



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Alteraciones en el desarrollo embrionario del
pez cebra por exposición a muestras del Río
Atoyac y descargas industriales**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Soledad Solis Angeles



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Rodolfo Omar Arellano Aguilar

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos de alumno

Solis
Ángeles
Soledad
56091614
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
305159645

2. Datos del tutor

Dr.
Rodolfo Omar
Arellano
Aguilar

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Rafael
Camacho
Carranza

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Jorge Humberto
Limón
Pacheco

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Patricia
Ramos
Morales

6. Datos sinodal 4

Jesús
Chimal
Monroy

7. Datos del trabajo escrito

Alteraciones en el desarrollo embrionario del pez cebra por exposición a muestras del Río
Atoyac y descargas industriales
97p
2013

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de la Doctora Regina Montero Montoya, del Departamento de Toxicología Ambiental y Medicina Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Índice

	Página
Resumen	1
I. Introducción	2
Contaminación en cuerpos de agua	2
Descargas industriales	4
Contaminación de ríos y efectos a la salud	5
La problemática del agua en México	6
El biomonitoreo como una herramienta en sitios contaminados	7
El pez cebra como modelo en Toxicología y Embriología	8
II. Hipótesis	12
III. Objetivo	12
Objetivos particulares	12
IV. Zona de estudio	13
V. Materiales y método	16
Trabajo de campo	16
Colecta de muestras de agua y evaluación de parámetros físico-químicos	16
Evaluación de parámetros químicos en muestras de agua	18
Colecta de embriones de pez cebra	21
Estimación de Dilución Letal 50 (DL ₅₀)	22
Ensayo de alteraciones en el desarrollo embrionario	23
Registro de alteraciones en el desarrollo embrionario	24
Frecuencia cardiaca media (<i>fc</i>)	24
Análisis Estadístico	26
Diagramas de Flujo	26

Índice

	Página
VI. Resultados	28
Análisis de calidad de agua	28
Dilución Letal 50 (DL ₅₀)	31
Alteraciones en el desarrollo embrionario.....	33
Retraso en el desarrollo embrionario.....	36
Edema de Saco Vitelino (ESV) a las 24 hpf	38
Alteraciones en formación de somitas a las 24 hpf.....	41
Alteraciones en formación de cabeza a las 24 hpf.....	43
Alteraciones en formación de región caudal a las 72hpf.....	45
Análisis de Frecuencia cardiaca media (<i>fc</i>).....	48
VII. Discusión	50
VIII. Conclusiones	60
IX Recomendaciones	61
X. Referencias	62
Anexo I Formato de registro para alteraciones en el desarrollo embrionario.....	69
Anexo II Catálogo de malformaciones.....	70

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias, UNAM por brindarme la oportunidad de crecer y desarrollarme en mi formación profesional.

A la Dra. Regina D. Montero Montoya del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental IIB-UNAM, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, así como por el apoyo y confianza para el desarrollo de este proyecto.

A mi tutor Dr. Omar Arellano-Aguilar te agradezco de manera especial por la confianza que depositaste en mí para el desarrollo de este proyecto. Sin tu apoyo y dirección este trabajo no se hubiera culminado.

A los miembros de mi comité Dr. Camacho, Dr. Chimal, Dr. Limón y Dra. Ramos por tomarse el tiempo de revisar este trabajo y realizar los comentarios pertinentes para mejorar y enriquecer este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio: Eunice, Fer, Karen Nancy Pau, gracias por su apoyo *emocional-científico*. Así como a Javier y Toño que además fueron aventureros y participaron voluntariamente en el muestreo. A Luis por el apoyo técnico brindado durante el proyecto.

A Alejandra Méndez del Centro Fray Julián Garcés de Derechos Humanos de Tlaxcala, Eduardo Morales del Instituto de Derechos Humanos "Ignacio Ellacuría S.J." de la UIBP, por su apoyo durante la colecta de las muestras.

Agradezco al final de este trabajo a mi familia especialmente a mis papás (Canela y Mimi) y a la Rata por su paciencia y apoyo incondicional, sin ustedes este y otros objetivos en mi vida simplemente no existirían ¡*Gracias por ser los mejores!*

Resumen

En una descarga industrial pueden encontrarse más de 200 sustancias químicas diferentes que interactúan entre sí formando mezclas complejas, lo que representa un riesgo para el ambiente y la salud. La sensibilidad en modelos en etapas tempranas de desarrollo es una herramienta útil para el estudio de efectos adversos a la salud principalmente en etapas vulnerables como el desarrollo embrionario. La evaluación de daño teratogénico es teratogénesis se propone como una herramienta para el estudio el estudio de efectos adversos a la salud por contaminantes en ambientes. Así el modelo de pez cebr ha comenzado a implementarse como modelo de biomonitorio ambiental. El río Atoyac en la zona industrial Puebla-Tlaxcala, recibe cerca de 23 descargas industriales, y en su cauce han sido identificadas 77 sustancias químicas con distintas propiedades mutagénicas, cancerígenas, y teratogénicas. Este trabajo tuvo por objetivo determinar efectos sub-letales en embriones de pez cebr expuestos a muestras de descarga industrial y cauce del río Atoyac. Para cada muestra se realizó: 1) análisis de calidad del agua con 26 parámetros físico-químicos, 2) ensayo de Dilución Letal 50 (DL₅₀) en embriones a las 72 horas post-fertilización (hpf), 3) evaluación de efectos sub-letales, utilizando un gradiente de diluciones porcentuales menor al valor de DL₅₀ de cada muestra. La calidad del agua en descargas y cauce se determinó como fuertemente contaminada por rebasar los límites máximos permitidos en cuanto a demanda química de oxígeno, sólidos disueltos totales, compuestos nitrogenados, fosfatos y metales pesados como: níquel, cromo VI y aluminio. La DL₅₀ se encontró por debajo del 1% de dilución (V_v) de las muestras de las descargas industriales, mientras que en el cauce del río, este valor no rebasó el 12% de dilución. Las muestras de todas las estaciones indujeron algún tipo de malformación y retraso en el desarrollo embrionario en al menos una dilución serial de cada estación. Las malformaciones con mayor incidencia fueron: edema de saco vitelino y la malformación de somitas. La frecuencia cardíaca media (*fc*) en los embriones expuestos fue menor con respecto a los controles a las 24, 48 y 72 hpf. Dos estaciones de descarga indujeron arresto embrionario en la etapa de gástrula durante 72 hrs. La presencia de sustancias químicas en las descargas y en el cauce del río representa un riesgo elevado de exposición ambiental en poblaciones cercanas al cauce del río, debido a la movilidad de estas sustancias a través de aire y agua. Proponemos la aplicación del modelo de pez cebr para el seguimiento en los niveles de toxicidad del río Atoyac como ya se ha implementado en ríos de países como China, Brasil e India.

I. Introducción

Contaminación de cuerpos de agua

En la actualidad una gran cantidad de cuerpos de agua alrededor del mundo son afectados por algún tipo de contaminación de origen antropogénico. El uso intensivo del recurso agua para la obtención de alimentos y actividades industriales ha ocasionado su sobreexplotación y contaminación de este recurso. Del 0.06% de agua disponible en ríos y lagos, el 70% se destina a actividades agrícolas, 20% a actividades industriales y 10% para el consumo humano (Li et al., 2011).

Como resultado de lo anterior, el 90% de las aguas residuales que se vierten en ríos y lagos del mundo han generado una grave situación de contaminación particularmente en países en vías de desarrollo y economías emergentes (Corcoran et al., 2010). De acuerdo con la Organización Mundial de Salud (OMS) (2006), en países en vías de desarrollo únicamente dos de cada diez descargas de aguas residuales reciben algún tipo de tratamiento antes de ser vertidas, mientras que en países desarrollados esta cifra aumenta sólo a cuatro de cada diez descargas (Corcoran et al., 2006).

De acuerdo con su origen las descargas se clasifican en: municipales, agrícolas e industriales. Se considera que las últimas causan un mayor impacto ambiental, ya que vierten agua residual con una mezcla de diversas sustancias químicas diferentes de acuerdo al tipo industria (Malmqvist et al., 2002). Aproximadamente 300 millones de toneladas de sustancias químicas se vierten en ríos a nivel mundial, de las cuales al menos 5.7 millones de toneladas se vierten en América del Norte (FAO, 2006). Solo en Estados Unidos (EUA), el 50% de descargas de agua residual proviene de la industria del ramo químico, metalúrgico, papelerero, textil y refinerías de petróleo principalmente (Ohe et al., 2004).

Tabla 1. Principales sustancias químicas vertidas por la industria cuerpos de agua y su clasificación de acuerdo con la IARC 2012

Grupo	Sustancia	Industria	Medio	IARC 2012*	Cáncer y otras propiedades
VOC's	CHCl ₃ (Cloroformo)	Industria química (Cloración de agua)	Agua Aire	2B	-Cáncer de colon, hígado y vejiga -Mutagénico humanos ¹ -Teratogénico animales ²
	Diclorometano	Industria química (Disolvente de pintura)	Aire Agua	2A	-Carcinoma hepático -Teratogénico en animales ¹ -Mutagénico humanos ¹
	Dicloroetano	Industria química (Disolvente de pintura)	Agua Aire	2B	-Carcinoma hepático -Teratogénico en animales ¹ -Mutagénico humanos ¹
	Tolueno	Industria Petroquímica (elaboración de gasolina y disolvente)	Agua Aire	3	-Alteraciones en SNC -Defectos de nacimiento -Inducción de abortos -Teratogénico en humanos ⁵ -Mutagénico humanos ¹ -Genotóxico en humanos ²
Metales	Arsénico	Industria metalúrgica (Perseverante de metales) Industria Textil (Colorante)	Agua Suelo	1	-Cáncer hígado y piel ¹ -Teratogénico en animales ⁶
	Cadmio	Industrias metalúrgica (Perseverante del Zn) Producto de pilas	Agua Suelo	1	-Cáncer de próstata, piel e hígado ¹ -Mutagénico en humanos y animales ¹ -Teratogénico en animales ⁸
	Cromo VI	Industria metalúrgica (Manufactura de productos químicos)	Agua Aire Suelo	1	-Cáncer de pulmón y estómago -Deficiencias reproductivas en machos
	Ni	Industria metalúrgica (Fundiciones, acero, elaboración de pilas)	Agua Aire Suelo	1	-Cáncer de pulmón -Elevada mortandad en embriones expuestos a dosis bajas -Teratogénico y mutagénico en animales ⁴
	Zn	Industria petroquímica, metalúrgica, minera, (sub producto de incineración)	Agua Aire Suelo	-	-Clastogénico en dosis altas ⁴

Tabla 1. Principales sustancias químicas vertidas por la industria cuerpos de agua y su clasificación de acuerdo con la IARC 2012 (Continuación)

Grupo	Sustancia	Industria	Medio	IARC 2012*	Cáncer y otras propiedades
Dioxinas	2,3,7,8-tetra-clorodibenzo-p-dioxina (TCDD)	Subproducto de incineración	Agua Aire	1	-Cáncer mama, ovario y otros -Mimetismo hormonal -Teratogénico en humanos ³ -Mutagénico en animales ²
	Anilina	Industria química (síntesis de colorantes) Industria textil (colorante)	Agua Aire Suelo	3	Teratogénico en animales ⁷
	Benceno	Contenido en combustibles Intermediario de procesos industriales	Agua Aire Suelo	1	-Leucemia ¹ -Mutágeno en humanos y animales ¹ -Teratogénico en humanos ¹
PAH's	Benzopireno	Industria petroquímica	Agua Aire Suelo	1	-Cáncer de pulmón, estómago -Teratogénico y mutagénico en humanos ¹
	2,3-benzantraceno	Industria petroquímica Semiconductor	Agua Aire Suelo	2B	-Cáncer de mama, sarcomas -Teratogénico en animales ¹
PCB's		Industria Automotriz (Conductores)	Agua Suelo	2B	-Cáncer de mama, próstata -Teratogénico en animales ¹
<p>*1 Cancerígeno; 2B Posible cancerígeno; 3 No clasificado cancerígeno en humanos; 4 Probablemente no cancerígeno ¹ATSDR 2013, ²Concise International Chemical Assessment, (IPCS) 2006, ³Boffetta et al., 2011, ⁴Leonard et al., 1981, ⁵Wilkins-Haug, 1997; ⁶Desso, 2001; ⁷Davis 1981, ⁸Saxena 1986</p>					

Descargas industriales

La composición de las descargas industriales es compleja: cerca de 1000 diferentes sustancias químicas son liberadas a partir de los procesos. Se estima que en un efluente

industrial particular se pueden identificar al menos 200 diferentes compuestos químicos(Watanabe et al., 2005), por ejemplo: hidrocarburos aromáticos policíclicos (fluoreno, fenantraceno, butadieno), dioxinas, nanopartículas entre los 30 y 40nm(Bui et al., 2012), metales pesados, compuestos orgánicos volátiles (Tuikka et al., 2011), colorantes, blanqueadores secadores y tintes. Las descargas de la industria textil se caracterizan también por la presencia de olores persistentes y elevadas temperaturas, entre los 40-70°C (López, 2012).

La mayoría de estas sustancias están clasificadas como cancerígenas de acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, *por sus siglas en inglés*). Algunas de ellas presentan propiedades neurotóxicas, de mimetismo hormonal, mutagénicas, genotóxicas, clastogénicas y teratogénicas (*Tabla 1*). La presencia de estos y otros contaminantes en las aguas residuales de tipo industrial representan un factor de deterioro ambiental y riesgo a la salud cuando son vertidas sin un tratamiento previo.

Contaminación de ríos y efectos a la salud

Se estima que el 3.1% de las muerte humanas en países en vías de desarrollo se debe a problemas de contaminación del agua, principalmente por aguas residuales de actividad industrial (Madsenet al., 2012). Sin embargo, pocos trabajos han logrado establecer de manera directa la relación entre la degradación de los sistemas naturales y la incidencia de ciertas enfermedades en poblaciones humanas cercanas a éstos (Bolognesi et al., 2011).

Por ejemplo, algunos trabajos han demostrado una asociación en el aumento de incidencia de cáncer de piel en personas que viven a menos de 2km de la ribera del río Kymijokien Finlandia y los niveles elevados de sustancias como: dioxinas, hidrocarburos aromáticos, furanos, clorofenoles, provenientes de descargas industriales (Verkasalo et al., 2000, Hitt et al., 2010) también demostraron que existe una relación directa entre la degradación de la integridad del ecosistema y la mortandad por cierto tipo de cánceres en la población del oeste de Virginia en E.U.

Algunos trabajos han determinado la presencia de daño teratogénico y genotóxico en modelos de laboratorio, y han determinado correlaciones positivas con la presencia de contaminantes industriales en ríos de China (Yangtzé, Qingdao), Brasil (Tiete) e India (Ganges, Yamuna) (Rocha et al., 2011; Tuikka et al., 2011; Wu et al., 2009; Yang et al., 2010). Es debido a las constantes descargas de contaminantes y las mezclas complejas que se forman en las descargas y al interior de los cuerpos de agua que la gran mayoría de estas sustancias se encuentren de manera ubicua en el ambiente, provocando una gran cantidad de efectos adversos a la salud y el ambiente.

La problemática del agua en México

El territorio mexicano se compone de 728 cuencas hidrológicas, divididas en 13 regiones hidrológicas administrativas, en las que se encuentran aproximadamente 85 ríos. La heterogeneidad de relieve del relieve geográfico, la presión demográfica y económica, así como el nuevo escenario de cambio climático influyen en la cantidad y calidad de agua en el país. Existen dos grandes regiones en el territorio mexicano: la zona norte-centro que concentra el 87% del PIB nacional y la zona sur con un 23% de PIB (CONAGUA, 2011).

El contraste económico en estas dos regiones correlaciona inversamente con la disponibilidad de agua: en la zona norte-centro únicamente se recibe el 31% de agua renovable mientras que en la zona sur se recibe el 66%. El ingreso de agua renovable, es decir, el agua disponible de la precipitación anual, cauce de ríos y mantos freáticos, es determinante en la disponibilidad de agua en el territorio mexicano. La zona centro del país recibe menos de 500m³/hab/año de agua renovable, valor que la coloca como una zona con elevado estrés hídrico.

En México, aproximadamente 21 de las 728 cuencas hidrológicas del país presentan algún tipo de estrés hídrico, situación que coincide con los datos de elevada densidad de población y aguas fuertemente contaminadas. Esto además de ser un problema de riesgo a la salud y al ambiente, representa una baja en la disponibilidad de agua para los habitantes. En la región hidrológica central del país se encuentran los

caudales más contaminados, es decir, con los índices menores de calidad de agua (Cotler, 2012).

El biomonitoreo como una herramienta en sitios contaminados

La necesidad de establecer el riesgo a la salud en los sitios contaminados ha hecho del monitoreo una herramienta indispensable. Sin embargo, en México existe un rezago en la aplicación de estos protocolos y en el establecimiento de programas de vigilancia ambiental. El monitoreo tiene como objetivo la determinación e identificación de compuestos contaminantes en los ecosistemas y es una herramienta útil en la evaluación de los posibles efectos adversos. Por otro lado, el biomonitoreo tiene como objetivo determinar la toxicidad de sustancias o materiales a través del uso de especies representativas o sensibles, mejor conocidas como especies centinela o bien de organismos de fácil manejo como bacterias o invertebrados (Chiswell et al., 1996). A la fecha se cuentan con diferentes ensayos de monitoreo y biomonitoreo que permiten caracterizar el impacto de los contaminantes en sistemas acuáticos y con ello calcular el riesgo a la salud humana y el ambiente.

Una tendencia en las técnicas de biomonitoreo desde hace una década es la implementación de ensayos que evalúen alteraciones subletales es decir, los efectos presentes en el organismo que no le resultan letales (Wu et al., 2009).

Entre los efectos subletales más evaluados se encuentran las pruebas de genotoxicidad, teratogénesis y otras alteraciones fisiológicas específicas. Estos efectos son comúnmente evaluados en modelos de plantas como *Vicia faba* y en animales acuáticos como *Danio rerio* y *Dreissena polymorpha* entre otras especies. Se cuenta con ensayos de teratogénesis en embriones de *Xenopus sp*, *Mus musculus* y *Gallus gallus* y otros organismos. Siendo un modelo por demás empleado la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Sin embargo nuevos modelos han comenzado a tomar relevancia en los estudios de monitoreo, principalmente por presentar características biológicas o ecológicas que las hacen estar más relacionadas con posibles efectos en el humano.

El pez cebra como modelo en Toxicología y Embriología

Los peces teleósteos son de los organismos con mayor uso en pruebas de biomonitoreo de cuerpos de agua debido a que su historia de vida favorece el contacto con los contaminantes (Arellano-Aguilar et al., 2009). El pez cebra es un modelo de prueba de laboratorio que se emplea en el estudio de diversos aspectos biológicos como el desarrollo embrionario, fisiología y genómica. Aproximadamente el 71% del genoma del pez cebra es ortólogo con el ser humano, incluyendo 82% de genes asociados a enfermedades como el cáncer, Alzheimer, Parkinson y cardiopatías (Howe et al., 2013).

En los últimos 20 años, el pez cebra ha surgido como un modelo vertebrado para estudios en genética, desarrollo embrionario y recientemente como modelo de biomonitoreo y toxicidad de sustancias químicas, particularmente por su sensibilidad y capacidad de respuesta (Rocha et al., 2011; Walker et al., 2010.).

Entre las principales ventajas de que caracterizan el uso del pez cebra como modelo de se encuentran: una elevada tasa reproductiva, ciclo de vida corto y desarrollo embrionario *ex utero*, además de un corion transparente que permite la observación visual del desarrollo embrionario a través del tiempo.(Lawrence et al., 2007).

El desarrollo embrionario del pez cebra ocurre en un periodo de 72 horas; desde la fecundación hasta la eclosión de una larva. En 1995, Kimmell y colaboradores describieron detalladamente el proceso de desarrollo embrionario, distinguiendo siete periodos y treinta y nueve etapas morfológicas específicas (*Tabla 2*). Los siete periodos del desarrollo corresponden a una serie de procesos de división, migración celular y señalización, común en vertebrados. Mientras que las etapas tienen características morfológicas específicas del desarrollo del pez cebra.

Durante las etapas de 9, 24, 48 y 72 hpf (horas post fertilización) es posible observar a través de ciertas manipulaciones del embrión cambios morfológicos, que permiten hacer el seguimiento del desarrollo embrionario(Haffter et al., 1996; Kimmell et al., 1995).

En condiciones de temperatura ideales (28°C) a las 9hpf el embrión en periodo de gástrula debe presentar un 90% de formación de la gástrula, a través de una serie de movimientos conocidos como, epibolia. A las 24hpf se debe distinguir la segmentación de las tres áreas: cabeza, torso y cauda. En la cabeza deben observarse los ojos y el otolito, en la zona del torso son visibles 26 somitas simétricas del mismo tamaño y forma, en la región caudal se debe observar un muñón hacia la región terminal. En la parte ventral del embrión debe distinguirse una estructura esférica, rodeada por una delgada membrana también de forma esférica conocida como saco vitelino. Entre las 48 y 72 hpf el embrión debió aumentar su tamaño respecto a las 24hpf. Las estructuras de cabeza, torso y cauda son más evidentes. La cabeza debe presentar claramente los ojos pigmentados (negros) y el otolito. La región caudal debe observarse separada del saco vitelino a las 48hpf y a las 72hpf la cola deber extenderse linealmente al resto del cuerpo de la larva, una vez que se rompe el corion. El saco vitelino debe conservar su aspecto esférico y en la región ventral superior se debe observar el corazón (*Fig. 1*).

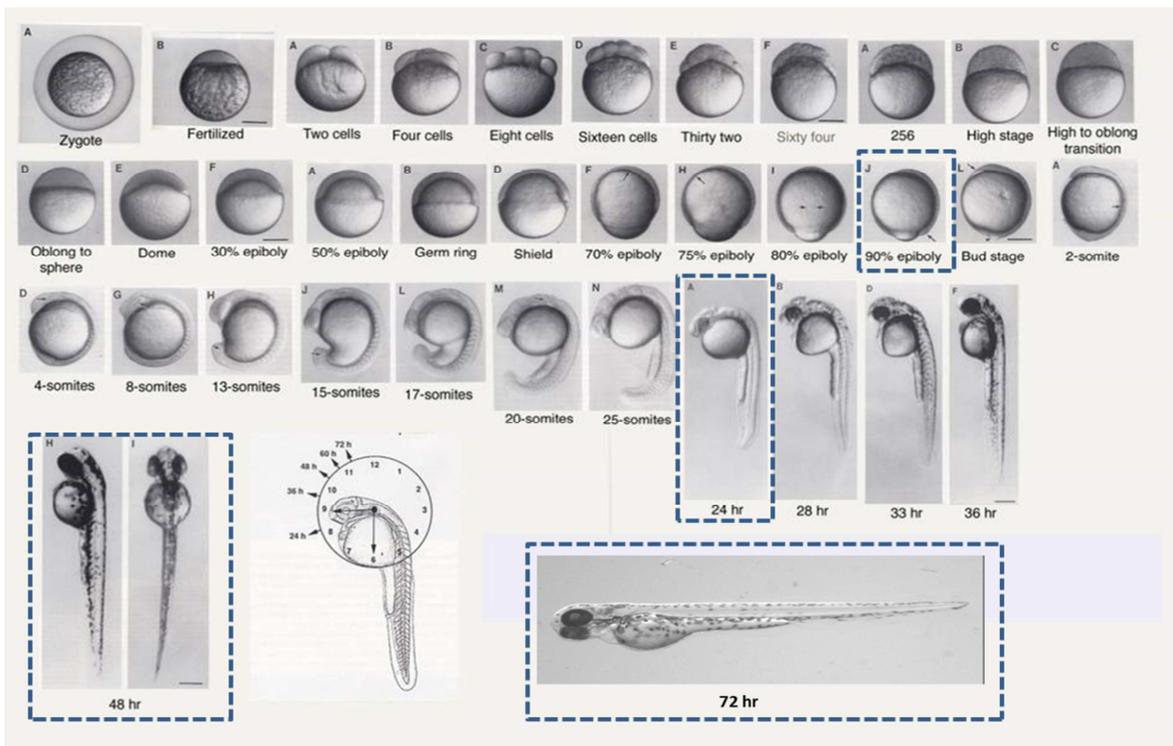


Figura 1. Desarrollo embrionario del pez cebra (*D. rerio*), tomado y modificado de Kimmel et al, 1995 (- - - Principales etapas para la observación de cambios morfológicos durante el desarrollo embrionario)

Tabla 2. Periodos y etapas del desarrollo embrionario del pez cebrá¹		
Periodos	hpf	Etapas
Cigoto	0.00	1 célula
	0.75	2 células
	1.00	4 células
Clivaje	1.25	8 células
	1.50	16 células
	1.75	32 células
	2.00	64 células
	2.25	128 células
	2.5	256 células
	2.75	512 células
	3.00	1k células
Blástula	3.33	Ovalado
	3.66	Oblongado
	4.00	Esfera
	4.33	Domo
	5.25	50% epíbolia
	5.60	Anillo germinal
Gástrula	6.00	Escudo
	8.00	75% epíbolia
	9.00	90% epíbolia
	10.00	Yema
	10.50	1 somita
	11.75	5 somitas
Segmentación	16.00	14 somitas
	19.00	20 somitas
	24.00	26 somitas
	24.50	5 primordios
	30.00	15 primordios
Pharyngula	36.00	25 primordios
	42.00	High pec
Eclosión	48-72	Long-pec
		Pre-fin

¹Tomado y adaptado de Kimmell et al., 1995

En el desarrollo embrionario temprano del pez cebrá se ha identificado al menos 374 genes esenciales, entre los que se incluyen diversos genes de la familia Hox, y elementos de respuesta a ácido retinoico (RARES, *por sus siglas en inglés*) (Golling et al.,

2002), lo que facilita el estudio de los efectos que provoca la exposición a contaminantes en esta etapa.

La teratogénesis es uno de los efectos más evidentes de la exposición a sustancias tóxicas. La presencia de anormalidades morfológicas o alteraciones fisiológicas en organismos expuestos durante su desarrollo, constituyen un indicador de referencia para la normatividad de sustancias químicas. Se ha calculado que aproximadamente el 10% de defectos al nacimiento en humanos son causados por la exposición prenatal a sustancias teratogénicas ambientales (Ronnan et al, 2001). En este sentido el modelo de pez cebra ha tomado fuerza en la determinación de sustancias con potencial teratogénico, principalmente porque estas sustancias afectan etapas del desarrollo comunes en todos los animales y pueden representar una limitante en la vida adulta de los organismos.

II. Hipótesis

La exposición de embriones de pez cebra a muestras de agua de un río contaminado y muestras de descargas industriales induce cambios teratogénicos en el patrón normal de la embriogénesis.

III. Objetivo

Determinar efectos teratogénicos en el desarrollo embrionario del pez cebra expuesto a muestras de agua del río Atoyac y descargas industriales en la zona industrial Puebla-Tlaxcala, México.

Objetivos Particulares

- Caracterizar la calidad del agua y de las descargas vertidas en el río Atoyac.
- Determinar la dilución letal 50 (DL₅₀) de las muestras del cauce y de las descargas industriales
- Evaluar la incidencia de daño teratogénico y caracterizar el tipo de malformaciones.

