

Efecto embriotóxico, teratogénico y genotóxico en el pez cebra (*Danio rerio*) por exposición a arsénico

Embryotoxic, teratogenic and genotoxic effect in zebrafish (*Danio rerio*) by exposure to arsenic

Marco Antonio Sanchez-Olivares¹✉, Juan Carlos Gaytán-Oyarzun^{1*}, María Estela Pérez-Cruz², Francisco Prieto-García³

Recibido: 31 de marzo de 2021.

Aceptado: 20 de noviembre de 2021.

Publicado: diciembre de 2021.

RESUMEN

Antecedentes. La comprensión del mecanismo de toxicidad del arsénico se ha visto obstaculizada por factores biológicos, químicos, incluida la relación dosis respuesta, la especificidad y sensibilidad de las especies utilizadas en bioensayos de los estudios toxicológicos para comprender su toxicodinámica. **Objetivo.** El propósito del presente estudio fue evaluar el efecto embriotóxico, teratogénico y genotóxico ocasionados por la exposición a arsénico, a través del análisis de frecuencia de malformaciones y micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica en pez cebra. **Métodos.** De manera preliminar, se calculó la curva de toxicidad del arsénico en embriones de pez cebra a partir de exponerlos a concentraciones de entre 0.0031 a 0.05 mg L⁻¹ de arsenito de sodio (NaAsO₂), durante 72 horas para determinar la concentración letal media (CL₅₀) para la prueba de embriotoxicidad y teratogénesis. Para la prueba de genotoxicidad, se realizó previamente el cálculo de la curva de toxicidad con peces cebra adultos que fueron expuestos a concentraciones de entre 0.035 a 0.044 mg L⁻¹ durante 48 horas con la finalidad de establecer la CL₅₀. **Resultados.** Se demostró que el efecto del arsenito de sodio fue estadísticamente positivo para las pruebas de embriotoxicidad y teratogénesis a las concentraciones evaluadas. La exposición al arsenito de sodio ocasionó desarrollo embrionario anormal en cada una de las concentraciones de prueba, además de presentarse malformaciones. Y un incremento en la frecuencia de eritrocitos micronucleados estadísticamente significativa de 0.035, evidenciándose el daño genotóxico del arsénico. **Conclusiones.** Este estudio, demostró que la inducción de anomalías nucleares en los eritrocitos, así como las anomalías en el desarrollo embrionario, son indicadores extremadamente sensibles en el estudio de efectos toxicológicos, y sugieren que el potencial de riesgo de este metaloide debe ser abordado en futuras investigaciones.

Palabras clave: eritrocitos, genotoxicidad, micronúcleos, malformaciones, teratogénesis.

ABSTRACT

Background. Understanding the toxicity mechanism of arsenic has been hampered by biological, chemical factors, including the dose response ratio, the specificity and sensitivity of species used in bioassays from toxicological studies to understand their toxicodynamics. **Goals.** The purpose of this study was to evaluate the embryotoxic, teratogenic and genotoxic effect caused by exposure to arsenic, through the frequency analysis of malformations and micronuclei in peripheral blood erythrocytes in zebrafish. **Methods.** The toxicity curve of arsenic in zebrafish embryos was calculated from exposure to concentrations between 0.0031 and 0.05 mg L⁻¹ of sodium arsenite (NaAsO₂) for 72 hours to determine the mean lethal concentration (LC₅₀) for the embryotoxicity and teratogenesis test. For the genotoxicity test, the calculation of the toxicity curve with adult zebrafish that were exposed to concentrations between 0.035 and 0.044 mg L⁻¹ for 48 hours was previously performed in order to establish LC₅₀. **Results.** The effect of sodium arsenite was shown to be statistically positive for embryotoxicity and teratogenesis tests at the evaluated concentrations. Exposure to sodium arsenite resulted in abnormal embryonic development at each of the test concentrations, in addition to malformations. And a statistically significant increase in the frequency of micronucleated erythrocytes of 0.035, showing genotoxic damage of arsenic. **Conclusions.** This study showed that the induction of nuclear abnormalities in erythrocytes, as well as abnormalities in embryonic development, are extremely sensitive

¹ Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Km 4-5 Carretera Pachuca-Tulancingo, Pachuca, Hidalgo, 42076. México

² Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Km 4-5 Carretera Pachuca-Tulancingo, Pachuca, Hidalgo, 42076. México

³ Facultad de Ciencias, Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 3000, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, 04510. México

*Corresponding author:

Juan Carlos Gaytán-Oyarzun: e-mail: jcgaytan@uaeh.edu.mx

To quote as:

Sanchez-Olivares, M. A., J. C. Gaytán-Oyarzun, M. E. Pérez-Cruz & F. Prieto-García. 2021. Efecto embriotóxico, teratogénico y genotóxico en el pez cebra (*Danio rerio*) por exposición a arsénico. *Hidrobiológica* 31 (3): 221-230.

DOI:10.24275/uam/izt/dcbshidro/2021v31n3/Sanchez

indicators in the study of toxicological effects, and suggest that the risk potential of this metalloide should be tested in future research.

Keywords: erythrocytes, genotoxicity, micronuclei, malformations, teratogenesis.

INTRODUCCIÓN

El arsénico (As), es un metaloide comúnmente presente en el ambiente (Coelho *et al.*, 2012), en la naturaleza puede existir en su forma orgánica e inorgánica, siendo esta última la forma más tóxica y acumulable en organismos expuestos (Liao *et al.*, 2004). Por sus características fisicoquímicas, el As se clasifica como un elemento altamente tóxico, carcinogénico y se encuentra entre los principales contaminantes ambientales a escala global, esta problemática ha sido reportada en varias regiones del mundo (ATSDR, 2007; Iliná *et al.*, 2009; Yamamura & Amachi, 2014). Estudios epidemiológicos han vinculado la exposición a altos niveles de arsénico a una mayor incidencia de cáncer, fibrosis, daño celular, melanosis e hiperqueratosis (Das *et al.*, 2004; Erraguntla *et al.*, 2012), además de daño cardiovascular, diabetes tipo 2 y otras enfermedades metabólicas (Del Razo *et al.*, 2011).

La presencia de arsénico a altas concentraciones desde 50 a 2500 ppm en cuerpos de agua en distintas regiones del mundo, representa una amenaza para la biota y la salud humana (Carbonell-Barrachina *et al.*, 2009), esto último está sustentado en estudios epidemiológicos alrededor del mundo en donde se evidencia la relación de la exposición a este metaloide y sus compuestos a los efectos reportados en humanos (Tchounwou *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009).

