

Los embriones de pez cebra *Danio rerio*: un modelo animal en la ecotoxicología

Zebrafish embryos *Danio rerio*: an animal model in ecotoxicology

Román Espinosa Cervantes,¹ María Teresa Medrano Ramírez²
y Adelfa del Carmen García Contreras¹

Resumen. *Una gran cantidad de compuestos químicos (metales pesados, disruptores endocrinos, pesticidas y fármacos), relacionados con actividades antropogénicas causan daño al medio ambiente y a los organismos. Muchos de estos compuestos no son completamente eliminados en las plantas de tratamiento de aguas residuales, incluso algunos de ellos son liberados al medio ambiente acuático natural, provocando problemas ecotoxicológicos y de salud pública. Actualmente, en la investigación toxicológica se ha usado al pez cebra en sus distintos estadios de desarrollo, desde embrión hasta adulto, para evaluar la toxicidad y la teratogenicidad potencial de estos compuestos químicos. Investigaciones recientes han propuesto que los embriones del pez cebra responden a los compuestos tóxicos como lo hacen los mamíferos, debido a su similitud en desarrollo embrionario, metabolismo, fisiología y vías de señalización. En el documento se hace una revisión sobre los efectos que provocan algunos compuestos tóxicos en embriones de peces cebra, como un modelo animal para estudios ecotoxicológicos.*

Palabras clave: *pez cebra, teratogénico, ecotoxicológico, metales pesados, fármacos.*

Abstract. Many chemical compounds (heavy metals, endocrine disruptors, pesticides, and drugs) related to anthropogenic activities cause damage to the environment and organisms. Many of these compounds are not eliminated in wastewater treatment plants and some of them are released into the natural aquatic environment, causing ecotoxicological and public health problems. Currently, toxicological research has used zebrafish at its various stages of development from embryo to adult to assess the toxicity and po-

¹ Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, e-mail: espinosa@correo.xoc.uam.mx

² Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

tential teratogenicity of these chemical compounds. Recent research has proposed that zebrafish embryos responded to toxic compounds as mammals do because of their similarity in embryonic development, metabolism, physiology, and signaling pathways. The document reviews the effects of some toxic compounds in zebrafish embryos, as an animal model for ecotoxicological studies.

Keywords: zebrafish, teratogenic, ecotoxicological, heavy metals, drugs.

INTRODUCCIÓN

Los avances en la medicina, la agricultura y la alimentación humana han permitido el uso de una gran diversidad de compuestos bioactivos (usados para desarrollar fármacos y suplementos dietéticos) y compuestos químicos, potencialmente útiles, sin embargo, estos compuestos tienen efectos secundarios y provocan contaminación ambiental (Dubińska-Magiera *et al.*, 2016). Se ha estimado que aproximadamente 1.6 millones de niños mueren al año en el mundo debido a la contaminación del agua (Hussain *et al.*, 2019). Los principales productos que se descargan al ambiente, suelo y agua, son metales pesados, pesticidas, hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), hormonas, fármacos, nanomateriales y microorganismos, que son motivo de gran preocupación, en términos de su ecotoxicidad (Jaishankar *et al.*, 2014).

Actualmente en las ciencias ambientales, la ecotoxicología ha tomado gran relevancia y con el apoyo de otras áreas del conocimiento (biología, toxicología, química, microbiología, matemáticas, climatología, gestión pública y legislación ambiental), participan en dilucidar los riesgos derivados de las sustancias químicas contaminantes (aproximadamente 100 000), que son descargadas por la industria a los ambientes acuáticos en todo el mundo, algunas de las cuales no son eliminadas completamente en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Tchounwou *et al.*, 2012; Magyary, 2018).

Hoy día, se han buscado alternativas para estudiar las consecuencias de los compuestos bioactivos, químicos y patógenos. Una opción es el uso de embriones de pez cebra (*Danio rerio*), un modelo animal que principalmente se ha utilizado para el estudio de la biología del desarrollo y la genética molecular (Nagel, 2002; Espinosa *et al.*, 2019a), sin embargo, este tipo de peces tiene mucha importancia en estudios ecotoxicológicos y en la identificación de compuestos químicos (Bambino y Chu, 2017).

Los peces cebra poseen características excepcionales: su ciclo de desarrollo es corto, los embriones son transparentes lo que permite identificar alteraciones internas fácilmente. En este sentido, el *Danio rerio* es ideal para determinar el efecto de cualquier sustancia química en el retraso de su desarrollo, así mismo permite la identificación de los puntos finales de la toxicidad, desarrollo de las somitas, movimiento espontáneo de ojos, otolitos, frecuencia cardiaca, edema del saco vitelino, eclosión, longitud y deformación de la cola (Chen *et al.*, 2014; Pham, *et al.*, 2016), y con ello determinar la concentración letal media a la que un pez puede verse afectado por la exposición a un compuesto tóxico (Hill *et al.*, 2005).

En el documento se hace una revisión sobre los efectos que provocan algunos compuestos tóxicos en embriones de peces cebra, como un modelo animal para estudios ecotoxicológicos.

