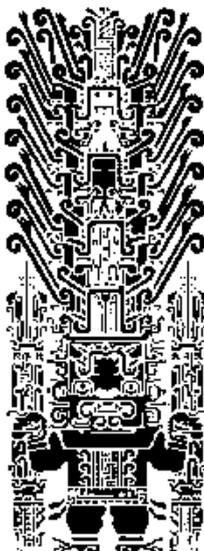


UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS:

**IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE ENSAYO DE MICRONÚCLEOS
PARA LA DETERMINACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO DE ETANOL Y PERÓXIDO
DE HIDROGENO EN SANGRE PERIFÉRICA DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*)**

TESISTA:

BACH. LEYVA VELÁSQUEZ, OMAR FREDERIK

ASESOR:

BLGO. MG. SC. CARLOS SCOTTO ESPINOZA

LIMA - PERÚ

2014



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la Sala de reuniones de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, siendo las 13:00 horas del día jueves 18 de Diciembre del 2014, de conformidad con el Artículo 45° acápite 45.2 de la Ley Universitaria 30220, Artículo 61° del Estatuto de la UNFV; acogiéndose a la obtención del Título Profesional, bajo la Modalidad de Sustentación de Tesis, presentado por el Bachiller en Biología, Sr.

LEYVA VELASQUEZ, Omar Frederik

Expuso la Tesis titulada:

"IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE ENSAYO DE MICRONÚCLEOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO DE ETANOL Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN SANGRE PERIFÉRICA DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*)"

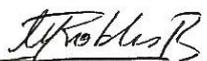
Ante el Jurado Integrado por los siguientes Docentes:

Mg. Margarita E. ROBLES ROMÁN	(PRESIDENTE)
Mg. María I. LA TORRE ACUY	(SECRETARIA)
PhD. Álvaro MARCELO RODRIGUEZ	(MIEMBRO)
Dr. José A. IANACONE OLIVER	(MIEMBRO)

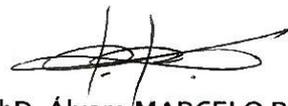
Luego que el Jurado formulara las preguntas pertinentes y a las respuestas del Bachiller, se debatió libre y reservadamente declarándolo: *aprobado*

Por mayoría

En consecuencia se encuentra **APTO (X)**, **NO APTO ()** para otorgársele el Título Profesional de **LICENCIADO EN BIOLOGÍA**; de conformidad con lo descrito firmamos:


Mg. Margarita E. ROBLES ROMÁN
PRESIDENTE


Mg. María I. LA TORRE ACUY
SECRETARIA


PhD. Álvaro MARCELO RODRIGUEZ
MIEMBRO


Dr. José A. IANACONE OLIVER
MIEMBRO

Agradezco a mi madre por haberme apoyado en todo momento y sobre todo en esta etapa de mi vida y a mi asesor en el desarrollo de esta tesis.

RESUMEN.

Los ensayos de toxicidad nos permiten demostrar los daños potenciales de diferentes sustancias químicas. De esta manera poder conocer las dosis permitidas para su uso y exposición de las personas. El test de micronúcleos es una metodología utilizada para poder medir el daño genotóxico en linfocitos. En el presente trabajo se implementó el test de micronúcleos en el laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la UNFV utilizando etanol y peróxido de hidrógeno como agentes xenobióticos en eritrocitos del pez *Dario rerio*. Obteniéndose un éxito en la implementación del protocolo en nuestro laboratorio.

Palabras claves: Genotoxicidad, micronúcleos, Dario rerio, etanol, peróxido de hidrógeno.

ABSTRACT.

Toxicity tests allow us to demonstrate the potential harms of different chemicals. Thus to know the dose permitted for use and exposure of people. The micronucleus test is a methodology used to measure genotoxic damage in lymphocytes. In this paper the micronucleus test was implemented in the laboratory of Animal Breeding and Reproduction UNFV using ethanol and hydrogen peroxide as xenobiotics in fish erythrocytes *Dario rerio*. Obtaining itself a success in the implementation of the protocol in our laboratory.

Key words: Genotoxicity, micronuclei, *Dario rerio*, ethanol, hydrogen peroxide.

1. INTRODUCCIÓN.

Los estudios de genotoxicidad laboratorial en el país son escasos. Lo que hace necesario desarrollar estudios de daño genotóxico y teratogénico al respecto con protocolos debidamente estandarizados y utilizando un animal modelo vertebrado filogenéticamente cercano al humano, pero económicamente sostenible en el tiempo, de bajo costo y con resultados preclínicos casi inmediatos como es el caso del pez cebra (*Danio rerio*) (Torres de Lemos *et al.*, 2007).

El pez cebra es único para obtener y mantener miles de mutantes gracias a sus especiales características; muchos de los fenotipos de los mutantes del pez cebra ya obtenidos se parecen a algunas enfermedades genéticas caracterizadas en el hombre, aportando un poderoso instrumento para ahondar en las correspondientes patologías humanas. Es por ello que se pueden buscar genes candidatos a enfermedades o anomalías en regiones cromosómicas humanas definidas por mutaciones en el pez cebra. Las alteraciones morfológicas en el desarrollo embrionario del pez cebra se han utilizado desde hace años para estudiar los efectos de los contaminantes (Prieto *et al* 2006).

La medición de la frecuencia de micronúcleos (MN) en linfocitos de sangre periférica se utiliza ampliamente en epidemiología molecular y citogenética para evaluar la presencia y extensión de daño cromosómico en poblaciones humanas expuestas a agentes genotóxicos o para determinar la presencia de un perfil genético susceptible. La alta confiabilidad y el bajo costo de la técnica del MN, ha contribuido al éxito y a la adopción de este biomarcador para estudios, *in vitro* e *in vivo*, de daños al genoma humano. Los micronúcleos se originan desde fragmentos cromosómicos o de cromosomas completos que no han sido incluidos en el núcleo principal de la célula hija durante la división celular (Benítez-Leite *et al.*, 2010). La formación de micronúcleos en células divididas es el resultado de ruptura cromosómica debida a ausencia o alteración de la reparación de lesiones del ADN, o mala agregación del cromosoma debido a mala función mitótica. El amplio uso actual del ensayo de MN es una oportunidad para aplicarlo en la planificación y validación de programas de vigilancia y prevención de cáncer (Bonassi *et al.*, 2007). Estudios conducidos en niños expuestos a contaminantes ambientales revelaron claramente un incremento en la frecuencia de micronúcleos en los expuestos, comparados con los niños referentes (Neri *et al.*, 2006).

El estudio de la genotoxicidad involucra la aplicación de diversos xenobióticos que de acuerdo al daño producido se clasifican en mutágenos, carcinógenos o teratógenos. Los mutágenos producen mutagénesis que abarca distintos tipos de alteraciones genéticas. Dichas alteraciones (mutaciones) pueden producirse a nivel de una unidad mínima de información (como por ejemplo un gen) o a nivel de unidades mayores como grupos estructurales (cromosomas) correspondiendo a lo que se denomina micromutación o macromutación respectivamente. Los carcinógenos producen carcinogénesis, el cual es un proceso que involucra cambios (transformación celular) de tipo irreversible, a través de una serie de estadios (iniciación, promoción y progresión). Los teratógenos, que producen teratogénesis, son los que implican el daño inducido sobre el organismo en desarrollo, es decir, en alguno de los distintos períodos de gestación o a lo largo de la misma como proceso (Prieto García *et al* 2006).