La comprensión del mecanismo de toxicidad por arsénico se ha visto obstaculizada por una serie de factores biológicos, químicos y/o situacionales, incluida la relación dosis respuesta, la especificidad y sensibilidad de los tejidos y especies utilizadas en bioensayos y como biomonitores en estudios toxicológicos para comprender su toxicodinámica (Vahter *et al.*, 2007). Diversos estudios han investigado el efecto de este metaloide en organismos acuáticos, entre los que destacan los peces, algunas de las especies utilizadas en estos estudios incluyen a *Oreochromis niloticus* (Ahmed *et al.*, 2011); *Clarias batrachus* (Datta *et al.*, 2009); *Fundulus heteroclitus* (Gaworecki *et al.*, 2012); *Labeo rohita*, *Cirrhina mrigala*, *Catla catla* y *Ctenopharyngodon idella* (Kousar & Javed, 2014). Estos organismos son sensibles para comprender los posibles efectos potenciales de compuestos químicos en los humanos e incluso en el ecosistema (Datta *et al.*, 2009; Ghobadian *et al.*, 2015).

En este contexto, el pez cebra (*Danio rerio*) provee un modelo ideal para estudiar y evaluar dichos efectos, debido a que se conoce ampliamente su fisiología, morfología y genoma, así como por su fácil mantenimiento y reproducción en condiciones de laboratorio y por la gran cantidad de trabajos publicados en revistas científicas y asociaciones especializadas en toxicología y otras áreas afines (Domingues *et al.*, 2010). Sus características, como la fertilización externa, rápido desarrollo embrionario (Zhang *et al.*, 2003; Lieschke & Currie, 2007), transparencia óptica de los embriones, así como por su alta sensibilidad permite la evaluación de riesgos a la salud de compuestos xenobióticos (Hill *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2009). Además, proveen información de los efectos genotóxicos y teratogénicos de los compuestos químicos (Zhu *et al.*, 2004; Domingues *et al.*, 2010; McCollum *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Van-Houcke *et al.*, 2015).

Para comprender el potencial del arsénico de inducir efectos toxicológicos en el pez cebra, se utilizaron los biomarcadores de daño teratogénico a través de malformaciones en columna vertebral y la evaluación de daño genotóxico a través de la estimación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica del pez cebra adulto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento del pez cebra

Se mantuvieron 200 peces cebra (*Danio rerio*) de una edad aproximada de 3 meses, en el Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. Se aclimataron durante un periodo de dos semanas y se mantuvieron en peceras de 70 litros, con una temperatura de 27 ± 1 °C, equipada con un calentador automático de 100 watts y un filtro de 10 watts con una capacidad de 480 L/h modelo AquaJet^{10F}, y características fisicoquímicas óptimas para el desarrollo de los peces (Rivera, 2006), además de un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Durante el periodo de mantenimiento (2 semanas), fueron alimentados 3 veces al día con alimento seco, agregando hojuelas de alimento comercial (Lomas®) con un contenido de proteína cruda de 43%, grasa cruda 5%, fibra cruda 3%, vitamina C 200 mg/kg; eliminando el exceso de alimento para evitar contaminación de hongos y protozoarios (Oberemm, 2000).

Para la reproducción, los peces adultos se colocaron en una pecera de desove de 40 L en proporción 3:2 (48 machos y 32 hembras), equipada con una malla de maternidad. Se mantuvo un total de 48 machos y 32 hembras para inducir una cría masiva de acuerdo al método de producción máxima de embriones (Westerfield, 2007). Los embriones fertilizados fueron transferidos a un cristallizador limpio para evitar la contaminación por heces y restos de alimentos (Gaytán *et al.*, 2008). Los embriones se revisaron usando un microscopio estereoscópico para seleccionar los embriones no fecundados o muertos (Kimmel *et al.*, 1995).

Prueba de embriotoxicidad y teratogenicidad

Se utilizó arsenito de sodio (NaAsO_2) (Sigma-Aldrich, CAS: 7784-46-5) como fuente de arsénico para las pruebas de toxicidad, se preparó una solución stock de 10 g L⁻¹ disolviendo arsenito de sodio en agua con temperatura de 27 ± 1 °C, las soluciones de prueba fueron obtenidas a partir de la dilución de la solución stock, para ello se probaron 10 concentraciones de arsenito de sodio para la prueba de toxicidad: 0.0031, 0.0062, 0.0125, 0.0187, 0.0250, 0.0281, 0.0312, 0.0375, 0.0437 y 0.050 mg L⁻¹.

La prueba de toxicidad fue diseñada de acuerdo a Gaytán *et al.* (2008) para establecer la concentración letal media (CL_{50}), dicha concentración sirvió de criterio para seleccionar concentraciones subletales experimentales ($\text{CL}_{6.25}$, $\text{CL}_{12.5}$, CL_{25}) para la prueba de teratogénesis sin que la toxicidad del compuesto enmascare dichos efectos.

Una vez que la CL_{50} y las concentraciones subletales fueron establecidas, el efecto teratogénico fue evaluado utilizando el biomarcador de daño en columna vertebral (González, 2005; Gaytán *et al.*, 2008). Para ello, se utilizaron 450 embriones por concentración de entre aproximadamente 2-4 horas postfertilización (hpf). Los embriones fertilizados fueron seleccionados y distribuidos en 15 frascos de vidrio de 125 mL con 30 embriones por frasco (Rivera, 2006). Cada frasco contenía

100 mL de solución de arsenito de sodio, correspondiente a las concentraciones 0.007, 0.0015, 0.0023 y 0.039 mg L⁻¹ que equivalen a las CL_{6.25}, CL_{12.5}, CL₂₅, CL₅₀ y un control negativo con 450 embriones en agua libre de contaminante. La exposición al compuesto químico duró hasta la eclosión de los embriones en peceras que se mantuvieron a una temperatura de 27°C±1 y un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El desarrollo de los embriones fue observado directamente en cajas Petri utilizando un microscopio estereoscópico marca Olympus, modelo SD-ILK equipado con un lente auxiliar de 40x. Se analizaron 2250 embriones para la evaluación de la frecuencia de malformaciones.

Frecuencia de malformaciones en la columna vertebral

Para la evaluación de malformaciones, se clasificó de acuerdo al biomarcador de daño en columna vertebral, que consiste en dividir el cuerpo del organismo en tres zonas, para identificar la zona dañada (cefálica, central y caudal) (Fig. 1). El tipo de malformaciones fue clasificado de acuerdo al tiempo de expresión como tempranas (espiral, caudal espiral, escuadra, gancho y ausencia de cuerpo) y tardías (simple, doble, múltiple, curvas y aleta caudal) (González, 2005; Rivera, 2006; Gaytán *et al.*, 2008). Además, se registraron alteraciones morfológicas a nivel cardíaco identificadas como edema del saco vitelino y edema pericárdico.