METODOLOGÍA

Para elaborar el presente estudio, se recopilaron artículos científicos disponibles en las bases de datos: Medline, ScienceDirect, el buscador Google académico y la biblioteca digital de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco (BidiUAM). La información seleccionada es de reciente publicación, y preferentemente con factor de impacto. Las palabras clave utilizadas en la búsqueda fueron: embriones, peces cebra, ecotoxicidad, efectos teratogénicos, metales pesados, disruptores endocrinos, pesticidas, fármacos y pez cebra transgénico. Cada uno de los conceptos se combinó con operadores booleanos como “and”, “or” o “not” para la recuperación de la información. La revisión de literatura está basada en artículos de revisión y artículos originales relacionados con el tema.

Características del modelo animal pez cebra (*Danio rerio*)

El pez cebra es un modelo utilizado para estudios en genética, embriología y biología celular. Recientemente, es usado para estudios preclínicos y aplicaciones toxicológicas debido a una amplia variedad de rasgos favorables: alta tasa de fecundidad (cientos de crías por semana), además los embriones se desarrollan fuera del cuerpo de la hembra y son transparentes. Por ello resulta ser un organismo ideal para estudiar el desarrollo embrionario de vertebrados sin necesidad de procedimientos invasivos (Nowik *et al.*, 2015; Schlegel y Gut, 2015).

Entre otros factores benéficos, el pez cebra es relativamente barato de albergar, requieren menos espacio, menor tiempo de dedicación del personal y menos regulaciones, comparadas con las de roedores; como ejemplo, podemos citar el enriquecimiento del hábitat (Dai *et al.*, 2014; Lantz-Mcpeak *et al.*, 2014; Simonetti *et al.*, 2015). Alrededor de 75% de los genes de enfermedades humanas conocidos tienen una coincidencia con el genoma del pez cebra, por tanto, este modelo puede utilizarse para estudiar una amplia gama de enfermedades humanas (Robles *et al.*, 2009; Sarasamma *et al.*, 2017). Además, el pez cebra tiene enzimas citocromo P450 y receptores nucleares similares a los mamíferos, por lo que esta especie ha sido utilizada como modelo para estudios de farmacología y toxicología (Zhang *et al.*, 2015).

Específicamente, en cuanto al uso de embriones de peces cebra en la investigación toxicológica, podemos mencionar que las hembras desovan un promedio de 300 embriones por semana y tienen un desarrollo embrionario muy rápido a las 24 hpf (horas después de la fertilización), pues ya están formados los órganos principales; a las 120 hpf alcanza la eclosión. Además, el proceso es similar a la embriogénesis de vertebrados superiores (incluidos los humanos). Su rápida tasa de desarrollo y su transparencia permiten la visualización de los daños provocados por algunos compuestos químicos durante la gastrulación y la organogénesis (Weigt *et al.*, 2011; Panzica-Kell *et al.*, 2015; García, 2018).

Efectos teratogénicos en embriones

La teratogénesis es un proceso que interrumpe el desarrollo normal de un embrión o feto al causar anomalías estructurales y funcionales permanentes (Gilbert-Barnes, 2010). El desarrollo fetal es un proceso altamente organizado en el que se coordinan cambios complejos. Es aquí donde los cambios a nivel molecular y celular se integran para permitir la manifestación de un fenotipo particular en todo el organismo. Evaluar la toxicidad embriológica y teratogénica de compuestos químicos en el desarrollo fetal en peces es importante, ya que varias sustancias químicas afirman tener efectos teratogénicos (Akinola *et al.*, 2019).

Los peces cebra son ideales para la detección de agentes que interrumpen el desarrollo normal, la división celular que sigue a la fertilización, la morfogénesis extensa que ocurre durante la epibolia, el desarrollo del plan corporal y sus órganos clave. Los ojos, el cerebro, el corazón, la notocorda y la aleta son particularmente sensibles a la perturbación, mientras que la visualización de los efectos sobre las células pigmentadas, incluidos los

glóbulos rojos, así como la eclosión y la mortalidad general, es muy fácil de detectar (Haque y Ward, 2018). Algunos de los principales daños teratogénicos causados por sustancias químicas en los peces cebra se describen en la tabla 1 (Raghunath y Perumal, 2018).

Es importante mencionar que los embriones de pez cebra pueden activar sustancias proteratogénicas sin la adición de un sistema de activación metabólica exógena, como metabolitos formados por el metabolismo materno y/o embrionario (Yang *et al.*, 2009). No obstante, los compuestos parentales, denominados proteratógenos, se pueden bioactivar mediante oxidación a metabolitos reactivos, por ejemplo, electrófilos o intermediarios de los radicales libres. Las enzimas del citocromo P450 (CYP) representan a la familia de enzimas más importante involucrada en la oxidación de los xenobióticos (Weigt *et al.*, 2011).

Tabla 1. Efectos teratogénicos y forma de evaluar

Daño teratogénico	Descripción	Compuesto toxico
Edema pericárdico	Presencia de un volumen anormal de líquido en el espacio que rodea las cámaras del corazón.	Diclofenaco
Edema del saco vitelino	Acumulación de líquido dentro del saco vitelino.	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)
Malformación de la cola	Torcedura en la cola, punta de la cola levantada.	Organofosforados
Cola doblada	Cola flexionada lateral o dorsoventralmente.	Cobre
Escoliosis	Curvatura axial de izquierda a derecha o de derecha a izquierda. Defecto axioesquelético con > 10° de curvatura de la columna vertebral.	Zinc* y Cadmio
Lordosis	Excesiva curvatura axial hacia adentro.	Mercurio
Edema del ojo/cabeza	Acumulación de líquido alrededor del ojo o cerebro.	Cadmio
Cifosis	Curvatura axial ya sea de adelante hacia atrás (jorobado).	Zinc* y Cadmio
Espina bifida	Fusión incompleta de las paredes del tubo neural en la región posterior	Arsénico

*Espinosa *et al.*, 2019b.

