

## Acumulación, toxicidad y teratogénesis provocada por presencia de arsénico en aguas en el pez cebra (*Danio rerio*)

Francisco Prieto García<sup>1</sup>, Oliveria Araceli Báez Ramírez<sup>1</sup>, Willians Scoot<sup>2</sup>, Juan C. Gaytán Oyarzún<sup>2</sup>, Armida Zúñiga Estrada<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Carretera a Pachuca –Tulancingo km. 4.5, 42076 Pachuca de Soto, Hidalgo (México)  
e-mail: prietog@uaeh.reduaeh.mx

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Carretera a Pachuca –Tulancingo km. 4.5, 42076 Pachuca de Soto, Hidalgo (México)

### Resumen

Fueron estudiados los daños teratogénicos y la inducción de micronúcleos en células branquiales de peces cebra (*Danio rerio*) mantenidos en aguas bicarbonatadas cálcico magnésicas de un pozo de referencia y del pozo Zimapán 5, el último con un contenido de arsénico que varía de 0,395 a 0,630 ppm. Para el estudio de genotoxicidad los ejemplares fueron estudiados durante 180 días en tres tratamientos: en agua del pozo de referencia (control negativo), en el agua de referencia adicionada con 5 mg As (V)/L (control positivo), y en el agua del pozo Zimapán 5, con 65 especímenes por lote. En aguas se obtuvo una disminución de la concentración de As con el tiempo, mientras que en pescados hubo un incremento. Después de 30 días hubo una disminución de As en el agua del control positivo de 1 092,65 ppb (36,42 ppb/día) mientras en pescados hubo un incremento de 523,81 ppb (17,46 ppb/día). Para el agua del pozo Zimapán 5 hubo una disminución de 211,40 ppb (7,04 ppb/día), y en pescados hubo un incremento de 74,73 ppb (2,49 ppb/día). En relación a la frecuencia de inducción de micronúcleos en células branquiales, al final de los 180 días en el control negativo hubo una generación espontánea de 0,8 micronúcleos/1 000 células, en el control positivo hubo una frecuencia de inducción de micronúcleos 163,5 veces mayor que en el control negativo, mientras que en los peces expuestos al agua del pozo Zimapán 5 fue 56,25 veces mayor con respecto al mismo. Estos resultados demuestran la genotoxicidad del As en *Danio rerio*. Para el estudio de teratogénesis, se colocó una hembra y un macho en apareamiento en las mismas condiciones de los tratamientos (negativo, positivo y Zimapán 5), obteniendo que a mayor concentración de As en el agua mayor porcentaje de huevos no viables y óvulos, menor porcentaje de huevos viables y de eclosión, mayor porcentaje de alevines recién eclosionados y juveniles con malformaciones, y menor porcentaje de juveniles sobrevivientes.

*Palabras clave:* Teratogénesis, genotoxicidad, micronúcleos, *Danio rerio*, arsénico

### Summary

#### Accumulation, toxicity and teratogenesis caused in Zebrafish (*Danio rerio*) by presence of arsenic in water

The teratogenic damages and 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 arsenic (As) content ranging from 0,395 to 0,630 ppm, was studied. For the genotoxicity study the specimens were studied during 180 days in 3 separated lots: in reference well water (negative control), in reference water to which was added 5 mg/L As (V) (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 1 092,65 ppb (36,42 ppb/day) whereas in fish it had increased to 523,81 ppb (17,46 ppb/day). For the water from Zimapán 5 well there was a diminution of 211,40 ppb (7,04 ppb/day), and in fish there was an increase of 74,73 ppb (2,49 ppb/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/1 000 cells, in the positive control there was a micronucleus frequency 163,5 times greater than in negative control, whereas for the fish exposed to Zimapán 5 well water the micronucleus frequency was 56,25 times greater than with the negative control. Taken together these results demonstrate the genotoxicity to *Danio rerio* of As in the well water.

*Key words:* teratogenesis, genotoxicity, micronuclei, *Danio rerio*, arsenic

## Introducción

---

La toxicología genética surgió ante la necesidad de estudiar los efectos de estos agentes contaminantes en la actividad fisiológica normal de los seres vivos. Sin embargo, 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 blancos. Por eso, el encontrar marcadores biológicos de exposición temprana en tejidos blancos, que puedan permitir la predicción de un daño por agentes contaminantes externos sobre la salud en individuos, se ha convertido en un objetivo primordial de la toxicología genética y conjuntamente con el área química; de tal manera que puedan realizarse diagnósticos y detecciones tempranas, prevenciones y explicar los mecanismos de acción de las sustancias carcinogénicas (Ehling, 1991).

El arsénico (As) es conocido como un agente carcinógeno al que están expuestos numerosos grupos humanos en México y en el resto del mundo y cuya actividad genotóxica ha sido demostrada en grupos de individuos expuestos (Del Razo y cols., 1990). El As y sus compuestos se introducen al organismo principalmente por ingestión, en donde el sistema gastrointestinal absorbe en promedio el 80% del As; esta cantidad es variable según algunas características del compuesto y del individuo.

Navarro y cols. (1992) determinaron As total en muestras liofilizadas de pescado 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 de 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, exponiéndolos a 0,5, 5 y 50 ppm del herbicida metanearsonato de monosodio en agua por 8 semanas. Por otra parte, otros 3 lotes fueron expuestos a las mismas concentraciones y tiempo, y después fueron transferidos a agua desclorinada 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 0,23 a 0,93, de 1,42 a 4,29, y de 2,81 a 4,60 ppm 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 perdida en las primeras 2 semanas.

El trióxido de arsénico causa toxicidad en los peces con una 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. Los arsenitos penetran al cuerpo del pez más rápido que los arsenatos y son más tóxicos. 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 ppm 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 ppm As total en agua del pozo Zimapán 5 (Estado de Hidalgo, México) 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 Ramírez, 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 (debido a la 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; 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.