Prueba de toxicidad y genotoxicidad

La prueba de toxicidad de arsénico en peces cebra adultos se realizó a partir de arsenito de sodio como fuente de arsénico. La solución stock (10 g L⁻¹) se preparó disolviendo arsenito de sodio en agua, las soluciones de prueba fueron obtenidas a partir de la dilución de la solución stock, para ello se utilizaron 10 concentraciones en la prueba de toxicidad en adultos 0.034, 0.035, 0.036, 0.037, 0.038, 0.039, 0.040, 0.041, 0.042, 0.043 y 0.044 mg L⁻¹. En la prueba de toxicidad en adultos de

pez cebra se expusieron 18 peces (6 peces en triplicado por concentración), durante 48 h en matraces Erlenmeyer de 1 L (Scotto *et al.*, 2013), cada uno de los matraces contenía 500 mL de la solución de arsenito de sodio (27°C±1), la prueba de toxicidad se realizó para establecer la concentración letal media (CL₅₀), y se seleccionaron tres concentraciones subletales (CL_{6.25}, CL_{12.5}, CL₂₅), para la prueba de genotoxicidad.

Una vez determinada la CL₅₀ y las concentraciones subletales experimentales, se evaluó el efecto genotóxico del arsénico a través de la inducción de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica. Para ello, 18 adultos (6 adultos en triplicado por concentración), fueron expuestos durante 48 h en matraces Erlenmeyer de 1 L (Scotto *et al.*, 2013). Cada matraz contenía 500 mL de la solución de arsenito de sodio con temperaturas de 27°C±1, correspondiente a las concentraciones proximales de CL_{6.25} (0.007 mg L⁻¹), CL_{12.5} (0.015 mg L⁻¹), CL₂₅ (0.023 mg L⁻¹) y CL₅₀ (0.039 mg L⁻¹) y un grupo control en agua libre de contaminante.

Análisis de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos

La frecuencia de micronúcleos (FMN) en eritrocitos fue evaluada de acuerdo a la metodología sugerida por Scotto *et al.* (2013). La cual consistió en que posterior al periodo de exposición (48 h), los organismos fueron aletargados con 10 mL de solución de bicarbonato de sodio a una concentración de 300 mg L⁻¹, posteriormente fueron sacrificados por decapitación y se colocó una gota de sangre en portaobjetos limpios, se extendió a manera de frotis con otro portaobjetos, y posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos, posteriormente se fijaron en metanol absoluto durante 15 minutos y nuevamente se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente, las muestras fueron teñidas con solución de Giemsa al 10% por 10 minutos, posteriormente se eliminó el excedente por escurrimiento con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente durante 60 minutos.

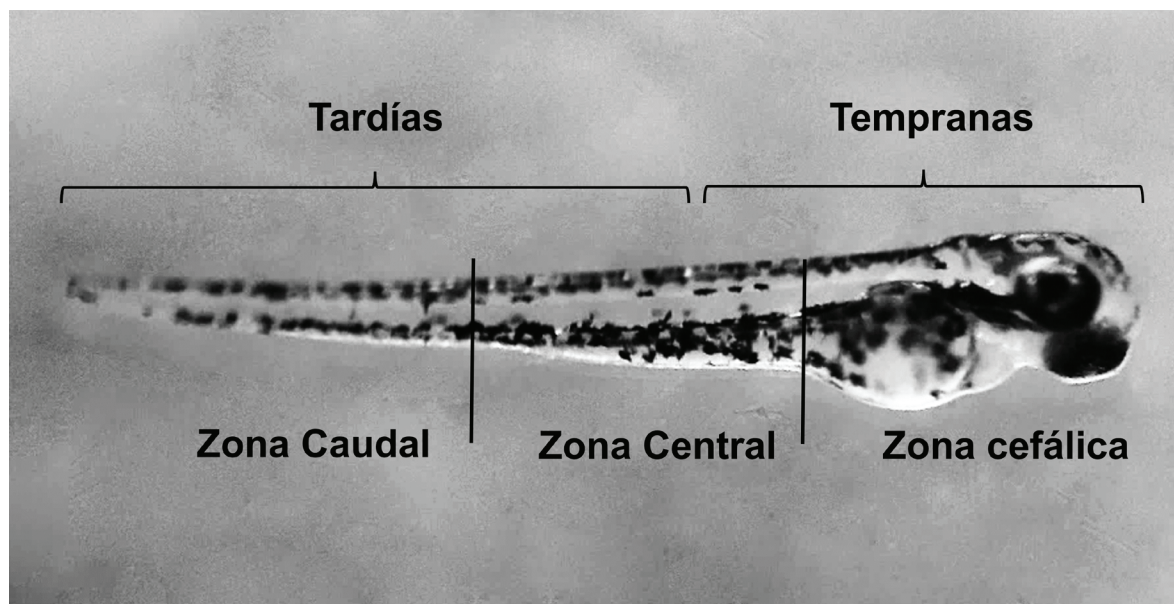


Figura 1. División del cuerpo de *Danio rerio*

En cuanto al análisis, se revisaron un total de 1500 eritrocitos por concentración bajo un microscopio compuesto con aceite de inmersión a una magnificación de 1000x, registrando el número de micronúcleos observados tanto en el grupo control como en los experimentales.

La identificación de micronúcleos (MN) fue de acuerdo a los criterios establecidos por Palhares & Koppe (2002):

- el diámetro de los MN debe ser de al menos un tercio del tamaño del núcleo principal
- los MN deben estar separados del núcleo principal
- el MN debe tener una tinción similar al núcleo principal

El cálculo de la frecuencia de micronúcleos se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$FMN = \text{Número de micronúcleos} / \text{Número de células analizadas}$$

Análisis estadístico

Los valores de la CL_{50} para de las pruebas de teratogénesis y genotoxicidad fueron estimados mediante la prueba de Probit en el programa Statistica V10 (IBM Corp. Released, 2017). Mientras que, para el análisis de los efectos teratogénicos y genotóxicos, se realizó una prueba de χ^2 con los datos de frecuencia de malformaciones en columna vertebral y la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica para identificar diferencias significativas entre tratamientos.

