



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Disminución de la toxicidad del ácido picrolónico en
Danio rerio por nanotubos de carbón de pared sencilla

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

VICTORIA LEVARIO DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. RAFAEL CAMACHO CARRANZA

2014





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.

Datos del Jurado

1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	1. Datos del alumno Levario Díaz Victoria 41 59 36 44 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 307629032
2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	2. Datos del tutor Dr Rafael Camacho Carranza
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	3. Datos del sinodal 1 Dra Rosario Rodríguez Arnáiz
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	4. Datos del sinodal 2 M en C Alfonso José Vilchis Peluyera
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	5. Datos del sinodal 3 Dra Rocío Salceda Sacanelles
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	6. Datos del sinodal 4 Dr Manuel Uribe Alcocer
7. Datos del trabajo escrito Título Subtítulo Número de páginas Año	7. Datos del trabajo escrito Disminución de la toxicidad del ácido picrolónico en <i>Danio rerio</i> por nanotubos de carbón de pared sencilla 38 2014

AGRADECIMIENTOS y DEDICATORIA

A mis padres, Guadalupe Díaz Montero y Victor Levario Medina, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida personal y profesional, así como su cariño entrañable. Gracias a su dedicación y tenacidad soy una persona de bien. De ustedes este triunfo y los que vienen. Saben que sin ustedes nunca habría logrado mis metas y sueños. Les dedico este trabajo con todo cariño.

A mi hermano Bruno Levario Díaz, por su apoyo, cariño, y por ser mi ejemplo a seguir.

A Juan Antonio Corrales Palomares por estar a mi lado en las buenas y en las malas siempre brindándome tu amor y amistad, sabes que siempre estaré a tu lado.

Al Dr. Rafael Camacho Carranza por ser un gran profesor y tutor ejemplar. Gracias por brindarme su paciencia, su enseñanza, pero principalmente por su apoyo absoluto. Usted forma parte de mi formación científica y le agradezco por todo lo que ha hecho por mí.

Al Dr. Javier Espinosa por sus comentarios y por sus consejos.

A la Bióloga Sandra Luz Hernández Ojeda, por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio y por ayudarme en la preparación del ácido picrolónico. Te agradezco todas tus enseñanzas y comentarios, me ayudaron a seguir adelante.

A la Bióloga Claudia Barajas por enseñarme todo lo que se dé nanotubos y sus constantes charlas.

A la M. en C. Blanca Hernández por sus enseñanzas, su cariño y su confianza.

A mis compañeros del laboratorio, Sitlali, Cinthia, Rebeca, Carlos, Clara, Gris, Xanthia, Pau, Sol y Noel que me apoyaron con los peces y me enseñaron a trabajar en equipo.

Al M. en C. Daniel por su apoyo en los estadísticos de este trabajo y por recordarme que la estadística es bella.

A mí jurado por sus comentarios y correcciones en este trabajo.

Al Dr. Ramón Arana por ser un maestro con mucha experiencia, pero sobre todo por ser mi amigo.

Al Dr. Luis Felipe del Castillo por contribuir a mi formación y por su apoyo brindado durante estos años. Gracias por su amistad.

Al señor Jesús Fares Kuri que siempre me impulsó a seguir mis sueños y por ayudarme en todo momento. Sé que ahora se encuentra en un lugar mejor cuidando de su familia y de mí.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Nanotecnología.....	3
1.2. Tipos de nanopartículas	5
1.3. Nanotoxicología y nanoecotoxicología.....	8
1.4. Nanotubos de carbón.....	11
1.5. Clasificación y propiedades de los CNT's	13
1.6. Fabricación de los CNT's.....	15
1.7. Estabilidad de los CNTs en ambientes acuáticos	16
1.8. Ecotoxicidad de nanotubos de carbón	18
1.9. Ácido picrolónico.....	19
1.10. Pez cebra.....	19
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Particulares	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Nanotubos de carbón.....	22
3.2. Mantenimiento del pez cebra y obtención de embriones	22
3.3. Distribución de los SWCNTs en el medio acuático.....	23
3.4. Frecuencia cardíaca.....	23
3.5. Preparación y tratamiento de ácido picrolónico	24
3.6. Supervivencia.....	24
RESULTADOS.....	25
4.1 Evaluación de las frecuencias cardíacas.....	25
4.2 Ácido picrolónico.....	28
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	31
LITERATURA CITADA	31

RESUMEN

Estudios recientes han demostrado el potencial tóxico en los ambientes acuáticos de desechos de nanomateriales manufacturados; por lo tanto, es necesario determinar los mecanismos de acción, dosis, dependencia e impacto sobre las especies acuáticas. Debido al impacto ambiental de los desechos de nanomateriales, es de interés el estudio de la toxicidad de los nanotubos de carbón (por sus iniciales en inglés CNTs) por su producción masiva y múltiples aplicaciones, para ello se ha utilizado como modelo los embriones del pez cebra (*Danio rerio*).

Se ha reportado que los CNTs de pared simple (por sus iniciales en inglés SWCNT) se aglomeran en condiciones básicas de pH en agua y presentan afinidad hacia el corion de los embriones del pez cebra. En efecto, mediante microscopia electrónica se determinó que los aglomerados de SWCNT alcanzan el orden de los micrómetros, mientras que los poros del corion de los embriones de pez cebra miden en el orden de nanómetros. Así mismo, un trabajo previo en el laboratorio, mediante ensayos rutinarios de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurium* (ensayo de Ames), observó la mutagenicidad reducida del ácido picrolónico en presencia de SWCNT.

Es nuestro interés determinar si la presencia de los SWCNT puede modificar la fisiología de los peces en formación, así como también comprobar la mutagenicidad reducida en un modelo vertebrado. Este trabajo evalúa las frecuencias cardiacas como un parámetro general fisiológico en presencia de SWCNT, así como las tasas de supervivencia de los embriones cuando son retados con ácido picrolónico. Proponemos que los aglomerados de SWCNT al bloquear los poros del corion, dificultan el intercambio de O₂ con el medio, por lo que la frecuencia cardiaca se verá modificada.

Por otra parte y con base en el resultado del trabajo previo en el laboratorio con el ensayo de Ames, sugerimos que los SWCNT por sus propiedades de adsorción, pueden capturar el ácido picrolónico protegiendo a los embriones de este mutágeno.

En el presente trabajo, los SWCNT fueron empleados a una concentración de 20 µg/mL y dispersados por sonicación durante 15 minutos. Los embriones del pez cebra fueron separados en placas de 24 pozos, ubicando 3 embriones por pozo, en presencia o ausencia de los SWCNT, en 2 mL de agua de acuario. El ácido picrolónico fue disuelto a una concentración de 1 µg/mL en DMSO (Dimetil sulfóxido). Los embriones fueron divididos en 4 grupos (40 embriones) y expuestos a:

- SWCNT / Ácido picrolónico
- Ácido picrolónico

- SWCNT / DMSO
- DMSO

Los resultados obtenidos muestran una disminución en las frecuencias cardiacas en presencia de nanotubos de carbón y altas tasas de supervivencia en grupos expuestos a SWCNT / ácido picrolónico y SWCNT / DMSO.

La propuesta exploratoria es que los nanotubos de carbón modifican la disponibilidad de oxígeno para el embrión al afectar la estructura del poro del corion, pero a su vez protegen al embrión expuesto a un mutágeno como el ácido picrolónico o a un disolvente como el DMSO.

Este estudio sugiere que los SWCNT no son inocuos en los ambientes acuáticos, sin embargo, pueden actuar como agentes de protección contra el ácido picrolónico y/o DMSO.

INTRODUCCIÓN

1.1. Nanotecnología

El prefijo *nano* – proviene del latín *nanus*, que significa “enano” y actualmente tiene la aceptación de una milmillonésima parte. Así, un nanómetro (abreviado nm) es una milmillonésima parte ($1 / 1\,000\,000\,000$) de un metro (Takeuchi, 2010). El nanómetro es la unidad natural con la que medir átomos y moléculas, pero también es la unidad adecuada para determinar el espesor de una membrana celular, el tamaño de los virus o la longitud de onda de la radiación ultravioleta (Serena, 2010). La nanotecnología es el área de investigación que estudia, diseña y fabrica materiales o sistemas a escalas nanoscópicas y les da alguna aplicación práctica (Takeuchi, 2010) [Figura 1].

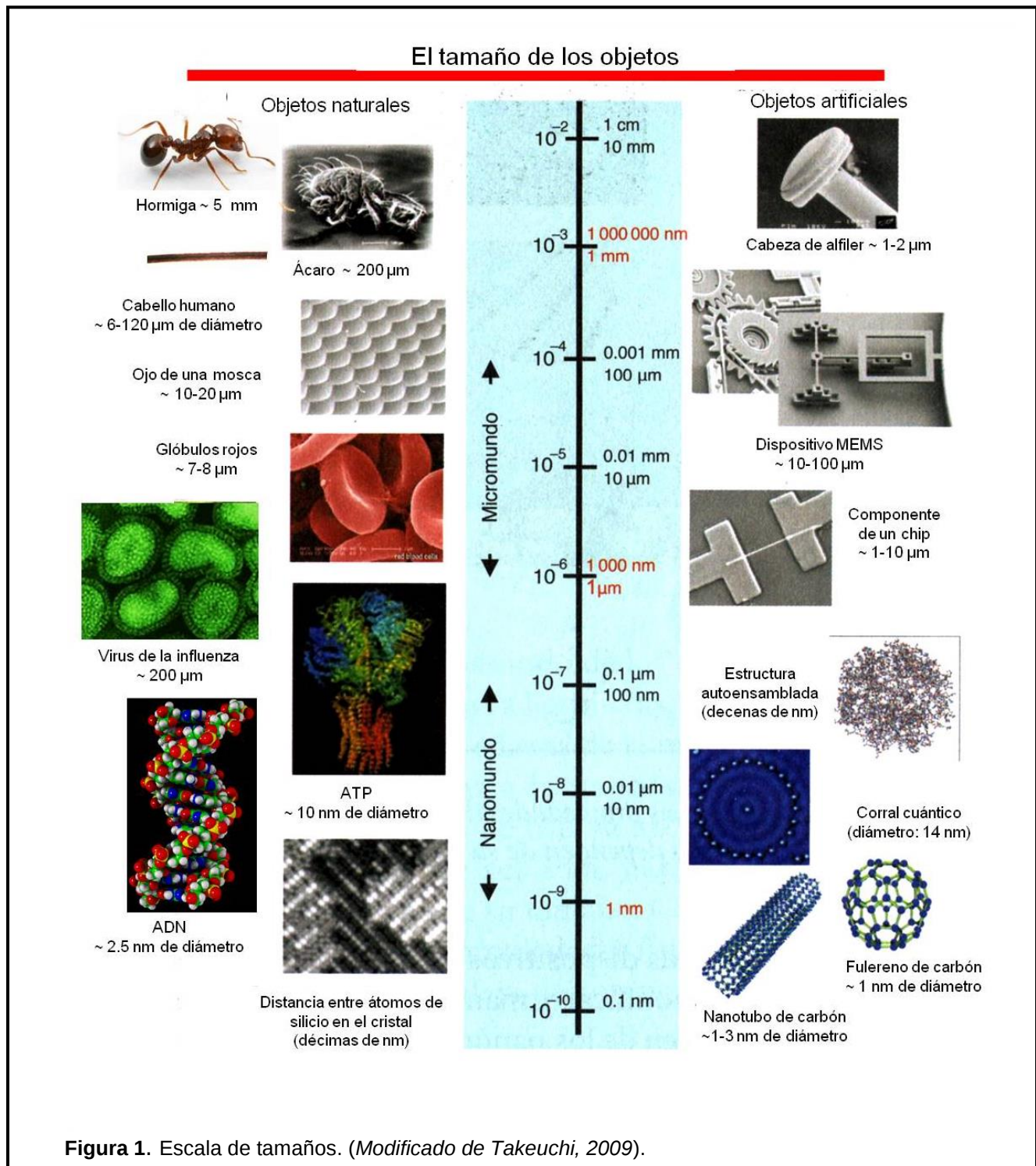
La idea de la nanotecnología fue introducida en 1959 por primera vez cuando Richard Feynman, un físico de Caltech, dio una plática titulada, “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” (Santamaria, 2012; Feynman, 1960), en la que planteaba la manipulación directa de los átomos individuales o la fabricación molecular. Sin embargo el término “nanotecnología” fue usado por primera vez en una publicación en 1974 por un estudiante de Tokyo Science University llamado Norio Taniguchi, en la cual planteó: “nano-tecnología consiste en el proceso de separación, consolidación y deformación de materiales por un átomo o una molécula” (Santamaria, 2012; Taniguchi, 1974).