IV. Zona de estudio

La cuenca del río Balsas abarca el 6% de la masa continental del territorio nacional y se ubica en los paralelos 17°00' y 20°00' Norte y los meridianos 97°30' y 103°15' Oeste, tiene una extensión aproximada de 117 km², subdivida en tres regiones; el alto Balsas (50km²), el medio Balsas (31km²) y el bajo Balsas (35km²); (INE, 2008). En la cuenca del alto Balsas, ocurren importantes regiones económicas del Pacífico centro-occidente y centro-sur de la República.

La industrialización y la agricultura intensiva en la cuenca del alto Balsas han provocado un aumento en la demanda de agua, así como un aumento en los desechos y contaminación. Se estima que la cuenca recibe diariamente 119 mil m³ de descargas industriales, urbanas y agrícolas (María et al., 2009)

El río Atoyac es el principal afluente de la cuenca del alto Balsas, tiene una extensión de 2,031 km, y en su recorrido cruza por 60 municipios de los estados de Puebla y Tlaxcala (*Fig. 2*). En la zona límite de estos estados el río Atoyac aporta cerca del 52% del agua para los municipios de San Martín Texmelucan, Santa María Moyotzingo, Villa Alta, Tepetitla de Lardizábal y Huejotzingo (SEMARNAT, 2010); (*Fig. 3*).

El aporte de agua del río en estas zonas favoreció el asentamiento del sector industrial y el crecimiento de la población urbana en la zona desde 1969. Durante la década de 1990 el establecimiento del corredor industrial Puebla–San Martín Texmelucan, el Complejo Petroquímico Independencia y el Corredor industrial Quetzalcóatl fueron determinantes para el proceso de industrialización en la zona (Navarro et al., 2004).

La rápida industrialización en la zona del Alto Balsas ha provocado un aumento en la demanda del recurso agua, así como de la contaminación de los ríos Atoyac, Zahuapan y Xochiac. En la zona existe el registro al 2001 de 23 descargas de tipo industrial, de las cuales el 78% rebasa los límites permisibles de la norma en metales pesados como plomo (Pb) y cromo VI (Cr⁶⁺), además de otros parámetros (Saldaña Fabela., 2001).



Figura 2. (Derecha) Representación estados de Puebla (café) y Tlaxcala (naranja). (Izquierda) Municipio de San Martín Texmelucan, Puebla (S.M.T.) y Cauce del río Atoyac. Elaborado en ArcMap10 (Datos INEGI 2008)

El río Atoyac tiene como principal fuente de contaminación las constantes descargas de origen agrícola, doméstico e industrial y los residuos sólidos urbanos (SEMARNAT, 1996). El uso de agroquímicos en las zonas agrícolas cercanas al cauce del río y la incorporación de aguas residuales industriales del ramo textil, químico, papeler, petroquímico y automotriz han ocasionado graves problemas de contaminación, particularmente en la zona limítrofe entre los estados Puebla y Tlaxcala (García-Nieto et al., 2011).

Debido a la fuerte contaminación del río Atoyac y la preocupación de los habitantes en la zona, diferentes grupos de investigación han realizado estudios de monitoreo en el río. Se han reportado la presencia de sustancias como: aceites, detergentes, cloroformo (CHCl_3), cloruro de metileno (CH_2Cl_2), tetra-cloro-etileno (C_2Cl_4), di-bromo-cloro-etano (CHBrCl), tolueno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$), etilbenceno (C_8H_{10}), hierro (Fe), manganeso (Mn), cloruro de vinilo ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}$), plomo (Pb), arsénico (As), cadmio (Cd), cromo VI (Cr), zinc (Zn), níquel (Ni) y aluminio (Al) entre otros. (Navarro et al., 2004, 2007, Méndez et al., 1995, CONAGUA, 2006; García et al., 2011; Saldaña et al., 2001); (Tabla

J).En zonas particulares se ha reportado la presencia de sustancias relacionadas con efectos adversos a la salud, particularmente en San Martín Texmelucan. En las poblaciones cercanas al río se ha encontrado elevados niveles de daño genotóxico particularmente en los municipios de Villa Alta, Moyotzingo, Huejotzingo, revelando una asociación positiva entre la exposición ambiental a los contaminantes presentes en el río y el daño genotóxico (Montero et al., 2006).

En 2008 el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) señaló que la presencia de contaminantes orgánicos e inorgánicos en el cauce del río Atoyac tienen el potencial de afectar adversamente la calidad del ambiente y la salud de las poblaciones. De acuerdo con el informe la zona límite de los estados de Puebla y Tlaxcala, es la más fuertemente contaminada y con mayor cantidad de población humana en riesgo. El informe identifica las poblaciones cercanas en un radio de 1 a 2 Km de distancia del cauce del río Atoyac como las de mayor riesgo (CONAGUA, 2008).

V. Materiales y Métodos

Trabajo de campo

El muestreo al río Atoyac se realizó en dos fechas: el 14 de marzo y el 9 de julio de 2012, con el propósito de tener muestras de las descargas, ya que estas dependiendo las horas y días pueden o no estar vertiendo aguas residuales.

Se seleccionaron 8 estaciones de muestreo, con base en trabajos de Montero y colaboradores 2006. (Fig.3) Tres de las ocho estaciones correspondieron a descargas de aguas residuales de tipo industrial que se vierten continuamente sobre el cauce del río Atoyac. Las siguientes tres estaciones se localizaron en el cauce del río Atoyac y una estación se encontraba sobre el cauce del río Xochiac 15 m antes de su incorporación con el río Atoyac (Tabla 3).

Colecta de muestras de agua y evaluación de parámetros físico-químicos in situ

La colecta de muestras de cauce de río se realizó superficialmente, usando una cubeta de 5 litros de capacidad sujeta a una cuerda de 10.5m de largo. El procedimiento de colecta consistió en arrojar la cubeta directamente hacia el tubo de descarga o bien a la zona central del cauce del río, desde la orilla.

Una vez que la cubeta se llenaba se jalaba hacia la orilla, elevándola para evitar levantar sedimentos en el caso de muestras de cauce (Fig.4). Esta técnica de muestreo sigue a las recomendaciones de toma de muestras de aguas residuales de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés).

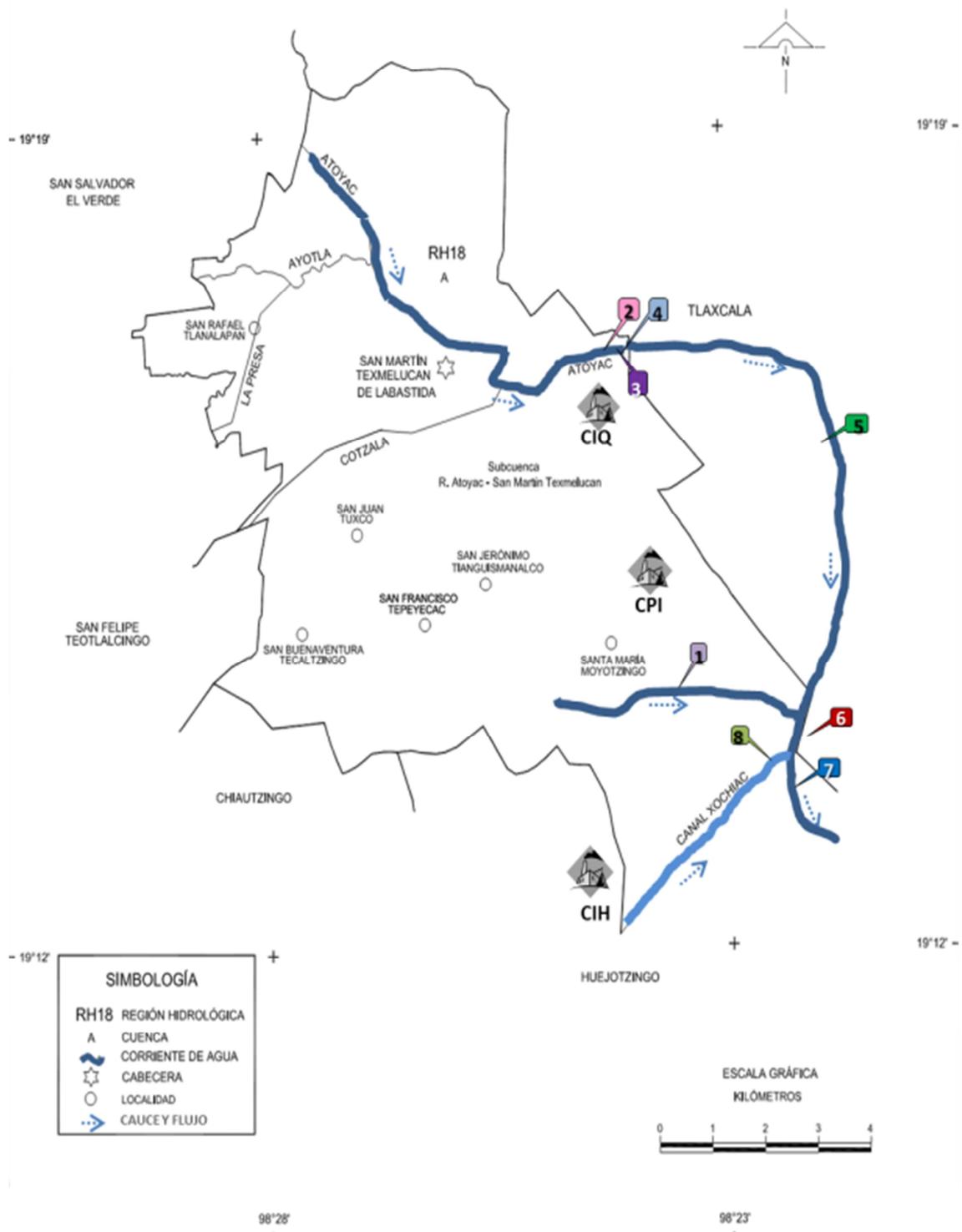


Figura 3. Zona de estudio en el río Atoyac. Los globos representan los sitios de muestro. Corredor industrial Quetzalcóatl (CIQ), Complejo Petroquímico Independencia (CPI), Complejo Industrial Huejotzingo (CIH). *Tomado y Modificado de INEGI 2008*

Las muestras se colectaron en frascos ámbar de 0.5 L de capacidad por triplicado, excepto en la estación DPCQ donde sólo se obtuvo una muestra directa de la descarga. Para cada muestra se realizó el registro de los siguientes parámetros físico-químico *in situ*: temperatura (°C), pH, conductividad (mS/cm), resistividad ($m\Omega \cdot cm$), potencial de óxido reducción (ORP) (mV), oxígeno disuelto (mg/L), sólidos disueltos totales (SDT) (mg/L), para lo que se empleó el fotómetro multiparámetro modelo HI 83099 de *Hanna Instruments*. Las muestras se trasladaron en una cama de hielo hasta su almacenamiento en el laboratorio a 4°C.

Evaluación de parámetros químicos en muestras de agua

En el laboratorio, las muestras se dejaron llegar a temperatura ambiente y se filtraron con papel Whatman #1. En cada triplicado de muestra se registró la concentración de: aluminio (Al_2O_3), nitrito (NO_2), nitrito de sodio ($NaNO_2$), ion nitrito (NO_2^-), cromo VI (Cr^{6+}), cromato (CrO_4^{2-}), dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$), fosfato (PO_4), fósforo (P), pentaóxido de fósforo (P_2O_5), nitrato (NO_3^-), óxido nítrico (NO_3), zinc (Zn), amonio (NH_4), amoniaco (NH_3), ion amonio (NH_4^+), níquel (Ni), así como la demanda química de oxígeno (DQO), usando el fotómetro multiparámetro modelo HI 83099 de *Hanna Instruments*.



Figura 4. Procedimiento de colecta (arrastre, evaluación de parámetros *in situ*, envasado), estación Tepetitla.

Tabla 3. Estaciones de muestreo

	Estación	Localización	Descripción
<p>1.*Descarga Pemex Moyotzingo (DPMO)</p>	<p>19°13'49"N 98°23'51"O</p>	<p>Tubo de descarga de 1 m de diámetro, caída de 1 m de altura aproximadamente. Flujo constante, color café, sin un olor específico. La descarga vierte aguas residuales del complejo petroquímico Independencia¹</p>	
<p>2.*Villa Alta</p>	<p>19°17'25"N 98°24'15"O</p>	<p>Cauce del río lento, sin olor, color verdoso. Presencia de basura en las orillas</p>	
<p>3.*Descarga Corredor Quetzalcóatl (DPCQ)</p>	<p>19°17'26"N 98°24'48"O</p>	<p>Tubo de descarga de 1 m largo x 0.5 m de ancho, caída de aproximadamente 3m de altura. Flujo constante, color azul oscuro, olor penetrante. La descarga vierte aguas residuales industriales del ramo textil y del corredor industrial Quetzalcóatl¹</p>	

Tabla 3. Estaciones de muestreo (Continuación)

Estación	Localización	Descripción	
<p>4. *Descarga Pemex Villa Alta (DPVA)</p>	<p>19°17'14"N 98°23'58"O</p>	<p>Descarga de 2 m largo x 1 m de ancho, caída de 3 m de altura Flujo constante, color azul oscuro, olor penetrante. La descarga vierte aguas residuales municipales de la comunidad, aguas residuales industriales del ramo textil, químico y del corredor Quetzalcóatl¹</p>	
<p>5. *Tepetitla de Lardizábal (Tepetitla)</p>	<p>19°17'57"N 98°21'3"O</p>	<p>Estación de cauce del río Atoyac con flujo constante, sin olor específico, color del agua marrón. Presencia de vegetación ribereña fragmentada árboles menores de 6 m</p>	
<p>6. *San Rafael Tenanyecac (San Rafael)</p>	<p>19°14'13"N 98°22'47"O</p>	<p>Estación de cauce del río Atoyac con flujo lento, olor penetrante y coloración del agua blanco lechoso. Presencia de sustancia negra viscosa y sales de azufre en las orillas del cauce. Ausencia de cobertura vegetal en la ribera.</p>	

Tabla 3. Estaciones de muestreo (Continuación)

Estación	Localización	Descripción
<p>7*Confluencia de los ríos Atoyac-Xochiac (Confluencia)</p>	<p>19°14'13''N 98°21'37''O</p>	<p>Estación de cauce de los ríos Atoyac-Xochiac con flujo lento, olor penetrante, coloración blanco lechoso proveniente del río Atoyac y rojizo en la incorporación del río Xochiac. Ausencia de cobertura vegetal e la ribera.</p>
<p>8. *Río Xochiac (Xochiac)</p>	<p>19°14'13''N 98°21'37''O</p>	<p>Estación de en el río Xochiac con flujo lento, sin olor con coloración rojiza. Presencia de bosque ribereño con árboles menores a 5m. El río durante su cauce recibe descargas de tipo industrial y agrícola¹</p>



¹Comen. Pers. Alejandra Méndez (Centro Fray Julián de Derechos Humanos)

*Números corresponden a los globos de la *figura 3*.

Colecta de embriones de pez cebra

Los embriones fueron obtenidos de la reproducción de un stock de peces adultos (*D. rerio*) obtenidos del acuario de la Facultad de Ciencias, UNAM, y mantenidos en el laboratorio. Para la obtención de embriones, los peces progenitores se mantuvieron en una proporción de hembras y machos 2:1, en condiciones controladas de temperatura (25°C), luz (14h luz, 10h oscuridad) y alimento.

24 horas previas al inicio de cada ensayo se colocó una red de maternidad (diámetro 1-2mm) en la pecera para que los huevos atravesaran la red y se cayeran en el fondo. Aproximadamente 30 minutos después de iniciado el periodo de luz, los huevos se colectaron mediante sifoneo en un recipiente limpio. Los huevos fueron enjuagados con agua de la pecera filtrada con papel Whatman #1, a 28°C. En cada ensayo únicamente se seleccionaron embriones fertilizados sincrónicos de menos de 2 hpf. La selección se realizó utilizando un microscopio estereoscópico *Velab (modelo VE-S5)* a un aumento de 15x. Los embriones se mantuvieron a 28°C hasta su uso antes de las 2hpf para los ensayos de DL₅₀ y alteraciones en el desarrollo embrionario (*Fig.5*).



Figura 5. Embrión de 2 hpf
(*Kimmell et al, 1995*)

Estimación Dilución Letal 50 (DL₅₀)

Los embriones fueron expuestos en grupos de tres en un volumen de 1.5 ml para cada dilución serial de las muestras. Se utilizaron un total de siete diluciones seriales 1:2 ($\%v/v$) para cada muestra por triplicado (N=63). Para el control negativo se utilizó agua filtrada del acuario con un total de 7 embriones en un volumen de 1.5ml, por triplicado (N=21). Las condiciones de temperatura y luz se mantuvieron constantes (28°C \pm 1°C, 14h luz, 10h oscuridad) durante las 72 horas del ensayo con recambios de agua cada 24horas para asegurar condiciones de oxígeno necesarias para la viabilidad de los embriones. Al

cabo de 72 horas que concluyó el desarrollo embrionario, se registró el número de embriones muertos y vivos para el cálculo de la DL₅₀.

Los valores de las diluciones seriales fueron transformados a porcentajes, para su representación en las tablas y gráficas subsecuentes en la sección de resultados (*Tabla 4*).

Tabla 4. Concentración relativa en % y diluciones seriales elaboradas			
Dilución Letal 50 (DL₅₀)		Ensayo de alteraciones en el desarrollo embrionario^a	
Muestra	100%	1:5	20%
1:2	50%	1:10	10%
1:4	25%	1:25	4%
1:8	12.5%	1:50	2%
1:32	3.0%	1:500	0.2%
1:100	1%		
1:1000	0.1%		
^a Diluciones elaboradas a partir de valor DL ₅₀ para cada muestra.			

Ensayo de alteraciones en el desarrollo embrionario

Tomando en cuenta el resultado de la DL₅₀ se elaboraron un total de 5 diluciones para cada muestra a partir de su valor de DL₅₀ (*Tabla 4*). Los embriones fueron distribuidos en grupos de tres en un volumen de 1.5 ml para cada dilución serial, por triplicado (N=45). Para el control negativo se utilizó agua filtrada del acuario con un total 3 embriones en un volumen de 1.5ml, por triplicado(N=9).Las condiciones de exposición fueron similares a las descritas anteriormente.

Se obtuvo un registro de supervivencia de los embriones a las 9, 24 y 72 hpf. Se consideró muerto a todo embrión que presentara coagulación o degeneración del embrión al interior del corion en las primeras 72 hpf.

Registro de alteraciones en el desarrollo embrionario

Para registrar alteraciones durante el desarrollo embrionario, se siguieron las recomendaciones de los protocolos: 1) Prueba de toxicidad en embriones de pez (FET, *por sus siglas en Inglés*; OECD, 2006), Guía de la OECD para la prueba de sustancias tóxicas y 2) Evaluación de citotoxicidad, genotoxicidad y teratogénesis en embriones de pez cebra (Yang et al., 2010).

El registro de alteraciones se realizó de acuerdo con la *Tabla 5*. La observación y registro de alteraciones se llevó a cabo en placas de 24 pozos, utilizando un microscopio invertido marca *Wild Heerbrugg*, modelo *M40-58629* con aumento de 60x y 150x. Si la característica era diferente al patrón normal de desarrollo embrionario (Kimmell et al., 1995) se asignó el valor de 1, de lo contrario se asignó el valor de 0. Se realizó un registro fotográfico de las alteraciones presentes en los embriones (*Anexo II*).

Una vez obtenidos los datos se obtuvo para cada dilución la proporción de embriones malformados entre el número de embriones vivos al momento de la evaluación. Se obtuvo también el total de malformaciones y embriones malformados por estación de muestreo.

Frecuencia cardiaca media (fc)

Para obtener la *fc* cuando los embriones alcanzaron las 24, 48 y 72 hpf se registró el número de latidos cardíacos por minuto para cada embrión, utilizando un microscopio invertido marca *Wild Heerbrugg*, modelo *M40-58629* en una amplificación de 60x.

La *fc* fue analizada en tres aspectos como se describen a continuación: 1) se comparó la *fc* entre el grupo control y expuesto para cada una de las diluciones de las muestras, 2) se analizó el cambio en la *fc* de los embriones de 24 a 48 y de 48 a 72 hpf

Tabla 5. Parámetros para la evaluación de alteraciones en el desarrollo embrionario de *Danio rerio*

Etapa desarrollo embrionario (Kimmell et al, 1995)	Parámetro	Tiempo de evaluación para cada etapa			Criterios de clasificación
		9hpf	24hpf	72hpf	
Gástrula	Retraso de la gastrulación	X			Embriones en etapas previas a la gastrulación o 90% de epibolía ¹ ,
Pharyngula	Edema saco vitelino (ESV) ³		X		embriones con aumento de tamaño y/o pérdida de la circunferencia en el saco vitelino ²
	Formación de somitas ³ (25 somitas)		X		Embriones con número de somitas diferente a 25 somitas, asimetría y/o pérdida de la forma de una o más somitas ²
	Formación de cabeza y otolito ³		X		Embriones con ausencia de cabeza y ojos, asimetría, migración incorrecta de otolito ²
	Formación de región caudal ³		X	X	Embriones con malformación de región caudal y/o extensión no lineal de la región caudal ²

¹(OECD, 2006), ²(F. Yang et al., 2010), ³Caracter de malformación

Para cada muestra y 3) se comparó el conjunto de *fc* entre grupos controles y expuestos de las ocho muestras. El análisis para los aspectos 1 y 3 se realizaron mediante la prueba paramétrica de ANOVA y la prueba *poshoc* de Tukey. El análisis para el aspecto 2 de *fc* se realizó mediante la prueba de datos pareados Wilcoxon en el software SPSS para determinar diferencias entre la *fc* en los periodos 24, 48, 72 hpf.

Análisis estadístico

Los datos fisicoquímicos fueron analizados a través de una prueba multivariable de conglomerado jerárquico, utilizando el enlace de similitud de Ward, para lo que se usó el software MINITAB. INC. El análisis multivariado (MVA) es una herramienta ampliamente utilizada para el análisis de parámetros fisicoquímicos en muestras ambientales. A través del análisis de conglomerado jerárquico (CA, *por sus siglas en Inglés*) o conglomerado jerárquico y componentes principales (PCA, *por sus siglas en Inglés*) permite una interpretación sencilla de una gran cantidad de datos, como lo son los parámetros fisicoquímicos (Kazi et al., 2009) El CA se ha empleado en trabajos que analizan la calidad de agua en ríos lagos y suelos (Facchinelli et al., 2001; Vaj et al., 2011; Yang et al., 2012).

La Dilución letal 50 (DL₅₀) se calculó siguiendo el método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1975), para lo que se usó el software de Concentración Letal 50 (LC₅₀, *por sus siglas en Inglés*) de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, *por sus siglas en Inglés*).

Los datos de alteraciones en el desarrollo y *fc* fueron analizados mediante la prueba de varianza no paramétrica Kruskal Wallis, para lo que se usó el software *Statistical Package for Social Science (SPSS)*, IBM, versión 21.

Diagramas de diseño experimental

A continuación se presenta de manera sintetizada el diseño experimental descrito (*Fig.6*).

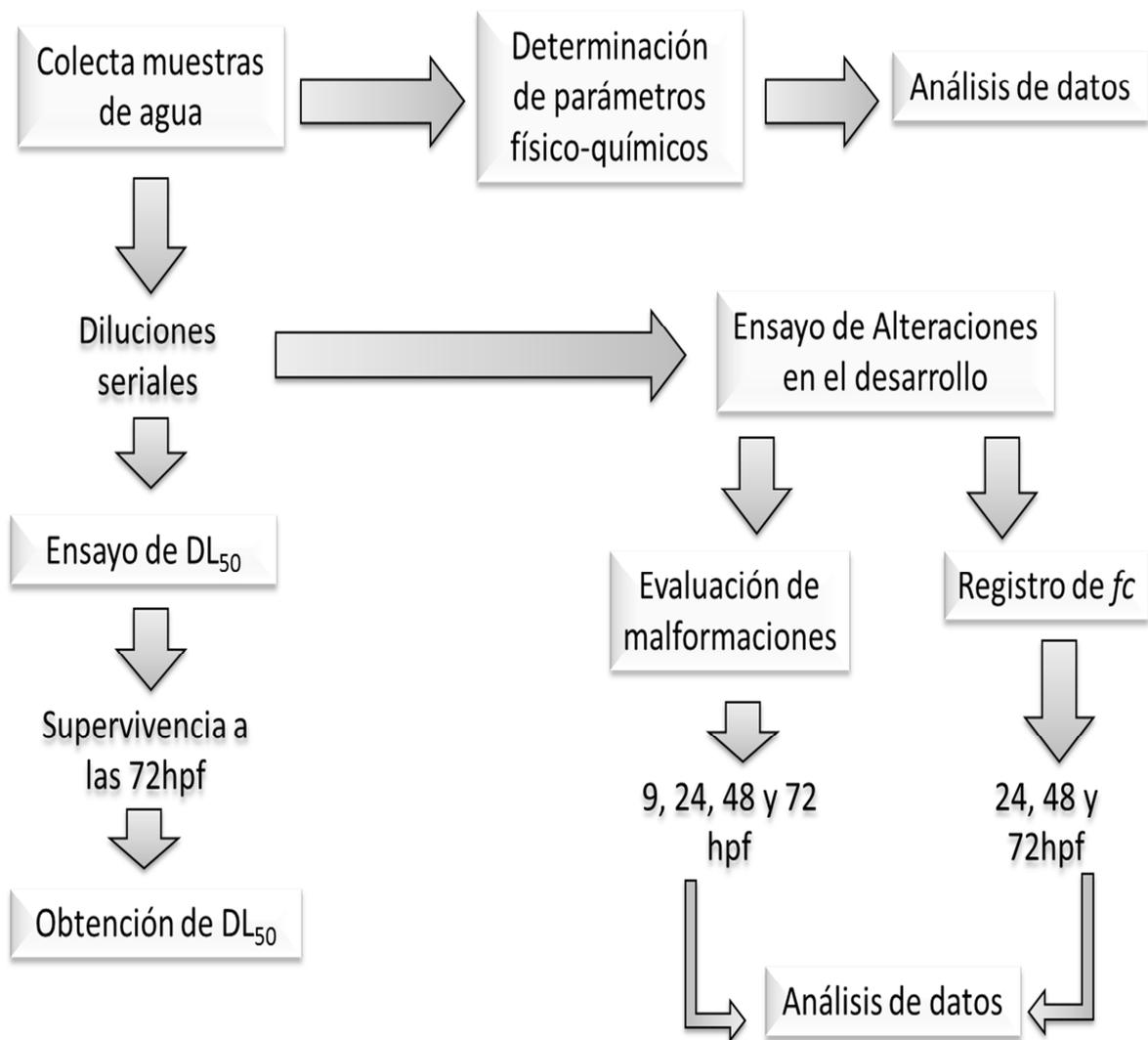


Figura 6. Diseño experimental

VI. Resultados

Análisis de la calidad de agua en las muestras

Los resultados obtenidos de la medición de 26 parámetros físico-químicos de las muestras tanto del cauce del río como de las descargas industriales se presentan en la *Tabla 6*. La temperatura superficial del río osciló entre 18 y 19°C, mientras que el agua de los tubos de descarga alcanzó temperaturas de 18 hasta 37°C. La estación DPCQ presentó la temperatura más elevada con 37°C, seguida de las estaciones DPVA y Xochiac con temperaturas de 20.4 y 19.7°C, respectivamente. En cuanto al pH, éste fluctuó entre 6.6 como mínimo en la estación DPCQ y 8.1 como máximo en la estación río Xochiac, mientras que los valores en el río Atoyac se mantuvieron en un rango entre 7.2 y 7.6.