RESULTADOS

Prueba de embriotoxicidad y teratogenicidad

La prueba Probit estimó la CL_{50} en 0.039 mg L⁻¹ con límite inferior de 0.033 mg L⁻¹ y límite superior de 0.046 mg L⁻¹ para la prueba de embriotoxicidad, a partir de esta, se probaron tres concentraciones su-

bletales experimentales para los tratamientos de teratogénesis CL_{25} (0.023 mg L⁻¹), $CL_{12.5}$ (0.015 mg L⁻¹), $CL_{6.25}$ (0.007 mg L⁻¹). El porcentaje de mortalidad aumentó a medida que la concentración de arsenito de sodio incrementaba (Tabla 1). Para evaluar los efectos teratogénicos potenciales del arsenito de sodio en el desarrollo embrionario de *Danio rerio*, se examinó la morfología de los embriones con un microscopio estereoscópico a las 72 hpf. La morfología de los embriones en el grupo control mostró un desarrollo normal en la columna vertebral (Kimmel *et al.*, 1995). Los embriones expuestos a concentraciones de 0.007 mg L⁻¹ presentaron cuatro tipos de malformaciones identificadas como sencilla, doble, múltiple y curva, en un tiempo de expresión tardío. En la concentración 0.015 mg L⁻¹ se observaron cinco tipos de malformaciones, en tiempo de expresión temprano (ausencia de cuerpo) y tardía (sencillas, dobles, curvas y aleta caudal). En la concentración 0.023 mg L⁻¹, seis tipos de malformaciones fueron detectadas, en tiempo de expresión temprana se presentó la malformación de ausencia de cuerpo, mientras que en el tiempo de expresión tardía se presentaron las malformaciones sencillas, dobles, curvas, múltiples y de aleta caudal. En la concentración más alta de 0.039 mg L⁻¹ se presentó la malformación en espiral en tiempo de expresión temprana, y en el tiempo de expresión tardía las malformaciones sencilla, doble, múltiple, curva y aleta caudal. Posterior a la exposición (72 horas), algunos embriones tuvieron otro tipo de anomalías identificadas como edema pericárdico y del saco vitelino (Fig. 2).

De acuerdo a la prueba de χ^2 , las concentraciones probadas CL_{50} , CL_{25} , $CL_{12.5}$, $CL_{6.25}$ en cada uno de los tratamientos, mostraron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos y el grupo control, confirmando el efecto teratogénico del compuesto (Tabla 2). De acuerdo al tiempo de expresión de las malformaciones, las malformaciones tardías fueron más frecuentes en comparación con las malformaciones tempranas (Fig. 3)

El arsenito de sodio ocasionó un incremento en la frecuencia de malformaciones en los embriones de pez cebra con respecto a la dosis de exposición, mostrando una relación dosis-respuesta.

Prueba de toxicidad y genotoxicidad

La prueba de Probit estimó la CL_{50} en 0.040 mg L⁻¹ con límite inferior de 0.039 mg L⁻¹ y límite superior de 0.041 mg L⁻¹ en la prueba de toxicidad en adultos de *Danio rerio*. En la prueba de genotoxicidad los resultados obtenidos revelaron que la frecuencia de micronúcleos se incrementó respecto a la concentración de arsenito de sodio, mostrando una relación dosis-respuesta (Fig. 3). Se observaron diferencias significativas en la prueba de χ^2 ($P < 0.0001$) (Tabla 3) entre el grupo control y los organismos expuestos al arsénico. En cada una de las concentraciones probadas, se registraron eritrocitos micronucleados, la frecuencia de micronúcleos en la concentración más alta (0.040 mg L⁻¹), correspondiente a la CL_{50} fue de 0.035, mientras que en la concentración más baja (0.034 mg L⁻¹) que corresponde a la $CL_{6.25}$ se registró una frecuencia de micronúcleos de 0.008. Para las concentraciones 0.035 y 0.037 mg L⁻¹ correspondientes a las $CL_{12.5}$ y CL_{25} , se obtuvo una frecuencia de micronúcleos de 0.014 y 0.02 respectivamente.

Como se muestra en la tabla 3, la frecuencia de micronúcleos aumentó significativamente conforme se incrementó la concentración de arsenito de sodio (Fig. 4).

Tabla 1. Valores obtenidos de dosis-respuesta a partir de un ensayo de 72 horas con embriones de *Danio rerio* del pez cebra expuestos a diferentes concentraciones de arsenito de sodio. *n*: número de embriones, S: Desviación estándar.

Concentración (mg L ⁻¹)	<i>n</i>	Mortalidad	Mortalidad %	Media ± S
0.0500	60	41	68.33	13.66 ± 13.31
0.0437	60	42	70	14 ± 10.58
0.0375	60	28	46.67	9.33 ± 10.70
0.0312	60	30	50	10 ± 9.53
0.0281	60	24	40	8 ± 12.12
0.0250	60	27	45	9 ± 9.64
0.0187	60	16	26.67	5.33 ± 6.80
0.0125	60	13	21.67	4.33 ± 4.93
0.0062	60	9	15	3 ± 5.19
0.0031	60	8	13.33	2.66 ± 3.78
Control	60	1	1.66	0.33 ± 0.57



Figura 2. Malformaciones en columna vertebral en *Danio rerio*. EP: edema pericárdico; ESV: edema del saco vitelino; A) embrión con desarrollo normal; b) malformación en espiral (0.039 mg L^{-1}); c) malformación de ausencia de cuerpo con edema pericárdico y del saco vitelino (0.023 mg L^{-1}); d) malformación sencilla (0.007 mg L^{-1}); E) malformación doble con edema pericárdico y del saco vitelino (0.023 mg L^{-1}); F) malformación múltiple (0.007 mg L^{-1}); G) malformación curva con edema del saco vitelino (0.015 mg L^{-1}); H) malformación aleta caudal con edema del saco vitelino (0.015 mg L^{-1}).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se evaluaron los efectos teratogénicos y genotóxicos del arsenito de sodio en el desarrollo embrionario y eritrocitos de sangre periférica del pez cebra (*Danio rerio*). El arsénico es un metaloide clasificado como teratígeno y carcinógeno que ocasiona efectos adversos en vertebrados. Los resultados del presente estudio

corroboran lo establecido por investigaciones realizadas en las últimas dos décadas en la evaluación de efectos teratogénicos (Prieto-García *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2011; Adeyemi *et al.*, 2015) y efectos genotóxicos inducidos por la exposición a dicho metaloide (Yadav & Trivedi, 2009; Kumar *et al.*, 2013; Kousar & Javed, 2014; Sayed *et al.*, 2015).

