,035 mg/l/día) en tanto que en peces se incrementó por bioacumulación en 0,015 mg/Kg. (0,0005 mg/kg/día). Para las aguas del experimento (pozo V de Zimapán), una disminución de 0,200 mg/l (0,0067 mg/l/día) y en peces un incremento de 0,0005 mg/kg (0,00017 mg/kg/día). Con relación a la inducción de micronúcleos (MNs) en células de branquias, se encontró que en los controles negativos existe una inducción por generación espontánea que al término de 30 días es de 8 MNs por cada 1000 células contadas. En el control positivo de 5,000 mg/l de As una inducción de MNs 15,38 veces mayor que el control negativo, en tanto que para los peces en las aguas del pozo V de Zimapán se apreció un incremento de inducción de MNs de 2,38 veces más con respecto al control negativo. Todo ello pone de manifiesto un efecto de genotoxicidad por As.

### Summary

#### Bioaccumulation and genotoxic damages in Zebra Fish (*Danio rerio*) by arsenic in Zimapán waters, Hidalgo (Mexico)

In bicarbonated calcic-magnesian waters from UAEH and Zimapán V wells, the last with arsenic (As) content of 0,50 mg/l, were studied As bioaccumulation in Zebra Fish (*Danio rerio*) and the probably genotoxic damages in gill cells, evaluating micronuclei (MNs) induction. The animals were studied for 30 days in three separated groups (negative control with UAEH wellwater, positive control with 5 mg As/l, and Zimapán V wellwater) with fifty individuals per group. In waters diminished As concentration with time, in fish had an increase. To the thirty days it had produced a decrease in the water of positive control of 1 mg As/l (0,035 mg As/l/day), and in fish had a bioaccumulation of 0,015 mg As/kg (0,0005 mg As/kg/day). In Zimapán V wellwater had a drop of 0,2 mg As/L (0,0067 mg As/l/day), and in fish an increase of 0,0005 mg As/kg (0,00017 mg As/kg/day). On the other side, in negative control was detected a spontaneous micronuclei induction (MI) in gill cells of 8 MNs/1000 cells. In positive control had a MI 15,38 times greater than negative control, and in fish exposed to Zimapán V wellwater were appreciated a MI increase of 2,38 times more than negative control. All of this reveals a genotoxicity effect due to As.

### Introducción

El arsénico (As) es conocido como un agente carcinógeno al que están expuestos numerosos grupos humanos en todas partes del mundo y cuya actividad genotóxica

ha sido demostrada en grupos de individuos expuestos (del Razo, 1990). La bioconcentración del As depende de la velocidad de absorción y eliminación en un organismo.

El trióxido de arsénico causa toxicidad en los peces con una concentración letal del 50% (CL<sub>50</sub>) a las 96 horas de 50-100 mg/l para el Pez Dorado, de 30-40 mg/l para la Carpa, de 20-25 mg/l para la Trucha, y de 25-30 mg/l para otros. La concentración de arsenitos y arsenatos, considerada como segura para peces y otros organismos acuáticos, es de 15-23 mg/l (Metelev y cols., 1983). En otro estudio, se obtuvo una CL<sub>0</sub> y una CL<sub>50</sub> a las 96 horas de 15,73 y 45,32 mg/l de As total para la Tilapia *Oreochromis niloticus*, administrado como trióxido de As. Asimismo, se sometieron peces sanos a 0; 0,05 y 15,73 mg/l As total en agua del pozo Zimapán 5 durante 96 horas, encontrándose un aumento en la concentración del metal en el pez completo y en el grado de lipoperoxidación en branquias con el incremento de la concentración en el agua y del tiempo (Baez, 2001). El As presente en el agua se absorbe por las branquias, por el tracto gastrointestinal y por la piel (Albert, 1997), se distribuye en hígado, riñón, piel y escamas (afinidad de los arsenitos por la queratina), branquias y músculo, donde el As inorgánico se biotransforma en As orgánico lipo e hidrosoluble (Lenihan y Fletcher, 1977).

Se han realizado investigaciones genéticas en el Pez Cebra y su desarrollo embrionario (Gaiano y Hopkins, 1996); se avanza en el descubrimiento y aplicaciones de los transposones de vertebrados como posibles vectores de transferencia de genes (Ivics y cols., 1996; Lam, Lee, y Gilbert, 1996; Izsvak, Ivics, y Hackett, 1997; Coll, 2001).

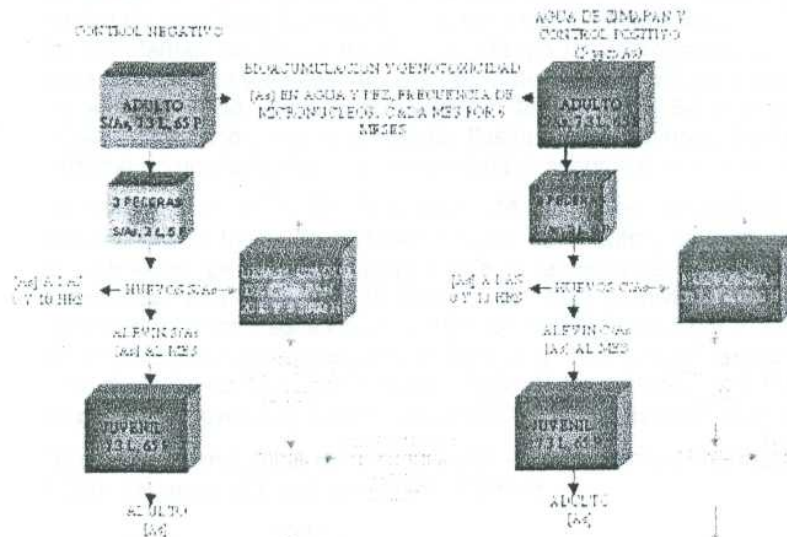
El Pez Cebra es uno de los peces que se encuentran más cercanos a la completa secuenciación de su genoma. Es único para obtener y mantener miles de mutantes gracias a sus especiales características; muchos de los fenotipos de los mutantes del Pez Cebra ya obtenidos se parecen a algunas enfermedades genéticas caracterizadas en el hombre, aportando un poderoso instrumento para ahondar en las correspondientes patologías humanas; se pueden buscar genes candidatos a enfermedades o anomalías en regiones cromosómicas humanas definidas por mutaciones en el Pez Cebra. Las alteraciones morfológicas en el desarrollo embrionario del Pez Cebra se han utilizado desde hace años para estudiar los efectos de los contaminantes. En esta investigación se pretende evaluar los efectos de la bioacumulación de arsénico contenido en el "agua potable" de Zimapán, Hidalgo y las consecuencias de este proceso en el Pez Cebra como indicador del posible daño genotóxico sobre la población de Zimapán que está expuesta a la contaminación por arsénico.

## Material y métodos

### Esquema del experimento

La metodología experimental se muestra en la Figura 1 en forma de diagrama de flujo donde se señalan las diferentes etapas de la investigación. Los ejemplares del Pez Cebra se colocaron en las peceras respectivas divididos en tres lotes, uno para el control negativo, en agua limpia del pozo de la Universidad Autónoma de Hidalgo (UAEH); otro para el control positivo, éste contiene agua del pozo UAEH y se le agregó arseniato ácido de sodio hasta alcanzar una concentración de 5 mg/l de As en el agua; y por último el lote para el agua del pozo V de Zimapán. En cada lote se colocaron 50 ejemplares bajo condiciones ideales de temperatura, oxigenación y alimentación.

Figura 1. Diagrama de flujo del experimento.