El ORP presentó valores negativos en las ocho estaciones de muestreo con valores de -155.37 ± 8.33 a -9.27 ± 1.4 mV, lo que indica que el cauce del río es un ambiente reductor que se acentúa con la incorporación de descargas de agua residuales. La literatura refiere que el ORP en un cuerpo de agua dulce debe oscilar entre los 200 a 300 mV, mientras que en una descarga de tipo industrial este debe encontrarse entre 1 a 20 mV (Alley et al., 2000).

Los valores de oxígeno disuelto (OD) corroboraron las condiciones anóxicas del río Atoyac y Xochiac (*Tabla 6*). De acuerdo con la Ley Federal de Derechos en materia de Aguas Nacionales (LFD), los niveles de OD en cuerpos de agua deben encontrarse por arriba de los 5 mg/l (SEMARNAT, 2009). La concentración de oxígeno disuelto en presentó valores cercanos a cero en la mayoría de las estaciones, excepto en las estaciones DPCQ (0.85 mg/l), Xochiac (0.68 mg/l) y Confluencia (0.10 mg/l).

En cuanto a los sólidos disueltos totales (SDT) en las ocho estaciones el rango fue de 266 a 9764 ppm. Todas las estaciones rebasaron los límites máximos permitidos (LMP) en la legislación mexicana que determina 125 ppm de SDT en cuerpos de agua y 200 ppm de SDT descargas industriales (NOM 001-ECOL-1996 y LFD 2009). Las estaciones DPCQ,

DPVA y Xochiac presentaron los niveles más elevados 9764ppm, 916 ppm y 776 ppm, respectivamente.

Otro parámetro de gran relevancia en la determinación de calidad de agua superficial es la demanda química de oxígeno (DQO). Las estaciones de muestreo presentaron valores entre 85 y 1500 mg/l. El agua residual de los tubos de descarga presentó un rango de DQO entre 560 y 1500 mg/l. Particularmente, la estación DPCQ tuvo el valor más alto 1500mg/l. La DQO en las estaciones en el cauce de río fueron menores en comparación con las descargas (*Tabla 6*). De acuerdo con los datos de CONAGUA y el valor obtenido de DQO en este trabajo se puede establecer que la zona de muestreo del río Atoyac debe ser considerada fuertemente contaminada pues presentó valores de DQO mayores a 120 mg/l, en siete de ocho estaciones.

Los niveles de amonio, nitritos, nitratos y fosfato presentaron niveles altos en todas las estaciones de muestreo, rebasando la concentración máxima permitida de acuerdo con la LFD y la NOM-001-ECOL-1996 (*Tabla 6*).

Los compuestos cromados y el cromo VI se encontraron por arriba de los límites permisibles en las estaciones del cauce (*Tabla 6*). En el caso de las descargas los niveles permisibles no fueron rebasados para este parámetro. El aluminio tuvo niveles elevados en las estaciones DPCQ y Tepetitla. Los niveles de zinc y níquel se encontraron rebasando los límites permisibles en las cinco estaciones de cauce de río, mientras que en las estaciones de descarga estos parámetros no se encontraron rebasados (*Tabla 6*).

Como resultado del análisis de CA se demostró que las condiciones de las descargas son distintas de las del cauce (*Tabla 6*). Sin embargo, la estación Villa Alta a pesar de que se trata de una estación en el cauce del río, presenta características similares a las de una descarga industrial. Por otro lado, observamos que la DPCQ es única ya que comparte poco más del 75% de similitud con una descarga de tipo industrial. En general las características físico-químicas en las estaciones a lo largo del río Atoyac fueron muy similares entre sí (>92%), incluyendo a la estación del río Xochiac (*Fig. 7*).

Tabla 6. Parámetros físico-químicos evaluados en muestras de agua del río Atoyac y descargas industriales

(mg/l)*	Descargas			Cauce de ríos (Atoyac y Xochiac)					Límites permisibles ¹⁻²
	DPMO	DPCQ ³	DPVA	Villa Alta	San Rafael	Tepetitla	Río Xochiac	Confluencia	
Temperatura (°C)	21.08±0.0	37.03	20.46±0.84	18.85±0.91	18.77±0.34	18.84±0.0	19.71±2.28	19.40±0.09	±1.5°C (T.A) ¹ 40°C ²
pH	7.61±0.05	6.65	8.08±0.07	7.25±0.02	7.70±0.06	7.61±0.05	8.19±0.02	7.63±0.05	6.5-8.5 ¹⁻²
ORP	-269.5± 9.27	-67.20	-73.90±21.20	-65.23±29.56	-9.27±1.4	-155.37±8.33	-10.00±1.24	-10.90±2.55	
% saturación OD	0.00±0.0	17.40	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	9.73±0.72	1.47±2.28	
OD (mg/l)	0.00±0.0	0.84	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.68±0.01	0.10±0.16	5(mínimo) ¹
Conductividad (mS/cm)	1.21±0.43	19.53	1.83±0.66	0.84±0.05	1.02±0.02	0.53±0.0	1.55±0.05	1.08±0.03	
Resistividad (MO/cm)	0.00±0.0	0.00	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	
SDT (ppm)	623.33±19.70	9764.00	916.33±33.07	422.00±27.07	509.33±11.37	266.00±0.0	776.67±26.10	542.00±0.0	125-200 ²
Salinidad	0.26±0.0	11.41	0.93±0.35	0.42±0.03	0.51±0.01	0.26±0.0	0.78±0.03	0.54±0.02	
DQO (mg/l)	561.67±16.16	>1500.00	688.00±39.95	402.00±92.97	142.00±43.84	85.67±9.50	289.50±0.70	120.50±12.02	200 ¹
Amonio (NH ₃)	24.32±0.0	13.22	24.32±0.0	23.15±1.24	6.34±0.18	6.56±0.10	9.11±0.77	7.94±6.65	0.6 ^{1,2}
Nitrito (NO ₂)	29.67±4.50	28.00	29.00±2.0	18.33±11.24	16.50±12.02	2.00±1.0	21.50±4.95	31.00±19.79	5 ^{1,2}
Nitrato (NO ₃ -N)	19.47±4.13	9.60	20.83±7.96	7.83±3.36	6.10±3.11	4.87±3.66	2.60±0.28	29.80±2.54	5 ^{1,2}
Fosfato (PO ₄)	20.93±6.42	8.30	22.0±5.04	16.07±1.09	6.50±4.66	2.32±0.42	3.35±0.21	4.35±0.07	0.05 ^{1,2}
Aluminio (Al ³⁺)	0.08±0.01	0.15	0.06±0.02	0.03±0.0	0.03±0.0	0.11±0.07	0.02±0.0	0.03±0.0	0.05 ¹
Cromo VI (Cr ₆₊)	0.23±0.05	0.14	0.17±0.05	0.14±0.0	0.13±0.03	0.11±0.0	0.11±0.02	0.11±0.01	0.05 ¹ , 0.75 ²
Zinc (Zn)	0.04±0.02	0.70	0.04±0.06	0.08±0.13	0.50±0.56	0.01±0.01	0.02±0.02	0.25±0.10	0.02 ¹ , 9 ²
Níquel (Ni)	0.69±0.19	1.54	0.32±0.10	1.24±1.41	1.85±0.74	0.03±0.03	0.81±0.46	1.34±0.69	0.6 ¹ , 6 ²
Media ± e. e. Valores por arriba del límite permisible									
ORP (Potencial Oxido-Reducción); OD (Oxígeno Disuelto); SDT (Sólidos Disueltos Totales); DQO (Demanda Química de Oxígeno)									
*Si no se indican otras unidades, ¹ Ley Federal de Derechos, Disposiciones Aplicables en Materia de Aguas Nacionales(Usos III Protección a la vida acuática), ² NOM-001-ECOL-1996, ³ Muestra única									

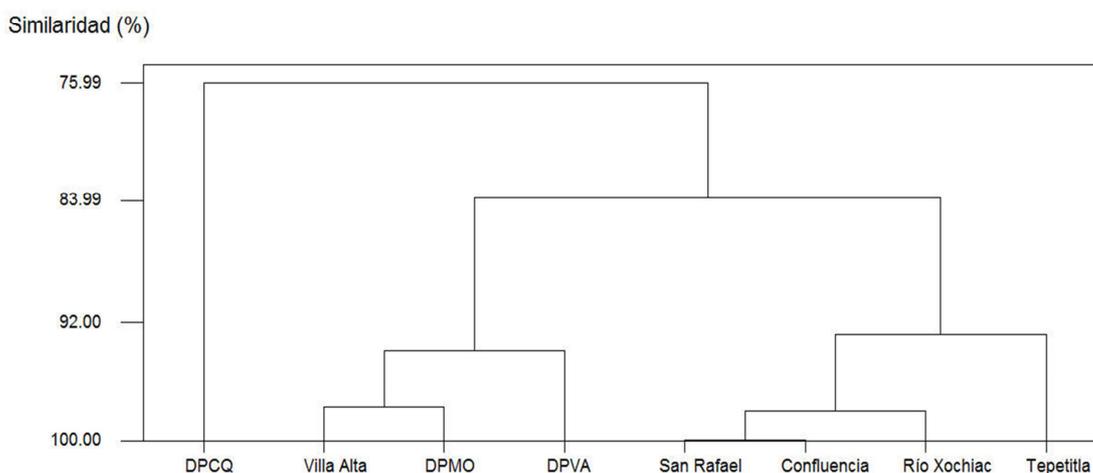


Figura 7. Conglomerado jerárquico en relación con los parámetros físico-químicos evaluados en muestras de agua del río Atoyac y descargas industriales

Dilución Letal 50 (DL₅₀)

La toxicidad de las muestras se evaluó estimando la dilución letal 50 (DL₅₀) en exposición aguda a las 72hpf. Las muestras de agua de las estaciones sobre el río Atoyac y las descargas industriales fueron tóxicas al 100%, es decir, muestras no diluidas. Los valores de la DL₅₀ estuvieron por debajo de la dilución 1:32 (equivalente al 3% de la muestra total), excepto por la estación Tepetitla cuyo valor de toxicidad de DL₅₀ fue obtenido en la preparación 11.31% (aproximadamente una dilución 1:8).

Los valores de la DL₅₀ en las estaciones DPCQ, DPVA y Villa Alta fueron 0.76%±0.56, 0.99%±0.34, 0.62%±0.38, respectivamente. Dado que estas estaciones mostraron valores menores al 1% de dilución de la muestra, encontramos que existe una elevada toxicidad de los componentes presentes en las muestra. Asimismo, la estación DPMO y las estaciones de cauce de río Tepetitla, San Rafael, Xochiac y Confluencia presentaron niveles de DL₅₀ de 1.21%±0.46, 11.31%±3.56, 2.80%±1.28, 2.25%±1.02, 1.61%±0.14, respectivamente, mostrando también una toxicidad elevada con valores no mayores al

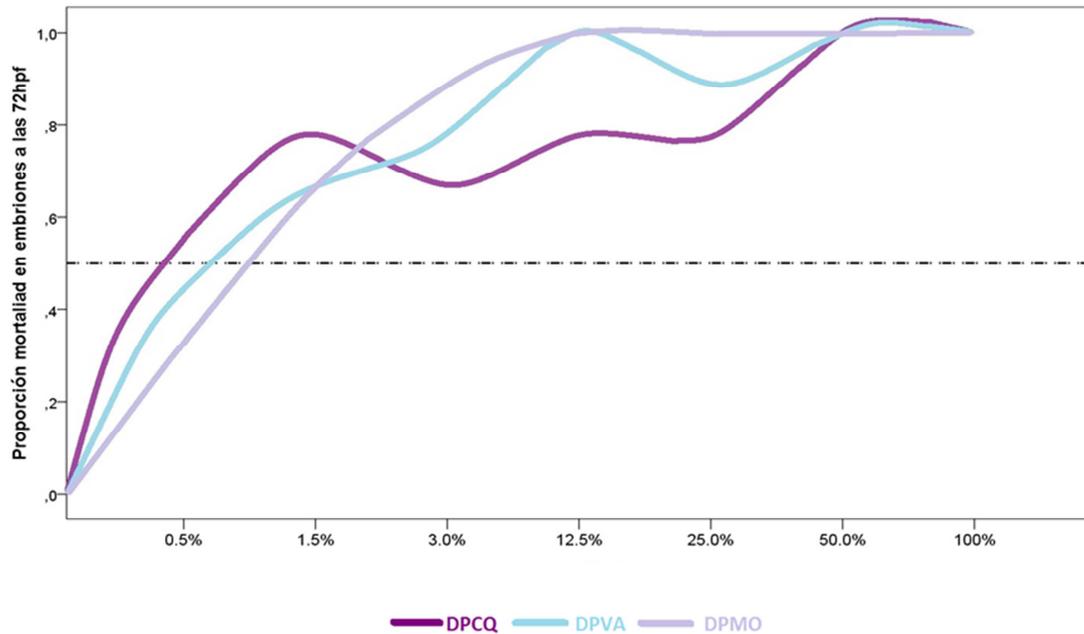


Figura 8. Estimación de curva de mortalidad en embriones expuestos por 72h a muestras de descargas industriales del río Atoyac. (----)Representa el valor de DL_{50} para cada estación, calculado por el Método Trimmed Sperarman-Karber.

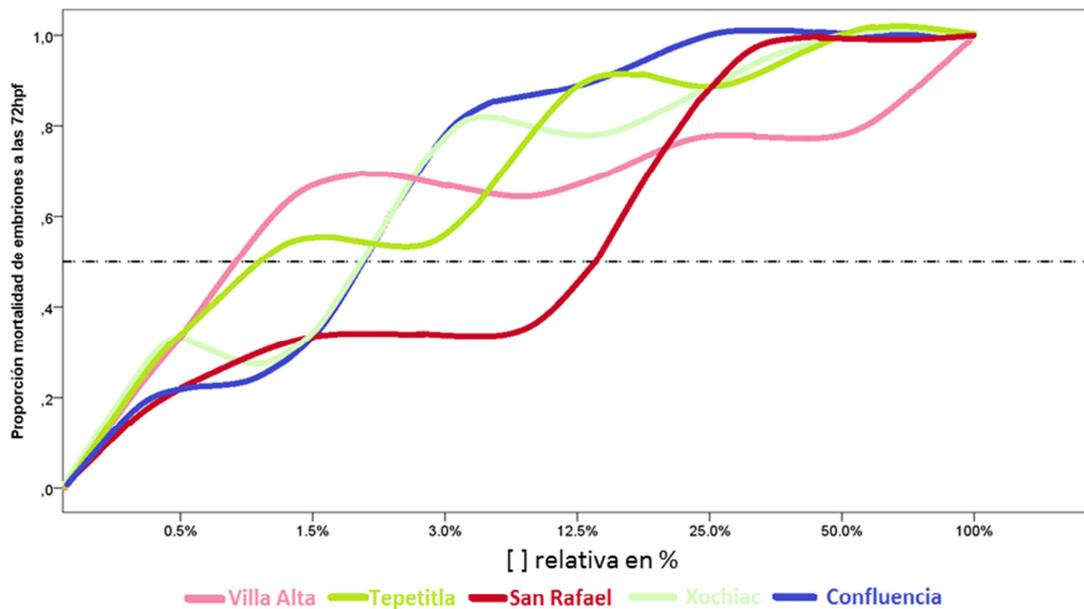


Figura 9. Estimación de curva de mortalidad en embriones expuestos por 72h a muestras de cauce del río Atoyac y Xochiac. (----)Representa el valor de DL_{50} para cada estación, calculado por el Método Trimmed Sperarman-Karber.

12% de dilución (Fig. 8 y 9). En consecuencia y considerando las condiciones físico-químicas de las muestras de agua, el río Atoyac presentó niveles considerablemente altos de toxicidad y contaminación, no compatibles con la vida de peces.

Alteraciones en el desarrollo embrionario

Las muestras presentaron una elevada toxicidad aun en diluciones por debajo del valor su de DL₅₀, presentando una baja supervivencia en embriones expuestos aún en diluciones del 20% del valor de DL₅₀ (tabla7). Las estaciones de descarga resultaron más tóxicas respecto a las estaciones de cauce.

Tabla 7. Supervivencia de embriones expuestos a diluciones seriales de muestras de descarga industriales y cauce del río Atoyac					
	N_{inicial} (2hpf)	24 hpf	48 hpf	72hpf	% Supervivencia 72 hpf
DPCQ					
0.2%	9	7	7	7	77.77
2%	9	7	7	7	77.77
10%	9	5	5	5	55.55
20%	9	Letal	Letal	Letal	Letal
DPMO					
0.2%	9	8	2	2	22.22
1%	9	7	2	2	22.22
2%	9	7	3	3	33.33
4%	9	Letal	Letal	letal	Letal
10%	9	Letal	Letal	letal	Letal
DPVA					
0.2%	9	6	6	6	66.66
1%	9	4	4	4	44.44
2%	9	2	2	2	22.22
20%	9	2	2	2	22.22
Villa Alta					
0.2%	9	7	6	6	66.66
2%	9	5	4	4	44.44
10%	9	2	2	2	22.22
20%	9	1	1	1	11.11

Tabla 7. Supervivencia de embriones expuestos a diluciones seriales de muestras de descarga industriales y cauce del río Atoyac (Continuación)

	N _{inicial} (2hpf)	24 hpf	48 hpf	72hpf	% Supervivencia 72 hpf
Tepetitla					
1%	9	7	7	7	77.77
2%	9	7	7	7	77.77
4%	9	6	6	6	66.66
10%	9	7	7	7	77.77
San Rafael					
0.2%	5	5	5	5	100,00
2%	5	4	4	4	80,00
4%	9	7	7	7	77.77
10%	9	6	6	6	66.66
20%	9	6	6	6	66.66
Confluencia					
0.2%	5	5	5	5	100.00
2%	5	5	5	5	100.00
4%	9	9	9	9	100.00
10%	9	8	5	5	55.55
20%	9	3	2	2	22.22
Xochiac					
0,20%	5	5	5	5	100.00
4%	9	6	6	6	66.66
10%	9	4	Letal	Letal	Letal
20%	9	Letal	Letal	Letal	Letal

Las muestras de todas las estaciones indujeron algún tipo de malformación en al menos una dilución entre las 24-72 hpf, registrando algunos embriones más de cinco malformaciones en un mismo organismo. DPVA, DPMO y Xochiac fueron las estaciones que mayor proporción de embriones malformados presentaron, siendo las malformaciones de torso y región caudal la más frecuentes para esta estación. Las estaciones DPCQ y San Rafael indujeron el mayor número de malformaciones de *ESV*. La estación Confluencia fue la que mayor proporción de embriones con malformación de región caudal presentó, además fue la única estación que no indujo malformaciones de

cabeza en los embriones expuestos. DPVA y Xochiac cuada la más indujo así como mayor porcentaje de malformaciones por embrión (Tabla 8 y Fig. 10). La mortalidad en las muestras DPCQ, DPVA y Villa Alta fue elevada (>30%) aún en diluciones por debajo de su valor de DL₅₀. En el grupo control no se observaron malformaciones en algún momento a lo largo del desarrollo embrionario (Tabla 8).

Tabla 8.No. de embriones malformados entre las 24y 72 hpf expuestos a muestras de descargas industriales y agua del río Atoyac y Xochiac México							
	Supervivencia 24 hpf	ESV	TORSO	CABEZA	CAUDA	*Total Malf.	Proporción
DPCQ	23	12	8	8	5	13	0,68
DPMO	22	13	16	16	18	19	0,86
DPVA	22	10	9	10	10	13	0,93
Villa Alta	15	5	9	11	11	12	0,80
Tepetitla	24	6	9	8	7	11	0,41
Confluencia	26	5	4	0	9	5	0,30
San Rafael	29	7	2	2	4	11	0,39
Xochiac	20	7	13	13	12	13	0,93
Control	58						
Total		65	70	68	76		
*Número total de embriones malformados,							

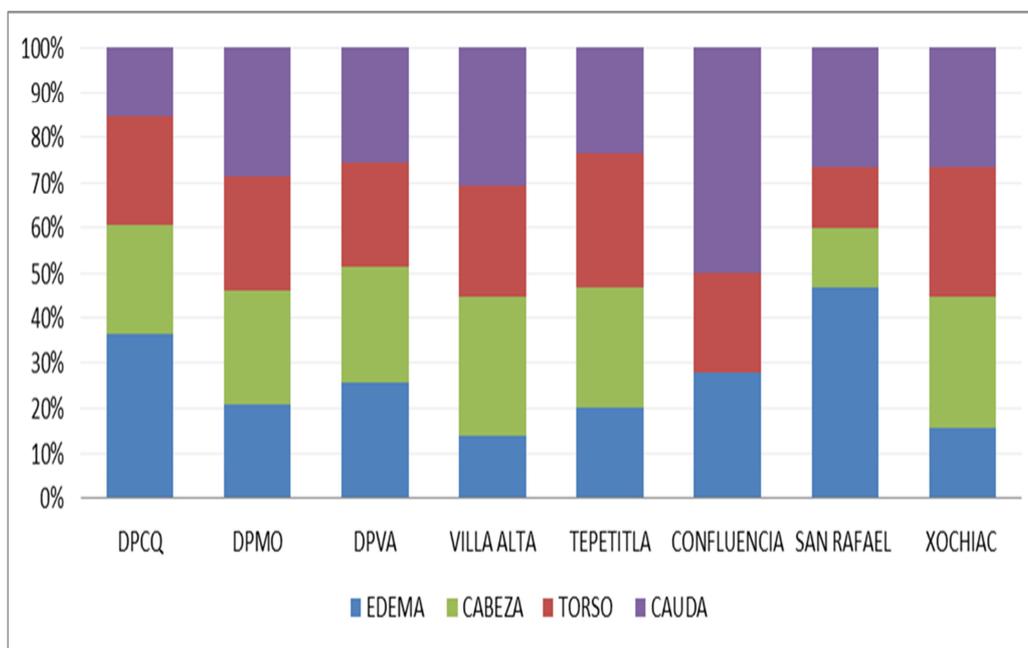


Figura 10. Porcentaje de malformaciones entre las 24 y 72 hpf .

Retraso en el desarrollo embrionario

De acuerdo con los datos recabados en la prueba de teratogénesis, la primera alteración en el desarrollo embrionario consistió en el retraso durante la fase de gástrula, es decir ausencia de epibolia al 90% (Kimmell et al., 1995); (Fig. 11). Las muestras de Villa Alta, DPCQ, Tepetitla y DPMO presentaron el mayor número de embriones con retraso entre el periodo de 9 a 72 hpf con respecto al grupo control ($H_7= 50.38$, $p<0.05$), que no presentó embriones con retraso. Contrariamente los embriones de las estaciones San Rafael y Confluencia presentaron menor número de embriones con retraso en el mismo periodo (Fig. 11 y 12).

Cabe mencionar que en las muestras de los sitios DPCQ y DPMO, específicamente en las proporciones al 0.2% y 2% respectivamente, se observó que los embriones se mantuvieron en un arresto embrionario hasta las 72hpf, sin presentar coagulación del huevo.

El arresto embrionario se define como la suspensión súbita del proceso de desarrollo embrionario. El primer reporte de este fenómeno fue hecho por Weiss et al. (1986), en donde indicaron que el embrión en arresto no presenta las características propias de un embrión muerto e inclusive en algunos casos el embrión puede reactivar el proceso de desarrollo. El retraso embrionario difiere en que los embriones no suspenden el proceso de desarrollo, éste simplemente ocurre de manera más lenta de lo normal.

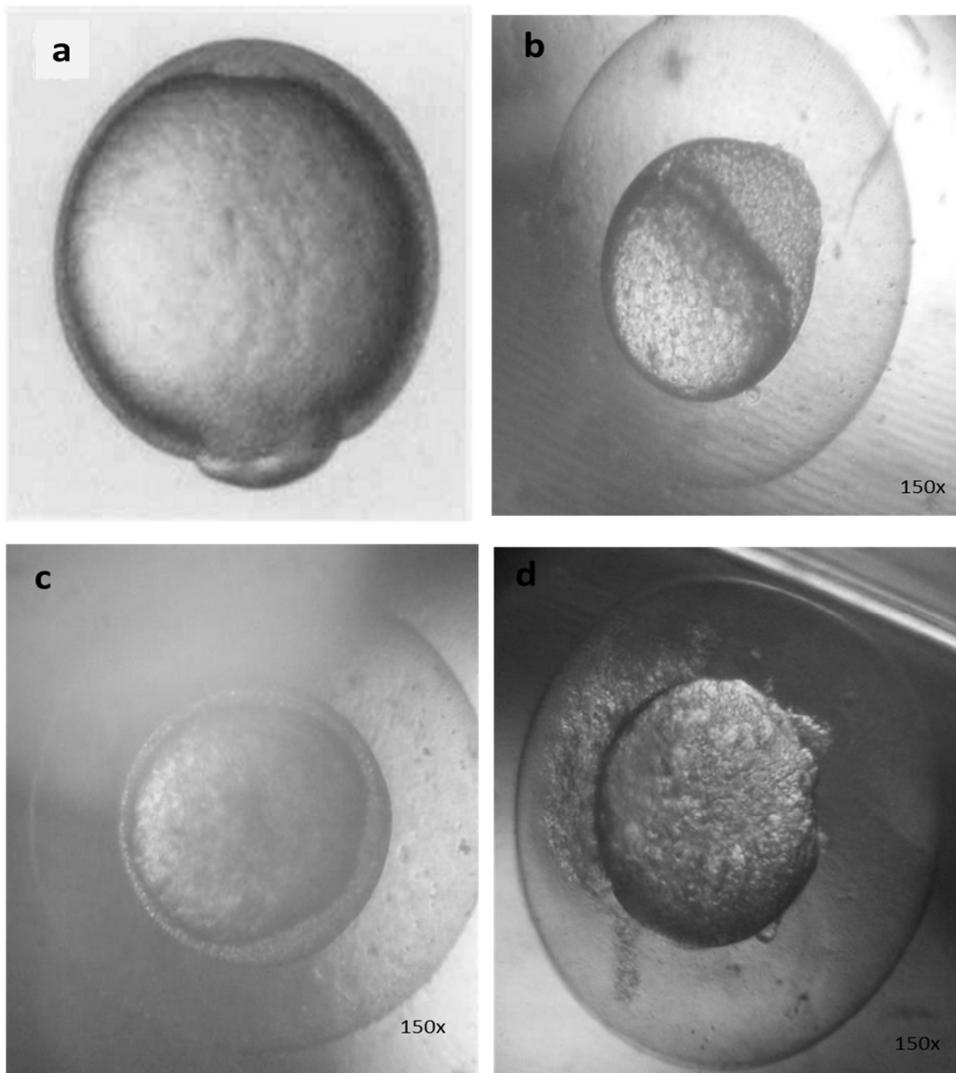


Figura 11. Embriones con retraso en la gástrula (ausencia del 90% epíbolia). (a) Embrión de 9hpf en epíbolia al 90% (Tomado de Kimmell 1995); (b) Retraso de 8hrs, estación (DPCQ 0.2%); (c) Retraso de 4.5hrs, estación (DPCQ 2%); (d) Retraso de 8.5hrs, estación (DPCQ 5%).