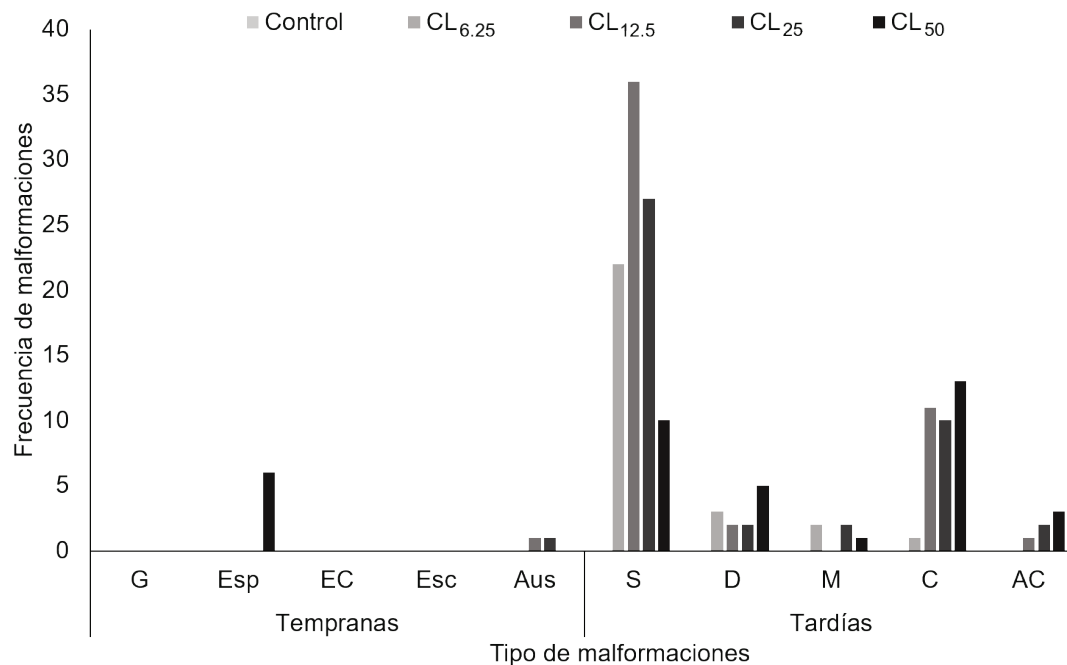


Figura 3. Frecuencia de malformaciones a las 72 hpf de exposición al arsenito de sodio. G: gancho; Esp: espiral; EC: espiral caudal; Esc: escuadra; Aus: ausencia de cuerpo; S: simple; D: doble; M: múltiple; C: curva; AC: aleta caudal.

En la prueba de embriotoxicidad, la mortalidad resultó ser proporcional al incremento en las concentraciones de prueba, corroborando lo establecido en estudios previos del efecto letal del arsénico en embriones de *Danio rerio* (Prieto-García *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2011; Adeyemi *et al.*, 2015). El valor de la CL_{50} -72h para la prueba de teratogénesis se estableció en 0.039 mg L^{-1} , y según los resultados de esta prueba, los embriones expuestos a concentraciones de 0.023 mg L^{-1} , presentaron malformaciones como ausencia de cuerpo, sencilla, dobles, múltiples, curvas y de aleta caudal; en la concentración 0.039 mg L^{-1} se observaron las malformaciones espiral, sencillas, dobles, múltiples, curvas y de aleta caudal. Mientras que los embriones expuestos a 0.007 mg L^{-1} mostraron malformaciones sencillas, dobles,

múltiples y curvas y en la concentración 0.015 mg L^{-1} se observaron las malformaciones de ausencia de cuerpo, sencillas, dobles, curvas y de aleta caudal con respecto a las establecidas en los tipos de daño en columna vertebral (Gaytán *et al.*, 2008), las malformaciones fueron aún más severas en las concentraciones de prueba más altas de arsenito de sodio (0.039 mg L^{-1}), corroborando lo establecido por Gaworecki *et al.* (2012) y Sfakianakis *et al.* (2015) quienes establecen que algunas de las anomalías más comunes ocasionadas por sales de arsénico, ocurren en el desarrollo embrionario, afectando la formación de la columna vertebral. Así mismo, en cada una de las concentraciones de prueba se presentó una gran incidencia de edemas pericárdico y del saco vitelino.

Tabla 2. Frecuencia de malformaciones observadas en los tratamientos con arsenito de sodio. *n*: número de embriones; *S*: Desviación estándar; G: gancho; Esp: espiral; EC: espiral caudal; Esc: escuadra; Aus: ausencia de cuerpo; S: simple; D: doble; M: múltiple; C: curva; AC: aleta caudal. * χ^2 prueba corregida por X_{1+1}^2 ; (+) positivo.

Concentración (mg L ⁻¹)	<i>n</i>	Media ± <i>S</i>	Malformaciones en la columna vertebral										
			Tempranas					Tardías					
			G	Esp	EC	Esc	Aus	S	D	M	C	AC	Total
CL (0.039)*	450	9 ± 4.66	0	6+	0	0	0	10+	5+	1+	13+	3+	74+
CL ⁵⁰ (0.023)*	450	4.4 ± 8.49	0	0	0	0	1+	27+	2+	2+	10+	2+	61+
CL ²⁵ (0.015)*	450	5.1 ± 11.37	0	0	0	0	1+	36+	2+	0	11+	1+	24+
CL ^{12.5} _{6.25} (0.007)*	450	2.8 ± 6.83	0	0	0	0	0	22+	3+	2+	1+	0	16
Control H O ₂	450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total			0	6	0	0	2	95	12	5	35	6	161

De manera similar, Adeyemi *et al.* (2015), reporta anomalías en columna como escoliosis, retardo en crecimiento, y la formación de edemas en pericárdico y en saco vitelino. Muchos estudios en pez cebra han reportado la presencia de edemas (pericárdico y en saco vitelino) en embriones expuestos a diferentes compuestos químicos (Hill *et al.* 2005; Raldúa *et al.*, 2008; Ghobadian *et al.*, 2015); estos compuestos pueden ocasionar fugas en los vasos endoteliales provocando disfunciones cardiovasculares derivando en edemas pericárdicos (Hallare *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2011). En el caso de los edemas del saco vitelino podrían ser ocasionados por un desarrollo anormal en el vitelo por un suministro nutricional deficiente en los embriones (Raldúa *et al.*, 2008). En la evaluación de efectos teratogénicos la presencia de edemas pericárdicos y edemas del saco vitelino representan una asociación, ya que suelen ocurrir en estudios de exposición a compuestos químicos.

