

125



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

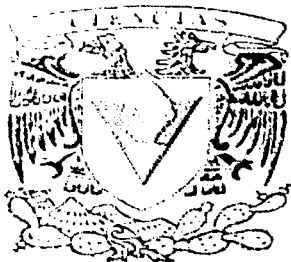
FACULTAD DE CIENCIAS

“ El ensayo de Micronúcleos en Epitelio Branquial y Eritrocitos en la carpa Carassius auratus como modelo experimental para determinar la presencia de cromatos genotóxicos en el ambiente”.



T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L Ó G A
P R E S E N T A N
AMELIA QUITZÉ LÓPEZ FLORES

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE



MÉXICO, D, F.

JULIO 2002



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

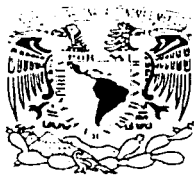


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "El ensayo de Micronúcleos en Epitelio
Branquial y Eritrocitos en Carassius auratus como modelo experimental para determinar
la presencia de cromatos genotóxicos en el ambiente"

realizado por

AMELIA QUITZE LOPEZ FLORES

con número de cuenta 9321288-3 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. María Eugenia Gensebatt Bonaparte

Propietario

Dra. María Aurora Armienta Hernández

on: Am Am... HA.

Propietario

M. en C. Adriana Muñoz Hernández

Suplente

Biól. Julio Prieto Sagredo

Suplente

M. en C. Patricia Guzman Bazán

Consejo Departamental de

BIOLOGIA

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.



Dra. Patricia Ramos Morales.

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**Este trabajo fue parcialmente financiado por
CONACYT 30950M**

Agradecimientos

A Dios por darme la oportunidad de vivir, por cuidarme y ayudarme a aceptar mis derrotas y darme la fortaleza de levantarme día a día con una sonrisa.

A mi **Mamá** por ser tan valiente, comprensiva y enseñarme a no temerle a la vida, gracias por tus innumerables desveladas, sonrisas, besos y hasta regañíos.

A mi **Papá** por apoyarme, comprenderme y ser un gran amigo.

A mi hermano **Juan** por ser mi compañero de juegos, peleas, risas y raspones nunca dejes de serlo.

A **Mis Flaquitas** adoradas **Tayde y Thalia**, el simple hecho de verlas sonreír es un gran motivo para seguir adelante y dejar atrás mis miedos y ganar mis batallas.

A **Mis Abuelitos** gracias por existir, por haberme criado con unos cimientos fuertes, por ser siempre tan comprensibles, por su incondicional apoyo y enseñarme a ver la vida desde otro punto de vista (con mucho amor y sensatez).

A mi tío **Hector** (gracias por componer mi compu!!!), **Karla, Angélica, Paco y Lulú** y por sus sabios consejos.

A mis primas **Karla, Sheira y Paulina** por ser mis grandes amigas.

A **Mary, Fer, Mafi y Asher** por acompañarme en mis buenos y malos momentos, por jalarme las orejas muy de ves en cuando y enseñarme que la amistad es una palabra muy chica a comparación de lo que significa.

A mi gran amigo **Berni** por su incondicional amistad, por tu forma de pensar, tus consejos y por ayudarme a realizar una de las metas más importantes de mi vida, nunca cambies!!

A mi **veroka, ponetito, roko y kimbo** por recibirme siempre con una sonrisa en el alma.

A mi gran ídolo la Dra. **Maricha**, por enseñarme lo maravilloso que es ser investigador, por guiar cada uno de mis pasos con esa gran experiencia que se adquiere con la dedicación, disciplina y amor por lo que se cree. Siempre estarás en mi corazón.

A mis compañeros de laboratorio, **Wendi, Luciana, Ana, Gerardo y Jorge** por ser un gran equipo.

Agradezco el apoyo y dedicación a la **M. C Patricia Guzmán Bazán** por haberme enseñado la técnica de **MN** así como su análisis e interpretación.

No hay que confundir nunca el conocimiento con la sabiduría. El primero nos sirve para ganarnos la vida; la sabiduría nos ayuda a vivir.

Carey, S.

Resumen

En los años recientes años el avance de la tecnología se ha incrementado exponencialmente. Hoy nuevas industrias se han comprometido en modernizar e innovar tecnologías, materiales y agentes químicos. En el pasado era usual que los agentes químicos fueran introducidos en el lugar de trabajo debido a que se sabía poco de los efectos que producían en el hombre y en el ambiente. Asbestos, vinil ácido clorhídrico, formaldehído y benceno son algunos ejemplos de materiales usados por muchos años.

Los metales han sido usados extensivamente en el lugar de trabajo, el empleo de estos sin las medidas adecuadas expone a millones de trabajadores y ecosistemas cercanos. Los resultados de muchas investigaciones relacionadas con la salud y el ambiente han demostrado que tan peligroso pueden ser las industrias o actividades industriales que no toman medidas adecuadas de sanidad y de eliminación de residuos tóxicos.

Debido a estas consecuencias, han aparecido numerosas regulaciones, en las que se establecen normas que regulan la emisión de los diferentes agentes potencialmente tóxicos. Se han invertido innumerables horas de investigación dedicadas a determinar que agentes químicos son seguros de utilizar y la manera apropiada en que se deben de desechar.

El objetivo de este trabajo es el de investigar la posibilidad de implementar metodologías de monitoreo en cuerpos de agua utilizando un organismo biomarcador *Carassius auratus*, para evaluar la genotoxicidad del cromo hexavalente, la cual es la forma carcinogénica del cromo. Este metal se utiliza en numerosas industrias y es finalmente desechado en diferentes cuerpos de agua, contaminando directamente a los ecosistemas acuáticos e indirectamente a la población en aquellos lugares donde su principal fuente alimenticia y de trabajo es el pescado.

Para llevar a cabo nuestro proyecto se utilizó el ensayo de Micronúcleos (MN), en eritrocitos y en tejido branquial de *C. auratus*. Los peces fueron expuestos a diferentes concentraciones (0, 25, 50 y 100 ng/ml) de dicromato de Potasio $K_2Cr_2O_7$ durante 3 y 7 días.

Los resultados muestran que en el tejido branquial hubo una clara inducción de MN a los tres días de tratamiento ya que los organismos tratados mostraron tres veces la frecuencia de MN observada en los controles. En eritrocitos no observamos la inducción de MN a ninguna de las dosis ni días de exposición. La metodología empleada resultó sencilla de implementar y adecuada para estudios de campo o de laboratorio que intenten identificar agentes genotóxicos en agua.

Índice

1.- El agua un valioso recurso	9
2.- ¿Que contamina el agua superficial?	10
2.1.- Fuentes Puntuales y No puntuales de contaminación en los cuerpos de agua subterráneas.	11
2.2 .- Transporte en el ambiente de los contaminantes en el agua.	12
3.- El Cromo.	13
3.1.- Características Fisicoquímicas.	13
3.2.- Minerales de Cromo.	14
3.3.-.....Cromo metálico.	14
3.4.- Derivados del Cromo (VI).	15
3.5.- Química Ambiental del Cromo.	15
3.6.- Utilización del Cromo en la industria.	18
3.7.- Fuentes ambientales de exposición.	18
3.8.- Toxicidad en Humanos.	20
3.9.- Toxicidad en animales.	21
3.9.1.- Farmacocinética del Cromo (VI)	21
3.9.2.- Efectos del Cromo (VI) en algunos iones dependientes de ATPasas en Branquias.	24
4.- Toxicología Acuática.	24
4.1.- Categorías de Toxicidad.	25
5.- Biomonitores	26
6.- Biomarcadores	27
6.1.- Clasificación de Biomarcadores	28
7.- Carassius auratus como Biomonitor	30
7.1.- Clasificación.	30
7.2.- Descripción.	30
7.3.- Anatomía Funcional de las Branquias.	
7.4.- Tejido hematopoyético.	33
7.5.- Glóbulos rojo.	34
7.6.- Formación de la Sangre.	34
8.- Micronúcleos.	34
8.1.- Tipos y Formas en que se inducen los MN.	35
Justificación.	37
Hipótesis.	37
Objetivo General.	37
Objetivos Particulares.	37
Diseño experimental.	38
Resultados.	43
Discusión.	46

Conclusiones.	49
Bibliografía	50
Apéndice A	57
Apéndice B	58
Apéndice C	59
Apéndice D	60
Apéndice E	61
Apéndice F	62
Apéndice G	63

1. - El agua un valioso recurso.

El agua y la vida son inseparables. La vida se originó en el agua y, al ser ésta el disolvente universal, podemos decir que todas las reacciones metabólicas ocurren en una solución acuosa compleja (Figura 1).

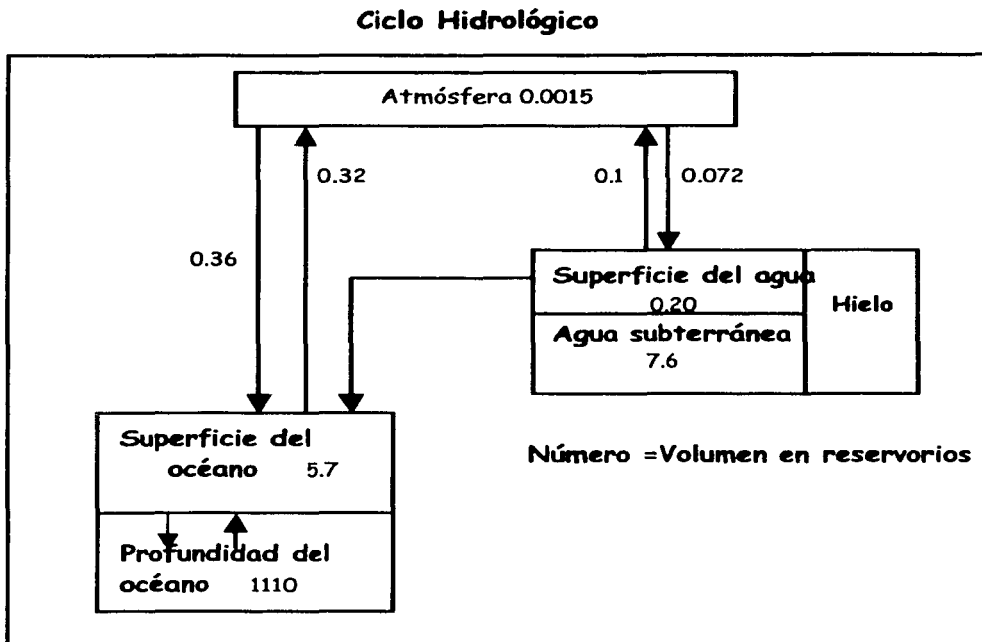


Figura 1: El ciclo del agua está controlado por la energía del sol y de la gravedad. (Albert 1997).

Este valioso recurso se mueve constantemente desde la atmósfera a la tierra, a los mares y ríos, luego, nuevamente a la atmósfera. Este movimiento modifica la superficie terrestre y por lo tanto, es un agente poderoso de los cambios geológicos. Al correr sobre la superficie de la tierra, primero arrastra nutrientes y sedimentos y después, los deposita. El efecto del agua en la tierra dependerá del tiempo que ésta permanezca en el terreno antes de llegar al mar.

El ciclo hidrológico tiene un depósito atmosférico pequeño, pero muy activo, por esto, es muy vulnerable a las perturbaciones provocadas por el hombre, las cuales pueden modificar el tiempo y el clima, a corto o largo plazo.

Aunque la Tierra tiene gran cantidad de recursos acuáticos, estos están distribuidos inequitativamente. El uso del agua potable se ha incrementado en todo el mundo, debido a que las demandas y necesidades de la población humana ha aumentado exponencialmente. Si la población mundial sigue creciendo como se estima, el agua dulce de los ríos y lagos podría terminarse en el siglo actual.

Para enfrentar la creciente demanda de este trascendente recurso, se han construido depósitos artificiales y se ha aumentado el uso del agua reciclada; por lo que es importante monitorear la calidad del agua (Raven P. et al., 1997).

Desde siempre, el hombre ha volcado sus desechos en los cuerpos de agua. En condiciones normales los ríos pueden autodepurarse: El agua arrastra los desechos hacia los océanos, las bacterias utilizan el oxígeno disuelto y degradan los compuestos orgánicos, que a su vez son consumidas por los peces y las plantas devolviendo el oxígeno y el carbono a la biosfera.

A partir de la revolución industrial se usan nuevas materias primas inorgánicas como el carbón y el petróleo esto se hace cada vez más difícil ya que muchas veces los sistemas se encuentran saturados de desechos, y las industrias vuelcan productos que no pueden ser degradados por las bacterias.

Ello hace que a menudo, el contenido de oxígeno disminuya drásticamente y que el río ya no tenga capacidad para mantener la vida en él (Raven P. et al., 1997).

2.- ¿Que contamina el agua superficial?

Las principales causas de contaminación del agua la constituyen:

1. Contaminación por sedimentos, ésta es causada por partículas de tierra que caen en el agua por la erosión.
2. Drenaje, es el agua de desecho que fluye del drenaje de las ciudades y las industrias
3. Agentes patógenos como bacterias, virus, protozoarios, parásitos que entran al agua, estos pueden ser los causantes de enfermedades como la tifoidea y el cólera, puede estar presente en el agua; estos provienen de los desechos de organismos infectados.
4. Desechos que requieren oxígeno; los desechos orgánicos pueden ser descompuestos por bacterias que usan oxígeno para biodegradarlos. Si hay poblaciones grandes de estas bacterias, pueden agotar el oxígeno del agua, matando así las formas de vida acuáticas.

5. Nutrientes inorgánicos de plantas y algas, como el nitrógeno y el fósforo, los cuales pueden provenir de desechos de animales y plantas, como fertilizantes.
6. Los nutrientes vegetales pueden ocasionar el crecimiento excesivo de plantas acuáticas que después mueren y se descomponen, agotando el oxígeno del agua y de este modo causan la muerte de las especies marinas (zona muerta).
7. Compuestos orgánicos la mayoría de los cuales son sintéticos, y comúnmente tóxicos para los organismos acuáticos. Como la mayoría tienen estructuras complejas que son difíciles de degradar, pueden persistir por gran tiempo en el medio.
8. Especies químicas inorgánicas en los que se incluyen contaminantes como los metales pesados mercurio plomo y cromo.
9. Substancias radioactivas en las que se incluyen los desechos de industrias como la minería y la refinería de metales radioactivos como también la contaminación causada por su uso.
10. Contaminación termal, las grandes usinas eléctricas emplean agua como refrigerante, esto hace que las aguas de los ríos eleven su temperatura, provocando cambios en los procesos biológicos y, por lo tanto, se destruye la vida existente entre ellos (Frederick 1996).