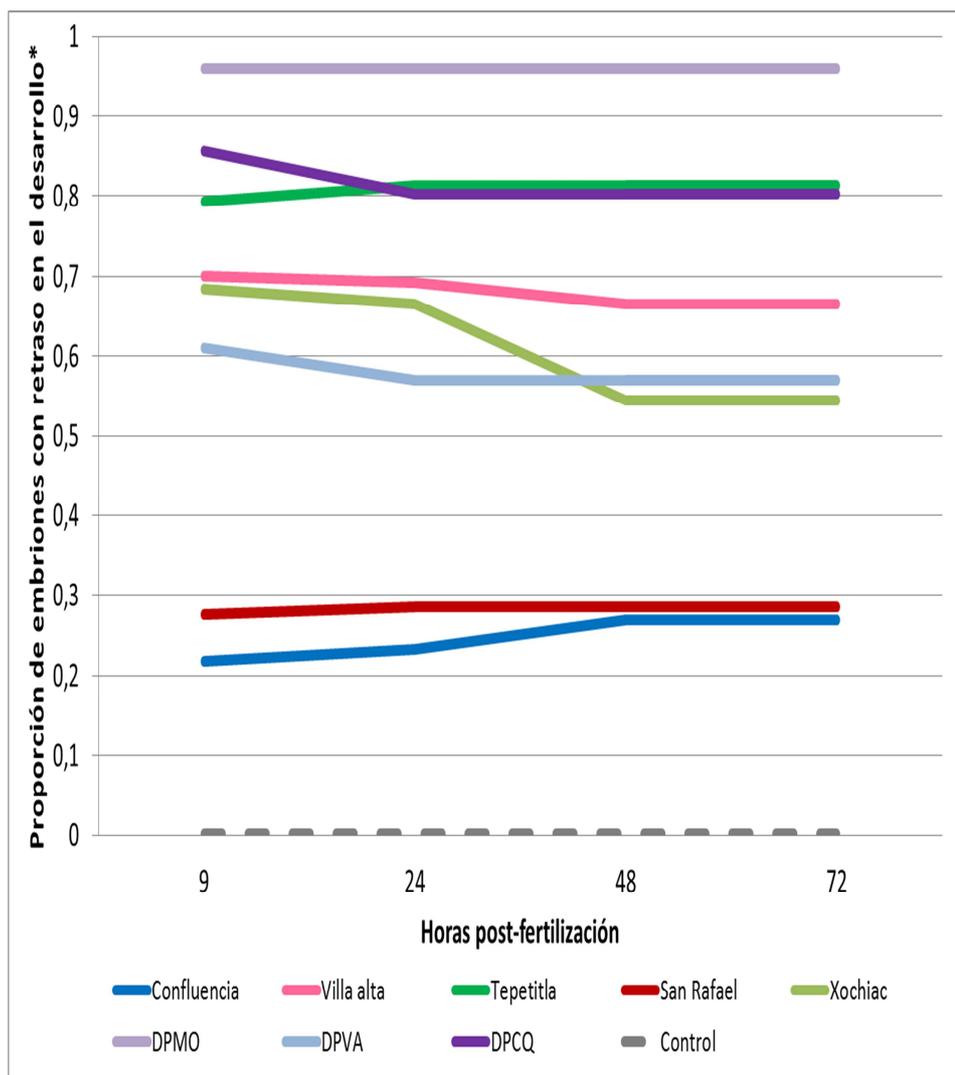


Figura 12. Proporción de embriones expuestos a muestras de cauce y descargas industriales con retraso en el desarrollo entre las 9 y 72 hpf. (Σ diluciones porcentuales de cada estación)

Edema de Saco Vitelino (ESV) a las 24 hpf

De las cinco malformaciones consideradas criterio (OECD, 2006, Yang et al, 2010), el *ESV* fue la malformación más frecuente en las ocho estaciones (Fig. 13). Las estaciones DPMO (1-2%), DPVA (1%), Villa Alta (0.2 y 10%) y Xochiac (1-20%) indujeron *ESV* en el 100% de los embriones expuestos a las diluciones indicadas entre paréntesis. Las

estaciones DPMO, DPVA y DPCQ indujeron mayor número de embriones con *ESV* en las diluciones 0.2-2%.

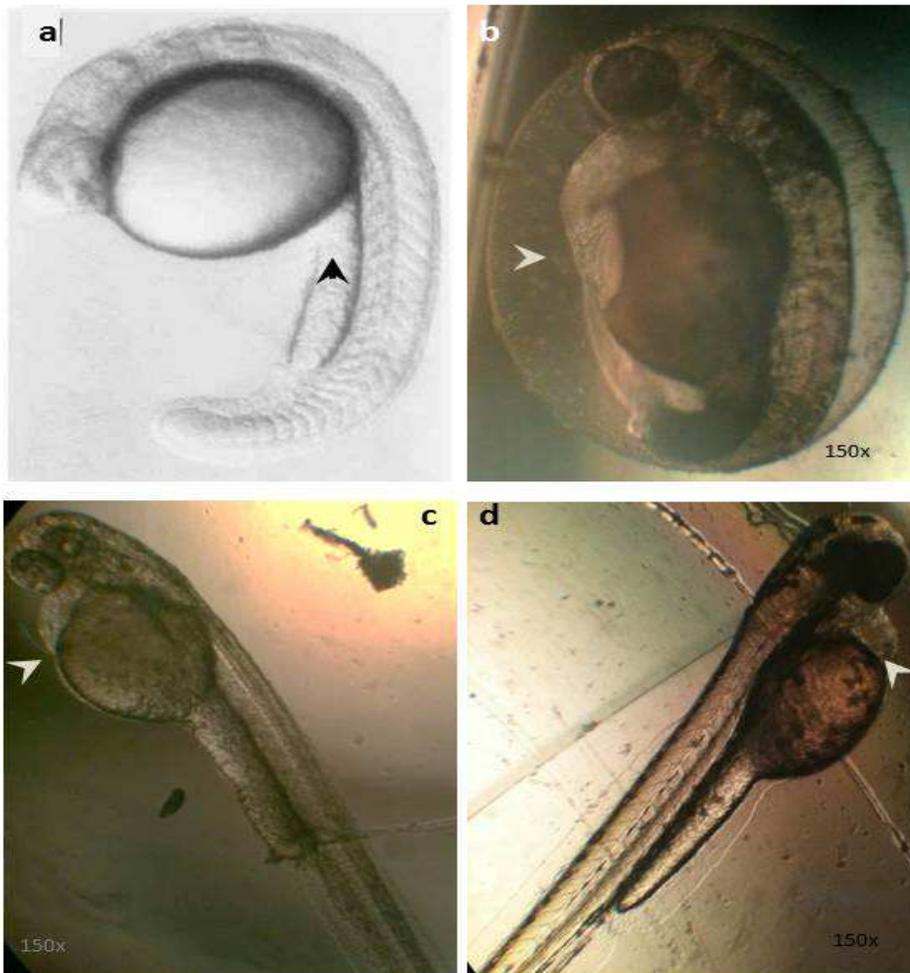


Figura 13. Embriones con edema de saco vitelino, las flechas señalan el *ESV*. **(a)** Embrión de 24hpf sin *ESV*, Flecha señala Saco vitelino (Tomado de Kimmell 1995); **(b)** Embrión de 72hpf con *ESV* hacia ventral, (DPMO 1%); **(c)** Embrión de 96hpf con *ESV* y pérdida de la circunferencia hacia dorsal del saco vitelino, (DPVA 20%); **(d)** Embrión de 72hpf con *ESV* hacia corazón, (Confluencia 4%)

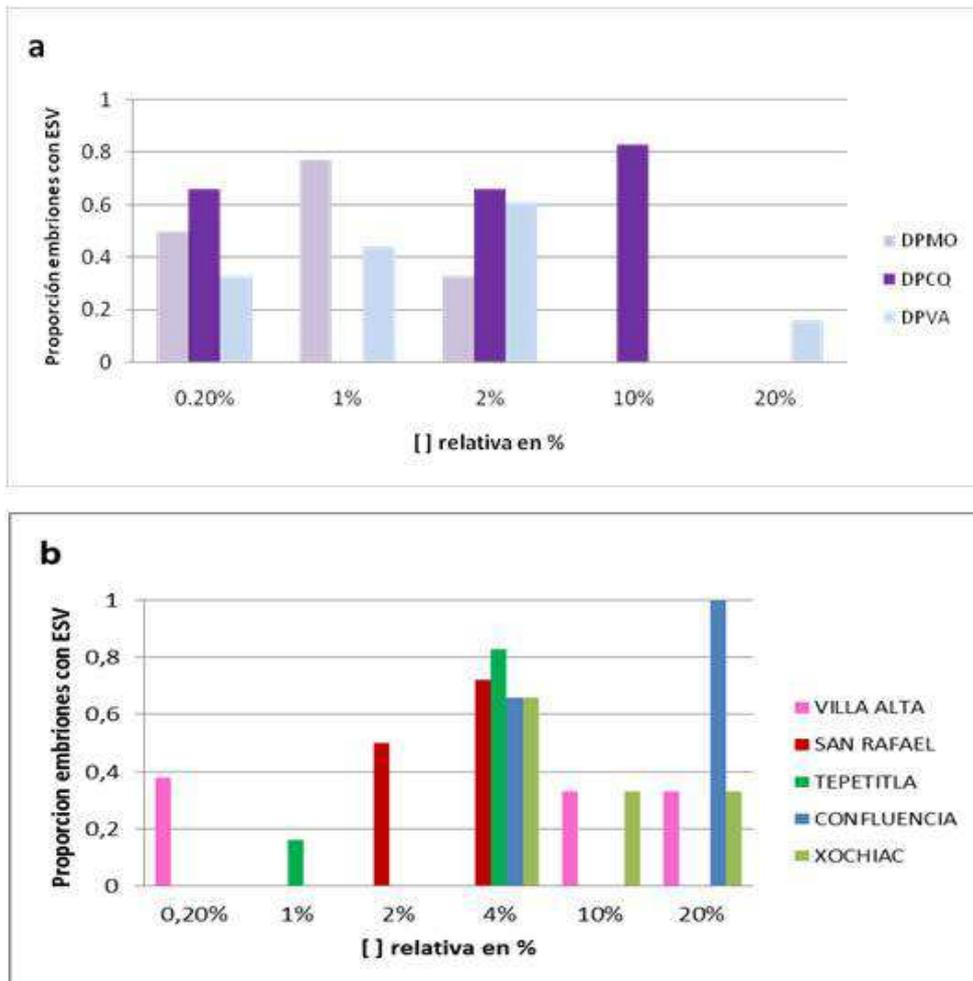


Tabla 9. Proporción embriones con edema de saco vitelino (ESV) a las 24 hpf (datos Gráfica a y b)

	DPMO	DPCQ	DPVA	VILLA ALTA	SAN RAFAEL	TEPETITLA	CONFLUENCIA	XOCHIAIC
0,20%	0,5	0,66	0,33	0,38	0	ND	0	0
1%	0,77	ND	0,44	ND	ND	0,16	ND	ND
2%	0,33	0,66	0,611	0	0,5	0	0	0
4%	Letal	ND	ND	ND	0,72	0,83	0,66	0,66
10%	Letal	0,83	ND	0,33	0	0	ND	0,33
20%	Letal	Letal	0,16	0,33	0	ND	1	0,33

Figura 14. Proporción de embriones con edema de saco vitelino (ESV) a las 24 hpf; (a) estaciones de descarga; (b) estaciones de cauce de ríos Atoyac y Xochiac; el grupo control no se presenta porque no se registro ESV.

Se observaron patrones dosis-respuesta en las estaciones Tepetitla (1-4%) y San Rafael (4-20%), la estación Confluencia únicamente indujo *ESV* al 4%. (Fig. 14). Las diluciones 2, 4 y 10% fueron significativamente diferentes al grupo control ($p < 0.05$).

Alteraciones en la formación de somitas a las 24 hpf

La malformación de somitas en embriones a las 24 hpf se presentó en menor proporción respecto al *ESV*. La malformación de número de somitas fue la más común, la falta de

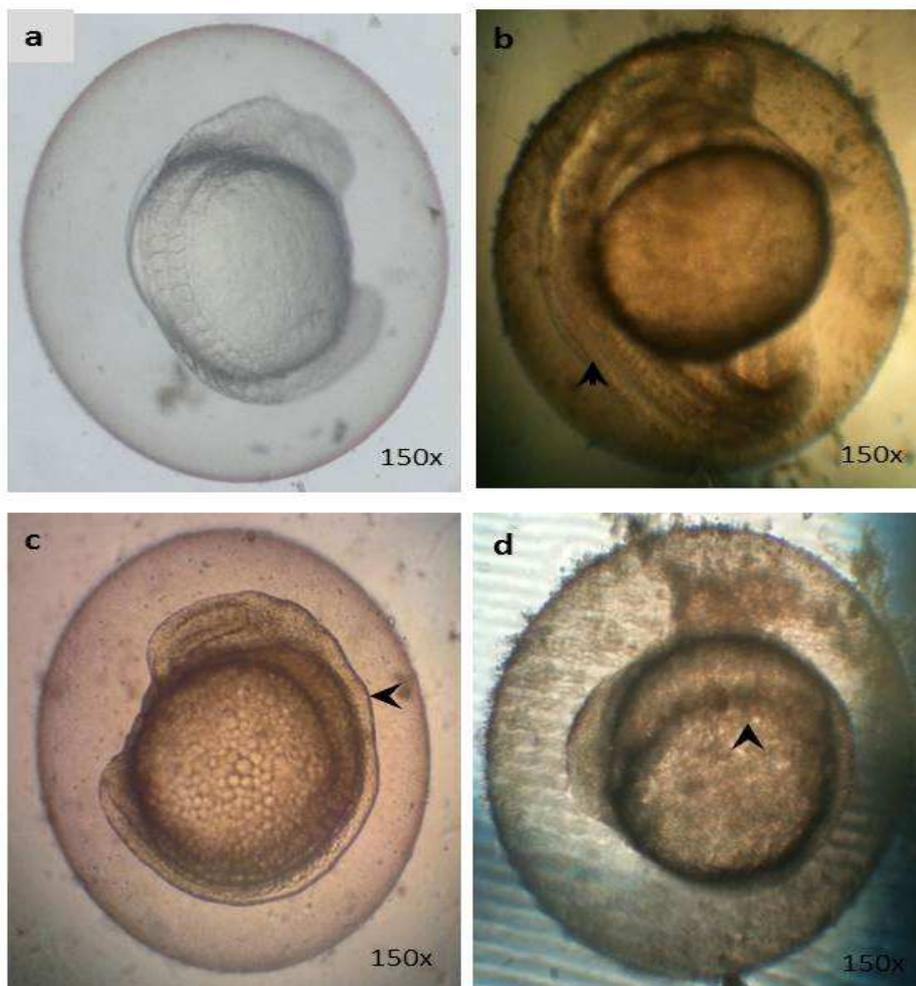


Figura 15. Embriones con malformación de somitas (flechas). (a) Embrión de 24 hpf con formación correcta de somitas; (b) Embrión de 72 hpf con somitas en dorsal asimétricas, (DPMO 1%); (c) Embrión de 24 hpf con menor número de somitas, (Villa Alta 10%); (d) Embrión de 24 hpf con ausencia de somitas, (Tepetitla 2%).

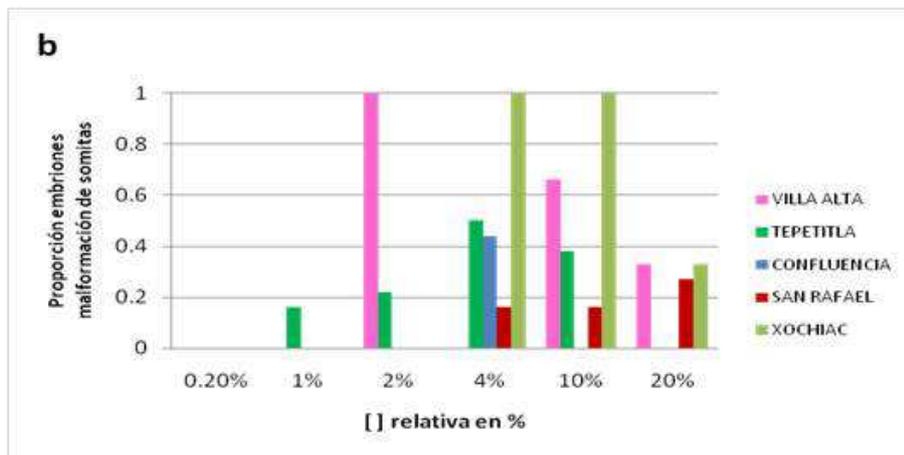
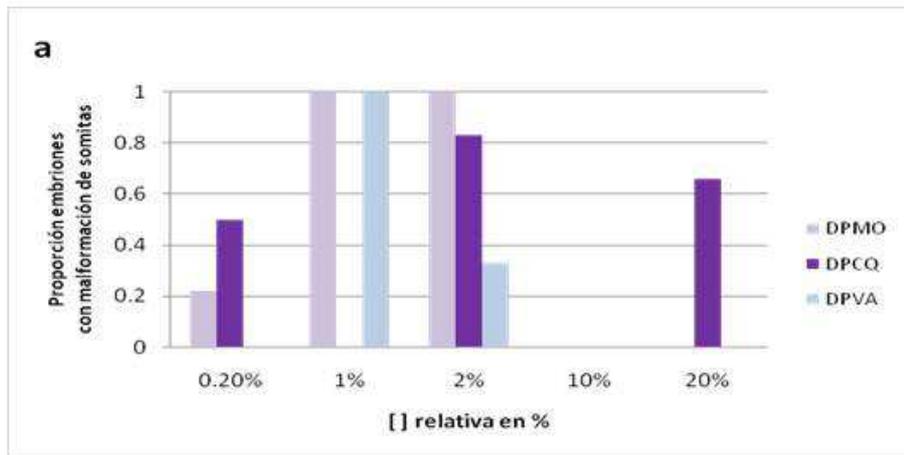


Tabla 10. Proporción embriones malformación de somitas a las 24 hpf (datos Gráfica a y b)

	DPMO	DPCQ	DPVA	VILLA ALTA	TEPETITLA	CONFLUENCIA	SAN RAFAEL	XOCHIAC
0,20%	0,22	0,5	0	0	ND	0	0	0
1%	1	ND	1	ND	0,16	0	ND	ND
2%	1	0,83	0,33	1	0,22	ND	0	0
4%	Letal	ND	ND	ND	0,5	0,44	0,16	1
10%	Letal	0,66	ND	0,66	0,38	0	0,16	1
20%	Letal	Letal	0	0,33	ND	0	0,27	0,33

Figura 16. Proporción de embriones con malformación de somitas a las 24 hpf; (a) estaciones de descarga; (b) estaciones de cauce de ríos Atoyac y Xochiac; el grupo control no se presenta porque no se registraron malformaciones de somitas.

somitas a las 48 hpf fue letal en embriones con retraso en el desarrollo. Todas las estaciones, excepto San Rafael, indujeron algún tipo de malformación (Fig.16). Los organismos expuestos a las muestras de Villa Alta y Confluencia tuvieron un patrón dosis respuesta en el rango de diluciones 2 a 20%. Sólo las muestras de descarga presentaron malformaciones de somitas en la dilución 0.20% (Fig. 15 y 16).

Alteraciones en la formación de cabeza a las 24 hpf

En todos los grupos expuestos se observó al menos un tipo de malformación en cabeza a las 24hpf (Fig. 17). Los embriones que presentaron malformaciones en cabeza entre las 24 y 48hpf no sobrevivieron.

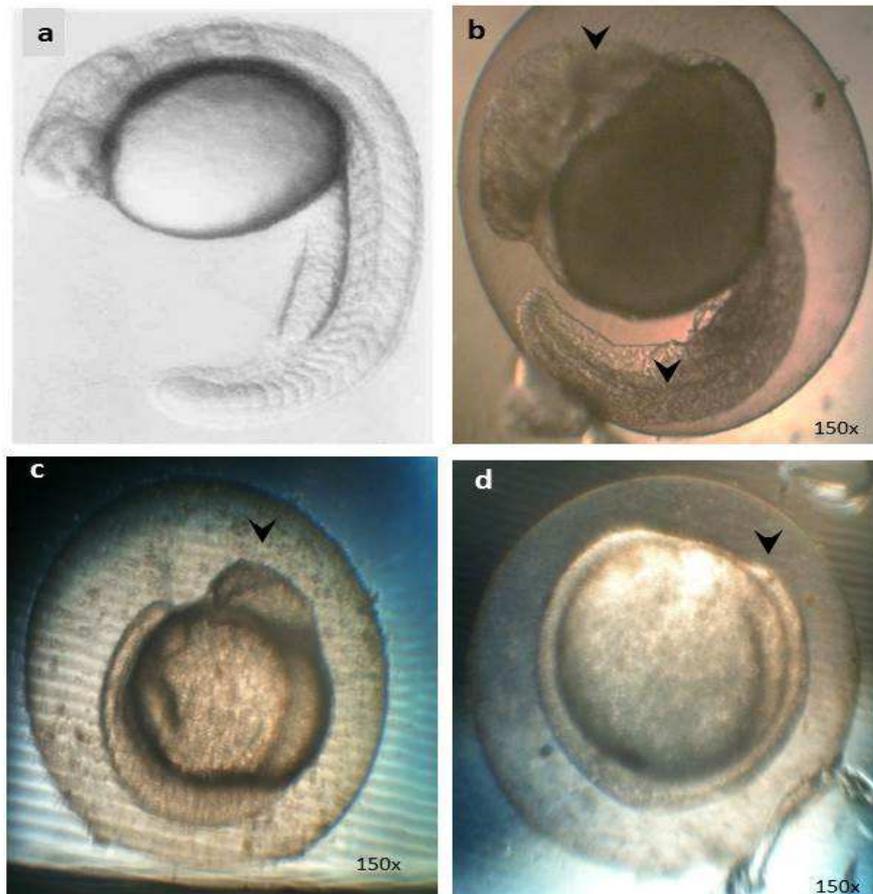


Figura 17. Embriones con malformación de cabeza. (a) Embrión de 24 hpf con formación correcta de cabeza (Tomado de Kimmell 1995); (b) Embrión de 72 hpf con ausencia de ojo derecho, (DPMO 1%); (c) Embrión de 72 hpf con ausencia de ojos y otolito, (DPCQ 5%); (d) Embrión de 48 hpf con ausencia de cabeza, (Tepetitla 2%).

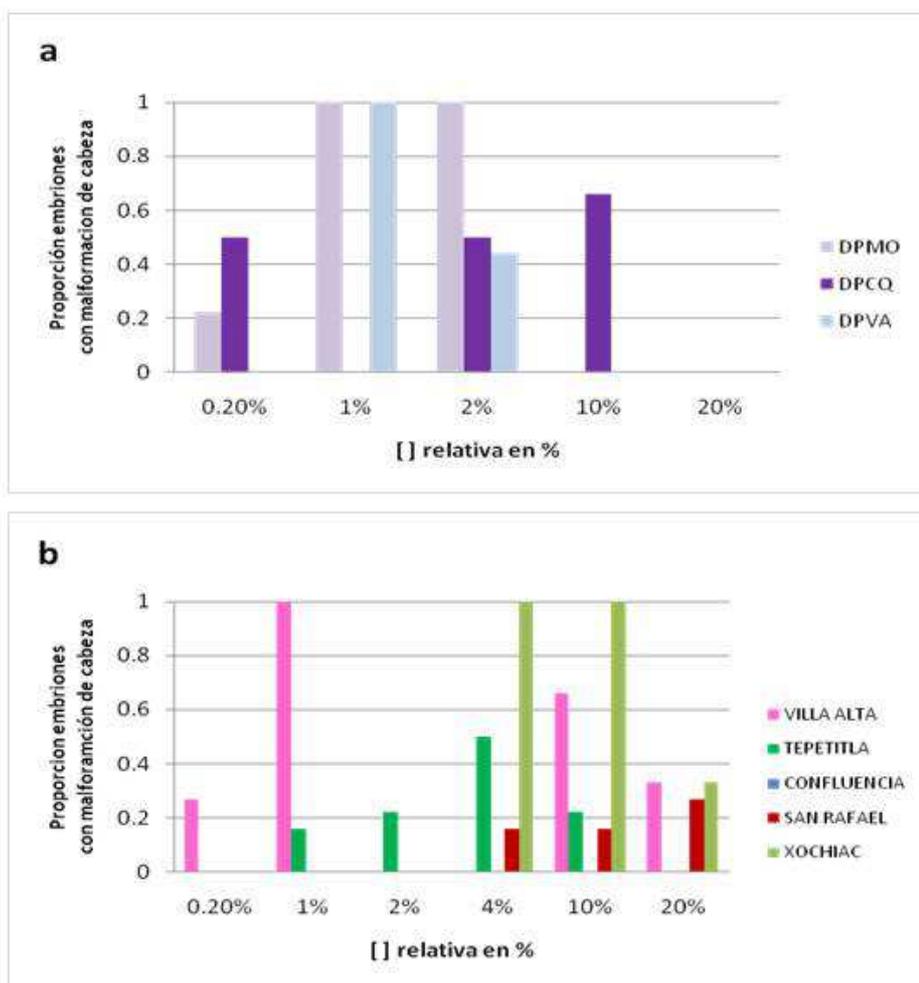


Tabla 11. Proporción embriones malformación de cabeza a las 24 hpf (datos Gráfica a y b)

	DPMO	DPCQ	DPVA	VILLA ALTA	TEPETITLA	CONFLUENCIA	SAN RAFAEL	XOCHIAC
0,20%	0,22	0,5	0	0,27	ND	0	0	0
1%	1	ND	1	1	0,16	0	ND	ND
2%	1	0,5	0,44	0	0,22	ND	0	0
4%	Letal	ND	ND	ND	0,5	0	0,16	1
10%	Letal	0,66	ND	0,66	0,22	0	0,16	1
20%	Letal	Letal	0	0,33	ND	0	0,27	0,33

Figura 18. Proporción de embriones con malformación de cabeza a las 24 hpf; (a) estaciones de descarga; (b) estaciones de cauce de ríos Atoyac y Xochiac; el grupo control no se presenta porque no se registraron malformaciones en cabeza.

La formación incorrecta de ojos fue la segunda malformación de cabeza más común, esta malformación resultó más evidente en etapas posteriores del desarrollo y fueron las malformaciones más comunes. Se indujo un patrón de dosis respuesta en las diluciones 1-4% y 4-10% de las estaciones Tepetitla y San Rafael, respectivamente.