No fue sino hasta 1980 que la nanotecnología se desarrolló como un campo gracias a la expansión de la idea de Feynman, por el científico del MIT, Eric Drexler, el cual tomó los conceptos y los expuso en su libro titulado “*Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*” (Santamaria, 2012; Drexler, 1986).

Las ideas de Feynman, Taniguchi o Drexler comenzaron a dejar de ser una entelequia durante la década de los años 1980, cuando surgieron poderosas e imaginativas herramientas con las que observar y modificar el nanomundo (Serena, 2010). Estos avances tecnológicos proporcionaron herramientas valiosas que ayudaron a formalizar la nanotecnología como un campo científico (Santamaria, 2012).

En este sentido, se puede afirmar que durante éstas tres últimas décadas lo que se ha desarrollado de manera impetuosa es una *nanociencia*, pues se han acumulado innumerables conocimientos sobre el nanomundo (Serena, 2010). La *nanociencia* es el estudio de los procesos fundamentales que ocurren en las estructuras de un

tamaño entre 1 y 100 nanómetros, las cuales se conocen como *nanoestructuras* (Takeuchi, 2009).



La nanotecnología está asociada con al menos 3 ventajas (Ramsden et al., 2011):

- Ofrece la posibilidad de crear materiales con combinaciones de propiedades nuevas.
- Los dispositivos del orden nanométrico necesitan menos material para ser producidos, usan menos energía y otros bienes, su función puede ser mejorada reduciendo las dimensiones, y pueden tener una amplia gama de accesibilidad.
- Ofrece una tecnología de fabricación universal.

La meta de la nanotecnología es direccionar los átomos y las moléculas hacia estructuras deseadas o patrones con nuevas funcionalidades. En la nanoescala, las propiedades físicas, químicas y biológicas de los materiales difieren en lo fundamental e importante de las propiedades individuales de los átomos y moléculas (Fulekar et al., 2010).

Esta particularidad hace de la nanotecnología una ciencia verdaderamente multidisciplinaria donde se entremezclan conceptos, modos de hablar y técnicas de caracterización y fabricación muy diferentes. Una consecuencia inmediata de este carácter multidisciplinario es la capacidad de proporcionar nuevos productos en muchas áreas de aplicación (Serena, 2010). [Figura 2].

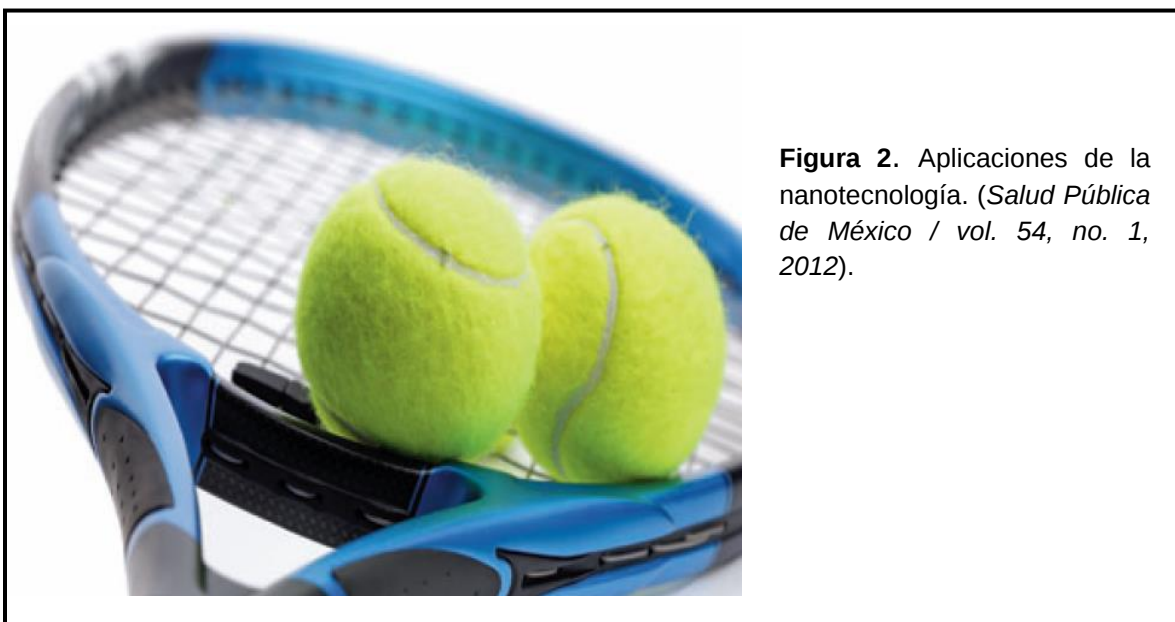


Figura 2. Aplicaciones de la nanotecnología. (*Salud Pública de México* / vol. 54, no. 1, 2012).

1.2. Tipos de nanopartículas

La definición de un nanomaterial (NM) adoptado por el British Standards Institution (Klaine et al., 2008; British Standards Institution, 2007) the American Society for Testing Materials (Klaine et al., 2008; American Society for Testing and Materials,

2006), y el Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks (Klaine et al., 2008; Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 2007) es un material con al menos una dimensión por debajo de 100 nm. Los nanomateriales se clasifican en función de sus dimensiones, como se muestra en la **Tabla 1** (Filipponi et al., 2013). Dentro de este grupo de materiales se encuentran las nanopartículas (NP), definidas como materiales con al menos dos dimensiones entre 1 y 100 nm (Klaine et al., 2008; American Society for Testing and Materials, 2006).

Tabla 1. Clasificación de los nanomateriales en función de sus dimensiones.

Dimensión del nanomaterial	Ejemplos
Tres dimensiones < 100 nm	Nanopartículas, quantum dots y microcápsulas
Dos dimensiones < 100 nm	Nanotubos, fibras y nanocables
Una dimensión < 100 nm	Películas delgadas, capas y recubrimientos

Los nanomateriales poseen diferentes propiedades en comparación con el mismo material en su forma gruesa o voluminosa (Rana et al., 2013; I. N. Throback et al., 2007). Una vez que el material es reducido a un tamaño menor de 100 nm, sus componentes demuestran unas características inusuales basadas en la mecánica cuántica, el cual influye en una variedad de propiedades como son la conductividad, la transferencia de calor, la temperatura de fusión, propiedades ópticas y magnetización (Rana et al., 2013; B. Bhushan et al., 2007).

Las primeras observaciones y mediciones de las nanopartículas fueron realizadas durante la primera década del siglo veinte, en 1914 por Richard Adolf Zsigmondy, quien fue el primero en utilizar el término nanómetro para caracterizar un tamaño de partícula de 1/ 1, 000, 000 de un milímetro, además desarrolló el primer sistema de clasificación basado en un tamaño de partícula en el rango nanométrico (Santamaria, 2012; Zsigmondy, et al., 1914).

Las nanopartículas no son una invención antropogénica y han existido naturalmente desde el inicio de la historia de la Tierra, sus fuentes naturales se pueden encontrar en polvo de origen volcánico, suelos y sedimentos. Las nanopartículas naturales son generadas por una gran variedad de procesos geológicos y biológicos. Los procesos

geológicos producen nanopartículas inorgánicas y los mecanismos biológicos producen nanomoléculas orgánicas (Handy et al., 2008) [Figura 3].

Las nanopartículas en el aire fueron tradicionalmente referidas como partículas ultrafinas, mientras que en el suelo y agua son coloides, con ligeras diferencias en el rango de tamaño (Klaine et al., 2008).

Las nanopartículas fabricadas muestran un coloide complejo y una agregación química, lo que es probable que se vean afectados la forma, el tamaño, la superficie del área y la carga de la superficie, así como las propiedades de adsorción del material (Handy et al., 2008).

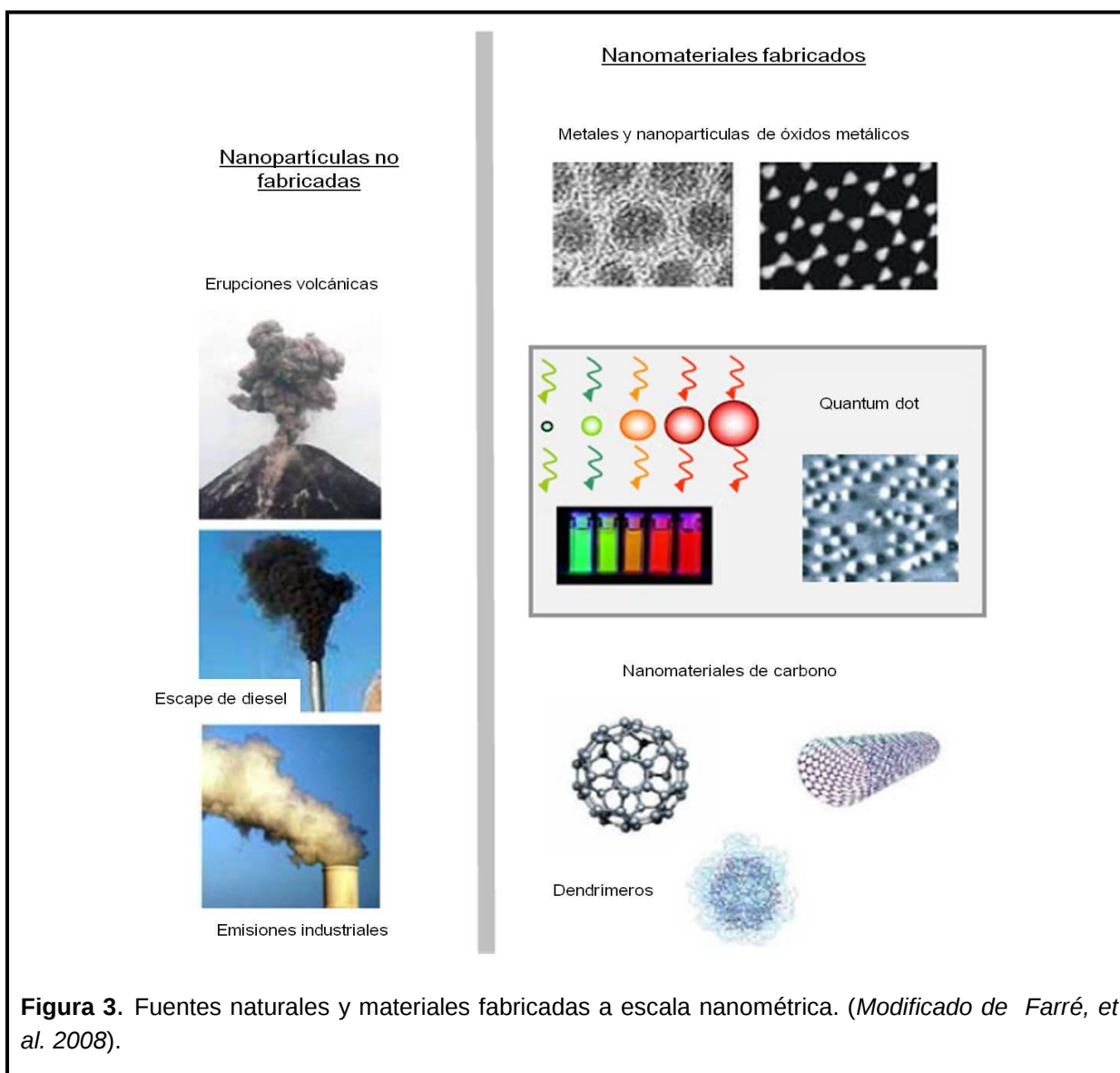


Figura 3. Fuentes naturales y materiales fabricadas a escala nanométrica. (Modificado de Farré, et al. 2008).

1.3. Nanotoxicología y nanoecotoxicología

En el 2004, Donaldson y sus colegas propusieron una nueva idea en el mundo de la toxicología, - la idea de que las partículas nanométricas se comportan de manera muy diferente de sus contrapartes más grandes, por lo tanto una nueva subcategoría dentro del campo era necesaria (Donaldson et al., 2004) el nombre de la nueva subcategoría es *nanotoxicología* (Monteiro-Riviere et al., 2013) y se define como el estudio de la toxicología de los nanomateriales (Ramsden et al., 2011).