### Análisis de aguas

Se realizaron muestreos mensuales de las aguas de los pozos V de Zimapán y pozo UAEH, este último ubicado en Ciudad Universitaria (UAEH) durante 9 meses. Se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos de acuerdo a la NOM-127-SSA1-1994 para agua de uso y consumo humano. Las determinaciones de metales se realizaron por Espectroscopía de Emisión con Acoplamiento Inductivo de Plasma (ICP) en un equipo Perkin-Elmer, en matrices de  $\text{HNO}_3$ .

Se tomaron las alícuotas necesarias de las muestras de agua en matriz nítrica al 3%, aforando a 25 ml. Para el caso de las determinaciones de As se realizó una prerreducción con ácido ascórbico y KI al 25% (2 ml), así como HCl concentrado y se determinó mediante generación de hidruros (2 ml) (Nölte, 1991).

### Análisis de peces

Los ensayos directos de exposición al arsénico con Peces Cebra se realizaron en un control negativo (agua del pozo UAEH), un control positivo de 5 mg/l de As(V) y las aguas del pozo V de Zimapán (con concentración de As de 0,48 mg/l) se sometieron 50 ejemplares por cada lote. Se utilizó adicionalmente un lote como control positivo en concentración de 15 mg/l de As como control (positivo) de elevada concentración.

Se sacrificaron a diferentes tiempos (1, 2, 3, 15 y 30 días) cinco ejemplares que se sometían a secado en horno eléctrico a temperatura de 60°C por 96 horas, extrayéndoles previamente las branquias. Ya secos se trituraban y pesaban, sometiendo estas muestras a digestión con 5 ml de  $\text{HNO}_3$  en horno microondas modelo Marx 5, con programación. Los digestatos se aforaron a 25 ml y se reservaron para los ensayos de As por generación de hidruros, con previa prerreducción como se indicó para los análisis de agua.

### Evaluaciones de inducción de micronúcleos (MNs)

Se detectaron micronúcleos por cada 1000 células, en un microscopio compuesto, por tinción de las células branquiales con colorante Giemsa a los 0, 1, 2, 3, 15 y 30 días en los 3 tratamientos. En un mortero se trituran las 5 branquias, se les agrega 1 ml de agua desionizada y se pasarán a un tubo de microcentrífuga. Luego se agrega 0,1 ml de suero fetal de bovino inactivado con temperatura. Se resuspende la suspensión celular conseguida con una pipeta Pasteur para homogenizarla, se coloca en el extremo de una laminilla, se barre en toda la superficie con ayuda de un portaobjetos.

Ya realizado el frotis se deja secar 24 horas en condiciones ambientales para posteriormente fijarlo en metanol durante 10 minutos, se deja secar nuevamente al aire libre por 24 horas. Una vez fijada la laminilla se procede a realizar la tinción empleando una solución al 0,25% de May-Grunwald durante 7 minutos, y posteriormente otra solución al 0,125% de May-Grunwald por 3 minutos, finalmente la laminilla se pasa a una solución de Giemsa al 10% por 15 minutos y se enjuaga con agua desionizada. Luego se analizan 2000 células a 100x en el microscopio. Se realiza en eritrocitos jóvenes ó policromáticos (PCE) los cuales se tiñen de color azul.

Se calcula la frecuencia de micronúcleos en PCE mediante la identificación de MN en 2 000 células de PCE con la siguiente fórmula:

$$fMPCE = \frac{nMPCE}{(nMPCE + nPCE)}$$

donde:

fMPCE = frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos.

nMPCE = número de micronúcleos en eritrocitos policromáticos.

nPCE = número de eritrocitos policromáticos.

## Resultados y discusión

### Caracterización de las aguas

Los resultados de caracterización de las aguas utilizadas en este trabajo aparecen en la Tabla 1, con resultados de tres réplicas y 9 meses (n=27). Los parámetros como conductividad, pH, sólidos totales disueltos, sulfatos y cloruros, entre otros, resultan ligeramente más altos en el agua del pozo UAEH que en la del pozo V de Zimapán, lo que pone de manifiesto que la primera está ligeramente más salinizada pero cumple con los parámetros establecidos por la normatividad mexicana para agua de uso y consumo humano (NOM-127-SSA1-1994), y es apta para ser utilizada en los ensayos con el Pez Cebra, sin riesgo aparente.

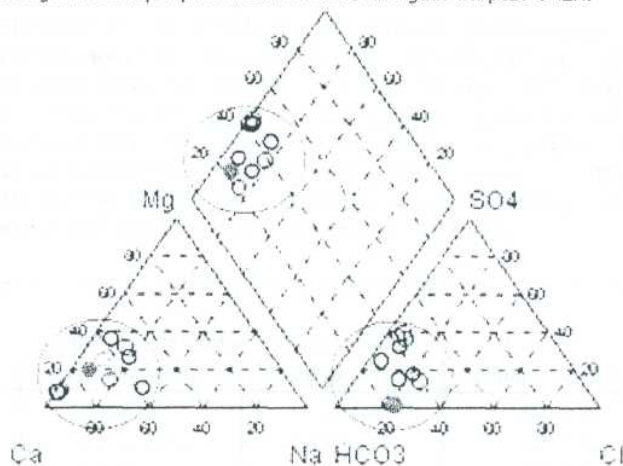
En ambos casos se trata de aguas bicarbonatadas cálcico-magnésicas, indicándose que en el caso del pozo UAEH, es ligeramente de mayor contenido cálcico. Mediante programa Aqua-Chem, versión 3.6, se obtuvo el diagrama de Piper que se muestra en la Figura 2. Se señala que en las aguas del pozo V de Zimapán la contaminación por As (casi 20 veces mayor que lo permitido por la normatividad, 0,025 mg/l). En la Tabla 2 podemos apreciar que las aguas del pozo de la UAEH son de baja dureza y de tipo temporal mayoritariamente.

**Tabla 1.** Promedio (% desviación estándar relativa) de los análisis de caracterización del agua de los pozos Zimapán V y UAEH (febrero-octubre/03).