Las muestras de las estaciones Xochiac y Confluencia indujeron malformaciones de cabeza en el rango de diluciones de 4 a 20% únicamente. Mientras que las muestras de descarga y Villa Alta indujeron malformaciones de cabeza, indistintamente de la dilución. (Fig. 18).

Alteraciones en la formación de región caudal a las 72 hpf

En cuanto a las malformaciones de cauda evaluadas a las 72hpf, los grupos expuestos presentaron malformación en varias diluciones (Fig. 19). En las muestras de las estaciones DPMO, San Rafael y Tepetitla se observó un efecto dosis respuesta en diluciones por abajo del 10%. Los embriones expuestos a las muestras de la estación Xochiac presentaron malformaciones únicamente en las diluciones 10 y 20%. Las muestras de las estaciones DPVA, DPCQ y Villa Alta fueron las únicas que indujeron malformaciones de cauda en diluciones menores a 2% de dilución (Fig. 20).

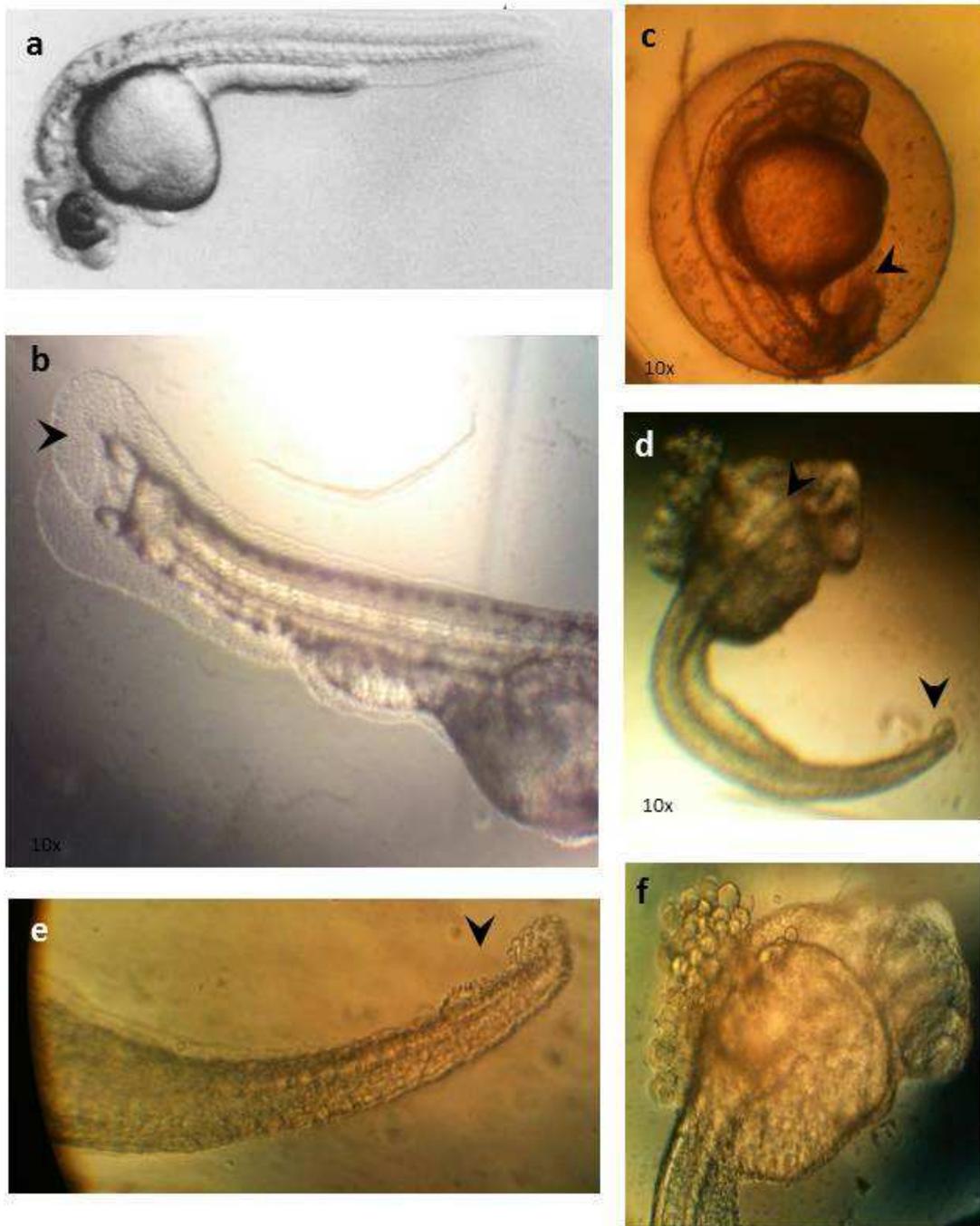


Figura 19. Embriones con malformación de región caudal (flechas). (a) Embrión de 72 hpf con formación correcta región caudal (Tomado de Kimmell 1995); (b) Embrión de 72 hpf con bifurcación terminal de región caudal y apéndices terminales en cauda, (DPCQ 0.2%); (c) Embrión de 72 hpf con región caudal con terminaciones anexas filamentosas, (DPVA 2%); (d-f) Embrión de 48 hpf con ensanchamiento de cauda hacia la zona media, terminación en forma de muñón, (Tepetitla 4%).

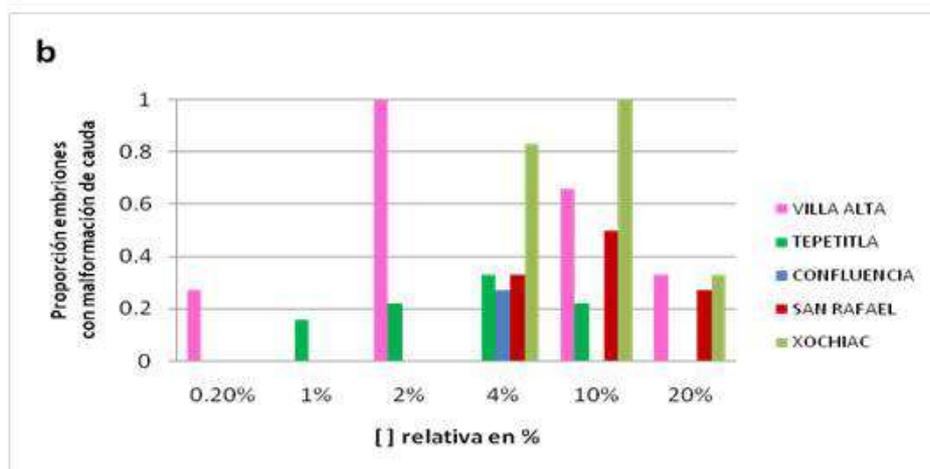
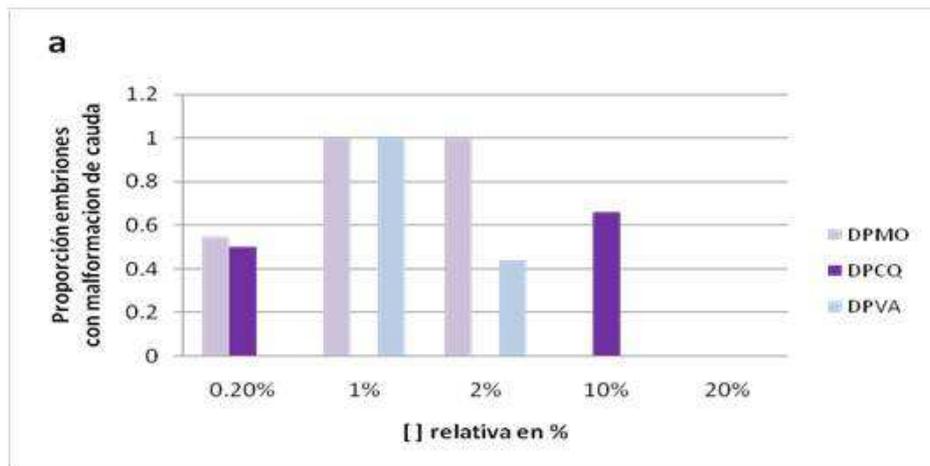


Tabla #. Proporción embriones malformación de cauda a las 72 hpf (datos Gráfica a y b)

	DPMO	DPCQ	DPVA	VILLA ALTA	TEPETITLA	CONFLUENCIA	SAN RAFAEL	XOCHIAC
0,20%	0,22	0,5	0	0,27	ND	0	0	0
1%	1	ND	1	1	0,16	0	ND	ND
2%	1	0,5	0,44	0	0,22	ND	0	0
4%	Letal	ND	ND	ND	0,5	0	0,16	1
10%	Letal	0,66	ND	0,66	0,22	0	0,16	1
20%	Letal	Letal	0	0,33	ND	0	0,27	0,33

Figura 20 . Proporción de embriones con malformación en región caudal a las 72 hpf; (a) estaciones de descarga; (b) estaciones de cauce de ríos Atoyac y Xochiac; el grupo control no se presenta porque no se registraron malformaciones en región caudal.

Análisis de Frecuencia cardiaca media (fc)

En comparación con el grupo control, todos los embriones expuestos presentaron una *fc* menor con excepción de los expuestos a la muestra de la estación Villa Alta. Los valores más bajos de *fc* lo registraron los embriones expuestos a las muestras provenientes de descargas industriales DPMO, DPCQ, y DPVA (Fig. 21).

Tabla 13. Frecuencia cardiaca media (fc) en embriones de pez cebra expuestos a muestras de agua del río Atoyac y descargas industriales.							
	hpf	Control	0.2%	2%	4%	10%	20%
DPCQ	24	58,42 ±1.0	53,50 ±0.6*	54,00 ±1.1*			
	48	72,71 ±0.8	64,50 ±6.1	57,33 ±3.8*	ND	NB	LETAL
	72	91,00±0.6	69,25 ±2.4*	68,00±1.5*			
DPVA	24	54,50 ±0.8	53,66 ±0.9	55.00*			55.50 ±1.5
	48	66,50 ±0.5	61,66 ±1.4*	67.00*	ND	ND	59.00 ±8.0
	72	91,33 ±0.6	84,33 ±4.2	71.00*			73.00 ±0.0*
Villa Alta	24	55,20 ±0.4	54,75 ±0.8				
	48	76,28 ±1.0	70,00 ±1.7	NB	ND	NB	NB
	72	90,20 ±1.0	100,00 ±1.0*				
Tepetitla	24	53,71 ±0.8			56.00*	46.00 ±2.0*	
	48	76,28 ±0.9			57.33*	57.20 ±5.6*	ND
	72	90,28 ±0.7	ND	NB	78.00*	84.60 ±3.7	
San Rafael	24	52,85 ±1.5	56,20 ±0.7	55.00 ±0.7	54.25 ±0.4	50.50 ±3.5	48.50 ±1.7
	48	68,42 ±1.9	71.00 ±0.8	69.50 ±0.2	65.25 ±2.7	60.00 ±1.0	54.75 ±0.8*
	72	90,00 ±0.9	86.80 ±2.0	89.00 ±1.3	79.75 ±4.4*	64.00 ±1.00*	62.75 ±0.6*
Xochiac	24	55,20 ±0.4	58.40 ±0.4*		48.00*		
	48	71,00 ±1.0	65.40 ±0.5*		55.00*		
	72	90,20 ±1.0	85.60 ±2.0*	ND	61.00*	NB	NB
Confluencia	24	53,71 ±0.5	53.6 ±1.3	57.20 ±0.7*	54.16 ±0.6	53.00 ±1.3	57.00 ±8.0
	48	73,71 ±0.6	71.80 ±0.5	70.60 ±1.2*	69.33 ±0.6*	55.40 ±1.2*	62.50 ±9.5
	72	90,28 ±0.7	90.20 ±1.0	87.80 ±0.8	85.66 ±1.9*	64.20 ±1.7*	72.00 ±13.0*

Media ± e.e., * $p < 0.05$; ° Únicamente un valor (n=1); ND (Diluciones no realizadas); NB (Datos no balanceados para los tres tiempos de evaluación); DPMO, no se incluyó en el análisis (n=1).

Los embriones expuestos a las muestras de las estaciones Tepetitla y Xochiac presentaron diferencias significativas respecto al grupo control a las 24 hrs ($U=46.50$ y 77.00 , $p < 0.005$). Los embriones expuestos a la muestra de la estación Villa Alta no presentaron diferencias significativas respecto al grupo control a las 48 y 72 hpf ($U=368.00$ y 191.50 , $p > 0.05$). De igual manera los embriones expuestos a la muestra de la estación DPVA tampoco presentaron diferencias a las 72 hpf ($U=200.50$, $p > 0.05$).

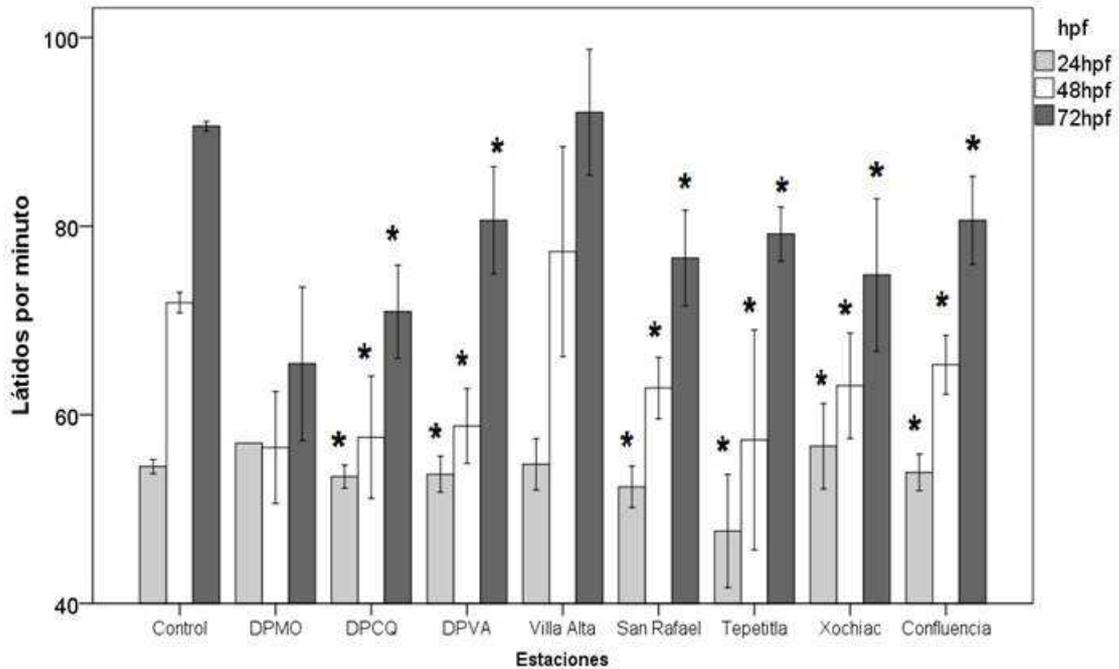


Figura 21. Frecuencia cardiaca media (fc) en embriones de pez cebrá expuestos a muestras de agua del río Atoyac y descargas industriales (Media \pm e.e.). * $p < 0.05$ con respecto a su control correspondiente en tiempo.

Los cambios en el valor de fc a las 24-48hpf y entre 48-72hpf fueron significativamente diferentes entre las ocho estaciones y el grupo control ($Z = -9.817$ y -9.87 , $p < 0.05$). La estación de DPCQ indujo diferencias significativas respecto al grupo control en diluciones menores al 2% a las 24hpf. Los embriones expuestos en las muestras de las estaciones Xochiac y Confluencia presentaron diferencias significativas a las 24hpf en las diluciones 0.2% y 2%, respectivamente (Tabla 13).

VII. Discusión

En una descarga industrial se pueden detectar más de 200 sustancias químicas diferentes que interactúan entre sí formando mezclas complejas, representando un riesgo para el ambiente y la salud. El uso de modelos vertebrados como el pez cebra (*Danio rerio*) es una herramienta útil para el estudio de efectos adversos a la salud principalmente en etapas vulnerables como el desarrollo embrionario. El río Atoyac en la zona industrial Puebla-Tlaxcala, México es un cuerpo de agua fuertemente contaminado debido a que constantemente recibe poco más de 23 descargas industriales, en las que se han identificado alrededor de 98 sustancias químicas diferentes.

De acuerdo con los resultados de este trabajo, las estaciones de muestreo presentan niveles altos de contaminantes. Las muestras de agua de las estaciones rebasaron los límites máximos permisibles en los compuestos nitrogenados y fosfatos, de acuerdo a la LFD en materia de aguas. Sin embargo, es de llamar la atención que las estaciones de grupo I (estaciones de cauce) rebasaron los parámetros de: metales pesados, mientras que en el grupo 2 (estaciones de descarga industrial) los valores fueron menores a límites máximos permisibles para descargas (NOM-001-ECOL-1996). Lo anterior puede ser una consecuencia de un sesgo en el muestreo el cual se realizó durante el día, mientras que las industrias descargan principalmente durante la noche.

Los valores obtenidos en este trabajo resultan similares a los reportados en trabajos previos de SEMARNAT(1996, 2005) y CONAGUA(2008) particularmente para las estaciones del grupo I (cauce). En este trabajo se encontraron en un rango más elevado la mayoría de los parámetros en las estaciones del grupo II (descargas), sobre todo para los parámetros de DQO y SDT reportados en trabajos previos (SEMARNAT, 1996, 2005; CONAGUA 2008).

Los datos obtenidos en el muestreo se deben considerar como muestras puntuales puesto que en los registros de los parámetros físico-químicos actúan variables ambientales como la estacionalidad, hora de colecta, método de colecta, o las

características de la misma descarga. La época en la que se colecta una muestra o un registro puede influenciar los valores de los parámetros, a consecuencia de efectos de dilución por lluvias o al contrario cuando se presentan altas temperaturas. El método de colecta y de registro es también una variable en los datos debido a la sensibilidad de los sistemas de medición. Por otro lado, la misma naturaleza de las descargas es las que más aporte en la variación pueden introducir en la lectura de los parámetros físico-químicos. Lo anterior debido a que las sustancias en la mezcla de la descarga pueden variar en composición, concentración e interacciones de acuerdo a los procesos industriales que las originan. En su mayoría las muestras de descarga evaluadas en este trabajo provienen de colectores de descarga de diferentes industrias que convergen en un mismo tubo, haciendo más compleja la mezcla que es vertida al río.

A pesar de estas variaciones es evidente que las constantes descargas industriales han rebasado desde hace más de 10 años los límites máximos permitidos para diferentes compuestos mermando con ello la calidad del agua y provocando así un deterioro en el río Atoyac. En 2005, SEMARNAT clasificó al río Atoyac como un cuerpo de agua fuertemente contaminado y estableció como prioridad su saneamiento en un periodo no mayor a 10 años. Para el 2008 el análisis de riesgo sanitario y ambiental realizado por la CONAGUA reportó la presencia de 97 sustancias tóxicas como: VOC's, PAH's y metales pesados. En dicho trabajo se asignó un Índice de peligrosidad de valor de 38 (máximo 50) a la zona correspondiente al municipio de San Martín Texmelucan, esto debido a la presencia de sustancias tóxicas y elevada contaminación en el cauce del río Atoyac (CONAGUA 2008).

Actualmente la NOM-001-ECOL-1996 y la LFD en materia de calidad de agua poseen un número limitado de parámetros, en este trabajo sólo 10 de los 26 parámetros evaluados tuvieron una referencia. Los niveles permisibles en norma y en la ley deben ser revisados y corregidos a niveles más bajos. Además de establecer vínculos entre normas para una mejor gestión de sustancias peligrosas como lo son las normas NOM-052-SEMARNAT-2005, NOM-055-SEMARNAT-2003, NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, NOM-058-SEMARNAT-1993 y NOM-018-STPS-2000 para establecer que ningún residuo industrial peligroso sea vertido en aguas nacionales.

La toxicidad de las muestras de agua fue elevada en todas las estaciones. Al igual que el análisis de conglomerado de calidad de agua, los valores DL_{50} se agruparon de manera similar. Grupo I estaciones de cauce y Grupo II estaciones de descarga y estación Villa Alta. La obtención de valores de DL_{50} en cuerpos de agua, es apenas una herramienta emergente en el análisis de calidad de agua, por lo que existen pocos trabajos que incorporen este ensayo. Villegas et al (2001) obtuvieron valores de DL_{50} similares a los obtenidos en este trabajo, con el modelo de *D. magna* a las 24 y 48hrs, en muestras de diferentes industrias del ramo textil en la zona de Puebla.

De manera general un cuerpo natural de agua no debería tener un valor DL_{50} para ningún organismo. El valor de DL_{50} de la estación Tepetitla fue el valor menos tóxico con una dilución de 12% de dilución a partir de la muestra. Sin embargo, este valor resulta alto para ser una estación intermedia sin aparentes descargas industriales, probablemente las estaciones Tepetitla y Xochiac, incorporan en el trayecto del río descargas no evaluadas en este trabajo o bien, clandestinas. A no más de 10 m de distancia de la ribera de estas estaciones se observó también la presencia de cultivos que podrían aportar al cauce sustancias como plaguicidas y fertilizantes que podrían influir en la toxicidad de las muestras. Sin embargo, la toxicidad de estas muestras puede que sea una consecuencia de la fuerte contaminación generada río arriba por la incorporación constante de descargas industriales al cauce de los ríos Atoyac y Xochiac. Los elevados niveles de toxicidad en las muestras de cauce indican que la contaminación en el agua del río la hace muy semejante a una descarga de tipo industrial.

Los reporte por trabajos previos en la zona hacen evidente presencia de sustancias tóxicas en el cauce y descargas de la zona de muestreo en este trabajo, así como la asociación de estas sustancias con riesgos a la salud y el ambiente en poblaciones humanas y no humanas, hacen del río un tema de discusión en materia del manejo, regulación y disposición de estas sustancias cuyo principal origen es el sector industrial en la zona. Es una prioridad establecer la distribución de estos contaminantes en agua y aire en la zona. Si bien desde el 2005, el río fue reconocido como un río de prioridad para su saneamiento, a casi 10 años, los reportes de sustancias tóxicas en el río no han

presentado disminuciones significativas en el número de descargas, cantidad de sustancias o un aumento en el número de industrias que reportan al Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes (RETC). En los más de 2031 km de cauce del río Atoyac sólo se reportan 5 descargas (RETC 2005).

El planteamiento de este trabajo fue el diseño de una prueba que permitiera la evaluación de efectos teratogénicos. En este trabajo todas las estaciones de cauce indujeron algún tipo de efecto teratogénico y alteraciones en la *fc* en diluciones muy cercanas al valor de DL_{50} de cada estación. Las estaciones de descarga y la estación Villa Alta indujeron en menor número embriones malformados respecto a las estaciones de cauce, sin embargo se presentaron mayor número de malformaciones en los embriones expuestos, esto debido a la elevada toxicidad de las muestras y a la letalidad de las malformaciones presentadas a las 24 hpf. Solo en las estaciones de cauce se indujo un efecto dosis-respuesta para un tipo particular de daño teratogénico, mientras que las estaciones de descarga los efectos teratogénicos se indujeron indistintamente de la dilución de cada muestra. En un nuevo diseño experimental es recomendable evaluar la incidencia de daño teratogénico en embriones muertos en el ensayo de DL_{50} a fin de recabar la mayor información posible, así como establecer ventanas de exposición en puntos críticos de la morfogénesis.

La organogénesis y la morfogénesis durante el desarrollo embrionario son puntos críticos. En el caso del pez cebra ocurren una serie de cambios en la expresión génica, que favorecen o no la correcta migración celular en el embrión, así como diversos procesos de apoptosis y diferenciación (Mendelsohn et al., 2008).

Entre las 9 y 24hpf fue el periodo con mayor mortalidad de embriones expuestos a las muestras de agua. El retraso en la gastrulación y en el desarrollo rebasó las 12hrs en embriones expuestos a las muestras de descargas y la estación Villa Alta, mientras que en las estaciones de cauce el retraso fue menor a las 12hrs. Observamos que las estaciones en las que los niveles de metales pesados y DQO fueron los más elevados, presentaron mayor proporción de *ESV*. Las estaciones con mayor proporción de *ESV* presentaron menor proporción de malformaciones en somitas. Las malformaciones de cabeza y cauda

presentaron una asociación con las estaciones con elevados valores de DQO, SDT y metales pesados.

La mortalidad de embriones expuestos en el periodo de 9 a 24 hpf podría deberse a las deficiencias en el proceso de morfogénesis y organogénesis de los embriones (Sipes et al, 2011). Nuestros resultados muestran que la sobrevivencia de los embriones fue disminuyendo particularmente en las diluciones por arriba del 2% del valor de la DL₅₀ en la mayoría de las estaciones, principalmente por la coagulación del huevo en la gastrulación, retraso (>24hrs) en el desarrollo, malformaciones letales como ausencia de cabeza o formación incompleta de somitas.

El retraso durante el desarrollo embrionario por exposición a sustancias químicas, es un fenómeno ampliamente documentado en peces, reptiles y anfibios(Fent, 2004), su incidencia ha sido descrita en respuesta a estresores, físicos o químicos. En embriones de pez cebra se ha evaluado esta respuesta por exposición a sustancias como PBDE, dioxinas, plaguicidas, (Frayse et al, 2006; Hallare et al, 2004). Además, el retraso en el desarrollo por exposición a sustancias químicas se ha relacionado con una reducción en la viabilidad y un aumento de malformaciones (Weis et al., 1987). Contrariamente al retraso, el arresto embrionario se encuentra asociado a la exposición de sustancias como retardantes de flama y plaguicidas (Usenko et al., 2011; Weis et al., 1987).

El *ESV* en embriones expuestos fue la malformación con mayor incidencia en las siete estaciones, aunque solamente en algunas muestras de cauce de río observamos efectos dosis-respuestas. Por su parte, las estaciones de descarga indujeron el *ESV* aun cuando la muestra estaba en porcentajes muy bajos. La incidencia de *ESV* y edema de pericardio ha sido reportada en embriones expuestos a mezclas de combustión de petroquímicos (Bui et al., 2012), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's, por sus siglas en inglés) (Billiard et al., 2002), dioxinas (TCDD) (Hill et al., 2004), entre otras sustancias. La presencia de *ESV* a partir de las 24hpf en embriones expuestos a las muestras, puede interferir con la morfogénesis, desarrollo del sistema cardiovascular, transporte de nutrientes y alimentación del embrión hasta 5 dpf (días post fertilización).

El saco vitelino es el órgano con mayor actividad metabólica en los embriones, la actividad de enzimas de la familia CYP450, han sido identificadas durante el desarrollo, por lo que además de la exposición a sustancias tóxicas, este metabolismo podría ser una disyuntiva en los embriones aumentando el daño producido por metabolitos y estrés oxidante (Otte et al., 2010; Sarasquete et al., 2000) o bien afectando la formación correcta del embrión. Los mecanismos que intervienen en el desarrollo de *ESV* por exposición a tóxicos no ha sido descrito, sin embargo, debido a la importancia del saco en el proceso hematopoyético, metabólico durante el desarrollo y la vida larval de los embriones, se requiere un análisis más detallado de los mecanismos y consecuencias del *ESV*.

