



Revista de Toxicología

ISSN: 0212-7113

revista@aetox.es

Asociación Española de Toxicología
España

Prieto García, F; Báez Ramírez, OA; Scout, W; Gaytán Oyarzún, JC; Zúñiga Estrada, A
Toxicidad y teratogénesis por arsénico en aguas en el pez cebra (*Danio rerio*)

Revista de Toxicología, vol. 24, núm. 1, 2007, pp. 18-22

Asociación Española de Toxicología

Pamplona, España

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91924104>

- [Cómo citar el artículo](#)
- [Número completo](#)
- [Más información del artículo](#)
- [Página de la revista en redalyc.org](#)

 redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Toxicidad y teratogénesis por arsénico en aguas en el pez cebrá (*Danio rerio*)

Prieto García F^{1*}, Báez Ramírez OA¹, Scout W², Gaytán Oyarzún JC² y Zúñiga Estrada A¹

¹Centro de Investigaciones Químicas; ²Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5. C.P. 42076. Pachuca de Soto. Hidalgo, México.

Recibido 17 de febrero de 2006 / Aceptado 22 de junio de 2007

Resumen: El objetivo del trabajo fue estudiar los daños teratogénicos y la inducción de micronúcleos en células branquiales de peces cebrá (*Danio rerio*) por presencia de arsénico en las aguas. Fueron mantenidos en aguas bicarbonatadas cálcicas magnésicas de un pozo de referencia y del pozo "Zimapán 5", del Municipio Zimapán, Estado de Hidalgo, México. Este último, con un contenido de arsénico que varía de 0,395-0,630 mg/L. Para el estudio de genotoxicidad se evaluaron durante 180 días en 3 tratamientos: agua del pozo de referencia (control negativo, sin As), agua del pozo de referencia adicionada con 5,0 mg As (V)/L (control positivo), y en agua del pozo "Zimapán 5", colocándose 65 especímenes por tratamiento. Después de 30 días hubo una disminución de As en el agua del control positivo de 1092,65 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). Este resultado pone de manifiesto el alto grado de bioacumulación de As en el pez, que en relación al control negativo muestra que es 2,54 veces mayor. 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/1000 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, obteniendo que a mayor concentración de As en el agua mayor porcentaje de huevos no viables, 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

Abstract: Toxicity and teratogenesis by arsenic in water in the zebra fish (*Danio rerio*). The objective of this work was study the teratogenic damages and the induction of micronuclei in gill cells of zebra fish (*Danio rerio*). They was 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 m/L. 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 by treatment. 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 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). This result indices the grade high of bioaccumulation of As in fish, in relation with negative control is 2.54 major. 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 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: genotoxicity, micronucleus, *Danio rerio*, arsenic

Introducción

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 [1]. El As y sus compuestos se introducen al organismo principalmente por ingestión, en donde el sistema gastrointestinal absorbe en promedio el 80 % del As. Schmitt y Brumbaugh (1990) participaron en un programa nacional de biomonitorización 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 [2] encontrándose una concentración máxima de As total en organismo completo de 1,5 mg/kg de peso húmedo. El As presente en el agua se absorbe en el pez por las branquias, el tracto gastrointestinal y la piel [3], 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 [4,5]. 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 de arsenito de sodio y su efecto en el crecimiento y hematología de la trucha *Salmo gairdneri* [5]. Cuatro grupos de ellos fueron expuestos a 0, 10, 20 y 30 mg As/kg en el alimento y después de 8 semanas de exposición los organismos de los tratamientos presentaron una reducción en la concentración de hemoglobina corpuscular, lo que sugiere que el efecto primario del As en la sangre fue un decremento

*e-mail: prietog@uaeh.reduaeh.mx

significativo en la hemoglobina. Los organismos expuestos a 10 mg As/kg presentaron un decremento en el hematocrito a las 4 y 6 semanas. 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 2 y 4 semanas de exposición, respectivamente. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los probables daños teratogénicos y la inducción de micronúcleos en células branquiales de peces cebra (*Danio rerio*) por presencia de arsénico en las aguas.

Material y métodos

Bloque experimental de bioacumulación de arsénico en pez cebra.