La contaminación del agua se puede originar en sitios fácilmente identificables u ocurrir de manera más extensa, por lo que se dice que puede ocurrir de manera puntual y no puntual.

2.1 Fuentes Puntuales y No Puntuales de contaminación en los cuerpos de agua subterráneas

- Las fuentes puntuales descargan contaminantes en localizaciones específicas a través de tuberías y alcantarillas. Ej. : Fábricas, plantas de tratamiento de aguas negras, minas, pozos petroleros, etc.
- Las fuentes no puntuales son grandes áreas de terreno que descargan contaminantes al agua sobre una región extensa. Ej.: Vertimiento de sustancias químicas, tierras de cultivo, lotes para pastar ganado, construcciones, tanques sépticos (Frederick 1996).

Un ejemplo claro de fuente puntual ocurre en el Valle de León, (Figura 2) ya que es uno de los estados más productivos en zapatos, bolsas, chamarras y

todo aquello relacionado con las pieles. Allí existen alrededor de 600 curtidoras y más del 80% utilizan cromo como agente curtidor. Los desechos son vertidos directamente en el sistema de drenaje municipal pasando por la rivera de León a la presa de Mastranzo en el sur del límite de la ciudad, en donde se usa esta agua para el riego. Además se han encontrado altas concentraciones hasta 50mg/L de Cr (VI) en el agua subterránea localizada en el valle producidos por la incorrecta disposición de los desechos fabriles (Armienta et al., 2001).

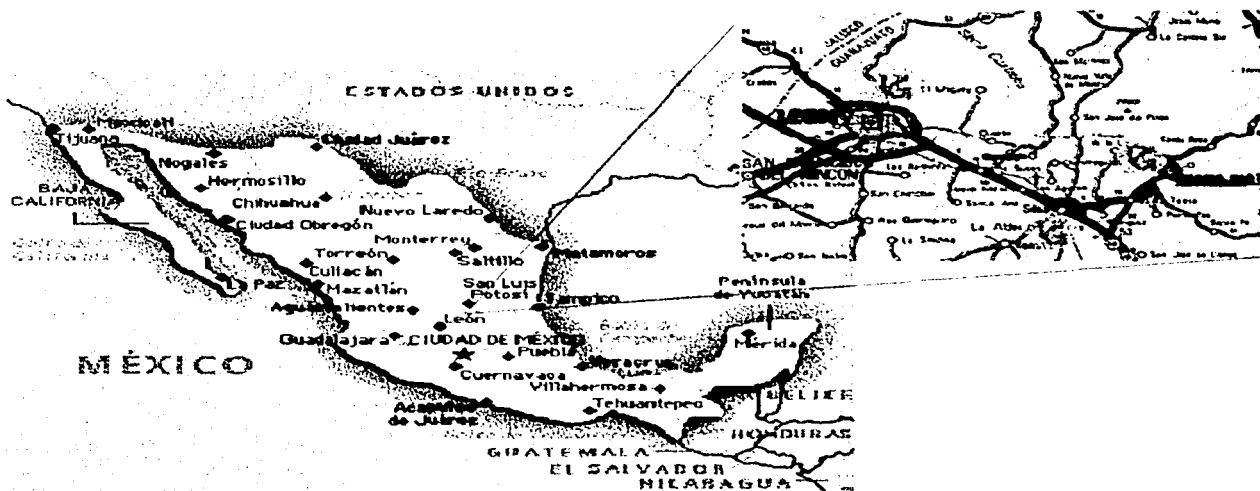


Figura 2 Valle de León

2.2 Transporte en el ambiente de los contaminantes en el agua.

Los contaminantes presentes en la superficie del agua existen en diferentes estados; pueden estar en solución y o en suspensión. El material en suspensión puede estar en forma de burbujas (aceite) o partículas y los contaminantes pueden estar disueltos en las burbujas o ser adsorbidos por las partículas sólidas. Todas estas formas pueden ser transportadas en el agua distancias considerables. Las partículas pueden sedimentarse en el fondo de los cuerpos de agua superficiales.

En ríos, los contaminantes son transportados a las largas distancias. La distancia depende de factores como la estabilidad y el estado físico de los contaminantes y la fuerza de la corriente del río. La distancia de viaje es comúnmente más grande cuando el compuesto es estable y esta en solución y la corriente del río es fuerte. En general la concentración de un contaminante

decae con el incremento de la distancia y esto se refleja en el cambio de la flora y fauna.

Cuando los contaminantes persistentes entran en la cadena alimenticia pueden trasladarse grandes distancias por la migración de animales y de aves (Dix, 1981).

3.- El cromo

El cromo es un elemento natural ubicuo, que se encuentra en rocas, plantas, suelos, animales y en los humos y gases volcánicos. Puede funcionar con distintas valencias y en el ambiente se encuentra en varias formas: las más comunes son las derivadas del cromo trivalente, o cromo (III), y las del cromo hexavalente, o cromo (VI).

El cromo es un nutriente esencial para los seres humanos, en los que promueve la acción de la insulina. El cromo metálico, o cromo (0), y los derivados del cromo (VI), usualmente son de origen antropogénico. (Albert, 1997).

3.1 Características Fisicoquímicas

El cromo es el sexto elemento en abundancia en la corteza terrestre, en donde se encuentra como óxido (Cr_2O_3) y, combinado con fierro y oxígeno, en el mineral cromita. El elemento se descubrió en 1762, en el cromato de plomo (PbCrO_4), que forma el escaso mineral crocoíta; su nombre proviene del griego cromos que significa "color" y se debe a los vivos colores de sus compuestos (Albert, 1997).

Es un metal pesado de la primera serie de metales de transición, a lo que se deben sus principales propiedades químicas y bioquímicas. Entre ellas destacan el que tiene varios estados de oxidación, algunos de sus compuestos son paramagnéticos, muchos de ellos son coloridos, por lo que algunos minerales y piedras preciosas deben su color al cromo y que el Cr tiende a formar iones complejos.

Los estados de oxidación del cromo son -2, 0, +2, +3, y +6. Los derivados de las valencias -2 y +2 tienen poca importancia, y el 0 corresponde al cromo metálico. Los únicos compuestos de importancia biológica son los derivados de los estados de oxidación +3 y +6; al primer grupo pertenecen el óxido crómico (Cr_2O_3) y las sales crómicas como el cloruro crómico (CrCl_3) o el anion crómico ($\text{Cr}(\text{OH})_4^-$) y, al segundo grupo el trióxido de cromo (CrO_3), los cromatos (CrO_4^{2-}) y los dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) (Albert, 1997). En la Tabla I se resumen las características fisicoquímicas más importantes del cromo.

Tabla I Características Fisicoquímicas del Cromo (Albert, 1997).

Símbolo químico:	Cr.
Masa atómica relativa:	51.996 g.
Densidad:	7.19 g/cm ³ a 20°.
Punto de ebullición:	2672° C.
Punto de fusión:	1857° C.
Presión de vapor:	10-6 Pa a 844° C.
Solvólisis:	Soluble en ácido sulfúrico y ácido clorhídrico diluidos.

3.2 Minerales de Cromo

El más importante es la cromita o ferrocromita (cromato ferroso, FeCr_2O_4), que deriva del cromo (III). La producción mundial de cromo es de 9,935,000t, África del sur ocupa el primer lugar, el 75% de la producción mundial de cromita proviene de los países de la ex Unión Soviética, Sudáfrica, Albania y Zimbabwe. En América Latina, el principal productor es Brasil, con alrededor del 10% de la producción mundial. Otro país de la región que produce cantidades relativamente importantes de cromo es Cuba. En 1984, la producción mundial de cromo era de más de 800 mil toneladas anuales. Los principales países industrializados, en particular Estados Unidos, son completamente dependientes de la importación de este metal, al cual se le considera como metal estratégico en ese país, por ser esencial para la industria. (Albert, 1997).

3.3 Cromo metálico

No se encuentra libre en la naturaleza debido a su alta reactividad. Se caracteriza por su plateado con un tinte azulado; es muy resistente al calor y fácilmente se recubre con una delgada capa de óxido que lo protege de un ataque químico posterior. Es altamente resistente a la oxidación, inclusive a altas temperaturas.

Esta propiedad, aunada a su color, es la causa de que se emplee para recubrir objetos de diferentes metales con el fin de protegerlos de la corrosión, lo que se conoce como cromado. (Albert, 1997).

Son muy importantes para la industria las aleaciones que contienen cromo, en especial las ferrosas o aceros aleados. El acero inoxidable contiene de 14 a 18% de cromo.

Estos compuestos son los que usualmente predominan en el ambiente porque son los derivados más estables del metal. El más importante de ellos es el óxido crómico, (Cr_2O_3) que es muy estable, resistente a los ácidos y de alto punto de fusión; se emplea como pigmento con el nombre de "verde de cromo". Los derivados de cromo (III) pueden formar iones complejos, estables y coloridos (Albert, 1997).

3.4 Derivados del Cromo(VI)

Ambos grupos son agentes oxidantes energéticos en medio ácido, en el que pasan a cromo (III). El dicromato de potasio se emplea mucho en la industria y en las operaciones químicas.

El dicromato sódico se emplea en el curtido de pieles, porque forma un compuesto insoluble con las proteínas del cuero.

El cromato de plomo se usa como pigmento, con el nombre de "amarillo de cromo" (Albert, 1997).

3.5 Química Ambiental del Cromo

En el ambiente la química del cromo ha sido muy estudiada (Richard y Bourg, 1991; Kotás y Satasicka, 2000). Se sabe que los distintos estados de oxidación en que podemos encontrar a la concentración del cromo, se presentan en diferentes compartimientos ambientales (agua, suelo y plantas). Ello determina la forma de evaluar el riesgo de contaminación por cromo (Armienta et al., 2001).

En general, los efluentes industriales que contienen cromo se incorporan a los cuerpos de aguas y eventualmente, llegan al océano, la forma química dependerá de la presencia de materia orgánica en los cuerpos de agua, si ésta está presente en grandes cantidades, el cromo (VI) podrá ser reducido a cromo (III), el cual se podrá adsorber

en las partículas o formar complejos insolubles (Albert, 1997).

Estos complejos pueden permanecer en suspensión cerca del sitio de entrada al ambiente, ser transportados al océano, o bien, precipitarse y ser incorporados a los sedimentos. En los océanos ocurre un proceso similar. La proporción de cromo (III) es directamente proporcional a la profundidad de los sedimentos.

El cromo (III) tiene una mayor retención en las capas del suelo dependiendo de las características físicas del mismo, la concentración dependerá de la combinación de diversos compuestos aunado a las características de cada uno; la profundidad del suelo determinará la concentración del cromo (Armienta et al., 1996).

El cromo también entra al ambiente a partir de todos los procesos de combustión, incluyendo los incendios forestales. Aunque en este caso no se conoce con certeza el estado de oxidación del cromo que se emite, que debe ser la forma hexavalente. Sin embargo, esta pasa con facilidad del estado trivalente, que es el más estable a comparación del hexavalente. Los cálculos sobre los aportes globales de el cromo al ambiente se presentan en la Tabla II El ciclo ambiental del cromo se resume en la (Figura 3).

Tabla II Fuentes que contribuyen a la liberación del cromo en el ambiente (Albert, 1997).

Fuente	Porcentaje
Emisiones volcánicas	1%
Ciclos biológicos	30%
Absorción por las plantas	15%
Intemperización de las rocas	15%
Emisiones de fuentes antropogénicas	70%
Producción minero-metalúrgica	3%
Diversos usos	60%
Procesos de combustión	7%

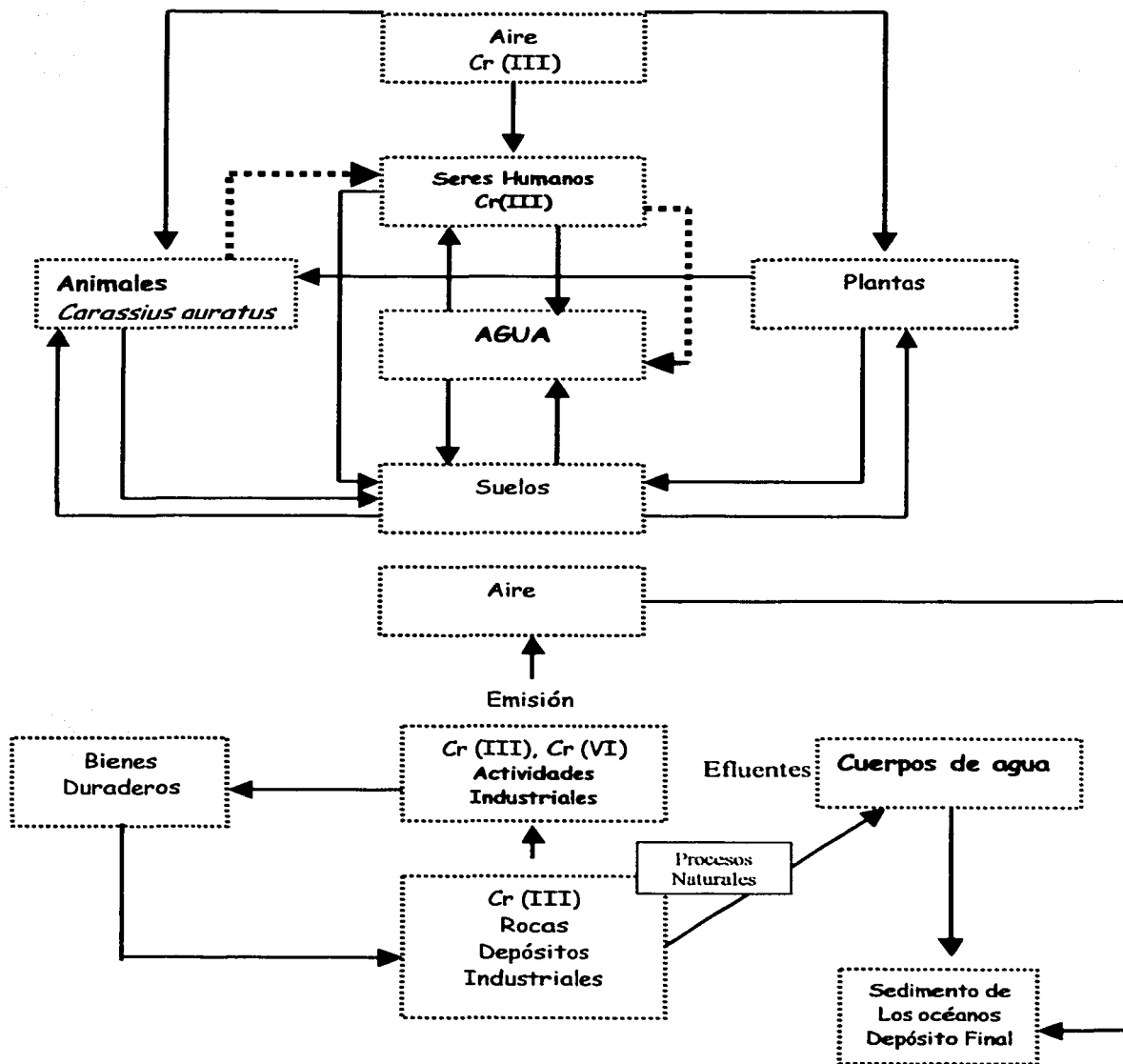


Figura 3 Resumen del cromo en el ambiente (Albert,1997).