El As también causa daños neuromotores, lo cual fue demostrado por McGeachy y Dixon (1992) que determinaron el tiempo promedio para la pérdida del equilibrio en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) expuesta a 240 y 120 mg arsenato/l a 5°C, así como también a 60 y 120 mg/l a 15°C, el cual fue de 32,2, 56,8, 210,0 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 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 arco iris sanas y 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 alevines sobrevivientes fueron sacrificados observándose lesiones en el riñón en el 39,6% de ellos. Estos daños eran grandes áreas de fibrosis. En el hígado se observaron lesiones proliferativas y no neoplásicas, también un gran desarrollo de hepatocitos y colangiocitos de una manera desorganizada.

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 de río *Procambarus clarkii*. En esta investigación 36 organismos de ambos sexos fueron expuestos a 100 ppm del herbicida metanearsonato 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 pleópodos de cada hembra, así como la pérdida o muerte de éstos. Treinta días después de la eclosión, veinte crías fueron expuestas en una solución de 15 ppm de MM por 37 semanas. La eclosión fue de 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.

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 y hepatología de la trucha arco iris. Cuatro grupos de peces fueron expuestos a 0, 10, 20 y 30 mg As/kg en el alimento. Después de 8 semanas de exposición los organismos de los tratamientos con 10, 20 y 30 mg As/kg presentaron una reducción en la concentración de hemoglobina corpuscular, lo que sugiere que el efecto primario del As en la sangre fue un decremento significativo en la hemoglobina de los eritrocitos sin hemólisis de las células. Los organismos expuestos a 10 mg As/kg presentaron un decremento en el hematocrito a las 4 y 6 semanas. El hígado acumuló los más altos niveles de As (lo cual pudo causar cambios histológicos con alteración de sus funciones) siguiendo 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 mg As/kg y 30 mg As/kg ascendió hasta 1,59 mg/kg y 2,40 mg/kg después de 4 y 2 semanas de exposición, respectivamente. Se observó una disminución del crecimiento que pudo deberse a la inhibición de enzimas, así también como una reducida capacidad de transporte de oxígeno en la sangre, que resultó en una ineficiente utilización del alimento.

Por otra parte, se han realizado investigaciones genéticas en el pez cebrá y su desarrollo embrionario. Por ejemplo, se están usando retrovirus que contienen la glicoproteína G del rabdovirus VSV (pseudotipos) para mutagénesis insercional masiva

(Gaiano y Hopkins, 1996) y es uno de los modelos en los que se avanza en el descubrimiento y aplicaciones de los transposones de vertebrados como posibles vectores de transferencia de genes (Ivics y cols., 1996; Lam y cols., 1996; Izsvak y cols., 1997; Coll, 2001). El pez cebra es uno de los peces que se encuentran más cercanos a la completa secuenciación de su genoma. Los estudios de biología molecular en peces no sólo permiten imaginar una posible gran versatilidad en cuanto al mejor aprovechamiento de estas especies como alimento humano sino que además ofrecen otras posibilidades como la reprogramación de especies comercializables, y su aprovechamiento como modelos sobre crecimiento, enfermedades genéticas y desarrollo aplicables a otros vertebrados incluido el hombre (Burkhart, 2000; Hackett y Álvarez, 2000).

El pez cebra 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. 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. Es por ello que 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.