La metodología experimental en forma de diagrama de flujo [6] señala las diferentes etapas de la investigación (Figura 1). Los ejemplares del pez cebra se colocaron en peceras respectivas, divididas en tres lotes: control negativo ([As] total < 0,002 mg/L) agua de pozo de la Universidad de Hidalgo, México (UAEHWW); control positivo, agua del mismo pozo UAEHWW con adición de Na_2HAsO_4 hasta alcanzar una concentración de 5 mg/L de As en el agua; y control experimental, agua del pozo V de Zimapán (Z5WW), Hidalgo ([As] total de 0,48 mg/L). En cada lote se colocaron 50 ejemplares bajo condiciones ideales de temperatura, oxigenación y alimentación. Se tomaron alícuotas de agua (n=5) y preparadas en matriz nítrica, donde se analizó [As] total con previa prerreducción, por espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros (GH). La prerreducción fue realizada tomando 10 ml de aguas de UAEHWW ó 5 ml de Z5WW, se le agregó 2 ml de HNO_3 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. Para la GH se preparó NaBH_4 al 0,6% NaOH al 0,5% y HCl 5 M [7]. Asimismo en peces, sacrificando 5 ejemplares por lote (previamente

se les retiró las branquias reservadas para ensayos de inducción de micronúcleos); fueron llevados a peso seco en estufa y en base seca se sometieron a digestión en horno de microondas con HNO_3 , para los análisis de [As] total.

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

Se analizó la FMNs en células branquiales entre 0 y 180 días, en 5 ejemplares de cada tiempo y tratamiento, se les extrajeron las 2 branquias y fueron colocadas en una laminilla con una gota de solución de NaCl al 1,5%, se trocearon finamente, 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, se sumergió la laminilla en un baño de colorante Giemsa al 30% durante 30 min, se retiró el exceso de colorante, se dejó secar a temperatura ambiente, la laminilla se sumergió 7 min en cada uno de los siguientes baños: 50% etanol a 70°C y 50% acetona pura, acetona pura, acetona al 50% y xilol al 50%, finalmente xilol al 98,5%. Se colocó un cubreobjetos, se dejó secar y se contaron 1000 células en un microscopio óptico con una magnificación 400 X para registrar el número de micronúcleos.

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 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. Se vaciaban los alevines en sus peceras y se