3.6 Utilización del Cromo en la Industria

El cromo se usa sobre todo, en tres industrias: la metalúrgica, la química y los materiales refraccionarios.

En la metalúrgica el cromo es usado en la manufactura de cromo-acero o de cromo-níquel-acero debido a que incrementa la resistencia y durabilidad del metal y porque el cromo platea otros metales. Además de tener un alto punto de fusión, modera la expansión termal, es estable en formas cristalinas a elevadas temperaturas y es un químico neutral (Kerger et al., 1997).

Los usos del cromo en materiales refractarios incluyen la fabricación de ladrillos a base de magnesita y cromo para hornos metalúrgicos y el uso de cromita granular para muchas otras aplicaciones que requieren resistencia (Albert, 1997).

La cromita se usa como aislante en los hornos industriales de alta temperatura que se emplean en la refinación de metales.

La tercera aplicación del cromo es para la producción de compuestos químicos con cromo ya que las sales de cromato dan colores luminosos por lo que se usa como pigmento de pinturas, de la industria textil, en curtido de pieles, en la firmeza de emulsiones fotográficas, como parte del toner para las maquinas de fotocopiado, en la catálisis de reacciones orgánicas e inorgánicas y en la cerámica. (Albert, 1997).

Cantidades menores de estos compuestos se usan en tratamiento de maderas, lodos de perforación, inhibidores de la corrosión, tratamiento de aguas, cerillos.

Por otro lado el sesquióxido de cromo es probablemente la forma más abundante y transportada por el aire; el cromo trivalente es producido por la industria metalúrgica.

El cromo hexavalente se origina únicamente por la producción de cromatos y dicromatos por la industria química y es transportado por el aire (Kerger et al., 1997).

3.7 Fuentes ambientales de exposición

El cromo, en sus formas (III) y (VI), entra principalmente al ambiente a partir de fuentes estacionarias. Aproximadamente el 64% del total de las emisiones atmosféricas de cromo en Estados Unidos es cromo (III) que procede de la producción de acero y de la combustión -comercial e industrial- de diversos combustibles, mientras que cerca del 32% es cromo (VI) que provienen de la fabricación de productos químicos, de las actividades de cromado y de las

torres de enfriamiento en las que se usan cromatos como inhibidores de la corrosión (Albert, 1997).

En el mismo país la EPA (Albert, 1997) calculó en fechas recientes, que cada año se emiten a la atmósfera 2840 toneladas métricas de cromo total, en contraste con 110 mil toneladas de cromo metálico que se producen anualmente en EUA.

Para la población en general, las principales fuentes de exposición ambiental al cromo son el aire, el agua de bebida y los alimentos que contienen este metal (Albert, 1997).

Aire

Usualmente, los niveles naturales de concentración de cromo en aire son bajos. Por ejemplo, la concentración de cromo total -suma de cromo (III) y cromo (VI)- en aire en zonas no industriales, generalmente es menor de 0.1 mg/m^3 (Albert, 1997).

Agua

Normalmente, las concentraciones de cromo total en el agua de bebida son inferiores a $2 \mu\text{g/L}$ (2ppb) (Albert, 1997). Sin embargo, el agua de pozos puede tener concentraciones mayores si está contaminada con cromo (VI) de fuentes industriales o si la zona tiene depósitos importantes de minerales de cromo.

Los efluentes de industrias que utilizan cromo, como las de cromado, curtido, protección de maderas, textiles, etc., también pueden aportar cantidades relativamente elevadas de cromo a los cuerpos de aguas superficiales. Cuando no se tratan adecuadamente los desechos sólidos de las industrias que procesan o emplean cromo, pueden ser fuentes importantes de contaminación para los mantos freáticos, en los que el cromo puede permanecer por largo tiempo. En Estados Unidos, el agua entubada contiene de 0.4 a $8 \mu\text{g Cr/L}$. En el valle de León, Guanajuato se han reportado altas concentraciones alrededor de (50 mg/l) debido a la inadecuada eliminación de los desechos industriales por las fábricas y en el sur del Valle se encuentran bajas concentraciones (0.05 mg/l) de cromo hexavalente (Armienta et al., 1996).

En teoría, el cromo (VI) puede persistir en este estado en aguas con bajo contenido de materia orgánica, mientras que, al pH natural de las aguas, cromo (III) formará compuestos insolubles, a menos que se formen complejos. Se desconoce la proporción relativa de cromo (III) y cromo(VI) en las aguas (Albert L. 1997).

Alimentos

El cromo (III) se encuentra de manera natural en muchos vegetales frescos, frutas, levaduras, granos y carne. Por esta causa, la ingestión de alimentos es, usualmente, la principal vía de exposición al metal para la población general.

Algunos métodos de procesar, almacenar y preparar los alimentos pueden modificar su contenido de cromo, por ejemplo, los alimentos ácidos que entren en contacto con latas o utensilios de acero inoxidable pueden llegar a tener cantidades elevadas de cromo, debido a que se pueden disolver y pasar al alimento el que está presente en el acero.

3.8 Toxicidad en Humanos

El cromo es considerado como un elemento esencial, la deficiencia de este daña el metabolismo de la glucosa produciendo hiperglicemia, elevación en los niveles de colesterol y de triglicéridos, trastornos en la fertilidad, pérdida de peso, disfunción del sistema nervioso, daño al metabolismo de proteínas y carbohidratos, crecimiento disfuncional y decremento en la actividad de fosfoglucomutasa (Albert, 1997; Fishbein, 1987); un exceso en su consumo también implica diversas complicaciones. A continuación se citan varios ejemplos: el cromato puede inhibir a numerosas enzimas, el cromo trivalente es una sal que es deficientemente absorbida alrededor del tracto gastrointestinal y respiratorio porque no puede cruzar fácilmente las membranas, el efecto más agudo por un exceso de ingestión es la necrosis renal tubular, mientras que cuando la exposición es por vías respiratorias, además de minimizar el sentido del gusto y el olfato, induce úlceras en la cavidades nasales (Kerger et al., 1997).

El cromo hexavalente puede ser absorbido por vía oral y a través de la ruta pulmonar y probablemente también por la piel formando complejos después de ser absorbido. Una vez en el interior celular es reducido a la forma trivalente, la cual es probablemente la única forma biológicamente activa. La dermatitis en la piel es el resultado de la precipitación de cromo con las proteínas probablemente como resultado de exposiciones ocupacionales, contaminación del aire provocando graves úlceras, inflamación de la membrana nasal, en casos extremos hay perforación de tabique nasal (O'Flaherty, 1993, 1994; Anderson, 1996).

Estudios epidemiológicos muestran que las sales de cromo (generalmente las que son solubles) son carcinogénicas (Kerger et al., 1997). Se han reportado cáncer de pulmón fibrosis, asma bronquial, y congestión pulmonar seguida de un edema en trabajadores que han estado expuestos a pigmentos con cromatos

por industrias cercanas ya que estos agentes químicos pueden ser transportados por el aire acondicionado (Kerger et al., 1997). La erosión de los dientes es posible por dos factores la corrosión natural y por cromo VI, la forma trivalente no irrita los tejidos ni erosiona los dientes.

3.9 Toxicidad en animales

El cromo VI causa daños a DNA y a una variedad de células *in vitro* y en sistemas in vivos. Se ha reportado que el cromo III produce mutagenicidad en sistemas bacterianos (Kerger et al., 1997).

Los cromatos y dicromatos han demostrado efectos teratogénicos y carcinogénicos en animales de laboratorio (Kerger et al., 1997). En particular, la toxicidad del dicromato de potasio varía dependiendo de la especie, la magnitud y el tiempo de exposición. En la tabla III se resumen diferentes efectos del dicromato de potasio en distintos organismos.

Tabla III Actividad genotóxica inducida por el dicromato de Potasio en diferentes sistemas biológicos.

Organismo	Alteración Genética (Fishbein, L et al 1987).
<i>Vicia faba</i>	Micronúcleos y aberraciones mitóticas (Fishbein, L et al 1987).
<i>Escherichia coli</i>	Mutaciones y baja fidelidad reproductiva (Fishbein, L et al 1987).
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Recombinación mitótica (Fishbein, L et al 1987).
<i>Camarones</i>	Alteraciones en DNA (Fishbein, L et al 1987).
<i>Carassius auratus gibelio</i>	Micronúcleos (Al-Sabti et al., 1994).
<i>Boeophthalmus dussumieri</i>	Aberraciones cromosómicas (Krishnaja and rege 1982).
Células de mamífero "in vitro"	Mutaciones, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, alteraciones en la replicación y reparación del DNA, rompimientos de cadena y entrecruzamientos. (Fishbein, L et al 1987).
Ratas "in vivo"	Micronúcleos y aberraciones cromosómicas (Fishbein, L et al 1987).
Humanos "in vivo"	Aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos (Fishbein, L et al 1987).

3.9.1 Farmacocinética del Cromo (VI)

La concentración total de cromo en eritrocitos humanos (RBCs), es uno de los biomarcadores más específicos después de una exposición. El cromo hexavalente es un componente que entra a la corriente sanguínea y es transportado dentro de los eritrocitos, por los canales de anión sulfato (Costa, et al., 1993). Una vez en el interior de los eritrocitos, el cromo (VI) es rápidamente reducido a intermediarios inestables de corta vida, los

cuales se ligan a hemoglobulinas y otras proteínas intracelulares (Gray y Sterling, 1950; Lewalter et al., 1985; Ottenwaelder y Wiegand, 1988; Wiegand et al., 1988; Coogan et al., 1991; Miksche et al., 1994), el resultado es una alta concentración de cromo en la sangre por la acumulación después de varias semanas.

Cabe mencionar que el cromo no solo es reducido en la sangre, en cualquier célula donde existan donadores de electrones disponibles como (el ácido ascórbico, el glutatión reducido, cisteínas, peróxido de hidrógeno, flavoenzimas como la glutatión reductasa u otras moléculas siempre y cuando sean ricas en electrones) ya que por cada átomo de cromo reducido se necesitan tres electrones (Fishbein, et al., 1987), y sistemas de transporte de electrones como el del citocromo P-450, aunque el sitio de mayor reducción es la mitocondria (Fishbein, et al., 1987); Sugiyama, 1991). Estudios con animales han demostrado una concentración elevada en eritrocitos después de una exposición intravenosa o intratraqueal de Cr (VI).

El cromo (VI) en contraste con el cromo (III) puede llegar a asociarse con los glóbulos rojos y el plasma de una manera más rápida e irreversible (Gray y Sterling, 1950; Wiegand et al., 1988). La distribución y excreción depende de las formas químicas, la administración y el organismo; cabe mencionar que su reducción puede ser más rápida debido a sustratos con un pH bajo como son amino ácidos, glutatión, ascorbato, citrato y por la presencia de ciertos metales. Los tejidos o fluidos corporales por ejemplo los jugos gástricos del estómago tienen una alta capacidad de reducir el Cr VI, la saliva, bacterias gastrointestinales y el plasma sanguíneo también cumplen con estas funciones.

Después que el cromo (VI) es rápidamente reducido de manera endógena o a Cr III (De Flora et al., 1987; De Flora y Wetterhahn, 1989) tendría dos mecanismos de acción, el primero implica que el cromo afecta directamente al DNA y el segundo a través de los radicales libres que se producen durante su reducción. (Fishbein et al., 1987; Suagden, D. 1992; Sugiyama, 1991; De la Sierra, 2001) (Figura IV).

y a través de una interacción electrostática o intercalándose por las bases (Sugden, 1992; Sugiyama, 1991). Además de estos efectos genotóxicos también se ha mencionado que el Cr (VI) puede inhibir enzimas vitales (Sugden, 1992; Sugiyama, 1991).

3.9.2 Efectos del Cromo VI en algunos iones dependientes de ATPasas en Branquias.

Los efectos subletales del cromo VI fueron directamente relacionados con la inhibición de varios procesos como el bloqueo del sistema de transporte activo del epitelio branquial, células clorhídricas etc. (Nath y Kumar, 1987).

En peces se ha comprobado que el cromo puede causar daño renal ya que se pierde la habilidad osmoregulatoria y respiratoria (Artillo y Melodio, 1988). Los metales pesados dificultan el transporte de iones en varios sistemas importantes de osmoregulación de los teleósteos (Olson, 1973) dañando algunos órganos como branquias, cerebro y riñones. Las ATPasas dependientes de iones de las membranas son enzimas responsables del transporte de estas especies a través de las membranas, lo que regula el volumen celular, la presión osmótica y la permeabilidad de la misma (Kundu et al., 1992, 1995). En branquias la inhibición de estas enzimas depende de la dosis y duración de la exposición.