Embriones de pez cebra como biosensor de metales pesados

Algunos metales pesados están presentes en el ambiente, como resultado de la rápida urbanización y las prácticas agrícolas e industriales. En los últimos años, las concentraciones de metales pesados han excedido los niveles normales en aguas superficiales y, por ende, en los alimentos (Malan *et al.*, 2015). Algunos metales como Fe, K, Cu, Zn, Ca y Mg son definidos como esenciales para el mantenimiento de la salud (para funciones enzimáticas y metabólicas), sin embargo, algunos llegan a ser tóxicos para los organismos acuáticos cuando están presentes en altas concentraciones (LeFauve y Connaughton, 2017). Los metales como Hg, Cd, Ni, Pb representan una seria amenaza para el medio ambiente acuático, incluso en pequeñas cantidades. Debido a su toxicidad, incluso a bajas concentraciones, la estabilidad química y la afinidad por acumularse en los organismos son considerados como contaminantes prioritarios (Jijie *et al.*, 2020).

Los métodos más comunes para identificar metales pesados en embriones de pez cebra son: la inhibición de la actividad enzimática y la expresión de genes provocada por los metales pesados (Dai *et al.*, 2014). Ling *et al.* (2011) reportan afectada la actividad de superóxido dismutasa, catalasa y acetilcolinesterasa por exposición a Cd y Zn. Estas tres enzimas pueden ser utilizadas como biosensores para aguas contaminadas; también es posible monitorear en tiempo real la absorción de iones de Hg inorgánico en células y embriones de pez cebra *in vivo*, usando espectroscopia y microscopia confocal, las cuales muestran que la saturación de la absorción de iones de Hg ocurre en 20-30 minutos en las células y el organismo (Bera *et al.*, 2014).

Además, con los avances de la ingeniería genética ya se ha desarrollado un pez cebra transgénico, capaz de detectar la presencia de metales en ambientes acuáticos. Los embriones de pez cebra transgénico *Tg (mt:egfp)* expresan una proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) y un gen indicador fluorescente (DsRed2) en los vasos sanguíneos, corazón, hígado y sistema nervioso, mismo que, bajo el control de los promotores de la quinasa hepática fetal (*flk*) y el control transcripcional de un promotor de metalotioneína, son sensibles al metal (Pawar *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2018). Esta línea transgénica se puede usar como biosensor para Zn y Cd acuático. También se ha reportado que el Cd perturba la absorción de Ca^{2+} debido a que reduce la actividad de Ca^{2+} -ATPasa (Liu *et al.*, 2016).

Los mecanismos de acción tóxica de los metales pesados están relacionados con alteraciones osmóticas síntesis y actividad enzimática que provocan daños durante 4 estadios del desarrollo embrionario de los peces cebra (Tabla 2) (Jeziarska *et al.*, 2009). Un mecanismo más, es el que sucede antes de la eclosión; los embriones tienen inhibido el desarrollo de la llamada glándula de la incubación, localizada en la cabeza que produce corionasa, una enzima fundamental para la eclosión (Kapur y Yadav, 1982).

Tabla 2. Efecto de los metales pesados durante el desarrollo embrionario de los peces

<p><i>I. Cigoto, escisión, blástula, gastrulación.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Inflamación reducida (espacio reducido para el desarrollo) • Escisión anormal, malformación de la blástula • Malformaciones • Muerte 	<p>Sustancia toxica Cd, Zn, Hg</p>
<p><i>II Organogénesis</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Reducción de la tasa metabólica y desarrollo. • Organogénesis perturbada • Malformaciones corporales • Muerte (es menor durante esta etapa) y >5% muere antes de la etapa de pigmentación ocular 	<p>Cu, Disruptores endocrinos, Fármacos</p>
<p><i>III. Eclosión</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo inhibido de la glándula de eclosión (corionasa). • Afectando la tasa de eclosión (prematura o tardía) • Malformaciones • Muerte de embriones no eclosionados • Muerte de larvas recién nacidas. <p><i>IV. Consecuencias</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Reduce la incubabilidad • Aumento de las anomalías de las larvas recién eclosionadas • Reducción del tamaño corporal de las larvas • Reducción de la supervivencia de las larvas 	<p>Antidepresivos, Cu, Zn y Diclofenaco.</p>

Jeziarska *et al.*, 2009; Espinosa *et al.*, 2019b.

Disruptores endocrinos químicos

Los disruptores endocrinos químicos (DEQ) son agentes exógenos que afectan negativamente la salud humana y la vida silvestre, interfiriendo con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de hormonas responsables del mantenimiento de la homeostasis y la regulación de los procesos de desarrollo (Kennedy *et al.*, 2013). Los DEQ afectan muchos aspectos de la transcripción y la regulación transcripcional que influyen en la expresión génica (Caballero-Gallardo *et al.*, 2016). En el humano provoca una disminución en la calidad del semen y el conteo de espermatozoides, malformación del tracto urogenital, cáncer de seno y testículo (Jana y Sen, 2012; Rachoñ, 2015). En los peces, la exposición ambiental a los estrógenos afecta el desarrollo sexual, lo

que resulta en la feminización de los machos y comportamiento sexual alterado (Söffker y Tyler, 2012).