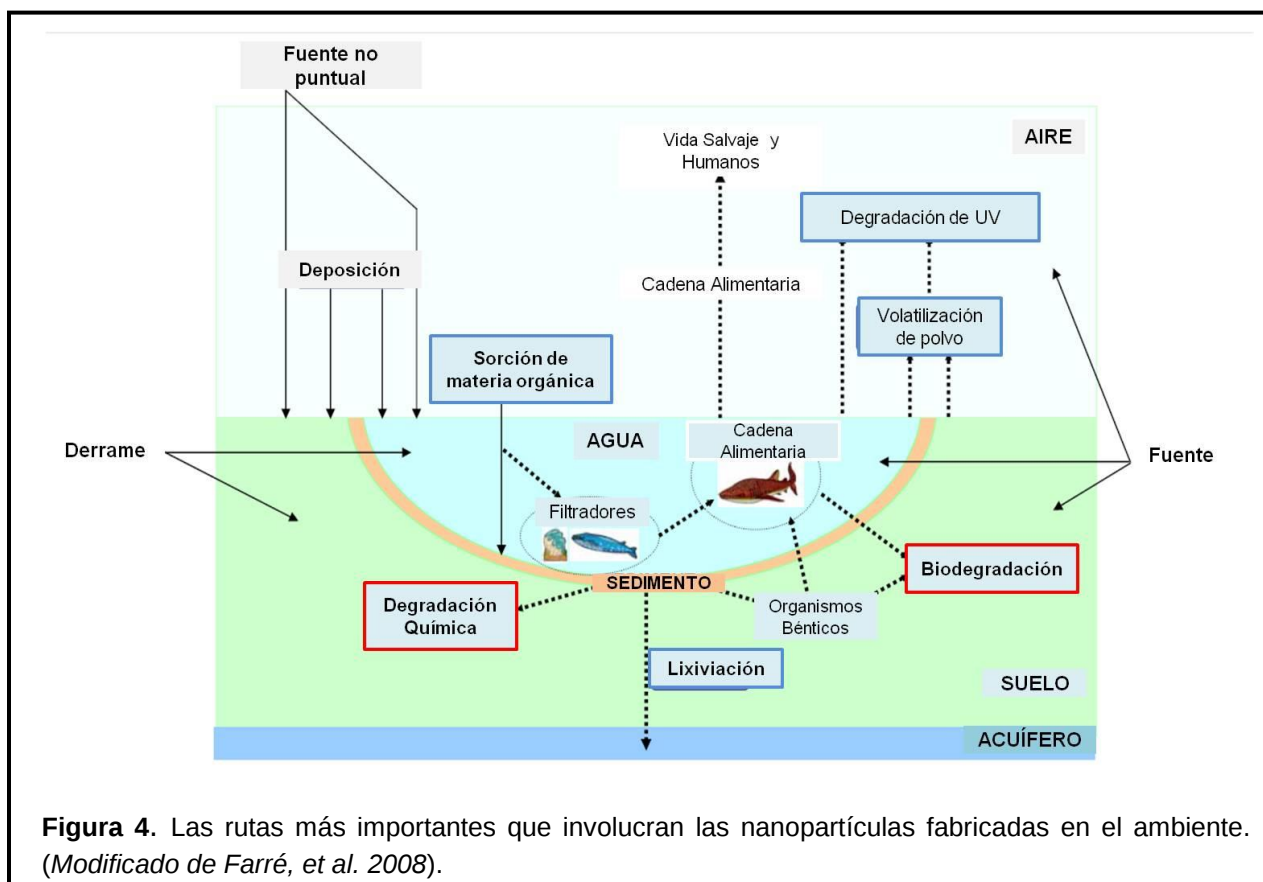
Así mismo, la ecotoxicología es una ciencia relativamente nueva que se preocupa por los contaminantes presentes en la biosfera y sus efectos sobre sus componentes, incluyendo los humanos. El término “ecotoxicología” fue acuñado por René Truhaut en 1969, el cual lo definió como “la rama de la toxicología que se ocupa del estudio de los efectos tóxicos causados por los contaminantes naturales o sintéticos, a los componentes de los ecosistemas, los animales (incluyendo humanos), vegetales y microbios. La investigación en la ecotoxicología se desarrolló muy rápido debido a la contaminación en el ambiente inducido por el rápido desarrollo industrial y surgió la preocupación ambiental sobre el efecto de las nanopartículas (NPs). Fue entonces cuando aparecieron los primeros artículos sobre la *nanoecotoxicología* en el 2006 (Kahru et al., 2009).

El medio ambiente contiene nanopartículas naturales tales como, el componente ultrafino de arena del desierto, aerosoles de sal producidos por la evaporación de la espuma de mar y la ceniza volcánica, además contiene nanopartículas aéreas artificiales, producidas no intencionalmente, tales como los productos de la combustión (Ramsden et al., 2011). En las atmósferas urbanas, los vehículos que usan diesel o gasolina y las fuentes estacionarias de combustión por muchos años han contribuido a la liberación de material particulado en una amplia gama de tamaños, incluyendo nanopartículas, que asciende a más de un 36% de las concentraciones totales de partículas (Shi et al., 2001; Klaine et al., 2008). Existen antecedentes de nanopartículas naturales en la atmósfera, aunque la concentración total es baja en comparación a la liberación de nanopartículas manufacturadas.

Recientemente, las altas tasas de producción y uso de nanopartículas, han planteado la preocupación de que la liberación de los nanomateriales fabricados puede suponer una grave amenaza para el medio ambiente, debido a que los ecosistemas acuáticos probablemente servirán como sumideros terminales de los nanomateriales introducidos a los sistemas naturales (Griffitt et al., 2008) por ello es necesario determinar el destino y comportamiento de los nanomateriales manufacturados en el ambiente (Klaine et al., 2008).

Oberdorster et al. (Oberdorster et al., 2005; Kennedy et al., 2008) identificaron varias vías para la liberación de los nanomateriales, tales como la producción en masa

(derrames y efluentes), el enjuague de productos de cuidado personal, lixiviación de productos, el uso de productos desechables y el reciclaje de los nanomateriales en producción [Figura 4] (Kennedy et al., 2008).



Se pueden considerar tres fuentes principales de nanomateriales en el medio ambiente:

1. Fuentes antropogénicas
2. Fuentes no intencionadas
3. Producción y uso de nanomateriales fabricados

Una vez en el ambiente, las nanopartículas libres tienden a formar agregados [Figura 5] que pueden ser atrapados o eliminados a través de la sedimentación. Los agregados o las nanopartículas adsorbidas son menos móviles y pueden someterse a la captación por filtradores y organismos que viven en el sedimento. La formación de agregados en los sistemas naturales puede ser comprendida considerando los procesos físicos, tales como la difusión Browniana, el movimiento fluido y la gravedad (Farré et al., 2008).

Las partículas emitidas en última instancia se depositarán en la suelo y en la superficie de los cuerpos de agua, aunque el tratamiento para evitar la agregación

puede dar lugar a una mayor flotabilidad de estas nanopartículas cuando se compara con las NPs de otras fuentes, tales como los derivados de las emisiones de diesel (Klaine et al., 2008).

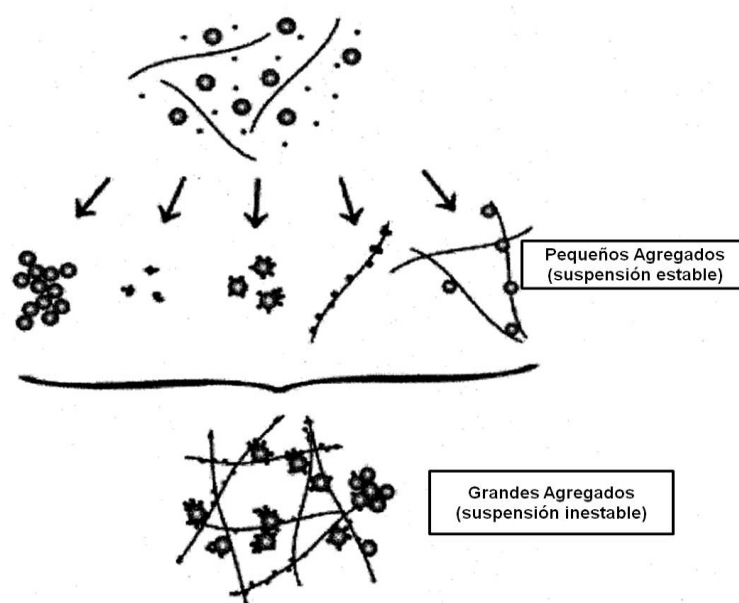


Figura 5. Dos modelos de coloides acuáticos relevantes para los procesos de agregación. Los puntos pequeños son material de tipo fúlvico entre otros, como azúcares y aminoácidos; los círculos representan coloides inorgánicos; y las líneas son biopolímeros tales como las fibrillas polisacáridas. Tomado de Buffle et al. 1998. (Modificado de Klaine et al. 2008).

El dramático incremento del uso de las nanopartículas fabricadas ha dado lugar a una mayor exposición ambiental y humana, y por lo tanto es claro que los organismos que viven en ambientes que contienen nanopartículas (NPs), las incorporarán. Las nanopartículas pueden entrar a las células por difusión a través de membranas celulares (Lin et al., 2007) así como también por endocitosis (Kim et al., 2006) y adhesión (Geiser et al., 2005). Diferentes propiedades físico-químicas, no solamente el tamaño, determinan la habilidad de las nanopartículas para atravesar barreras biológicas; la situación se complica aún más por la formación de una llamada corona de biomoléculas en las superficies de las nanopartículas [Figura 6], la composición de las cuales puede variar dependiendo de la vía de exposición y la traslocación de las nanopartículas de un compartimento biológico a otro (Pietroiusti et al., 2012).

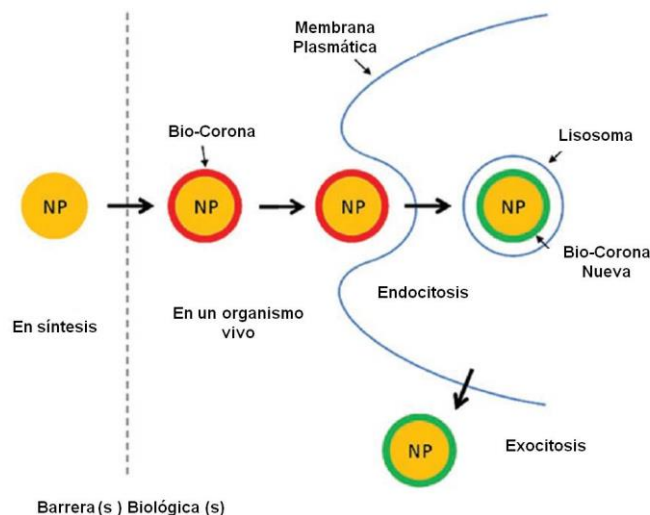


Figura 6. Representación esquemática de la dinámica de la bio-corona en las superficies de las nanopartículas. Superficies prístinas de las nanopartículas (NPs) son rápidamente cubiertas por biomoléculas (proteínas, lípidos, etc.) como van entrando al compartimento biológico y la bio-corona puede cambiar dependiendo del portal de entrada (por ejemplo, pulmones o tracto gastrointestinal); la bio-corona puede someterse a cambios dinámicos seguidos de endocitosis y puede sufrir más cambios en la endocitosis. (Modificado de Pietroiusti, et al., 2012).

Para las plantas, las respuestas tóxicas más comunes son la reducción en la germinación o el crecimiento, deformación de la membrana celular, deterioro en la fotosíntesis, reducción en el desarrollo reproductivo y la mortalidad. Normalmente, las respuestas tóxicas descritas para los animales expuestos a las nanopartículas fabricadas incluyen citotoxicidad por necrosis o apoptosis, daño de órganos o tejidos, inhibición del crecimiento, disminución de la reproducción y / o desarrollo y la mortalidad (Klaine et al., 2008; Wang et al., 2013).

Estudios de toxicidad en seres humanos, con énfasis en los entornos de los trabajadores, no sólo tienen en cuenta principalmente la dispersión y la absorción por aire, sino también la absorción directa a través de la ingestión, la exposición cutánea y en algunos casos especiales relacionados con el uso médico e inyecciones (Rana et al., 2013).

1.4. Nanotubos de carbón

El carbón en fase sólida puede existir en tres formas alotrópicas: grafito, diamante y fulerenos. El diamante es una estructura cristalina donde cada átomo de carbón sp^3 hibridado está unido a otros 4 átomos en un arreglo tetraédrico. El grafito está hecho de capas planas de átomos de carbón sp^2 hibridados unidos en una red hexagonal (Guldi et al., 2010).

En 1996, Harry Kroto, Robert Curl y Rick Smalley fueron premiados con el Premio Nobel de Química por el descubrimiento en 1985 de una molécula esférica compuesta de átomos de carbón. El C_{60} o “bucky ball”, es una molécula icosaédrica con 60 átomos de carbón unidos en pentágonos y hexágonos. Esta estructura del orden de nanómetros fue nombrada “fulereno” debido a su semejanza con los domos geodésicos diseñados por el arquitecto Richard Buckminster Fuller. En la década de 1980 y principios de 1990, se llevó a cabo una amplia investigación sobre la teoría, síntesis y caracterización del fullereno. Sin embargo, en 1991 Iijima, presentó sus observaciones tomadas por el microscopio de transmisión electrónica mostrando microtubos en capas, alargados y concéntricos hechos de átomos de carbón, los cuales, hasta ese entonces, habían sido considerados como filamentos de carbón (Guldi et al., 2010; O’Connell et al., 2012). Esto impulsó la investigación relacionada con una de las estructuras más investigadas activamente del siglo pasado: ahora llamados nanotubos de carbón (CNTs) (Guldi et al., 2010).