En relación a la evaluación de somitas, los embriones que presentaron retraso en el desarrollo presentaron un menor número de somitas a las 24hpf respecto a los embriones del grupo control, sin embargo, embriones sin retraso expuestos a las muestras también presentaron menor número de somitas, así como asimetría. La formación de somitas (somitogénesis) comienza a las 10.5 hpf de desarrollo y culmina entre las 24 y 30 hpf con un número de 26 y 33 somitas, respectivamente (Kimmell et al., 1995). Durante la somitogénesis cerca de 50 genes son expresados diferencialmente a lo largo del torso del embrión (Devoto, 2000). Las somitas son clave para el desarrollo de órganos y apéndices, durante la morfogénesis. Las alteraciones de éstas causadas por la exposición a sustancias tóxicas como asimetría, números impares, migraciones desfasadas, pueden ocasionar malformaciones de extremidades u órganos internos (Holley et al., 2000), como los observados en los embriones expuestos en este trabajo.

La malformación de somitas ha sido reportada en trabajos previos con embriones expuestos a teratógenos como: diclofenaco, triclosán, cloruro de estaño (Brannen et al, 2010; Hallare et al, 2004; Selderslaghs et al, 2009) y dioxinas (McCollum et al, 2011). Existe relación entre la exposición a sustancias tóxicas y la malformación de somitas a las 24hpf en un 15% de embriones expuestos como consecuencia de la activación de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*) (Devoto,2000). Sin embargo, se requiere una comprensión de la interacción de los genes durante la somitogénesis y la exposición a

sustancias tóxicas para entender las consecuencias funcionales de presentar alguna malformación en somitas durante el desarrollo y etapas posteriores.

La formación correcta de cabeza en el desarrollo involucra la interacción de una serie de genes (homeobox, genes de apoptosis y ciclo celular) y mediadores celulares (ácido retinoico), aún en etapas tempranas del desarrollo. Se han descrito malformaciones óseas de cabeza en embriones por exposición a metales, como As, Cd y $\text{CH}_3\text{-Hg}$, y alcoholes como etanol. Así mismo, se han evaluado malformaciones de ojo en embriones de pez cebra por exposición a plaguicidas como la atrazina, anilinas y TCDD (McCollum et al., 2011). En la formación de cabeza se involucran una cantidad de genes específicos en tiempo y función, en esta estructura es necesario formar y coordinar ojos, boca y oído, lo que involucra el uso selectivo de más de 107 genes (Golling et al, 2002).

La malformación de cauda es el parámetro más evaluado en ensayos de teratogénesis con embriones de pez cebra, debido a las repercusiones en el correcto desarrollo y vida del organismo. Durante la formación de cauda al igual que en la cabeza intervienen una gran cantidad de genes y mediadores celulares. La exposición a tóxicos como benzo(a)pireno, dioxina, PCBE, carbamatos, atrazina, Cr, As y anilinas en embriones de pez cebra correlaciona con la malformación de región caudal y asimetría del axis (Lemly, 1997; Teraoka et al, 2003).

La incidencia de malformaciones en cabeza y cauda se presentó de manera similar en las mismas estaciones, así como en las mismas diluciones, esto indica que durante el desarrollo embrionario ambas estructuras comparten algunas vías de señalización génicas, trabajos de mutagénesis con embriones de pez cebra asocian la expresión de 39 genes en el desarrollo de la región caudal(Golling et al., 2002). Otro factor importante que podría influir en este resultado sería el ácido retinoico que es una de las moléculas señalizadoras por excelencia en la formación y delimitación de la región superior y caudal en embriones de vertebrados, su incorrecta distribución en tiempos específicos del desarrollo podría ser la principal causa de teratogénesis de cabeza y cauda (Marlétaz et al., 2006)

El análisis de *fc* es el parámetro cuantitativo de mayor uso en ensayos sub-letales con embriones de pez cebra y otros organismos (Weis et al, 1987). En trabajos citados

previamente además de la evaluación de malformaciones, se evaluó la *fc* y se estableció correlación de cambios en este parámetro en embriones expuestos respecto a embriones no expuestos a sustancias como dioxinas, tolueno, carbamatos PCB's, metales pesados como Pb, Hg, Cd y el metaloide As; plaguicidas como paratión, malatión. Se ha establecido que un descenso en la *fc* podría reflejar la presencia de malformaciones en corazón, ventrículos y vasos, así como el incorrecto transporte de oxígeno y nutrientes (Isogai et al, 2001).

Tabla 14. Comparación de respuesta de parámetros físico-químicos y el modelo de pez cebra

	DPMO	DPCQ	DPVA	Villa Alta	San Rafael	Tepetitla	Xochiac	Confluencia
Parámetros físico-químicos								
ORP(mV)	-269,5	-67,2	-73,9	-65,23	-9,2	-155,3	-10,9	-10
(SDT) (ppm)	623,3	764	916,3	422	509,3	266	776,6	542
DQO (mg/l)	561,6	500	688	402	142	85,6	289,5	120,5
Aluminio (Al³⁺)	0,08	0,15	0,06	0,03	0,03	0,11	0,02	0,03
Cromo VI (Cr⁶⁺)	0,23	0,14	0,17	0,14	0,13	0,11	0,11	0,11
Zinc (Zn)	0,04	0,7	0,04	0,08	0,5	0,01	0,02	0,25
Níquel (Ni)	0,69	1,54	0,32	1,24	1,85	0,03	0,81	1,34
Ensayos biológicos								
DL₅₀ (%)	1.21	0.76	0.99	0.62	2.80	11.31	2.25	1.61
No.Malformados	19	13	13	12	11	11	13	9
ESV	13	12	10	5	7	6	7	5
Somitas	16	8		9		9	13	4
Cabeza	16	8	10	11	2	8	13	
Cauda	18	5	10	11	4	7	12	9

El modelo de pez cebra a través del ensayo de DL₅₀ confirmó la mala calidad del agua, debido a que todas las estaciones presentaron una elevada toxicidad. El ensayo de alteraciones en el desarrollo fue congruente con el análisis de conglomerado de los parámetros físico-químicos. Las estaciones de descarga (grupo I) presentaron mayor

número de malformaciones, y las estaciones de cauce (grupo II) presentaron una menor proporción. El ESV y las malformaciones de cauda fueron las de mayor incidencia en las muestras (*tabla 14*).

La elevada mortalidad de los embriones en el ensayo de alteraciones, en el que fueron utilizadas diluciones hasta 500 veces las muestras, pudo deberse no a la toxicidad de las muestras sino a la letalidad de las malformaciones.

Todas las malformaciones evaluadas en este trabajo han sido previamente reportadas en embriones de pez cebra expuestos a muestras ambientales con elementos de descargas de tipo industrial. Si bien la incidencia de malformaciones y alteraciones en la *fc* han sido ya reportadas por exposición a tóxicos y muestras ambientales, se requiere una mejor comprensión de los mecanismos que inducen estos efectos (Selderslaghs et al., 2009). Trabajos con embriones mutantes en diversos genes han observado la presencia de éstas y otras malformaciones por lo que establecen una primera aproximación a los genes que podrían estar involucrados en el daño por exposición a teratógenos en el ambiente.

La determinación de patrones de alteración en el desarrollo embrionario aporta información valiosa respecto a la identificación de sitios con un alto riesgo de exposición y brinda información de referencia para la creación de leyes que regulan descargas y niveles de tóxicos en cuerpos de agua. A pesar de las declaraciones sobre proyectos de saneamiento del cauce del río, los niveles de contaminantes se encuentran aún muy por encima de los límites máximos permisibles y se distribuyen dinámicamente en el ambiente aledaño al río afectando a miles de personas expuestas diariamente a estos compuestos a través de aerosoles y gases que emanan del río Atoyac, además de la filtración a aguas subterráneas que también es probable. Diversos estudios han demostrado gradientes de afectación y riesgo a la salud hasta 2 km a partir de ríos contaminados. En el caso del río Santiago, en Jalisco, por ejemplo, se ubican más de diez poblaciones en ese margen (Arellano-Aguilar et al., 2012). Mientras que en el municipio de San Martín Texmelucan cerca de 13 mil personas viven en la ribera del río Atoyac (CONAGUA 2008).

En el país hay más de 80 ríos de los cuales el 70% presenta algún tipo de contaminación. En 2011, la Asamblea Nacional de Afectados Ambientales (ANAA) elaboró

una petitoria al Tribunal Latinoamericano del Agua como parte de las acciones para evidenciar la crisis hídrica en México. Por lo anterior se requiere, entre otras cosas, generar y analizar la información que permita identificar zonas de riesgo de salud por contaminación ambiental (Arellano-Aguilar et al., 2013).

VIII. Conclusiones

De acuerdo con los parámetros de calidad de agua obtenidos en este trabajo se puede concluir que la contaminación observada en el cauce del río fue similar a la de una descarga de agua residual de tipo industrial.

La elevada toxicidad calculada en las muestras de agua en el cauce y descargas industriales, así como la incidencia de malformaciones fue congruente con la clasificación de las estaciones obtenidas del análisis de conglomerados.

El modelo de exposición del pez cebra en etapas tempranas del desarrollo basado en la DL_{50} y la prueba de FET no solo fue sensible y eficaz para la evaluación de toxicidad, sino también en la detección de teratógenos presentes en las muestras ambientales y descargas industriales.

IX Recomendaciones

- Implementar un ensayo de teratogénesis en pez cebra basado en la DL_{50} como herramienta de bio-monitoreo en pruebas de calidad de agua.
- Ampliar el número de sustancias sujetas a reporte en el RETC (Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes), así como en los parámetros considerados en las Normas ambientales de calidad de agua, por ejemplo metales pesados, hidrocarburos y VOC's y la inclusión de los parámetros físico-químicos SDT y ORP.
- Se recomienda que la evaluación de efectos teratogénicos sea incluida como un parámetro para evaluar el éxito de saneamiento en cuerpos de agua.

Referencias

- Ackermann, G. E., & Paw, B. H. (2003). Zebrafish: a genetic model for vertebrate organogenesis and human disorderS. *Frontiers in Bioscience*, 8, 1227–1253.
- Alley E., Roberts. (2000), *Water Quality Control Handbook*, McGraw-Hill Professional, ed 1º New York.
- Amores, A., Force, A., Yan, Y., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., ... Postlethwait, J. H. (1998). Zebrafish hox Clusters and Vertebrate Genome Evolution, 282(November), 1711–1714.
- Arellano-Aguilar, O., Montoya, R. M., & Garcia, C. M. (2009). Endogenous Functions and Expression of Cytochrome P450 Enzymes in Teleost Fish: A Review. *Reviews in Fisheries Science*, 17(4), 541–556. doi:10.1080/10641260903243487
- Arellano-Aguilar, O., Ortega-Elorza, L., Gesundheit-Montero, P., (2012) Estudio de la contaminación en la cuenca de río Santiago y la salud pública en la región. Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad (resumen ejecutivo)
- Arellano-Aguilar, O., Montoya, R. M. Ortega E. L. (2013). Daños a la Salud por Efectos Ambientales: Morbilidad y Mortalidad en la Población Mexicana; en *Salud, Ambiente y Trabajo*, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. Mc Graw Hill (en imprenta)
- Bolognesi, C., & Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205–13. doi:10.1093/mutage/geq073
- Brannen, K. C., Panzica-Kelly, J. M., Danberry, T. L., & Augustine-Rauch, K. a. (2010). Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, 89(1), 66–77. doi:10.1002/bdrb.20223
- Bui, A., Xiao, R., Perveen, Z., Kleinow, K., & Penn, A. (2012). Zebrafish embryos sequester and retain petrochemical combustion products: Developmental and transcriptome consequences. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 108, 23–32. doi:10.1016/j.aquatox.2011.09.025
- Chiswell, B. (1996). REVIEW PAPER REVIEW OF AQUATIC MONITORING PROGRAM DESIGN, 30(9), 1935–1948.

CONAGUA. (2006). CLASIFICACIÓN DE LOS RÍOS :

CONAGUA. (2008). Evaluación del riesgo sanitario ambiental de las zonas aledañas al río Atoyac (resumen ejecutivo), 1–13.

Corcoran J, Winter MJ, Tyler CR., (2010) Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit Rev Toxicol.* 40(4):287-304. doi: 10.3109/10408440903373590.

Corcoran, E., C. Nellemann, E. Baker, R. Bos, D. Osborn, H. Savelli (eds), 2006, Sick Water? The central role of waste- water management in sustainable development. A Rapid Response Assessment. United Nations Environment Programme, UN-HABITAT, ISBN: 978-82-7701-075-5, (versión electrónica)

Cotler Avalos Helena. (2012). Las cuencas hidrográficas de México, Diagnóstico y priorización, 1ª edición, SEMARNAT.

Davis, K. R., Ridge, O., & Ridge, O. (1981). *Xenopus laevis* 1, 391, 371–391.

DeSesso, J. M. (2001). Teratogen update: inorganic arsenic. *Teratology*, 64(3), 170–3. doi:10.1002/tera.1060

Devoto, S., Stickney, H. L., Barresi, M. J. F., & Devoto, S. H. (2000). Somite Development in Zebrafish Somite Development in Zebrafish.

Estadísticas del agua en México , edición 2011. (2011).

Environmental Protection Agency (1973). Handbook for Monitoring Industrial Wastewater (version electronica) (<http://nepis.epa.gov>).

FAO. (2006). Live Stock Long Shadow: Environmental Issues and Options (versión electrónica)

Facchinelli, A., Sacchi, E., & Mallen, L. (2001). Multivariate statistical and GIS-based approach to identify heavy metal sources in soils, 114.

Fent, K. (2004). Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205(3), 223–40. doi:10.1016/j.tox.2004.06.060

García-Nieto, E., Carrizales-Yañez, L., Juárez-Santacruz, L., García- Gallegos, E., Hernández-Acosta, E., Briones-Corona, E., & Vázquez-Cuecuecha, O. G. (2011). Plomo Y Arsénico En La Subcuenca Del Alto Atoyac En Tlaxcala, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, XVII(1), 7–17. doi:10.5154/r.rchscfa.2010.06.040

- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Hopkins, N. (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nature genetics*, 31(2), 135–40. doi:10.1038/ng896
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. a, ... Nüsslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development (Cambridge, England)*, 123, 1–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007226>
- Hallare, a V, Köhler, H.-R., & Triebkorn, R. (2004). Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere*, 56(7), 659–66. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.04.007
- Hamilton, M. A., Russo, R. C., & Thurston, R. V. (1975). Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays, (1).
- Hitt, N. P., & Hendryx, M. (2010). Ecological integrity of streams related to human cancer mortality rates. *EcoHealth*, 7(1), 91–104. doi:10.1007/s10393-010-0297-y
- Holley, S. A., & Volhard, C. N.-. (2000). Somitogenesis in Zebrafish.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... Matthews, L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. doi:10.1038/nature12111
- IARC. (2012). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Review of Human Carcinogens, volumes A-F, ISBN-13 9789283213291, INE. (2008). La Cuenca del río Balsas (versión electrónica)
- Isogai, S., Horiguchi, M., & Weinstein, B. M. (2001). The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Developmental biology*, 230(2), 278–301. doi:10.1006/dbio.2000.9995
- INEGI.(2008), Cartas Topográficas Municipios, Conjunto de Datos Geográficos (1:1 000 000) (versión electrónica)
- Kazi, T. G., Arain, M. B., Jamali, M. K., Jalbani, N., Afridi, H. I., Sarfraz, R. a., ... Shah, A. Q. (2009). Assessment of water quality of polluted lake using multivariate statistical techniques: A case study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 301–309. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.02.024
- Kimmell, C. B., Ballard, W. W., Kimmell, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official*

- publication of the American Association of Anatomists*, 203(3), 253–310.
doi:10.1002/aja.1002030302
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1-4), 1–20. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.077
- Lemly, A. D. (1997). A Teratogenic Deformity Index for Evaluating Impacts of Selenium on Fish Populations, 266, 259–266.
- Li, S., Li, J., & Zhang, Q. (2011). Water quality assessment in the rivers along the water conveyance system of the Middle Route of the South to North Water Transfer Project (China) using multivariate statistical techniques and receptor modeling. *Journal of hazardous materials*, 195, 306–17. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.08.043
- López Gordillo Ana Paulina (2012), Evaluación de daño genotóxico y citotóxico por exposición simultánea a cloroformo, diclorometano y tolueno y su relación en el metabolismo de fase II en rata, Facultad de Ciencias, UNAM
- Madsen Kaj, Quiblier Pierre, (2012), Global Chemical Outlook Towards Sound Management of chemical ,Synthesis Report for Decision-Makers, UNEP-WHO, ISBN 978-92-807-3275-57 (versión electrónica)
- Malmqvist, B., & Rundle, S. (2002). Threats to the running water ecosystems of the world, 29(2), 134–153. doi:10.1017/S0376892902000097
- María, A., Villasana, S., Pulido-flores, G., Monks, S., José, A., Martínez, G., & Villegas, C. (2009). TOXICOLÓGICA DE LA DEGRADACIÓN AMBIENTAL DEL RÍO. *Evaluation*, 34, 880–887.
- Marlétaz, F., Holland, L. Z., Laudet, V., Schubert, M., Biologie, L. De, De, M., Lyon-, I. F. R. B. (2006). Retinoic acid signaling and the evolution of chordates, 2(2), 38–47.
- McCollum, C. W., Ducharme, N. a, Bondesson, M., & Gustafsson, J.-A. (2011). Developmental toxicity screening in zebrafish. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 93(2), 67–114. doi:10.1002/bdrc.20210
- Mendelsohn, B. a, Kassebaum, B. L., & Gitlin, J. D. (2008). The zebrafish embryo as a dynamic model of anoxia tolerance. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(7), 1780–8. doi:10.1002/dvdy.21581
- Méndez, G. T.; Rodríguez, D. L.; Palacios, M. S.(2000). Impacto del riego con aguas contaminadas, evaluado a través de la presencia de metales pesados en suelos. *Terra Latinoamericana* 18(4): 277-288.

- Montero, R., Serrano, L., Araujo, A., Dávila, V., Ponce, J., Camacho, R., ... Méndez, A. (2006). Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: Comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 21(5), 335–42. doi:10.1093/mutage/gel040
- OECD. (2006). OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. *Water*, 2006, 1–11.
- Ohe, T., Watanabe, T., & Wakabayashi, K. (2004). Mutagens in surface waters : a review, 567, 109–149. doi:10.1016/j.mrrev.2004.08.003
- Rocha, P. S., Bernecker, C., Strecker, R., Mariani, C. F., Pompêo, M. L. M., Storch, V., ... Braunbeck, T. (2011). Sediment-contact fish embryo toxicity assay with *Danio rerio* to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(7), 1951–9. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.07.009
- Saldaña Fabela, P. (2001). Caracterización de fuentes puntuales de contaminación en el río atoyac, méxico., (1).
- Saldaña FP, Alcocer Y VH, Ler-do de Tejada BA, Gómez BMA (2002a) Calidad del Agua en Colectores de la Ciudad de Puebla y la Aplicación de Análisis de Toxicidad. XXVIII Cong. Interam. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 27-31 Oct. Cancún, México.
- Saldaña, P, Lerdo de Tejada A, Gómez MA, López R (2002b) La importancia de incluir análisis de toxicidad en descargas industriales y municipales que afectan los cuerpos receptores. Cong. Nac. Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. 17-20 Abr. Guanajuato, México.
- Selderslaghs, I. W. T., Van Rompay, A. R., De Coen, W., & Witters, H. E. (2009). Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafishembryo. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 28(3), 308–20. doi:10.1016/j.reprotox.2009.05.004
- SEMARNAT. (1996). DECLARATORIA de clasificación de los ríos Atoyac y Xochiac o Hueyapan, y sus afluentes.
- SEMARNAT. (2009). Ley Federal de Derechos Ley Federal de Derechos.
- SEMARNAT. (2010). Estadísticas del Agua en la cuenca del Río Balsas , 2010.
- Sipes, N. S., Padilla, S., & Knudsen, T. B. (2011). Zebrafish — As an Integrative Model for Twenty-first Century Toxicity Testing, 267(Part C), 256–267. doi:10.1002/bdrc.20214

- Teraoka, H., Dong, W., Tsujimoto, Y., Iwasa, H., Endoh, D., Ueno, N., ... Hiraga, T. (2003). Induction of cytochrome P450 1A is required for circulation failure and edema by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(2), 223–228. doi:10.1016/S0006-291X(03)00576-X
- Tuikka, a I., Schmitt, C., Höss, S., Bandow, N., von der Ohe, P. C., de Zwart, D., ... Kukkonen, J. V. K. (2011). Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(1), 123–31. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.08.038
- Usenko, C. Y., Robinson, E. M., Usenko, S., Brooks, B. W., & Bruce, E. D. (2011). PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 30(8), 1865–72. doi:10.1002/etc.570
- Vaj, C., Barmaz, S., Sørensen, P. B., Spurgeon, D., & Vighi, M. (2011). Assessing, mapping and validating site-specific ecotoxicological risk for pesticide mixtures: A case study for small scale hot spots in aquatic and terrestrial environments. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(8), 2156–66. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.07.011
- Verkasalo, P. K., Kokki, E., Pukkala, E., Vartiainen, T., Kiviranta, H., Penttinen, A., & Pekkanen, J. (2004). Cancer Risk Near a Polluted River in Finland. *Environmental Health Perspectives*, 112(9), 1026–1031. doi:10.1289/ehp.6741
- Villegas-Navarro, a, Ramírez-M, Y., Salvador-S, M. S., & Gallardo, J. M. (2001). Determination of wastewater LC50 of the different process stages of the textile industry. *Ecotoxicology and environmental safety*, 48(1), 56–61. doi:10.1006/eesa.2000.1986
- Walker, J. M. (n.d.). *IN MOLECULAR BIOLOGY™ Series Editor. Molecular Cell.*
- Watanabe, T., Ohe, T., & Hirayama, T. (2005). Occurrence and origin of mutagenicity in soil and water environment. *Environmental sciences: an international journal of environmental physiology and toxicology*, 12(6), 325–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609672>
- Wu, L., Chen, L., Hou, J., Zhang, Y., Zhao, J., & Gao, H. (2009). Assessment of Sediment Quality of Yangtze River Estuary Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos, 234–242. doi:10.1002/tox
- Yang, F., Zhang, Q., Guo, H., & Zhang, S. (2010). Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and teratogenicity of marine sediments from Qingdao coastal areas using in vitro fish cell assay, comet assay and zebrafish embryo test. *Toxicology in vitro: an*

international journal published in association with BIBRA, 24(7), 2003–11.
doi:10.1016/j.tiv.2010.07.019

Yang, Y., Wang, C., Guo, H., Sheng, H., & Zhou, F. (2012). An integrated SOM-based multivariate approach for spatio-temporal patterns identification and source apportionment of pollution in complex river network. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 168, 71–9. doi:10.1016/j.envpol.2012.03.041

Anexo II

*Catálogo de malformaciones y alteraciones en
embriones de pez cebra por exposición a descargas
industriales y muestras ambientales del río Atoyac*

Índice

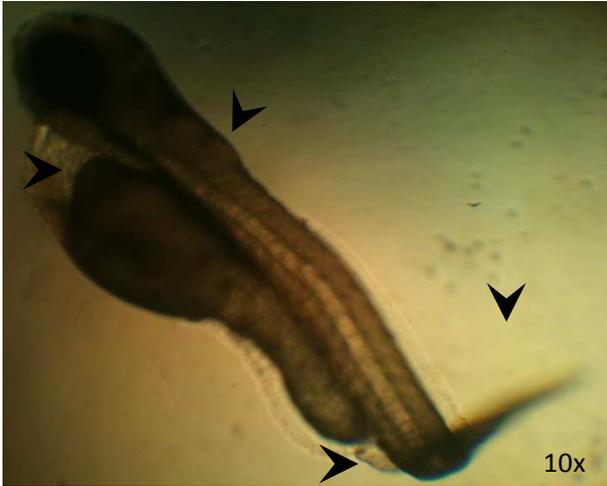
	Pág.
<i>Descarga PEMEX Santa María Moyotzingo (DPMO)</i>	3-5
▪ DPMO 0.02%	3
▪ DPMO 2.00%	4
▪ DPMO 1.00%	5
<i>Descarga PEMEX Corredor Quetzalcoatl (DPCQ)</i>	6-10
▪ DPCQ 0.20%	6
▪ DPCQ 2.00%	7
▪ DPCQ 5.00%	9
▪ DPCQ 7.00%	10
▪ DPCQ 10.00%	10
<i>Descarga PEMEX Villa Alta (DPVA)</i>	11-12
▪ DPVA 0.20%	11
▪ DPVA 1.00%	11
▪ DPVA 2.00%	12
▪ DPVA 20.00%	12
<i>Villa Alta</i>	13-14
▪ Villa Alta 0.20%	13
▪ Villa Alta 10.00%	14
<i>Tepetitla de Lardizabal</i>	15-18
▪ Tepetitla 1.00%	15
▪ Tepetitla 2.00%	16
▪ Tepetitla 4.00%	16
▪ Tepetitla 10.00%	18
<i>Río Xochiac</i>	18
▪ Xochiac 4.00%	18
<i>San Rafael Tenaycac</i>	19-20
▪ San Rafael Tenaycac 4.00%	19
▪ San Rafael Tenaycac 10.00%	20
▪ San Rafael Tenaycac 20.00%	20
<i>Confluencia de ríos Atoyac y Xochiac</i>	20-21
▪ Confluencia 4.00%	20
▪ Confluencia 10.00%	21

Abreviaturas

- ❖ *ESV* (Edema de saco vitelino)
- ❖ *RG* (Retraso en la gastrulación)
- ❖ *hpf* (horas post fertilización)

Descarga PEMEX Santa María Moyotzingo (DPMO)

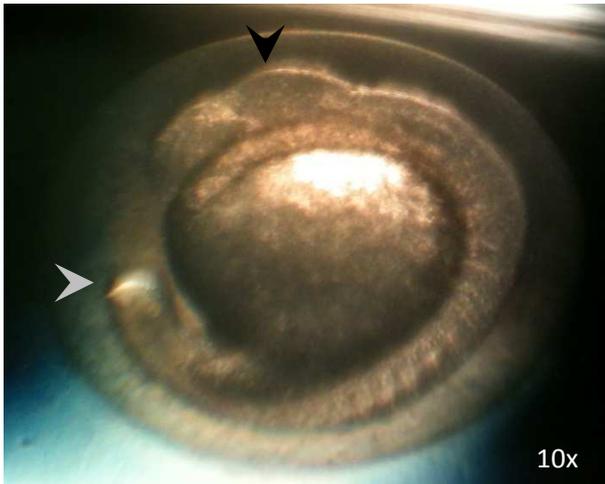
DPMO 0.02%



Estación DPMO
(Dilución) 0.20%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con edema y pérdida de circunferencia de saco vitelino hacia el corazón, con edema de pericardio. Región dorsal superior con protuberancia. Región caudal con extensión hacia lateral derecho en zona terminal, masa anexa en región media de la cauda.