<b>Análisis</b>	<b>NOM</b>	<b>Pozo V</b>	<b>P UAEH</b>
<b>Cl<sub>2</sub> res (mg/l)</b>	<1,5	<0,02	<0,02
<b>Color UPC</b>	<20	<5	2,50 (92,58)
<b>Conductividad (mS/cm)</b>	NN	0,477 (21,67)	0,69 (10,71)
<b>Cl<sup>-</sup> (mg/l)</b>	<250	3,41 (3,36)	24,73 (40,22)
<b>Dureza Ca (mg/l)</b>	NN	161,00 (46,59)	102,26 (25,79)
<b>Dureza Total (mg/l)</b>	<500	295,03 (99,72)	207,07 (18,03)
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-2</sup> (mg/l)</b>	<300	323,39 (8,59)	112,65 (2,77)
<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg/l)</b>	<0,05	0,001 (0,0001)	<0,001
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/l)</b>	<10	0,16 (0,43)	2,11 (91,95)
<b>Olor</b>	Agradable	Agradable	Agradable
<b>Oxígeno Disuelto (mg/l)</b>	NN	ND	5,08 (24,18)
<b>pH</b>	6,5-8,5	7,40 (0,22)	8,13 (12,08)
<b>Sabor</b>	Agradable	Agradable	Agradable
<b>SDT (mg/l)</b>	<1000	244,47 (0,51)	511,14 (14,01)
<b>ST (mg/l)</b>	NN	307,33 (7,08)	552,95 (12,37)
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (mg/l)</b>	<400	47,42 (6,85)	114,09 (80,64)
<b>Temperatura (°C)</b>	NN	26,9 (3,41)	21,98 (8,07)
<b>Turbidez (mUTN)</b>	<5000	296 (2,90)	50,35 (87,28)
<b>Al (µg/l)</b>	<200	48 (0,80)	2,19 (54,35)
<b>As (µg/l)</b>	<25	330,00 (0,18)	4,36 (47,01)
<b>Ba (µg/l)</b>	<700	88 (0,06)	9,44 (16,40)
<b>Ca<sup>+2</sup> (mg/l)</b>	<0,005	44,92 (38,62)	17,69 (27,12)
<b>Cd (µg/l)</b>	<5	2 (0,004)	<2,085
<b>Cr Total (µg/l)</b>	<50	4 (0,004)	<0,219
<b>Cu (µg/l)</b>	<2000	11 (0,016)	<0,480
<b>Fe (µg/l)</b>	<300	260 (0,48)	79,01 (11,01)
<b>Hg (µg/l)</b>	<25	< 1	3,90 (2,68)
<b>K<sup>+</sup> (mg/l)</b>	NN	1,88 (2,20)	2,27 (30,73)
<b>Mg<sup>+2</sup> (mg/l)</b>	NN	10,51 (8,04)	9,22 (19,68)
<b>Mn (µg/l)</b>	<150	330 (0,37)	10,11 (57,18)
<b>Na<sup>+</sup> (mg/l)</b>	<200	6,65 (6,35)	7,06 (7,74)
<b>Pb (µg/l)</b>	<25	4 (0,01)	0,32 (29,24)
<b>Zn (mg/l)</b>	<5	0,06 (0,07)	4,08 (44,05)
<b>Coliformes fecales (NMP/100 ml)</b>	NN	Ausencia	Ausencia
<b>Coliformes Totales (NMP/100 ml)</b>	< 1,1	No detect	No detect
<b>Mesófilos aerobios (UFC/ml)</b>	< 100	No detect	No detect

NOM: Valores establecidos por la Norma Oficial Mexicana. NN: No Normado. Los valores entre paréntesis indican DER.

**Figura 2.** Diagrama de Piper para clasificación de las aguas del pozo UAEH.



Las aguas del Pozo de la UAEH (simbolizadas con O) clasifican como un pozo con aguas bicarbonatadas calcico-magnésicas y de clasificación similar al agua del pozo V de Zimapán (simbolizado con +). Se muestran los nueve meses muestreados (febrero-octubre 2003).

**Tabla 2.** Balance promedio de las aguas del Pozo UAEH en el período comprendido de febrero/octubre 2003.

Muestra:	POZO UAEH			
Localización:	Único			
Sitio:	UAEH			
Fecha de muestreos:	02-10/2003			
Geología:	Natural			
Estimación del tipo de agua:	Ca-Mg-HCO <sub>3</sub> -SO <sub>4</sub> (bicarbonatada cálcica-magnésica y sulfática)			
<b>VALORES PROMEDIOS DE:</b>				
Suma de Aniones (meq/l):	2,15			
Suma de Cationes (meq/l):	1,85			
Balance:	7,6%			
Sólidos totales disueltos:	4,0 meq/l	147,4 mg/l		
<b>Dureza:</b>				
	meq/l	°f	°g	mg/l CaCO <sub>3</sub>
Dureza total:	1,48	7,41	4,15	74,11
Dureza permanente:	0,19	0,97	0,54	9,72
Dureza temporal:	1,29	6,43	3,60	64,32
Alcalinidad total:	1,29	6,43	3,60	64,32
(1 °f = 10 mg/l CaCO <sub>3</sub> 1 °g = 10 mg/l CaO)				
<b>Mejor composición iónica promedio:</b>				
	Mg/l	mmol/l	meq/l	meq%
Na <sup>+</sup>	6,501	0,283	0,283	7,083
K <sup>+</sup>	3,182	0,081	0,081	2,027
Ca <sup>2+</sup>	16,740	0,418	0,835	20,899
Mg <sup>2+</sup>	7,850	0,323	0,646	16,168
Cl <sup>-</sup>	19,381	0,547	0,547	13,691
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	15,220	0,158	0,317	7,934
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	78,510	1,287	1,287	32,211
<b>RELACIONES</b>				
	Mg/l	mmol/l		
Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	2,132	1,293		
Ca <sup>2+</sup> /SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,101	2,636		
Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>	0,335	0,517		
<b>Posibles minerales disueltos:</b>				
	mg/l	mmol/l		
Halita (NaCl):	16,542	0,2827		
Dolomita (CaMg(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ):	59,448	0,3232		
Anhidrita (CaSO <sub>4</sub> ):	21,581	0,1580		

### Bioacumulación de arsénico

Los resultados se muestran en la Tabla 3 que indican disminuciones de las concentraciones de As en las aguas en el tiempo por los distintos lotes y el incremento en peces totales. Para cada caso se tomaron alícuotas de agua (cinco réplicas), preparadas en matriz nítrica de 3% y se analizó [As(V)]; asimismo en peces, sacrificando 5 ejemplares por lote (previamente se les retiró las branquias para las evaluaciones y ensayos de inducción de micronúcleos); fueron llevados a masa seca en estufa y por su peso seco se sometieron a digestión en horno de microondas con ácido nítrico concentrado (5 ml). Posteriormente se analizó [As total].

**Tabla 3.** Concentraciones de As promedios en muestras de aguas y peces en los controles negativos, positivos y experimento.

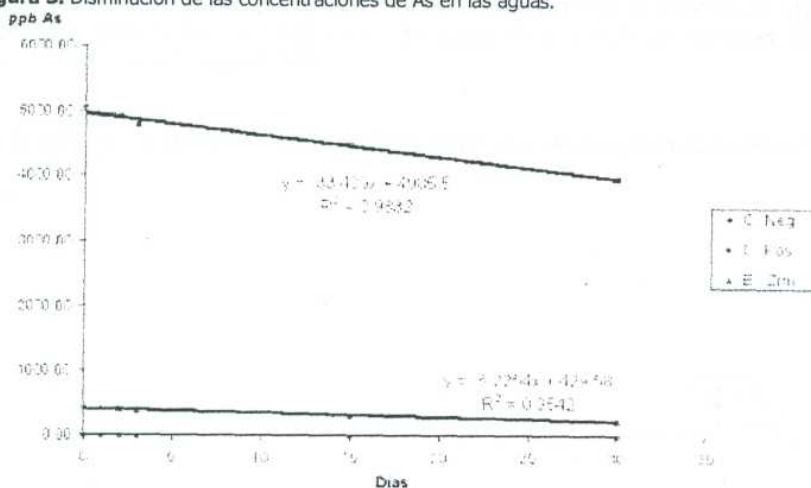
As promedio en Aguas en $\mu\text{g/l}$ (%DER)				
Días	Negativo	Positivo (15 mg/l)	Positivo (5 mg/l)	Zimapán (0,5 mg/l)
0	<1,12	12 300 (0,79)	5 056 (1,06)	451 (1,92)
1	<1,12	12 221 (0,38)	4 937 (0,64)	430 (0,32)
2	<1,12	12 167 (0,12)	4 926 (0,61)	417 (1,29)
3	<1,12	12 085 (0,13)	4 799 (1,05)	388 (1,27)
15	<1,12	11 220 (0,15)	4 512 (0,90)	322 (2,46)
30	<1,12	10 747 (0,82)	3 975 (1,04)	252 (2,34)

As promedio en peces en $\mu\text{g/kg}$ (%DER)				
Días	Negativo	Positivo (15 mg/l)	Positivo (5 mg/l)	Zimapán (0,5mg/l)
0	<1,12	<1,12	<1,12	<1,12
1	<1,12	86,55 (4,49)	1,31 (2,03)	1,19 (4,43)
2	<1,12	98,04 (1,21)	1,42 (4,59)	1,21 (1,56)
3	<1,12	155,39 (2,86)	1,94 (2,45)	1,27 (0,99)
15	<1,12	262,56 (0,58)	6,26 (6,83)	2,96 (8,95)
30	<1,12	480,73 (4,07)	14,74 (1,49)	5,29 (1,83)

