

**EFFECTOS DEL NITRATO DE PLOMO EN LA EMBRIOGENESIS DE LA
TRUCHA ARCOÍRIS *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)**



ADRIANA DEL PILAR OSORIO RAMÍREZ

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE ESTUDIOS AMBIENTALES Y RURALES
CARRERA DE ECOLOGÍA
Bogotá D.C
2010**

**EFFECTOS DEL NITRATO DE PLOMO EN LA EMBRIOGENESIS DE LA
TRUCHA ARCOÍRIS *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)**



ADRIANA DEL PILAR OSORIO RAMÍREZ

Trabajo de grado para optar el título de:

ECÓLOGA

Directora

EDILMA GUEVARA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE ESTUDIOS AMBIENTALES Y RURALES
CARRERA DE ECOLOGÍA
Bogotá D.C.
2010**

Nota de aceptación

Dr. LUIS MIGUEL RENJIFO
Decano académico

DRA. ÁNGELA AMARILLO
Directora carrera de Ecología

EDILMA GUEVARA
Directora

GLORIA GIRALDO
Jurado

MARIO OPAZO
Jurado

Nota de advertencia

Artículo 23 de la Resolución No. 13, de Julio de 1.946:

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Luz Stella y Antonio, por su apoyo incondicional, por creer en mí y darme la oportunidad de haber llegado a este punto de mi vida, logrando hacer mis sueños realidad. Infinitas gracias por todo su amor, comprensión y paciencia.

A Sandra y Toño, por que más que mis hermanos son mis amigos. A ellos, gracias por sus consejos, compañía y confianza.

A David Panqueva, por el amor, motivación, comprensión y tolerancia. Doy gracias por los maravillosos momentos que he vivido junto a él.

A Edilma Guevara, porque desde el primer día me brindo su colaboración. Gracias por compartir su conocimiento y tiempo.

A Gloria Giraldo por sus enseñanzas, correcciones y sugerencias.

A Rafael Rosado, por su gran colaboración al facilitarme las ovas. Gracias a él y a sus truchas por permitirme elaborar este trabajo.

A Henry Córdoba, por guiarme y brindarme su ayuda en los procedimientos químicos.

Al departamento de química de la Universidad Javeriana por permitirme trabajar en sus laboratorios las veces que lo necesite.

A Karen, gracias por su amistad, lealtad y experiencias vividas a lo largo de la carrera. A Lina, Sandria, Sergio, Luisa, y a todos los que hicieron parte de esta etapa de mi vida... muchas gracias.

Finalmente, doy gracias a Andrés Quintero, Ana María Guillermo, Mario Bertieri, Adriana Ucros, y a todas aquellas personas que de una u otra forma me colaboraron en la elaboración de este trabajo

RESUMEN

Con el fin de evaluar los efectos del nitrato de plomo en la embriogénesis de la Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), y determinar la dosis letal y las dosis subletales, fueron expuestas a cinco concentraciones diferentes del compuesto, ovas recién fecundadas.

Las cantidades adicionadas de nitrato de plomo fueron de: 0.05 mg, 0.1 mg, 0.5 mg, 1 mg, y 3 mg de nitrato de plomo/L de agua. El recambio de las soluciones se hizo cada 24 horas, al igual que el conteo de la mortalidad, y la toma de muestra de cada uno de los grupos, con el fin de identificar las alteraciones en el desarrollo a nivel morfológico de los embriones.

En el análisis de la mortalidad se obtuvo un $\chi^2 = 4091.66$, aceptándose que esta es dependiente de la concentración de nitrato de plomo, y que el efecto del compuesto en los embriones de *O. mykiss* es dependiente de la presencia del mismo, ya que el χ^2 para este análisis fue de 534.48.

Las concentraciones de 0.5 ppm, 1 ppm y 3 ppm de nitrato de plomo son dosis letales (DL50) para los embriones de *O. mykiss*, mientras que las dosis de 0.1 ppm y 0.05 ppm resultaron ser dosis subletales.

Los embriones presentaron un total de 9 malformaciones, siendo estas: cifosis, lordosis, escoliosis, hiperplasia del cristalino, microcefalia, hipoplasia encefálica, microftalmia, hipertrofia de las aletas y hemorragias.

Lo anterior, demuestra que el nitrato de plomo es un agente teratogénico para los embriones de Trucha arcoíris, e incide altamente en la mortalidad de los mismos durante el desarrollo embrionario.

Palabras Claves: Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), nitrato de plomo, embriogenesis, ecotoxicología.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 MARCO CONCEPTUAL	4
2.1.1 Características generales del plomo	4
2.1.2 Toxicología del plomo.....	6
2.1.3 Características de la especie <i>Oncorhynchus mykiss</i>	8
2.1.4 Pruebas de toxicidad	13
2.1.5 Malformaciones congénitas	14
2.2 ANTECEDENTES.....	16
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	19
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. OBJETIVOS	21
5.1 Objetivo General.....	21
5.2 Objetivos Específicos	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Recolección de información.....	22
6.2 Fase de laboratorio.....	22
6.2.1 Aclimatación de los embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i>	22
6.2.2 Mantenimiento de los huevos de <i>Oncorhynchus mikiss</i>	23
6.2.3 Pruebas de toxicidad	23
6.2.4 Toma y preservación de las muestras	24
6.3 Análisis de resultados.....	24
7. RESULTADOS	26
7.1 Mortalidad.....	26
7.1.1 Dosis letal	33
7.2 Malformaciones	34
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIONES	49

10. RECOMENDACIONES	51
11. BIBLIOGRAFÍA	52

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie <i>Oncorhynchus mykiss</i> .	8
Tabla 2. Prueba de chi cuadrado para la mortalidad y las concentraciones (ppm) de nitrato de plomo.	26
Tabla 3. Prueba de chi cuadrado para evaluar la incidencia del plomo en la mortalidad de los embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i> .	27
Tabla 4. Porcentaje de mortalidad acumulada de embriones de <i>O. mikiss</i> en 5 concentraciones de nitrato de plomo y el control.	33
Tabla 5. Malformaciones en embriones de <i>O. mikiss</i> según las concentraciones (ppm) de nitrato de plomo.	34

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i> vivos y muertos en la concentración de 0,05 ppm de nitrato de plomo.	28
Figura 2. Embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i> vivos y muertos en la concentración de 0,1 ppm de nitrato de plomo.	29
Figura 3. Embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i> vivos y muertos en la concentración de 0,5 ppm de nitrato de plomo.	30
Figura 4. Embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i> vivos y muertos en la concentración de 1 ppm de nitrato de plomo.	31
Figura 5. Embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i> vivos y muertos en la concentración de 3 ppm de nitrato de plomo.	32
Figura 6. Porcentaje de mortalidad acumulada de embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i> con relación a las concentraciones de nitrato de plomo y el control.	33
Figura 7. Embrión malformado de Trucha arcoíris (cifosis).	40
Figura 8. Embrión malformado de Trucha arcoíris (escoliosis).	40
Figura 9. Embrión malformado de Trucha arcoíris (lordosis).	42
Figura 10. Embrión malformado de Trucha arcoíris (hiperplasia del cristalino).	43
Figura 11. Embrión malformado de Trucha arcoíris (microcefalia).	41
Figura 12. Embrión malformado de Trucha arcoíris (microftalmia).	43
Figura 13. Embrión malformado de Trucha arcoíris (hipertrofia de aletas).	44
Figura 14. Embrión malformado de Trucha arcoíris (hemorragias).	42
Figura 15. Aparición de malformaciones en embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i> de acuerdo al estadio en la concentración de 0,05 ppm de nitrato de plomo.	35

Figura 16. Aparición de malformaciones en embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i> según estadio en la concentración de 0,1 ppm de nitrato de plomo.	36
Figura 17. Embrión malformado de Trucha arcoíris (hipoplasia encefálica).	41
Figura 18. Aparición de malformaciones en embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i> según estadio en la concentración de 0,5 ppm de nitrato de plomo.	37
Figura 19. Aparición de malformaciones en embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i> según estadio en la concentración de 1 ppm de nitrato de plomo.	38
Figura 20. Malformaciones en embriones de <i>Oncorhynchus mikiss</i> según las concentraciones (ppm) de nitrato de plomo.	39
Figura 21. Síntesis de la hemoglobina.	46
Figura 22. Embrión normal de Trucha arcoíris (sin cifosis).	40
Figura 23. Embrión normal de Trucha arcoíris (sin escoliosis).	40
Figura 24. Embrión normal de Trucha arcoíris (nivel encefálico).	41
Figura 25. Embrión normal de Trucha arcoíris (recién eclosionado).	42
Figura 26. Embrión normal de Trucha arcoíris (desarrollo del ojo).	43
Figura 27. Embrión normal de Trucha arcoíris (aletas pectorales).	44

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación acuática por metales pesados como el plomo, se ha convertido en uno de los problemas ambientales más importantes y críticos en la actualidad, fundamentalmente por las actividades industriales del hombre. Debido a su toxicidad, persistencia y capacidad de bioacumulación, en los ambientes contaminados por este metal, se ve alterada la capacidad de supervivencia de los organismos, lo que afecta la dinámica poblacional de las especies y, por tanto, la estructura y función ecosistémica (Posada *et al.*, 2006).

El plomo tiene múltiples efectos contraproducentes en los animales que se encuentran expuestos permanentemente a este metal. Puede afectar la capacidad de supervivencia, aprendizaje y reproducción; retardar el crecimiento, y generar numerosas lesiones del metabolismo en general. Además, tiene la habilidad de permanecer y almacenarse en los organismos vivos, biomagnificándose cada vez más en la cadena alimenticia, hasta llegar a los humanos (Malpartida, 2002).

A diferencia de otros metales, el plomo es un elemento no esencial, muy tóxico y no se le conoce una función fisiológica en los seres vivos (García, 2002). A pesar de los esfuerzos y medidas que se han implementado para reducir los contenidos y las emisiones de plomo, este sigue siendo un grave contaminante del ambiente, hasta el punto de estar presente en la dieta del hombre (Rubio *et al.*, 2004).

Desde el origen de la acuicultura en Colombia, esta actividad económica ha venido en aumento con la creación de granjas industriales dedicadas al

cultivo de peces, y la evolución de la infraestructura y los métodos aplicados en su producción (CCI, 2009). En gran medida, este sistema es impulsado o motivado por los constantes problemas que se presentan en los cuerpos de agua natural como la contaminación, degradación y destrucción de hábitats, o la sobreexplotación de los recursos (Salazar, 2001).

La trucha arcoíris es una de las especies más importantes en el mercado acuícola del país, junto a la tilapia (*Oreochromis*), la cachama (*Piaractus*) y el camarón (*Litopenaeus vannamei*) (CCI, 2009), por lo que es conveniente realizar estudios que proporcionen conocimiento acerca de los elementos tóxicos y sus efectos teratógenos, dentro de la producción de estos animales y todos aquellos que se destinen al consumo humano.

La toxicología ambiental permite analizar las diferentes formas de contaminación, evaluando la naturaleza de los contaminantes y las dosis que producen ciertos efectos tóxicos o nocivos en los distintos niveles estructurales de los seres vivos (Capó, 2002 en Posada *et al.*, 2006). La evaluación de los efectos y la toxicidad de los metales pesados en diferentes organismos, es de gran importancia puesto que son una herramienta que define y describe los límites y/o alteraciones físicas que experimentan dichos organismos, ante una contaminación específica.

En términos generales, los efectos tóxicos de los contaminantes se basan en una interrupción de la morfogénesis temprana, lo cual puede resultar en aparición de malformaciones en estados más tardíos del desarrollo como es en el último período de desarrollo embrionario y en larvas recién eclosionadas. Muchos de estos problemas originados durante la etapa de ova van a repercutir posteriormente durante la etapa de alevín con saco, causando mortalidades variables en los alevines (Burgos, 1999).

Este trabajo tiene como objetivo brindar información acerca de los efectos del nitrato de plomo en la trucha arcoíris, enfatizando aquellos que se presentan durante el desarrollo embrionario, determinando las malformaciones morfológicas y la toxicidad que ejerce el compuesto sobre la especie, en cada uno de los estadios comprendidos en esta etapa de vida.

2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 MARCO CONCEPTUAL

2.1.1 Características generales del plomo

El plomo (número atómico 82, peso atómico 207.19, gravedad específica 11.34) es un metal blando de color gris azulado o plateado. Su temperatura de fusión es 327.5°C y su temperatura de ebullición, a la presión atmosférica, 1.740°C. Tiene cuatro isótopos naturales (208, 206, 207 y 204, por orden de abundancia), pero las proporciones isotópicas en minerales de distinto origen son, a veces, muy distintas. Esta propiedad ha servido para realizar estudios ambientales y metabólicos con sustancias marcadoras no reactivas (OPS, 1979).

Aunque el plomo posee cuatro electrones en su órbita de valencia, solo dos se ionizan fácilmente. En consecuencia, el estado habitual de oxidación del plomo en los compuestos inorgánicos es +2, y no +4. Las sales inorgánicas del plomo (II), el sulfuro de plomo y los óxidos del plomo son en general, poco solubles, con la excepción del nitrato, el clorato y, en mucho menor medida, el cloruro (OPS, 1979).