La prueba de MN fue originalmente desarrollado con especies de mamíferos, y ha sido ampliamente usado para testar actividad genotóxica de químicos. La técnica fue subsecuentemente modificada para su aplicación a peces en laboratorio (Kotwani *et al.*, 1995). La prueba de MN aplicado en peces es un sistema útil para detección *in situ* de agentes genotóxicos en el ambiente acuático. La prueba de MN con peces muestra el potencial como técnica de monitoreo para detectar agentes de genotoxicidad en agua en el laboratorio y en el campo (Di Giorgio *et al.*, 2001). Los eritrocitos de peces, que son nucleados, han sido usados como medida de actividad clastogénica (Anitha *et al.*, 2000, De Flora *et al.*, 1993).

Un riesgo frecuente en la investigación es la exposición a vapores en la proximidad de un proceso en el que se utiliza alcohol etílico. La exposición prolongada a concentraciones superiores a 5.000 ppm causa irritación de los ojos y la nariz, cefalea, sopor, fatiga y narcosis. Su efecto en la piel es similar al de todos los disolventes de grasas y de no tomarse las debidas precauciones, puede producirse una dermatitis de contacto (Conde, 2004). La ingestión es poco probable en el entorno de investigación, pero posible en el caso de los alcohólicos. El peligro de este consumo anómalo depende de la concentración de etanol, que si es superior al 70% puede producir lesiones esofágicas y gástricas y de la presencia de desnaturalizantes. Estos últimos se añaden para hacer que el alcohol tenga un sabor desagradable cuando se obtiene libre de impuestos para fines distintos al del consumo (Estruch, 2002; Medina, 2006). Recientemente se ha sospechado la existencia de otro riesgo potencial en las personas expuestas a etanol sintético, por haberse demostrado que este producto es cancerígeno

en ratones tratados con dosis altas. Un estudio epidemiológico posterior ha revelado una mayor incidencia de cáncer de laringe (cinco veces superior a la prevista) en un grupo de trabajadores empleados en una fábrica de etanol obtenido mediante ácidos fuertes (Conde, 2004).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un metabolito, aunque con menor capacidad oxidativa que un anión superóxido (O_2^-), es capaz de formar a los radicales hidroxilo OH^\cdot , los cuales son potentes agentes oxidantes que afectan negativamente a las células del organismo, como por ejemplo, generando daños sobre la estructura del ADN (Ayala *et al*, 2004; Conde, 2004). Se ha visto que el efecto causado por la generación de los radicales hidroxilos y por otras especies reactivas de oxígeno sobre la estructura del ADN es nocivo, ya que promueve la inestabilidad de la misma mediante el rompimiento de enlaces entre los fosfatos de la doble cadena. Esto ocasiona mayores daños a nivel de cromatina, fomentando transcripciones erróneas de información genética y subsecuentes alteraciones a la estructura general de las células y los tejidos (Conde, 2004).

Por lo tanto es importante estudiar los daños potenciales de estos 2 compuestos que son utilizados en la investigación, la industria y la medicina. Es por lo expuesto que el objetivo general del proyecto fue diseñar, implementar y realizar un protocolo de ensayo de micronúcleos para la determinación del daño genotóxico de etanol y peróxido de hidrógeno en sangre periférica de pez cebra (*Danio rerio*)

2. MARCO TEORICO.

2.1 ANTECEDENTES

En España en el año 2007 se han realizado estudios en el pez cebra que se ha convertido en un modelo inigualable para investigar diferentes procesos biológicos. Y ahora, sus cualidades genéticas y embrionarias se aprovechan para buscar nuevos medicamentos que permitan controlar enfermedades devastadoras, como el cáncer y el Parkinson (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007)

Hasta ahora, es uno de los peces modelo más estudiados y en los que se ha desarrollado gran parte de la investigación básica en biología-genética molecular de vertebrados, es el pez tropical de agua dulce *D. rerio* o pez cebra de la familia Cyprinidae, ver fig. 1 (Detrich *et al.*, 1999; Westerfield, 1995). Por ejemplo, es uno de los modelos en los que se avanza en las aplicaciones de los transposones de vertebrados como posibles vectores de transferencia de genes (Coll, 2001; Ivics *et al.*, 1997; Izsvak *et al.*, 1997) y es uno de los peces que se encuentran más cercanos a la completa secuenciación de su genoma.



Fig. 1: Pez cebra (*Danio rerio*). Tomado de Coll, 2001; Ivics *et al.*, 1997; Izsvak *et al.*, 1997

Por otro lado, el test de MN permite hallar una muy diversa gama de alteraciones del material genético como son la presencia de micronúcleos. Su presencia indica la existencia de un fragmento cromosómico ubicado fuera del núcleo principal, que en pocos ciclos celulares se perderá, con el daño que supone para la célula perder el material genético contenido en él. También evidencia la existencia de distintos tipos y

niveles de daño genético estructural (doble o triple micronúcleo, micronúcleo con puente, etc.), mientras que otras indican fallas celulares que afectan a la distribución y número de cromosomas (binucleadas, polinucleadas, etc.). Hallar un número crecido de alteraciones cromosómicas estructurales y/o numéricas, indicarían una alta probabilidad que el organismo portador ha estado bajo la acción de alguna “sustancia genotóxica” por un determinado tiempo (McHugh, 2001).

Los reportes de presencia de micronúcleos (MN) en peces por exposición a efluentes textiles, mineros y agroindustriales sirven para monitorear la contaminación de las fuentes fluviales (Cavas, T. & Ergene-Gözükara, S., 2003). Los experimentos con ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, bleomicina y mitomicina encontraron incrementos de micronúcleos a las 24 horas de exposición. Las variaciones en el tipo y número de MN, dependen del tipo de genotóxico, la concentración utilizada, la forma de administración y la respuesta genética que tenga cada especie (Palhares & Grisolia, 2002).

2.2 GENERALIDADES.

2.2.1 PEZ CEBRA (*Dario rerio*)

El pez cebra es una de las especies que ofrece ventajas de tipo morfológicas, fisiológicas y genética. Por ello, el estudio en pez cebra es un complemento a los estudios realizados en ratones de laboratorio. Dentro de estas ventajas destacan cuatro en esencia: la primera, que compartimos un ancestro común hace 400 millones de años. Lo cual nos brinda procesos a nivel molecular e histopatológico similares a los cánceres que el hombre sufre. Indicándonos la semejanza en procesos genéticos y fisiológicos entre este pez y el hombre (Hill *et al.*, 2004; Cayuela *et al* 2012).