El potencial genotóxico del arsénico ha sido reportado anteriormente por diversos autores (Yadav & Trivedi, 2009; Ahmed *et al.*, 2011;

Kummar *et al.*, 2013; Kousar & Javed, 2014; Sayed *et al.*, 2015), y para determinar el efecto genotóxico, la prueba de micronúcleos (MN) es una herramienta sensible y muy utilizada para evaluar ruptura y daño cromosómico (Fenech, 2002), además pueden analizarse en diferentes tipos de células, entre los que se encuentran los eritrocitos (Bolognesi & Hayashi, 2011; Bolognesi *et al.*, 2006). En este estudio, se evaluó el efecto genotóxico del arsenito de sodio sobre eritrocitos de sangre periférica del pez cebra (*Danio rerio*) y se demostró que la frecuencia de micronúcleos se incrementó de manera proporcional a la concentración de arsenito de sodio suministrado (Tabla 3). Del mismo modo, Kousar & Javed (2014), determinaron el efecto genotóxico del arsénico en eritrocitos de sangre periférica en cuatro especies de peces: *Labeo rohita*, *Cirrhina mrigala*, *Catla catla* y *Ctenopharyngodon idella*, y observaron un aumento significativo en el daño al ADN dependiente de la concentración de arsénico suministrado.

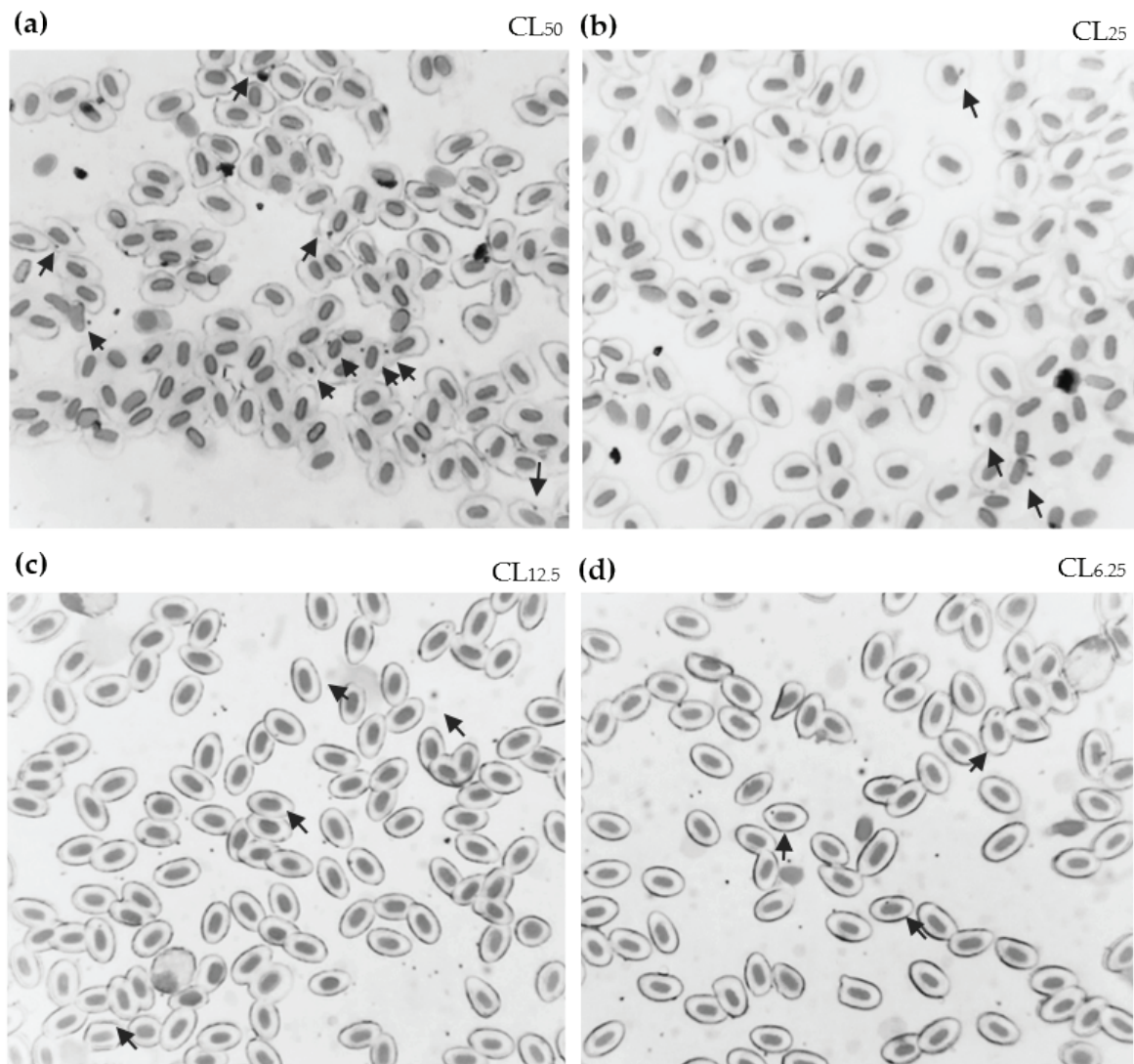


Figura 4. Microfotografía de frotis sanguíneo del pez cebra expuesto a concentraciones de arsenito de sodio durante 48 horas (a) CL₅₀; (b) CL₂₅; (c) CL_{12.5}; (d) CL_{6.25}.

Tabla 3. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica del pez cebra. FMN: frecuencia de micronúcleos; CL: concentración letal. *X² prueba corregida por X₁⁺; (+) positivo.

Concentración (mg L ⁻¹)	CL	Media ± S	FMN
Control	-	0	0
*0.034	CL _{6.25}	4±1	0.008+
*0.035	CL _{12.5}	7.3±0.57	0.014+
*0.037	CL ₂₅	10±1	0.020+
*0.040	CL ₅₀	17.66±6.11	0.035+

Durante el presente estudio, en la concentración experimental más alta de arsenito de sodio correspondiente a la CL₅₀ (0.040 mg L⁻¹) se presentó una FMN de 0.035/1500 eritrocitos. De manera similar, Yadav & Trivedi (2009) reportaron una FMN de 8.83-10.33/1000 células en una concentración de 6.936 mg L⁻¹ de trióxido de arsénico. Las concentraciones de prueba en el presente estudio son inferiores a las reportadas por Yadav & Trivedi (2009), sin embargo, estos autores establecen que la formación de micronúcleos en pez cebra se induce significativamente incluso a bajas concentraciones.

CONCLUSIÓN

En este estudio, se demostró que en el pez cebra el arsenito de sodio a las concentraciones experimentales de 0.007, 0.0015, 0.0023 y 0.039 mg L⁻¹, ocasiona embriotoxicidad, anomalías en columna vertebral durante el desarrollo embrionario, incluyendo efectos edemas pericárdicos, en saco vitelino y daño en el material genético, ya sea por efectos clastogénicos o aneuploidegénos (micronúcleos). Estos resultados demuestran la sensibilidad del pez cebra como un modelo experimental sensible y excelente en la evaluación del efecto teratogénico y genotóxico en la exposición al arsénico. El presente estudio provee datos para comprender efectos del arsénico, pero se requiere mayor énfasis en su toxicocinética y toxicodinámica en futuras investigaciones.