El plomo es un elemento ubicuo, presente en casi todas las fases del medio ambiente inerte y en todos los sistemas biológicos (Goyer, 1991, en Roses, 1995), y se presenta en la naturaleza principalmente como sulfuro o galena. Las fuentes pueden ser naturales, industriales, agrícolas y domésticas (Roses, 1995). Es un metal muy usado en la industria, como puede ser en la fabricación de pigmentos, recubrimientos, recipientes, ungüentos, pilas eléctricas, incluso algunos licores. Además, el plomo tiene hoy en día tiene

numerosas aplicaciones en metalurgia (munición de armas, metal para cojinetes, cobertura de cables, compuestos de calafateo, plomo laminado, soldaduras, pigmentos, vidriado de cerámica y ciertos tipos de cristal) (Rubio, 2004). De igual manera, es utilizado en la fabricación de insecticidas y gasolinas que contienen aditivos de plomo (Sandoval, 2004), aunque estos, han disminuido notablemente ante la prohibición de su uso.

2.1.1.1 Nitrato de plomo

El nitrato de plomo, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, es una sustancia cristalina blanca, que se prepara disolviendo plomo, monóxido o carbonato de plomo en ácido nítrico (Pauling, 1951).



Es uno de los pocos compuestos de plomo solubles (Petrucci *et al.*, 2003), y su uso principal, desde la Edad Media ha sido como materia prima en la producción de numerosos pigmentos. Si se añade una sal de cromato soluble al $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 (\text{aq})$, se obtiene el pigmento cromato de plomo (II) (amarillo de cromo) (Petrucci *et al.*, 2003).

El nitrato de plomo (II) se ha usado históricamente en la fabricación de cerillas y explosivos, en la manufactura de fusibles y otros compuestos deflagrantes, y también para preparar los mordientes en las industrias de impresión y tintura (Enciclopedia Británica, 1911). Además, tiene utilidad industrial en la obtención de otros compuestos de Plomo, y en la industria fosforera (Ciudad. 1998).

2.1.2 Toxicología del plomo

Al tener un elevado peso molecular, el plomo es muy susceptible de acumularse en el metabolismo de los seres vivos y posee un enorme grado de toxicidad sobre ellos, desde los microorganismos responsables de la degradación de la materia orgánica hasta el hombre (Malpartida, 2002). Los animales de los lugares más altos de la cadena alimenticia son más susceptibles a consumir alimentos contaminados con plomo que otras especies. El plomo se biomagnifica o bioacumula en los organismos con el tiempo, por lo que muchas especies incrementan sus cargas corporales de este metal a medida que envejecen. Los animales jóvenes son más vulnerables que los viejos debido a sus procesos de desarrollo (Valladares *et al.*, 2007).

En Medicina Veterinaria los principales efectos tóxicos debidos al plomo son conocidos desde hace más de 2.000 años, debido a las múltiples fuentes de exposición que los animales domésticos tienen dentro de instalaciones y la contaminación ambiental producida sobre todo por la industrialización (Valladares *et al.*, 2007).

En 1955, Staplen, expuso gatos y perros a dosis elevadas de plomo, las cuales fueron ingeridas por vía oral y logro determinar encefalopatía (Alarcón, 1986).

En todas las especies de animales de experimentación estudiadas, inclusive en primates, se ha observado que el plomo tiene efectos adversos en varios órganos y sistemas de órganos, inclusive los sistemas hematopoyético, nervioso, renal, cardiovascular, reproductivo e inmunitario. El plomo también afecta los huesos y se ha demostrado que es carcinógeno en ratas y ratones (WHO, 1995).

El plomo atraviesa la barrera placentaria y en ciertas circunstancias puede causar anomalías congénitas en los embriones (Cordero, 2007). Trabajos con ratas en período de lactancia demostraron que el plomo puede ser transferido de madre a hijos a través de la leche, lo que indica la capacidad que tiene la glándula mamaria para excretar niveles aumentados de plomo y que son absorbidos por sus descendientes (Momcilovic, 1973 en Child, 1985). Además, se observó que el transporte de plomo en ratas preñadas se hace rápidamente a través de la barrera placentaria hacia el feto, logrando estar en equilibrio aproximadamente 24 horas después de ser absorbido (Green *et al.*, 1940 en Child, 1985).

El plomo es teratogénico para algunas especies, particularmente en dosis altas (Child, 1985). Se han observado malformaciones de la región sacra, columna vertebral y cordón espinal en hámsters, después de una sola dosis intravenosa en el día ocho de gestación (Ferm, 1967 en Child, 1985). Igualmente, estudios con animales han demostrado gameto-toxicidad y efectos reproductivos en varias especies (Krigman *et al.*, 1974, en Child, 1985), así como, cambios en el tamaño, peso y supervivencia de las crías (Child, 1985).

En los peces el plomo se acumula de la misma forma que en humanos y afecta básicamente los mismos órganos y tejidos y su acción es más observada en estados inmaduros como alevinos (Tulasi *et al.*, 1989 en Cordero, 2007).

Similarmente al arsénico, la exposición al plomo induce a una excesiva producción de mucus branquial que termina recubriéndolas, impidiendo la captación de oxígeno de los peces (Malpartida, 2002).

Altas concentraciones de plomo pueden dañar las branquias, causando problemas respiratorios, una baja habilidad para enfrentar las enfermedades,

nacimientos de peces deformes, infertilidad, y formaciones tumorales (Alquezar *et al.*, 2005 en Rodríguez, 2007). Además, una alta concentración del metal en la musculatura del pez, a través de una exposición crónica, puede resultar fatal para los animales, ya que provoca el daño branquial y secundariamente, puede afectar a los humanos que los ingieran (Roberts, 2001 en Rodríguez, 2007).

Exposiciones a largo plazo de peces adultos con Pb inorgánico induce efectos subletales en la morfología, actividad delta-ALAD y otras actividades enzimáticas y alteraciones en el comportamiento a concentraciones entre 10 y 100 mg/L (WHO, 1989 en García, 2002).

2.1.3 Características de la especie *Oncorhynchus mykiss*

2.1.3.1 Tabla 1. Clasificación Taxonómica

Phylum	Cordata
Subphylum	Vertebrata
Clase	Osteichthyes
Subclase	Actinopterygii
Superorden	Teleosteica
Orden	Clupeiformes
Familia	Salmonidae
Subfamilia	Salmoninae
Género	<i>Oncorhynchus</i>
Especie	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Nombre común	Trucha arcoíris

Fuente: Rosado *et al.*, (2001).

2.1.3.2 Características generales

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es una especie foránea introducida a Colombia en 1939 desde Estados Unidos para realizar cultivos en alta montaña (Salazar, 2001 en Tovar *et al.*, 2008). En regiones tropicales su presencia se restringe a altitudes superiores a los 1.200 msnm. Las granjas piscícolas de esta especie se ubican entre los 2.000 y 3.000 msnm en Colombia. Se distribuye ampliamente en las zonas frías como Antioquia, Cundinamarca, Boyacá, Santander y Nariño (Pineda *et al.*, 2004 en Tovar *et al.*, 2008).

Con la introducción al país de la trucha arcoíris para el repoblamiento de aguas de uso público en la zona Andina, específicamente en el Lago de Tota en Boyacá, con fines de pesca deportiva, se dio origen a la acuicultura. Posteriormente se introdujeron la carpa *Cyprinus carpio* y la mojarra *Oreochromis mossambicus*, con las que se adelantaron las primeras experiencias de cultivo en estanques (Salazar, 2001).

La trucha arcoíris es un salmónido que se caracteriza por presentar cuerpo alargado, fusiforme y cabeza relativamente pequeña que termina en una boca grande puntiaguda, hendida hacia el nivel de los ojos y con una fila de dientes fuetes en cada una de las mandíbulas que le permiten aprisionar las presas capturadas (Rosado, 2001). Su coloración varía según el hábitat, tamaño y edad. *Oncorhynchus mykiss* es una especie carnívora, con preferencia hacia los crustáceos e insectos (quironómidos, coleópteros, dípteros y hemípteros), restos vegetales, simúlidos y tricópteros, como presas secundarias arácnidos, anuros, bivalvos, huevos de peces y peces pequeños incluyendo otras truchas (Ferriz, 1993 en Tovar *et al.*, 2008), los estados juveniles se alimentan de zooplancton (Gall, 1992 en Tovar *et al.*, 2008).

El nombre genérico *Oncorhynchus* significa nariz ganchuda, característica que se acentúa más en los machos en la época de reproducción, en los que se desarrolla en la mandíbula inferior un abultamiento o gancho (prognatismo) (Rosado, 2001).

El nombre común arco iris está dado por la presencia de numerosos puntos negros y una banda iridiscente en los flancos del pez. Esta coloración cambia ligeramente en las épocas de madurez, siendo notorio el obscurecimiento que se presenta en los machos (Rosado, 2001).

La trucha arcoíris se adapta muy bien a bajas temperaturas. Cuando la temperatura es mayor de 20° C y no se da un adecuado suministro de agua, existe la posibilidad de que se presente una alta mortalidad, cuando la temperatura oscila entre 22 y 23° C, pueden sobrevivir, pero su crecimiento es muy lento. La temperatura óptima para su cultivo está entre 13 y 18° C. (Saga *et al.*, 1995).

Los huevos de los salmónidos tienen como característica ser de gran tamaño pero son producidos en menor cantidad con respecto a otras especies. Los óvulos son esféricos, rozados o incoloros según la cantidad de carotenoides; recién fecundados son flácidos y traslúcidos y con un disco germinal (Cachafeiro, 1995 en Botero, 2006). La célula expulsada corresponde a un ovocito secundario que está conformado por un corión o membrana porosa (Cachafeiro, 1995 en Botero, 2006), de unos 33 a 37 micrones de diámetro (Chaparro, 1981), elástica pero dura; un micrópilo que es un poro por donde penetran los espermatozoides para ir al pronúcleo del ovocito (Cachafeiro, 1995 en Botero, 2006). Hacia el interior de la membrana perivitelina que rodea el citoplasma celular; el espacio perivitelínico está entre las dos membranas; el citoplasma es en gran parte vitelo, que determina el tamaño del ovocito, está compuesto por gotas de grasa y globulinas (Cachafeiro, 1995 en Botero, 2006).

El desarrollo de los ovocitos demanda bastante oxígeno, la contaminación es peligrosa y a veces letal por eso la importancia de la calidad del agua. La cantidad de tiempo requerido para el desarrollo de los ovocitos depende de la temperatura del agua, después de este tiempo las larvas rompen el saco vitelino y emergen, por varias semanas se alimentan del saco vitelino (Chaparro, 1981).

2.1.3.3 Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario de la Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) comienza con el ovocito maduro sin fertilizar, el cual es telolecito, y está conformado por una membrana externa protectora y un micrópilo. Después de 8 a 10 horas de haber ocurrido la fertilización, se inicia la primera segmentación en el disco germinal, en donde éste se divide en dos blastómeros iguales, y el polo vegetativo queda notorio sobre la superficie del vitelo. La segunda segmentación, la cual ocurre entre la hora 11-12, va desde la iniciación del segundo surco hasta la aparición del tercero, y en este punto, se forman 4 blastómeros iguales. La tercera segmentación ocurre a las 17 horas, y aquí, se forman 8 células iguales, y los blastómeros comienzan a levantarse de su posición aplanada para dar paso al blastocele, el cual se llena de líquido, quedando limitado por las células centrales del blastodermo y por la superficie del vitelo. La cuarta segmentación se da a las 20 horas, formándose 16 blastómeros que se distribuyen en una semiesfera, y después de 2 horas aproximadamente, sucede la quinta segmentación, formándose así, 32 células. En muchos casos, este suceso se puede extender hasta la hora 41 (Bejarano, 1983).

En la sexta segmentación se forman 64 células muy pequeñas que comienzan a apilarse en el disco germinal, y ocurre 26 horas después de la fecundación. Tras las segmentaciones, la mayoría de los embriones se

convierten en blastodermos en el primer día de vida. La blástula de 180 blastómeros, se presenta como un disco compacto y algo alargado, homogéneo, y sin señales de surcos de segmentación (Bejarano, 1983). A partir de las 37 a 61 horas, las células del blastodermo se hacen progresivamente más pequeñas y numerosas, agrupándose en tres capas. La blástula se va aplanando y extendiendo sobre el vitelo, y la membrana vitelina forma una corona blanquecina, alrededor del disco. Hacia las 100 horas ya se ha iniciado la gastrulación que se evidencia por la periferia del blastodisco uniformemente engrosada (Bejarano, 1983).

Ya para el sexto día, se hace visible la quila neural sobre el labio dorsal del blastoporo, y la notocorda. Y entre los días 7 y 9, el embrión tiene 17- 24 somitas, y se puede observar el abultamiento óptico. El labio del blastoporo forma el tapón vitelino, el cual, cuando esté cerrado completamente indicará que el cristalino, el cerebro anterior, los lóbulos ópticos, el cerebelo y la medula están formados (Bejarano, 1983).

Hacia el día 10- 11, se hacen presentes en el embrión los lóbulos olfatorios del cerebro, y se pueden distinguir las tres regiones cerebrales y los botones de las aletas pectorales. La región nasal se desarrolla como un engrosamiento del ectodermo y más tarde formará las fosas nasales. En los días 12 y 13 se forman las primeras hendiduras branquiales en la región de la faringe que se observan como abultamientos o yemas, creciendo al mismo tiempo los opérculos que las cubren. Además, se producen los primeros movimientos del embrión. Para el día 15- 16, se pueden apreciar pigmentos oculares aun a través del corión. Las branquias se destacan bastante, los orificios nasales ya están bien formados, y comienzan a formarse los otolitos. Entre los días 17 y 25, el embrión aumenta de tamaño y se aprecia más oscuro, y los ojos están completamente formados notándose perfectamente el cristalino dentro de la cavidad ocular. El día 28, el embrión está

completamente formado y sobrepasa con su enrollamiento en el vitelo la porción cefálica, además de hacerse más notoria la pigmentación corporal (Bejarano, 1983).