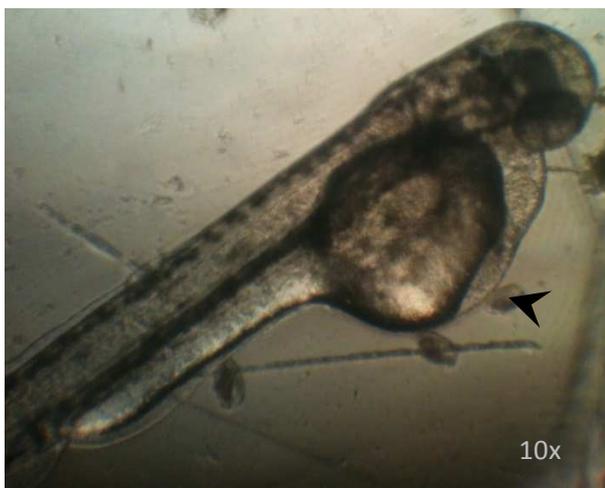
ID 276.72



Estación DPMO
(Dilución) 0.20%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino hacia región superior cercano a corazón. Protuberancia en región posterior de cabeza. Región caudal unida a saco vitelino en región media. Retraso de 24hrs.

ID 276.72

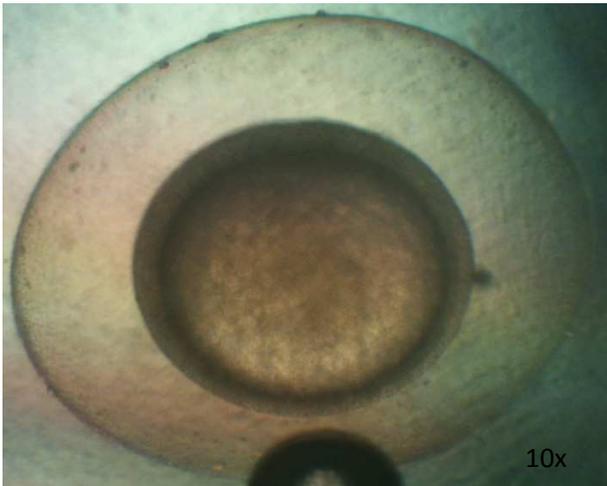


Estación DPMO
(Dilución) 0.20%
Etapa (hpf) 96
Malformación *ESV,*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino hacia ventral, con edema de pericardio.

ID 279.96

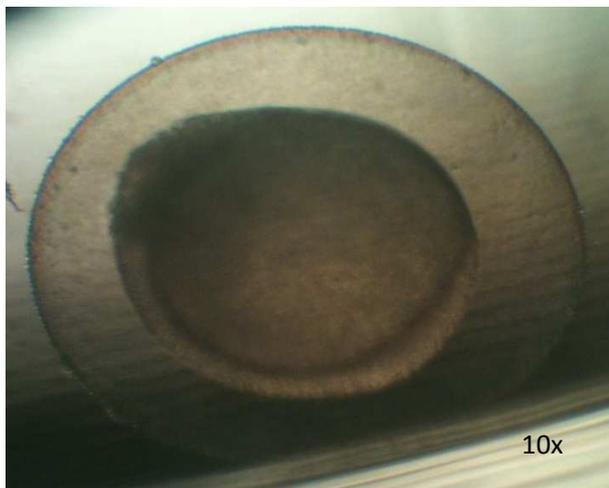
DPMO 2.00%



Estación DPMO
(Dilución) 2.00%
Etapas (hpf) 24
Malformación *Somitas, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista ventral con ausencia de somitas, cabeza, cauda, Arresto embrionario en etapa de "Germ ring" hasta las 72 hpf (*Kimmell, 1995*)

ID 285.24



Estación DPMO
(Dilución) 2.00%
Etapas (hpf) 24
Malformación *Somitas, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista ventral con ausencia de somitas, cabeza, cauda, Arresto embrionario en etapa de "50%-epibolia" hasta las 72 hpf (*Kimmell, 1995*)

ID 291.24

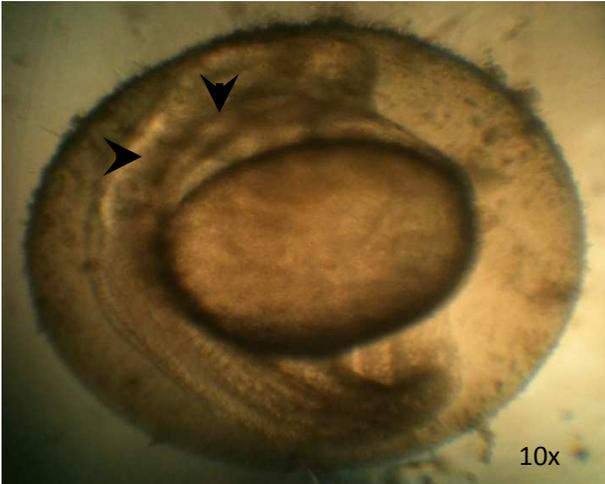


Estación DPMO
(Dilución) 2.00%
Etapas (hpf) 24
Malformación *Somitas, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista ventral con ausencia de somitas, cabeza, cauda, Arresto embrionario en etapa de "90%-epibolia" " hasta las 72 hpf (*Kimmell, 1995*)

ID 286.48

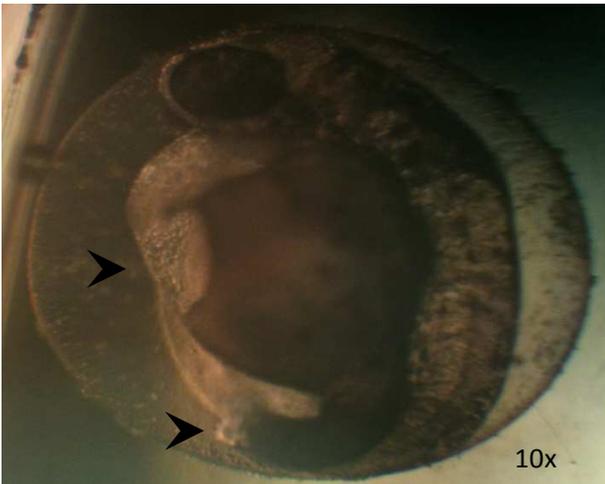
DPMO 1.00%



Estación DPMO
(Dilución) 1.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Somitas*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino hacia el corazón con edema de pericardio. Somitas de mayor tamaño al normal en la región superior dorsal. Retraso de 24hrs.

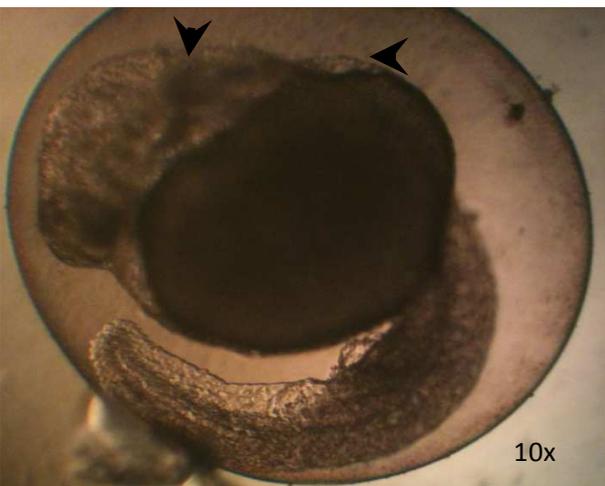
ID 266.72



Estación DPMO
(Dilución) 1.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino hacia ventral, pérdida de la circunferencia del saco, edema de pericardio. Región caudal en forma de muñon. Retraso de 24hrs.

ID 269.72



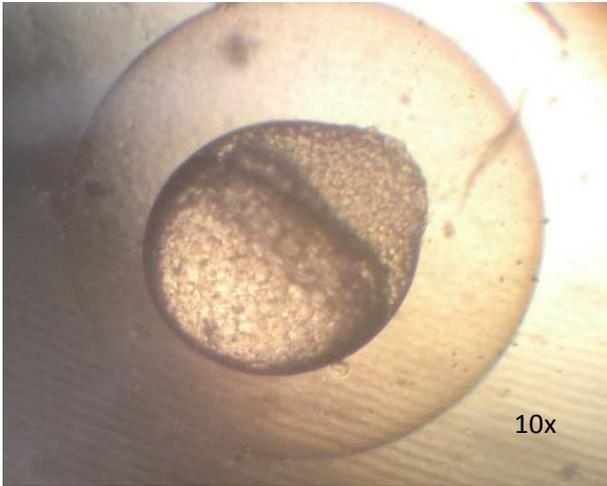
Estación DPMO
(Dilución) 1.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cabeza*

Descripción Embrión vista ventral con edema de saco vitelino hacia lateral izquierdo y derecho, con pérdida de la circunferencia. Cabeza ausencia de ojo derecho. Retraso de 24hrs.

ID 271.72

Descarga PEMEX Corredor Quetzalcoatl (DPCQ)

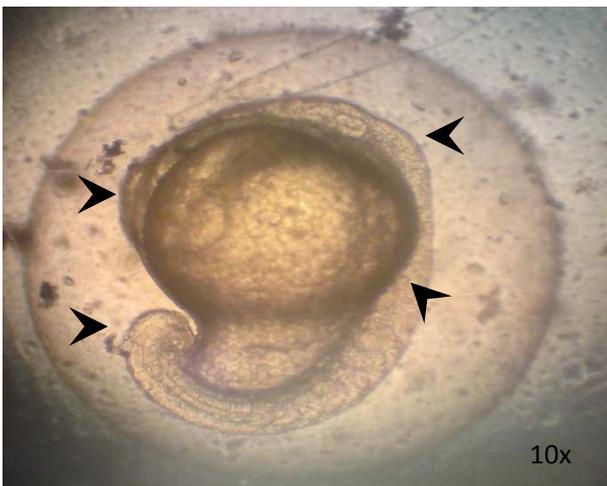
DPCQ 0.20%



Estación DPCQ
(Dilución) 0.20%
Etapa (hpf) 9
Malformación *RG*

Descripción Embrión vista ventral con ausencia de epibolia, retraso embrionario de 8hrs.

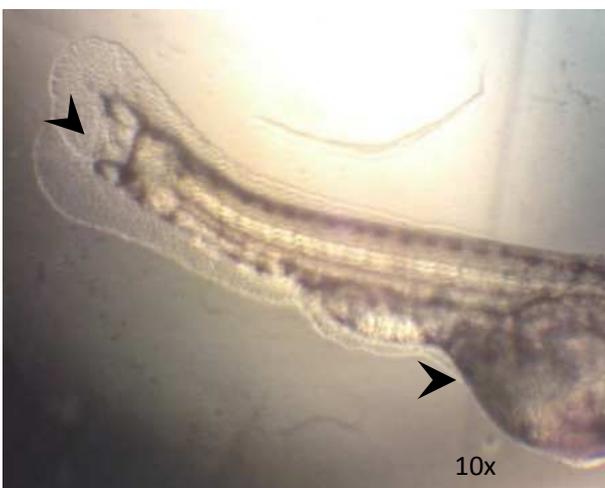
ID 17.9



Estación DPCQ
(Dilución) 0.20%
Etapa (hpf) 24
Malformación *ESV, Somitas, Cabeza, Cauda.*

Descripción Embrión vista lateral con protuberancia hacia ventral en cabeza. Protuberancia en región superior dorsal. Desplazamiento de las somitas hacia la región caudal. Cauda no separada del saco vitelino en región terminal. Retraso de 5hrs.

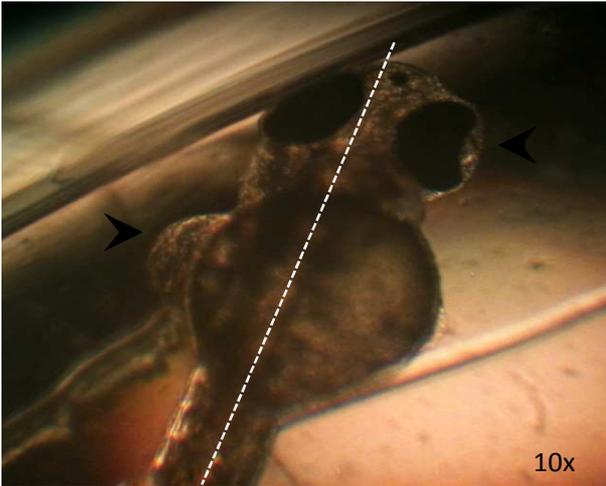
ID 13.24



Estación DPCQ
(Dilución) 0.20%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con bifurcación terminal de región caudal y apéndices terminales en cauda. Edema de saco vitelino hacia lateral.

ID 12.72

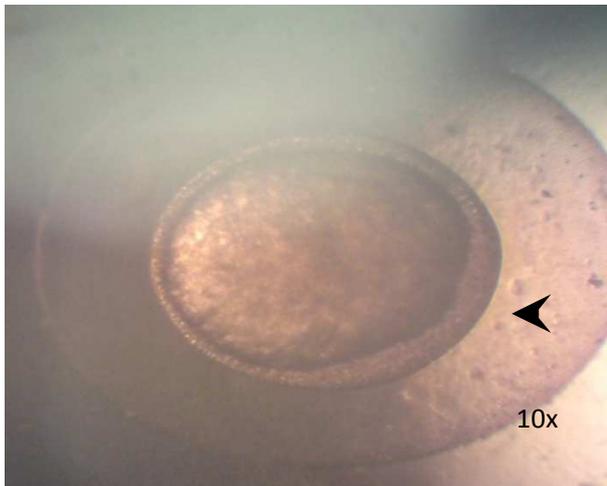


Estación DPCQ
(Dilución) 0.20%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cabeza*

Descripción Embrión vista superior con asimetría axial (*línea punteada*) Depresión en la parte media del ojo izquierdo, punto negro en región frontal de cabeza. Edema de saco vitelino hacia lateral izquierdo, masa anexa en lateral derecho.

ID 11.72

DPCQ 2.00%



Estación DPCQ
(Dilución) 2.00%
Etapa (hpf) 9
Malformación *RG*

Descripción Embrión vista ventral, con ausencia de epíbolia, retraso de 4.3hrs.

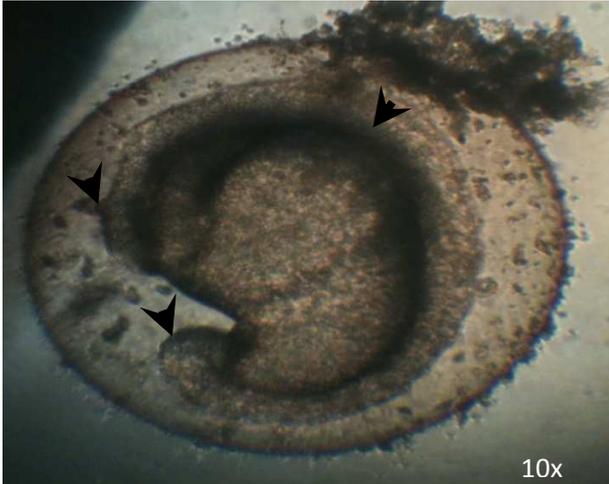
ID 9.9



Estación DPCQ
(Dilución) 2.00%
Etapa(hpf) 24
Malformación *ESV, Somitas, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista ventral amorfo con pérdida de forma en saco vitelino y presencia de masa anexa. Ausencia de cabeza, somitas y cauda.

ID 4.24



Estación DPCQ
(Dilución) 2.00%
Etapa (hpf) 24
Malformación *ESV, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con retraso de 8.5hrs. Edema de saco vitelino hacia dorsal superior. Ausencia de ojo. La región caudal no se encuentra separada del saco vitelino. El embrión presenta un retraso de 8.5hrs.

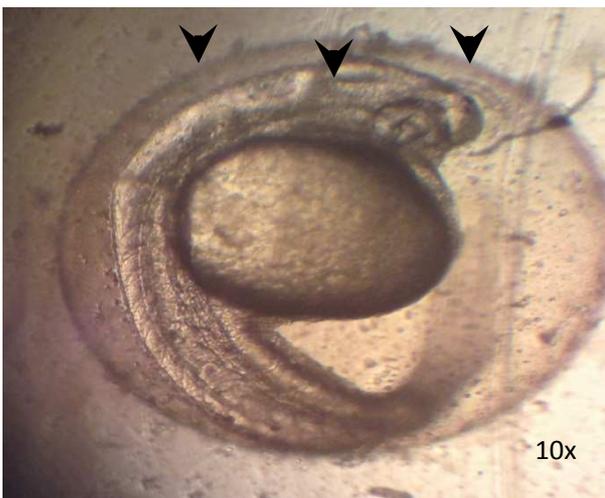
ID 7.24



Estación DPCQ
(Dilución) 2.00%
Etapa (hpf) 48
Malformación *ESV, Somitas*

Descripción Embrión vista lateral con edema lateral superior próximo a corazón. Edema de pericardio en región superior ventral del corazón. Región dorsal superior ausencia de somitas, somitas presentes esta zona con bordes irregulares.

ID 2.48



Estación DPCQ
(Dilución) 2.00%
Etapa (hpf) 48
Malformación *EVS, Somitas, Cabeza*

Descripción Embrión vista lateral con protuberancia frontal, edema de saco vitelino en la región superior, próxima al corazón. Desplazamiento de somitas hacia la región caudal. En la parte frontal de la cabeza.

ID 5.48

DPCQ 5.00%



Estación (Dilución) DPCQ 5%
Etapa (hpf) 9
Malformación RG

Descripción Embrión con retraso de 8hrs, con masa celular anexa en la región superior derecha. .

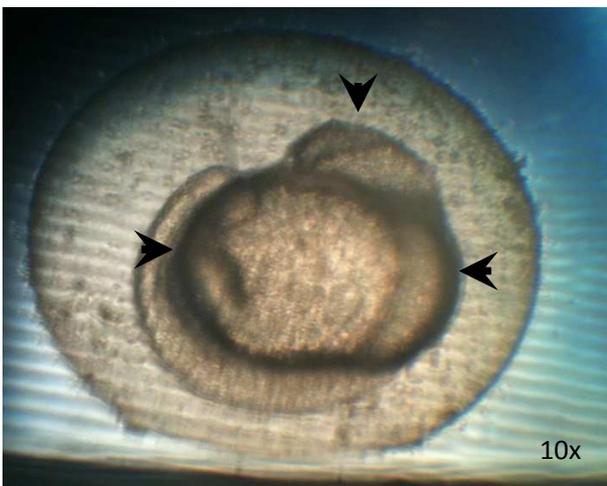
ID 217.9



Estación (Dilución) DPCQ 5.00%
Etapa (hpf) 48
Malformación *ESV, Cabeza*

Descripción Embrión vista lateral con desplazamiento incorrecto del otolito en región posterior de cabeza. Edema de saco vitelino en región frontal.

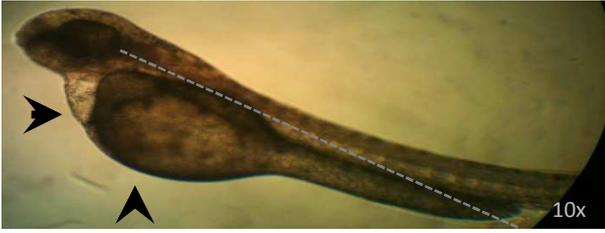
ID 94.48



Estación (Dilución) DPCQ 5.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cabeza Cauda*

Descripción Embrión vista latero-posterior Formación incompleta de cabeza, ausencia de ojo. Edema de saco vitelino hacia superior con depresiones hacia la región caudal. Región caudal unida a saco vitelino Retraso de 24hrs

ID 97.72



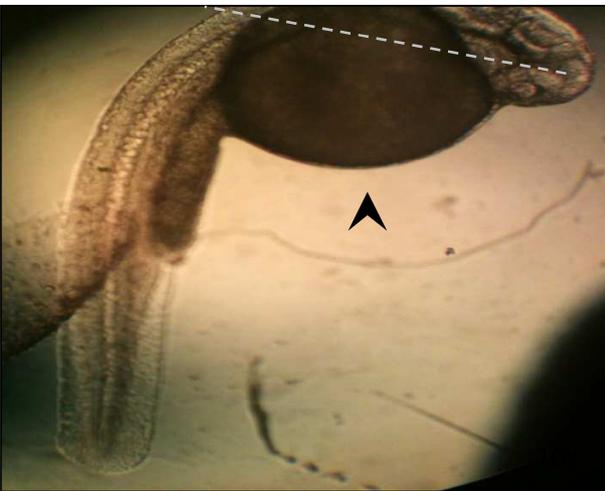
Estación DPCQ
(Dilución) 5.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con alargamiento y edema de saco vitelino en la región superior, edema de pericardio, próximo al edema de saco. Extensión no lineal de cauda (línea punteada). Retraso de 24hrs.

ID 100.96.1,
100.96.2



DPCQ 7.00%

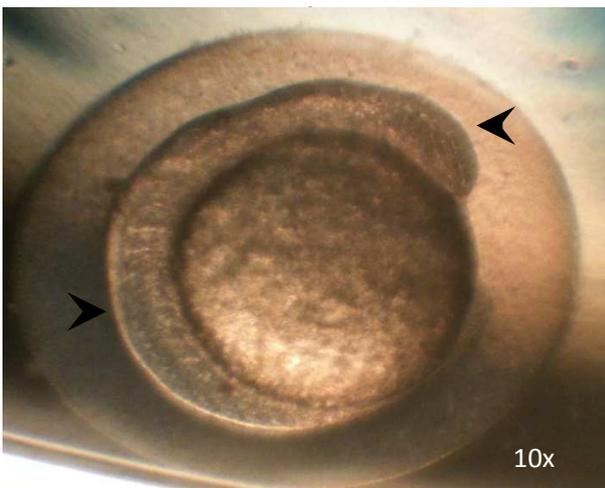


Estación DPCQ
(Dilución) 7.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV*

Descripción Embrión vista ventral con edema y alargamiento de saco vitelino. Extensión no lineal de cauda (línea blanca)

ID 219.72

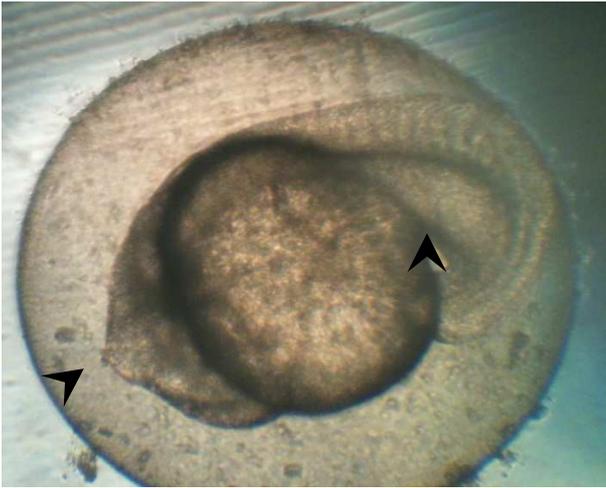
DPCQ 10.00%



Estación DPCQ
(Dilución) 10.00%
Etapa (hpf) 24
Malformación *Cabeza, Somitas*

Descripción Embrión vista lateral con ausencia de ojo, otolito. Somitas asimétricas. Retraso de 8hrs

ID 233.24



Estación DPCQ
(Dilución) 10%
Etapa (hpf) 72
Malformación Cabeza, Cauda

Descripción Embrión vista lateral con malformación de cabeza ausencia de ojos y protuberancia en región superior media de cabeza. Edema de saco vitelino hacia caudal. Extensión no lineal de región dorsal.

ID 228.72

Descarga PEMEX Villa Alta (DPVA)

DPVA 0.20%



Estación DPVA
(Dilución) 0.20%
Etapa (hpf) 72
Malformación ESV

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino en la parte superior del saco y hacia frontal, con edema de pericardio, región inferior del saco vitelino separada.

ID 399.72

DPVA 1.00%

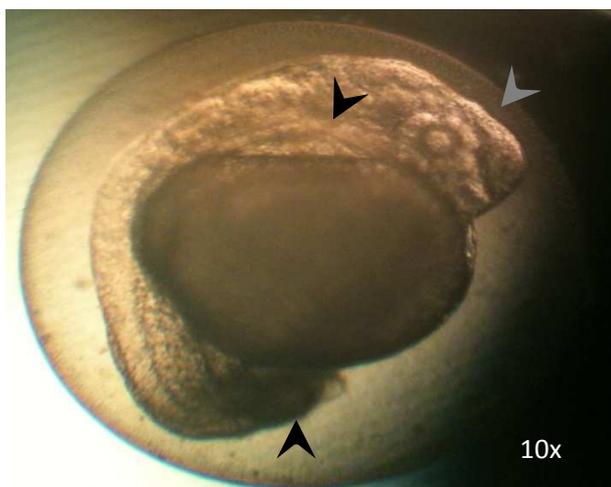


Estación DPVA
(Dilución) 1.00%
Etapa (hpf) 48
Malformación ESV

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino en la parte superior del saco y hacia frontal.

ID 378.48

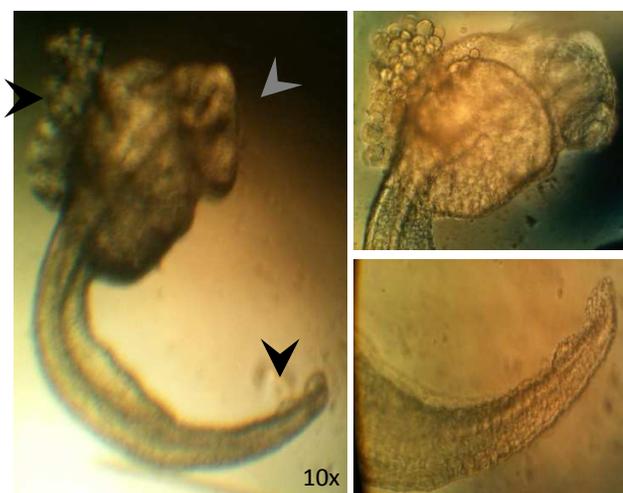
DPVA 2.00%



Estación (Dilución) DPVA 2.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cabeza y Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino en la parte superior del saco. Protuberancia en cabeza hacia frontal. Cauda con terminación en forma de muñón. Retraso de 24hrs.

ID 380.72



Estación (Dilución) DPVA 2.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cabeza y Cauda*

Descripción Embrión vista posterior, con edema de saco vitelino, presencia de masa celular anexa de lado derecho. Cabeza con protuberancia hacia frontal, con pérdida de simetría. Región caudal con terminaciones anexas filamentosas.