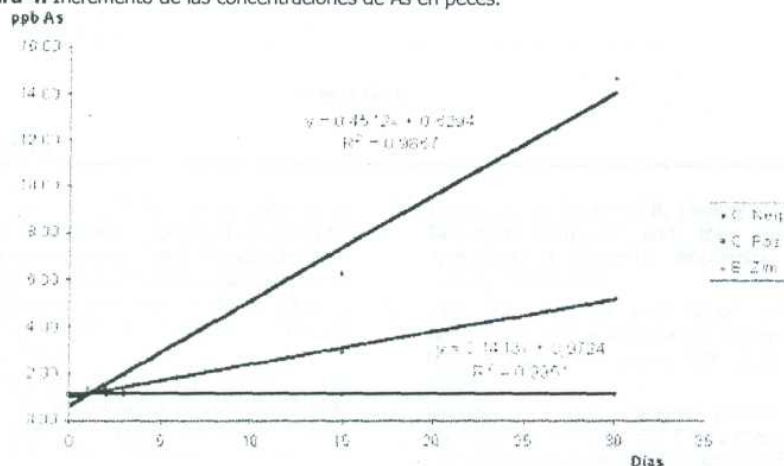
Entre paréntesis aparecen los % Desviación Estándar Relativa (%DER). Los resultados corresponden a 5 réplicas promediadas.

Como se aprecia en los controles negativos (para aguas y peces) los resultados arrojaron valores menores que el límite de detección (LD) experimental encontrado (<1,12  $\mu\text{g/l}$ ). Para un control positivo de elevada concentración (15 000  $\mu\text{g/l}$ ) se observó que en 30 días se había producido una disminución en las aguas de 1 550  $\mu\text{g/l}$  (52  $\mu\text{g/l/día}$ ), acompañada de un incremento en peces de aproximadamente 500  $\mu\text{g/kg}$  (16  $\mu\text{g/kg/día}$ ); esto tuvo su principio de observación denotándose una mortalidad en peces a partir de las 72 horas y un 50% al término de 15 días. Para el control positivo de 5000  $\mu\text{g/l}$  se observó una disminución en la concentración de As de las aguas de 1000  $\mu\text{g/l}$  aproximadamente (35  $\mu\text{g/l/día}$ ) en tanto que en peces se incrementó en unos 15  $\mu\text{g/kg}$  (0,5  $\mu\text{g/kg/día}$ ). Por su parte las aguas del experimento (pozo V de Zimapán) mostraron una disminución de 200  $\mu\text{g/l}$  (6,7  $\mu\text{g/kg/día}$ ) y en peces un incremento de 5  $\mu\text{g/kg}$  (0,17  $\mu\text{g/kg/día}$ ). En las Figuras 3 y 4 se muestran estos resultados de manera gráfica para disminuciones e incrementos en aguas y peces respectivamente, así como la ecuación y regresión lineal de estas tendencias.

**Figura 3.** Disminución de las concentraciones de As en las aguas.



**Figura 4.** Incremento de las concentraciones de As en peces.



Como se observa se logran regresiones mayores de 0,95 y las pendientes de las líneas rectas de disminuciones en aguas (pendientes negativas) con valores de -33,5 y -6,22  $\mu\text{g/l/día}$  se corresponden con los valores antes discutidos, así como las pendientes de incrementos en peces con valores de 0,45 y 0,14  $\mu\text{g/kg/día}$ , estos últimos valores interpretados velocidad de-bioacumulación de As en Pez Cebra.

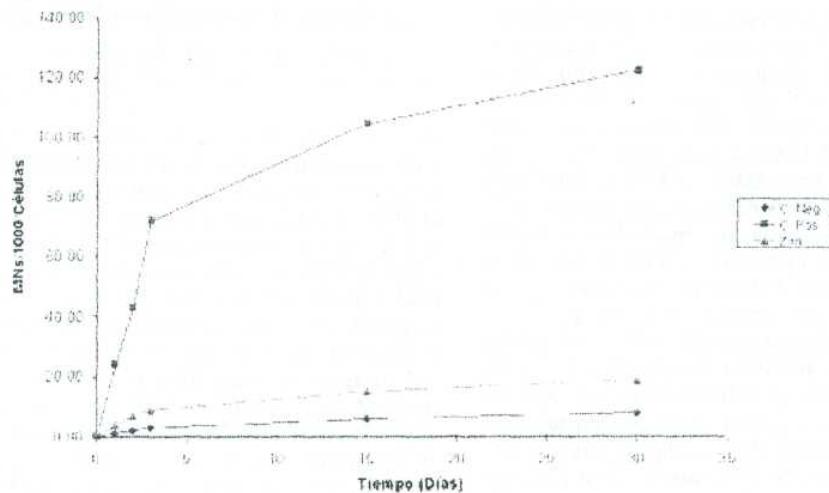
**Evaluación de daños genotóxicos**

Con relación a la inducción de micronúcleos (MNs) evaluados en células sanguíneas de las branquias de los peces sacrificados, se puede observar que en los controles negativos existe una inducción por generación espontánea de formación de MNs que al término de 30 días es de 8 MNs por cada 1000 células contadas. Por su parte el control positivo de 5000  $\mu\text{g/l}$  de As arrojó una inducción de MNs en células sanguíneas de 15,38 veces mayor que el control negativo, en tanto que para los peces en las aguas del pozo V de Zimapán se apreció un incremento de inducción de MNs de



2,38 veces más con respecto al control negativo. Esto permite corroborar el efecto genotóxico que provoca la presencia de As en aguas de la región de Zimapán. En la Figura 5 se muestran estos resultados.

**Figura 5.** Evaluación de la inducción de micronúcleos (MNs) en células sanguíneas tomadas de las branquias del Pez Cebra.



## Bibliografía

1. Albert Lilia, A. (1997). Introducción a la toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, División de Salud y Ambiente, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud y Secretaría de Ecología. Metepec, Estado de México, México
2. Baez Ramírez, O.A. (2001). Toxicidad del arsénico de fuentes subterráneas naturales de agua potable y presa Fernando Hirirart Balderrama de Zimapán, Hidalgo en *Oreochromis niloticus*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional
3. Coll, J.M. (2001). El transposon SB de salmonidos como vector para transferencia de genes en vertebrados. Investigaciones Agrarias, en prensa
4. del Razo, L.M., M.A. Arellano y M.E. Cebrián. (1990). The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenicism area of northern Mexico. *Environ. Pollut.*, 64:143-153
5. Gaiano, N. y N. Hopkins. (1996). Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in Zebrafish. *Nature*, 383:829-832
6. Ivics, Z., Z. Izsvak, A. Minter y P.B. Hackett. (1996). Identification of functional domains and evolution of Tc1-like transposable elements. *Proceedings National Academy Sciences, USA*, 93:5008-5013
7. Izsvak, Z., Z. Ivics y P.B. Hackett. (1997). Repetitive elements and their genetic applications in Zebrafish. *Biochemical Cell. Biology*, 75:507-523
8. Lam, W.L., T.S. Lee y W. Gilbert. (1996). Active transposition in zebrafish. *Proceedings National Academy Sciences, USA*, 93:10870-10875
9. Lenihan, J. y W.W. Fletcher. (1977). The chemical environment. En: *Environment and man*. Blackie Glasgow and London. Vol. 6
10. Metelev, V.V., A.I. Kanaev y N.G. Dzasokhova. (1983). *Water toxicology*. Amerind Publishing Co. New Delhi
11. Nölte, J. (1991). Continuous-flow hydride generation combined with conventional nebulization for ICP-AES determination. *Atomic Spectroscopy*, 12(6):199-203
12. Secretaría de Salud. (2000). Norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994. Agua para uso y consumo humano (potable)

## Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapán, Hidalgo, Mexico

Oliveria A. Baez Ramírez\* and Francisco Prieto García\*

Chemical Investigation Center, Independent University from Hidalgo State (UAEH), highway Pachuca-Tulancingo km 4.5, University City, Pachuca, Hidalgo, México, C.P. 42076

The induction of micronuclei in gill cells of zebra fish (*Danio rerio*) maintained in calcium–magnesium bicarbonated waters from a reference well and 'Zimapán 5' well, the latter with an arsenic (As) content ranging from 0.395 to 0.630 p.p.m., was studied. The specimens were studied during 180 days in three separated lots: in reference well-water (negative control), in reference water to which was added 5 mg/l As<sup>5+</sup> (positive control); and in water from 'Zimapán 5' well, with 65 specimens/lot. In waters an As concentration diminution was observed with time, whereas in fish there was an increase. After 30 days there was an As diminution in water from positive control of 1092.65 p.p.b. (36.42 p.p.b./day), whereas in fish it had increased to 523.81 p.p.b. (17.46 p.p.b./day). For the water from 'Zimapán 5' well, there was a diminution of 211.40 p.p.b. (7.04 p.p.b./day), and in fish there was an increase of 74.73 p.p.b. (2.49 p.p.b./day). In relation to micronucleus frequency in gill cells, at the end of 180 days in the negative control there was a spontaneous generation of 0.8 micronuclei/1000 cells, in the positive control there was a micronucleus frequency 163.5 times greater than in the negative control, whereas for the fish exposed to 'Zimapán 5' well-water the micronucleus frequency was 56.25 times greater than in the negative control. Taken together these results demonstrate the genotoxicity to *Danio rerio* of As in the well water.

### Introduction

Arsenic (As) is a carcinogen to which numerous human groups around the world are exposed (1). It is absorbed by the lung, gastrointestinal system and skin, it crosses the placental barrier and it concentrates to a significant extent in the fetus (2). In Hidalgo, Mexico, the State Management of the Water National Commission has recognized the high arsenic content in the water from Zimapán wells. The total As concentration in the 'Zimapán 5' well-water (Z5WW) varies from 0.395 to 0.630 p.p.m. (3,4). For this reason, the Zimapán population is at risk of health problems related to exposure to this non-metal (5).

Zimapán, Hidalgo, Mexico is located between 20° 57' and 20° 34' north and between 99° 33' and 99° 12' west (Figure 1). The 'Zimapán 5' well is located at Mineros street No. 40, Llano Norte Colony in the Zimapán's municipal head.

Fish have been widely used as models for monitoring toxic chemicals in aquatic environments (6,7). Baez (8) exposed healthy tilapias (*Oreochromis niloticus*) to 0.00, 0.05 and 15.73 p.p.m. of additional As (administered as arsenic

trioxide) in the Z5WW over 96 h and a concentration increase was found of the nonmetal in whole fish of 435, 465 and 10 044 p.p.b. (dry basis), respectively. McGeachy and Dixon (9) determined the average time for the equilibrium loss in the trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to 60 and 120 mg/l arsenate to 15°C, which was 210 and 34.8 h with an As concentration in fish of 8100 and 8600 p.p.b. in humid base. Naqvi *et al.* (10) exposed adult crayfish *Procambarus clarkii* to 0.5, 5 and 50 p.p.m. of the herbicide monosodium methanearsonate in the water over 8 weeks at the end of which the total As concentration in fresh tissue was of 930, 4290 and 4600 p.p.b., respectively.

Among other techniques, the micronucleus test is very applicable to fish. The micronuclei [MNS] form by the loss of acentric fragments or whole chromosomes that are not incorporated in the brother nucleus during mitosis, by apoptosis, or phagocytosis, among other mechanisms (11). Cavas and Ergene-Gözükar (12) exposed the fish *Oreochromis niloticus* to 5, 10 and 20% of a textile effluent over 9 days, obtaining an increase in the micronucleus frequency in gill cells with the increase of the dose and time.

In human studies, Basu *et al.* (13) investigated individuals exposed to arsenic through drinking ground water (containing 368.11 µg/l of As) in West Bengal, India, and found a statistically significant increase in micronucleus frequency in oral mucosa cells, urothelial cells and lymphocytes (5.15, 5.74 and 6.39/1000 cells, respectively) when compared with unexposed controls (0.77, 0.56 and 0.53/1000 cells, respectively). Gonsebatt *et al.* (14) studied micronuclei in exfoliated

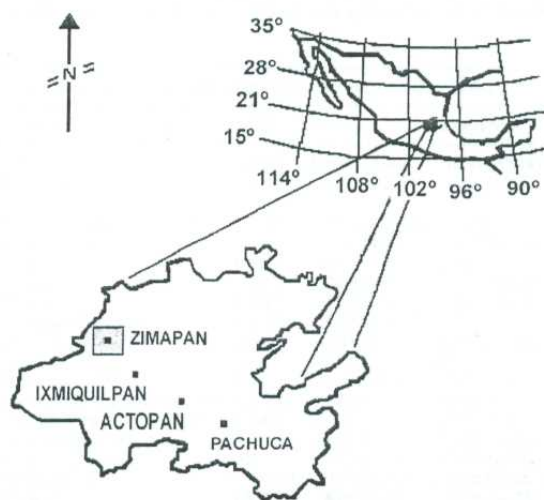


Fig. 1. Zimapán location map in Hidalgo, Mexico.

\*To whom correspondence should be addressed. Fax: +0177171 72133; Email: BARO670528@yahoo.com.mx

epithelial cells obtained from the oral mucosa and urine samples in exposed inhabitants from Santa Ana, where drinking water has 408.17 µg/l As, finding a significant increase in micronucleus frequency in oral and urinary epithelial cells (males being more affected than females) as well as a higher number of micronucleated oral cells in individuals with skin lesions.

Other metals also induce micronuclei; Kapka *et al.* (15) examined 67 children aged nine from Silesia who were exposed to lead, with an average blood concentration of 4.8 mg/dl, compared with 2.5 mg/dl in the controls and found a micronucleus frequency of 2.8 versus 1.0, respectively. Joardar and Sharma (16) administered mice with different oral doses of MnSO<sub>4</sub> and KMnO<sub>4</sub> over a period of 3 weeks and observed that the frequencies of chromosomal aberrations and micronuclei in bone marrow cells were increased significantly by both salts and that the clastogenic effects were directly related to the concentrations used.

The general objective of this study was to evaluate the genotoxic effect induced by As from Zimapán 'drinking water' using zebra fish (*Danio rerio*) as a biomonitor. Our specific objective was to determine the micronucleus frequency in gill cells.

## Materials and methods

### Physicochemical and microbiological characterization of well waters

Monthly samplings from Zimapán 5 well and from a reference well, located in University City (Pachuca, Hidalgo, Mexico), [UAEHWW], were made from February 2003 to January 2004. Physicochemical and microbiological analyses were made according to the norm NOM-201-SSA1-2002 (17). For the metals and As determination, the samples were preserved in 3% nitric acid. The metal analysis was made by emission spectroscopy with plasma inductive connection (ICP) in Perkin-Elmer equipment (18,19). The As determination was made by atomic absorption spectroscopy with hydride generation, previous prereduction with ascorbic acid to 25%, KI to 25% and HCl conc. (20,21).