Finalmente, hacia el día 29- 30, varias partes del corión son disueltas por enzimas disolutivas. La ruptura y desprendimiento del embrión se acelera por movimientos vigorosos del cuerpo y latigazos caudales, y el alevino recién nacido permanece adosado a una porción de vitelo rodeada por el saco vitelino, el cual se irá consumiendo paulatinamente hasta su reabsorción total a medida que el alevino continúa su crecimiento y desarrollo (Bejarano, 1983).

2.1.4 Pruebas de toxicidad

Una prueba de toxicidad es un ensayo en el cual un tejido viviente, organismo o grupo de organismos, son usados como reactivos para la determinación de la fuerza de alguna sustancia fisiológicamente activa (Bellan, 1981 en Ramírez, 1999). El bioensayo es una herramienta que se ocupa del estudio del efecto y destino de contaminantes tóxicos de origen antrópico, y que permite realizar medidas experimentales de la relación concentración-respuesta que genera un efecto tóxico en los organismos de prueba, bajo condiciones controladas en terreno o en laboratorio (Reish, 1987 en Alarcón *et al.*, 2008). Entre los efectos que se pueden determinar, están la mortalidad, inhibición del crecimiento, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos, entre otros (Díaz-Báez *et al.*, 2004).

Los ensayos de toxicidad en el medio acuático, según el tiempo de exposición al tóxico, pueden clasificarse en agudos, subcrónicos, crónicos, reproductivos y de recuperación (Posada *et al.*, 2006), y generalmente se

efectúan mediante flujo continuo para mantener constante la concentración del compuesto estudiado (Ramírez, 1999).

Los bioensayos con organismos acuáticos son métodos empleados en muchos países para el monitoreo y control de la contaminación hídrica, ya que frecuentemente el medio acuático es quien recibe las consecuencias de las actividades humanas, incluyendo las industriales, en donde se encuentran grandes cantidades de sustancias químicas contaminantes que ponen en riesgo la salud del ecosistema. (Alcazar, 1988 en Alarcón *et al.*, 2008).

A través de los bioensayos es posible simular condiciones futuras, evitando así graves consecuencias ambientales (Ramírez, 1999). Su aplicación permite la obtención de información sobre el peligro y los efectos nocivos en organismos, ayuda a identificar y clasificar muestras potencialmente tóxicas, y expresa resultados sobre el estado real de la contaminación, convirtiéndose en una herramienta importante para el manejo del medio ambiente (Díaz-Báez *et al.*, 2004).

2.1.5 Malformaciones congénitas

Entre los diferentes tipos de malformaciones se encuentran las malformaciones congénitas, las cuales se refieren a las características adquiridas durante el desarrollo embrionario, y que por lo tanto, se encuentran presentes en el momento de la eclosión (Adler, 1974 en Burgos, 1999).

Algunas de estas malformaciones presentes en el desarrollo embrionario de la Trucha arcoíris, ocasionadas por el nitrato de plomo son:

Cifosis: desviación angular en sentido ventral a diferentes niveles del cuerpo y con diferentes grados de intensidad, impidiendo al alevino nadar hacia adelante y hacia los lados, limitándolo a estar en el mismo lugar (Burgos, 1999).

Lordosis: desviación angular en sentido dorsal a diferentes niveles del cuerpo y con diferentes grados de intensidad (Burgos, 1999).

Escoliosis: deformidad lateral de la columna (Burgos, 1999).

Hiperplasia del cristalino: aumento cuantitativo en el número de células, sin cambios significativos en su estructura y funcionamiento, y como consecuencia de esto, los tejidos y órganos afectados suelen aumentar de tamaño (Robbins *et al.*, 1983).

Microcefalia: afección en la cual la cabeza es considerablemente más pequeña de lo normal con base en tablas de referencia, y se presenta debido a que el cerebro no logra crecer a una tasa normal (Kinsman *et al.*, 2007).

Microftalmia: anomalía congénita en donde se encuentra una notoria reducción del diámetro del globo en uno o ambos ojos, y generalmente hundido en una órbita también pequeña (Roa, SF).

Hipertrofia de aletas: aumento de las dimensiones celulares, ya que se sintetizan más componentes ultraestructurales, pero sin aumento del número de células en un tejido. En consecuencia, hay aumento de las dimensiones de todo el órgano o tejido (Robbins *et al.*, 1983).

Hipoplasia encefálica: falta de desarrollo completo. Todas las variaciones de atrofia significan que algún medio perjudicial exige que las células

experimenten regresión a dimensiones menores con las cuales pueden sobrevivir pero con un nivel funcional más bajo (Robbins *et al.*, 1983).

2.2 ANTECEDENTES

Uno de los aspectos importantes en la ecotoxicología es la relación entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el consecuente efecto nocivo que le produce. Esta relación, conocida como la relación dosis-respuesta, constituye la base para la evaluación del peligro y el riesgo generado por las sustancias químicas en el medio ambiente (Díaz-Baez *et al.*, 2004).

Múltiples estudios han demostrado los efectos toxicológicos y las consecuentes alteraciones teratogénicas del plomo en peces, como el realizado por Christensen *et al.*, (1975) quienes expusieron truchas de Fontana (*Salvelinus fontinalis*) a nitrato de plomo, entre 0.057 mg/L y 0.53 mg/L, durante ocho semanas, encontrando una pérdida de peso en los alevines, disminución significativa en los niveles de hemoglobina, y un incremento en la actividad fosfatasa alcalina y en la actividad acetilcolinesterasa, tras analizar una serie de factores bioquímicos.

De igual forma, Holcombe *et al.*, (1976) sometieron a tres generaciones de truchas Fontana (*Salvelinus fontinalis*) a nitrato de plomo (0.009- 0.474 mg/L), obteniendo como resultado escoliosis en la segunda y tercera generación, así como disminución en el peso de los alevinos.

Otros estudios similares son los elaborados por Hodson *et al.*, (1979) quienes analizaron individuos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*) presente en el lago Ontario (Estados Unidos), contaminado por plomo, y

detectaron que los peces expuestos desde la fase de huevo son 5 veces más susceptibles que los expuestos desde una etapa más avanzada. Además, observaron una coloración negra en la cola de los alevines, lo cual indica un síntoma de deformidad de la columna, debido a la exposición que tienen con el metal.

Tabche *et al.*, (1990) expusieron a la tilapia (*Oreochromis hornorum*) a concentraciones subletales de plomo (15, 23, 31, 39 y 47% de la LC₅₀), durante 72 horas, lo cual mostró una reducción de la concentración de la hemoglobina en la sangre.

Las lesiones que Roncero *et al.*, (1990) encontraron en 21 adultos de tenca (*Tinca tinca*, L.), tras exposición a 75 ppm de nitrato de plomo, se localizaron principalmente en las branquias, las cuales presentaron necrosis, ocasionando así, la muerte a los 12- 15 días de exposición.

Burden *et al.*, (1998) estudiaron la actividad ALA- D en alevinos de trucha arcoíris, al ser expuestos a ciertas concentraciones de plomo, obteniendo como resultado una disminución de la actividad y una reducción en el crecimiento de los peces expuestos.

Valladares *et al.*, (2007) expusieron a 21 especímenes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*) a 3 concentraciones distintas de nitrato de plomo /L de agua (0.87 mg, 1.17 mg y 3.51 mg) durante un mes, observando una disminución del consumo de alimento e hiperactividad, además de reportar una resistencia de los peces a una dosis adicionada durante más tiempo. Así mismo, hallaron lesiones a nivel de branquias, como desprendimiento de la lamela secundaria, congestión y telangiectasia, áreas de necrosis, deposición de fibrina; en riñón: proliferación de centros melanomacrófagos y degeneración hidrópica de túbulos renales; en hígado: congestión y áreas

de necrosis; sacos pilóricos: atrofia de vellosidades, y en piel: migración de melanocitos a la superficie y degeneración de fibras musculares.

En cuanto al contexto nacional, se encuentran los trabajos elaborados por Child (1985) y Alarcón (1986), quienes analizaron el efecto y la toxicidad del acetato de plomo, así como las alteraciones a nivel de tejidos, en individuos de la rana *Hyla labialis*, en las etapas tempranas de desarrollo. Los embriones mostraron malformaciones morfológicas externas como: edema abdominal, escoliosis e invaginaciones a nivel de aletas caudales. Además, presentaron un aumento en la intensidad del pigmento a nivel de epidermis, y retardo en el desarrollo de algunas estructuras en determinados estadios, presentándose en forma directamente proporcional a la concentración.

Concerniente a peces, en Colombia, se han venido desarrollando una serie de trabajos relacionados con el estado de las concentraciones de metales pesados, así como su bioacumulación en estos organismos, pero hace falta obtener mayor información y reportar los efectos que estos contaminantes pueden llegar a causar a la ictiofauna.

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La contaminación de las aguas por metales pesados se ha convertido en un problema inevitable debido a las acciones antropogénicas, como la industrialización y urbanización, afectando de manera irreversible su composición y calidad. El nitrato de plomo al ser una sal inorgánica soluble en agua (Petrucci *et al.*, 2003), se convierte en uno de los compuestos más comunes y nocivos en este recurso.

La Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*) es un producto alimenticio con gran peso dentro de la actividad económica de Colombia. A pesar de que el país ha venido aplicando y desarrollando infraestructuras y tecnologías para mejorar cada día su cultivo, se desconoce los procesos toxicológicos de los metales pesados presentes dentro de los cuerpos de agua donde se encuentran los peces, por lo que se hace conveniente investigar y obtener información acerca de los efectos que tienen estos contaminantes ambientales, como el plomo, sobre estos y otros animales, especialmente en aquellos que son destinados al consumo humano, en sus diferentes estadios de vida.

4. JUSTIFICACIÓN

Teniendo en cuenta la importancia que reviste la contaminación acuática por metales pesados, y sin olvidar que la mayoría de pruebas toxicológicas han recaído en especies y estadios de vida de alta disponibilidad al científico, en donde solo se dan a conocer resultados a cerca de los efectos finales de una fase de contaminación (Gray, 1989^a en Ramírez, 1999), este estudio, se realizó con el fin de mostrar los efectos del nitrato del plomo en la trucha arcoíris durante el periodo de la embriogénesis, aportando de esta manera, información referente a las alteraciones teratogénicas y susceptibilidad de los embriones cuando están expuestos a dicho metal.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar los efectos del nitrato de plomo en la embriogénesis de la Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*), hasta la eclosión del alevino (estadio 18).

5.2 Objetivos Específicos

- Determinar la dosis letal (DL50) y dosis subletales para el nitrato de plomo en embriones de Trucha arcoíris.
- Identificar las alteraciones morfológicas presentes en los diferentes estadios de desarrollo de los embriones de Trucha arcoíris, en cada una de las concentraciones de nitrato de plomo aplicadas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Recolección de información

En esta etapa inicial, se realizó la revisión bibliográfica de las publicaciones existentes referente a los efectos del plomo en animales, específicamente en peces, recopilando, analizando y haciendo síntesis de la información, con el fin de conocer sobre el tema, identificar falencias y desarrollar un buen trabajo que complementara y aportara datos importantes a cerca de la toxicidad del nitrato de plomo en la Trucha arcoíris.

6.2 Fase de laboratorio

6.2.1 Aclimatación de los embriones de *Oncorhynchus mikiss*

Las ovas fueron obtenidas en la piscícola de Rafael Rosado en Guasca-Cundinamarca, y la fecundación se realizó mediante la fertilización en seco. Después de la fecundación, los huevos fueron transportados hacia Bogotá en una nevera con hielo, con el fin de brindar unas condiciones óptimas para el cultivo, y se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 14°C, con aireadores permanentes, debido a que el mantenimiento de la trucha exige condiciones óptimas de oxígeno. Adicionalmente, tanto las soluciones de nitrato de plomo como el agua utilizada para hacer el recambio del grupo control, eran enfriadas previamente, con el objetivo de estabilizar la temperatura y así, evitar cambios bruscos que pudieran afectar a los embriones.

El estudio duró 24 días (576 horas), tiempo en el que los embriones eclosionaron.

6.2.2 Mantenimiento de los huevos de *Oncorhynchus mikiss*

Los huevos recién fecundados fueron distribuidos en acuarios con capacidad de 2 litros, repartiendo 500 embriones en cada una de las concentraciones y en el grupo control. Diariamente se lavaban los acuarios, cambiando el agua y las soluciones de nitrato de plomo, y extrayendo mediante pipetas las ovas muertas, las cuales se podían distinguir fácilmente ya que se tornan blancas. Este procedimiento se realizó a oscuras, debido a que la luz tiene un efecto negativo sobre los embriones.

6.2.3 Pruebas de toxicidad

Se prepararon dosis de 5 mg, 10 mg y 15 mg de nitrato de plomo/L de agua, y de acuerdo con los resultados obtenidos en esta etapa, fue necesario aplicar tratamientos de 0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm, y 3 ppm, obteniendo de esta manera, los datos requeridos y esperados para este estudio.

Diariamente se reportaba la mortalidad de cada una de las concentraciones así como la del grupo control, y se tomaba además, una muestra de cada una de ellas, para posteriormente determinar cualquier anomalía en el embrión.