Iijima fue el primero en reconocer que los nanotubos son hojas de grafeno enrolladas concéntricamente con helicidades y quiralidades. Inicialmente observó los nanotubos de pared múltiple (MWCNTs) con entre 2 y 20 capas, pero en una publicación posterior en 1993, confirmó la existencia de los nanotubos de pared sencilla (SWCNTs) y elucidó su estructura (Guldi, 2010). Actualmente, los nanotubos de carbón son agrupados en dos grupos, SWCNTs que consisten en una capa de grafeno y los MWCNTs que consisten en un arreglo coaxial anidado de SWCNTs, separados por aproximadamente 0.34 nm, ligeramente más grande que el espacio de la capa intermedia del grafeno. [Figura 7] (Cheng et al., 2006; Zhang et al., 2012).

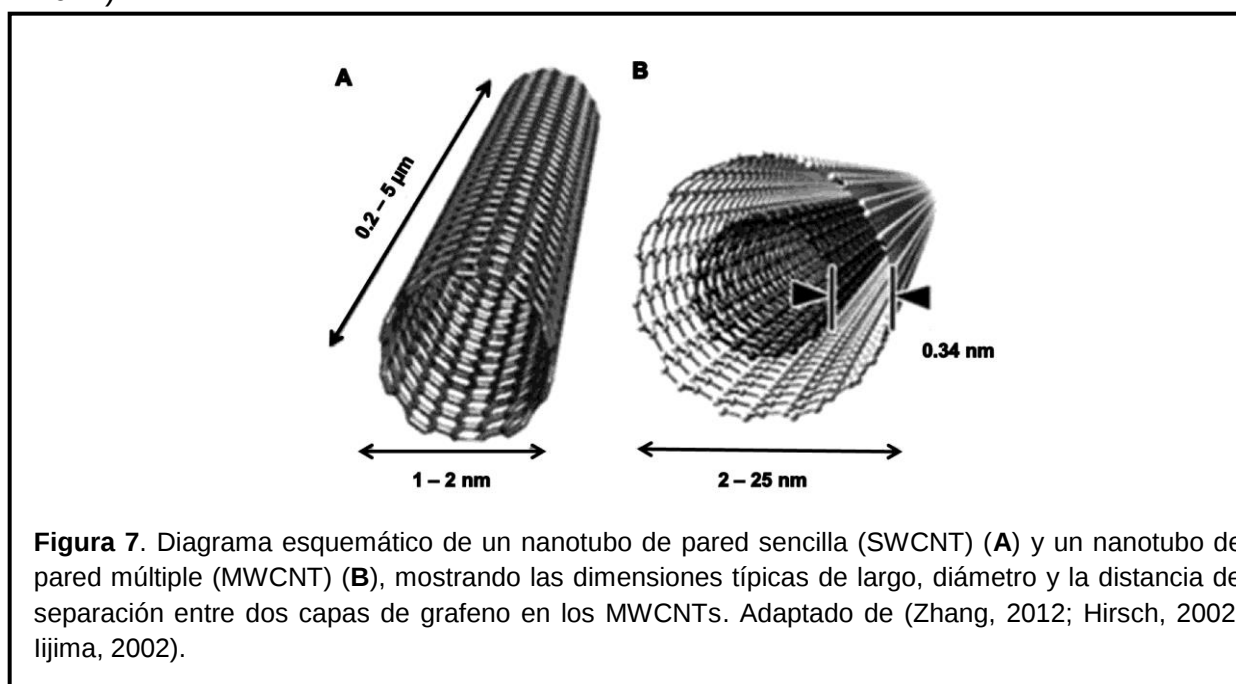


Figura 7. Diagrama esquemático de un nanotubo de pared sencilla (SWCNT) (A) y un nanotubo de pared múltiple (MWCNT) (B), mostrando las dimensiones típicas de largo, diámetro y la distancia de separación entre dos capas de grafeno en los MWCNTs. Adaptado de (Zhang, 2012; Hirsch, 2002; Iijima, 2002).

1.5. Clasificación y propiedades de los CNT's

Los nanotubos de carbón (CNTs) consisten en átomos de carbono que están estructurados en capas de grafeno enrolladas en cilindros. Cada átomo de carbón esta simétricamente unido a otros 3 átomos de carbón, que a su vez forman anillos hexagonales (Gustavsson et al., 2011).

- Clasificación por el número de capas de grafeno:
 - a. Nanotubos de pared sencilla (SWCNTs): consisten en una sola capa de grafeno.
 - b. Nanotubos de pared múltiple (MWCNTs): consisten de varias capas de grafeno dispuestos en cilindros concéntricos, los cuales están unidos por fuerzas de van der Waals.

La estructura atómica de los nanotubos de carbono es descrita por el ángulo quiral de los tubos, el cual determina la forma torcida de los hexágonos en la estructura de grafeno. El ángulo quiral se describe a menudo por un vector (n, m) donde n y m denotan el número entero de los vectores a lo largo de la estructura de grafeno [Figura 8].

- Clasificación de acuerdo a los índices de Hamada:
 - a. De tipo zigzag: cuando la $m=0$
 - b. De tipo armchair: cuando la $n=m$
 - c. De tipo quiral: cuando son $(n > m > 0)$

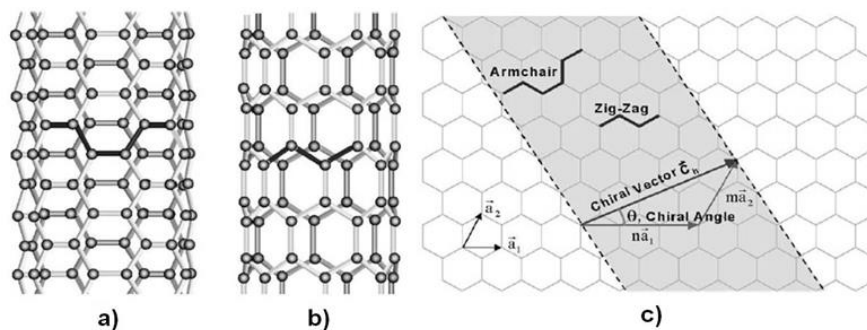


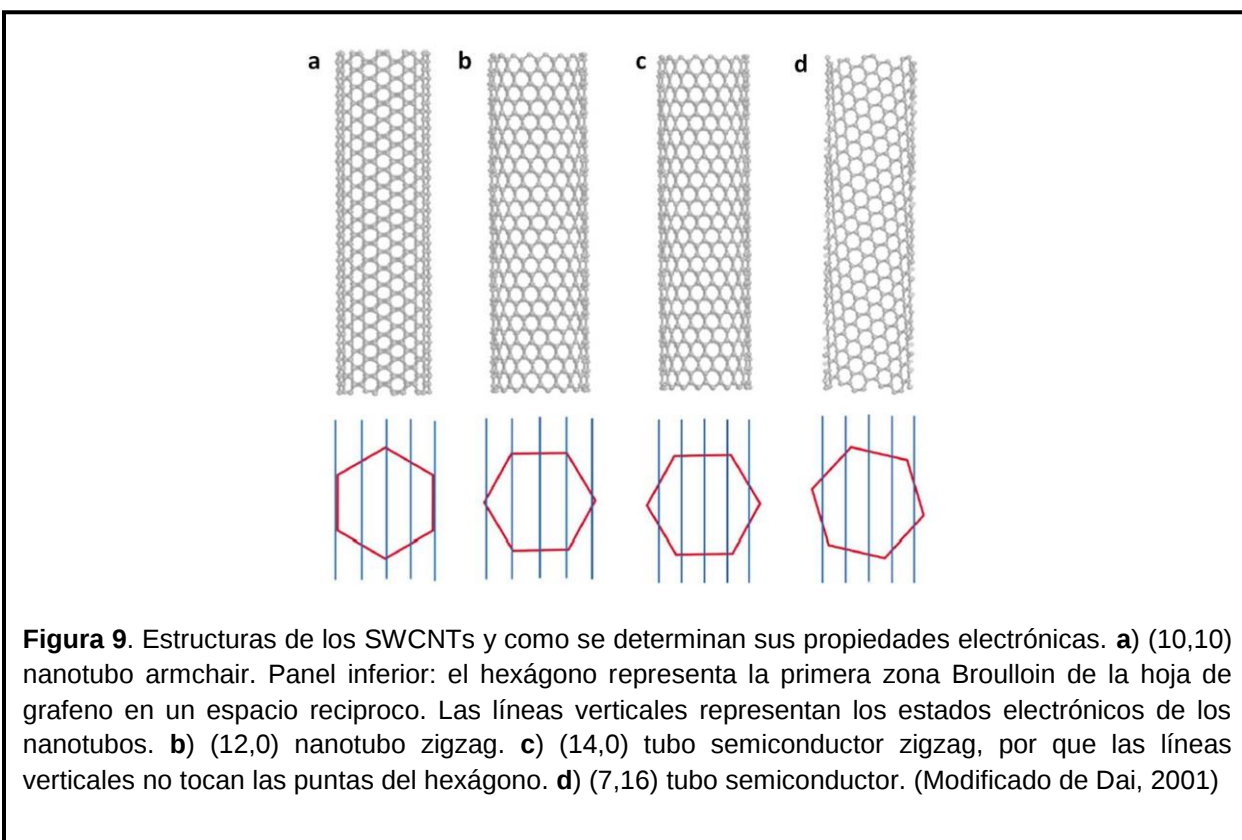
Figura 8. La estructura atómica de los SWCNTs para dos tipos de tubos; **a)** estructura “armchair” **b)** estructura “zigzag”. **c)** un diagrama de diferentes torcidos y ángulos quirales de una hoja de grafeno. (Fuente: Thostenson et al., 2001). (Modificado de Gustavsson, et al., 2011)

El ángulo quiral de los nanotubos de carbono afecta algunas de sus propiedades como las propiedades mecánicas, ópticas y en particular las eléctricas. El grafeno en sí es un semiconductor, en contraste los nanotubos se pueden clasificar en:

- Clasificación por la estructura electrónica dependiendo de su ángulo quiral:
 - a. Metálicos: (armchair)
 - b. Semiconductores: (zigzag y quiral)

En términos de propiedades mecánicas, los nanotubos se encuentran dentro de los materiales más fuertes y resistentes que existen en la naturaleza (Dai et al., 2001). Los SWCNTs son alrededor 10 veces más fuertes que el acero y de 1 a 2 veces más rígidos que el diamante (Walters et al., 1999; Yu et al., 2000). También son muy flexibles, ya que pueden doblarse varias veces hasta 90° sin dañarse (Gustavsson et al., 2011).

Las propiedades eléctricas de los nanotubos dependen de los índices (n, m) y por lo tanto en el diámetro y quiralidad. Un SWCNT puede ser un metal o un semiconductor dependiendo de los parámetros estructurales (n, m) [Figura 9] (Dai et al., 2001), mientras que los MWCNTs dependen de las características de cada capa de carbono coaxial y la conducción se lleva a cabo dentro del plano basal del grafito (Bourlon et al., 2004) (Zhang et al., 2012).



Los CNTs también tienen una capacidad de adsorción, la cual es atribuida a su estructura porosa, el área de la superficie y la existencia de un amplio espectro de grupos funcionales superficiales. Tienen una aplicación potencial de remover metales pesados, tales como el zinc (Zn), cadmio (Cd), entre otros. Los mecanismos por los que los iones metálicos son adsorbidos a los CNTs son muy complicados y puede atribuirse a la atracción electrostática, adsorción-precipitación e interacción entre los iones metálicos y los grupos funcionales de la superficie de los CNTs (Mubarak et al., 2014).

1.6. Fabricación de los CNT's

Se pueden obtener nanotubos de carbono por ablación láser, por los métodos de descarga de arco de carbono y por deposición de vapor químico (Poole, 2007).

El método por ablación láser consiste en que un tubo de cuarzo que contiene argón y un blanco de grafito son calentados a 1200 °C. Contenido en el tubo, pero un poco fuera del horno, esta un colector de cobre refrigerado por agua. El blanco de grafito contiene pequeñas cantidades de cobalto y níquel que actúan como sitios de nucleación catalíticos para la formación de los tubos. Un haz de laser pulsado incide en el objetivo, evaporándose el carbono del grafito. El argón luego precipita los átomos de carbono de la zona con alta temperatura al colector de cobre refrigerado en el que se condensan los nanotubos. Mediante este método se pueden producir tubos de 10-20 nm de diámetro y 100 µm de largo.