4.- Toxicología Acuática

Debido a la dinámica hidrológica y eólica del agua, una gran cantidad de compuestos tóxicos y antropogénicos llegan a los ecosistemas acuáticos, donde son absorbidos, acumulados, biotransformados por procesos biológicos y/o químicos. Los xenobióticos (Toda sustancia extraña que actúa en el cuerpo de un hombre o animal, incluyendo sustancias benignas o dañinas; excluye vitaminas y hormonas) disueltos o dispersos en el agua son introducidos a los organismos acuáticos a través de las branquias, la piel y/o el tracto digestivo. Una vez dentro del organismo, estas sustancias tóxicas interactúan en diversos procesos fisiológicos y rutas bioquímicas. La importancia de las alteraciones o daños causados depende de las propiedades químicas de cada xenobiótico, que podrá ser degradado, biotransformado y/o acumulado por el propio organismo o a través de las cadenas tróficas del ecosistema acuático (Walker et al., 1996). El estudio y el conocimiento de la biodisponibilidad y las biotransformaciones de los contaminantes en los componentes de las cadenas alimentarias acuáticas pueden ser de gran utilidad para establecer los riesgos que estas sustancias representan para los organismos acuáticos y el público consumidor de los productos provenientes de los cuerpos de agua. Se trata de una ciencia en

pleno desarrollo que resulta de enorme importancia para nuestro país ya que cuenta con una gran variedad de riqueza acuática pero es amenazada con grandes cantidades de contaminantes (Walker et al., 1996).

La toxicología acuática tiene tres funciones básicas: (1) examinar la naturaleza adversa de los efectos producidos por agentes químicos, (2) valorar la probabilidad de ocurrencia y (3) monitorear, evaluar y cuantificar el riesgo de la exposición de agentes químicos en cuerpos de agua.

4.1 Categorías de Toxicidad

Los Toxicólogos han clasificado a los agentes químicos en pequeñas categorías, generalmente separan respuestas adversas por duración de efectos temporales:

- A) Toxicidad aguda: Generalmente se observa un ataque por un periodo corto de tiempo (puede tener efectos reversibles).
- B) Toxicidad crónica: Señalada por una larga duración o permanente, constante o continua (puede tener efectos permanentes o irreversibles) (Petrocelli, 1985).

La concentración o dosis adquirida por un organismo dependerá de numerosos factores como: las propiedades fisicoquímicas del xenobiótico, la ruta de exposición, la fisiología y bioquímica de cada organismo. Pueden existir varias rutas de exposición, ya que los agentes químicos disueltos en el agua pueden ingresar por las branquias, la piel, por el tracto gastrointestinal, etc. Asimismo la toxicidad puede distinguirse por los sitios de acción:

- Toxicidad local: Ocurre en el sitio de acción o de exposición entre el tóxico y el sistema biológico
- Toxicidad sistémica: Requiere la absorción del agente tóxico y que mediante su distribución en la corriente sanguínea llegue a un órgano(s), susceptible(s) o sitio de acción (Petrocelli, 1985)..

Las sustancias químicas que se encuentran en los sedimentos pueden ser absorbidas por contacto dérmico directo, ingestión y absorción por el tracto gastrointestinal. La relativa importancia de cada ruta de entrada varía con las propiedades intrínsecas del xenobiótico y también de la probabilidad de que el agente químico sea degradado en el medio acuático y biotransformado por organismo de bajos niveles tróficos (Petrocelli, 1985).

5. - Biomonitores

Las especies utilizadas en estudios de toxicología acuática se denominan organismos biomonitores. Son sistemas biológicos capaces de proporcionar información sobre las condiciones del ecosistema, (Butterwort et al., 1995; Landis et al., 1995) Nos indican efectos biológicos más que cantidades reales del contaminante. Las características con las que se deben cumplir para ser organismos biomonitores son:

1. Fáciles de coleccionar e identificar.
2. Que su edad y sexo sean fáciles de determinar en cualquier época.
3. Óptimos para el trabajo de laboratorio
4. Sedentarios en la mayoría de su ciclo de vida (se establecen en un sitio determinado para el resto de su vida).
5. Sensibles al tóxico.
6. De tamaño conveniente (Butterwort et al., 1995; Landis et al., 1995).

Los organismos biomonitores que habitan de manera natural en el ecosistema a evaluar, sirven como indicadores del potencial del agente contaminante en su propio hábitat ya que están representando a la población natural y también tienen una amplia distribución y abundancia y nos permite realizar monitoreos *in situ*.

Los peces, crustáceos y moluscos son los vectores más importantes que trasladan los contaminantes a los humanos. Por ejemplo peces marinos y mariscos son grandes fuentes de proteínas en muchas ciudades. La contaminación de estas especies con altas concentraciones de Metil mercurio (WHO, 1990) provocó daño cromosómico en los linfocitos de personas que consumieron el pescado contaminado (Skerfving et al., 1974).

Dada su importancia, una gran variedad de ensayos *in vitro* como *in vivo* con peces han sido usados como modelos de sistemas toxicológicos y bioquímicos (Powers, 1989).

Los peces responden a los agentes tóxicos de una manera similar a los vertebrados superiores, los cuales han sido utilizados para evaluar los efectos teratogénicos y carcinogénicos. También se han observado respuestas similares en hepatocitos con respecto a la inducción de la proliferación de peroxisomas (Yang, et al., 1990) al daño oxidativo (Washburn y di Giulio, 1989), y a la del citocromo P-450 monooxigenasa hepático que metaboliza de una manera análoga a los mamíferos (Stegeman y Lench, 1991). Por ejemplo, la presencia de altas concentraciones de contaminantes carcinogénicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés) han sido asociados a una elevada prevalencia de tumores en

peces que se encuentran en contacto con el sedimento (Harshbarger y Clark 1990).

El ensayo de MN fue originalmente desarrollado con una gran variedad de especies de mamíferos; aplicada a los tejidos de peces nos permite estudiar la presencia de agentes genotóxicos en el medio acuático, lo cual previene el riesgo directo e indirecto en humanos (Al-Sabti, 1994). Los eritrocitos de peces son nucleados, por lo tanto los MN pueden ser cuantificados fácilmente y así medir la actividad clastogénica, varios estudios muestran que después de varias exposiciones de diferentes contaminantes hay una alta incidencia de MN en eritrocitos periféricos. Pueden observarse en una gran variedad de tejidos siempre y cuando sean tejidos altamente proliferativos como: el tejido hematopoyético (linfocitos de sangre periférica y eritrocitos), tejido nasal, bucal y epitelial. (Hofman y de Raat, 1982; Al-Sabti, 1986^a, B; Das y Nanda, 1986; Hose et al., 1987; Metcalfe, 1988; Al-Sabti y Harshbarger 1990; Al Sabti, 1991; Hughes y Hebert, 1991; Ueda et al., 1992; Shultz et al., 1993; Al-Sabti et al., 1993; Al-Sabti, 1994), por lo que nos permite estudiar eventos relevantes en los procesos carcinogénicos (Schmid, 1975; Land et al., 1983).

6 Biomarcadores

Los efectos tóxicos también se conocen como biomarcadores o indicadores biológicos. En 1980 nace este nuevo campo el cual se empieza a utilizar para evaluar los efectos a la salud, por exposiciones a agentes potencialmente nocivos.

Los marcadores biológicos son señales o indicadores de cambios que ocurren en el organismo a consecuencia de una exposición a agentes tóxicos que permiten detectar los efectos que ocurren entre la exposición a un xenobiotico y la enfermedad resultante (NRC, 1989, 1992; Klassen y Eaton, 1991).

La magnitud de la alteración que produce la exposición a sustancias tóxicas dependerá de la naturaleza del compuesto, de la dosis de exposición y la función que desempeñe(n) en el organismo el (los) órganos blancos o tejidos afectados (NRC, 1989, 1992; Klassen y Eaton, 1991).

Los toxicólogos usan los biomarcadores para estimar la relación dosis-efecto y así facilitar la valoración del riesgo asociado a pequeñas exposiciones, aclarando los mecanismos de los agentes químicos que inducen enfermedades. En 1993 Smith y colaboradores clasificaron a los biomarcadores como indicadores de exposición, de efecto y susceptibilidad.

6.1 Clasificación de Biomarcadores

Biomarcadores de exposición

La exposición externa es la cantidad o concentración del material xenobiótico en el ambiente de un organismo, mientras que la dosis interna se refiere a la cantidad de xenobiótico que es transferida al organismo. La dosis biológicamente efectiva es aquella que ha interactuado con un blanco celular o tisular en donde el efecto biológico se inicia (Elinder et al., 1987; NRC, 1989).

Las diferencias metabólicas entre especies y entre individuos de una misma especie, pueden alterar drásticamente las dosis internas de los metabolitos reactivos. La dosis interna de un xenobiótico puede variar con la ruta de exposición, la especie química y la forma física.

Para hacer estimaciones cuali o cuantitativas de la exposición mediante marcadores biológicos: la concentración, la duración, el patrón de exposición y la naturaleza fisicoquímica de una sustancia tóxica deben ser consideradas en la selección de un marcador apropiado de exposición (Gibaldi y Perrier, 1982). Otros factores ambientales como la temperatura, pueden afectar la exposición cambiando la cantidad de consumo de agua y por lo tanto, de la ingesta de los contaminantes contenidos en la misma.

En este nivel se asocian los marcadores de genotoxicidad los cuales describen las alteraciones que sufre el DNA después de haber interactuado con el agente tóxico, sus principales etapas son:

- El agente tóxico o algunos de sus metabolitos reaccionan con el DNA.
- El DNA sufre alteraciones .
- Se activan los procesos de reparación, los cuales pueden remplazar un segmento dañado de DNA.
- Si la alteración no fue reparada a tiempo la alteración será heredada a las células hijas o morirá expresando la alteración (Galván 1998; Landis E., 1995).
- Cabe mencionar que aún después de las reparaciones correspondientes en el DNA, el agente tóxico puede permanecer provocando acciones nocivas o letales como interferir en la replicación, transcripción o en la propia reparación del DNA trayendo consecuencias graves en la reproducción o heredando esta alteración a las siguientes generaciones, en el caso que se presentaran en células reproductivas (Eckert, 1990; Landis, W et al., 1995)

Biomarcadores de efecto

Son las alteraciones que sufren los sistemas biológicos a nivel bioquímico, fisiológico y genético y se utilizan para evaluar el riesgo potencial o efectivo por la exposición de un solo o varios agentes (NRC, 1989, 1992).

Para la investigación en salud ambiental, los marcadores biológicos de efecto a un agente tóxico son considerados en el contexto de su relación con la salud del individuo por lo que un efecto se define como:

1. Una alteración en un tejido u órgano
2. Un evento temprano en un proceso biológico predictivo del desarrollo de un padecimiento.
3. Un padecimiento o una enfermedad clínicamente identificable.
4. Una respuesta periférica o paralela al desarrollo de una enfermedad, pero correlacionado con el y por lo tanto útil para predecir la evolución de un padecimiento (NRC, 1989, 1992).

Biomarcadores de susceptibilidad

Este marcador nos permite conocer una limitación heredada o adquirida de la capacidad de un organismo para responder a la exposición de un agente xenobiótico específico (NCR, 1989). Algunos marcadores biológicos alertan acerca de la existencia de factores individuales o poblacionales que pueden afectar la respuesta a agentes ambientales.

La selección de marcadores biológicos de exposición pueden obtenerse midiendo la concentración de una sustancia tóxica o sus metabolitos solos o unidos a DNA RANA, proteínas o receptores en tejidos o fluidos corporales y en productos de excreción.

El uso de marcadores puede acompañarse del empleo de cuestionarios con el propósito de evaluar la duración y magnitud de la exposición, como son los archivos clínicos. (NCR, 1989).

Se debe escoger o generar marcadores biológicos que pueden identificar los estados iniciales de la enfermedad; y que se conviertan en herramientas valiosas para desarrollar estrategias que prevengan la progresión de la enfermedad, y permitan realizar un análisis de riesgo (WHO, 1985; NCR, 1989).

Existe una gran diversidad de marcadores biológicos, entre los que se encuentran los mircronúcleos (MN)

Dentro del grupo de organismos seleccionados como biomonitores, se encuentra *Carassius auratus* (Figura 5).

A continuación se presentan su diagnosis y datos biológicos.

7.- *Carassius auratus* como Biomonitor



Figura 5 (Tomada de: Henley et al.,1980)

7.1 Clasificación

Clase: Osteichthyes

Subclase: Actinopterygii

Orden: Cypriniformes

Suborden: Cyprinoidei

Familia: Cyprinidae

Especie: *Carassius auratus*

Esta especie presenta variaciones morfológicas muy marcadas y generalmente es utilizada como peces de ornato, ya que adquieren formas y coloraciones muy vistosas, que son muy estimadas por los aficionados al acuarismo.

Al ser liberada en cuerpos de agua, es consumida por la población rural adquiriendo importancia como alimento.

7.2 Descripción

El cuerpo es alargado, robusto y grueso con un promedio de longitud total de 127 a 254 mm, con presencia de barbillas en la mandíbula inferior: el pedúnculo caudal es grueso y corto; con una altura del cuerpo de 28 al 34% de la longitud total.

La cabeza tiene forma triangular y una longitud del 24.1 al 26.4% de la longitud total. Los ojos tienen un tamaño moderado y su diámetro es de 19.0 a 31.8% de la longitud de la cabeza; la distancia interorbital va de 35.7 a 42.8% de la longitud de la cabeza y la boca es relativamente pequeña y protusible.