Actualmente, la investigación internacional se ha enfocado a identificar la actividad disruptiva endocrina para evitar riesgos para la salud humana y ambiental asociados con la exposición. Vandenberg *et al.* (2016) utilizaron embriones de pez cebra transgénico (TG) sensible a los estrógenos, y Lee *et al.* (2012) identificaron tejidos diana para estrógenos ambientales, incluso a concentraciones ambientalmente relevantes. Además, los productos químicos disruptores endocrinos estrogénicos indujeron la expresión específica de la proteína verde fluorescente (PVF) en diferentes tejidos de embriones de peces cebra TG, como el hígado, el músculo esquelético, el prosencéfalo y los ganglios (Magyary, 2018).

Tabla 3. Algunas moléculas identificadas como disruptores endocrinos químicos

Aditivos plásticos	Bisfenol A
Plastificantes	Ftalatos
Químicos sintéticos (solventes o lubricantes)	Bifenilos policlorados, Bifenilos polibromados y dioxinas
Alquilfenoles)	En detergentes y tensioactivos
Pesticidas	Metoxicloro, clorpirifos, diclorodifeniltricloroetano (DDT), vinclozolin
Agentes farmacéuticos	Dietilstilo
Metales	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Cd ²⁺ y Zn ²⁺
Fármacos	Diclofenaco
Agentes anabólicos	Análogos de vitamina D
Hongos	Micoestrógenos zearalenona
Fitoestrógenos	Isoflavonas, lignanos y xenobióticos.

Caballero-Gallardo, *et al.*, 2016.

La mayor parte de los efectos biológicos de los disruptores endocrinos es posible identificarlos a diferentes niveles en los peces (molecular, celular, órganos, organismos, población y ecosistema) (Ankley *et al.*, 2009). Actualmente, las tecnologías ómicas proporcionan valiosas herramientas para entender los cambios en el genoma (genómica, epigenómica), expresión génica global (transcriptómica), niveles de proteínas (proteómica) y moléculas bioquímicas involucradas en el metabolismo (metabolómica). Dichas herramientas son esenciales para evaluar las respuestas de los disruptores endocrinos en los organismos acuáticos (Caballero-Gallardo *et al.*, 2016).

Ortiz-Villanueva *et al.* (2018) reportan la identificación de algunos DEQ como bisfenol A (BPA), sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y tributilestano (TBT) en embriones de peces cebra. La detección de dichos compuestos se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS). Estos autores identificaron los cambios en el metabolismo de glicerofosfolípidos, aminoácidos, purinas y ácidos 2-oxocarboxílicos. Ellos relacionaron los cambios en el metabolismo de los glicerofosfolípidos con las alteraciones en la absorción del saco vitelino, la principal fuente de nutrientes (incluidos los lípidos) para el embrión en desarrollo, y vincularon los marcadores moleculares con efectos fenotípicos adversos.

Toxicidad de los pesticidas

Los pesticidas son una mezcla de sustancias que previenen algunas plagas (insectos, nematodos, ratas, ácaros y malas hierbas). A nivel mundial, el uso de pesticidas en la agricultura va en aumento, actualmente se aplican aproximadamente 2 kg/Ha (Tanguay, 2018).

El uso generalizado de pesticidas y su liberación incontrolada al medio ambiente (penetran al suelo, se filtran al medio acuático causando problemas reproductivos y efectos secundarios en el desarrollo de peces de agua dulce y salada) ha despertado el interés de los investigadores por conocer los efectos secundarios en organismos vivos (Aktar *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2014).

Además, los insecticidas actúan principalmente en la interrupción del mecanismo de señalización en el sistema nervioso central (SNC), inhibiendo así la función neurológica. Las investigaciones realizadas en diferentes grupos de pesticidas han demostrado un impacto negativo en la salud humana, en particular los efectos se han observado en los fetos y los niños (Silver *et al.*, 2015).

Algunos de los pesticidas más utilizados en la agricultura y la industria son los compuestos organofosforados (OF). La mayoría de los OF presentan toxicidad aguda en los embriones de peces cebra debido a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que descompone la acetilcolina e inhibe la transmisión colinérgica (Strähle y Grabher, 2010; Ogungbemi *et al.*, 2019). Los OF producen neuropatía retardada, un trastorno neurodegenerativo crónico caracterizado por una axonopatía distal central-periférica de los axones sensoriomotores más largos; el curso clínico incluye parestesia en las extremidades distales, pérdida sensorial, ataxia, parálisis flácida y finalmente, parálisis espástica (Faria *et al.*, 2018).

La determinación de los daños que provocan los OF en los embriones de peces cebra es el porcentaje de eclosión, supervivencia, período de incubación y malformaciones físicas embrionarias (saco vitelino inmaduro y saco vitelino oscuro) (Ogungbemi *et al.*, 2019).