Los nanotubos también se pueden sintetizar empleando el método de descarga de arco de carbono. Un potencial de 20-25 V es aplicado a través de electrodos de carbono de 5-20 µm de diámetro y separados por 1 mm a una presión de 500 torr de de helio que fluye. Los átomos de carbono son expulsados de un electrodo positivo y se forman los nanotubos en un electrodo negativo. Conforme se van formando los tubos, la longitud del electrodo positivo decrece, y un depósito de carbono se forma en el electrodo negativo. Para producir SWCNTs, una pequeña cantidad de cobalto, níquel o hierro, es incorporada como catalizador en la región central del electrodo positivo. Si no se utiliza un catalizador, los tubos se anidarán o se producirán MWCNTs, que son nanotubos dentro de nanotubos. El método de arco de carbono puede producir SWCNTs de diámetros de 1-5 nm con una longitud de 1 µm [Figura 10].

El método por deposición de vapor químico involucra la descomposición de un gas de hidrocarburo, como el metano (CH₄) a 1100°C. Conforme el gas se descompone, los átomos de carbono que se producen después se condensan en un sustrato frio que puede contener varios catalizadores como el hierro. Este método produce tubos con extremos abiertos, lo cual no ocurre si se emplean otros métodos. Este

procedimiento permite la continua fabricación, y puede ser el método más favorable para la producción (Poole, 2007).

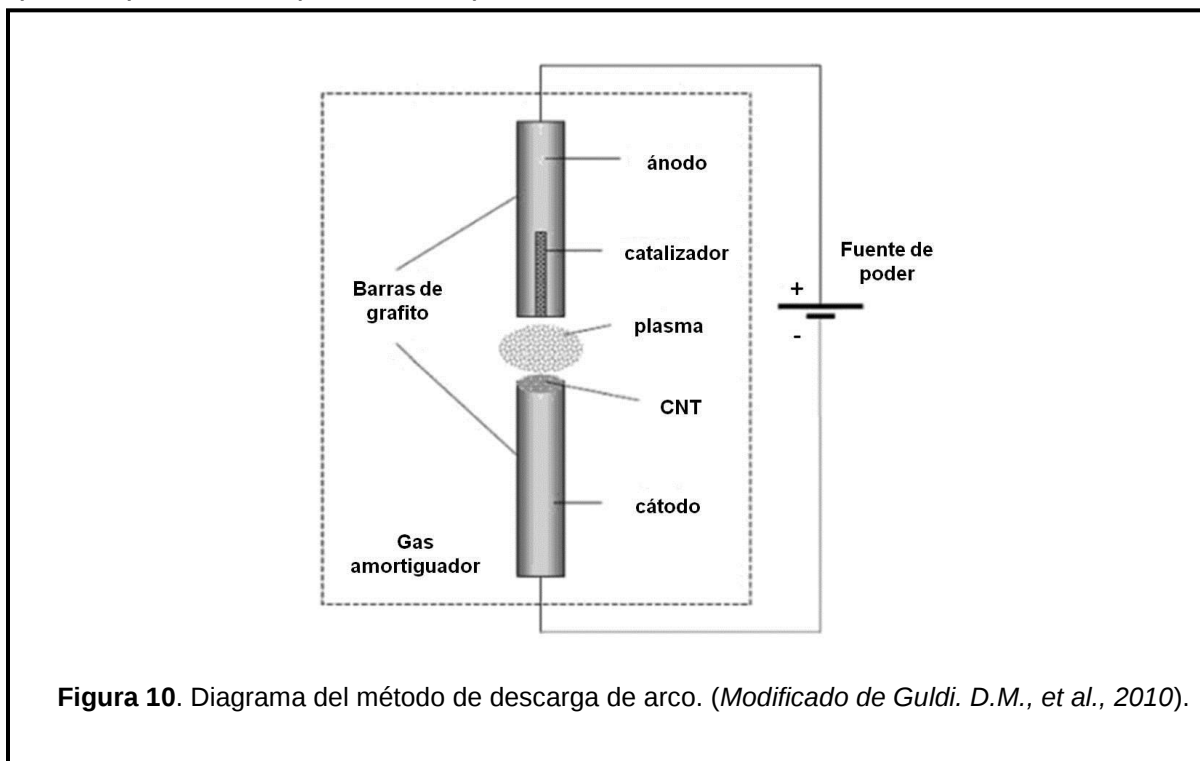


Figura 10. Diagrama del método de descarga de arco. (Modificado de Guldi. D.M., et al., 2010).

1.7. Estabilidad de los CNTs en ambientes acuáticos

Los nanotubos de carbono a menudo se procesan en forma suspendida y por lo tanto, la liberación de suspensiones de estos nanomateriales en el medio acuático es razonable (Schwyzer et al., 2013). El destino y transporte de los CNTs en los sistemas acuáticos son dependientes de la estabilidad coloidal (Griffit et al., 2008; Kohler et al., 2008; Schwyzer et al., 2011; Lin et al., 2009; Lin et al., 2010). La agregación de los CNTs influirá en su capacidad para permanecer suspendidos en solución y por lo tanto también en su movilidad y biodisponibilidad en los sistemas acuáticos naturales. La suspensión de los CNT es mitigada por fuerzas iónicas altas, en la que los cationes protegen las cargas negativas de la superficie de los CNTs resultando en la formación de agregados (Sano et al., 2001; Schwyzer et al., 2013).

La agregación de los CNTs también controla sus tasas de sedimentación (Griffit et al., 2008). Investigadores han sugerido que las nanopartículas de carbono tienen un potencial limitado para la asociación y el transporte acuoso debido a la agregación y adsorción a partículas de sedimento (Kennedy et al., 2008; Templeton et al., 2006; Brant et al., 2005; Espinasse et al., 2007). El efecto de los ácidos fúlvicos y húmicos es inhibir la agregación de los nanotubos de carbono (Farré et al., 2008), sin

embargo el ácido húmico estabiliza mejor a los CNTs que los ácidos fúlvicos (Schwyzer et al., 2013).

Se sabe que los CNTs son altamente hidrofóbicos (Petersen et al., 2011), y esta característica les proporciona mayor afinidad por otras partículas, y la agregación se mejora aún más por la gran área de superficie y proporción, que permite múltiples puntos de contacto. Esto conlleva a una desestabilización por las fuerzas de van der Waals (Kennedy et al., 2008). Una de las estrategias más comunes para mejorar la dispersión de los CNTs en soluciones acuosas es unir covalentemente grupos funcionales cargados o hidrofílicos en las paredes y extremos de los CNTs (Petersen et al., 2011). Se ha mostrado que la materia orgánica natural (NOM) es omnipresente en el ambiente natural y aumenta la estabilidad coloidal de los CNTs por el revestimiento hidrofílico de la superficie (Hyung et al., 2007; Schwyzer et al., 2013).

Los nanotubos de carbón de pared simple (SWCNT), una vez liberados, estarán expuestos a electrolitos mono (NaCl) y di-valentes (CaCl_2 y MgCl_2) presentes en ambientes acuáticos y por lo tanto un entendimiento del comportamiento de agregación en estas condiciones es necesario. Los resultados de un estudio sugieren que los SWCNTs son relativamente estables en presencia de electrolitos con un papel predominante de quiralidad en su estabilidad en un ambiente acuático. Particularmente, los SWCNTs semiconductores con configuraciones cercanas a armchair y relativamente con menor diámetro, mostraron una alta estabilidad comparados con tubos de diámetros más largos. [Figura 11] (Khan et al., 2013).

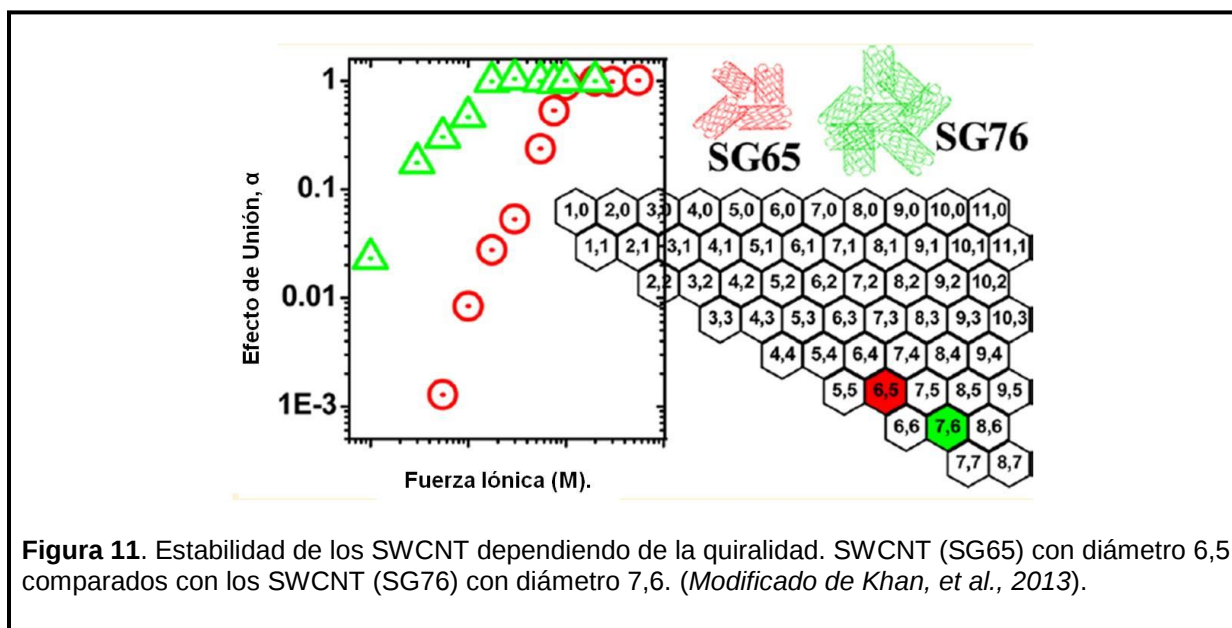


Figura 11. Estabilidad de los SWCNT dependiendo de la quiralidad. SWCNT (SG65) con diámetro 6,5 comparados con los SWCNT (SG76) con diámetro 7,6. (Modificado de Khan, et al., 2013).

Debido a que naturalmente las nanopartículas y los coloides están omnipresentes en el ambiente, es más probable que los CNTs sean sometidos a una heteroagregación en lugar de una homoagregación cuando son liberados en sistemas acuáticos naturales (Petersen et al., 2011).

1.8. Ecotoxicidad de nanotubos de carbón

Debido a las propiedades únicas, los nanotubos de carbón (CNTs), (Iijima, 1991; Monthioux y Kuznetsov, 2006) tienen un amplio rango de aplicaciones potenciales. La producción estimada a la fecha asciende entre 55 y 1100 toneladas por año en los Estados Unidos solamente (Hendren et al., 2011). Como consecuencia del aumento en la elaboración y uso, la liberación no intencionada de los nanotubos de carbono en el medio ambiente es probable que se produzca. La exposición ambiental de los CNTs podría tener lugar a lo largo de su ciclo de vida, es decir, su producción, uso y eliminación (Köhler et al., 2008; Petersen et al., 2011) [Figura 12] (Schwyzer et al., 2013).

La ecotoxicidad de los CNTs ha sido explorada en años recientes utilizando organismos que habitan en ecosistemas terrestres, de sedimento y acuáticos. Se han observado efectos ecotoxicológicos mínimos en los suelos y sedimentos expuestos, ya que los CNTs son generalmente eliminados por los organismos que habitan en estos ecosistemas o adsorbidos a partículas del suelo (Petersen et al., 2011) debido a que las interacciones de las partículas son más frecuentes con los movimientos brownianos de las nanopartículas (Kennedy et al., 2008).

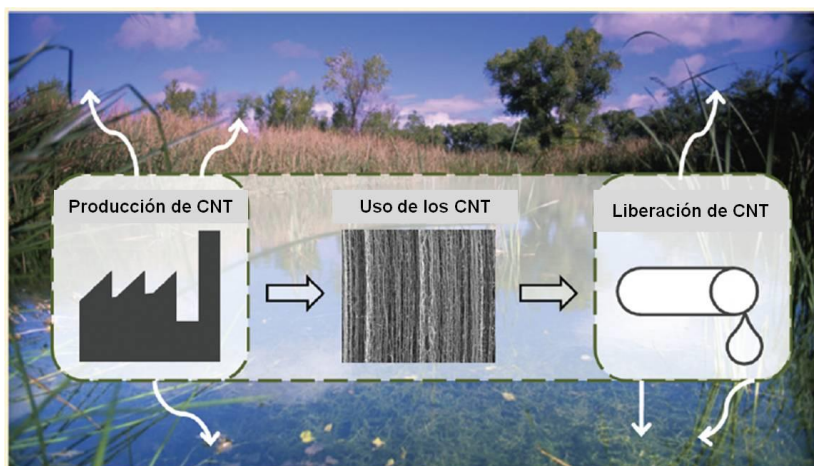


Figura 12. Ciclo de vida de los nanotubos de carbón (CNT). (Modificado de Eckelman, et al. 2012).