## **Metodología Experimental**

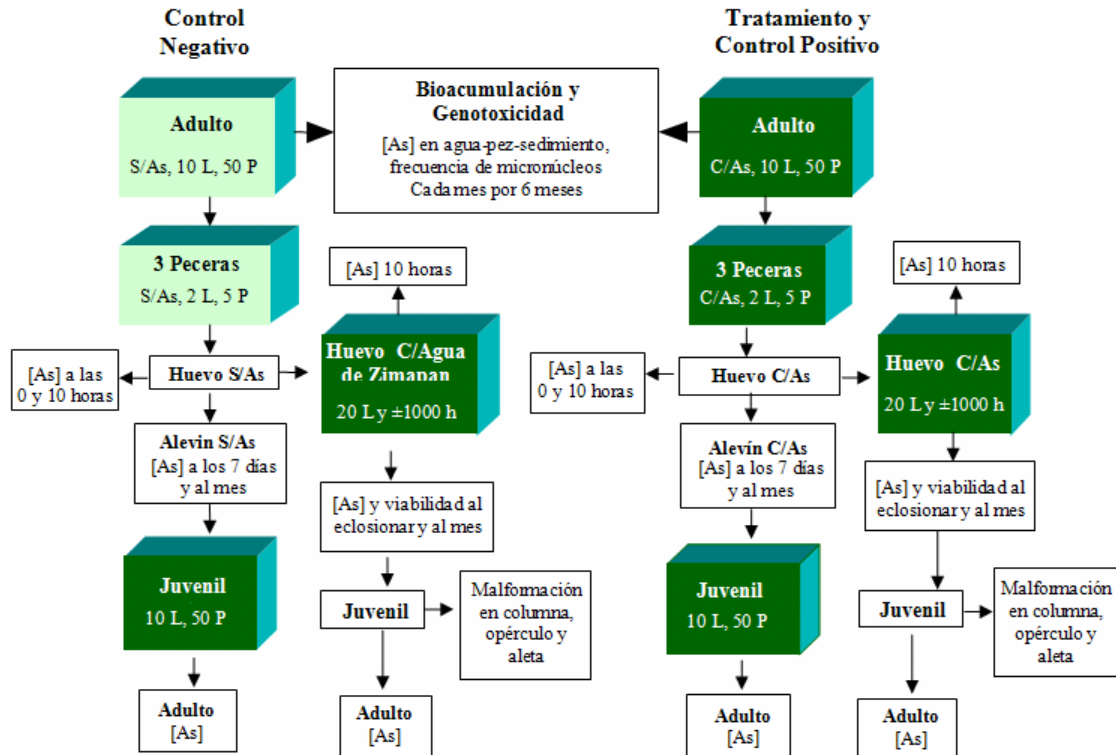
---

### **Bloque experimental de bioacumulación de arsénico en pez cebra**

La metodología experimental se muestra en la Figura 1 en forma de diagrama de flujo (Báez Ramírez y Prieto García, 2004) donde se señalan las diferentes etapas de la investigación. Los ejemplares del pez cebra se pusieron en peceras respectivas, divididas en tres lotes: control negativo, agua limpia (concentración de As total menor de 0,002 mg/l) de pozo (UAEHWW) (pozo de la Universidad de Hidalgo, México); control positivo, agua del mismo pozo UAEHWW con adición de arseniato ácido de sodio hasta alcanzar una concentración de 5 mg/L de As en el agua; y control experimental, agua del pozo V de Zimapán (Z5WW), Hidalgo (concentración de As total de 0,48 mg/l). En cada lote se colocaron 50 ejemplares bajo condiciones ideales de temperatura, oxigenación y alimentación. Para cada caso se tomaron alícuotas de agua (cinco réplicas) y preparadas en matriz nítrica de 3% y se analizó la concentración de As total; para ello se les hizo una prerreducción y luego se analizaron por espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros. Para la prerreducción, a 10 ml de aguas de UAEHWW o a 5 ml de Z5WW se le agregó 2 ml de ácido nítrico concentrado, 2 ml de ácido clorhídrico concentrado, 2 ml de ioduro potásico 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 prerredujeron los patrones aforando a 50 ml. Posteriormente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro con borohidruro de sodio al 0,6% - NaOH al 0,5% y HCl 5 M (American Public Health Association y cols., 1989; Nölte, 1991). 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 en ácido nítrico. Posteriormente se analizó [As total].

Figura 1. Diagrama de flujo del experimento (Báez Ramírez y Prieto García, 2004).



### Pruebas de evaluación de inducción y frecuencia de aparición de micronúcleos (FMNs). Teratogénesis.

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 833,3 g, se desechó el sobrenadante, se aforó a 1,5 ml con agua destilada, se dejó reposar 5 min, se centrifugó nuevamente 10 min a 833,3 g, 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 la solución madre con buffer 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 400x para registrar el número de micronúcleos (frecuencia en 1 000 células).

El siguiente criterio fue usado: 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.

Para el estudio de la teratogénesis se prepararon 3 peceras con los tratamientos control negativo, control positivo y Z5WW. En cada una se colocó una maternidad con una hembra y un macho a 28-29°C con aireación permanente, iluminación natural y artificial, 7,3 l de agua, alimentación con hojuelas Tetramin dos veces al día y cambio de agua cada 4 días. Cuando había desove los huevos se colocaban en frascos de vidrio dentro de otras peceras, en las mismas condiciones de los tratamientos, hasta que eclosionaban. Posteriormente se vaciaban los alevines en sus peceras y se mantenían a 26°C con cambio diario de agua alimentándolos dos veces al día con alimento para alevines marca Sera. A los 25 días se alimentaban con alimento en hojuelas Tetramin dos veces al día hasta llegar a adultos, a los 30 días se les cambiaba el agua cada 4 días.

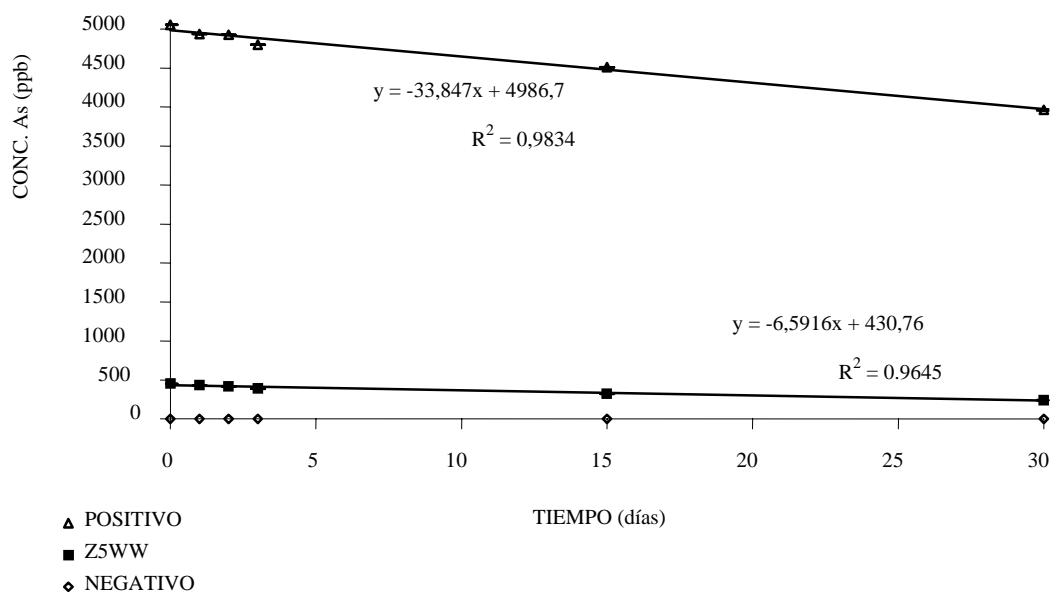
Por otra parte se contaron los huevos para calcular el porcentaje de óvulos, huevos no viables y viables. Asimismo se contó el número de alevines eclosionados y de juveniles sobrevivientes, normales y con malformaciones, así como el tipo de malformación.