### Exposure of *Danio rerio* to dibasic sodium arsenate (Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)

For this study zebra fish, 4 months old with an average weight of 0.2 g were obtained from a pet shop. Sixty-five animals were placed in each of three lots; one for the negative control (UAEHWW without As addition), another for the

positive control (with an As initial concentration of 5055.96 p.p.b. of total As, added to the UAEHWW as dibasic sodium arsenate (Baker analyzed lot 6 41 366)), and finally the lot with the Z5WW (with an As initial concentration of 451.40 p.p.b.). During 180 days fish were maintained at 26°C, with permanent aeration, 20 liter water per lot, feeding with Tetramin dry flakes twice a day (22,23). The first total water change was after 30 days and thereafter every 4 days.

The total As concentration in waters and in fish (excluding gills, based on dry weight) was determined on days 0, 1, 2, 3, 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 by atomic absorption spectroscopy with hydride generation, previous prereduction with ascorbic acid to 25%, KI to 25% and HCl conc. Before the prereduction the sampled water aliquots were preserved in nitric matrix to 3% and each dry fish was digested with concentrated nitric acid in a microwave oven.

### Micronucleus frequency in gill cells

The micronucleus frequency on days 0, 1, 2, 3, 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 was determined using five fish for each time and treatment, staining with 30% Giemsa solution (the stock solution diluted 3:7 in Sorenson's buffer) and later scoring 1000 cells/slide under 1000× magnification (12,23). Two entire gills per fish were extracted for each slide, because the gills were very small and it was necessary to have sufficient tissue for the score. The following criteria were used: (i) micronuclei should be >1/3 diameter of the main nucleus, (ii) they should be on the same plane of focus, (iii) they should have the same color, texture and refraction as the main nucleus, (iv) they should have oval or round shape and (v) they should be clearly separated from the main nucleus.

## Results

### Characterization of waters from 'Zimapán 5' and UAEH wells

The results of water characterization appear in Table I (averages from February 2003 to January 2004).

In all cases results of 3 retorts/month and 12 months are reported (*n* = 36). Parameters such as pH, conductivity, dissolved total solids, total solids, nitrates, nitrites, chlorides, among others, are higher in the UAEHWW than in the Z5WW, which shows that the first is saltier but it fulfills the established parameters for the Mexican norm for water for human consumption (24). In general, all the evaluated parameters are below the permissible limits established by the norm. Both cases had calcium-magnesium bicarbonated

Table I. Average and variation coefficient of the water characterization analysis of the 'Zimapán 5' and UAEH wells (February 2003–January 2004)

Analysis	NOM	Z5WW	UAEHWW	Analysis	NOM	Z5WW	UAEHWW
Aerobic mesophilic (UFC/ml)	<100	<100	<100	Mn (µg/l)	<150	330.00 (2.00)	10.11 (57.18)
Al (µg/l)	<200	22.00 (6.10)	2.19 (54.35)	Na <sup>+</sup> (mg/l)	<200	5.70 (6.35)	7.06 (7.74)
As (µg/l)	<25	480.00 (2.20)	8.55 (79.66)	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	<1	0.002 (10.10)	<0.011
Ba (µg/l)	<700	48 (3.10)	9.44 (16.40)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	<10	0.04 (4.30)	3.61 (62.43)
Ca <sup>2+</sup> (mg/l)	NN	28.32 (38.62)	17.69 (27.12)	Odor	Nice	Nice	Nice
Calcic hardness (mg/l)	NN	106.60 (2.80)	103.17 (21.97)	Pb (µg/l)	<10	12.00 (4.00)	0.32 (29.24)
Cd (µg/l)	<5.0	5.00 (7.60)	<2.085	Ph (U)	6.5–8.5	7.30 (0.40)	8.14 (10.11)
Cl <sup>-</sup> (mg/l)	<250	1.11 (7.00)	23.56 (36.16)	Residual Cl <sub>2</sub> (mg/l)	0.2–1.5	0.02 (0.30)	<0.02
Color UPC	<20	<5	2.25 (104.82)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/l)	<400	48.48 (2.12)	108.43 (70.54)
Conductivity (mS/cm)	NN	0.49 (5.90)	0.62 (20.28)	Taste	Nice	Nice	Nice
Cr (µg/l)	<50	<0.10	<0.219	Temperature (°C)	NN	25.60 (2.50)	21.52 (7.74)
Cu (µg/l)	<2000	11.00 (0.016)	<0.48	Total coliforms (NMP/100 ml)	Absence	Absence	Absence
Faecal coliforms (NMP/100 ml)	Absence	Absence	Absence	Total dissolved solids (mg/l)	<1000	244.30 (3.10)	485.80 (14.71)
Fe (µg/l)	<300	260.00 (2.40)	79.01 (11.01)	Total hardness (mg/l)	<500	348.60 (0.90)	199.75 (16.63)
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	<300	242.00 (8.59)	96.58 (34.79)	Total solids (mg/l)	NN	307.30 (7.10)	537.73 (11.50)
Hg (µg/l)	<1	<0.50	0.39 (2.68)	Turbidity (UTN)	<5.0	0.50 (1.30)	0.055 (108.68)
K <sup>+</sup> (mg/l)	NN	2.24 (2.20)	2.27 (30.73)	Zn (µg/l)	<5000	8.00 (6.20)	4.08 (44.05)
Mg <sup>2+</sup> (mg/l)	NN	6.81 (8.04)	9.22 (19.68)				

NOM, values established by the NOM-127-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 2000). Z5WW, 'Zimapán 5' well-water; UAEHWW, well-water from Independent University from Hidalgo State; and NN, none normalized. The values in parentheses indicate coefficient of variation (CV).  
 $CV = \left( \frac{\sum (X_i - X_m)^2}{n - 1} \right)^{0.5} / X_m \times 100$  where  $X_i$  = value/retort,  $X_m$  = average,  $n$  = number of retorts/analysis.

**Table II.** Average As concentration in samples of waters and fish (excluding gills) for the treatments negative, positive and Z5WW

Days	Negative control	Positive control	Z5WW
Average As concentration in waters in p.p.b. and CV <sup>a</sup>			
0	<1.12	5055.96 (1.06)	451.40 (1.92)
1	<1.12	4937.20 (0.64)	429.60 (0.32)
2	<1.12	4926.10 (0.61)	417.20 (1.29)
3	<1.12	4799.30 (1.05)	388.00 (1.27)
15	<1.12	4512.40 (0.90)	322.20 (2.46)
30	<1.12	3963.31 (9.03)	240.00 (2.34)
60	<1.12	4149.88 (4.86)	246.69 (2.73)
90	<1.12	3922.89 (2.69)	233.11 (3.49)
120	<1.12	4048.51 (2.21)	228.33 (4.13)
150	<1.12	4032.34 (2.83)	231.67 (3.73)
180	<1.12	4042.29 (6.29)	237.19 (1.80)
Average As concentration in fish (excluding gills) in p.p.b. and CV <sup>a</sup>			
0	<1.12	<1.12	<1.12
1	<1.12	15.12 (2.03)	3.34 (4.43)
2	<1.12	30.75 (4.59)	4.87 (1.56)
3	<1.12	50.92 (2.45)	10.25 (0.99)
15	<1.12	300.45 (6.83)	40.28 (8.95)
30	<1.12	524.93 (10.29)	75.85 (1.83)
60	<1.12	1068.25 (6.42)	101.69 (10.46)
90	<1.12	2375.73 (3.81)	212.19 (2.74)
120	<1.12	2896.03 (4.10)	223.63 (3.13)
150	<1.12	3570.08 (3.57)	364.57 (3.18)
180	<1.12	4051.93 (1.74)	397.76 (4.54)

<sup>a</sup>The values in parentheses indicate coefficient of variation (CV).  $CV = \left( \frac{\sum (X_i - X_m)^2}{n - 1} \right)^{0.5} / X_m \times 100$  where  $X_i$  = value/retort,  $X_m$  = average and  $n$  = number of retorts. The results correspond to 3 and 5 averaged retorts for waters and fish, respectively. Z5WW, 'Zimapan 5' well-water.

waters, indicating that the UAEHWW had greater calcium content than magnesium.