Los embriones de pez cebra son utilizados en la comprensión de los mecanismos que provocan los pesticidas en etapas tempranas del desarrollo en vertebrados. Estudios realizados en embriones de pez cebra que fueron incubados con el pesticida organofosforado clorpirifos (CPF) o su metabolito activo el oxón (CPFO), mostraron una inhibición del crecimiento axonal en motoneuronas primarias (MNP) y motoneuronas secundarias (MNS), con las consiguientes anomalías en la capacidad de natación (Muth-Köhne *et al.*, 2012; D'Amora y Giordani, 2018).

Toxicidad de los fármacos

Los productos farmacéuticos utilizados en el tratamiento de humanos y animales son eliminados en la orina y las heces, posteriormente, son transportados hasta las plantas de tratamiento de aguas residuales, donde no siempre se pueden eliminar o incluso se vierten directamente a las aguas superficiales, afectando el medio ambiente acuático. Estas sustancias químicas son compuestos biológicamente activos (esteroides antiinflamatorios, antibióticos, vitaminas y antiepilépticos) que tienen efectos adversos para la salud humana y los organismos acuáticos (Lomba *et al.*, 2019).

Los embriones de pez cebra son usados como un modelo de vertebrado para desarrollar bioensayos (en embriones y animales completos) para la detección preclínica de fármacos. Además de tener similitud en la respuesta tóxica, los efectos teratogénicos y la LD₅₀, a la reportada en ratones. Los efectos de los fármacos en diferentes órganos, como corazón, cerebro, intestino, páncreas, cartílago, hígado y riñón, es apreciado en

los embriones de los peces cebra sin procesos complicados dada su transparencia. A continuación, se mencionan algunos tipos de fármacos de uso humano, como el SU5416 y flavopiridol, que tienen efectos antiangiogénicos, inhibiendo el crecimiento de vasos sanguíneos en embriones de pez cebra (Parng *et al.*, 2002).

También en los embriones de peces cebra se ha evaluado la toxicidad aguda de otros fármacos (difenhidramina, gentamicina, tobramicina, enalapril y lidocaína). En el caso de la gentamicina, los embriones de peces cebra fueron expuestos a altas concentraciones ($100 \cdot 10^3$ mg/L), y los resultados obtenidos fueron que 54% de los embriones a las 24 hpf y 100% a las 48 hpe, presentaron necrosis, sin embargo, cuando se usaron concentraciones de $770 \cdot 10^2$ mg/L a $940 \cdot 10^1$ mg/L había embriones vivos de peces cebra a las 48 hpe (Lomba *et al.*, 2019).

Otra preocupación ambiental, es el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos que alivian el dolor, pero que presentan toxicidad en el sistema endocrino, riñón y reproducción en peces teleósteos (Xia *et al.*, 2017). Por ello, se han determinado los efectos del ibuprofeno y diclofenaco en la eclosión y la capacidad motora de embriones de pez cebra a diferentes concentraciones 5, 50 y 500 μ g/L a partir de las 6 h hpf. Estos hallazgos indican que el ibuprofeno (-63%) y el diclofenaco (-58%) causaron una reducción significativa en la tasa de eclosión a las 55 hpf en la concentración más alta 500 μ g/L., además de afectar la locomoción embrionaria (Xia *et al.*, 2017). Se estima que el consumo mundial de diclofenaco (humano y veterinario) es de >1000 toneladas/año (Memmert *et al.*, 2013).

La toxicidad genética del diclofenaco en células en desarrollo es mediante su introducción, a través de la bicapa lipídica, para distribuirse en el citoplasma e interactuar con macromoléculas, e.g., ADN, y con ello, se altera la expresión de algunos genes como el Wnt3a, Wnt8a, Gata4 y Nkx2.5. La expresión de estos genes es esencial para el desarrollo del sistema cardiovascular y nervioso durante el desarrollo embrionario. Los daños en la expresión de estos genes podrían causar daños teratogénicos, como edema pericárdico y corporal, cuerpo más corto (longitud), curvatura del tronco y malformación de la cola (Chen *et al.*, 2014). Otro estudio demuestra la importancia de la expresión de estos genes como el Wnt8a, que es indispensable para la formación del eje dorsal en embriones de peces cebra (Hino *et al.*, 2018).

Otro tipo de fármaco que también tiene efectos perjudiciales son los antidepresivos, como el fluoxentina (FLX) y paroxetina (PAR) que son excretados principalmente en la orina (80% y 64%, respectivamente, de la dosis oral), mientras que la sertralina (SER) se elimina en 44%, tanto en orina y heces (44%). Por lo que las concentraciones reportadas de antidepresivos en ambientes acuáticos que fueron tratados fluctúan entre 1.1 a 1.4

$\mu\text{g/L}$ para PAR y FLX, respectivamente. Sin embargo, cuando son aguas residuales no tratadas, las concentraciones pueden alcanzar incluso hasta un $39.73 \mu\text{g/L}$ para PAR y $3.47 \mu\text{g/L}$ para FLX, causando daños en la organogénesis, malformaciones cardiovasculares y acelerando la eclosión de los peces (Panzica-Kelly *et al.*, 2015; Nowakowska *et al.*, 2020).

En el caso de los fármacos usados en la terapéutica Veterinaria, al igual que en el caso de humanos, los compuestos parenterales y los metabolitos son excretados en la orina y las heces, ambos vertidos al medio ambiente, en muchos de los casos sin conocer con exactitud el impacto de los metabolitos y los productos de la degradación de cada uno de los fármacos (Carlsson *et al.*, 2013).