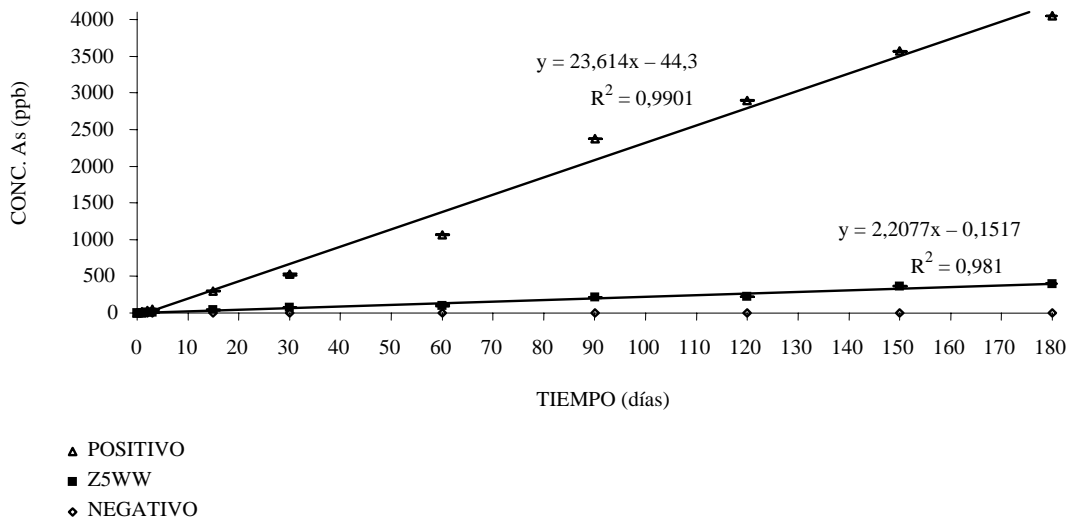
## Resultados y Discusión

### Ensayos y evaluación de bioacumulación de arsénico en pez cebra.

La exposición al As se inició en el mes de Septiembre/2004 y concluyó en Marzo/2005, con 6 meses de evaluación. Se observa en el tratamiento Z5WW y en el control positivo, el decrecimiento de la concentración de As en el agua con el tiempo, en tanto que en peces se produce un incremento. 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 Z5WW donde el 35,35% del As que disminuyó en esta agua fue bioacumulado. En las Figuras 2 y 3 se muestran las disminuciones e incrementos en aguas y pescados respectivamente, así también como la ecuación y coeficiente de correlación.

**Figura 2.** Disminución de la concentración de As en las aguas en función del tiempo. Las barras indican la desviación estándar.



**Figura 3.** Incremento de las concentraciones de As en peces.

Como se aprecia en los controles negativos (para aguas y peces) los resultados arrojaron valores menores que los respectivos límites de detección (LD) encontrados experimentalmente. En las aguas se observa el decrecimiento de las concentraciones de As en el tiempo en tanto que en peces se produce un incremento. Para el control positivo de 5 000  $\mu\text{g/l}$  (UAEHWW) se observó una disminución en la concentración de As de las aguas de 1000  $\mu\text{g/l}$  aproximadamente en sólo 30 días (35  $\mu\text{g/l/día}$ ) en tanto que en peces se incrementó en unos 15  $\mu\text{g/l}$  en ese mismo tiempo (0,5  $\mu\text{g/l/día}$ ). Por su parte las aguas del experimento (Z5WW) mostraron una disminución de 200  $\mu\text{g/l}$  (6,7  $\mu\text{g/l/día}$ ) y en peces un incremento de 5  $\mu\text{g/L}$  (0,17  $\mu\text{g/l/día}$ ) para los mismos 30 días evaluados. Dada la necesidad de cambiar las aguas en las peceras, no se evaluó a más de 30 días para los ensayos de aguas pero si se continuó la evaluación en peces hasta completar 180 días. La Figura 3 muestra de manera gráfica los incrementos en peces definiendo una ecuación y regresión lineal de esta tendencia.

Como se observa se logran regresiones mayores de 0,95 y las pendientes de las líneas rectas de incrementos en peces de los ensayos de UAEHWW y del experimento Z5WW, se corresponden con valores de 0,45 y 0,14  $\mu\text{g/l/día}$ .

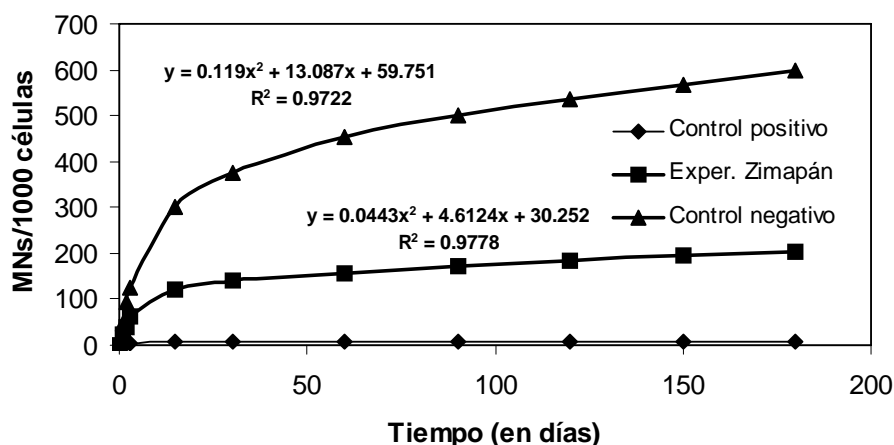
A los 180 días de exposición la concentración de As en pescados sin branquias del tratamiento Z5WW fue de 397,76 ppb (base seca) lo cual es cercano a lo reportado por Báez Ramírez (2001) de 435 ppb (base seca) en pez completo a las 96 horas de exponer *Oreochromis niloticus* a la misma agua. Por otro lado, la concentración de As de 4 051,93 ppb en peces del control positivo fue aproximada a lo reportado por Naqvi y cols. (1990) de 4 290 ppb en tejido fresco de cangrejo de río *Procambarus clarkii* expuesto a 5 ppm del herbicida metanearsenato de monosodio en el agua por 8 semanas.