6.2.3.1 Preparación de soluciones

Las concentraciones de nitrato de plomo se hallaron por medio de la ecuación de dilución (Skoog *et al*, 1986). A continuación se muestra el ejemplo del cálculo de una de ellas:

$$\frac{15 \text{ mg Pb (NO}_3)_2}{l} \times 2 l \times \frac{331.21 \text{ mg Pb (NO}_3)_2}{207.19 \text{ mg Pb (NO}_3)_2} \times \frac{100 \text{ mg Pb (NO}_3)_2 \text{ Frasco}}{99 \text{ mg Pb (NO}_3)_2}$$

$$= 48.4418 \text{ mg Pb (NO}_3)_2 \text{ Frasco}$$

$$= \mathbf{0.0484 \text{ gr Pb (NO}_3)_2 \text{ Frasco}}$$

6.2.4 Toma y preservación de las muestras

A diario se tomaba una muestra de cada una de las concentraciones y se analizaban macroscópicamente mediante el uso del estereoscopio para determinar las alteraciones en el desarrollo a nivel morfológico de los embriones. Para lograr establecer las anomalías, se tomó como referencia la tabla de desarrollo embrionario normal de la Trucha *Oncorhynchus mikiss*, elaborada por Bejarano (1983), y así mismo, los ejemplares del grupo control fueron confrontados con este mismo objetivo.

Los embriones se fijaron en solución líquido de Bouin, y después de cuatro días se les retiraba el corion, para facilitar su observación. El procedimiento que se siguió para la fijación de los ejemplares fue el expuesto por Guevara (1997).

6.3 Análisis de resultados

Los datos obtenidos en los bioensayos se analizaron estadísticamente mediante el programa Statistix versión 9.0, aplicando la prueba de chi cuadrado (χ^2), que se define como la suma de los cuadrados de variables independientes, normalmente distribuidas con medias 0 y varianzas 1, y la cual depende de los grados de libertad (Stell *et al.*, 1988), con el fin de comparar la tasa de mortalidad entre el grupo control y los grupos

experimentales. Adicionalmente, se utilizaron tablas y figuras para determinar el número de embriones vivos y muertos de *O. mikiss* por cada una de las concentraciones de nitrato de plomo, y así mismo, establecer el porcentaje de mortalidad en cada una de estas.

La dosis letal (DL50) se evaluó con base en los principios expuestos en el método de Reed & Muench (1955).

Para el análisis de las malformaciones en los embriones de *O. mikiss*, se tabuló y graficó con el fin de identificar cuáles de estas estaban presentes en cada una de las concentraciones de nitrato de plomo, y determinar en qué punto del tiempo de exposición se hacían presentes.

7. RESULTADOS

7.1 Mortalidad

El análisis de la mortalidad se determinó con una prueba de chi cuadrado comparando los individuos vivos y muertos en cada una de las concentraciones, obteniendo un $\chi^2 = 4091.66$ (chi cuadrado calculado), comparado con el χ^2 de tablas, con 5 grados de libertad y un alfa de 0.05. Se obtuvo un valor de 11.1, el cual es mayor al chi cuadrado calculado, por lo cual se acepta la hipótesis alterna, es decir, que la mortalidad es dependiente de la concentración de nitrato de plomo (Tabla 2).

Tabla 2. Prueba de chi cuadrado para la mortalidad y las concentraciones (ppm) de nitrato de plomo.

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence for Mortalida = Individuo Concentra						
Individuo		0.05 PPM	0.1 PPM	Concentra		
				0.5 PPM	1 PPM	3 PPM
Vivo	Observed	9996	9677	3270	2463	1586
	Expected	9683,33	9401,09	3560,09	2804,25	1974,74
	Cell Chi-Sq	10,10	8,10	23,64	41,53	76,53

Muerto	Obs	125	149	451	468	478
	Expected	437,67	424,91	160,91	126,75	89,26
	Cell Chi-Sq	223,37	179,16	522,97	918,78	1693,14
		10121	9826	3721	2931	2064

Individuo		Concentra Control				
Vivo	Observed	11350	38342			
	Expected	10918.5				
	Cell Chi-Sq	17,05				

Muerto	Obs	62	1733			
	Expected	493,50				
	Cell Chi-Sq	377,29				
		11412	40075			
Overall Chi-Square		4091,66				
P-value		0,0000				
Degrees of Freedom		5				

El efecto del nitrato de plomo en los embriones de *O. mikiss* es dependiente de la presencia de este compuesto, ya que al realizar la prueba de chi cuadrado se obtuvo un valor de $\chi^2 = 534.48$, con un alfa de 0.05 y un grado de libertad, el cual es mayor al chi cuadrado de tablas 3.84 (Tabla 3).

Tabla 3. Prueba de chi cuadrado para evaluar la incidencia del plomo en la mortalidad de los embriones de *Oncorhynchus mikiss*.

Chi-Square Test for Heterogeneity or Independence for Mortalida = Individuo Plomo				
Individuo		Plomo		
		Con plomo	Sin plomo	
Vivo	Observed	27719	11350	39069
	Expected	28141.7	10927.3	
	Cell Chi-Sq	6,35	16,35	
Muerto	Obs	1671	62	1733
	Expected	1248,29	484,71	
	Cell Chi-Sq	143,14	368,64	
		29390	11412	40802
Overall Chi-Square		534,48		
P-value		0,0000		
Degrees of Freedom		1		

Los embriones de *O. mikiss* de la concentración de 0,05 ppm mostraron síntomas de toxicidad, pero sin tener un alto porcentaje de mortalidad, siendo esta del 25% (Tabla 4). Los primeros días de exposición al nitrato de plomo los embriones murieron masivamente, pero para el resto de tiempo, se disminuyó posibilitando su eclosión (Figura 1).

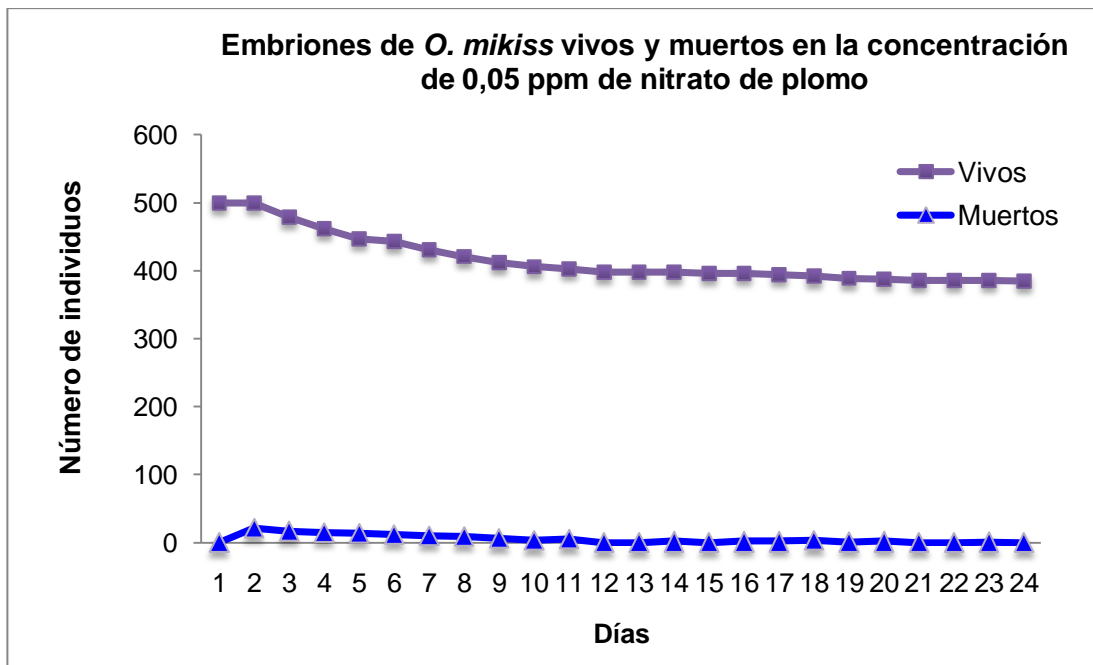


Figura 1. Embriones de *Oncorhynchus mikiss* vivos y muertos en la concentración de 0,05 ppm de nitrato de plomo.

En la concentración de 0,1 ppm se presentó una mortalidad del 29.8% (Tabla 4), evidenciándose el mayor número de muertos los primeros días de exposición, estabilizándose después hasta la culminación del desarrollo embrionario. Los embriones llegaron hasta el periodo de eclosión, lo que indica que a concentraciones menores de 0,1 de nitrato de plomo/L de agua, sobrevivirá más de la mitad de la población de *O. mikiss* (Figura 2).

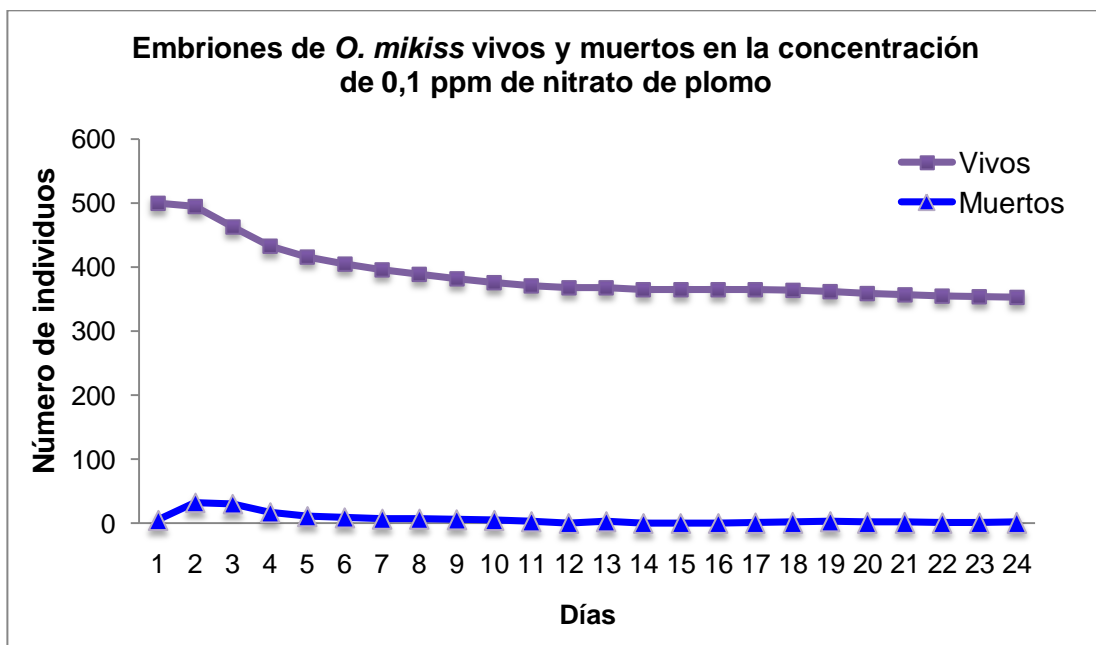


Figura 2. Embriones de *Oncorhynchus mikiss* vivos y muertos en la concentración de 0,1 ppm de nitrato de plomo.

Los embriones que se encontraban en la concentración de 0,5 ppm alcanzaron el período de pre- eclosión (día 24), pero en este punto, la mortalidad fue del 90% (Tabla 4). El número de individuos muertos tuvo un alto índice los primeros 5 días, estabilizándose hasta la hora 576. (Figura 3)

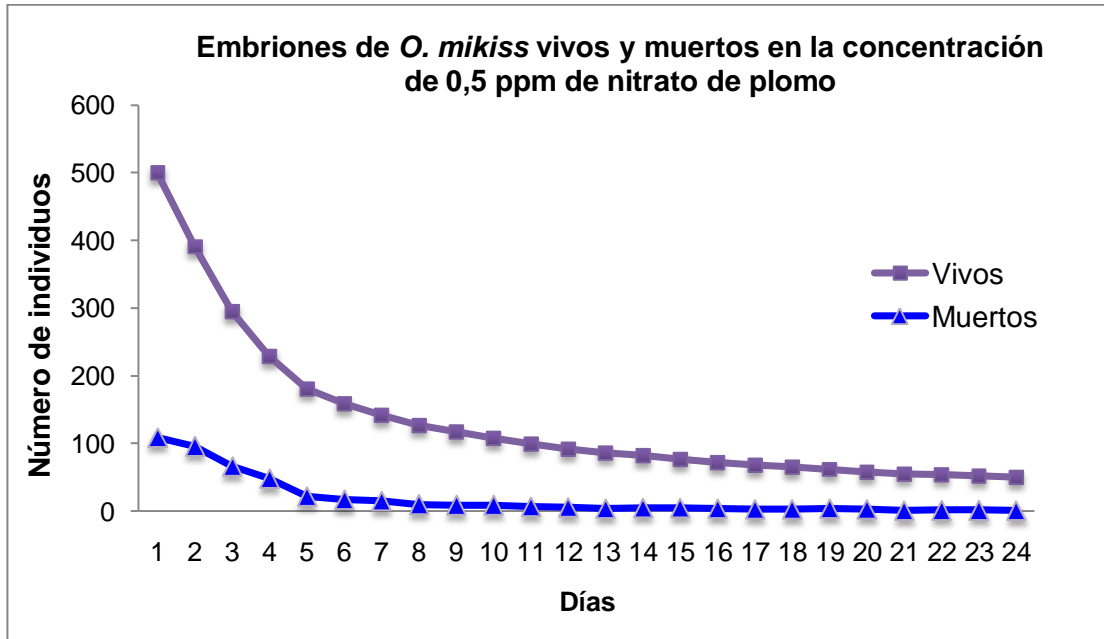


Figura 3. Embriones de *Oncorhynchus mikiss* vivos y muertos en la concentración de 0,5 ppm de nitrato de plomo.