REFERENCIAS

- ADEYEMI, J.A., A. DA CUNHA MARTINS-JUNIOR & F. BARBOSA. 2015. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (Danio rerio) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 172-173:7-12. DOI:10.1016/j.cbpc.2015.04.001
- AHMED, M.K., M. HABIBULLAH-AL-MAMUN, M.A. HOSSAIN, M. ARIF, E. PARVIN, M.S. AKTER & M.M. ISLAM. 2011. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere* 84(1):143-149. DOI:10.1016/j.chemosphere.2011.02.025
- ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES & DISEASE REGISTRY). 2007. Toxicological profiles for arsenic. Departamento de Salud y de Servicios Humanos de EUA, Servicio de Salud Pública, Atlanta, Georgia. 493 p. Also available at: Página electrónica (www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp2.pdf).
- BOLOGNESI, C. & M. HAYASHI. 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26(1): 205213. DOI:10.1093/mutage/geq073
- BOLOGNESI, C., E. PERRONE, P. ROGGERI, D. PAMPANIN & A. SCIUTTO. 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish Exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology* 78(1):93-98.
- CARBONELL-BARRACHINA, A.A., A.J. SIGNES-PASTOR, L. VAZQUEZ-ARAFILLO, F. BURLO & B. SEN GUPTA. 2009. Presence of arsenic in agricultural products from arsenic-endemic areas and strategies to reduce arsenic intake in rural villages. *Molecular Nutrition and Food Research* 53(5):531-541. DOI:10.1002/mnfr.200900038
- COELHO, P., S. COSTA, S. SILVA, A. WALTER, J. RANVILLE, A.C.A. SOUSA, C. COSTA, M. COELHO, J. GARCÍA-LESTÓN, M.R. PASTORINHO, B. LAFFON, E. PASARO, C. HARRINGTON, A. TAYLOR & J.P. TEIXEIRA. 2012. Metalloid levels in biological matrices from human populations exposed to mining contamination – Panasqueira mine (Portugal). *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 75(13-15):893-908. DOI:10.1080/15287394.2012.690705
- DAS, R.K., A.K. MITRA, P.K. SENGUPTA, A. HOSSAIN, F. ISLAM & G.H. RABBANNI. 2004. Arsenic concentration in rice, vegetables and fish in Bangladesh: a preliminary study. *Environmental International* 30(3):383-387. DOI:10.1016/j.envint.2003.09.005
- DATTA, S., D. GHOSH, D.R. SAHA, S. BHATTACHARYA & S. MAZUMDER. 2009. Chronic exposure to low concentration of arsenic is immunotoxic to fish: role of head kidney macrophages arsenic biomarkers of arsenic toxicity to *Clarias batrachus*. *Aquatic toxicology* 92(2):86-94. DOI:10.1016/j.aquatox.2009.01.002
- DEL RAZO, L., G. GARCIA-VARGAS, O. VALENZUELA, E. CASTELLANOS, L. SANCHEZ-PENA, J. CURRIER, Z. DROBNA, D. LOOMIS & M. STYBLO, M. 2011. Exposure to arsenic in drinking water is associated with increased prevalence of diabetes: a cross-sectional study in the Zimapan and Lagunera regions in Mexico. *Environmental Health* 10:73. DOI:10.1186/1476-069X-10-73
- DOMINGUES, I., R. OLIVEIRA, J. LOURENÇO, C. GRISOLIA, S. MENDO & A. SOARES. 2010. Biomarkers are a tool to assess chromium effects (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 152(3):338-345. DOI:10.1016/j.cbpc.2010.05.010
- ERRAGUNTIA, N.K., R.L. SIELKEN, C. VALDEZ-FLORES & R.L. GRANT. 2012. An updated inhalation unit risk factor for arsenic and inorganic arsenic compounds based on a combined analysis of epidemiology studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 64(2):329-341. DOI:10.1016/j.yrtph.2012.07.001
- FENECH, M. 2002. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology* 181-182:411-416. DOI:10.1016/s0300-483x(02)00480-8
- GAWORECKI, K.M., R.W. CHAPMAN, M.G. NEELY, A.R. D'AMICO & L.J. BAIN. 2012. Arsenic to killifish during embryogenesis alters muscle develop-