Como se observa en las Figuras 2 y 3, fueron obtenidas pendientes negativas de disminución de As en aguas con valores de -33,847 y -6,5916 ppb/día que corresponden al tratamiento positivo y Z5WW, respectivamente. Por otro lado, la bioacumulación de As puede ser expresada como velocidad de bioacumulación con valores de 23,614 y 2,2077 ppb/día para los peces de los mismos tratamientos, respectivamente, con una tendencia lineal. Esto es proporcional con la concentración inicial de As en el agua del control positivo que fue 11,2 veces mayor que la del Z5WW.

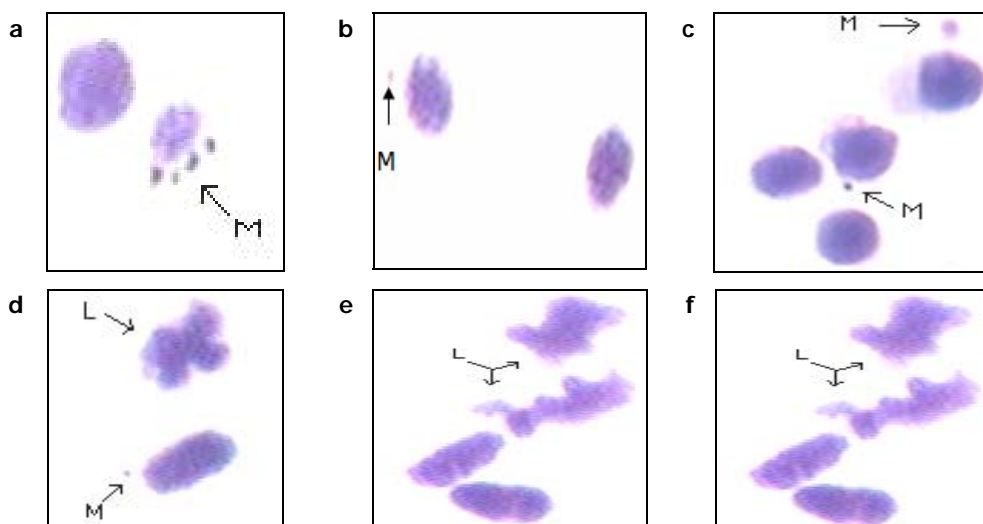
### Pruebas de evaluación de inducción y frecuencia de aparición de micronúcleos (FMNs).

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 y se mantiene en este nivel hasta los 180 días. Por su parte el control positivo de 5000 µg/l de As arrojó una inducción de MNs en células sanguíneas de 46,9 veces mayor que el UAEHWW a los 30 días, valor que se incrementó hasta 74,6 veces mayor a los 180 días; en tanto que para los peces en las aguas del pozo Z5WW se apreció un incremento de inducción de MNs de 17,8 veces más con respecto al control negativo a los 30 días (0,38 veces menor que en el control positivo) e incrementó hasta 25,5 veces más a los 180 días de ensayo (0,34 veces menor que en el control positivo). En la Figura 4 se muestran estos resultados y apreciar igualmente las respectivas ecuaciones polinómicas y sus correspondientes coeficientes de regresiones mayores de 0,97. Así mismo podemos observar las microfotografía de células con presencia de MNs en la Figura 5.

**Figura 4.** Evaluación de la inducción de micronúcleos (MNs) en células sanguíneas tomadas de las branquias del pez cebra.



**Figura 5.** Micronúcleos y otras anomalías nucleicas en células branquiales del pez cebra de los tratamientos Z5WW y positivo: a, b, c y d muestran micronúcleos; d, e y f muestran otras anomalías nucleicas. M=micronúcleos, L=núcleo hendido, NT=núcleo lobulado. La magnificación es 1 000x.





Con relación a la FMNs en células branquiales, en el control UAEHWW se observó una generación espontánea que a los 180 días fue de 0,8 MNS/1 000 células. Por su parte el control positivo presentó una FMNs 163,5 veces mayor que el control negativo, en tanto que en los pescados del Z5WW hubo un incremento en la FMNs 56,25 veces mayor que en el control negativo, apareciendo también otras anormalidades como núcleos lobulados (NT) y hendidos (L).

En ambos tratamientos el As promovió un cambio celular a concentraciones subletales, con un incremento en la FMNs de 0,119 y 0,044 MNS/día (ver en la Figura 4 el término cuadrático), respectivamente, lo cual está en una proporción 2.88:1.

Comparando la FMNs de 10,2/1 000 células a los 30 días en el tratamiento Z5WW, es cercano a 10,16/1 000 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 otro lado la FMNs de 4,4 MNS/1 000 células a los 15 días en el mismo tratamiento, se parece a 5,15 MNS/1 000 células encontrado 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.

Es importante mencionar que el Z5WW tuvo mayor concentración de manganeso (330 µg/l) y Pb (12 µg/l) que el UAEHWW, y tanto el Mn inorgánico (Joardar y Sharma, 1990) como el Pb (Kapka y cols., 2004) inducen MNS también. Aunque estos exceden el límite máximo permisible (NOM-127-SSA1-1994) 2,0 y 1,2 veces respectivamente, no se comparan con el As el cual lo excedió 19,2 veces; por esto afirmamos que este metaloide causó el principal daño genotóxico.

### **Desove, supervivencia y teratogénesis**

Respecto al desove y sobrevivencia, a mayor concentración de As en el agua mayor porcentaje de huevos no viables y óvulos, menor porcentaje de huevos viables y de eclosión, mayor porcentaje de recién eclosionados y juveniles con malformaciones, y menor porcentaje de juveniles sobrevivientes (Tabla 1).

Por otra parte, a mayor concentración de As, en el agua mayor porcentaje de descendientes con malformaciones en columna.

Bodammer (1993) reporta que en los embriones de peces expuestos a una variedad de 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* al 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, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y 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 fueron anisofthalmia, 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 modificar la movilidad embrionica;
- 6) Decrementar 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 afectó 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 ppm de zinc hubo necrosis de las células epiteliales, las células cloro tuvieron menos mitocondrias, los organelos Golgi estuvieron ausentes, y se observó un retículo endoplásmico liso congestionado. El autor concluye que la exposición de embriones a concentraciones de zinc de 6 a 12 ppm puede dañar la capacidad osmorregulatoria (células cloro), respiratoria (células epidérmicas), muscular y neural, de la larva recién eclosionada. 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 adenosintrifosfato que se necesita para el metabolismo normal.