El ambiente acuático podría estar afectado a través de corrientes de aguas residuales y áreas de escurrimientos alrededor de las plantas de fabricación, vertederos y otros lugares donde los CNTs fueron usados, desechados o liberados (Lin y Xing, 2008; Schwyzer et al., 2013), así como por metalurgia, minería, curtiduría y refinerías de combustibles fósiles que implican el uso de compuestos metálicos, de este modo, una vez en el ambiente acuático, los CNTs serán parte de los sedimentos e influirán en la calidad del agua (Cheng et al., 2006).

La toxicidad de las suspensiones acuosas de los CNTs varía considerablemente entre los organismos y esta particularidad puede ser consecuencia de las diferencias en el impacto relativo de los CNTs sobre las superficies epiteliales de los organismos (Petersen et al., 2011). Se ha reportado que el tamaño y la forma de los nanomateriales de carbono pueden afectar el potencial de exposición y la toxicidad en los organismos (Farré et al., 2008).

1.9. Ácido picrolónico

El ácido picrolónico (3 metil-4-nitro-1-(p-nitrofenil)-2-pirazolina-5-uno) [Figura 13] es un reactivo de alcaloides, aminoácidos y calcio (Rosenkranz et al., 1975). Stein y Rosenkranz reportaron en 1975 que este compuesto es mutagénico para *Salmonella typhimurium*, ya que induce mutaciones de corrimiento de lectura. También mostraron que este químico inhibe preferencialmente el crecimiento de la DNA polimerasa deficiente de *E. coli*.

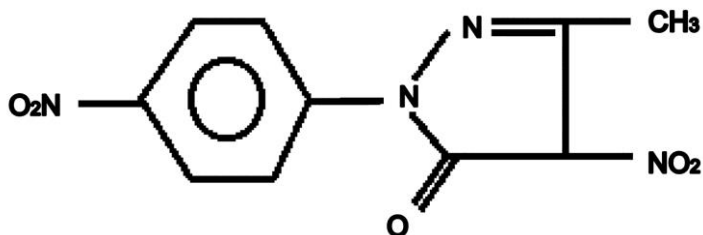


Figura 13. Fórmula del ácido picrolónico. (Modificado de Rosenkranz, et al. 1975).

1.10. Pez cebra

Siendo el grupo más numeroso y diverso filogenéticamente de vertebrados, los peces nos enseñan principios importantes acerca de los procesos fundamentales en la evolución de los vertebrados, su desarrollo y sus enfermedades (Spitsbergen et al., 2003; Harshbarger et al., 1990; Hatanaka et al., 1982).

El pez cebra históricamente ha sido el foco de atención de muchos investigadores en el estudio de efectos teratogénicos causados por sustancias tóxicas y de mecanismos básicos de repuestas celulares a químicos tóxicos. Sin embargo, esto no hubiera sido posible sin el trabajo de caracterizar las técnicas de cría, el desarrollo embrionario y la manipulación genética del pez cebra (Serena, 2010).

El pez cebra así como otros peces de acuario poseen ventajas distintivas como modelos para la investigación biomédica. El pez cebra es fácilmente alojado en sistemas compactos con recirculación, se puede criar continuamente todo el año y tiene tiempos generacionales cortos aproximadamente de 3 a 5 meses (Spitsbergen et al., 2003; Detrich et al., 1999).

Las especies ovíparas como el pez cebra tienen fertilización y desarrollo externo, facilitando el acceso a la observación y manipulación de los embriones en desarrollo. El pequeño tamaño de los embriones y alevines minimiza el costo y el volumen de residuos para los estudios toxicológicos (Spitsbergen et al., 2003).

Debido a estas ventajas, el pez cebra ha emergido como el primer modelo de vertebrados para clarificar los roles de genes específicos y señalización de rutas en el desarrollo. A partir de la década pasada se ha intensificado la investigación a nivel mundial sobre mecanismos genéticos moleculares, patrones de formación, morfogénesis y maduración funcional de los órganos mayores (Spitsbergen et al., 2003).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de este trabajo es que los aglomerados de nanotubos de carbón de pared simple (SWCNTs), al bloquear los poros de corion alterarán el intercambio de diversas sustancias entre el huevo y el entorno, por lo que la frecuencia cardiaca, como un parámetro fisiológico global, se verá modificada en presencia de dichas nanopartículas. Así mismo, los aglomerados de SWCNTs protegerán al embrión al reducir la toxicidad del ácido picrolónico.

Objetivo General

Evaluar la frecuencia cardiaca como un parámetro general de la fisiología del embrión de pez cebra en presencia de nanotubos de carbón de pared sencilla (SWCNT), así como la genotoxicidad reducida del ácido picrolónico en presencia de éstos nanomateriales.

Objetivos Particulares

- ✚ Identificar la edad de desarrollo de los embriones de pez cebra.
- ✚ Determinar la concentración de SWCNTs a emplear.
- ✚ Registrar las frecuencias cardiacas obtenidas de cada embrión expuesto a SWCNT a las 24 y 48 horas post- fertilización (hpf).
- ✚ Determinar la concentración de ácido picrolónico disuelto en DMSO a emplear.
- ✚ Registrar la tasa de supervivencia de los embriones expuestos al ácido picrolónico y al DMSO a las 24 y 48 hpf.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Nanotubos de carbón

Se emplearon nanotubos de carbón de pared sencilla (SWCNTs) obtenidos de Nanostructured and Amorphous Material Inc. con 90% de pureza de CNTs y 80% de pureza de SWCNTs. Fueron fabricados por el método de descarga de arco voltaico en láminas de grafito, agrupados en cuerdas de 50 unidades; el diámetro que presentan es de 1-2 nm y la longitud es de 5-15 μm .

3.2. Mantenimiento del pez cebra y obtención de embriones

Para realizar el estudio, se contó con el apoyo de un laboratorio que disponía de una población de pez cebra proveniente del acuario de la Facultad de Ciencias, UNAM. Esta población se encontraba y se mantuvo bajo condiciones controladas de proporción 2:1 hembras y machos, con una temperatura de 27° C, con un fotoperiodo de 12:12 horas (luz: oscuridad) y se alimentó con hojuelas (Tetra Min) tres veces al día.

La edad de desarrollo de los embriones fue medida en horas post- fertilización (hpf) de acuerdo con el método descrito por Kimmel et al., 1995. Para la obtención de embriones de 4 hpf únicamente, se colocó una red de maternidad, previamente hecha, de luz de malla de 2 mm de diámetro durante 24 horas y al final de este tiempo y poco después de que inicia el periodo de luz, las hembras liberaron los huevos, estimuladas por el fotoperiodo artificial. De este modo, los huevos atravesaron los poros de la red y se depositaron en el fondo del acuario. Para coleccionar los huevos fecundados del fondo del acuario en un recipiente limpio, se utilizó un sifón. Para aumentar la viabilidad de los embriones, se enjuagaron con agua de acuario filtrada con papel filtro (# 1 Whatman) y fueron depositados en placas de 24 pozos en una incubadora a 28 ° C. En cada ensayo realizado, se observaron e identificaron embriones de 4 hpf (Figura 13) mediante dos microscopios estereoscópicos, Velab (modelo VE-S5) y Motic (modelo *Digital Microscope DM 143*).

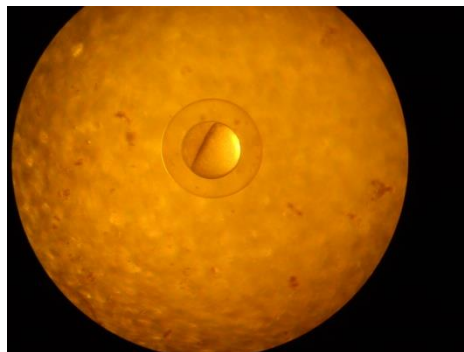


Figura 13. Embrión a las 4 hpf.

3.3. Distribución de los SWCNTs en el medio acuático

Los nanotubos de carbón de pared sencilla (SWCNTs) en una concentración de 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de agua fueron dispersados por sonicación durante 15 minutos. Los embriones colectados de 4 hpf, fueron colocados en placas de 24 pozos ubicando 3 embriones por pozo y fueron expuestos a una sola concentración de SWCNTs (20 $\mu\text{g} / \text{mL}$) (pH 7, 28 ° C). Se realizaron 4 repeticiones y en cada una estuvieron expuestos a los SWCNTs 144 embriones de 4 a 48 hpf. Estos embriones fueron el grupo tratado (Tx). Los embriones en cada repetición fueron evaluados usando un microscopio invertido (modelo *WILD HEERBRUGG SWITZERLAND M40.58624*) en una magnificación de 4X a las 24 y 48 hpf, y se registraron los latidos por minuto (lpm) de cada uno, para posteriormente obtener su frecuencia cardíaca.

3.4. Frecuencia cardíaca

Se obtuvo la frecuencia media registrando el número de latidos cardíacos de los embriones a las 24 y 48 hpf con la ayuda de un cronómetro y un contador.

Las frecuencias obtenidas fueron analizadas en dos categorías:

- 1) Se analizaron las frecuencias cardíacas entre grupo control y expuesto a las 24 y 48 hpf.
- 2) Se comparó el incremento de latidos cardíacos entre grupo control y expuesto a 24 y 48 hpf.

Las frecuencias cardíacas entre grupo control y expuesto fueron analizadas con la prueba de ANOVA de dos vías o de dos factores, ya que evaluamos el efecto que ejercen los SWCNTs en los embriones comparando las varianzas muestrales. La prueba de ANOVA fue analizada utilizando el programa de GraphPad Prism 6.

3.5. Preparación y tratamiento de ácido picrolónico

El ácido picrolónico (3 metil-4-nitro-l-(p-nitrofenil)-2-pirazolina-5-uno; Sigma Aldrich), fue disuelto a una concentración de 1 µg / por mL de DMSO (Dimethyl Sulfoxide; Merck), almacenado a -20°C. Los embriones de 4 hpf fueron identificados con la ayuda del microscopio estereoscópico Velab (modelo VE-S5) y colectados aleatoriamente. Los embriones fueron colocados en placas de 20 pozos ubicando 2 embriones por pozo. Posteriormente se dividieron en 4 grupos (40 embriones por grupo), y cada uno expuesto a:

- SWCNTs / Ácido picrolónico (20 µg / mL) / (1µg / mL)
- Ácido picrolónico (1µg / mL)
- SWCNT / DMSO (20 µg / mL) / (2 µL)
- DMSO (2µL)

En este protocolo empleó un grupo testigo de embriones sin exposición a algún agente para poder comparar la mortalidad natural de cada puesta de embriones. Estos experimentos se efectuaron por triplicado y en cada una se registró la tasa de supervivencia a las 24 y 48 hpf.

3.6. Supervivencia

Se registró la tasa de supervivencia de los embriones expuestos a los 4 tratamientos respectivamente, y las comparamos con el grupo control a las 24 y 48 hpf empleando una tabla de contingencia para probar la asociación entre las variables categóricas (grupo / supervivencia) y fueron analizadas con chi cuadrada (X^2). La tabla de contingencia fue analizada con el programa de GraphPad Prism 6.

Los embriones muertos fueron examinados analizando su aspecto. Notamos que su contenido fue turbio dentro del corión y a simple vista su color se tornó opaco (Figura 14).

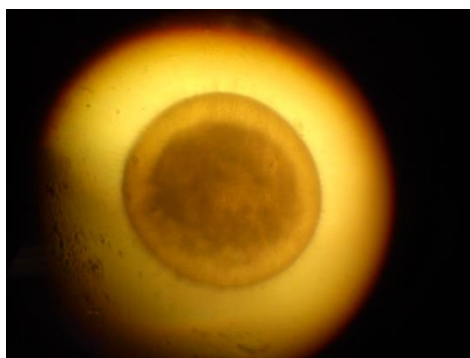


Figura 14. Embrión muerto.