En la industria ganadera se usan antibacteriales y antiparasitarios, esto incluye sulfonamidas, fluoroquinolonas, tetraciclinas, trimetoprima y avermectinas, que frecuentemente son encontradas en ng/L cuando se monitorean en el agua (Boxall, 2010). No obstante, los fármacos más persistentes son las ivermectinas, oxitetraciclinas, sulfadiazina y trimetoprima (Carlsson *et al.*, 2013). Los compuestos tóxicos que causan mayor toxicidad en los embriones de peces cebras son los antiparasitarios como la ivermectina que provoca malformaciones, temblores, movimientos reducidos y frecuencia cardíaca alterada, sin embargo, el uso de antibióticos, como trimetoprima y oxitetraciclina, tiene una potencia tóxica menor (Boxall, 2010).

El pez cebras transgénico como modelo de vigilancia ecotoxicológica

En los últimos años, se ha empleado la tecnología transgénica en el pez cebras para diversas aplicaciones, incluida la generación de peces ornamentales fluorescentes y peces para biomonitorio. Los peces transgénicos expresan proteínas fluorescentes (en órganos y tejidos de interés toxicológico) y son herramientas poderosas, porque permiten a los investigadores ver patrones de expresión de genes particulares en animales vivos (Carvan *et al.*, 2000). El pez cebras posee una fuerte ventaja sobre otros organismos vertebrados porque su cuerpo es transparente durante el desarrollo embrionario y juvenil (Satou *et al.*, 2013; Poon *et al.*, 2017)

Las líneas transgénicas de embriones de pez cebras muestran la expresión del gen de la luciferasa o proteína verde fluorescente (GFP), que es de gran utilidad para estudiar los efectos de la toxicidad de metales pesados (vía genes de las proteínas de choque térmico), estrés oxidativo (electrófilos), así como la detección de varios químicos orgánicos que actúan a través de las vías de respuesta del receptor de hidrocarburos de

arilo, tiroides, glucocorticoides y estrógenos (Lee *et al.*, 2015). La sensibilidad de estos modelos varía muy poco y es capaz de detectar exposiciones ambientalmente relevantes; sin embargo, el potencial de estos sistemas para el análisis de los efectos químicos en tiempo real y en múltiples objetivos en organismos intactos es considerable (Carvan *et al.*, 2000).

Actualmente, ya se han descubierto nuevas proteínas fluorescentes con diferentes espectros de emisión y excitación. Esto da la posibilidad de clasificar células activadas por fluorescencia para aislar poblaciones celulares del tejido marcado y determinar cambios en la respuesta celular (Botman *et al.*, 2019).

CONCLUSIÓN

Los embriones de pez cebra son ampliamente utilizados como un modelo animal en diferentes campos (biología del desarrollo y la genética molecular), por sus características excepcionales: rápido crecimiento, alta fecundidad, adaptabilidad, ciclo reproductivo corto, embriones transparentes, capacidad para absorber, por la piel y las branquias, las moléculas diluidas en agua. Los estudios recientes han demostrado que la sensibilidad de los embriones de pez cebra, a diversas sustancias tóxicas, puede ayudar a controlar los contaminantes ambientales, mediante el monitoreo de metales pesados tóxicos, disruptores endocrinos, fármacos y pesticidas. Es una herramienta para detectar toxinas en ambientes acuáticos (biosensor) y para investigar los mecanismos de acción de las diversas toxinas ambientales y sus enfermedades, relacionadas con los humanos y los animales.

BIBLIOGRAFÍA

- Akinola, A. A. *et al.*, 2019, "Phytochemical evaluation, Embryotoxicity and Teratogenic effects of Curcuma longa extract in Zebrafish (*Danio rerio*), en *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019:1-10.
- Ankley, G. T. *et al.*, 2009, "Endocrine disrupting chemicals in fish: developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action", en *Aquat. Toxicol*, 92(3):168-178.
- Aktar, M. W. *et al.*, 2009, "Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards", en *Interdisciplinary toxicology*, 2(1): 1-12.
- Bambino, K.; Chu, J., 2017, "Zebrafish in Toxicology and Environmental Health", en *Current topics in developmental biology*, 124: 331-367.
- Bera, K. *et al.*, 2014, "Development of a Rhodamine-Rhodanine-Based Fluorescent Mercury Sensor and Its Use to Monitor Real-Time Uptake and Distribution of Inorganic Mercury in Live Zebrafish Larvae", en *Analytical Chemistry*, 86(5): 2740-2746.
- Botman, D. *et al.* 2019, "In vivo characterization of fluorescent proteins in budding yeast", en *Sci Rep*, 9: 2234.
- Boxall, A. B. A., 2010, "Veterinary medicines and the environment. Comparative and Veterinary Pharmacology", en *Handbook of Experimental Pharmacology*, 199: 291-313.
- Caballero-Gallardo, K. *et al.*, 2016, "Toxicogenomics to Evaluate Endocrine Disrupting Effects of Environmental Chemicals Using the Zebrafish Model", en *Current genomics*, 17(6): 515-527.
- Carlsson, G. *et al.*, 2013, "Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos", en *Aquatic Toxicology*, 126: 30-41.
- Carvan, M. J. *et al.*, 2000, "Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution", en *Annals of the New York Academy of Sciences*, 919: 133-147.
- Chen, J. B. *et al.*, 2014, "Developmental toxicity of diclofenac and elucidation of gene regulation in zebrafish (*Danio rerio*)", en *Scientific*, 4: 4841.
- Dai *et al.*, 2014, "Zebrafish as a model system to study toxicology", en *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1): 11-17.
- D'Amora, M.; Giordani, S., 2018, "Utility of Zebrafish as a Model for Screening Developmental Neurotoxicity", en *Frontiers in Neuroscience*, 12: 1-6.
- Dubińska-Magiera, M. *et al.*, 2016, "Zebrafish: A Model for the Study of Toxicants Affecting Muscle Development and Function", en *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11): 1-22.