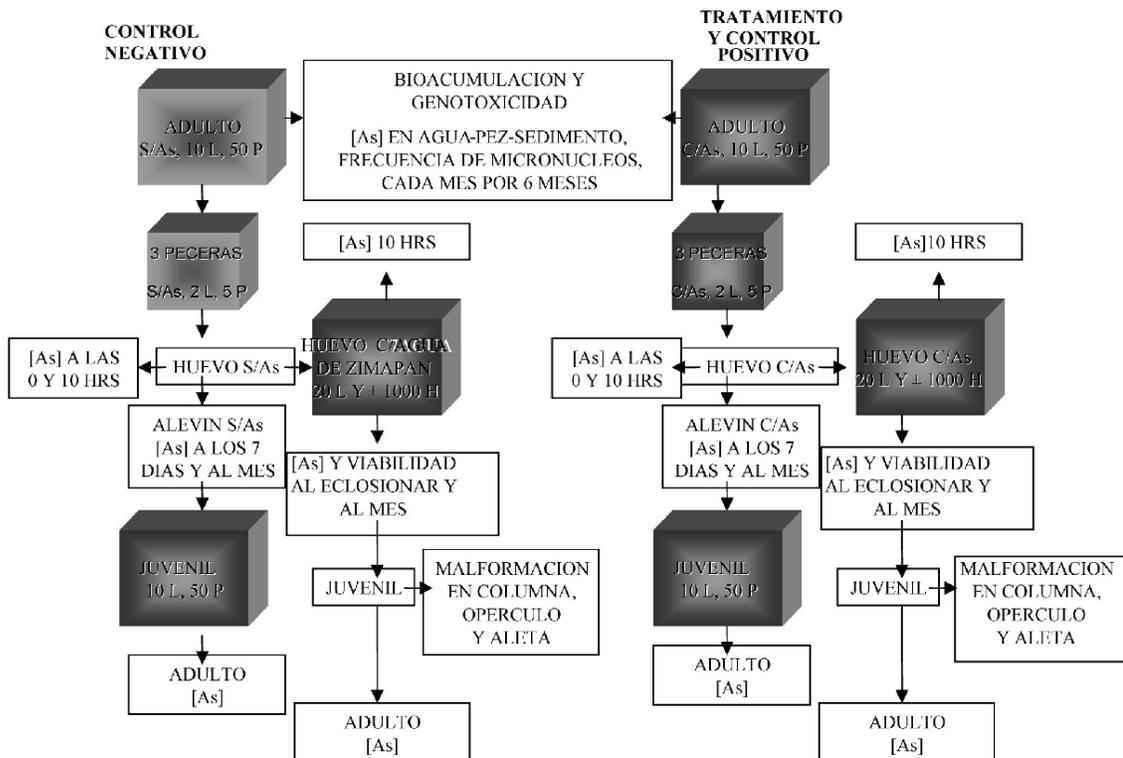


Figura 1. Diagrama de flujo del experimento [6].

mantenían a 26°C con cambio diario de agua alimentándolos dos veces al día con alimento para alevines. A los 25 días se alimentaban dos veces al día hasta llegar a adultos. Se contaron los huevos para calcular el porcentaje de óvulos, huevos no viables y viables. Se contó el número de alevines eclosionados y juveniles supervivientes, 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 realizó durante 6 meses de evaluación en cada tratamiento; a los 30 días se observó en el control positivo que el 47,94% del As que disminuyó en el agua, fue bioacumulado por el pez y el resto excretado en los sedimentos; similarmente eso pasó con el tratamiento Z5WW donde el 35,35% del As que disminuyó en esta agua fue bioacumulado (Figuras 2 y 3). Se aprecia que en los controles negativos (para aguas y peces) los resultados arrojaron valores menores que los respectivos límites de detección (LD). Para el control positivo de 5000 g/L (UAEHWW) se observó una disminución en la concentración de As de las aguas de 1000 g/L aproximadamente en sólo 30 días (35 g/L/día), en tanto que en peces se incrementó en unos 15 g/L en ese mismo tiempo (0,5 g/L/día). Por otra parte, las aguas del experimento (Z5WW) mostraron una disminución de 200 g/L (6,7 g/L/día) y en peces un incremento de 5 g/L (0,17 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. Se obtuvieron 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 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 lo cual es cercano a lo reportado por [8] de 435 ppb en pez completo a las 96 horas de exponer *Oreochromis niloticus* a la misma agua. 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.

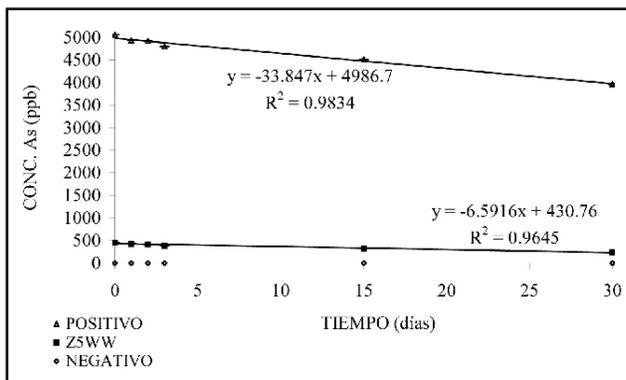


Figura 2. Disminución de la concentración de As en las aguas en función del tiempo. Las barras indican la desviación estándar

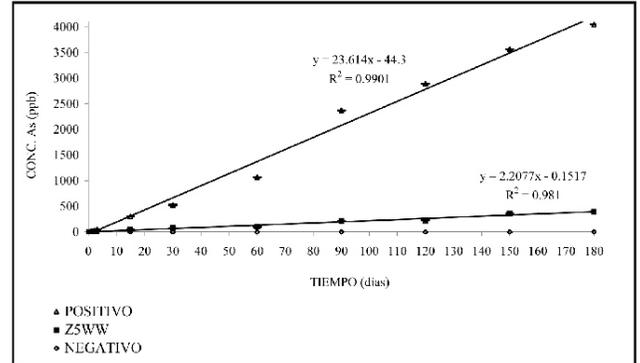


Figura 3. Incremento de las concentraciones de As en peces.