RESULTADOS

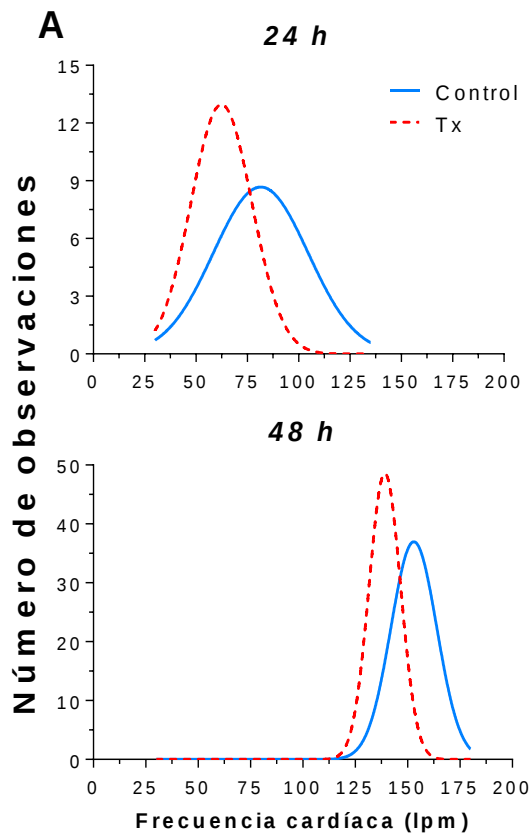
4.1 Evaluación de las frecuencias cardíacas

Para evaluar si los SWCNTs inducen un descenso en la frecuencia cardíaca, contamos los latidos por minuto (lpm), a las 24 y 48 hpf de los embriones de pez cebra que fueron expuestos a 20 μg / mL de SWCNTs y los comparamos con un grupo testigo. Los resultados demuestran que los SWCNTs disminuyen las frecuencias cardíacas a las 24 y 48 hpf, como se muestra en las Figuras 15 **A y B** y 16 **A**.

En la Figura 15 **A** se presenta la comparación de la distribución de frecuencias del número de lpm ajustadas mediante una curva tipo Gaussiana para los embriones testigo y tratados a las 24 (panel superior) y 48 hpf (panel inferior). Se puede observar en la Tabla de la Figura 15 **B** los parámetros de ajuste donde la amplitud de las curvas del grupo tratado a las 24 y 48 hpf fue mayor en comparación con las curvas del grupo testigo, indicando que las frecuencias cardíacas del grupo tratado se concentraron cerca de su media poblacional. Las medias entre los grupos tratado y testigo tuvieron una diferencia de 20 lpm aproximadamente (62 y 81 lpm, respectivamente) a las 24 hpf y a las 48 hpf la diferencia fue de 10 lpm aproximadamente (139 y 153 lpm).

Completando lo anterior, en comparación al grupo tratado, el valor promedio de lpm para el grupo control fue de 87 lpm, el cual es significativamente mayor al registrado en los animales tratados los cuales presentaron una frecuencia cardíaca de 76 lpm. (Figura 16 **A**) (ANOVA: $p < 0.001$ a las 24 y 48 hpf). Cabe mencionar que la disminución de la frecuencia cardíaca no afectó el desarrollo embrionario ni la supervivencia del pez cebra (Figura 17 **C**).

La frecuencia cardíaca aumenta conforme el desarrollo del pez cebra va progresando y en la Figura 16 **B** se muestra el incremento de las frecuencias cardíacas de las 24 a las 48 hpf de los embriones tratados y los embriones testigo. Se puede observar que los lpm de los embriones tratados incrementa significativamente 2.18 veces que son aproximadamente 75 latidos, en comparación a los embriones testigo que en condiciones normales incrementan su frecuencia cardíaca por 63 latidos, sin embargo, la etapa de eclosión de los embriones tratados no se vio afectada por la diferencia de lpm (Figura 17 **C**).



B Comparación de parámetros de las distribuciones de frecuencias cardíacas

Parámetros de ajuste	Grupo			
	Tx		Control	
	A	B	A	B
Amplitud	12.96 ± 1.8	48.58 ± 1.4	8.6 ± 1.7	36.97 ± 2.7
Media	62.39 ± 2.4	139.1 ± 0.28	81.54 ± 5.2	153.0 ± 0.93
DS	14.84 ± 2.4	7.5 ± 0.24	23.05 ± 5.4	10.94 ± 0.93

^A 24 hpf, ^B 48 hpf

Figura 15. Evaluación de las frecuencias cardíacas. **(A)** Distribución de frecuencias ajustadas mediante una curva tipo Gaussiana de la frecuencia cardíaca en embriones testigo y tratados. **(B)** Tabla de comparación de parámetros de ajuste de las distribuciones de frecuencias cardíacas a las 24 y 48 hpf.

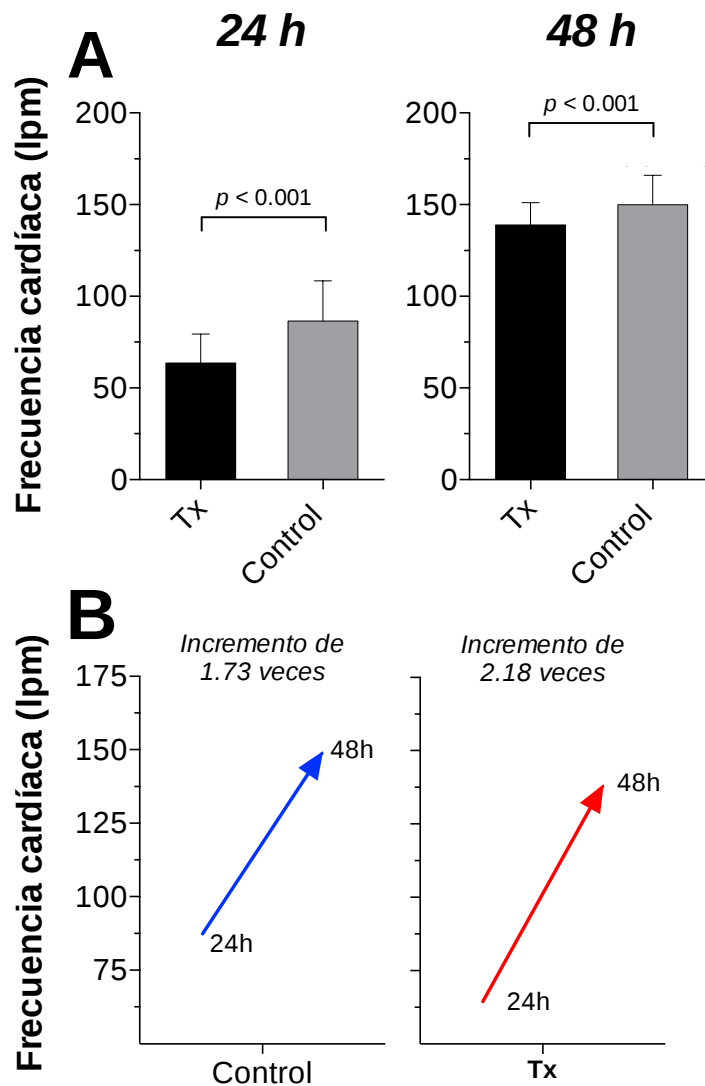


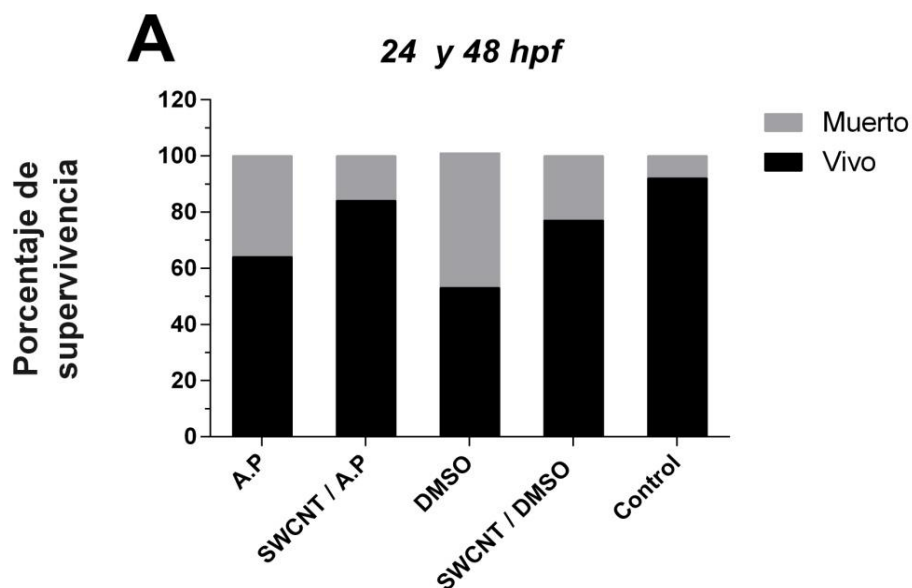
Figura 16. Evaluación de las frecuencias cardíacas. **(A)** Prueba de ANOVA de dos vías o dos factores evaluando las frecuencias cardíacas. **(B)** Incremento de las frecuencias cardíacas de los grupos tratado y testigo a las 24 y 48 hpf.

4.2 Ácido picrolónico

El porcentaje de supervivencia de los embriones expuestos a 4 tratamientos y un grupo control se muestra en la Figura 17 **A**. Comparamos los porcentajes de supervivencia entre los embriones expuestos con respecto al grupo control y detectamos que los embriones expuestos a los SWCNTs tuvieron mayor porcentaje de supervivencia. Estos porcentajes no cambiaron en las horas de observación, es decir, a las 24 y 48 hpf se mantuvo la misma proporción de supervivencia tanto los embriones expuestos como en el grupo control.

Se realizó una tabla de contingencia (Figura 17 **B**) donde se presentan los conteos de frecuencias de cada tratamiento. Esta tabla se analizó con la prueba de chi cuadrada (X^2) para probar la asociación entre el agente de exposición y la supervivencia o mortalidad de los embriones. Como podemos observar en la Figura 17 **B**, el valor p es menor que el nivel de significancia de 0.05 (< 0.0001) y el valor de X^2 es de 51.83 con 4 grados de libertad; estos valores nos demuestran que existe una asociación entre el agente de exposición y la mortalidad o supervivencia de los embriones.

Los SWCNTs presentan una afinidad hacia el corión de los embriones, sin embargo la exposición a estas nanopartículas no afecta la supervivencia del pez cebra durante su desarrollo embrionario como se puede observar en la Figura 17 **C**.



B Tabla de contingencia. Tasa de supervivencia de embriones

	Grupo				
	A	B	C	D	E
Vivo	64	84	53	77	77
Muerto	36	16	48	23	23

^A Ácido picrolónico, ^B SWCNT / Ácido picrolónico, ^C DMSO, ^D SWCNT / DMSO, ^E Control.

*Chi cuadrada = 51.83, 4 $p < 0.05$

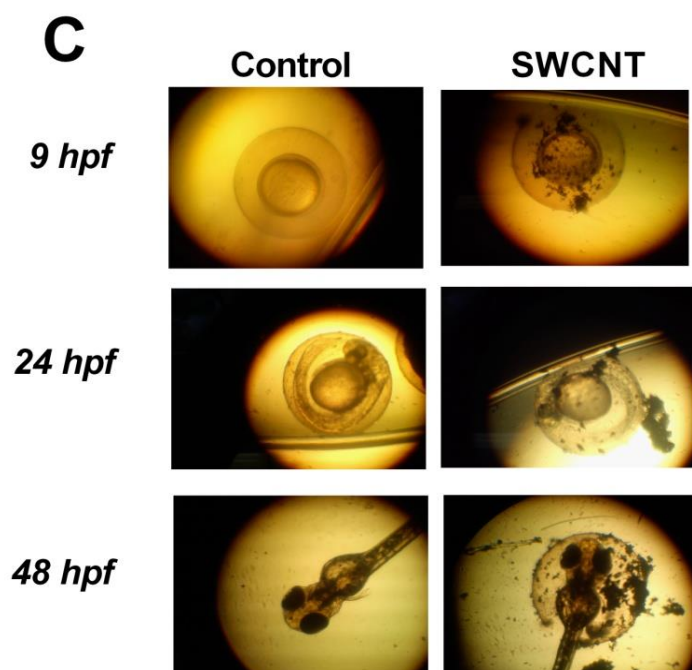


Figura 17. Análisis de supervivencia de embriones. (A) Porcentaje de supervivencia de embriones expuestos a 4 tratamientos y un grupo control. (B) Tabla de contingencia de la tasa de supervivencia de los embriones. (C) Imágenes de embriones a las 6 y 24 hpf, así como a las 48 hpf en el periodo de eclosión.

DISCUSIÓN

Este trabajo demuestra que la exposición a los SWCNTs en ambientes acuáticos disminuye las frecuencias cardíacas de los embriones de pez cebra sin afectar su desarrollo e influye en su supervivencia cuando están expuestos a un mutágeno y/o solvente.

Los embriones identificados y capturados a las 4 hpf, es decir, en el periodo de blástula, estuvieron bajo observación a las 24 hpf, en el periodo de faríngrula, debido a que en ese momento se puede observar el latido cardíaco, y a las 48 hpf, en el periodo de eclosión, debido a que en ese periodo se finaliza la rápida morfogénesis de los órganos primarios, la eclosión ocurre asincrónicamente (Kimmel *et al.*, 1995) y el latido cardíaco se intensifica conforme se acerca el término del desarrollo embrionario.