7.3 Anatomía Funcional de las Branquias

Tal como le sucede a otros animales, una de las necesidades fundamentales de un pez consiste en contar con una provisión adecuada de oxígeno en los tejidos,

de tal manera que pueda realizarse la oxidación que le proporcione la energía necesaria para mantener la vida. Los peces óseos muestran, en general, la misma disposición básica de sólo una abertura branquial externa, localizada a cada lado de la cabeza y bajo un opérculo que cubre las branquias. En todos los peces óseos los músculos mueven las bases de las hemibranquias, de tal manera que la presión que va hacia la cavidad oral, y posiblemente también el flujo de agua que sale de ella, es debidamente regulada (Eckert, 1997) (Figura 6)

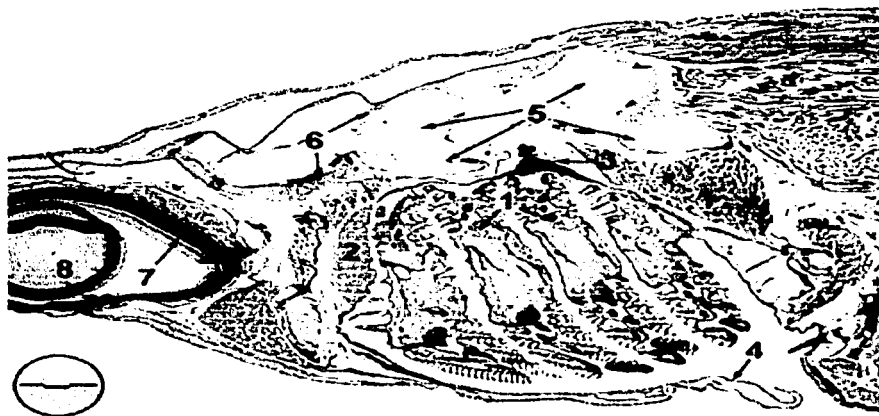


Figura 6 Sistema Respiratorio: Cavidad bucal (Corte parasagital). Sección parasagital de la cavidad bucal alrededor de los arcos branquiales. 1 arcos branquiales, 2 pseudobranquia; 3 Timo; 4 Operculo; 5 Canales semicirculares conteniendo ampollas; 6 Cráneo; 7 retina, 8 cristalino del ojo. (Henley, 1980) Escala: 90.2 μm

Cada filamento de la pseudobranquia tiene un soporte de varilla cartilaginosa delgada y vasos sanguíneos en su porción medular, alrededor de la cual se adosan capas de células pseudobranquiales y espacios sanguíneos sinusoidales. Existen cuatro arcos branquiales, en cada lado de la cabeza cada filamento branquial lleva consigo muchas subdivisiones o lamelas que son el asiento principal del intercambio gaseoso (Figura 7).



Figura 7 Sistema Respiratorio: Arco Branquial (Corte sagital): (Bouins, H&E, Bar= 90.2 μ m). 1. Limite Branquial, 2 Mucosa del epitelio, 3 Membrana basal, 4 submucosa, 5 Hueso, 6 Tejido adiposo, 7 Arteriolas branquiales eferentes, 8 Arteria branquial eferente, 9 Lámela primaria, 10 Lamela secundaria. Tomada Henley,1980) Escala: 90.2 μ m

Los bordes libres de las laminillas son extremadamente delgados, además están cubiertas por una mucosa secretadas por glándulas mucosas que se encuentran entre el epitelio; contienen una extensa red de vasos capilares sostenidos en la porción por células en columna. El número y tamaño relativo de las láminas determina el área respiratoria de las branquias. El área respiratoria varía mucho de acuerdo con los hábitos de los peces. Las lamelas en los filamentos no tienen contacto entre sí. La punta de los filamentos de los arcos adyacentes están yuxtapuestos y semejan la estructura de una coladera por donde pasa el flujo del agua (Eckert 1997) (Figura 7).

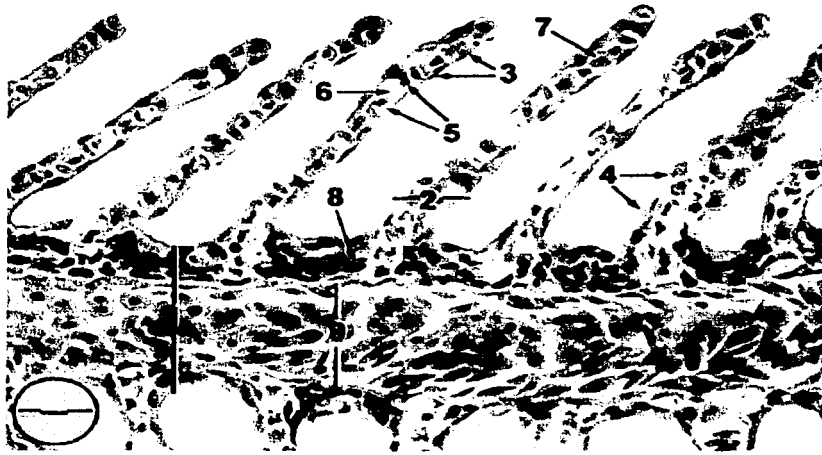


Figura 8 Filamento Branquial: Sección sagital alrededor del seno venoso
Sección sagital alrededor del seno venoso 1 lamela primaria; 2 lamela
secundaria; 3 célula epitelial, 4 mucosa celular; 5 pilar de celulas; 6
laguna; 7 eritrocito entre el lumen capilar; 8 células basales
indiferenciadas; 9 seno venoso central. (Henley,1980) Escala: 90.2 μ m

El flujo de agua pasa por canales semejantes a hendiduras entre las lamelas; estos canales miden alrededor de 0.02-0.05 mm de ancho y 0.2 -1.6 mm de largo. El aprovechamiento del oxígeno del agua respirable es mejorado no solamente por la subdivisión de los filamentos branquiales en las lamelas; también lo incrementa la dirección de la corriente sanguínea y la circulación del agua. Estas circulaciones son realmente un sistema de contracorriente, donde el gradiente de oxígeno del agua, fluyendo desde el lado oral al aboral de las branquias, decrece a medida que la sangre en las laminillas corre desde los vasos sanguíneos aferentes de las laminillas aborales a los eferentes de las laminillas orales.

La contracorriente de la sangre y el agua respirable mantienen un gradiente de difusión suave en las branquias para que penetre el oxígeno y se desprenda el dióxido de carbono en el pez (Eckert, 1997).

7.4 Tejido hematopoyético

El plasma es un líquido claro en el que se encuentra, además de las células sanguíneas, minerales en solución, productos absorbidos durante la digestión, productos de desecho procedentes de los tejidos, secreciones especiales,

enzimas, anticuerpos y gases disueltos. Las diferencias específicas incluyen a las diferencias de los coeficientes de sedimentación de las principales proteínas del plasma. Los peces tienen bajos niveles de proteína de plasma comparados con los vertebrados superiores. Las principales proteínas del plasma sanguíneo del pez son la albúmina (que controla la presión del pez), las globulinas (uniones hemo), la ceruloplasma (que se liga al cobre), el fibrinógeno (coagula la sangre) y el ioduroforino (único en los peces, que liga al yodo inorgánico).

La sangre de los peces, al igual que los demás vertebrados, consta de dos partes: una fluida y otra sólida, la parte fluida se compone de plasma en donde las partes sólidas (células) están suspendidas y son transportadas, las células rojas (eritrocitos) y blancas (linfocitos y leucocitos) (Eckert, 1997).

7.5 Glóbulos rojos

Se han encontrado eritrocitos nucleados y de color amarillo rojizo en la sangre de todos los peces a excepción de tres especies pequeñas del Antártico. Los glóbulos rojos maduro de los peces tienen forma oval, son pequeños y su diámetro mayor queda comprendido entre las 7 micras en muchos peces.

El transporte del oxígeno en la sangre depende del compuesto de hierro, la hemoglobina, que es el pigmento respiratorio de la sangre.

El contenido de hemoglobina, en la sangre del pez varía de acuerdo al número de eritrocitos presentes (Eckert, 1997).

7.6 Formación de la Sangre

En las primeras etapas embriológicas de los peces se diferencian los vasos sanguíneos y a partir de éstos, las células sanguíneas. En el adulto pueden aún ser formadas a partir de los tegumentos de los vasos sanguíneos, pero aparecen otros centros formadores de células sanguíneas. Las diferentes clases de células sanguíneas se forman en el bazo donde también son destruidas. Se ignora si otros órganos también tienen la función de destruir los elementos sanguíneos (Eckert, 1997).

8- Micronúcleos

Los micronúcleos (MN) son fragmentos cromosómicos o cromosomas completos que no son incorporados en el núcleo hijo durante la división celular apareciendo en la célula hija como núcleos secundarios pequeños, debido a un rompimiento cromosómico o a la no disyunción de los cromosomas por

interferencia o mal funcionamiento del huso mitótico. (Evans et al., Cols., 1959 Matter y Schmid, 1971; Heddle, 1973; Yamamoto y Kikuchi, 1980).

El ensayo de Micronúcleos, detecta potencialmente agentes clastogénicos y aneuploidogénicos. Los primeros inducen rompimientos cromosómicos mientras que los segundos afectan la distribución regular de los cromosomas en mitosis. Sin embargo, el ensayo no permite caracterizar la naturaleza del tipo de daño nuclear inducido, cualquiera que sea el agente utilizado (Schmid, 1975). Los (MN) son fácilmente detectados en células en interfase como cuerpos intra citoplasmáticos libres (Hogstedt, 1984), por lo que permite medir la frecuencia con la cual los cromosomas o fragmentos cromosómicos se pierden en el citoplasma durante la división celular (Heddle, 1973; Schmid, 1975; Eastmond y Tucker, 1989). Debido a su gran confiabilidad, junto con su gran simplicidad y rapidez, con respecto a otras pruebas citogenéticas, esta prueba es un indicador cuantitativo de rompimiento cromosómico, la cual ha sido validada en más de 100 compuestos químicos genotóxicos y/o carcinogénicos usando varios sistemas biológicos como los cultivos de fibroblastos, hepatocitos, linfocitos, mielo y eritroblastos de animales tanto *in vivo* como *in vitro*. (Schmid, 1975; Schmid, 1976; Ma, 1979; Tates y cols., 1980, De kok y cols., 1985; Nassi et al., 1987).

8.1 Tipos y Formas en que se inducen los MN

Muller y Streffer (1994) propusieron 4 diferentes modelos para la formación de MN, en los cuales se involucran clastogenicidad o rompimiento del DNA.

A) Fragmentos acéntricos

Son fragmentos que al carecer de un centrómero y su cinetocoro no pueden unirse a las fibras del huso mitótico, lo que impide que se integren al núcleo principal y forma MN. Estos fragmentos son originados por clastogenicidad.

B) Cromosomas multicéntricos

Son cromosomas conectados en varios puntos con las fibras del huso que se desplazan hacia polos opuestos, lo que impide el movimiento de las cromátidas hacia el núcleo principal, quedando fuera de éste; los cromosomas se originan por rompimientos y reunión de fragmentos.

C) Daño al cinetocoro

El cinetocoro es necesario para que las cromátidas se unan a las fibras del huso, guiándose a los polos opuestos de las células hijas. Al sufrir daño el cinetocoro la cromátida no puede integrarse dentro de su correspondiente núcleo.

D) Daño al aparato mitótico

Al dañarse el aparato mitótico se impide la distribución normal de los cromosomas hacia los nuevos núcleos. Estudios realizados con colcemid y colchicina demuestran que los MN generados contienen uno o más cinetocoros lo que sugiere que contienen cromosomas completos lo cual representa un evento aneuploidogénico (Muller et al., 1994).

Justificación

En este trabajo, se implementaron metodologías que permitan estimar el daño genotóxico que causa el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en la carpa *Carasius auratus* y valorar su eficiencia como organismo biomonitor en cuerpos de agua dulce contaminados con este metal ya que nos interesa disponer de baterías de pruebas para evaluar la presencia de agente genotóxicos en cuerpos de agua (debido al del desarrollo industrial y la ineficiencia de la protección al ambiente) aplicada a estudios de campo.

En este trabajo se evaluaron 2 parámetros: la genotoxicidad en el tejido hematopoyético y en el branquial y se determinó la concentración de cromo en branquias.

Hipótesis

El dicromato de potasio inducirá la formación de MN en el tejido hematopoyético y branquial de *C. auratus*. Esta inducción estará correlacionada con la cantidad de cromo acumulada en el tejido branquial, y con la dosis de tratamiento.

Objetivos

General:

Con base en la información anterior, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el daño genotóxico inducido por dicromato de potasio en eritrocitos y epitelio branquial de *C. auratus*

Particulares:

1. Evaluar la inducción de MN inducida por el dicromato de potasio en tejido hematopoyético y tejido branquial.
2. Cuantificar la concentración de cromo en tejido branquial.
3. Correlacionar la inducción de Mn en tejido branquial con la concentración de cromo en branquias.

Diseño Experimental

Ver apéndice A

1.-Aclimatación de los peces:

Las carpas *Carassius auratus* fueron obtenidas del criadero Eusebio Jáuregui el cual se encuentra Cuautla Morelos. Los peces se aclimataron en peceras de fibra de vidrio, con oxigenación constante, se mantuvieron a temperatura ambiental entre 25 y 30° y a fotoperíodos naturales.

2.- Tratamientos de los peces

Se utilizaron cuatro peceras, en las cuales se vertió dicromato de Potasio $K_2Cr_2O_7$ (Sigma, St. Louis, MO) a concentraciones finales de (0, 25, 50 y 100 ng/ml), cada pecera contenía 10 carpas, 5 carpas de cada pecera fueron sacrificadas los tres primeros días y las 5 restantes hasta el séptimo día para (este protocolo se tomo de Al-Sabti, 1986b). Las branquias destinadas a el ensayo de MN se fijaron y tiñeron para poder ser analizadas al microscopio. Para medir la concentración de cromo, las branquias fueron guardadas en nitrógeno líquido despues de sacrificar al organismo.

Las carpas se alimentaron con comida para peces rica en proteínas. (Figura 9).