**Tabla 1.** Porcentaje de huevos no viables<sup>1</sup> y viables, óvulos, eclosión<sup>2</sup>, eclosionados y alevines con malformaciones<sup>3</sup>, y juveniles sobrevivientes<sup>4</sup>. Los números entre paréntesis indican el porcentaje del coeficiente de variación.

	Tratamiento		
	Control Negativo	APZ5	Control Positivo
Huevos no viables	0,7 (159,1)	4,1 (132,9)	15,4 (24,1)
Óvulos	0,1 (216,1)	0,3 (192,8)	0,3 (205,5)
Huevos viables	99,1 (1,2)	96,3(6,0)	81,5(5,6)
Eclosión	98,2 (1,6)	92,0 (7,9)	78,0 (10,6)
Eclosionados c/columna desviada	0	2,5 (59,4)	13,6 (83,7)
Eclosionados prematuros	0	0	10,4 (50,5)

<sup>1</sup> El porcentaje de huevos no viables, óvulos y huevos viables, se obtuvo basándose en el número total de huevos y óvulos desovados.

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

<sup>3</sup> Es el porcentaje de eclosionados y alevines con malformaciones del total de eclosión.

<sup>4</sup> Es el porcentaje de juveniles supervivientes del total de eclosión.

Debido a la transparencia de sus embriones, el estudio genético de especímenes con mutaciones espontáneas o inducidas resulta muy sencillo. En las Figuras 6a y 6b se muestran microfotografía de huevos viables y no viables de los controles negativo y Z5WW. En la Figura 6c se muestra la ampliación de un huevecillo no viable Z5WW donde se aprecia la magnitud del daño.

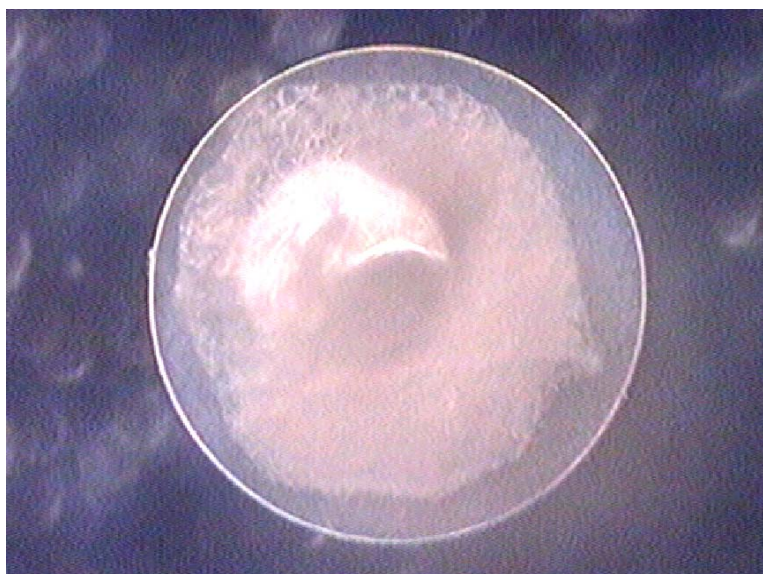
**Figura 6a.** Huevos viables control negativo. Aumento 40x.



**Figura 6b.** Huevos no viables Z5WW. Aumento 40x.



**Figura 6c.** Huevos no viables Z5WW. Aumento 100x.



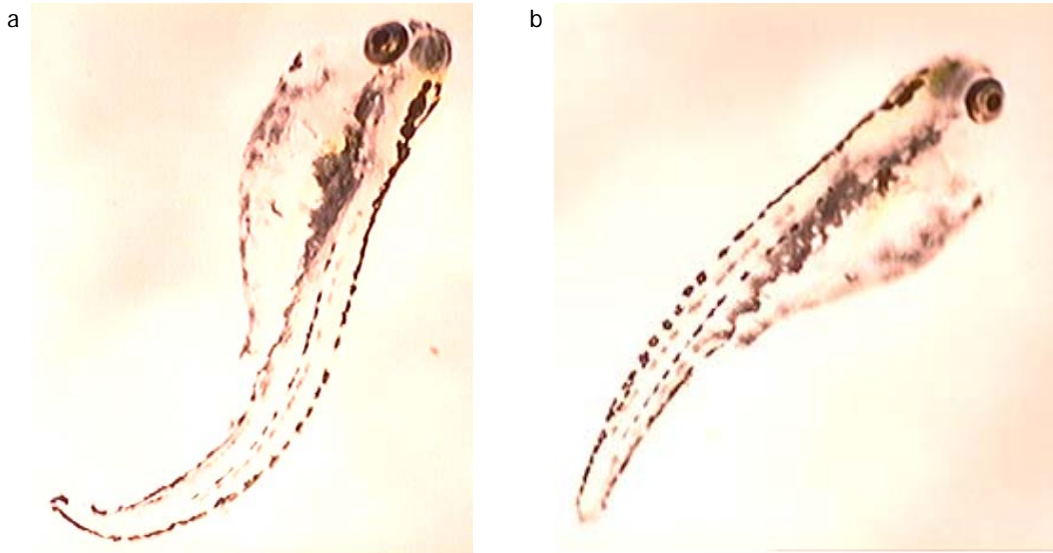
Respecto a la teratogénesis, se obtuvo que a mayor concentración de As en el agua, mayor porcentaje de malformaciones en columna. En la Figura 7 se muestra el tipo de malformación en columna en alevines de siete días. No se observaron malformaciones en aletas y opérculo.