Un estudio previo reveló mediante microscopía electrónica que el corión de los embriones de pez cebra actúa como una barrera protectora que impide el paso de los aglomerados de los SWCNTs a través de los poros. También reveló que los CNTs se adhieren fácilmente al corión indicando que tienen una afinidad biológica. Los embriones de pez cebra en este estudio, fueron expuestos a 6 concentraciones de SWCNTs (20, 40, 60, 120, 240 y 360 mg / L) respectivamente, y estuvieron expuestos a 120, 240 y 360 mg / L de SWCNTs (Cheng *et al.* 2006).

En este trabajo los embriones fueron expuestos a 20 µg / mL de SWCNTs, la concentración más baja utilizada en el estudio previo, y también se observó la afinidad de los SWCNTs al corión y se sugiere que los aglomerados cubren los poros del corión impidiendo el intercambio de oxígeno causando una hipoxia y así una disminución en la frecuencia cardíaca de los embriones de pez cebra, sin embargo el desarrollo de los embriones no estuvo afectada por esta disminución.

En este trabajo también se demuestra que los SWCNTs pueden aumentar la supervivencia de los embriones cuando están expuestos a un mutágeno y / o disolvente, en este caso el ácido picrolónico y el DMSO respectivamente. Estudios anteriores han resumido y demostrado que los CNTs poseen una gran capacidad de adsorción la cual es atribuida a su estructura porosa y a su gran área de superficie, así como sus propiedades químicas, mecánicas y su estabilidad térmica. Los CNTs poseen una gran superficie, la cual tiene uniones de van der Waals para unirse fuertemente con moléculas adsorbentes en los espacios de la estructura porosa de estas nanopartículas (Mubarak, *et al.*, 2014). Investigadores han estudiado la remoción de metales pesados utilizando los CNTs como tratamiento de aguas de acuerdo a las capacidades anteriormente descritas.

Un estudio previo en el laboratorio propuso mediante el ensayo de Ames en *Salmonella typhimurium* que los SWCNTs tienen la capacidad de reducir la mutagenicidad el ácido picrolónico (Barajas *et al.*, 2014). Este trabajo propone la capacidad de reducción en la toxicidad probada en un modelo vertebrado, así mismo estas nanopartículas son capaces de aumentar la tasa de supervivencia de los embriones cuando están expuestos a un disolvente como el DMSO.

Este trabajo ha contribuido con una nueva perspectiva acerca de la aplicación de los SWCNTs en ambientes acuáticos, ya que puede propiciar a un aumento en la supervivencia de especies que habitan en este tipo de ecosistemas, así como un tratamiento de aguas, sin embargo se proponen más experimentos para estudiar los efectos tóxicos de los SWCNTs en otros organismos acuáticos así como terrestres, y crear o mejorar la técnica de medición de frecuencias cardíacas para que sea más confiable que un doble ciego.

CONCLUSIONES

En conclusión, los SWCNTs pueden causar una alteración fisiológica, disminuyendo las frecuencias cardíacas de los peces cebra durante su desarrollo embrionario, sin embargo no afectan su supervivencia, al contrario, se demostró que posiblemente por sus propiedades de adsorción protegen a los embriones del mutágeno y / o disolvente, ya que las moléculas de estos agentes pueden ser retenidas en la superficie de los SWCNTs.

LITERATURA CITADA

1. American Society for Testing and Materials. (2006). Standard terminology relating to nanotechnology. E 2456-06. West Conshohocken, PA.
2. B. Bhushan, *Handbook of Nanotechnology*, Springer, Berlin, Germany, 2nd edition, 2007.
3. Brant J., *et al.* (2005). Aggregation and deposition characteristics of fullerene nanoparticles in aqueous systems. *J. Nanoparticle Res*, 7: 545-553.
4. British Standards Institution. (2007). Terminology for nanomaterials. PAS 136:2007. London, UK.
5. Cheng J., Flahaut E., Y Cheng H. S. (2006). Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26 (4): 708-716.
6. Dai H. (2001). Carbon nanotubes: opportunities and challenges. *Surface Science*, 500: 218-241.

7. Detrich H.W. 3rd, Westerfield M., Y Zon L.I. (1999). Overview of the Zebrafish system. *Methods Cell Biol*, 59: 3–10.
8. Donaldson K., *et al.* (2004). Nanotoxicology. *Occup Environ Med*, 61: 727-728.
9. Drexler K. E. (1986). Engines of creation: the coming era of nanotechnology. Random House, New York.
10. Eckelman, *et al.* (2012). New Perspectives on Nanomaterial Aquatic Ecotoxicity: Production Impacts Exceed Direct Exposure Impacts for Carbon Nanotubes. *Environ. Sci. Technol*, 46; 2902-2910.
11. Espinasse B., *et al.* (2007). Transport and retention of colloidal aggregates of C60 in porous media: Effects of organic macromolecules, ionic, composition, and preparation method. *Environ. Sci. Technol*, 41: 7396-7402.
12. Farré M., Gajda-Schrantz K., Kantiani L., Y Barceló D. (2008). Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Anal Bioanal Chem*, 393: 81-95.
13. Feynman R. P. (1960). There's plenty of room at the bottom. *Eng Sci*, 23 (5): 22-36.
14. Filippini L. Y Sutherland D. (2013) Nanotechnologies: Principles, Applications, Implications and Hands-on Activities. *European Commission*. Brussels. 19-24.
15. Fulekar H. M. (2010). Nanotechnology: Importance and Applications. I. K. International Pvt Ltd. New Dehli. 1-3.
16. Geiser M., *et al.* (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect*, 113: 1555-1560.
17. Griffitt R. J., Luo J., Gao J., Bonzongo J. C., Y Barber S. D. (2008). Effects of Particle Composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9): 1972-1978.
18. Guldi M. D. Y Martín Z. (2010). Carbon Nanotubes and Related Structures: Synthesis, Characterization, Functionalization, and Applications. *John Wiley & Sons*. Germany. Pp.1-4.
19. Gustavsson P., *et al.* (2011). Carbon nanotubes – Exposure, toxicology and protective measures in the work environment. Pp. 14-15.
20. Handy D. R., Owen R. Y Valsami-Jones E. (2008). The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17: 315-325.
21. Harshbarger J.C., Y Clark J.B. (1990). Epizootiology of neoplasms in bony fish of North America. *Sci Total Environ*, 94: 1–32.
22. Hatanaka J., Doke N., Harada T., Aikawa T., Y Enomoto M. (1982). Usefulness and rapidity of screening for the toxicity and carcinogenicity of chemicals in the medaka, *Oryzias latipes*. *Japan J Exp Med*, 52: 243–253.

23. Hirsch A. (2002). Funktionalisierung von einwandigen Kohlenstoffnanoröhren, *Angew. Chem*, 114: 1933-1939.
24. I. N. Throback, M. Johansson, M. Rosenquist, M. Pell, M. Hansson, Y. S. Hallin. (2007). "Silver (Ag⁺) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil," *FEMS Microbiology Letters*, 270 (2): 189–194.
25. Iijima S. (2002). Carbon nanotubes: past, present, and future. *Phys. B.*, 323, 1-5.
26. Kahru A. Y. Dubourguier H-C. (2009). From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 269: 105-119.
27. Khan A. I., et al. (2013). Chirality Affects Aggregation Kinetics of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Environ. Sci. Technol*, 47: 1844-1852.
28. Kim J. S., et al. (2006). Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol. Sci.*, 89: 338-347.
29. Kimmel B. C., et al. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203: 253-310.
30. Klaine J. S., Alvarez J.J. P., Batley E. G., Fernandes F. T., Handy D. R., Lyon Y. D., Mahendra S., McLaughlin J. M., Y. Lead R.J. (2008). NANOMATERIALS IN THE ENVIRONMENT: BEHAVIOR, FATE, BIOAVAILABILITY, AND EFFECTS. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9): 1825-1851.
31. Kennedy J. A., Hull S. M., Steevens A. J., Dontsova M. K., Chappell A. M., Gunter C. J., Y. Jr. Weiss A. C. (2008). Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9): 1932-1941.
32. Kohler A. R., et al. (2008). Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle. *J. Clean. Prod*, 16 (8-9): 927-937.
33. Lin S., et al. (2007). Detection of phospholipid-carbon nanotubes translocation using fluorescence energy transfer. *Applied Physics Letters*, 89: 143118.
34. Lin D. H., et al. (2009). The effect of ionic strength and pH on the stability of tannic acid-facilitated carbon nanotubes suspensions. *Carbon*, 47 (12): 2875-1882.
35. Lin D. H. et al. (2010). Different stabilities of multiwalled carbon nanotubes in fresh surface water samples. *Environ. Pollut*, 158 (5): 1270-1274.
36. Monteiro-Riviere A. N. Y. Tran L. C. (2013). Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects. *CRC Press*. USA. 1-5.
37. Mubarak M. N., et al. (2014). Removal of Heavy Metals from Wastewater Using Carbon Nanotubes. *Separation & Purification Reviews*, 43:4, 311-338.
38. Nanopartículas modificadas en productos de consumo; cómo entender un Nuevo ingrediente. (2012). *Salud pública de México*, 54 (1); 79-86.
39. Oberdoster G., et al. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: Elements of a screening strategy. *Particle Fibre Toxicology*, 2: 1-35.

40. O'Connell J. M. (2012). Carbon Nanotubes: Properties and Applications. CRC Press. USA. 19-33.
41. Petersen J. E., Zhang L., Mattison T. N., O'Carroll M. D., Whelton J. A., Uddin N., Nguyen T., Huang Q., Henry B. T., Holbrook D. R., Y Chen L. K. (2011). Potential Release Pathways, Environmental Fate, and Ecological Risks of Carbon Nanotubes. *Environmental Science & Technology*, 45: 9837-9856.
42. Pietroiusti A., Campagndo L., Y Fadeel B. (2012). Interactions of Engineered Nanoparticles with organs protected by Internal Biological Barriers. *Small*, 9 (10), 1557-1572.
43. Poole P. C. Y Owens J. F. (2007). Introducción a la nanotecnología. Reverte. España. 113-129.
44. Ramsden J. (2011), Nanotechnology: An Introduction, *William Andrew*. UK.13-27.
45. Rana S. Y Kalaicheluan T.P. (2013). Ecotoxicity of Nanoparticles. *ISNR Toxicology*. 1-11.
46. Rosenkranz S. H. Y Stein B. A. (1975). Picrolonic acid: a novel frameshift mutagen. *Mutation Research*, 28: 127-129.
47. Santamaria A. (2012). Historical Overview of Nanotechnology and Nanotoxicology. *Nanotoxicity: Methods and Protocols*, 926: 1-12.
48. Schwyzer I., et al. (2011). Influence of the initial state of carbon nanotubes on their colloidal stability under natural conditions. *Environ. Pollut*, 159 (6): 1641-1648.
49. Schwyzer I., Kaegi R., Sigg L., Y Nowack B. (2013). Colloidal stability of suspended and agglomerate structures of settled carbon nanotubes in different aqueous matrices. *Water Research* XXX, 1-11.
50. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. 2007. The appropriateness of the risk assessment methodology in accordance with the Technical Guidance Documents for new and existing substances for assessing risks of nanomaterials. 21-22 June 2007. European Commission, Brussels, Belgium.
51. Serena D. A. P., (2010). La nanotecnología. Editorial CSIC. Madrid. 30-47.
52. Shi J.P., Evans D. E., Khan A. A. Y Harrison R. M. (2001). Sources and concentration of nanoparticles (<10 nm diameter) in the urban atmosphere. *Atmos Environ*, 35: 1193-1202.
53. Spitsbergen M.J. Y Kent L.M. (2003). The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research-Advantages and Current Limitations. *Toxicol Pathol*. 2003; 31 (Suppl): 62-87.
54. Takeuchi N. (2009). Nanociencia y Nanotecnología: La Construcción de un mundo Mejor Átomo por Átomo. Fondo De Cultura Económica USA. 142.
55. Taniguchi N. (1974). On the basic concept of nano-technology. In: Proceedings of the international conference of production engineering. Japan

- Society of Precision Engineering, Tokyo. Wang H., Wu F., Meng W., White C. J., Holden A. P. Y Xing B. (2013). Engineered Nanoparticles May Induce Genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 47, 13212-13214.
56. Templeton R. C., *et al.* (2006). Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) on a estuarine meiobenthic copepod. *Environ. Sci. Technol.* 40: 7387-7393.
57. Zhang Q., (2012). Carbon Nanotubes and Their Applications. CRC Press. USA. 31-35.
58. Zsigmondy R. (1914). Colloids and the ultramicroscope. Wiley, New York.