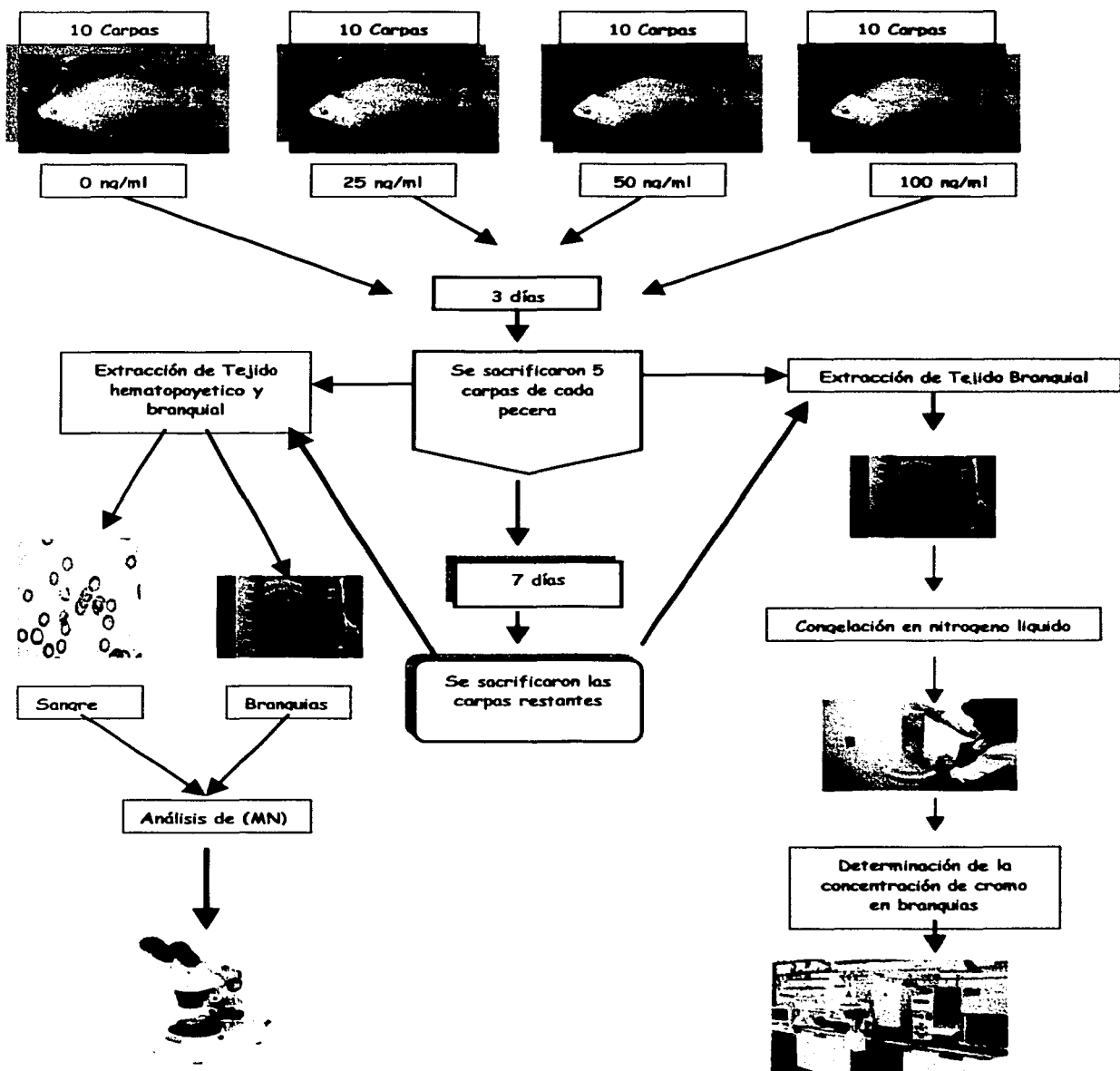


Figura 9. Diseño experimental empleado para la evaluación del efecto genotóxico del dicromato.

3.- Obtención de sangre y células branquiales

Se quitó el opérculo y se cortó cada arco branquial, separando con cuidado cada lámina de las branquias procurando que no tuvieran tejido cartilaginoso. Se extrajeron muestras de sangre de cada carpa, en las que se realizaron frotis en portaobjetos limpios.

Tratamiento de las muestras

1.- Determinación de (MN) en branquias y eritrocitos.

Las láminas branquiales se colocaron en vidrios de reloj en unas gotas de acetato de sodio al 1%. Se cortaron finamente hasta disgregarlas en una suspensión celular. Se tomó la suspensión celular con una pipeta Pasteur y se colocó en tubos cónicos conteniendo un volumen equivalente de fijador (metanol:ácido acético glacial, 3:1), para su centrifugación por 5 minutos (1000 rpm.). Después de la centrifugación se extrajo el sobrenadante, para agregar más fijador. Las células se resuspendieron para evitar la formación de agregados y se volvieron a centrifugar para realizar un último lavado. La pastilla celular se resuspende en fijador fresco y se depositan unas gotas en portaobjetos limpios. Se controla la calidad de las preparaciones en un microscopio. Los portaobjetos conteniendo el material branquial se dejaron secar al aire por 24 hr. Después de este tiempo se procedió a teñir las preparaciones mediante la tinción de Feulgen (1914). Este proceso consistió en hidrolizar cada laminilla con ácido clorhídrico 1 N a temperatura ambiente por 5 min, luego a 60° C por 10 min, se lavó con agua destilada durante 5 min y se trató con el reactivo de Schiff durante 1 hr, se enjuagó con agua corriente y se contratiñó con verde rápido por 10 s, para finalmente lavar con agua corriente y secar al aire.

Los frotis de sangre se fijaron en metanol por 5 minutos y se dejaron secar al aire. Posteriormente se tiñeron con el colorante de Wright de 1 a 3 minutos y se diferenciaron en una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 por 10 minutos y se lavaron con agua corriente para dejar secar al aire.

Determinación de la concentración de cromo en branquias

El homogenado branquial fue digerido con 4 ml de peróxido de hidrógeno al 50% y 4 ml de ácido nítrico concentrado para degradar todas las partículas orgánicas. Las muestras se colocaron en una parrilla (500°C) hasta evaporación. Después el residuo inorgánico se disolvió en 2 ml. de ácido clorhídrico al 1.5%, se aforó a 10 ml. con el mismo ácido y cada solución se filtró y se congeló a -20°C hasta su determinación en un espectrométero de absorción

atómica (IL 257, 0.05ppm) mediante el uso de una flama de óxido nitroso-acetileno y a una longitud de onda de $\lambda = 357.9$ nm. Estas determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Química Analítica del Instituto de Geofísica bajo la supervisión de la Dra. María Aurora Armienta Hernández.

Análisis de la frecuencia de Mn

Se analizaron 3000 células de cada lamina de tejido branquial y hematopoyético y se calculó la frecuencia de células micronucleadas multiplicada por 1000 células.

Análisis estadístico de los datos

Una vez revelados los códigos, se obtuvieron promedios, desviaciones estándares y errores estándares de los datos colectados a 3 y 7 días para cada concentración. Para realizar el análisis de varianza mediante una prueba paramétrica, se hizo una transformación de raíz cuadrada a los datos originales, mediante el programa Sigma Stat (1955). El nivel de significancia se situó en $p \leq 0.05$, cuando se observaron diferencias significativas se realizó una prueba *post hoc* de Dunnett (1955).

Resultados

Todos los peces llegaron vivos y aparentemente sanos al término de la exposición.

Eritrocitos

Se observó una tendencia a incrementar la proporción de células micronucleadas en las concentraciones más altas de 50 ng/ml y 100 ng/ml (Tabla IV) sólo en los organismos examinados después de 3 días de tratamiento. En los organismos sacrificados a los 7 días la tendencia de Mn fue aún menor. No se observaron los efectos genotóxicos esperados del Cr (VI) en los eritrocitos. []

Tabla IV Frecuencia de Mn inducida por Cr (VI) en tejido hematopoyético de *Carassius auratus*.

Frecuencia de MN / 1000		
CONCENTRACIÓN Cr (VI) ng/ml	3 Días	7 Días
	PROMEDIO ± ² ee	PROMEDIO ± ee
0	0±0	0±0
25	0±0	0.2 ± 0.08
50	0.260± 0.123	0.06± 0
100	0.328± 0.246	0 ± 0

ee: error estándar

Tejido Branquial

A diferencia de lo observado en los eritrocitos, en el tejido branquial hubo una clara inducción de genotoxicidad a los tres días en los 3 2, figura 1). La frecuencia de MN en los las branquias de los organismos tratados tratamientos (tabla prácticamente se triplicó. El análisis de varianza y la prueba *post hoc* de Dunnett demostraron que los tres grupos experimentales difirieron significativamente del testigo. A los siete días, hubo una ligera inducción pero las diferencias no fueron significativas (tabla V y Figura 10 y 11).

Tabla V Frecuencia de MN en tejido Branquial

Frecuencia de MN / 1000		
CONCENTRACIÓN Cr (VI) ng/ml	3 Días	7 días
	Promedio±ee	Promedio±ee
0	0.331 ± 0.170	0.493 ± 0.392
25	1.168 ± 0.175*	0.917 ± 0.137
50	0.893 ± 0.370*	0.61 ± 0.27
100	1.36 ± 0.814*	0.814 ± 0.35

**ANOVA de una sola vía p=0.0252, prueba de Dunnett p<0.05.

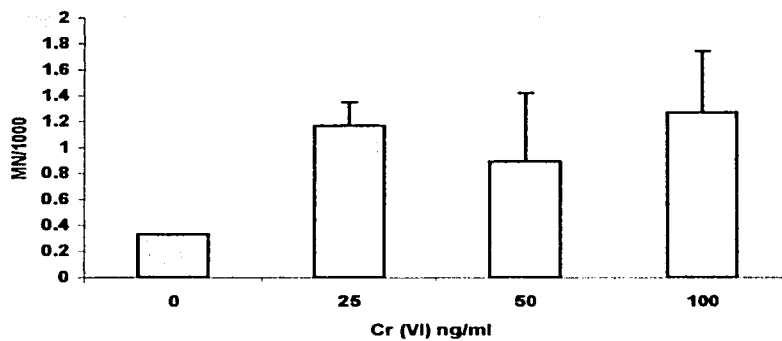


Figura 10. Frecuencia de Mn en tejido branquial a los 3 días de exposición

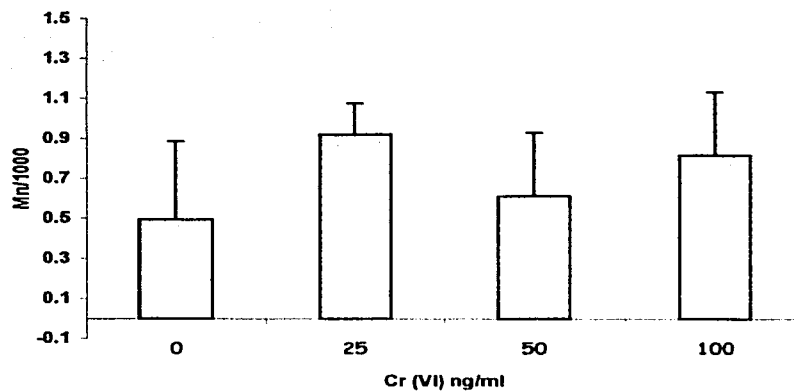


Figura 11 Frecuencia de Mn en tejido branquial a los 7 días de exposición

Concentración de Cr (VI) en tejido branquial

La cantidad de cromo detectado en las branquias aumentó de manera proporcional a la concentración de la exposición, sin embargo no encontramos una correlación positiva entre este biomarcador y la presencia de MN en ninguno de los dos tiempos de tratamiento. (Tabla VI) En los organismos sacrificados después de 3 días de exposición si observamos una correlación positiva entre la cantidad de cromo en el agua y la frecuencia de Mn en el tejido branquial ($r=0.5536$, $p=0.0212$).

(Tabla VI) Concentración de Cr (VI) en tejido branquial

Cr (VI) ng/ml	3 días	7 días
	Promedio ± ee	Promedio±ee
0	569.94 ± 474.194	391 ± 139.143
25	566.71 ± 360.539	455.62 ± 42.542
50	638.28 ± 241.507	239.05 ± 72.435
100	947.30 ± 476.348	562.73 ± 115.192

Discusión

La contaminación acuática por la disposición inadecuada de desechos sólidos, por sus lixiviados o por la contribución de los efluentes de industrias que no poseen sistemas de tratamientos de agua, es una realidad que se presenta tanto en países industrializados como no industrializados.

El biomonitoreo del agua es una estrategia que nos permite conocer la biodisponibilidad de estos contaminantes así como sus efectos. Los peces son habitantes naturales de los ecosistemas acuáticos y pueden servir como modelos experimentales para el biomonitoreo. La determinación de efectos genotóxicos en estas especies constituye una indicación de efectos severos sobre esta y otras especies, así como para el hombre.

El ensayo de MN es un sistema ideal para monitorear la presencia de genotóxicos en el agua. El tejido hematopoyético y el branquial pueden utilizarse en esta metodología. El primero es más comúnmente usado porque se pueden tomar muestras repetidas y no requiere del sacrificio del animal como ocurre cuando se utiliza el tejido branquial. Sin embargo, de acuerdo a nuestros resultados y a similares estudios realizados por otros grupos la sensibilidad de ambos tejidos no es igual.

Los resultados mostraron que el tejido branquial es más sensible a la inducción de MN por el dicromato de potasio que los eritrocitos, esto se puede deber a que el cromo se incorpora inicialmente a las células branquiales donde es reducido a cromo (III) de manera endógena, que es la forma que interactúa con el ADN (De Flora, et al., 1987; De Flora y Wetterhahn, 1989; Kerger et al., 1996). El Cromo hexavalente en contraste con el cromo trivalente puede llegar a asociarse con los glóbulos rojos y el plasma de una manera más rápida e irreversible, pero en su forma reducida ya no puede entrar a los tejidos por su baja solubilidad, lo cual podría explicar que no haya una inducción significativa de Mn en sangre, si el compuesto fue metabolizado en branquias y no llega o lo hace en cantidades reducidas a los tejidos hematopoyéticos (Gray y Sterking, 1950; Wiegand et al., 1988). Efectos similares han sido observados por Hayashi et al., (1998) quienes pudieron demostrar efectos genotóxicos en las branquias de especies del mismo género, a concentraciones más bajas que las necesarias para inducir MN en los eritrocitos.

Las branquias constituyen probablemente el órgano inicial de exposición para sustancias disueltas en el agua, por ello están expuestas más directamente a cantidades mucho mayores de tóxicos que los pulmones de un animal terrestre (Hayashi et al 1998). Ello, porque constituyen no sólo un órgano respiratorio,

sino que también cumplen funciones de osmorregulación, características que facilitan la absorción de sustancias ya que se comportan de manera similar a las que se presentan en los epitelio de los órganos de intercambio y absorción de los animales terrestres.