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

Con relación a la inducción de micronúcleos (MNs) en branquias, se observó que en los controles negativos existe una inducción por generación espontánea de MNs que al término de 30 días es de 8 MNs/1000 células contadas y se mantiene en este nivel hasta los 180 días. Para el control positivo de 5000 g/L de As, arrojó una inducción de MNs 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 y que incrementó hasta 25,5 veces más a los 180 días de ensayo, así se puede observar en las microfotografías de células con presencia de MNs (Figuras 4 y 5, respectivamente).

La FMNs en el control UAEHWW mostró una generación espontánea que a los 180 días fue de 0,8 MNs/1000 células. Por su parte el control positivo presentó una FMNs 163,5 veces mayor que el control negativo, en pescados del Z5WW hubo un incremento en la FMNs 56,25 veces mayor que en el control negativo, apareciendo también otras anomalías como núcleos lobulados (NT) y hendidos (L). En ambos tratamientos el As promovió un cambio celular a concentraciones subletales, y un incremento en la FMNs de 0,119 y 0,044 MNS/día, respectivamente, lo cual está en una proporción 2,88:1.

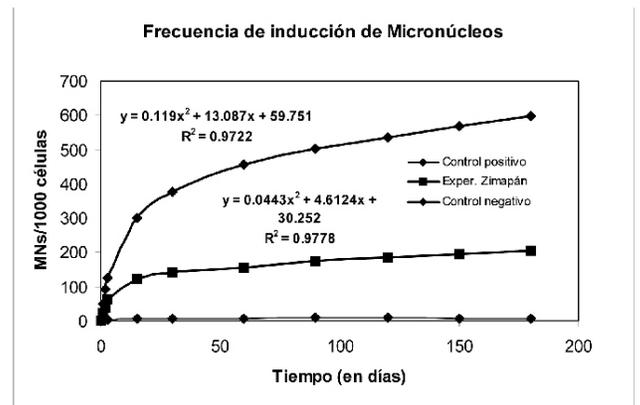


Figura 4. Evaluación de la inducción de micronúcleos (MNs) en células sanguíneas tomadas de las branquias del pez cebra.