La segunda gran ventaja es la manipulación genética mediante las técnicas genéticas disponibles. Esto consiste en que los huevos son susceptibles de ser microinyectados (RNA, antisense, morfolidos, proteínas, anticuerpos, drogas, etc) lo que permite estudiar los efectos en el desarrollo de la sustancia inyectada y de esta manera ver las consecuencias de una sobre expresión o inhibición de sus genes. (Rocha *et al.*, 2002; Cayuela *et al* 2012).

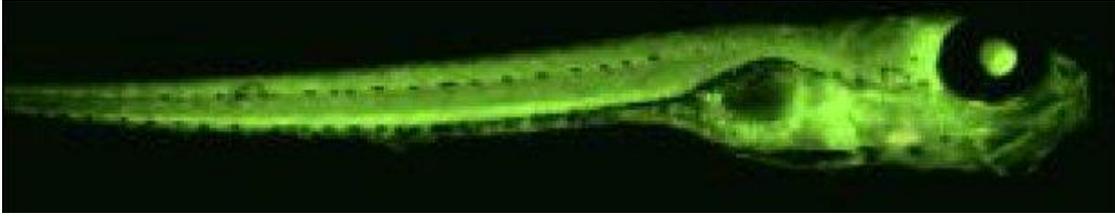


Fig. 2: Pez cebra fluorescente (GFP). Tomado de Rocha *et al.*, 2002; Cayuela *et al* 2012

La transparencia de los embriones viene a ser la tercera ventaja. Gracias a esto se pueden realizar seguimientos de los cambios organogénéticos en los embriones desde muy temprano desarrollo causado por agentes externos e incluso se puede marcar mediante genes fluorescentes, como el GFP (Green Fluorescent Protein) Fig. 2, en determinados órganos y observar su desarrollo embrionario y larval. Si bien es cierto, sólo los estadios tempranos del pez cebra es transparente, se ha encontrado un mutante llamado “Casper” que presenta durante todo su ciclo de vida la característica de ser transparente (Cayuela *et al* 2012).



Fig. 3: Pez cebra línea Casper. Tomado de Cayuela *et al* 2012

Finalmente, su alta capacidad reproductiva (la hembra pone hasta 400 huevos) y rápido desarrollo (sus órganos se forman en sólo 24 horas), facilita realizar diferentes experimentos en una misma generación de animales, investigar las causas y la evolución de las patologías como el cáncer. (Asociación Toxicológica Argentina. Tomado de: Acta Toxicológica Argentina, 2007). Esto nos permite realizar experimentos a gran escala y de manera sistemática para diversos compuestos tanto dañinos como el estudio de medicamentos (Cayuela *et al* 2012).

Es por todo lo expuesto que el pez cebra es utilizado para estudios de desarrollo y genética en animales vertebrados, así como los efectos que causan diversos agentes químicos en su desarrollo. Sumado a la facilidad de poder monitorearlos con el simple uso de un microscopio y la obtención de resultados a corto plazo. Ni que decir del hecho

de poder ahorrar en costos de mantención si se usara animales de mayor tamaño como los ratones. Lo cual lo hace un excelente modelo animal para estudios de genotoxicidad (Maldonado, 2003).

2.2.2 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS.

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas completos que quedan fuera del núcleo durante la división celular, es decir, la mitosis. (Ruíz-Bernes *et. al.* 2013). Esta prueba junto a la de ensayo cometa son los test de genotoxicidad más utilizados a nivel mundial. Debido a que han demostrado ser herramientas fundamentales para evaluar daños genéticos en diferentes tejidos de varias especies de animales y los posibles efectos de los productos químicos en la salud de los seres humanos, antes de su salida al mercado, así como del daño causado por metales en zonas contaminadas por relaves mineros (Tejedor, 2001). Podemos observar la formación de micronúcleos en la figura 4.

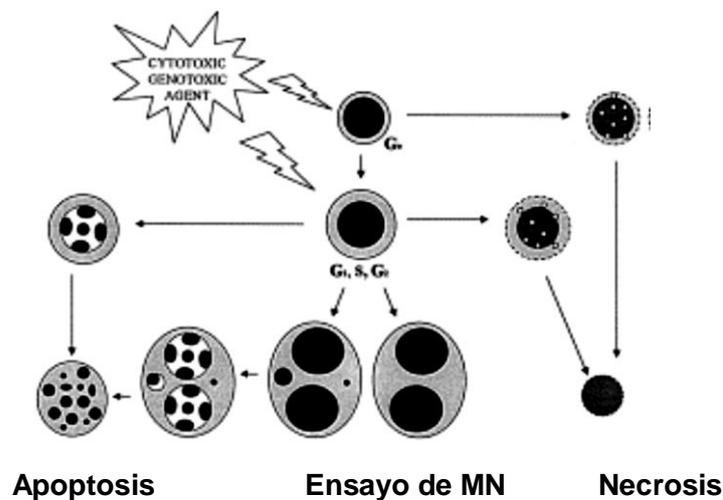


Fig.4: Esquema que explica la formación de los micronúcleos (Tejedor, 2011).

El test de micronúcleos, permite hallar una muy diversa gama de alteraciones del material genético como son la presencia de micronúcleos. Su presencia indica la existencia de un fragmento cromosómico ubicado fuera del núcleo principal, que en pocos ciclos celulares se perderá, con el daño que supone para la célula perder el material genético contenido en él. También evidencia la existencia de distintos tipos y niveles de daño genético estructural (doble o triple micronúcleo, micronúcleo con puente, etc.), mientras que otras indican fallas celulares que afectan a la distribución y número de cromosomas (binucleadas, polinucleadas, etc.). Hallar un número crecido de

alteraciones cromosómicas estructurales y/o numéricas, indicarían una alta probabilidad que el organismo portador ha estado bajo la acción de alguna “sustancia genotóxica” por un determinado tiempo (Comet Assay, 2000; Tejedor, 2001).

Los micronúcleos son el resultado de un daño previo en el ADN, evento que provoca mutaciones y por ende un cambio en la expresión del material genético. Este fenómeno desencadena una serie de acontecimientos, dentro de los cuales está presente, ruptura de cromosomas acrocéntricos y alteración en la formación del huso mitótico, dejando como consecuencias células con fragmentos o incluso cromosomas completos desapareados para luego formarse alrededor de los mismos una envoltura nuclear y por consiguiente, el armazón responsable de las manifestaciones de núcleos de menor tamaño que el principal durante la anafase (Tejedor, 2001).

Estos micronúcleos son fácilmente detectados por una tinción diferencial, ya que toman una tonalidad azul intensa en los eritrocitos evaluados. El test de micronúcleos es un método de análisis citogenético que puede utilizarse tanto *in vivo* como *in vitro*. Fue diseñada para identificar agentes químicos con efectos clastogénicos, es decir, a aquellos agentes capaces de producir fracturas a los cromosomas. Diversos trabajos muestran lo útil de la prueba y su importancia dada su simplicidad, fácil conteo y amplio espectro de aplicabilidad (Valenciano, 1995).