Los embriones de Trucha arcoíris expuestos a la concentración de 1 ppm, presentaron una alta mortalidad desde el primer día de exposición al compuesto, desapareciendo toda la muestra el día 16, tiempo en el que se encontraban en el estadio de pigmentación retinal inicial (Figura 4), obteniendo así, una mortalidad del 100% (Tabla 4).

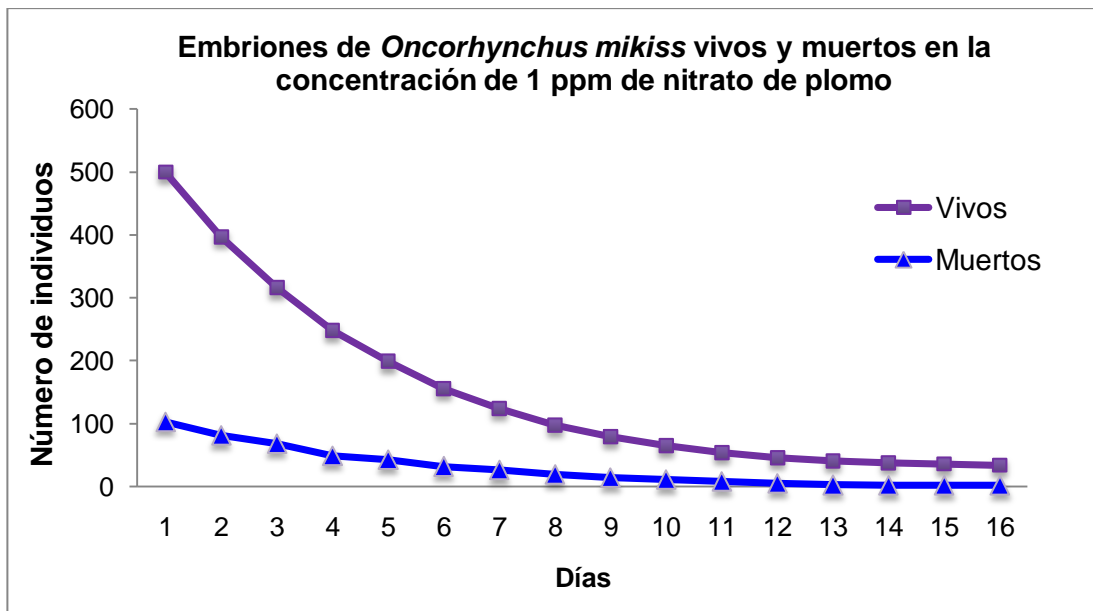


Figura 4. Embriones de *Oncorhynchus mikiss* vivos y muertos en la concentración de 1 ppm de nitrato de plomo.

En la concentración de 3 ppm los embriones presentaron una mortalidad del 100% en el día 11 quedando en el estadio de 60 somitas y botones de las aletas pectorales, en donde ya están presentes los lóbulos olfatorios del cerebro, las regiones cerebrales, el corazón, entre otros (Figura 5).

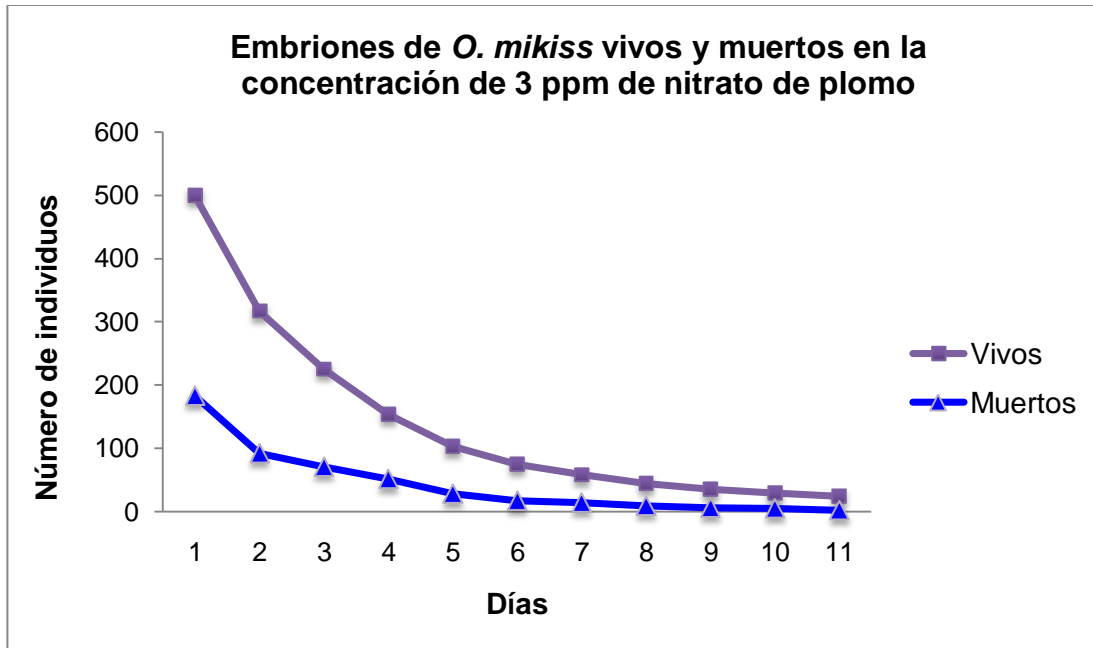


Figura 5. Embriones de *Oncorhynchus mikiss* vivos y muertos en la concentración de 3 ppm de nitrato de plomo.

Tabla 4. Porcentaje de mortalidad acumulada de embriones de *O. mikiss* en 5 concentraciones de nitrato de plomo y el control.

Concentración (ppm)	Vivos	Muertos	% Mortalidad
Control	438	62	12,4
0,05	375	125	25
0,1	351	149	29,8
0,5	50	450	90
1	0	500	100
3	0	500	100

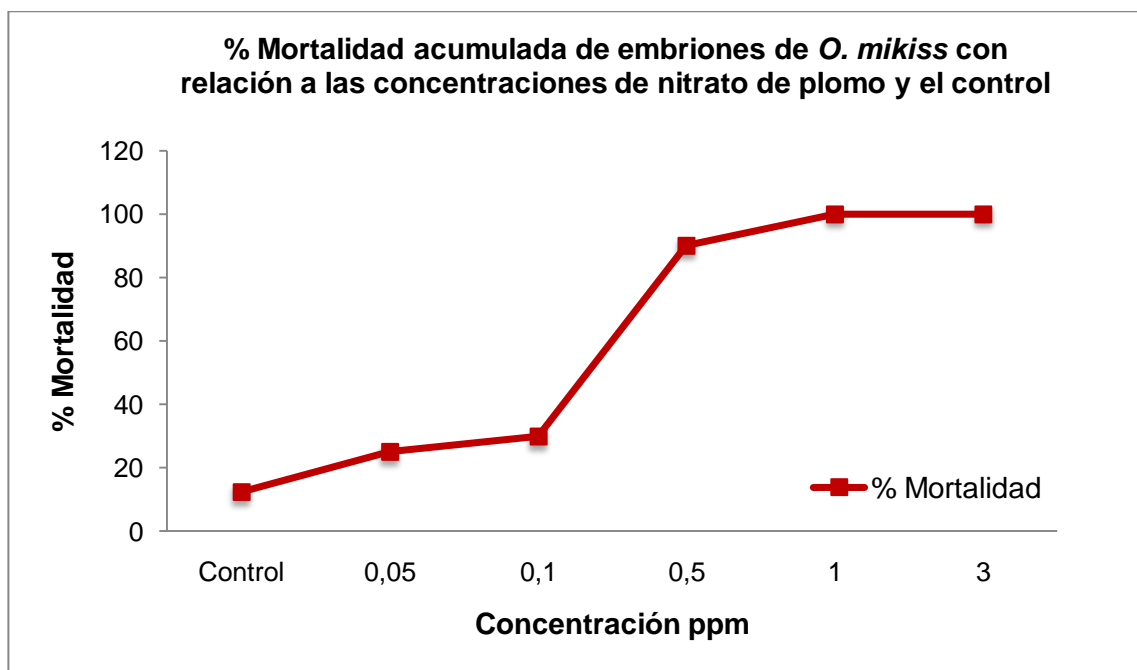


Figura 6. Porcentaje de mortalidad acumulada de embriones de *Oncorhynchus mikiss* con relación a las concentraciones de nitrato de plomo y el control.

7.1.1 Dosis letal

De acuerdo con el protocolo de Reed & Muench para la dosis letal (DL50), las concentraciones de 0,5 ppm, 1 ppm y 3ppm, se consideran como dosis

letales para el compuesto de nitrato de plomo, ya que originan la muerte de más del 50% de los embriones de *O. mikiss*, y las dosis de 0,1 ppm y 0,05 ppm son consideradas como dosis subletales.

7.2 Malformaciones

Las malformaciones presentes de todas las concentraciones de nitrato de plomo, fueron determinadas a partir del estadio 60 somitas y botones de las aletas pectorales, ya que en estadios anteriores, los embriones de *Oncorhynchus mikiss* no presentaron anomalía aparente. Por esta misma razón, la concentración de 3 ppm no fue tomada en cuenta para este análisis, ya que no hubo embriones que llegaran a este punto en el desarrollo (Tabla 5).

Tabla 5. Malformaciones en embriones de *O. mikiss* según las concentraciones (ppm) de nitrato de plomo.

Malformación	0,05 ppm	0,1 ppm	0,5 ppm	1 ppm
Cifosis	X			
Lordosis	X	X		
Escoliosis	X	X	X	X
Hiperplasia cristalino	X		X	X
Microcefalia	X	X	X	X
Hipoplasia encefálica			X	X
Microftalmia	X		X	
Hipertrofia aletas	X	X	X	X
Hemorragias	X	X		

Los embriones de *O. mikiss* de la concentración de 0,05 ppm, exhibieron las tres alteraciones a nivel de espina dorsal. La cifosis, malformación que se presentó únicamente en esta dosis, se evidenció a la hora 168 o estadio 60 somitas y botones de aletas pectorales (Figura 7), la escoliosis se mostró a partir del estadio de pigmentación retinal inicial, y fue constante para el resto

de estadios hasta el período de pre- eclosion (Figura 8), y la lordosis se presentó solo en los alevines recién eclosionados (Figura 9). Adicionalmente, en los embriones en estadio de pigmentación corporal por melanóforos y aumento en el tamaño del embrión, en el cual los ojos ya están completamente formados y se nota perfectamente la vesícula cristaliniiana, la cual presenta un aumento, lo que evidencia una hiperplasia en este órgano (Figura 10). Se detectó un retraso en el desarrollo a nivel encefálico o microcefalia, desde el estadio de pigmentación retinal inicial hasta el período de pre- eclosión (Figura 11), así como una anomalía ocular, determinada como microftalmia en alevines recién eclosionados (Figura 12). Los embriones además, exhibieron una hipertrofia de aletas desde el estadio de pigmentación retinal (Figura 13), y hemorragias en la parte posterior de la espina dorsal y saco vitelino (Figura 14). (Figura 15)

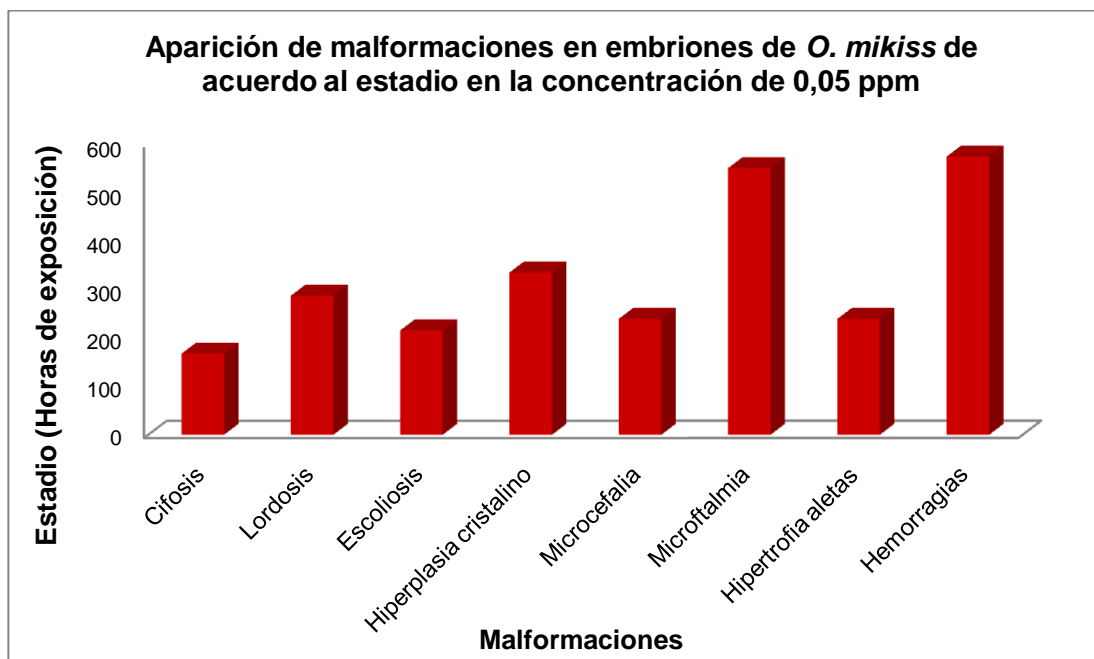


Figura 15. Aparición de malformaciones en embriones de *Oncorhynchus mikiss* de acuerdo al estadio en la concentración de 0,05 ppm de nitrato de plomo.