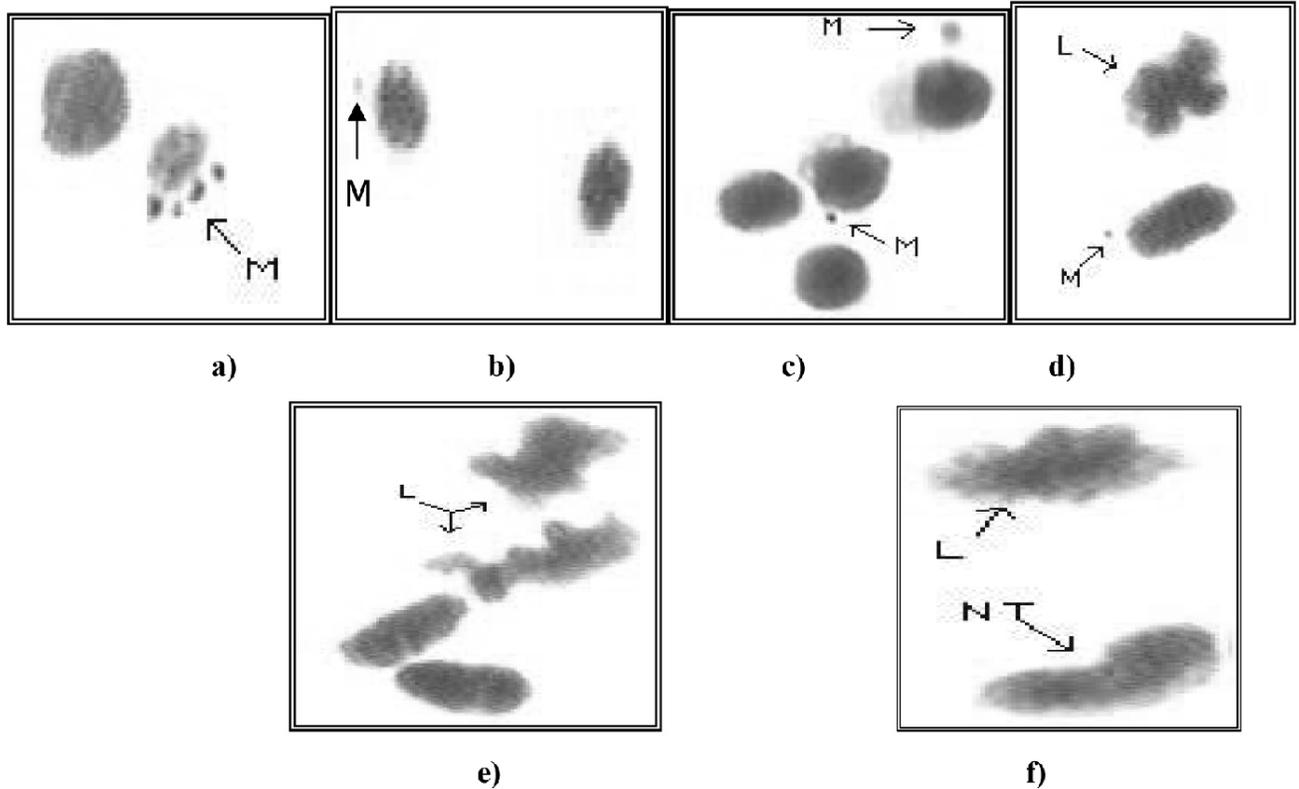


Figura 5. Micronúcleos y otras anomalías nucleicas en células branquiales del pez cebra de los tratamientos Z5WW y positivo: a, b, c y d muestran micronúcleos; d, e y f muestran otras anomalías nucleicas. M = micronúcleos, L = núcleo hendido, NT = núcleo lobulado. La magnificación es 1000 x.

Desove, supervivencia y teratogénesis.

Respecto al desove y supervivencia, 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 supervivientes (Tabla 1). Por otra parte, a mayor concentración de As, en el agua mayor porcentaje de descendientes con malformaciones en columna. Debido a la transparencia de sus embriones, el estudio genético de especímenes con mutaciones espontáneas o inducidas resulta muy sencillo. En la

figura 6 a y b se muestran microfotografía de huevos viables y no viables de los controles negativo y Z5WW. En la Figura 6 c se muestra la ampliación de un huevecillo no viable Z5WW donde se aprecia la magnitud del daño.

Respecto a la teratogénesis, se obtuvo que a mayor concentración de As en el agua, mayor porcentaje de malformaciones en columna; no se observaron malformaciones en aletas y opérculo. En las figuras 7 se muestran microfotografías de alevines recién eclosionados y sus malformaciones, se aprecian las malformaciones de columnas (a: curvadas), malformaciones en columnas (b: acortadas y curvadas),

Tabla 1. Porcentaje de huevos no viables¹ y viables, óvulos, eclosión², eclosionados y alevines con malformaciones³, y juveniles sobrevivientes⁴. Los números entre paréntesis indican el % del coeficiente de variación.

TRATAMIENTO	% HUEVOS NO VIABLES	% OVULOS	% HUEVOS VIABLES	% ECLOSION	% ECLOSIONADOS C/COLUMNA DESVIADA	% ECLOSIONADOS PREMATUROS
C. NEGATIVO	0.7 (59.1)	0.1 (16.1)	99.1 (1.2)	98.2 (1.6)	0.0	0.0
APZ5	4.1 (32.9)	0.3 (12.8)	96.3 (6.0)	92.0 (7.9)	2.5 (9.4)	0.0
C. POSITIVO	18.4 (24.1)	0.3 (25.5)	81.5 (5.6)	78.0 (10.6)	13.6 (8.7)	10.4 (5.5)

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

² Es el porcentaje de eclosión del total de los huevos viables.

³ Es el porcentaje de eclosionados y alevines con malformaciones del total de eclosión.

⁴ Es el porcentaje de juveniles supervivientes del total de eclosión.