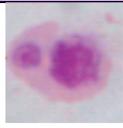
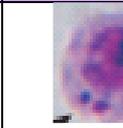
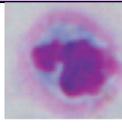
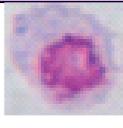
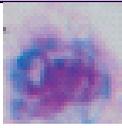
Célula con un micronúcleo	Célula con dos micronúcleos	Célula con núcleos en forma arriñonada	Núcleo no uniforme y membrana nuclear rota	Célula con núcleo fragmentado
				

Fig. 5: Tipos de micronúcleos producidos por daño genotóxico sobre los glóbulos rojos en el pez cebra *Dario rerio* (Asociación Toxicológica Argentina, 2007).

En base a la información anterior, se puede concluir que el análisis de micronúcleos ofrece un método sencillo, económico y efectivo para investigar y evaluar la respuesta celular al efecto de mutágenos y/o agentes carcinógenos.

2.2.3 CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA

La Concentración Letal, también conocida por sus siglas en inglés como *LC* (lethal concentration), es una forma de expresar el grado de toxicidad de una sustancia. Como norma general se utiliza la concentración semi letal o LC_{50} o CL_{50} que indica en toxicología los miligramos de una sustancia necesarios por kilogramo de peso de un animal para matar al 50% de la población en una determinada unidad de tiempo. Los valores de CL_{50} dependen de varios factores: el sistema biológico o animal, la raza, sexo, edad, dieta, etc. (Organización Marítima Internacional, 2006).

2.2.4 PERÓXIDO DE HIDROGENO

El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H_2O_2) es un agente oxidante inestable de uso ampliamente difundido. Se presenta en concentraciones del 3 - 60%, según su uso antiséptico o industrial (Borrego *et. al.* 1998).

El peróxido de hidrogeno es un agente genotóxico, que es capaz de producir modificaciones de las características particulares del DNA. El peróxido de hidrógeno es un agente capaz de dar lugar a múltiples reacciones, llegando a producir un daño celular. El daño celular producido por estos agentes al encontrarse en elevadas cantidades, ocurre sobre diferentes macromoléculas, tal es el caso de lípidos, proteínas y DNA, conociéndose a este daño como estrés oxidativo. En el DNA, el estrés oxidativo puede dar lugar a fenómenos como mutaciones y carcinogénesis. Los linfocitos humanos periféricos representan una población celular donde el DNA está predominantemente en la etapa pre-sintética del ciclo celular, fase G_0 (Camacho *et. al.* 2010).

2.2.5 ETANOL

El uso del etanol se remonta a épocas prehistóricas. Su descubrimiento tal vez fue accidental al momento de consumir frutas estropeadas, es decir, fermentadas. De la cual se observó que tenía un efecto tóxico y estimulante en algunas personas. Por esto, el etanol se puede obtener de la fermentación de azúcares y almidones de productos vegetales de los cuales se puede obtener entre 12 – 15% de alcohol en estas soluciones. Para obtener un grado mayor se debe destilar dichas soluciones lo que aumenta la

concentración entre un 40 – 50%. Y aplicando una doble destilación podemos obtener una solución al 95% de etanol (Wade, 2004; McMurry, 2004).

Desde mediados de los años 40 se produce etanol mediante la reacción catalítica en fase gaseosa de etileno con agua a altas temperaturas y presión. Utilizando catalizadores como el pentóxido de difosforo, óxido de tungsteno e incluso cerámica tratada especialmente (McMurry, 2004).

El etanol es un excelente disolvente, utilizado como combustible y económico de producir. Utilizando también como antiséptico tópico. Si bien es cierto que el etanol tiene una baja toxicidad mucha gente muere cada año por subestimar la peligrosidad del etanol. Aproximadamente 200 mL de etanol ingeridos puede llegar a ser tóxico para un adulto. Sin embargo, dosis menores pueden afectar el nervio óptico. Es por ello, que debe evitarse la ingesta de alcohol en el laboratorio e incluso evitar el contacto con los ojos o mucosas (Wade, 2004).

3. METODOLOGÍA.

3.1 MATERIALES.

- Peces cebra.
- Envases plásticos de 1 L.
- Tanques de 280 L.
- Agua Cielo.
- Peróxido de hidrógeno.
- Laminas portaobjetos.
- Laminas cubreobjetos.
- Etanol absoluto.
- Colorante Giemsa 10%.
- Agua destilada.
- Microscopio óptico.
- Micropipetas 20 a 100 uL.
- Tips de 20 a 100 uL.
- Camara fotográfica Canon.
- Goteros de plástico.
- Vasos precipitados.
- Pipetas de vidrio 10 mL.
- Probetas de 50 mL.
- Baguetas.
- Placas Petri.
- Estuche de disección.

3.2 MÉTODOS.

3.2.1 TIPO DE ESTUDIO.

Es de tipo experimental con ensayos pre clínico y se desarrolló en el Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad Nacional Federico Villarreal de junio a diciembre de 2013.

3.2.2 LOCALIZACIÓN

Los peces fueron seleccionados del stock de alevines de *Danio rerio* del laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, ubicado en Calle Río Chepén s/n Cuadra, El Agustino, Lima, Perú.

3.2.3 CARACTERÍSTICAS Y MANEJO DE *DANIO RERIO*

Se utilizaron 248 peces cebra adultos (*D. rerio*) sexualmente maduros, de 3 a 4 meses de edad. La población de peces fue distribuida equitativamente en 2 acuarios de vidrio de 280 L (100 cm x 70 cm x 40 cm), cada uno será mantenido en $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Se usó agua de grifo reposada por 24 h con un acondicionador marca Sera® 0,3 mL.L⁻¹. Se instaló un aireador continuo, la temperatura fue de 21 °C aproximadamente. El fotoperiodo fue de 12L/12D aproximadamente. Se alimentaron de *ad libitum* con alimento seco Sera®, suplementado con alimento vivo a base de *Artemia salina* (Linnaeus, 1758). Los tanques fueron sacados con sifón una vez que cada segundo día y aproximadamente 2 L de agua fueron intercambiados durante cada limpieza.

3.2.4 POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO.

Se utilizó 120 peces para el análisis con cada agente genotóxico, más un control, lo que hace un total de 248 peces. Para cada ensayo se emplearon 30 envases plásticos de 1 L. que fueron llenados solo 500 mL de su capacidad, mantenidos a una temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante las 24 h del periodo experimental y saturado con oxígeno durante 24 h antes de la introducción de los peces. Los peces fueron tomados de los tanques de 280 L. y se ubicaron 6 peces por cada envase plástico. Se realizó un registro con el número total de muerte durante las 2 h, 4 h, 8 h y 24 h del periodo experimental. Se preparó una solución madre la cual se diluirá con un factor de 0,6 para obtener 5 concentraciones. Para cada tratamiento se diluyó en agua concentraciones de 0 (control), 27 500, 25 000, 22 500, 20 000 y 17 500 mg.L⁻¹ de etanol y 300, 250, 200, 150 y 100 mg.L⁻¹ de peróxido en cada uno de los envases plásticos. Los peces se consideraron muertos cuando dejaron de realizar movimiento opercular durante 15 min de monitoreo por observación. Se realizó un total de 3 repeticiones por cada una de las concentraciones en el experimento.