En la concentración de 0,1 ppm los embriones de *O. mikiss* tomaron una posición cóncava durante los estadios próximos a la eclosión, como son la pigmentación retinal inicial, y la pigmentación corporal por melanóforos, y después de la eclosión, la lordosis se hizo más común en los alevines. La escoliosis desde el estadio de botones de aletas pectorales, microcefalia desde la pigmentación retinal inicial, hipertrofia de aletas desde pigmentación corporal por melanóforos, y hemorragias en los alevinos recién eclosionados, fueron identificadas igualmente, en los embriones. (Figura 16)

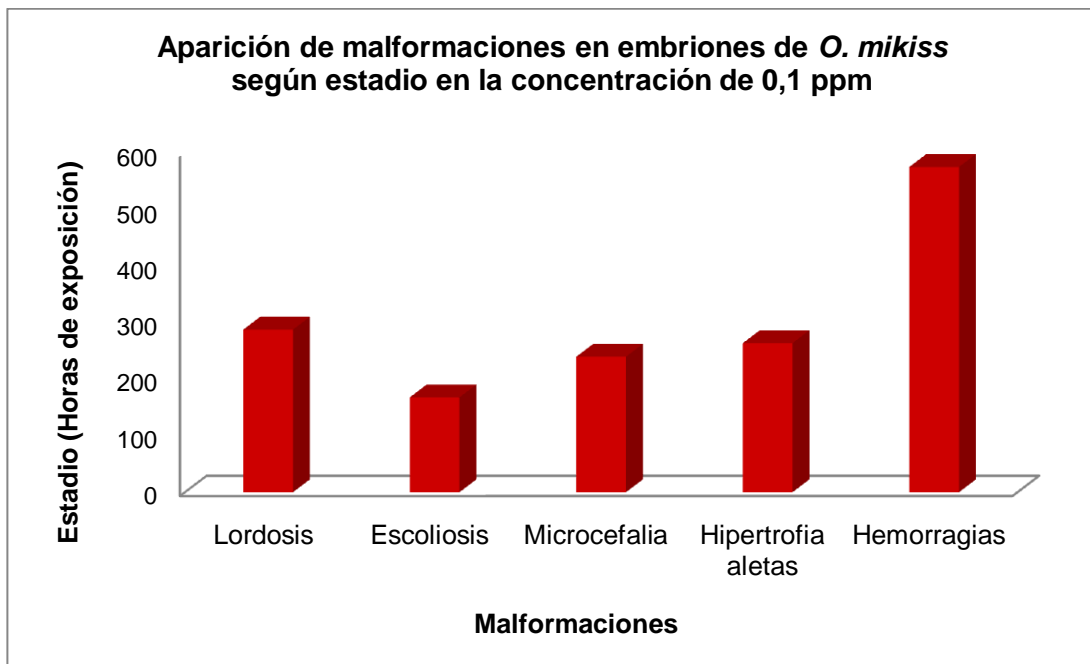


Figura 16. Aparición de malformaciones en embriones de *Oncorhynchus mikiss* según estadio en la concentración de 0,1 ppm de nitrato de plomo.

Para la concentración de 0,5 ppm los embriones de *O. mikiss* presentaron seis malformaciones: escoliosis, microcefalia e hipertrofia de aletas, desde el estadio de botones de aletas pectorales, hipoplasia encefálica (Figura 17) desde la pigmentación retinal inicial, y microftalmia e hiperplasia del cristalino desde pigmentación corporal por melanóforos. (Figura 18)

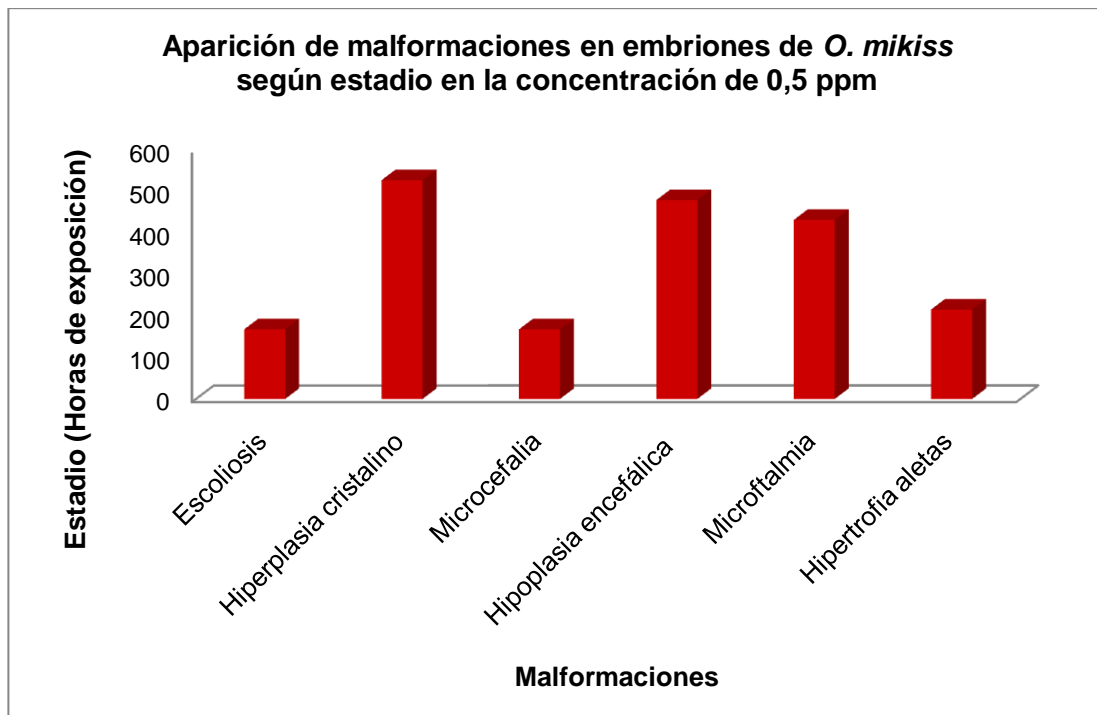


Figura 18. Aparición de malformaciones en embriones de *Oncorhynchus mikiss* según estadio en la concentración de 0,5 ppm de nitrato de plomo.

Los embriones de *O. mikiss* de la concentración de 1 ppm presentaron como primera malformación la hipertrofia de aletas, y se pudo observar también, una microcefalia durante el estadio de botones de aletas pectorales. La hiperplasia del cristalino e hipoplasia encefálica aparecieron en el estadio de pigmentación retinal inicial, al igual que la escoliosis, siendo esta la última malformación en presentarse. (Figura 19)

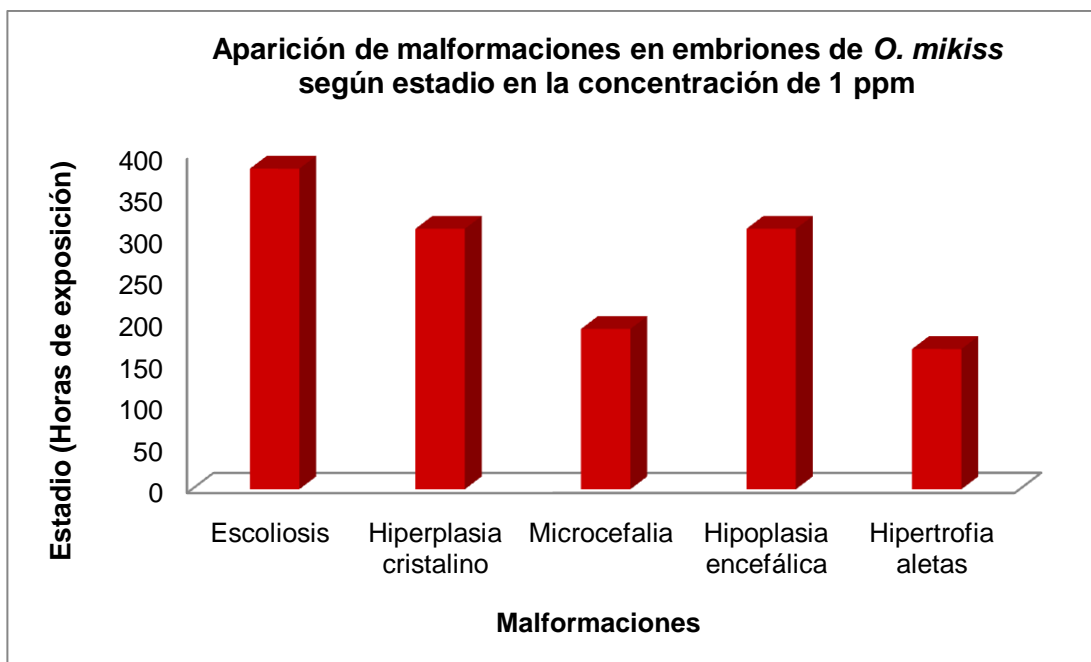


Figura 19. Aparición de malformaciones en embriones de *Oncorhynchus mikiss* según estadio en la concentración de 1 ppm de nitrato de plomo.

Los embriones de *O. mikiss* expuestos a las concentraciones de nitrato de plomo (ppm) presentaron en total 9 malformaciones (Figura 20). Se esperaba que a medida que aumentará la dosis, se estableciera una relación directa con el número de anomalías, pero por el contrario ocurrió que en la menor concentración, correspondiente a 0,05 ppm se evidenciaron todas las malformaciones con excepción de la hipoplasia encefálica. Esto probablemente, se debe a que en esta concentración la mayor parte de los embriones alcanzaron el periodo de pre- eclosión, presentando de este modo el máximo grado de deformación, y los embriones de la concentración de 1ppm al vivir tan solo 16 días, presentaron un número menor de malformaciones determinadas.

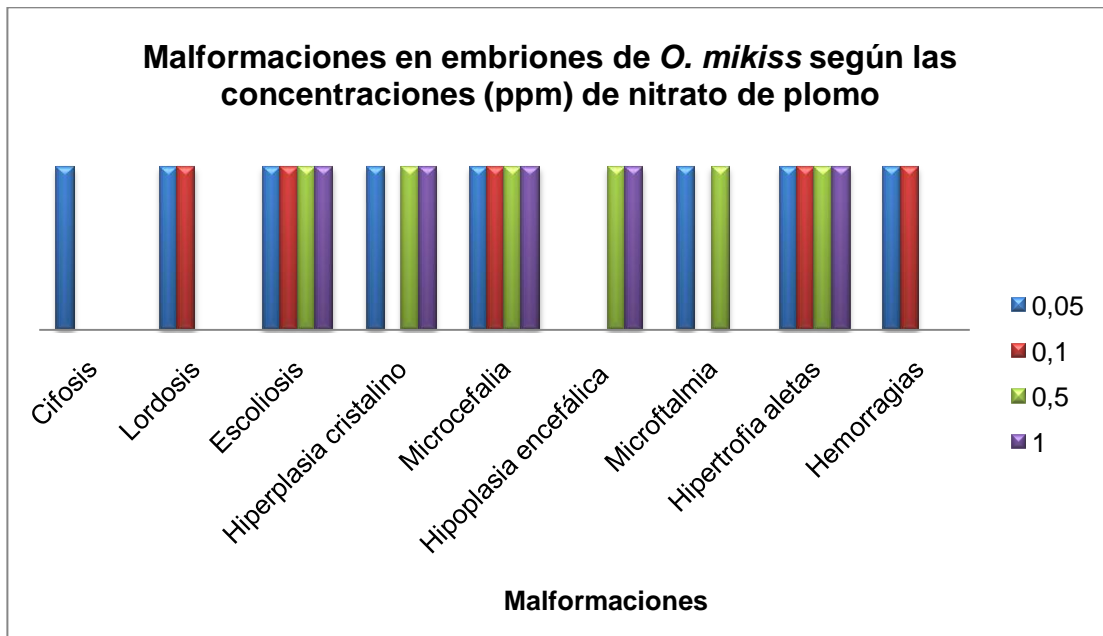


Figura 20. Malformaciones en embriones de *Oncorhynchus mikiss* según las concentraciones (ppm) de nitrato de plomo.

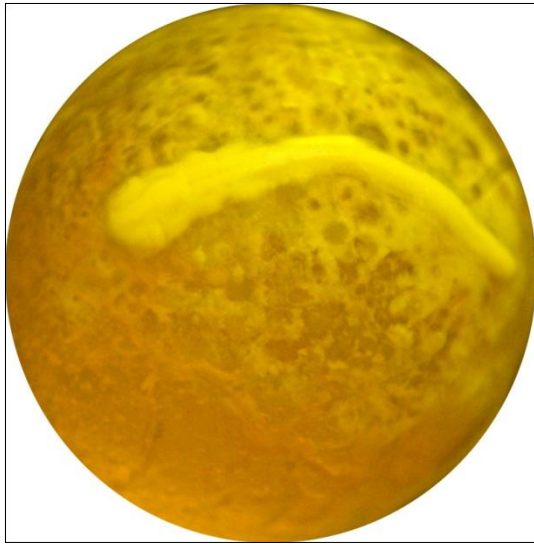


Figura 7. Embrión malformado de Trucha arcoíris que (cifosis)



Figura 22. Embrión normal de Trucha arcoíris

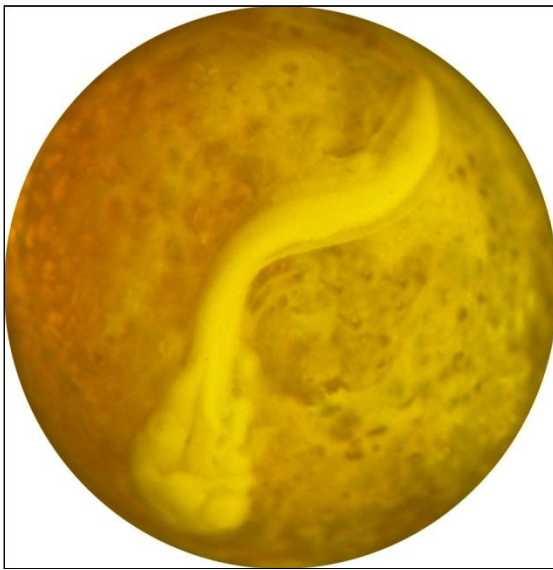


Figura 8. Embrión malformado de Trucha arcoíris (escoliosis).