La mayor inducción de MN se observó al tercer y no al séptimo día, es importante recordar que el Cr (VI) se agregó al inicio del experimento, por lo que es probable que el incremento de muchas sustancias orgánicas como el excremento o las partículas de comida ayudaran a una reducción más rápida del Cr VI a Cr III, ya que la forma hexavalente sólo puede persistir en este estado en aguas con bajo contenido de materia orgánica (Al Sabti, 1994). Cabe mencionar que el Cr (VI) es 300 veces más soluble que el Cr(III) (Armienta 2001), disminuyendo su biodisponibilidad y su absorción (Albert ., 1997) cuando se reduce.

Lo anterior podría explicar el hecho de que la cantidad de cromo acumulada en las branquias al séptimo día es menor que la determinada al tercer día como lo muestra la tabla VI. Ello también nos podría explicar el que no observáramos una inducción significativa de MN en las branquias de los organismos sacrificados al final del experimento.

Por otro lado, la acumulación de cromo en branquias no aumentó significativamente en los peces expuestos a ninguna de las tres concentraciones esto se puede deber a factores relacionados con la metodología ya que las concentraciones más bajas de 0 y 25 ng/ml se encontraron por debajo del límite de detección del espectrofotómetro de absorción atómica, mientras que las concentraciones de 50 ng/ml y 100 ng/ml están en el límite de detección del sistema. También es probable que parte del metal se perdiera en el momento de descongelar las muestras o que la digestión del tejido branquial para extraer el metal no fue suficiente. Consideramos que estos hechos enfatizan la sensibilidad de nuestro sistema biológico para detectar la presencia de un agente genotóxico. Nuestro biomarcador de efecto resultó de una sensibilidad mayor que la determinación analítica, ya que obtuvimos una inducción significativa de MN y se encontró una correlación positiva entre las concentraciones empleadas y la frecuencia de MN en las branquias de los organismos sacrificados al tercer día de exposición ($r=0.55$, $p=0.02$). Los peces expuestos a niveles más elevados de dicromato fueron los que mayor daño genotóxico presentaron, como era nuestra hipótesis. Por otro lado, y también de acuerdo a la frecuencia de MN observada en las branquias de los organismos sacrificados al final del experimento, se sugiere que hubo una disminución en la biodisponibilidad del dicromato por su reducción

a Cr (III) en las peceras. Otra posibilidad es que los organismos pudieron haber metabolizado el dicromato excretándolo y de esa manera reduciendo su exposición. Solís (2002) observó alteraciones en la vesícula biliar de los peces tratados con cromo y dado que este órgano secreta cromo, ello sería una indicación de que el dicromato fue absorbido para posteriormente ser excretado por los peces.

El ensayo de MN se puede adaptar fácilmente a tejidos en proliferación como ocurre con el tejido branquial, convirtiéndola en una metodología fácil de implementar en condiciones de campo. Además es una prueba de bajo costo, que no requiere de equipos caros en el laboratorio, convirtiéndola en un ensayo ideal para monitorear la presencia de agentes genotóxicos en cuerpos de agua, cuya acumulación en la cadena alimenticia puede tener efectos deletéreos en el ecosistema y en la salud humana. Otras especies de peces, renacuajos e invertebrados (De la Sienna, 2001) pueden utilizarse como indicadores o centinelas, mediante esta metodología. Aunque la determinación de la presencia de cromo en los tejidos requiere de contar con equipo más sofisticado como es un espectrofotómetro de absorción atómica.

Este trabajo nos permitió implementar una metodología para el monitoreo ambiental de agentes genotóxicos que se encuentran en el ambiente acuático que permite contar con una información relevante antes de realizar determinaciones químicas más específicas de los agentes presentes en el sitio contaminado.

Conclusiones

- *Carassius auratus* es un organismo que cumple con las características de organismo biomonitor antes mencionadas y puede ser empleado como organismo biomonitor.
- Concentraciones de 25, 50 y 100 ng/ml de dicromato de potasio indujeron Mn en las branquias de *C. auratus* sacrificadas a los 3 días de exposición, mientras que a los 7 días se observó una reducción de la genotoxicidad en este tejido.
- La reducción de la genotoxicidad pudo deberse a una disminución en la biodisponibilidad del dicromato ya que la sal se administró una sola vez y al inicio del experimento.
- No observamos un efecto genotóxico similar en eritrocitos en ninguno de los dos tiempos de exposición analizados, por lo que este tejido resulta tener una menor sensibilidad.
- Se detectó una tendencia a la incorporación de cromo en las branquias pero esta presencia no fue significativamente mayor en los organismos tratados que en los testigos y su presencia tampoco correlacionó de manera lineal ni con la concentración ni con la genotoxicidad.

Bibliografía

1. Albert, L. A. (1997) *Introducción a la Toxicología Ambiental*. Organización Mundial de la Salud. Metepec, Edo. de México, Pp 1-5 y 227-246.
2. Al-Sabti, K. (1986^a) *Clastogenic effect of five carcinogenic mutagenic chemicals on the cells of the common carp Cyprinus carpio L.*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 85C, 5-6.
3. Al-Sabti, (1986^b) *Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals*. *Cytobios.* 47, 147-154.
4. Al-Sabti, K. And J. Hardig (1990) *Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of the industrial waste products, in the Baltic sea. Sweden*. *Comp. Bioch. Physiol.*, 97C: 179-182.
5. Al-Sabti, K. (1991) *Handbook of Genotoxic Effects and Fish Chromosomes*. ISBN 86 80023-17-5. pp 230. Jozef Stefan Institute, Jamova 39, 61111 Ljubjana. Slovenia.
6. Al-Sabti, et al (1993) *Chromium-induced micronuclei in fish*. *Applied Toxicology*. Pp 333-336.
7. Al-Sabti, K., M. Franko, B Andrijanic. S. CNES and P. Stegnar (1994) *Chromium induced micronuclei in fish*, *J. Appl. Toxicol.*, 14, 333-336.
8. Anderson, R. A., Bryden, N.A., and Polansky, M.. 1996. *Lack of toxicity of chromium chloride and chromium picolinate (Abst.)*. *Toxicologist* 30:299.
9. Armienta M, A. O Morton,; Rodríguez R; Cruz O; Aguayo A, N Cenicerros. (2001) *Chromium in a Tannery Wastewater Irrigated Area, León Valley, Mexico* *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66:189-195.
10. Armienta M.A.; Rodríguez R.; Cenicerros, F.; Juárez and Cruz O (1996) *Distribution, origin and fate of chromium in soils in Guanajuato, México*. *Environmental Pollution* 391-397.
11. Artillo, A. and Melodio. F. (1988) *Effects of hexavalent chromium on the trout mitochondria*. *Toxicol. Lett.* 44, 71-76.
12. Butterworth, F. M. et al (1995) *Biomonitoring and biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press. N.Y., EUA. P. 3-6, 116-117 y 193-195.
13. Coogan, T., Squibb, K. S., Motz, J., Kinney, P. L, and Costa, M. 1991. *Distribution of chromium within cells of the blood*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 157-166.

14. Costa, M., Zhtikovich, A., and Toniolo, P. 1993. DNA-protein cross-links in welders: Molecular implications. *Cancer Res.* 53:460-463.
15. Das, R.K. and N.D. Nandan(1986) Induction of micronuclei in peripheral erythrocyte of fish *Heteropneus fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent, *Mutation Res.*, 175, 67-71.
16. De Flora, S., Badolati, G. S., Serra, D., Picciotto, A., Magnolia, M. R., and Savarino, V. 1987. Circadian reduction of chromium in the gastric environment. *Mutat. Res.* 192:169-174.
17. De Flora, S., Wetterhahn, K. E. 1989. Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chem. Rep.* 7:169-244.
18. De kok, A. J., A.D. Tates, L. Den Engelse y J.W.I. M. Simons. (1985). Genetic and molecular mechanisms of the in vitro transformation of *Syriam* hamster embryo cells by the carcinogen N-ethyl-nitrosourea. I. Correlation of morphological transformation and enhanced fibrinolytic activity to gene mutation, chromosomal alterations and lethality. *Carcinogenesis*, 6, 1565-2627.
19. De la Sienna 2001 Desarrollo de un modelo experimental para investigar genotoxicidad en un invertebrado acuatico de importancia economica, el acocil *Procamgbarus clarkii*. Tesis de Licenciatura. UNAM.
20. Dix, H. M. (1981) *Environmental Pollution Gives a wide-ranging account of the distribution and movement of pollutants in air and water.*
21. Eastmond, D.A., y Tucker, J.D. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mut.*, 13, 34-43.
22. Ecker, R. (1997) *Animal Physiology McGraw-Hill.* Madrid-España Pp 552-556.
23. Elinder, C-G Gerhardsson, L. y Oberdoerster, G. (1987). Biological monitoring of toxic metals, en: T. W. Clarkson, L. Fiberg, G. F. Norddberg y P. R. Sager (eds). *Biological Monitoring of Toxic Metals*, Plenum Press, New York. pp 1-171,
24. Evans, H. J.; G.J. Neary y F. S Williams (1959). The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gama-rays on *Vicia faba* roots an the effect of oxygen, II. Chromosome damage: the production of micronuclei, *Int J Radiat Biol.*, 3, 216-229
25. Fishbein, L (1987) *Genotoxic and Carcinogenic Metals: Environmental and Occupational Occurrence and Exposure.* Princenton Scientific Publishing Co. N. J., EUA. Pp 87-125 y 265-270.

26. Frederick, K. D. "Water as a Source of International Conflict," Resources, No. Spring 1996. Competition for water is playing an increasingly important role in international relation.
27. Galván, L (1998) Union de AND. Proteínas como indicador de exposición aguda a arsénico. Tesis de Licenciatura UNAM.
28. Gibaldi, M. y Perrir, D. (1982). Pharmacokinetics, 2da ed.,. New York, Marcel Dekker, pp 459.
29. Gray, S. J., and Sterling, K. 1950. The tagging of red cells and plasma proteins with radioactive chromium. J. Clin. Invest. 29:1604-1613.
30. Harshbarger, M.A. and J.B Clark (1990) epixotiology of neoplasms in bony fish of North America, Sci. Total Environ., 94, 1-32.
31. Hayasi M.m t. Ueda, K. Wada, N. Kinae, K. Saotome, N. Tanaka, A. Talai, Y.F. Sasaki, N. Asano, T. Sofuni e Y. Ojima, 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. Mutation Research. 399:125-133.
32. Hensley, D.A., and W.R. Courtenay, Jr. 1980 *Carassius auratus* (Linnaeus) Goldfish. Page 147 in D.S. Lee, C.R. Gilbert, C.H. Hocutt, R.E. Jenkisns, D.E. McAllester, and J.R. Stauffer, Jr. Atlas of North American Fresh Water Fishes. Publication #1980-12 of the North Carolina Biological Survey. North Carolina State Museum of Natural History.
33. Heddle, J.A. (1973). Arapid in vivo test for chromosomal damage. Mutat. Res., 18: 187-190.
34. Hooftman, R. N. and W.K, de Raat (1982) Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in peripheral blood erythrocytes of Eastern mudnimmow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate, Mutation Res., 104, 147-152.
35. Hose, J.E., J.N. Cross, S.G. Smith and D. Dich (1987) Elevated circulating erythrocyte micronuclei in dishes from contaminated sites off Southern California. Marine Environ. Res. 22. 167-176.
36. Hughes. J.B. and AT hebert (1991) Erythrocyte micronuclei in winte flounder (*Pseudopleur omectes amencamus*). Result of field surveys during 1980 - 1988 from Virginia to Nova Scotia and in Long Island soun. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 20 474-479.
37. Kerger, b, Paustenbach, D., Corbett, G., and Finley, B. 1997. Absorption and elimination of trivalent and hexavalent chromium in humans following ingestion of a bolus dose in drinking water. Toxicol. Appl. Pharmacol. 141.

38. Klassen, C. D. y Eaton, D. L. (1991). Principles of Toxicology, en: Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of Poisons, M. O. Amdour, J. Doull y C. D. Klassen (Eds.), Pergamon Press 4ta ed. ew York, U.S.A., pp12-49.
39. Kotás J, Stasicka Z (2000) Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. Environ Pollut 107: 263-283.
40. Kundu, R., Lakshmi, R. And Mansuri, A. P. (1992) The entry of mercury to mudskipeer, *Boleophthalmus dentatus* (Cuv. Et Val.): Part I. Changes in the activity of ATPases in gills. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 18, 605-611.
41. Kundu. R., Lakshmi, R. and Mansuri, A.P. (1995) Effects of Cr(VI) on ATPases in the brain and muscle of mudskipper, *Boleophthalmus dentatus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 55, 723-729.
42. Land, H., Parada, L. F. Weinberg, R. A. (1983). Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science, 222, 771-778.
43. Landis W. Et al (1995) Introduction to Environmental Toxicology. Lewis Publisher. F. E.U.A. Pp 197-204.
44. Lewalter J., Korallus, U., Harzdorf, C., and Weidemann, H. 1985. Chromium bond detection in isolated erythrocytes: a new principle of biological monitoring of exposure to hexavalent chromium. Int. Arch. Occup. Environ. Health 55:305-318.
45. Ma, T.H. y Rossman, T.G. (1979). Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. Molec. Toxicol., 2, 1-9.
46. Matter, B., W. Schmid. (1971). Trenimon induced chromosomal damage in bone marrow cells of six mammanian species, evaluated by the micronucleous test. Mutat Res., 12, 417-425.
47. Metcalfe. C.D. (1988) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*), bull. Environ. Contam. Toxicol., 40, 489-495.
48. Muller U V and Streffer C (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxidee in carcinogenesis. Mutat Res 305: 253-264.
49. Nassi, L., B. Epe, D. Schiffmann, E. Adam, A. Beinhauer y a. Griesbeck (1987). Induction of morphological transformation and micronuclei in *Syriam hamster* embryo fibroblasts by 1,2 dioxetanes. Correlation with DNA single strand breaks in HL-60 cells. Carcinogenesis, 8: 947-953.