*Evaluation of As bioaccumulation in zebra fish*

The As exposures began in September 2003 and finished in April 2004, with 6 months of evaluation. The results are shown in Table II.

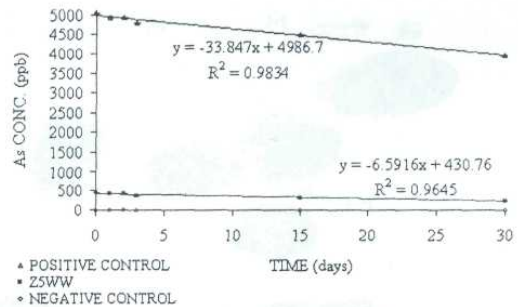
A concentration decrease in As was observed for the positive control and the Z5WW waters, with a simultaneous increase in As levels in the fish. After 30 days 47.94% of the As lost from the positive control water had bioaccumulated in the fish, the remainder was eliminated by excretion in the sediment. Similarly 35.35% of the As lost from the Z5WW after 30 days had bioaccumulated in the fish. Figure 2 shows the diminution of As concentration in waters and Figure 3 shows the increase in the As concentration in fish.

*Micronucleus frequency*

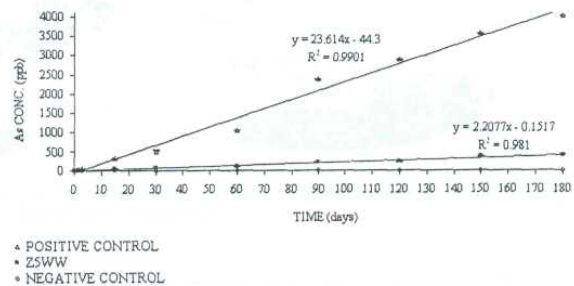
The micronucleus frequency in gill cells of the fish maintained in the negative control water for 180 days was 0.8 micronuclei/1000 cells. On the other hand, the positive control water produced a frequency 163.5 times greater than in the negative control, whereas for the fish in the Z5WW an increase in frequency 56.25 times greater than was observed in the negative control, along with other nuclear abnormalities. Results are shown in Figures 4 and 5, and Table III.

**Discussion**

The UAEHWW was saltier than Z5WW, both waters were calcium-magnesium bicarbonated and in general they were below the official norm limits for water for human



**Fig. 2.** As concentration diminution in waters with time. Bars indicate the standard deviation.



**Fig. 3.** As concentration increase in fish with time. Bars indicate the standard deviation.

consumption. However, the latter showed an As concentration almost 20 times greater than that allowed by norm NOM-127-SSA1-1994 (24).

In relation to the bioaccumulation, there was an As concentration increase in fish and a diminution in waters with time. After 30 days a diminution of As concentration in water of 1092.65 p.p.b. (36.42 p.p.b./day) was observed for the positive control, whereas in fish (excluding gills) it increased to 523.81 p.p.b. (17.46 p.p.b./day). Also the Z5WW showed a diminution of 211.40 p.p.b. (7.04 p.p.b./day) and the fish had an increase of 74.73 p.p.b. (2.49 p.p.b./day). The increase in As concentration in fish exposed to the positive control was much more rapid than in those exposed to Z5WW, with a bioaccumulation of 47.94 and 35.35%, respectively, of the As lost from the water.

After 180 days of exposure the As concentration in fish (excluding gills) from Z5WW treatment was 397.76 p.p.b. (dry basis) which is near the value reported by Baez (8) of 435 p.p.b. (dry basis) for whole fish (*Oreochromis niloticus*) exposed over 96 h to the same water. On the other hand, the As concentration of 4051.93 p.p.b. in fish from the positive control water was similar to the value reported by Naqvi *et al.* (10) of 4290 p.p.b. in fresh tissue of crayfish *Procambarus clarkii* exposed to 5 p.p.m. of monosodium methanearsenate herbicide in water over 8 weeks.

As shown in Figures 2 and 3, the negative slopes showing As diminutions in waters, with values of -33.847 and -6.5916 p.p.b./day, correspond to the positive control and Z5WW treatments, respectively. On the other hand, the As bioaccumulation in zebra fish can be expressed as a rate of 23.614 and 2.2077 p.p.b./day for fish from positive control and Z5WW treatments, respectively. This is proportional to the As initial concentration

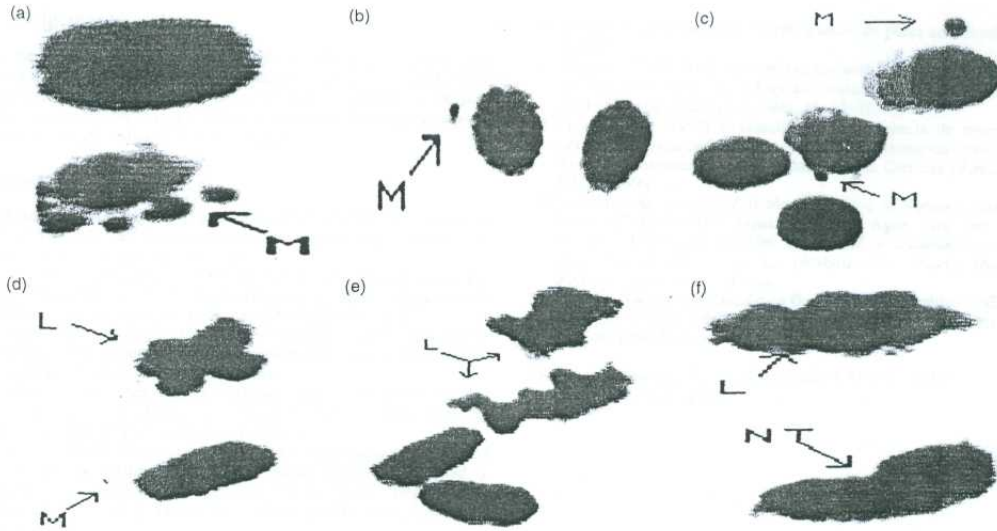


Fig. 4. Micronuclei and other nuclear abnormalities in zebra fish gill cells from positive and Z5WW treatments: (a), (b), (c) and (d) show micronuclei; (d), (e) and (f) show nuclear abnormalities. M, micronuclei; L, lobed nuclei; NT, notched nuclei. The magnification is 1000X.

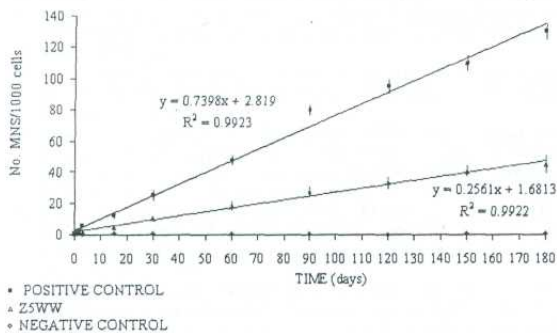


Fig. 5. Changes in micronucleus frequency in gill cells of zebra fish with time. Bars indicate the standard deviation.

in waters which was 11.2 times greater for the positive control water than for Z5WW, demonstrating that the bioaccumulation is linear.