- ment. *Toxicological Sciences* 125(2):522-531. DOI:10.1093/toxsci/kfr302
- GAYTÁN O.J.C., L. L. GONZÁLEZ, G. PULIDO-FLORES, S. MONKS, A.J. GORDILLO-MARTÍNEZ, R.B.E. CABRERA-CRUZ & E. PÉREZ-CRUZ. 2008. Evaluación de la calidad del agua en la reserva de la biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México, a través de la inducción de malformaciones en columna vertebral en pez cebra (*Danio rerio* Hamilton, 1982). In: Pulido-Flores, G., A.L. López-Escamilla & M.T. Pulido-Silva (eds.). *Estudios biológicos en las áreas naturales del Estado de Hidalgo. Núm. 7*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México, pp. 117-124.
- GHOBIAN, M., M. NABIUNI, K. PARIVAR, M. FATHI & J. PAZOOKI. 2015. Toxic effects of magnesium oxide nanoparticles on early developmental and larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122:260-267. DOI:10.1016/j.ecoenv.2015.08.009
- GONZÁLEZ, L.L. 2005. Evaluación del efecto del cloruro de mercurio (HgCl₂) en la inducción de malformaciones de columna vertebral del pez cebra (*Danio rerio* Hamilton, 1982) durante diferentes etapas del desarrollo embrionario. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca. Hidalgo, México. 94 p.
- HALLARE, A., K. NAGEL, H.R. KOHLER & R. TRIEBSKORN. 2006. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63(3):378-388. DOI:10.1016/j.ecoenv.2005.07.006
- HILL, A.J., H. TERAOKA, W. HEIDEMAN & R.E. PETERSON. 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86(1):6-19. DOI:10.1093/toxsci/kfi110
- IBM CORP. RELEASED. 2017. IBM SPSS for Windows. Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- ILINÁ, A., J. MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, E. SEGURA-CENICEROS, J. VILLARREAL-SÁNCHEZ & K. GREGORIO-JAUREGUI. 2009. Biosorción de arsénico en materiales derivados de maracuyá. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 25(4):201-216.
- KIMMEL, C.B., W.W. BALLARD, S.R. KIMMEL, B. ULLMANN & T.F. SCHILLING. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203:252-310. DOI:10.1002/aja.1002030302
- KOUSAR, S. & M. JAVED. 2014. Assessment of DNA damage in peripheral blood erythrocytes of fish exposed to arsenic under laboratory conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(11):877-888.
- KUMMAR, A., P.K. VIBUDH & K.K. PARIMAL. 2013. Fish micronucleus assay to assess genotoxic potential of arsenic at its guideline exposure in aquatic environment. *Biometals* 26:337-346. DOI:10.1007/s10534-013-9620-8
- LI, D., C. LU, J. WANG, W. HU, Z. CAO, D. SUN, H. XIA & X. MA. 2009. Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquatic Toxicology* 91(3):229-237. DOI:10.1016/j.aquatox.2008.11.007
- LI, Y., F. YANG, Z. CHEN, L. SHI, B. ZHANG, J. PAN, X. LI, D. SUN & H. YANG. 2014. Zebrafish on a chip: a novel platform for real-time monitoring of drug-induced developmental toxicity. *PLoS One* 9(4):1-8. DOI:10.1371/journal.pone.0094792
- LIAO, C.M., J.W. TSAI, M.P. LING, H.M. LAIN, Y.H. CHOU & P.T. YANG. 2004. Organ-specific toxicokinetics and dose-response of arsenic in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Archives of Environment Contamination and Toxicology* 47(4): 502-10. DOI:10.1007/s00244-004-3105-2
- LIESCHKE, G.J. & P.D. CURRIE. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature* 8(5):353-367. DOI:10.1038/nrg2091
- MCCOLLUM, C.W., N.A. DUCHARME, M. BONDESSON & J. GUSTAFSSON. 2011. Developmental toxicity screening in zebrafish. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today Reviews* 93(2):67-114. DOI:10.1002/bdrc.20210
- OBERRAMM, A. 2000. The use of a refined zebrafish embryo bioassay for the assessment of aquatic toxicity. *Lab Animal* 29(7):32-40.
- OLIVEIRA, R., I. DOMINGUES, C.K. GRISOLIA & A.M. SOARES. 2009. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environmental Science and Pollution Research International* 16(6):679-688. DOI:10.1007/s11356-009-0119-3
- PALHARES, D. & G. C. KOPPE. 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology* 25(3):281-284. DOI:10.1590/S1415-47572002000300005
- PRIETO-GARCÍA, F., O.A. BÁEZ-RAMÍREZ, S. MONKS, J.C. GAYTÁN-OYARZÚN & A. ZÚÑIGA-ESTRADA. 2006. Acumulación, toxicidad y teratogénesis provocada por presencia de arsénico en aguas en el pez cebra (*Danio rerio*). *AquaTIC: Revista Electrónica de Acuicultura* 24:72-85.
- RALDÚA, D., M. ANDRÉ & P. J. BABIN. 2008. Clofibrate and gemfibrozil induce an embryonic malabsorption syndrome in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 228(3):301-314. DOI:10.1016/j.taap.2007.11.016
- RIVERA, I. 2006. Determinación de la frecuencia de malformaciones en columna vertebral, opérculo y aleta en *Danio rerio* Hamilton, 1822, como posibles bioindicadores en la valoración de daño teratogénico. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 73 p.
- SAYED, A.H., H.A.M. ELBAGHDADY & E. ZAHARAN. 2015. Arsenic-induced genotoxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*); the role of *Spirulina platensis* extract. *Environmental Monitoring and Assessment* 187(12):751. DOI: 10.1007/s10661-015-4983-7
- SCOTTO, C., J. ÁLVAREZ, C. LLANOS, O. LEYVA, S. SOTOMAYOR, K. CHÁVEZ, E. JUSTO, O. CASSO, C. LARICO, W. MAYTA & W. SANGA. 2013. Análisis genotóxico de muestras de agua del río Ramis (Departamento de Puno, Perú) utilizando eritrocitos de la sangre periférica del pez Cebra (*Danio rerio*). *Catedra Villareal* 1(1):23-26.
- SFAKIANAKIS, D.G., E. RANIERI, M. KENTOURI & A.M. TSATSAKIS. 2015. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: a review. *Environmental Research* 137:246-255. DOI:10.1016/j.envres.2014.12.014
- STATSOFT INC. 2011. STATISTICA (data analysis software system). Version 10. www.statsoft.com

- TCHOUNWOU, P.B., J.A. CENTENO. & A.K. PATLOLLA. 2004. Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis – a health risk assessment and management approach. *Molecular and Cellular Biochemistry* 255(1-2):47-55. DOI:10.1023/b:mcbi.0000007260.32981.b9
- VAN-HOUCKE, J., L. DE GROEF, E. DEKESTER & L. MOONS. 2015. The zebrafish as a gerontology model in nervous system aging, disease, and repair. *Ageing Research Reviews* 24(Pt B):358-368. DOI:10.1016/j.arr.2015.10.004
- VAHTER, M., A. ÅKESSON, C. LIDÉN, S. CECCATELLI & M. BERGLUND. 2007. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environmental Research* 104(1):85-95. DOI:10.1016/j.envres.2006.08.003
- WESTERFIELD, M. 2007. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, Oregon. 385 p.
- YADAV, K.K. & S.P. TRIVEDI. 2009. Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. *Chemosphere* 77(11):1495-500. DOI:10.1016/j.chemosphere.2009.10.022
- YAMAMURA, S. & S. AMACHI. 2014. Microbiology of inorganic arsenic: From metabolism to bioremediation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118(1):1-9. DOI:10.1016/j.jbiosc.2013.12.011
- YANG, F., Z. CHEN, J. PAN, X. LI, J. FENG & H. YANG. 2011. An integrated microfluidic array system for evaluating toxicity and teratogenicity of drugs on embryonic zebrafish developmental dynamics. *Biomicrofluidics* 5(2):24115. DOI:10.1063/1.3605509
- YU, Y.L., H.L. LI, Y.C. WANG & X.G. QIAO. 2011. The effect of thiram on heart development of zebrafish embryos. *Journal of Inner Mongolia University for Nationalities* 3:1-7.
- ZHANG, C., C. WILLETT & T. FREMGEN. 2003. Zebrafish: an animal model for toxicological studies. *Current Protocols in Toxicology* 1:1.7.1-11.0.2. DOI:10.1002/0471140856.tx0107s17
- ZHU, Y., J. WANG, Y. BAI & R. ZHANG. 2004. Cadmium, chromium, and copper induce polychromatocyte micronuclei in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72(1):78-86. DOI:10.1007/s00128-003-0243-6