- Espinosa, C. R. *et al.*, 2019a, "El pez cebra (*Danio rerio*) como modelo para el estudio del metabolismo y la obesidad", en *Sociedades Rurales Producción y Medio Ambiente*, 19(37): 165-179.
- Espinosa, C. R. *et al.*, 2019b, "Estudio preliminar del efecto teratogénico del ZnO en embriones de peces cebra usando un antioxidante (resveratrol)", 2° Congreso de Ecología Aplicada, 28-29 de octubre de 2019, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco.
- Faria, M. *et al.*, 2018, "Analysis of the neurotoxic effects of neuropathic organophosphorus compounds in adult zebrafish", en *Sci Rep*, 8(4844): 1-14.
- García, K. Y., 2018, "Efecto del neonicotinoide - tiametoxam en el desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*)", en *Rev. Toxicol*, 35: 22-27.
- Gilbert-Barness E., 2010, "Teratogenic causes of malformations", en *Ann Clin Lab Sci*, 40(2): 99-114.
- Guo, H. *et al.*, 2014, "Prenatal exposure to organochlorine pesticides and infant birth weight in China", en *Chemosphere*, 110: 1-7.
- Han, H. *et al.*, 2018, "Transgenic zebrafish model for quantification and visualization of tissue toxicity caused by alloying elements in newly developed biodegradable metal", en *Sci Rep*, 8: 13818.
- Haque, E.; Ward, A. C., 2018, "Zebrafish as a Model to Evaluate Nanoparticle Toxicity", en *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 8(7): 561.
- Hill, A. J. *et al.*, 2005, "Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity", en *Toxicological Sciences*, 86(1): 6-19.
- Hino, H. *et al.*, 2018, "Roles of maternal wnt8a transcripts in axis formation in zebrafish", en *Developmental Biology*, 434(1): 96-107.
- Hussain, S. *et al.*, 2019, "Health Risk Assessment of Different Heavy Metals Dissolved in Drinking Water", en *International journal of environmental research and public health*, 16(10): 1737.
- Jaishankar, M. *et al.*, 2014, "Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals", en *Interdiscip Toxicology*, 4(7): 60-72.
- Jana, K; Sen, P. C., 2012, "Environmental toxicants induced male reproductive disorders: identification and mechanism of action", pp. 473-518, en Acree, B., *Toxicity and drug testing*, TechOpen.
- Jezierska, B. *et al.*, 2009, "The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review)", en *Fish Physiol Biochem*, 35: 625-640.

- Jijie, R. *et al.*, 2020, "Antagonistic effects in zebrafish (*Danio rerio*) behavior and oxidative stress induced by toxic metals and deltamethrin acute exposure", en *Science of The Total Environment*, 698: 1-12.
- Kapur, K.; Yadav, N. A., 1982, "The effects of certain heavy metal salts on the development of eggs in common carp, *Cyprinus carpio* var. *communis*", en *Acta Hydrochim Hydrobiol*, 10: 517-522.
- Kennedy, C. J. *et al.*, 2013, "Estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals in Fish", en *Fish Physiology*, 33: 257-307.
- Lantz-McPeak, S. *et al.*, 2014, "Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos", en *J. Appl. Toxicol*, 35; pages 261– 272.
- Lee, O. *et al.*, 2012, "Biosensor zebrafish provide new insights into potential health effects of environmental estrogens", en *Environ Health Perspect*, 120(7): 990-996.
- Lee O. *et al.*, 2015, "Transgenic fish systems and their application in ecotoxicology", en *Critical Reviews in Toxicology*, 45(2): 124-141.
- LeFauve, M. K.; Connaughton, V. P., 2017, "Developmental exposure to heavy metals alters visually-guided behaviors in zebrafish", en *Current zoology*, 63(2):221-227.
- Liu, L. *et al.*, 2016, "Generation of mt:egfp transgenic zebrafish biosensor for the detection of aquatic zinc and cadmium", en *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35: 2066-2073.
- Ling, X. *et al.*, 2011, "Superoxide dismutase, catalase and acetylcholinesterase: Biomarkers for the joint effects of cadmium, zinc and methyl parathion contamination in water", en *Environ Technol*, 32: 1463-1470.
- Lomba, L. *et al.*, 2019, "Acute and subacute effects of drugs in embryos of *Danio rerio*. QSAR grouping and modelling", en *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172: 232-239.
- Magyary, I., 2018, "Recent advances and future trends in zebrafish bioassays for aquatic ecotoxicology", en *Ecocycles*, 4(2): 12-18.
- Malan, M. *et al.*, 2015, "Heavy metals in the irrigation water, soils and vegetables in the Philippi horticultural area in the Western Cape Province of South Africa", en *Environmental monitoring and assessment*, 187: 4085.
- Memmert, U. *et al.*, 2013, "Diclofenac: New data on chronic toxicity and bioconcentration in fish", en *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(2): 442-452.
- Muth-Köhne, E. *et al.*, 2012, "The classification of motor neuron defects in the zebrafish embryo toxicity test (ZFET) as an animal alternative approach to assess developmental neurotoxicity", en *Neurotoxicol. Teratol*, 34: 413-424.
- Nagel, R. 2002, "The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*-a general model in ecotoxicology and toxicology", en *ALTEX*, 19(1): 38-48.