El embrión de este tipo de pez tarda muy poco tiempo en desarrollarse y eclosionar, lo que permite llevar a cabo un seguimiento sencillo. Un desarrollo embrionario normal del pez cebra puede apreciarse en la Figura 8. En la Figura 9 se muestran microfotografías de alevines recién eclosionados y sus malformaciones, en la Figura 9a

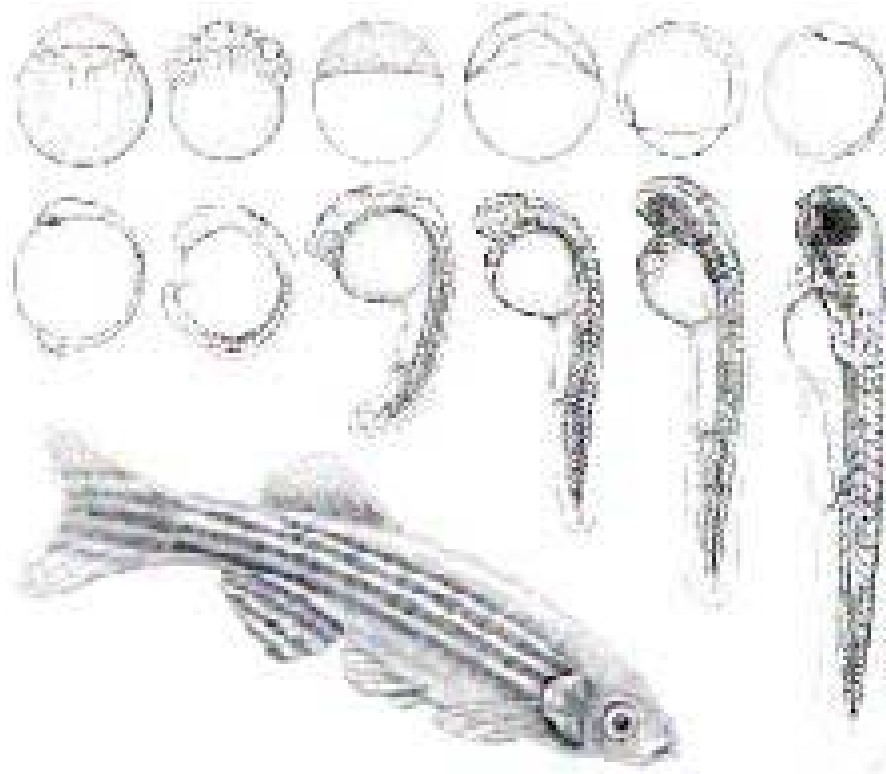
se aprecian las malformaciones de columnas (curveadas), en la Figura 9b malformaciones en columnas (acortadas y curveadas), además de ojo dañado y aparición de protuberancias en dorso; finalmente, en la Figura 9c columna curveada, excesivamente alargada y delgada.

En conclusión, los resultados fueron indicativos de que el As causó el mayor daño genotóxico y teratogénico en células branquiales y en descendientes del pez cebra, a concentraciones subletales.

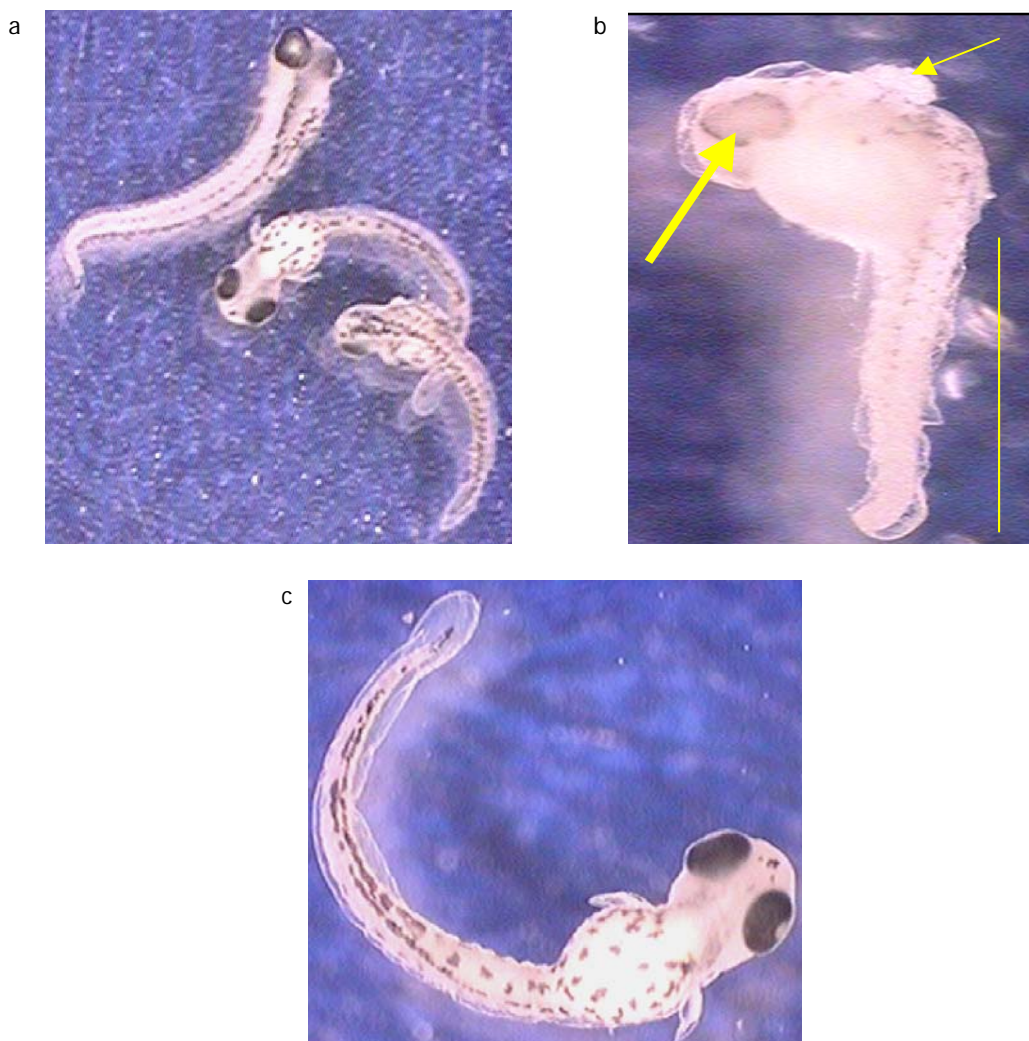
**Figura 7.** Tipo de malformación en columna de alevines (7 días) en los tratamientos. a) Z5WW, columna curveada y, b) positivo, columna acortada.