3.2.5 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS.

Se sacrificaron dos peces cebra por cada repetición (5 repeticiones en total) de ambas concentraciones y un control con sólo agua de pecera. Esto a las 6 h, 12 h y 24 h de exposición para realizar la prueba de MN de sus eritrocitos. Se extrajo sangre periférica por un corte en la parte anterior del pez, entre el opérculo y las aletas pectorales. Se realizó la prueba de MN estandarizada en el Laboratorio: se hizo un frotis con la sangre, se dejó secar por 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se fijaron las muestras en etanol absoluto por 15 minutos a 4 °C, luego se dejaron sacar por 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez seco se colorearon con Giemsa 10% por 8 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavó con agua destilada y dejaremos secar por una hora para luego observarlo en el microscopio a 400X y 1 000X.

Siendo un solo observador viendo un total de 100 campos por lámina portaobjeto para 2 animales (duplicados) y se evaluó sus distintos tipos de anomalías de acuerdo a una tabla patrón.

3.2.6 TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Se realizaron tomas fotográficas con una cámara digital de 10 megapíxeles Marca Canon (10X) y fondos especiales para lograr un contraste estándar adecuado. Con la finalidad de observar las imágenes en computadora y cuantificar los micronúcleos presentes y tener un registro digital de las muestras. Esto debido al deterioro que pueden sufrir las muestras por el tiempo.

3.2.7 TÉCNICAS DE ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS.

Se evaluaron 100 eritrocitos por cada individuo. Determinándose las frecuencias de micronúcleos intactos del grupo control (solamente agua) como parte del proceso de estandarización

El fraccionamiento de la Concentración Letal Media (CL₅₀) para la Solución de Etanol y la Solución de Peróxido de Hidrógeno, se fraccionaron las CL₅₀ encontradas en la mitad (1/2) y un cuarto (1/4) y se realizará los ensayos de exposición para encontrar daño genotóxico en el núcleo de los glóbulos rojos o eritrocitos. Se realizó el conteo de 100

núcleos ($n = 100$) por cada fracción de CL_{50} para 2 animales (triplicados) y se evaluará sus distintos tipos de anomalías

Tanto para la solución de etanol y peróxido de hidrógeno se observaron los efectos genotóxicos sobre los glóbulos rojos del pez Cebra a partir a una $\frac{1}{4}$ parte de la CL_{50} .

La eficacia de las dosificaciones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA). Se determinará la presencia de MN a 24 h mediante el uso del método de ajuste Spearman-Kärber v. 1.5. Se realizó la medición de longitud y peso como datos referenciales. El análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando el programa estadístico analítico SPSS, v. 17.0.

4 RESULTADOS.

4.1. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA

El valor de la CL_{50} aguda a 24 h (95% de límites de confianza) del etanol absoluto fue $18964.80 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabla 2) y del peróxido de hidrogeno fue 163.9 mg.L^{-1} (Tabla 3) en *D. rerio*. También se observan los efectos de toxicidad aguda en *D. rerio* entre las 2 a las 24 h de exposición.

Tabla 1. Toxicidad aguda de etanol entre las 2 h hasta las 24 h en *Danio rerio*

Tiempo (h)	CL_{50} (mg.L ⁻¹)	Límite mínimo de confianza	Límite máximo de confianza
2	25157.18	23968.59	26404.7
4	22425.32	21336	23569.71
6	20557.16	19593.56	21568.16
12	19775.3	18536.55	21096.83
24	18964.11	18051.11	19923.21

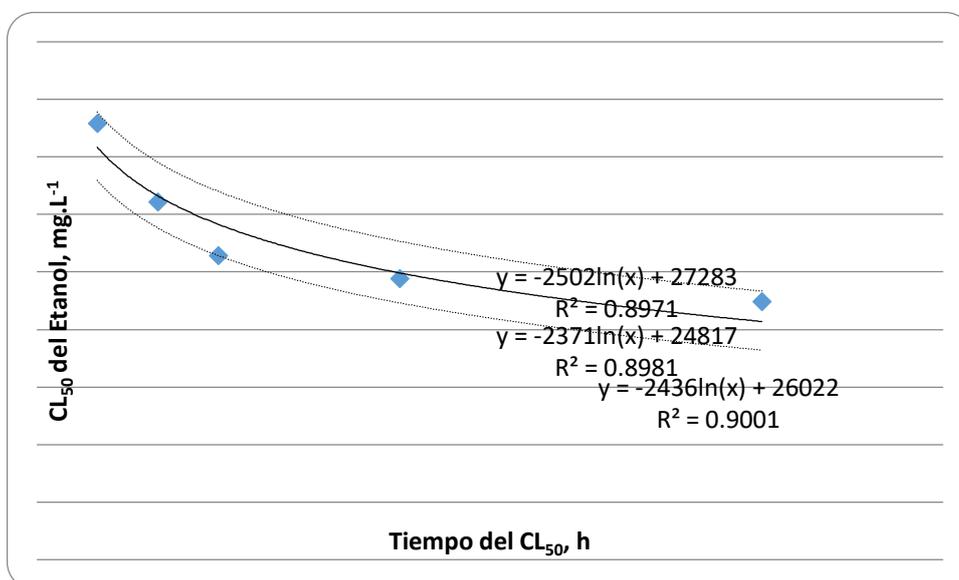
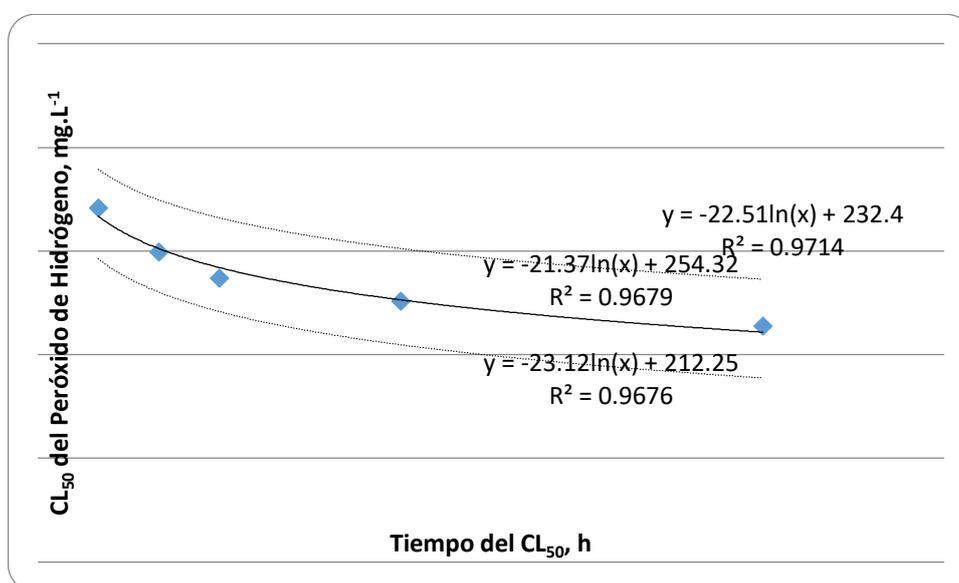


Tabla 2. Toxicidad aguda de peróxido de hidrogeno entre las 2 h hasta las 24 h en *Danio rerio*

Tiempo (h)	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Límite mínimo de confianza	Límite máximo de confianza
2	220.92	199.85	244.22
4	199.65	180.41	220.95
6	186.91	164.22	212.74
12	176.05	154.51	200.59
24	163.9	141.86	189.36



4.2. FRACCIONAMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀) PARA LA SOLUCIÓN DE ETANOL Y LA SOLUCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Tanto para la solución de etanol como de peróxido de hidrogeno se observó efectos genotóxicos sobre los glóbulos rojos del pez cebr a partir a una ¼ parte de la CL₅₀ (Tablas 3 y 4).