Figura 23. Embrión normal de Trucha arcoíris

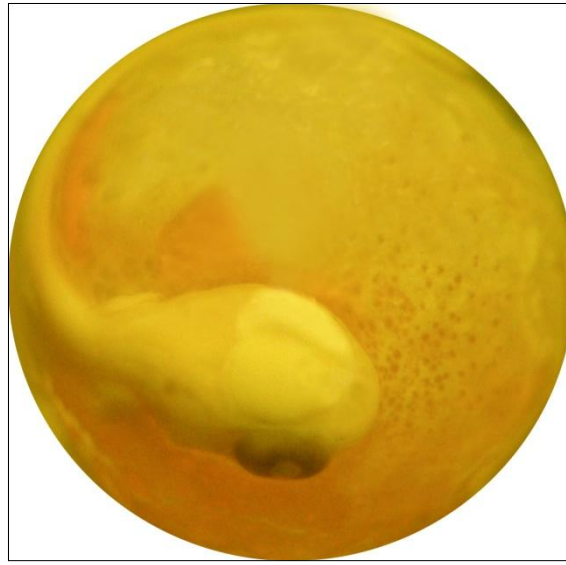


Figura 24. Embrión normal de Trucha arcoíris

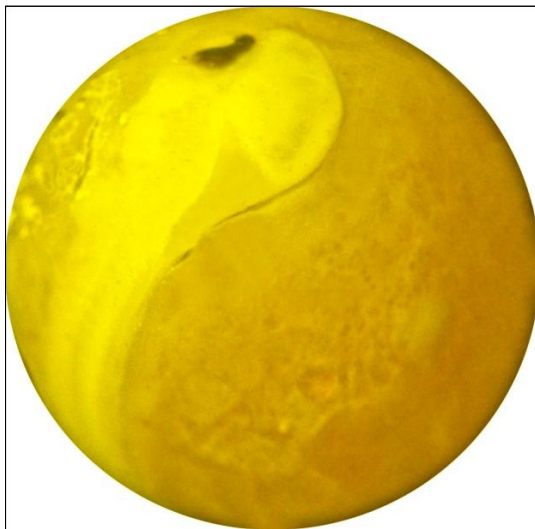


Figura 17. Embrión malformado de Trucha arcoíris (hipoplasia encefálica).

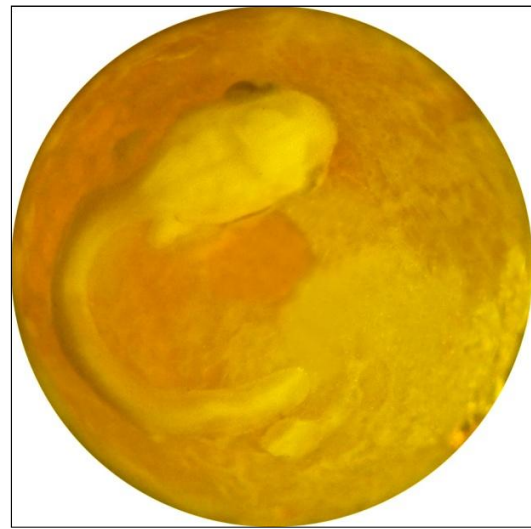


Figura 11. Embrión malformado de Trucha arcoíris (microcefalia).

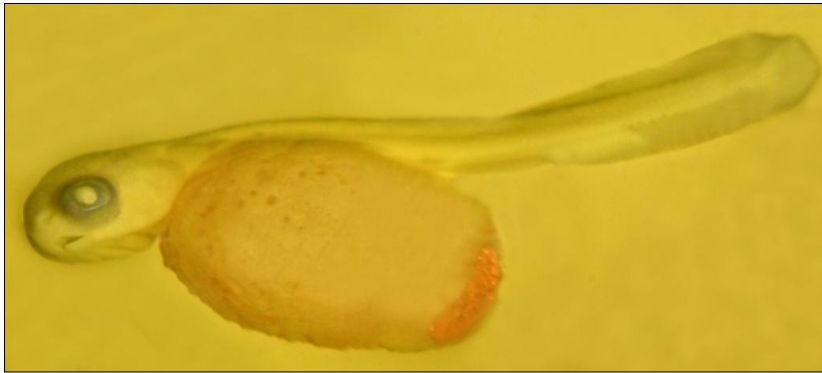


Figura 25. Embrión normal de Trucha arcoíris.



Figura 9 . Embrión malformado de Trucha arcoíris (lordosis).



Figura 14. Embrión malformado de Trucha arcoíris (hemorragias).

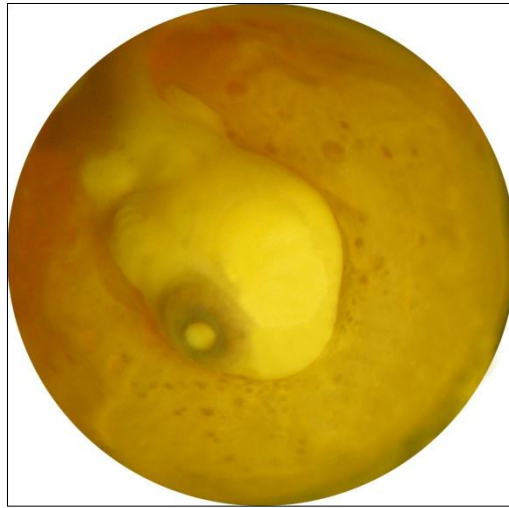


Figura 26. Embrión normal de Trucha arcoíris.



Figura 10. Embrión malformado de Trucha arcoíris (hiperplasia del cristalino).



Figura 12. Embrión malformado de Trucha arcoíris (microftalmia).



Figura 27. Embrión normal de Trucha arcoíris.



Figura 13. Embrión malformado de Trucha arcoíris (hipertrofia de aletas).

8. DISCUSIÓN

Los efectos tóxicos del nitrato de plomo se pueden evidenciar inicialmente en la mortalidad de los embriones de *Oncorhynchus mikiss* en cada una de las concentraciones (ppm), siendo esta relación directa, es decir, que a mayor concentración, mayor número de individuos muertos. Posiblemente, este compuesto, afecte de manera irreversible algún órgano interno de los embriones, cuya alteración no se pueda observar macroscópicamente, y sea la causa de muerte.

Las malformaciones que presentan los embriones de trucha arcoíris, son adquiridas durante la embriogénesis y repercuten en los estadios más avanzados del desarrollo, causando mortalidades variables en los alevines (Burgos, 1999), retardo del crecimiento parcial o completo, o una alteración funcional (Sadler, 1986).

Los efectos teratogénicos del nitrato de plomo son innumerables, es tal su magnitud que debemos ver más allá de una alteración a nivel morfológico, puesto que están implicados procesos importantes a nivel molecular, celular e histológico que influyen en el desarrollo del embrión.

Entre las principales funciones biológicas que posee el hierro, está el transporte y almacenamiento de oxígeno a través de la hemoglobina, la cual es inhibida por el plomo al interferir con varios pasos enzimáticos de la ruta del grupo hemo (Boccio, 2003). Específicamente, el plomo inhibe la enzima ALAD (ácido deltaminolevulínico deshidrasa), que debe convertir el ALA (ácido deltaminolevulínico) en porfobilinógeno, y también inhibe la ferroquelatasa, la cual cataliza la inserción del hierro en la protoporfirina IX, para formar la hemoglobina (Figura 21). Como consecuencia de esto, se produce una disminución de la producción de glóbulos rojos (Bellot, SF) y por

tanto, la ruta del oxígeno se ve disminuida, razón que podría explicar el retardo en el desarrollo encefálico (Microcefalia) de los embriones de *Oncorhynchus mykiss*.

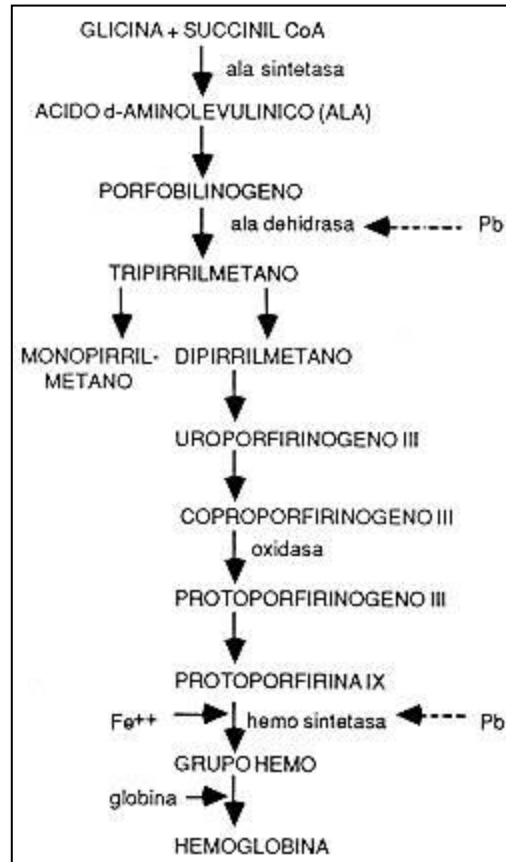


Figura 21. Síntesis de la hemoglobina.

Fuente: Pascual (1986).

La alteración del ácido deltaminolevulínico (ALA) por acción del plomo en la síntesis de la hemoglobina, explicaría la hipoplasia encefálica, ya que esta enzima al estar localizada en la membrana interna de la mitocondria (Medina *et al.*, 2000) ocasionaría daños en las células del cerebro, interrumpiéndose así su desarrollo.

Las dosis elevadas de plomo producen encefalopatía. Los encéfalos presentan manifestaciones histopatológicas semejantes a las descritas en la encefalopatía humana (OPS, 1979), y los efectos se pueden explicar atribuyéndolos a retardo del desarrollo encefálico (Michaelson, 1973 & Krigman *et al.*, 1974 en OPS, 1979). Se ha interpretado que estos resultados indican un retardo de la maduración encefálica (OPS, 1979).

La microftalmía identificada en los embriones de Salmon coho (*Oncorhynchus kisutch*) y Salmon del atlántico (*Salmo salar*), al estar expuestos a los antibióticos enrofloxacino y eritromicina, es causada por la inducción parcial del mesénquima encefálico sobre la vesícula óptica durante su desarrollo (González, 2004). De igual manera, la deficiencia de vitamina A provoca esta anomalía en el ojo. (Lovell, 1998 en González, 2004).

El plomo al tener una acción toxica sobre la síntesis de hemoglobina, afecta de manera directa los glóbulos rojos, incrementando la fragilidad de la membrana eritrocitaria y su posterior ruptura (Osorio *et al.*, SF). Se sabe que el plomo altera las paredes de los vasos sanguíneos, de tal modo que se hacen más permeables, y las fugas del líquido causan edema (Chisolm, 1971 en Child, 1985). Este suceso, explicaría las hemorragias que presentaron algunos de los embriones de *O. mykiss* en la parte posterior de la espina dorsal y saco vitelino.

Se sabe que el calcio es un elemento esencial para la formación y funcionamiento de estructuras musculares y óseas en desarrollo de los organismos. El plomo interfiere con el metabolismo del calcio, remplazándolo y comportándose como un segundo mensajero intracelular, alterando la distribución del mismo en los compartimientos dentro de la célula (S.O.S, SF). Este comportamiento de competencia del plomo con el calcio, puede explicar las alteraciones a nivel de columna que presentaron los embriones

(escoliosis, cifosis y lordosis) al estar expuestos a las concentraciones de nitrato de plomo.

La vitamina C (ácido ascórbico) es necesaria para el desarrollo del tejido conectivo, hueso y cartílago, y en casos de deficiencia se produce una curvatura anormal de la columna vertebral de los peces, caracterizada por escoliosis y lordosis en la trucha arcoíris (González, 2004).

La deficiencia de magnesio en trucha arcoíris provoca alteraciones que incluyen reducción de la tasa de crecimiento, curvatura de la columna vertebral y degeneración de las fibras musculares (Lovell, 1998 en González, 2004).

En cuanto a las anomalías presentes en las aletas caudales se pueden relacionar con las malformaciones de la espina dorsal, ya que estos órganos están conectados. Kassenar (1957 en Child, 1985) observó que el plomo produce una interferencia a nivel de cadena alfa. Los disturbios a nivel cromosómico podrían explicar en parte la reabsorción que ocurre en las células de las aletas caudales mediante probables bloqueos enzimáticos causados por los cambios genéticos.

El plomo actúa como mitógeno, estimula la proliferación celular, activando la señal de transducción de la proteína quinasa C (PKC) (Repetto, *et al.*, 2009), que es una enzima dependiente del calcio vinculada con el crecimiento y la diferenciación celular, y la conservación de la barrera hematoencefálica (Matte, 2003). Como consecuencia, se produce aumento de la división celular e hiperplasia (Repetto, *et al.*, 2009), con lo que se explicaría el aumento en el cristalino de los embriones.