50. Nath, K. and kumar, N. (1987) effects of hexavalente chromium on the carbohydtate metabolism of a freshwater tropical teleost *Colisa Fasciatus*. Bull. Inst. Zool. Acad Sin. (Taipei) 26, 245-248.
51. NCR (1989). National Research Council. Biological Markers in Reproductive toxicology, Comission on Life Sciences, National Academic Press, Washington, D. C., pp 15-29.
52. NCR (1992). National Research council. Commission on Life Sciences, Board on Environmental Studies and Toxicology, Subcommittee on Immunotoxicology committee on biological Markers. Biological, Markes in Immunotoxicology, National Academic Press, Washington, D. C., Pp 68 -71.
53. Olson, K. R., Bergman, H.L. and fromm, P.O. (1973) Uptake of methylmercuric chloride and mercuric chloride by trout: a study of uptake pathways into the whole animal and uptake by erythrocytes in vitro. J. Fish, Res. Board Can. 30, 1293-1299.
54. Ottenwaelder, H., and Wiegand, H.J. 1988. Uptake of 51 Cr (VI) by human erythrocytes: Evidence for a carrier - mediated transport mechanism. Sci. Total Environ. 71:561-566.
55. Petrocelli, D.R. 1985. Chronic Toxicity Tests, In Fundamentals of Aquatic Toxicology. G.M. Rand and S. R. Petrocelli, Eds., Hemisphere Publishing Corporation, Washintong, D. C., pp 96-109.
56. Powers, D.A. (1989) Test for predicting carcinogenicity in fish. CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences, Vol. 1. CRC Press Inc. pp. 111 - 129.
57. Raven, P., L. Berg, G Johnson. 1997. Enviroment. 2nd Saunders College Publishing. USA. pp. 272-302.
58. Richard F.C., Bourg ACM (1991) Aqueous geochemistry of chromium a review Wat Res 25:807-816.
59. Schmid, W. (1976). The micronucleus test cytogenetic analysis. In Chemicall Mutagens: Principle and Methodos for their detection, Vol 4, A. Holleander ed Plenum Press, New York, 31.
60. Schmid, W. (1975). The micronucleus test. Mutation Res., 31, 9-15.
61. Shultz, N., L. Norgren. J. Grawe. A. Hohannisson and O Medhage (1993) Micronulei frequency in circulating erythrocytes from rainbow trout (*Oncorhyndus mykiss*) subjected to radiation, an mage analysis and flow cytometric study. Comp. Biochem. Physiol. 105 C 207 -211.

62. Skerfving, S., K. Hansson, C. Mangs, J. Lindsten and N Ryman (1974) Methylmercury-induced chromosomal damage in man. *Environmental Research*, 7, 83-89.
63. Stegeman, J.J. And J.J. Lech (1991) Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen and pollutant exposure, *Environ. Health Persp.*, 90 101-109. Washburn, P. C. and R. T. Di Giulio (1989) stimulation of uperoxide production by nitrofuraption. P-nitrobenzoic acid an m-dinitrobenzene in hepatic microsomes of three especies of f Weis. J.s. and P. weis (1989) Effects of environmental pollutants on early fish development. *CRC Rev. Aquatic. Sci.*, 45 -74.
64. Suagden, K. D. (1992) Oxygen radical-mediated DNA damage by redox. Active Cr (III) complexes. *Biochemistry*. 31: 11626-11631.
65. Sugiyama, M (1991) Effects of vitamins on chromium (VI)-induced damage. *Environmental Health Perspectives*. Vol 92. Pp 63-70.
66. Tates, A:D., I. Meuteboom, M. Hofke y L. den Engels. (1980). A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes in rat liver in vivo. *Mutat Res.*, 74, 11-22.
67. Ueda, T., M. Hayashi, Y. Ohtsuka, T. Nakamura, J. Kobayashi and t. Sofuni (1992) A preliminary study of the micronucleus test by acridin orange fluorescent staining compared with chromosomal aberrrtion test using fish erythropoietic and embryonic cells, *Water Sci. Tech.*, 25(11), 235-240.
68. Walker H, S.P Hopkin, R.M. Sibly and D. B. Peakall 1996 *Principiules of ecotoxicology U. S. A 1996 Taylor and Francis Edit p.p 46.*
69. Wasbburn, P.C. and R.T. di Guilio (1989) Stimulation of uperoxide production by nitrofurantion. p-nitrobenxoic acid and m-dinitrobenzene in hepatic microsomes of three especies of freshwater fish, *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, 171-180.
70. Wedrychowski, A. Et la (1985) Chromium-induced cross-linking of nuclear proteins and DNA. *Biological Chemistry*. Vol 260 No 7 pp 3370-3376.
71. WHO (1985). *Guidelines for the study of genetic effects in human populations*, *Environ. Health Criteria* 46,
72. WHO. (1990) *Environmental health criteria for methylmercury*. *Environmental Health Criteria* 101. pp. 144. Geneva.

73. Wiegand, H. S.; Ottenwalder, H., and Bolt, H. M.: 1988 Recent advances in biological monitoring of hexavalent chromium compounds. *Sci. Total Environ* 71: 309 - 315.
74. Yamamoto, K.; Ito, Y., Kikkuchi. (1980). A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Res.*, 71, 127-131.
75. Yang, J.H., P.T. Kistechi. E. J. Calabroco and L. A. Baldwin (1990) Induction of peroxisome proliferation in rainbow trout exposed to ciprofibrate. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 104, 476-482.

Apéndice A

A) Equipo y Material

- Balanza analítica.
- Baño de agua.
- Centrífuga.
- Contador.
- Estilete.
- Koplín.
- Microscopio.
- Pinzas.
- Pipetas Pasteur.
- Porta y cubreobjetos.
- Reloj.
- Termómetro.
- Tijeras de preferencia chicas.
- Tubos de centrifugación de 15ml.
- Vidrios de reloj o recipiente similar.

B) Material biológico

40 Carpas *Carassius auratus*, con una longitud promedio de 12.7 a 25.4 cm y un peso promedio de 33.3 gramos.

C) Reactivos

- Ácido Acético 25%.
- Ácido clorhídrico 1N.
- Carbón activado.
- Citrato de sodio.
- Etanol.
- Fosfato dibásico de Sodio.
- Fosfato monobásico de potasio.
- Fucsina básica (SIGMA) CAS.
- Metabisulfito de sodio o potasio de Bisulfito de sodio anhidro.
- Metanol 75%.

Apéndice B
Sangre 3 días

Controles	Mn	Mn/1000	Totales
C1	0	0	3150
C2	0	0	3222
C3	0	0	3107
C4	0	0	3247
C5	0	0	3008
suma	0	0	15734
Promedio	0	0	
sdv	0	0	
ee		0	
Tratamiento Ng/ml	Mn	Mn/1000	Totales
[25] 1	0	0	3006
[25] 2	0	0	3116
[25] 3	0	0	3007
[25] 4	0	0	3119
[25] 5	0	0	3026
suma	0	0	15274
promedio	0	0	
sdv	0	0	
ee		0	
Tratamiento Ng/ml	Mn	Mn/1000	Totales
[50] 1	1	0,33233632	3009
[50] 2	0	0	3028
[50] 3	0	0	3001
[50] 4	1	0,31269543	3198
[50] 5	2	0,65897858	3035
suma	4	1,30401034	15271
promedio	0,8	0,26080207	
sdv	0,836660027	0,27495002	
ee		0,1229	
Tratamiento Ng/ml	Mn	Mn/1000	Totales
[100] 1	1	0,32992412	3031
[100] 2	0	0	3133
[100] 3	0	0	3203
[100] 4	3	0,98392916	3049
suma	4	1,31385327	12416
promedio	1	0,32846332	
sdv	1,414213562	0,46382968	
ee		0,2627	

Apéndice C
Sangre 7 días.

Control	Mn	Mn/1000	Totales
C1	0	0	3112
C2	0	0	3016
C3	0	0	3222
C4	0	0	3062
C5	0	0	3043
suma	0	0	15455
promedio	0	0	
sdv	0	0	
e.e		0	
Tratamiento	Mn	Mn/1000	Totales
Ng/ml			
[25] 1	0	0	3043
[25] 2	1	0,32916392	3067
[25] 3	1	0,3298153	3028
[25] 4	0	0	3008
[25] 5	1	0,33036009	3038
suma	3		15184
promedio	0,6	0,2	3036,8
sdv	0,54772256	0,14774	
e.e		0,44	
Tratamiento	Mn	Mn/1000	Totales
Ng/ml ⁻¹			
[50] 1	0	0	3032
[50] 2	1	0	3132
[50] 3	0	0	3027
[50] 4	0	0	3037
[50] 5	0	0	3009
suma	1	0	15237
promedio	0	0	
sdv	0	0	
e.e		0,66	
Tratamiento	Mn	Mn/1000	Totales
Ng/ml			
[100] 1	0	0	3099
[100] 2	0	0	3058
[100] 3	0	0	3116
[100] 4	0	0	3017
[100] 5	0	0	3043
Suma	0	0	
promedio	0	0	
Sdv	0	0	
e.e		0	

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Apéndice D
Branquias 3 días

Controles	Mn	Mn/1000	Totales
C1	0	0	3019
C2	2	0,6646727	3009
C3	1	0,3274394	3054
C4	1	0,3332223	3001
C5	1	0,3310162	3021
Suma	5		
dvs		0,2350083	
Promedio		0,3312701	
ee			
	Mn	Mn/1000	Totales
[25] 1	4	1,3223141	3025
[25] 2	4	1,3275805	3013
[25] 3	2	0,6071645	3294
[25] 4	5	1,6469038	3036
[25] 5	3	0,9386733	3196
Suma	18		
dvs		0,4017939	
Promedio		1,1685273	
ee			
	Mn	Mn/1000	Totales
[50] 1	2	0,6607202	3027
[50] 2	2	0,6033183	3315
[50] 4	6	1,9821606	3027
[50] 5	1	0,3266906	3061
Suma	11		
dvs		0,7404607	
Promedio		0,8932224	
ee			
	Mn	Mn/1000	Totales
[100] 3	2	0,6607202	3027
[100] 4	7	2,1895527	3197
100) 5	3	0,9545021	3143
Suma	12		
dvs		0,8112734	
Promedio		1,2682583	

Apéndice E
Branquias 7 días

Controles	Mn	Mn/100	totales
C1	0	0	3053
C2	0	0	3008
C4	5	1,64636154	3037
C5	1	0,33333333	3050
Suma	6		12148
Promedio		0,78354312	
dvs		0,49492372	
ee			
Tratamiento	Mn	Mn/1000	Totales
Ng/ml	Mn	Mn/1000	Totales
[25] 1	2	0,66644452	3001
[25] 2	2	0,64536947	3099
[25] 3	3	0,98199673	3055
[25] 4	4	1,31147541	3050
[25] 5	3	0,98264003	3053
Suma	14		15258
Promedio		0,91758523	
dvs		0,2741822	
ee			
Tratamiento	Mn	Mn/1000	Totales
Ng/ml	Mn	Mn/1000	Totales
[50] 1	0	0	3467
[50] 3	0	0	3082
[50] 4	4	1,32669983	3015
[50] 5	2	0,65659882	3046
Suma	6		12610
Promedio		0,49582466	
dvs		0,63453029	
ee			
Tratamiento	Mn	Mn/1000	Totales
Ng/ml	Mn	Mn/1000	Totales
[100] 1	1	0,33036009	3027
[100] 2	0	0	3005
[100] 3	5	1,64744646	3035
[100] 4	5	1,43102461	3494
[100] 5	2	0,66225166	3020
Suma	13		15581
Promedio		0,81421656	
ee			
dvs		0,70620168	
C5, C3, (50)2 no hay laminas			

Apendice F

Concentración de Cr en agua 3 días

Tratamiento	Concentración		Peso de la branquia		ppm/gr
	Mg/L	µg/L	mg	mg/µg/L	
C1	1.07	1070	1.2	891.6666667	0.891666667
C2	0.32	320	1.2	266.6666667	0.266666667
C3	1.26	1260	1.2	1050	1.05
C4	5.35	5350	1.3	4115.384615	4.115384615
C5	0.1	100	1.4	71.42857143	0.071428571
[25] 1	0.24	240	1.2	200	0.2
[25] 2	0.31	310	1.5	206.6666667	0.206666667
[25] 3	0.24	240	1	240	0.24
[25] 4	0.25	250	1.4	178.5714286	0.178571429
[25] 5	2.41	2410	1.2	2008.333333	2.008333333
[50] 1	0.13	130	1.12	116.0714286	0.116071429
[50] 2	0.49	490	0.842	581.9477435	0.581947743
[50] 3	0.42	420	1.119	375.3351206	0.375335121
[50] 4	1.16	1160	0.869	1334.867664	1.334867664
[50] 5	0.22	220	0.843	260.9727165	0.260972716
[100] 1	0.81	810	0	810	0.81
[100] 2	0.62	620	0.949	653.3192835	0.653319283
[100] 3	2.56	2560	1.083	2363.804247	2.363804247
[100] 4	0.37	370	0.957	386.6248694	0.386624869
[100] 5	0.34	340	0.882	385.4875283	0.385487528

Apendice 6
Concentración de Cromo en agua 7 días

Tratamiento	Concentración		Peso de la branquia		ppm/gr
	Mg/L	$\mu\text{g/L}$	mg	mg/ $\mu\text{g/L}$	
C1	0.16	160	0.5	320	0.32
C2	0.06	60	1	60	0.06
C3	0.54	540	0.6	900	0.9
C4	0.28	280	0.7	400	0.4
C5	0.22	220	0.8	275	0.275
[25] 1	0.61	610	1	610	0.61
[25] 2	0.25	250	0.5	500	0.5
[25] 3			0.4		
[25] 4	0.27	270	0.8	337.5	0.3375
[25] 5	0.3	300	0.8	375	0.375
[50] 1	0.28	280	0.7	400	0.4
[50] 2			1.2		
[50] 3	0.14	140	0.9	155.5555556	0.155555556
[50] 4	0.25	250	0.5	500	0.5
[50] 5	0.22	220	0.6	366.6666667	0.366666667
[100] 1	0.26	260	0.6	433.3333333	0.433333333
[100] 2	0.13	130	0.5	260	0.26
[100] 3	0.23	230	0.5	460	0.46
[100] 4	0.71	710	0.9	788.8888889	0.788888889
[100] 5	0.61	610	0.7	871.4285714	0.871428571