ID 386.72

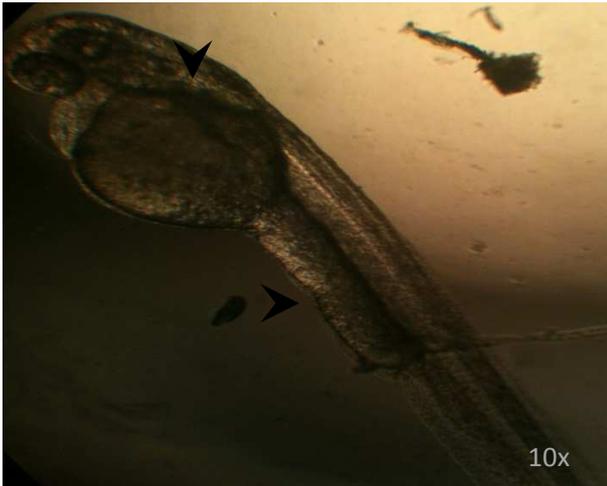
DPVA 20.00%



Estación (Dilución) DPVA 20.00%
Etapa (hpf) 24
Malformación *Somitas, Cabeza y Cauda*

Descripción Embrión vista ventral con ausencia de cabeza, somitas y cauda Retraso de 20hrs. Arresto embrionario en etapa de "2-cell" hasta las 72 hpf (*Kimmell, 1995*)

ID 391.24



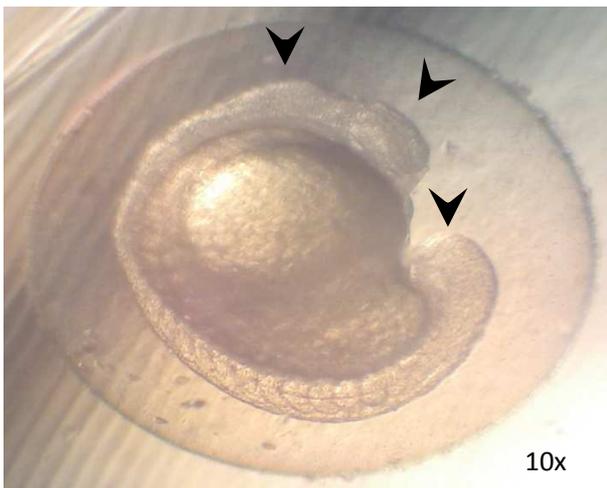
Estación DPVA
(Dilución) 20.00%
Etapa (hpf) 96
Malformación *ESV*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino hacia ventral con edema de pericardio.

ID 397.96

Villa Alta

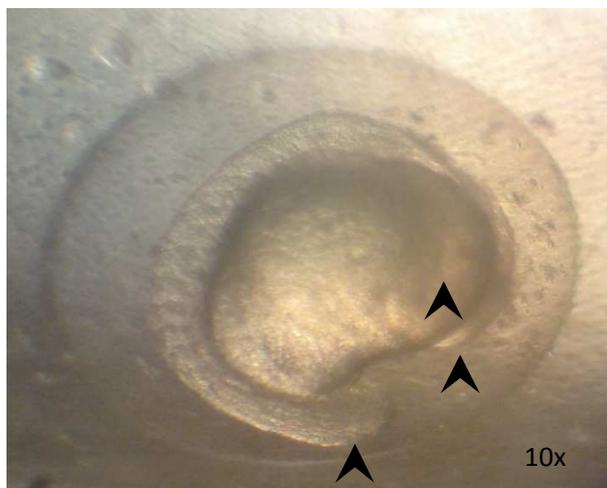
Villa Alta 0.20%



Estación Villa Alta
(Dilución) 0.20%
Etapa (hpf) 24
Malformación *ESV, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino hacia dorsal superior. Cabeza con protuberancia hacia posterior. Ausencia de otolito y protuberancia en la región posterior de la cabeza. En la parte superior cercano al corazón. Región caudal no separada del saco vitelino. Retraso en el desarrollo de 5hrs.

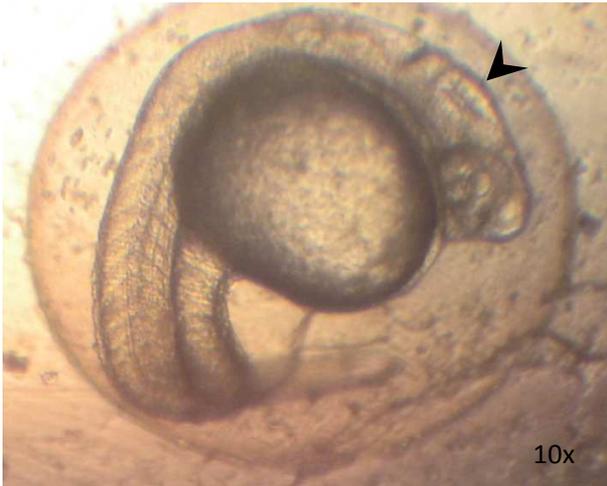
ID 86.24



Estación Villa Alta
(Dilución) 0.20%
Etapa (hpf) 24
Malformación *ESV, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino hacia cabeza. Ausencia de ojo y otolito, depresión hacia posterior en cabeza. Región caudal no separada del saco vitelino. Retraso en el desarrollo de 5hrs

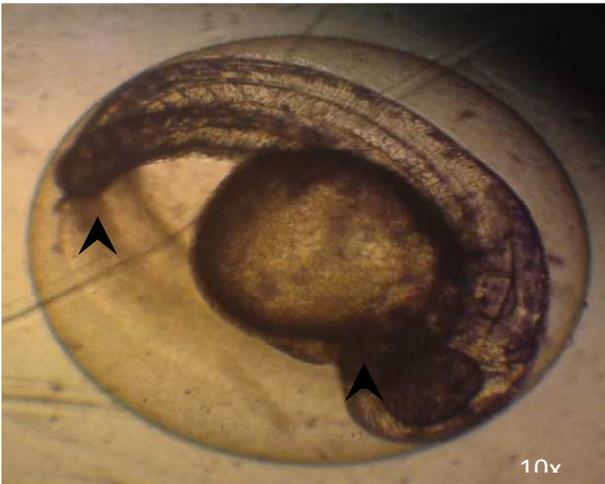
ID 90.24



Estación Villa Alta
(Dilución) 0.20%
Etapa (hpf) 48
Malformación *ESV, Cabeza*

Descripción Embrión vista lateral con formación incorrecta de otolito.

ID 84.48



Estación Villa Alta
(Dilución) 0.20%
Etapa (hpf) 48
Malformación *ESV, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino en la parte superior frontal cercana al corazón. Región caudal con formación incompleta y presencia de apéndice en la región terminal.

ID 85.48

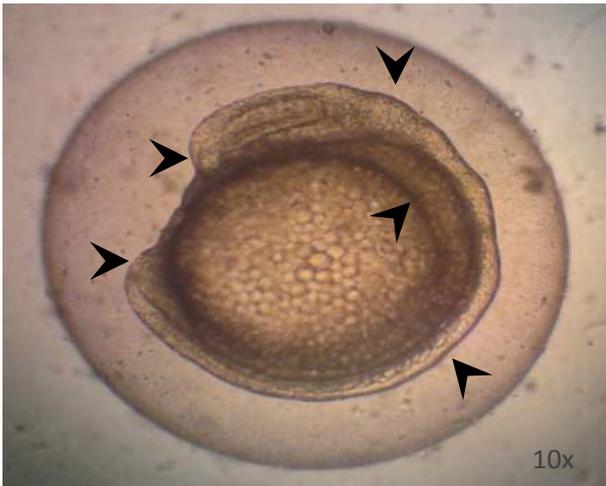
Villa Alta 10.00%



Estación Villa Alta
(Dilución) 10.00%
Etapa (hpf) 24
Malformación Retraso en el desarrollo

Descripción Embrión vista ventral con retraso en el desarrollo embrionario. Ausencia de somitas, cabeza, cauda a las 24hpf

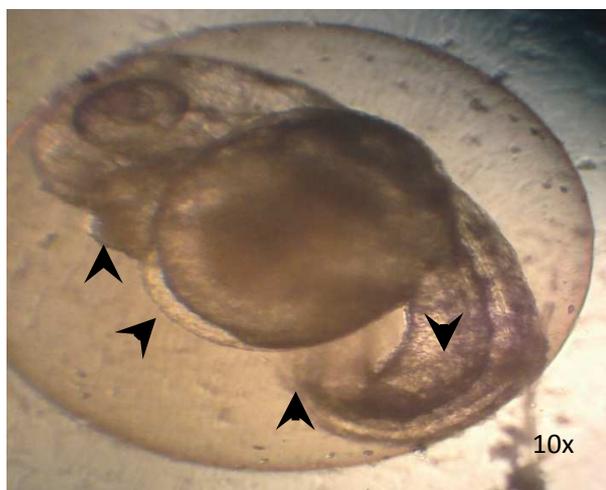
ID 38.24



Estación Villa Alta
(Dilución) 10.00%
Etapa (hpf) 24
Malformación *ESV, Somitas, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino hacia región dorsal. Somitas asimétricas hacia la región caudal. Cauda no separada del saco vitelino. Retraso en el desarrollo de 12hrs

ID 42.24



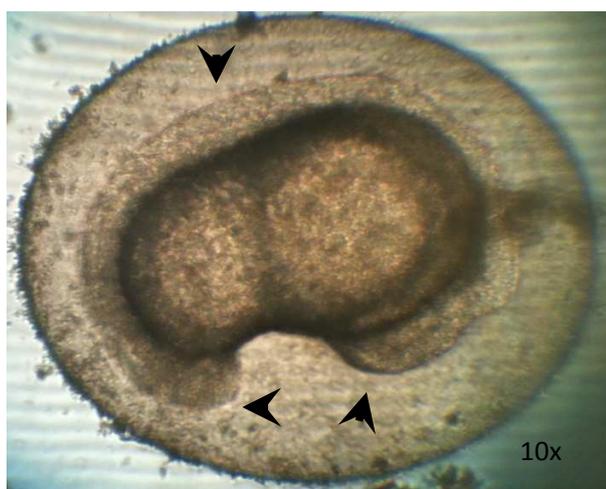
Estación Villa Alta
(Dilución) 10.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cauda*

Descripción Embrión vista ventral con edema de saco vitelino lateral derecho, edema de pericardio. Ensanchamiento de región caudal con terminación de región caudal filamentosas. Retraso de 24hrs.

ID 45.72

Tepetitla de Lardizabal

Tepetitla 1.00%

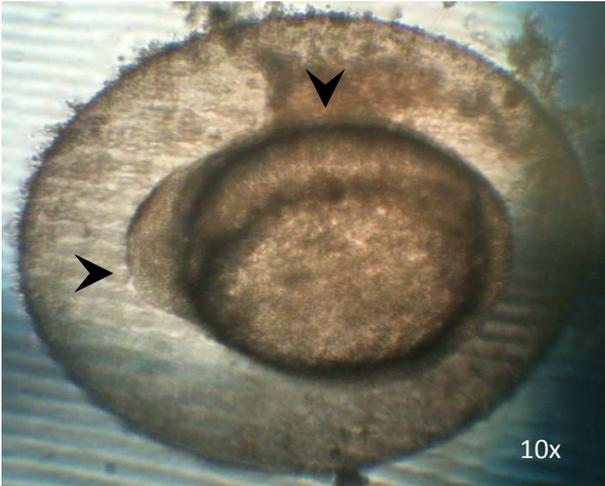


Estación Tepetitla
(Dilución) 1.00%
Etapa (hpf) 48
Malformación *Somitas, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con ausencia de ojo, otolito y somitas. Región caudal unida al saco vitelino. Retraso de 33hrs, con arresto embrionario hasta las 72hpf.

ID 336.48

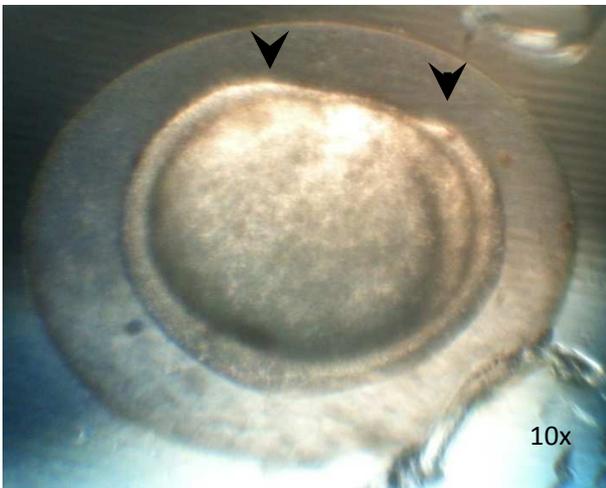
Tepetiltla 2.00%



Estación (Dilución) Tepetiltla 2.00%
Etapa (hpf) 24
Malformación Somitas, Cabeza, Cauda

Descripción Embrión vista ventral con ausencia de cabeza, somitas y cauda. Retraso de 15hrs.

ID 353.24

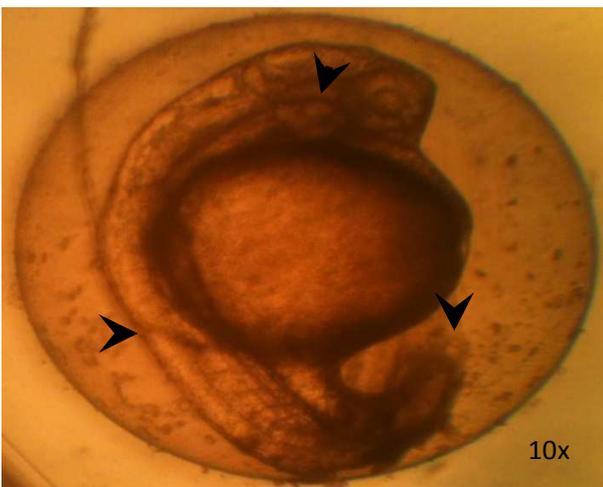


Estación (Dilución) Tepetiltla 2.00%
Etapa (hpf) 48
Malformación Somitas, Cabeza, Cauda

Descripción Embrión vista ventral con ausencia de cabeza, somitas y cauda. Retraso de 39hrs.

ID 353.48

Tepetiltla 4.00%



Estación (Dilución) Tepetiltla 4.00%
Etapa (hpf) 48
Malformación Somitas, Cabeza, Cauda

Descripción Embrión vista lateral con desplazamiento de ojo izquierdo hacia posterior. Desplazamiento de somitas hacia caudal de la zona dorsal media. Región caudal con ensanchamiento en la zona media de la cauda. Retraso de 24hrs

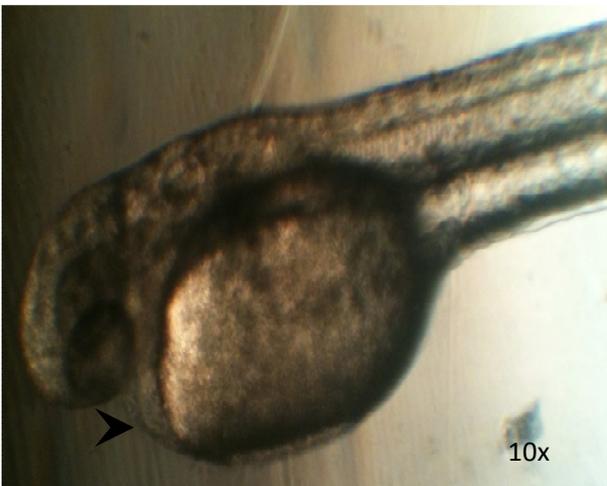
ID 336.48



Estación Tepetitla
(Dilución) 4.00%
Etapa (hpf) 48
Malformación *ESV, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino hacia corazón y edema de pericardio. Región caudal en forma de muñon

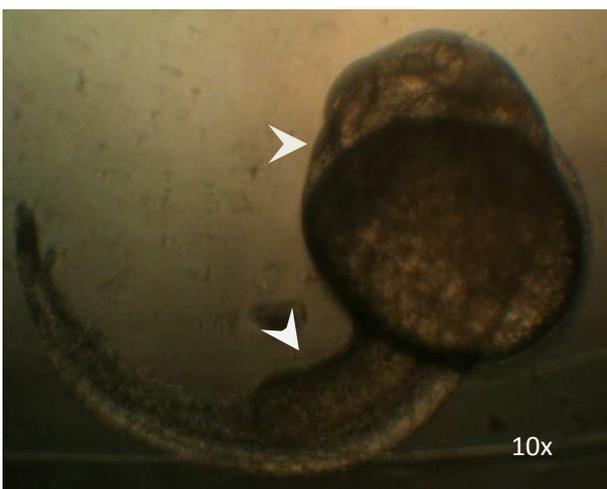
ID 339.48



Estación Tepetitla
(Dilución) 4.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV*

Descripción Vista superior lateral de embrión con edema de saco vitelino hacia corazón y edema de pericardio

ID 336.72

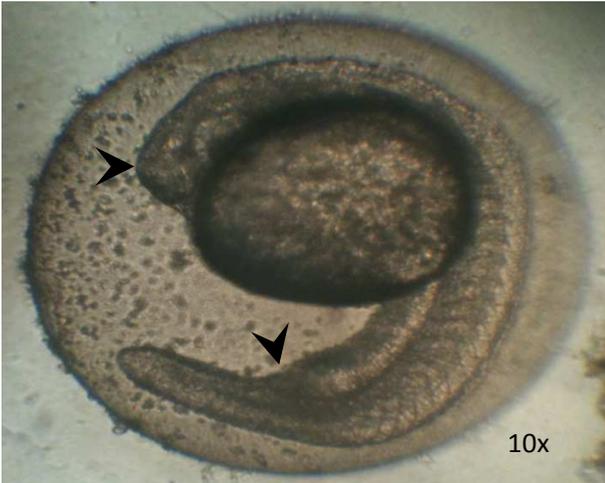


Estación Tepetitla
(Dilución) 4.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cauda*

Descripción Embrión vista ventral con edema de saco vitelino hacia corazón. Ensanchamiento de región caudal en la región media, extensión no lineal de región caudal.

ID 338.72

Tepetitla 10.00%



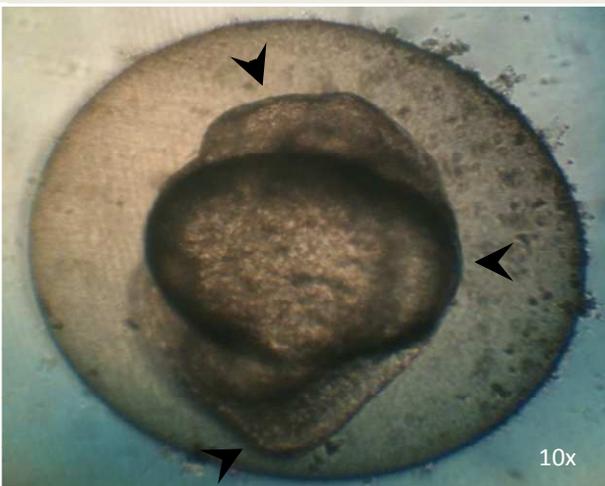
Estación Tepetitla
(Dilución) 10.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con ausencia de ojo y otolito, Región caudal con ensanchamiento en la zona media de la cauda. Retraso de 24hrs

ID 328.72

Río Xochiac

Xochiac 4.00%



Estación Xochiac
(Dilución) 4.00%
Etapa (hpf) 48
Malformación *ESV, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino hacia posterior. Cabeza con ausencia de ojo y otolito. Región caudal unida al saco vitelino con plegamiento piramidal en región media. Retraso de 12hrs

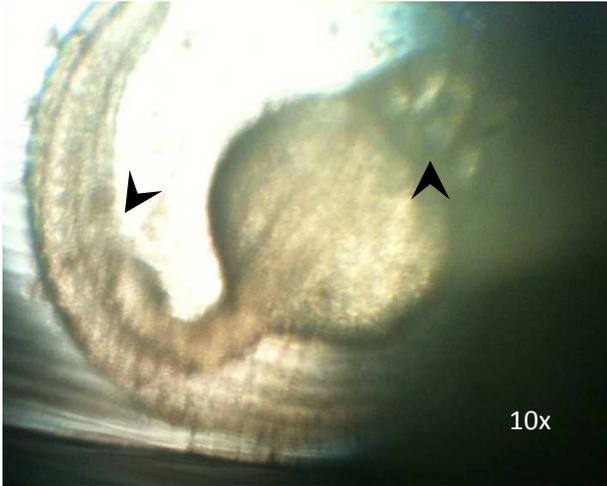
ID 137.48



Estación Xochiac
(Dilución) 4.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino superior cercano a corazón, con pérdida de la circunferencia del saco vitelino. Retraso de 24hrs

ID 134.72



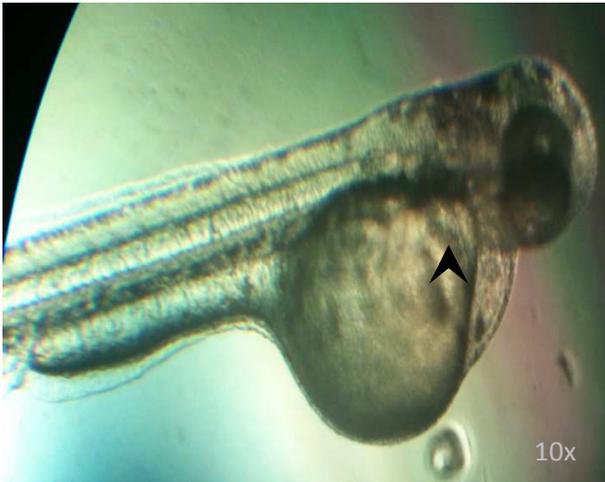
Estación Xochiac
(Dilución) 4.00%
Etapa (hpf) 120
Malformación Cabeza Cauda

Descripción Embrión vista latero-posterior, se observa malformación de cabeza con masas circulares hacia posterior. Región caudal sin extensión lineal y masa anexa en la región media de la cauda. Retraso de 24hrs.

ID 131.120

San Rafael Tenaycac

San Rafael Tenaycac 4.00%



Estación San Rafael
(Dilución) 4.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación ESV

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino en la región parte superior próxima al corazón.

ID 184.72

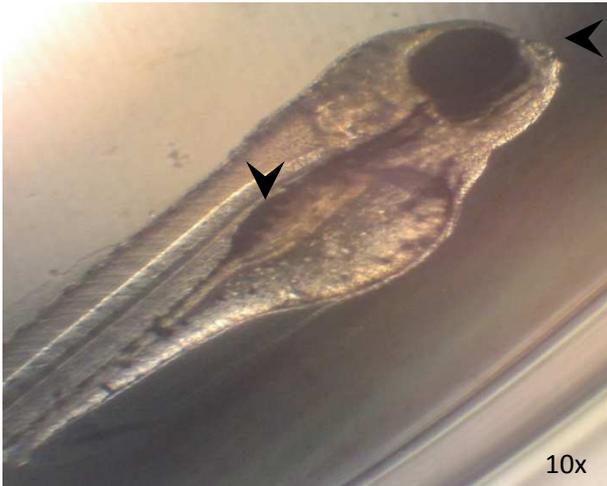


Estación San Rafael
(Dilución) 4%
Etapa (hpf) 96
Malformación Cauda

Descripción Vista lateral inferior de embrión con extensión no lineal de la región caudal (línea Blanca)

ID 186.96

San Rafael Tenaycac 10.00%



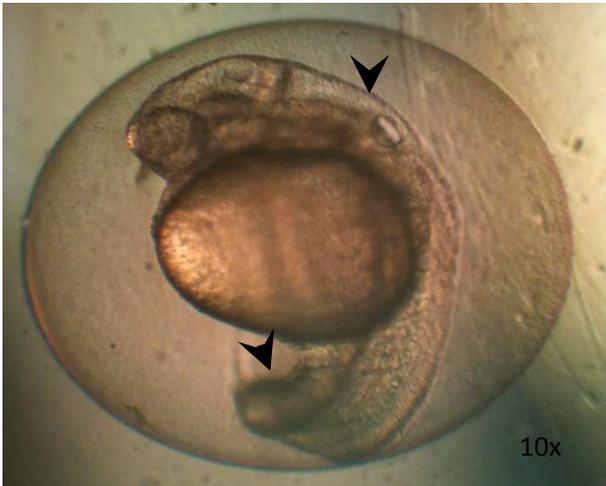
Estación San Rafael
(Dilución) 10.00%
Etapa (hpf) 96
Malformación *ESV, Cabeza*

Descripción Embrión vista lateral con alargamiento de saco vitelino, vejiga natatoria con tamaño aumentando. Protuberancias en boca y ojo con pérdida de la circunferencia.

10x

ID 157.96

San Rafael Tenaycac 20.00%



Estación San Rafael
(Dilución) 20.00%
Etapa (hpf) 48
Malformación *Cabeza, Cauda*

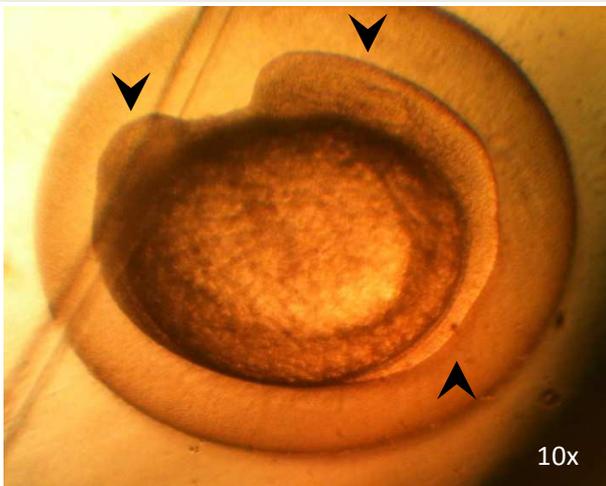
Descripción Embrión vista lateral con migración incompleta de otolito en región posterior de cabeza. Región caudal terminal en forma de muñon.

10x

ID 155.48

Confluencia de ríos Atoyac y Xochiac

Confluencia 4.00%

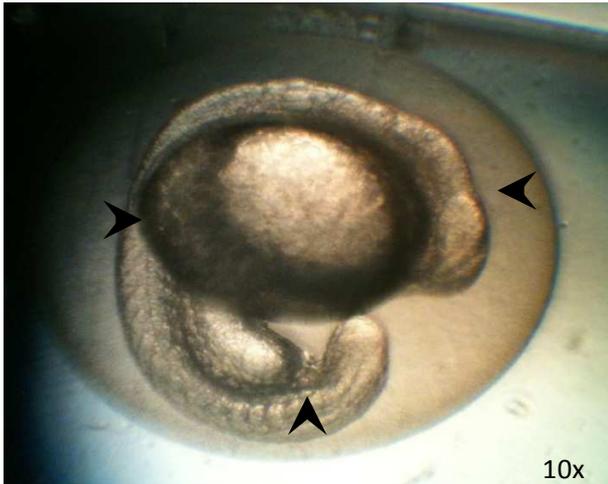


Estación Confluencia
(Dilución) 4.00%
Etapa (hpf) 24
Malformación *Somitas, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con ausencia de ojo, otolito somitas. Región caudal unida al saco vitelino. Retraso de 5hrs.

10x

ID 192.24



Estación (Dilución) Confluencia 4.00%
Etapa (hpf) 48
Malformación *ESV, Cabeza, Cauda*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino hacia dorsal. Región caudal con presencia de células anexas hacia la región terminal. Retraso de 3hrs.

ID 200.48



Estación (Dilución) Confluencia 4.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *ESV*

Descripción Embrión vista lateral con edema de saco vitelino en la región superior hacia corazón, edema de pericardio.

ID 173.72

Confluencia 10.00%



Estación (Dilución) Confluencia 10.00%
Etapa (hpf) 72
Malformación *Cabeza*

Descripción Embrión vista ventral con depresión de en la región inferior de cabeza del lado izquierdo.

ID 182.72