- Nowakowska, K. *et al.*, 2020, "Acute exposure of zebrafish (*Danio rerio*) larvae to environmental concentrations of selected antidepressants: Bioaccumulation, physiological and histological changes", en *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 229: 1-9.
- Nowik, N. *et al.*, 2015, "Zebrafish: An animal model for research in veterinary medicine", en *Polish journal of veterinary sciences*, 18(3): 663-674.
- Ogungbemi, A. *et al.*, 2019, "Hypo- or hyperactivity of zebrafish embryos provoked by neuroactive substances: a review on how experimental parameters impact the predictability of behavior changes", en *Environ Sci Eur*, 31(88): 1-26.
- Ortiz-Villanueva, E. *et al.*, 2018, "Assessment of endocrine disruptors effects on zebrafish (*Danio rerio*) embryos by untargeted LC-HRMS metabolomic analysis", en *Science of the Total Environment*, 635: 156-166.
- Panzica-Kelly, J. M. *et al.*, 2015, "Optimization and Performance Assessment of the Chorion-Off [Dechorinated] Zebrafish Developmental Toxicity Assay", en *Toxicological Sciences*, 146(1):27-134.
- Parg, C. *et al.*, 2002, "Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening", en *Assay and Drug Development Technologies*, 1(1): 41-48.
- Pawar, N. *et al.*, 2016, "Development of a fluorescent transgenic zebrafish biosensor for sensing aquatic metal pollution", en *Transgenic Research*, 24(5): 617-627.
- Pham, D. H. *et al.*, 2016, "Use of Zebrafish Larvae as a Multi-Endpoint Platform to Characterize the Toxicity Profile of Silica Nanoparticles", en *Scientific reports*, 6: 37145.
- Poon, K. L. *et al.*, 2017, "Transgenic Zebrafish Reporter Lines as Alternative *In Vivo* Organ Toxicity Models", en *Toxicological Sciences*, 156(1): 133-148,
- Rachoń, D. 2015, "Endocrine disrupting chemicals (EDCs) and female cancer: Informing the patients", en *Rev Endocr Metab Disord*, 16: 359-364.
- Raghunath, A.; Perumal, E., 2018, "Analysis of Lethality and Malformations During Zebrafish (*Danio rerio*) Development", en *Teratogenicity Testing*, 337-363.
- Robles, V. *et al.*, 2009, "Germplasm Cryobanking in Zebrafish and Other Aquarium Model Species", *Zebrafish*, 6(3): 281-293.
- Sarasamma, S. *et al.*, 2017, "Zebrafish: A Premier Vertebrate Model for Biomedical Research in Indian Scenario", en *Zebrafish*, 14(6), 589-605.
- Schlegel, A.; Gut, P. 2015, "Metabolic insights from zebrafish genetics, physiology, and chemical biology", en *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 72(12): 2249-2260.
- Silver, M. K. *et al.*, 2015, "Distribution and predictors of pesticides in the umbilical cord blood of Chinese newborns", en *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13: 1-14.

- Simoneti, R. *et al.*, 2015, "Zebrafish (*Danio rerio*): The future of animal model in biomedical research", en *Journal of Fisheries Science*, 9(3): 039-045.
- Söffker, M.; Tyler, C. R., 2012, "Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish-a critical review on effects and possible consequences", en *Crit Rev Toxicol*, 42(8): 653-68.
- Satou, C. *et al.*, 2013, "Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons", en *Development*, 140: 3927-3931.
- Strähle, U.; Grabher, G., 2010, "The zebrafish embryo as a model for assessing off-target drug effects", en *Disease Models & Mechanisms*, 3: 689-692.
- Tanguay, R. L., 2018, "The Rise of Zebrafish as a Model for Toxicology", en *Toxicological Sciences*, 163(1): 3-4.
- Tchounwou, P. B. *et al.*, 2012, "Heavy metal toxicity and the environment", en *Experientia supplementum*, 101: 133-164.
- Vandenberg, L. N. *et al.*, 2016, "A proposed framework for the systematic review and integrated assessment (SYRINA) of endocrine disrupting chemicals", en *Environ Health*, 15(1): 74.
- Xia, L. *et al.*, 2017, "Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*)", en *Chemosphere*, 182: 416-425.
- Weigt, S. *et al.*, 2011, "Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens", en *Toxicology*, 281: 25-36.
- Yang, L. *et al.*, 2009, "Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals", en *Reproductive Toxicology*, 28(2): 245-253.
- Zhang, F. *et al.*, 2015, "Antibiotic Toxicity and Absorption in Zebrafish Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry", *PLoS ONE* 10(5): e0124805.