Para el etanol, a una **concentración de 1 del CL₅₀** de cien células contabilizadas con repetición se observó entre 86 a 99 células con núcleos fragmentados (Tipo V), 1 célula con dos micronúcleos (Tipo II) y entre 1 a 2 células con un micronúcleo (Tipo I), entre 1

a 10 células con núcleo arriñonado (Tipo III), y entre 1 a 8 células con núcleo no uniforme y membrana nuclear rota (Tipo IV).

Para el etanol, a una **concentración de $\frac{1}{2}$ del CL_{50}** de cien células contabilizadas con repetición se observó entre 90 a 95 células con núcleos fragmentados (Tipo V) y entre 3 a 8 células con núcleo arriñonado (Tipo III), además 2 células con un micronúcleo (Tipo I), 1 a 2 células con un núcleo no uniforme y membrana nuclear rota (Tipo IV). Y ninguna célula con dos micronúcleos (Tipo II).

Para el etanol, a una **concentración de $\frac{1}{4}$ del CL_{50}** de cien células contabilizadas con repetición se observó entre 95 a 97 células con núcleos fragmentados (Tipo V) y entre 1 y 3 con núcleo arriñonado (Tipo III), 2 a 3 células con un núcleo no uniforme y membrana nuclear rota (Tipo IV). Y ninguna célula con dos micronúcleos (Tipo II), con ningún micronúcleo (Tipo I).

Para el peróxido de hidrógeno, a una **concentración de 1 del CL_{50}** de cien células contabilizadas con repetición se observó 1 a 2 células con un micronúcleo (Tipo I), entre 2 a 11 células con núcleo arriñonado (Tipo III) y entre 86 a 93 células con núcleo fragmentado (Tipo V), 2 a 8 células con núcleo no uniforme y membrana nuclear rota (Tipo IV). Y ninguna célula con dos micronúcleos (Tipo II).

Para el peróxido de hidrógeno, a una **concentración de $\frac{1}{2}$ del CL_{50}** de cien células contabilizadas con repetición se observó, entre 1 a 11 células con núcleo arriñonado (Tipo III) y entre 80 a 97 células con núcleo fragmentado (Tipo V), 1 a 4 células con núcleo no uniforme y membrana nuclear rota (Tipo IV). Y ninguna célula con un micronúcleo (Tipo I), ni célula con dos micronúcleos (Tipo II)

Para el peróxido de hidrógeno, a una **concentración de $\frac{1}{4}$ del CL_{50}** de cien células contabilizadas con repetición se observó, entre 2 a 10 células con núcleo arriñonado (Tipo III) y entre 80 a 98 células con núcleo fragmentado (Tipo V), 2 a 5 células con núcleo no uniforme y membrana nuclear rota (Tipo IV). Y ninguna célula con un micronúcleo (Tipo I), ni célula con dos micronúcleos (Tipo II).

Tabla 3. Presencia de Micronúcleos en las fracciones de CL₅₀ de Etanol.
Fracciones de CL₅₀ de Etanol (18964.11 mg.L-1)

Animal 1															Animal 2															
Fracción de la CL50															Fracción de la CL50															
1					½					¼					1					½					¼					
Tipo de MN	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V					
Nº por tipo	1	0	1	2	96	0	0	5	0	95	0	0	2	8	90	1	1	2	1	95	1	0	7	2	90	0	0	2	1	97
Nº total	100					100					100					100					100					100				

CL₅₀ de Etanol (18964.11 mg.L-1)

Animal 3															Animal 4															
Fracción de la CL50															Fracción de la CL50															
1					½					¼					1					½					¼					
Tipo de MN	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V					
Nº por tipo	1	0	1	1	97	1	0	2	0	97	0	0	2	0	98	1	0	1	3	95	0	0	2	3	95	0	0	2	1	97
Nº total	100					100					100					100					100					100				

Fracciones de CL₅₀ de Etanol (18964.11 mg.L-1)

Animal 5															
Fracción de la CL50															
1					½					¼					
Tipo de MN	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Nº por tipo	1	0	1	2	96	0	0	3	0	97	1	0	2	1	96
Nº total	100					100					100				

Tabla 4. Presencia de Micronúcleos en las fracciones de CL₅₀ de Peróxido de hidrógeno.

Fracciones del CL₅₀ de Peróxido de Hidrogeno (163.9 mg. L-1)

Animal 1															Animal 2														
Fracción de la CL50															Fracción de la CL50														
1					½					¼					1					½					¼				
I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
1	0	2	2	95	3	0	2	1	94	0	0	2	2	96	0	0	2	5	97	3	0	2	2	93	0	0	2	2	96
100					100					100					100					100					100				

Animal 3															Animal 4														
Fracción de la CL50															Fracción de la CL50														
1					½					¼					1					½					¼				
I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
0	0	8	0	92	0	0	5	6	89	0	0	4	3	93	0	0	9	3	88	3	0	2	3	92	0	0	3	7	90
100					100					100					100					100					100				

Fracciones del CL₅₀ de Peróxido de Hidrogeno (163.9 mg. L-1)

Animal 5															
Fracción de la CL50															
CL50	1					½					¼				
Tipo de MN	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Nº por tipo	2	1	8	2	87	0	0	1	8	91	1	0	1	4	94
Nº total	100					100					100				

En las Figuras 5, 6 y 7 se muestran los diferentes tipos de micronúcleos encontrados en este trabajo.



Fig. 5: Presencia de micronúcleos Tipo I (400x).



Fig. 6: Presencia de Micronúcleos tipo I y IV (400x).

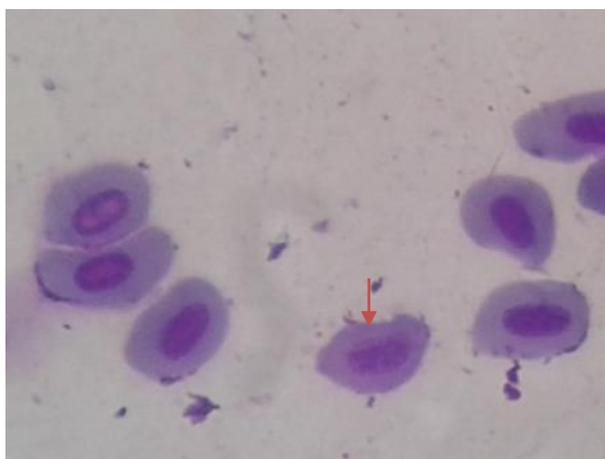


Fig. 7: Presencia de Micronúcleos tipo V. 400x.