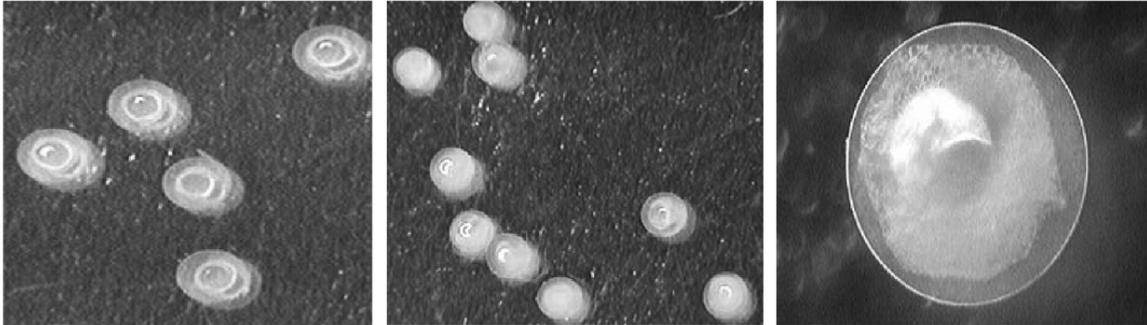


Figura 6. a) Huevos viables control. negativo. Aumento 40X.

Figura 6. b) Huevos no viables Z5WW. Aumento 40X

Figura 6. c) Huevos no viables Z5WW. Aumento 100X.

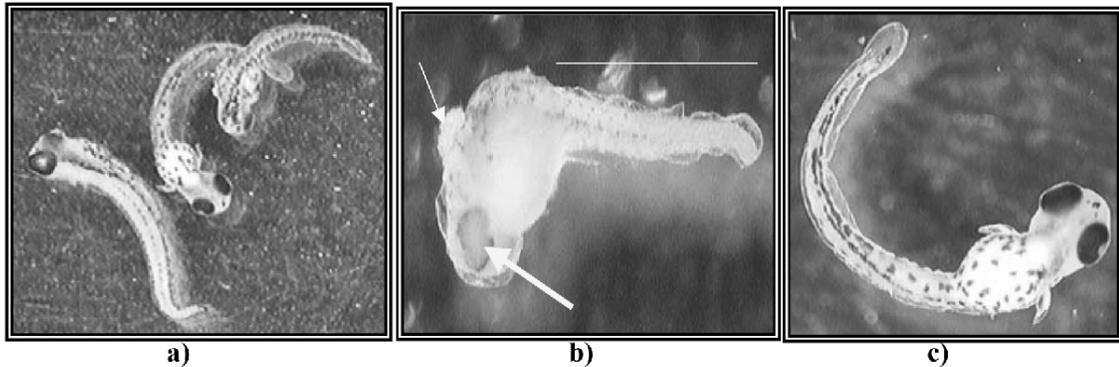


Figura 7. a) Alevines recién eclosionados en tratamiento Z5WW y las malformaciones en columnas (curvadas) que presentan. **b)** Alevín recién eclosionado en el control positivo, se aprecia columna curvada y acortada, un ojo atrofiado y una pequeña tumoración en la unión cabeza-cuerpo. **c)** Alevín recién eclosionado en tratamiento Z5WWW y columna muy alargada. Todas las microfotografías fueron realizadas a 100X

además de ojo dañado y aparición de protuberancias en dorso y columna curvada (en c), excesivamente alargada y delgada. 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.

Bibliografía

1. Del Razo LM, Arellano MA, Cebrián ME (1990). The oxidation states of arsenic in well-water from a chronic arsenicism area of northern Mexico. *Environ Pollut* 64: 143-153.
2. Schmitt ChJ, Brumbaugh WG (1990). National contaminant biomonitoring program: Concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, mercury, selenium and zinc in U. S. freshwater fish, 1976-1984. *Arch Environ Con Toxicol* 19: 731-747.
3. Albert LA (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.
4. Lenihan J, Fletcher WW (1977). The chemical environment. Vol. 6. Environment and man. Ed. Blackie Glasgow. London.
5. Oladimeji AA, Qadri SU, Freitas ASW (1984). Long-term effects of arsenic accumulation in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Bull Environ Con Toxicol* 32: 732-741.
6. Báez OA, Prieto F (2004). Bioacumulación y daños genotóxicos en pez cebra (danio rerio) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo, México. *Ensayos en cortos plazos. Revista AquaTIC. España.* 21: 62-70.
7. Nölte J (1991). "Continuous-flow hydride generation combined with conventional nebulization for ICP-AES determination". *Atomic Spectroscopy* 12 (6): 199-203.
8. Baez OA (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. México.