9. CONCLUSIONES

Las cinco concentraciones (ppm) de nitrato de plomo, provocaron letalidad y anomalías a nivel morfológico en el desarrollo embrionario de *Oncorhynchus mikiss*.

Las concentraciones de 0.5 ppm, 1 ppm y 3 ppm de nitrato de plomo son dosis letales (DL50) para los embriones de *O. mikiss*, mientras que las dosis de 0.1 ppm y 0.05 ppm son dosis subletales, demostrando que la mortalidad está relacionada con las dosis aplicadas.

El porcentaje de la mortalidad de embriones de *O. mikiss* aumentó al incrementarse las concentraciones de nitrato de plomo, mientras que con las malformaciones no existió esta relación directa, ya que en la menor concentración se presentó la mayoría de alteraciones morfológicas.

El mayor número de malformaciones se presentaron en la dosis de 0,05 ppm, explicando este comportamiento debido al tiempo de exposición al compuesto, y porcentaje de individuos vivos y muertos durante el desarrollo embrionario.

Es probable que el nitrato de plomo afecte órganos vitales internos del embrión de *O. mikiss*, ocasionando su muerte, razón por la cual, resultaría interesante realizar un análisis histológico.

La mayoría de las malformaciones producidas por las concentraciones de nitrato de plomo fueron típicas de determinados estadios del desarrollo embrionario de *O. mikiss*.

Las malformaciones predominantes en todas las concentraciones (ppm) de nitrato de plomo, fueron microcefalia e hipertrofia de aletas.

Las concentraciones (ppm) de nitrato de plomo incidieron en la formación a nivel encefálico de los embriones de *O. mikiss*, ya sea ocasionando microcefalia o hipoplasia. Así mismo, las dosis aplicadas tienen un efecto teratogénico en el desarrollo del ojo de la Trucha arcoíris.

10. RECOMENDACIONES

Realizar el presente estudio a un nivel histológico, con el fin de observar las alteraciones presentes en los órganos internos de *Oncorhynchus mikiss*, a causa del nitrato de plomo, y poder corroborar de igual forma, si estas afectaciones fueron la causa de muerte de algunos embriones, las cuales no se podían determinar macroscópicamente.

Evaluar los efectos toxicológicos del plomo en diversas especies, con el fin de ampliar el conocimiento y comprender el comportamiento de este metal en las mismas, y así mismo, poder determinar las dosis que producen anomalías morfológicas o mortalidad en los organismos expuestos.

Aplicar pruebas de toxicidad en diferentes niveles organizacionales de los seres vivos, utilizando otras sustancias químicas de interés ambiental, ya que esto permite complementar y aportar datos que pueden ser utilizados para contribuir a la prevención y control de la contaminación de cuerpos de agua, y a la protección de los organismos que allí habitan.

Evaluar las alteraciones y la tolerancia que presentan los organismos en los primeros estadios de vida, para poder determinar cuáles son los efectos iniciales que experimentan ante una determinada contaminación.

Se sugiere tener en cuenta los datos obtenidos en esta investigación, ya que estos aportan valiosa información a cerca de la toxicidad del plomo en la trucha arcoíris, que podría ser implementada para garantizar la calidad y conservación de esta y otras especies.

11. BIBLIOGRAFÍA

Alarcón, J. C. 1986. Análisis histológico de embriones de *Hyla labialis* expuestos a tres diferentes concentraciones de acetato de plomo. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 15p.

Alarcón, J. & Ardila, L. 2008. Determinación de la concentración letal media (CL50-48) de *Daphnia pulex* por medio de bioensayos de toxicidad acuática con aluminio y plata. Tesis de pregrado. Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería ambiental y sanitaria. Bogotá, Colombia. 30- 31pp.

Bejarano, C. 1983. Estudios histológicos de la embriogénesis en trucha *Salmo gairdneri*, criada en el embalse del Neusa. Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 109p.

Bellot, J.L. SF. Principios de urgencias, emergencias y cuidados críticos. Capítulo 10.8: Intoxicación por productos industriales. Extraído de:
< <http://tratado.uninet.edu/c100804.html> >

Boccio, J., Salgueiro, J., Lysionek, A., Zubillaga, M., Goldman, C., Weill, R. & Caro, R. 2003. Metabolismo del hierro: conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Volumen 53, Número 2.

Botero, J. P. 2006. Identificación y cuantificación de las isoenzimas de L-Lactato: Nad oxido- reductosa (LDH; EC.1.1.1.27) durante el desarrollo embrionario temprano de *Oncorhynchus mykiss* (Walpaum, 1792). Tesis de

pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.

Burden, V; Sandheinrich, M. & Caldwell C. 1998. Effects of lead on the growth and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Environmental Pollution, Volume 101, Issue 2, Pages 285-289.

Burgos, M.E. 1999. Malformaciones encontradas en alevines de salmón del atlántico (*Salmo salar*) provenientes de ovas nacionales e importadas en una piscicultura de la Décima Región, Chile. Tesis de Grado. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile. Pp. 7, 23, 27.

Chaparro, L. 1981. Estudios preliminares sobre la producción intensiva de trucha arco iris (*Salmo gairdneri*, Richardson 1836) en jaulas flotantes en el lago de Tota- Bogotá. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 9p.

Child, M. 1985. Efectos del acetato de plomo en los embriones de *Hyla labialis*. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. Pp. 5-7, 14-15.

Christensen, G. 1975. "Biochemical effects of methylmercuric chloride, cadmium chloride, and lead nitrate on embryos and alevins of the brook trout, *Salvelinus fontinalis*". Toxicol, Appl Pharmacol. 32: 191-197.

Ciudad, M. J. 1998. Estudio de los niveles de plumbemia en la comunidad autónoma de Madrid. Tesis de grado. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de medicina. Madrid, España. 24p.

Cordero, R. D. 2007. Presencia de metales pesados en Trucha (*Salmo trutta* Linnaeus: Salmonidae) en el lago de Tota (Boyacá, Colombia). Trabajo de grado. Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia. 10p.

Corporación Colombia Internacional (CCI). 2009. Sistema de información de precios y mercados para la producción acuícola y pesquera. Trucha arco iris en Colombia: estructura y costos de producción. Boletín semanal Vol. 5, No.13.

Díaz-Baez, M; Bulus, G. & Pica, Y. 2004. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Editora Castillo, G. México. 99p.

Díaz-Báez, M; Bustos, M. & Espinosa, A. (2004). Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 18p.

Enciclopedia Británica. 1911. Lead. Undécima Edición. Encyclopaedia Britannica, Inc.

García J. P. 2002. Estado actual de la contaminación por metales pesados y pesticidas organoclorados en el Parque Natural de Monfragüe. Tesis de doctorado. Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria. Cáceres, España. Pp. 124, 137-139.

González, M. 2004. Determinación de la mortalidad y posibles efectos teratogénos de los antibióticos Enrofloxacino, Eritromicina y de la desinfección con yodo de las ovas de Salmon coho (*Oncorhynchus kisutch*) y

Salmon del atlántico (*Salmo salar*). Tesis de grado. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile. Pp. 22- 24.

Guevara, E. 1997. Estudio embrionario y larval, macroscópico e histológico de *Betta Splendens* (Regan, 1909). Tesis de maestría. Pontificia Universidad Javeriana. . Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.

Hodson, P; Blunt, B; Jensen, D. & Morgan, S. 1979. Effect of fish age on predicted and observed chronic toxicity of lead to rainbow trout in lake Ontario water. Journal Great Lakes Res. 5: 84-89.

Holcombe, G; Benoit, D; Leonard, E. & McKim, J. 1976. Long-term effects of lead exposure on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada. Vol. 33, No. 8, pp. 1731-1741.

Incagro e Inversiones Santa Inés S.A.C. 2008. Sub proyecto de extensión “Mejora de la producción de truchas en Choclococha Santa Inés. Manual para la producción de truchas en jaulas flotantes. Huancavelica, Perú. 23p.

Kinsman, S.L. & Johnston, M.V. 2007. Congenital anomalies of the central nervous system. Edición 18. Editores Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia. 592 p.

Malpartida A. R. 2002. Ecotoxicología y contaminantes. Extraído de:
<<http://teoria.ecologica.googlepages.com/BorradorEcotoxicologa.pdf> >

Matte, T. D. 2003. Efectos del plomo en la salud de la niñez. Salud Pública. México. Vol.45, suplemento 2.

Medina, E, Carbajal, B, Ponce, C, Sandoval, N. & Valladares, E. 2000. Las Porfirias. Revista médica de Honduras. Vol. 68, No. 1.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1979. Criterios de salud ambiental 3: Plomo. Publicación científica N° 388. Washington D.C, E.U.A. Pp. 10, 86- 89.

Osorio, L., Tovar, A. & Guerrero, D. SF. Contaminantes inorgánicos. Capitulo 11: Plomo. Extraído de:
< <http://www.cepis.ops-oms.org/bvstox/fulltext/toxico/toxico-03a11.pdf>>

Pascual, A. 1986. La ZPP como marcador biológico en la detección precoz y diagnosis del saturnismo. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). Ministerio de trabajo y asuntos sociales España.

Pauling, L. 1951. Química general: una introducción a la química descriptiva y a la moderna teoría química. Segunda Edición. Editor Aguilar. Madrid. 460p.

Petrucci, R; Harwood, W. & Herring, F. 2003. Química general. Octava Edición. Pearson Educación S.A. Madrid. 897p.

Posada, M. I & Arroyave, M. 2006. Efectos del mercurio sobre algunas plantas acuáticas tropicales. EIA. ISSN 1794-1237. Número 6, pp. 57-67.

Ramírez, A. 1999. Pruebas de toxicidad. Ecología aplicada: diseño y análisis estadístico. Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Colombia. Pp. 241, 245.

Repetto, M. & Repetto, G. 2009. Toxicología Fundamental. Cuarta edición. Ediciones Díaz de Santos. 265 p.

Roa, J. SF. Causas de pérdida del globo ocular: Microftalmia. Extraído de:
<<http://www.scribd.com/doc/2437580/MICROFTALMIA>>

Robbins, S.L. & Angell, M. 1983. Patología Básica. Segunda edición. Nueva Editorial Interamericana S.A. México D.F. Pp. 10-11, 75

Rodríguez, A; González, J. F. & Suarez, R. 2007. Bioacumulación por metales pesados en el capitán de la sabana (*Eremophilus mutisi*), habitante de la cuenca alta del río Bogotá. Revista electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola. Año II, vol. 2.

Roncero, V; Vecente, J; Redondo, E; Gazquez, A. & Durán, E. 1990. Experimental lead nitrate poisoning: Microscopic and ultrastructural study of the gills of Tench (*Tinca tinca, L*). Environmental Health Perspectives. Vol. 8: 137-144.

Rosado, R. & Erazo, A. 2001. Aspectos básicos para el cultivo de la Trucha arcoíris. Fundamentos de Acuicultura continental. Segunda edición. Instituto Nacional de pesca y acuicultura (INPA). Bogotá, Colombia. 301- 302 pp.

Roses, O. 1995. Toxicología de los alimentos. Primera edición. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 275- 276 pp.

Rubio C; Gutiérrez A.J; Martín R.E; Revert C; Lozano G. & Hardisson A. 2004. El plomo como contaminante alimentario. Revista de Toxicología. Año/vol. 21, número 2-3, pp. 72-80

Saga, A. & Román, C. 1995. Piscicultura: sus bases, métodos y aplicaciones. Editorial Aebug. Armenia, Colombia. 86p.

Salazar, G. 2001. Consideraciones generales sobre la acuicultura. Fundamentos de Acuicultura continental. Segunda edición. Instituto Nacional de pesca y acuicultura (INPA). Bogotá, Colombia. 2p.

Sandoval, M. T., Pérez, C. & Herkovits, J. 2004. Teratogénesis y alteración del desarrollo de embriones de *Bufo arenarum* por exposición al plomo. Reunión de comunicaciones científicas de la Universidad Nacional del Nordeste. Buenos Aires, Argentina. 10p.

Shibamoto, T. & Bjeldanes L. F. 1996. Introducción a la toxicología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 122p.

Skoog, D & West, D. 1986. Introducción a la química analítica. Editorial reverté S.A. Sevilla, España.

Servicios Orientados de Salud (S.O.S). SF. Dependencia Técnica Medicina del Trabajo. Protocolo clínico administrativo para el tratamiento de intoxicación por plomo. Extraído de:

<<https://www.sos.com.co/ArchivosSubidos/Internet/Publicaciones/UMT/Protocolos%20Enfermedades/7-IntoxicacionPorPlomo.pdf>>

Steel, R. & Torrie, J. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. Primera Edición. McGraw- Hill. México. 56p.

Tabche, L; Martinez, C; Sánchez, E. 1990. Comparative study of toxic lead effect on gill and hemoglobin of tilapia fish. Journal of Applied Toxicology. 10 (3): 193-196.

Tovar, M; Contreras L; Caldas M; Rodríguez, D. & Hurtado, H. 2008. Comparación histológica y morfométrica entre el ojo de *eremophilus mutisii* (trichomycteridae) y el de *Oncorhynchus mykiss* (salmonidae). Acta Biológica Colombiana. Vol. 13. No. 2, pp. 73- 88.

Valladares, C; Palomares, S; Vega, C; Aguilar, H; Castro, M; Zamora, E; Ortega, S; Zaragoza, B. & Pedraza, S. 2007. Evaluación del nitrato de plomo en el modelo biológico de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mikiss*). Toluca, México. 102p.

World Health Organization. 1995. Environmental Health Criteria 165. Inorganic Lead. Geneva, Suiza. 29p.