Si analizamos los datos presentados en la tabla 3 con ayuda del SPSS podemos visualizar (Fig. 8 y 9) que en todas las evaluaciones de la CL₅₀, es decir, 1X, 1/2 X y 1/4X se ha obtenido como resultado un gran número de eritrocitos con MN tipo V luego de 24 horas de exposición al etanol.

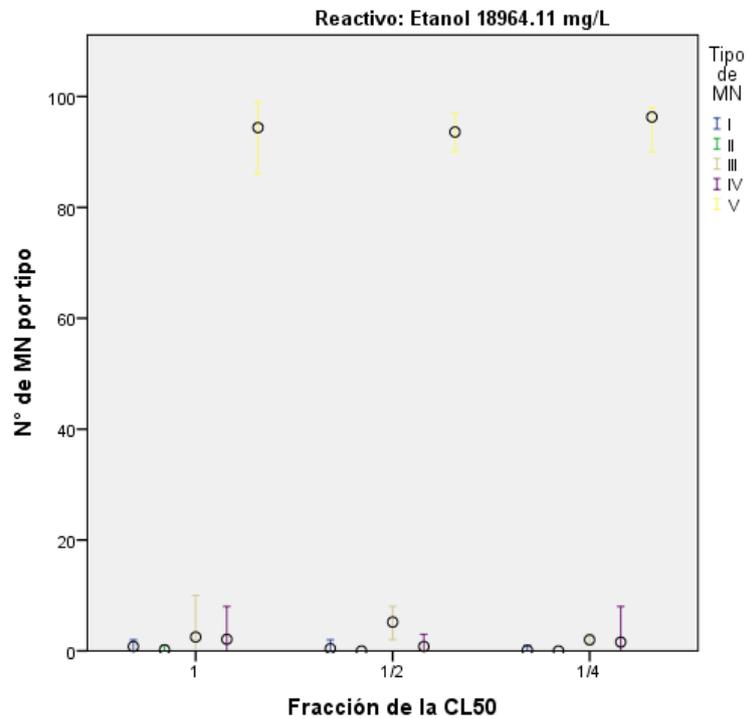


Fig. 8. Comparación del número de MN según la dilución del CL₅₀ de etanol.

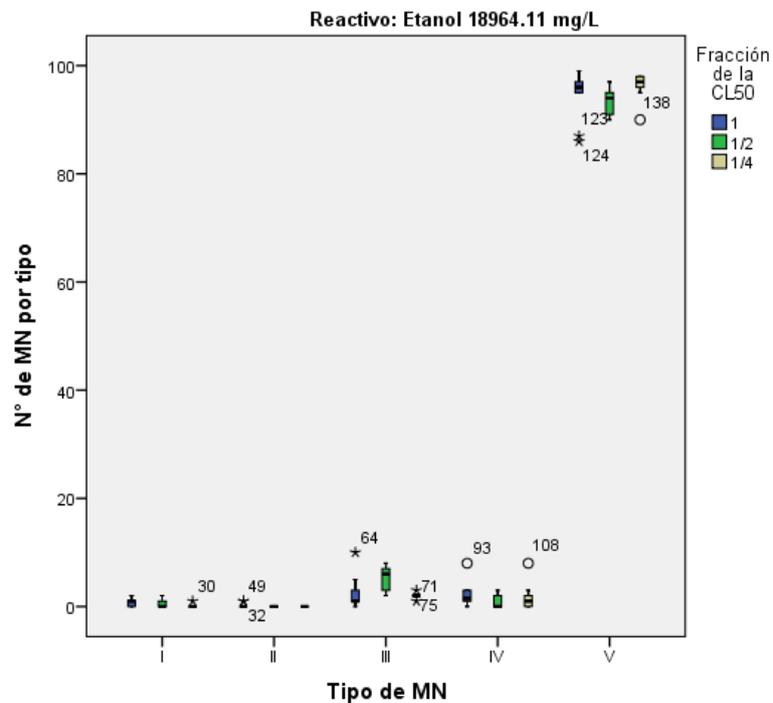


Fig. 9. Comparación del número de MN según el tipo de MN en CL₅₀ de etanol.

Por otro lado, si analizamos los datos presentados en la tabla 4 con ayuda del SPSS podemos visualizar (Fig. 10 y 11) que en todas las evaluaciones de la CL₅₀, es decir, 1X, 1/2 X y 1/4X se ha obtenido como resultado un gran número de eritrocitos con MN tipo V luego de 24 horas de exposición al peróxido de hidrógeno.

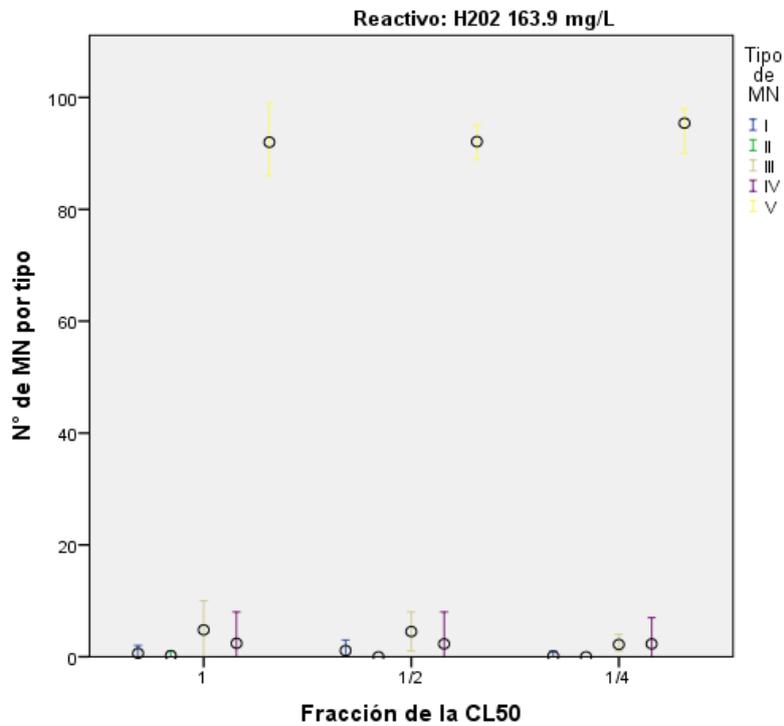


Fig. 10. Comparación del número de MN según la dilución del CL₅₀ de H₂O₂.