**Figura 8.** Proceso de desarrollo embrionario normal del pez cebra.



**Figura 9.** a) Alevines recién eclosionados en tratamiento Z5WW y las malformaciones en columnas (curvadas) que presentan. b) Alevín recién eclosionado en el control positivo, se aprecia columna curvada y acortada, un ojo atrofiado y una pequeña tumoración en la unión cabeza-cuerpo. c) Alevín recién eclosionado en tratamiento Z5WWW y columna muy alargada. Todas las microfotografías fueron realizadas a 100x.



## Bibliografía

1. 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, México
2. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF) (1989). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (20th ed.)
3. Baez Ramírez, O.A. (2001). *Toxicidad del arsénico de fuentes subterráneas naturales de agua potable y presa Fernando Hirirart Balderrama de Zimapán, Hgo. en Oreochromis niloticus*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional
4. Báez Ramírez, O.A. y F. Prieto García. (2004). Bioacumulación y daños genotóxicos en pez cebra (*Danio rerio*) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo, México. *Ensayos en cortos plazos. Revista AquaTIC*, 21:62-70. Disponible en URL: <http://www.revistaaquatic.com>
5. Barbazuk, W.B., I. Korf, C. Kadavi, J. Heyen, S. Tate, E. Wun, J.A. Bedell, J.D. McPherson y S.L. Johnson. (2000). The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Research* 10:1351-1358
6. Basu, A., J., Mahata, A.K. Roy, J.N. Sarkar, G. Poddar, A.K. Nandy, P.K. Sarkar, P.K. Dutta, A. Banerjee, M. Das, K. Ray, S. Roychaudhury, A.T. Natarajan, R. Nilsson y A.K. Giri, (2002). Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutation Research*, 516, 29-40.

7. 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.
8. Burkhart, J.G. (2000). Fishing for mutations. *Nature Biotechnology* 18:21
9. Cavas, T. y S. Ergene-Gözükara. (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.
10. Coll, J.M. (2001). El transposon SB de salmonidos como vector para transferencia de genes en vertebrados. *Investigaciones Agrarias*. En prensa
11. 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
12. Dooley, K. y L.I. Zon. (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion Genetics Development* 10:252-256
13. Ehling, U.H. (1991). Genetic risk assesment. *Ann. Rev. Genet.* 25:218-224
14. Gaiano, N. y N. Hopkins. (1996). Insertional mutagenesis and rapid cloning of essential genes in zebrafish. *Nature*, 383:829-832
15. 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, D.F., p. 5-6
16. Hackett, P.B. y M.C. Alvarez. (2000). The molecular genetics of transgenic fish. Recent advances in Marine Biotechnology. M. Fingerman y R. Nagabhushanam. *Aquaculture*. part B Fishes, 4:77-145
17. Hulka, B.S. (1990). Overview of biological markers. En: *Biological markers in epidemiology*. B. Hulka, T. Wilcolsky y J. Griffith. New York. Oxford University Press. 1-15
18. 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
19. Izsvak, Z., Z. Ivics y P.B. Hackett. (1997). Repetitive elements and their genetic applications in zebrafish. *Biochemical Cell Biology* 75:507-523
20. Joardar, M. y A. Sharma. (1990). Comparison of clastogenicity of inorganic manganese administered in cationic and anionic forms in vivo. *Mutation Research*, 240, 159-163.
21. Kapka, L., D. Anderson, M. Kruszewski, E. Siwinska, T. Oldak y D. Mielzynska. (2004). DNA damage in children exposed to lead. *Gliwickie Spotkania Naukowe*, 19-20, November.
22. Kotsanis, N. y G.J. Iliopoulou. (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 Contamination and Toxicology*, 62:169-178
23. Lam, W.L., T.S. Lee y W. Gilbert. (1996). Active transposition in zebrafish. *Proceedings National Academy Sciences USA* 93:10870-10875
24. Lenihan, J. y W.W. Fletcher. (1977). *The chemical environment*. Vol. 6. Environment and man. Blackie Glasgow and London
25. McGeachy, S.M. y D.G. Dixon. (1992). Whole body arsenic concentrations in rainbow trout during acute exposure to arsenate. *Ecotoxicology and environmental safety* 24:301-308
26. Metelev, V.V., A.I. Kanaev y N.G. Dzasokhova. (1983). *Water toxicology*. Amerind Publishing Co. New Delhi
27. Naqvi, S.M. y C.T. Flagge. (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
28. Naqvi, S.M., C.T. Flagge y R.L. Hawkins. (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
29. Navarro, M., H. López y M.C. López. (1992). Determination of arsenic in fish by hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 16(5-6):169-171
30. Nölte, J. (1991). Continuous-flow hydride generation combined with conventional nebulization for ICP-AES determination. *Atomic Spectroscopy*, 12(6):199-203
31. Oladimeji, A.A., S.U. Qadri y A.S.W. de Freitas. (1984). Long-term effects of arsenic accumulation in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 32:732-741
32. Secretaría de Salud. 2000. *Norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994 Agua para uso y consumo humano (potable)*. México
33. Schmitt, C.J. y W.G. Brumbaugh. (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
34. Tamaki, S. y W.T. Frankenberger. Environmental Biochemistry of Arsenic. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 124:79-109