In relation to the genotoxicity there was an increase in micronucleus frequency with time, which was greater in fish treated with the positive control than in fish treated with Z5WW, accompanied in both cases, by other nuclear abnormalities as well. With both treatments As promoted cell turnover at sublethal concentrations, with an increase in micronucleus frequency of 0.7398 and 0.2561 micronuclei/day (Figure 5), respectively, a ratio of 2.88:1.

The micronucleus frequency of 10.2/1000 cells at 30 days in fish treated with Z5WW is similar to that of 10.16/1000 cells reported by Cavas and Ergene-Gözükara (12) in gill cells at 3 days of exposing the fish *O. niloticus* to 10% of a textile effluent. However, the frequency of 4.4 micronuclei/1000 cells after 15 days of the same treatment is similar to 5.15 micronuclei/1000 cells found by Basu *et al.* (13) in oral mucosa

Table III. Micronucleus frequency (average) in gill cells of zebra fish (*Danio rerio*) exposed to As-containing waters

DAYS	Negative control MNS/1000 cells (CV <sup>a</sup> )	Z5WW MNS/1000 cells (CV)	Positive control MNS/1000 cells (CV)
0	0.4 (122.5)	0.4 (122.5)	0.4 (122.5)
1	0.8 (50.0)	1.2 (97.2)	2.0 (70.7)
2	0.6 (81.6)	2.0 (54.8)	2.6 (71.3)
3	0.4 (122.5)	2.4 (42.5)	6.0 (29.8)
15	0.6 (81.6)	4.4 (49.0)	12.0 (19.0)
30	0.4 (122.5)	10.2 (20.9)	24.8 (14.3)
60	0.4 (122.5)	18.4 (17.7)	48.0 (7.5)
90	0.4 (122.5)	27.6 (13.7)	80.2 (5.0)
120	0.2 (200.0)	32.8 (11.8)	95.4 (5.1)
150	0.4 (122.5)	40.8 (10.0)	110.4 (4.9)
180	0.8 (50.0)	45.0 (14.1)	130.8 (4.1)

<sup>a</sup>The values in parentheses indicate coefficient of variation (CV).  $CV = \left( \frac{\sum (X_i - X_m)^2}{n - 1} \right)^{0.5} / X_m \times 100$  where  $X_i$  = value/retort,  $X_m$  = average and  $n$  = number of retorts. The results correspond to 5 averaged retorts. Z5WW, 'Zimapan 5' well-water.

cells from individuals exposed to 368.11 µg/l of As in drinking ground water.

It is important to mention that the Z5WW had greater concentrations of manganese (330 µg/l) and lead (12 µg/l) than the UAEHWW, as both manganese (16) and lead (15) also induce micronuclei. Although these exceeded the permissible maximum limit (NOM-127-SSA1-1994) by 2.0 and 1.2 times, they do not compare with the As which exceeded the permissible limit by 19.2 times; from this, we conclude that this non-metal is the cause of the major genotoxic damage.

In conclusion, the results of this study demonstrate the significant genotoxic effects of As bioaccumulation in zebra fish gill cells.

## Acknowledgements

We are grateful to Dr Armida Zúñiga Estrada for allowing us to make the microbiological analysis and part of the physicochemical analysis in the State Laboratory of Public Health from Hidalgo. We are also grateful to Dr Juan Carlos Gaytan Oyarzun for having allowed us to use the genetics laboratory to conduct the biological studies of this investigation.

## References

- Del Razo, L.M., Arellano, M.A. and Cebrían, M.E. (1990) The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenicism area of northern Mexico. *Environ. Pollut.*, **64**, 143–153.
- Galvão, L.A.C. and Corey, G. (1987) Arsénico. Serie Vigilancia. 8a. ed. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud.
- Arriente, H.M.A., Rodríguez, C.R. and Villaseñor, G. (1993) Estudio de reconocimiento de la contaminación por arsénico en la zona de Zimapán, Hgo. Instituto de geofísica, UNAM, México.
- Ramos, L.J.A. (1996) Parámetros estructurales que controlan la hidrodinámica de las aguas subterráneas en el área de Zimapán, Hgo. Tesis de maestría. Instituto de geofísica, UNAM, México.
- Albert, L.A. (1997) Introducción a la toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, División de Salud y Ambiente, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud y Secretaría de Ecología, Metepec, Estado de México, México.
- Maldonado, E. (2003) Experimentación en el pez cebra, un modelo de biología del desarrollo. *Mensaje bioquímico*, XXVII, 147–156. México.
- Oberemm, A. (2000) The use of a refined zebra fish embryo bioassay for the assessment of aquatic toxicity. *Research note*, **29**, 7, 32–40.
- Baez, R.O.A. (2001) Toxicidad del arsénico de fuentes subterráneas naturales de agua potable y presa Fernando Hiriart Balderrama de Zimapán, Hgo. en *Oreochromis niloticus*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, México.
- McGeachy, S.M. and Dixon, D.G. (1992) Whole body arsenic concentrations in rainbow trout during acute exposure to arsenate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **24**, 301–308.
- Naqvi, S.M., Flagg, C.T. and Hawkins, R.L. (1990) Arsenic uptake and depuration by red crayfish, *Procambarus clarkii*, exposed to various concentrations of monosodium methanearsonate (MSMA) herbicide. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **45**, 94–100.
- Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P. and MacGregor, J.T. (1991) Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.*, **18**, 277–291.
- Cavas, T. and Ergene-Gözükara, S. (2003) Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.*, **538**, 81–91.
- Basu, A., Mahata, J., Roy, A.K. et al. (2002) Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat. Res.*, **516**, 29–40.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Salazar, A.M., Montero, R., Guzmán, P., Blas, J., Del Razo, L.M., García-Vargas, G., Albores, A., Cebrían, M.E., Kelsh, M. and Ostrosky-Wegman, P. (1997) Review: cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat. Res.*, **386**, 219–228.
- Kapka, L., Anderson, D., Kruszewski, M., Siwinska, E., Oldak, T. and Mielzynska, D. (2004) DNA damage in children exposed to lead. *Gliwickie Spotkania Naukowe*, 19–20, November, 2004.
- Joardar, M. and Sharma, A. (1990) Comparison of clastogenicity of inorganic manganese administered in cationic and anionic forms *in vivo*. *Mutat. Res.*, **240**, 159–163.
- Secretaría de Salud. (2002) Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2002, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias. *Diario Oficial de la Federación*, 18-10-02, México.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) y Water Pollution Control Federation (WPCF). (1989) Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ediciones Días de Santos, S.A.
- Berman, E. (1980) *Toxic metals and their analysis*. Heyden International Topics in Science, London.
- Nölte, J. (1991) Continuous-flow hydride generation combined with conventional nebulization for ICP-AES determination. *Atomic Spectrosc.*, **12**, 199–203.
- Hepher, B. and Pruginin, Y. (1998) Cultivo de peces comerciales. Editorial Limusa.
- Nagel, R. (2002) *DarT*: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio*—a general model in ecotoxicology and toxicology. TU Dresden, Institut für Hydrobiologie, D-Dresden. *Altex*, **19**, 38–48.
- Guzmán, D.P. (1997) Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales como prueba para detectar exposición crónica a arsénico. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Biología celular). UNAM, México.
- Secretaría de Salud. (2000) Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. *Diario Oficial de la Federación*, 22-11-00, México.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). (1995) Zimapán de Reyes-Estado de Hidalgo-Cuaderno estadístico municipal-Edición 1994. México.

Received on February 15, 2005; revised on April 15, 2005;  
accepted on April 19, 2005