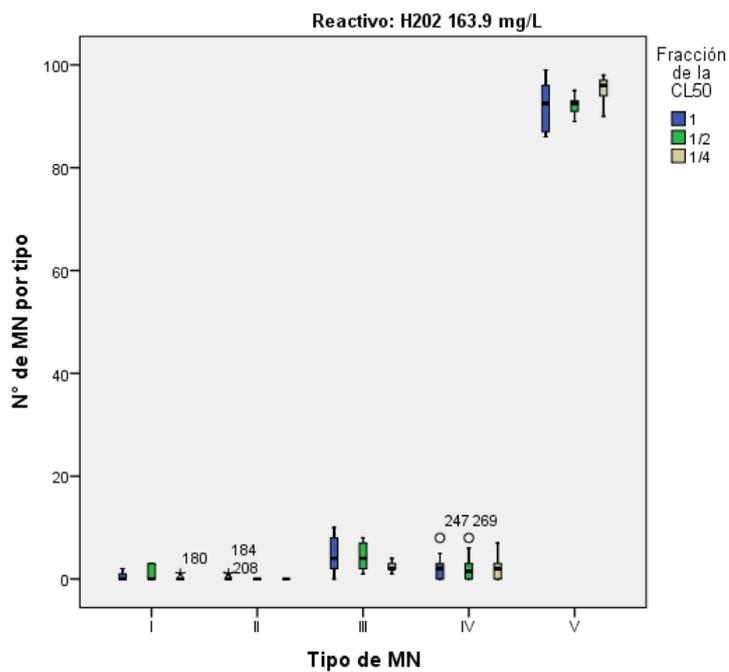


Fig. 11. Comparación del número de MN según el tipo de MN en CL₅₀ de H₂O₂.

5 DISCUSIONES.

La morfología de los eritrocitos maduros en individuos de *D. rerio* (Hamilton, 1822) no expuestos a etanol o peróxido de hidrógeno coinciden con la morfología de los eritrocitos normales de otras especies como *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) "carpa", *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) "goldfish" y otras especies de peces. El daño genético producido por el etanol y el peróxido de hidrógeno se observó por un incremento de micronúcleos en los eritrocitos de sangre periférica demostrando un efecto de dosis dependiente durante la exposición por 24 horas.

Los valores de CL₅₀ encontrado para Etanol fue de 2,27% (v/v) y del Peróxido de Hidrógeno fue casi ciento ochenta veces menor; 0.0128% (v/v). Sin embargo, comparando los resultados obtenidos con los realizados en *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) utilizando otros genotóxicos se encuentra alta variación en la formación de micronúcleos, así por ejemplo, en muestras de sangre periférica de *O. niloticus* a los dos días de exposición a ciclofosfamida muestra un valor de 14,68 ‰, con 5-fluorouracilo 1,25, con bleomicina 1,58, con mitomicina 1mg/kg 1,25, con mitomicina 2mg/kg 2,1 y a los tres días 3,8‰, con efluentes textiles 6,56 ‰, con atrazine 25ug/L 1,19 ‰, entre otros. Además, así como hay diferencias entre diferentes tipos de genotóxicos en cuanto a su capacidad de alterar al DNA, trabajos realizados en una misma especie ante un mismo genotóxico muestran diferencias en los valores de MN en diferentes tejidos (Torres de Lemos *et al.* 2007).

En relación a los tipos de micronúcleos encontrados, las frecuencias registradas a las 24 horas de tratamiento fueron significativamente mayores para el tipo V (células con núcleo fragmentado). Este marcador es factible de ser cuantificado de manera objetiva al igual que las células con micronúcleos y ser utilizados en los ensayos de genotoxicidad en peces. Según estudios previos, las alteraciones en las formas nucleares fueron clasificados en células con: un micronúcleo (Tipo I), con dos micronúcleos (Tipo II), con núcleo arriñonado (Tipo III) y con núcleo no uniforme y membrana nuclear rota (Tipo IV), núcleo fragmentado (Tipo V), son cuantificados de manera independiente y conjuntamente como una sola clasificación: anomalías nucleares. En todos los casos, las comparaciones entre tratamientos presentan un alto grado de significancia contrastable con el control negativo y positivo. En este trabajo se cuantificó como micronúcleo a todos las células con micronúcleos que tienen brotes nucleares claramente definidos.

Los mecanismos del proceso micronuclear o por efecto del peróxido de hidrógeno no se conoce. Sin embargo, la evidente presencia de micronúcleos por efecto del mismo, podrían ser indicios de un proceso apoptótico. Existen estudios en otras especies, de la inducción de apoptosis después de la exposición al peróxido de hidrógeno, relacionado con las alteraciones del potencial de membrana de las mitocondrias, el incremento de la actividad del citocromo c y de la proteína p53 (Kiechle, F. & Zhang, X. ,2007).

Una célula en fase S, es el blanco principal de cualquier agente genotóxico, por estar la cromatina descondensada para los procesos de replicación y transcripción. Se ha descrito una explicación de la presencia de micronúcleos por efecto de una hiperamplificación del DNA en la fase S o por efecto de una respuesta fisiológica celular como consecuencia de una poliploidización que tiende a eliminar el exceso de DNA, seguido de micronúcleos o minicélulas (Fernandes *et al.*, 2007).

Una hipótesis contraria plantea la formación micronúcleos como consecuencia de un proceso apoptótico ante el daño provocado por agentes genotóxicos. Existen evidencias de la hipodiploidización celular o disminución del contenido de ADN cuyo mecanismo no está esclarecido. Otros mecanismos, consideran que la formación de “nuclear bounds” es resultado de roturas de puentes anafásicos, o de cromosomas con migración retrasada que no son incluidos totalmente en el núcleo principal y que estarían sustentadas por la presencia de centrómero o telómero positivo en los micronúcleos (Pulido, M. & Parrish, A., 2003).

En relación con el proceso de micronucleación, el origen de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica, se debería a la ocurrencia de lesiones en el DNA principalmente en las células en interfase-S, por ejemplo (1) roturas en los brazos cromosómicos que conducirían a deleciones en el proceso anafásico, quedando rezagados fragmentos cromosómicos acéntricos con la consecuente formación de micronúcleos telómeros positivos, (2) roturas cromosómicas en los telómeros conducirían a la formación de puentes cromosómicos durante la anafase-telofase que al producirse roturas generarían micronúcleos, (3) cambios en las secuencias nucleótídicas de DNA centromérico o en las secuencias génicas de proteínas centroméricas y durante la migración cromosómica originarían cromosomas rezagados y micronúcleos de cromosomas enteros con una o dos cromátidas, (4) alteraciones en las secuencias génicas de enzimas comprometidas con la condensación cromosómica produciendo cromosomas pegajosos que no facilitan

una segregación cromosómica equitativa que podrían formar micronúcleos o minicélulas.

Carvan et al. (2004) realizaron un amplio estudio del efecto de la toxicidad del alcohol con el pez Cebra. La exposición de los embriones de pez Cebra a causa del alcohol produce ciclopía y anomalías craneofaciales y altera el desarrollo del cerebro medio y delantero. También induce anomalías en el desarrollo de la notocorda y la médula espinal, y la malformación del tronco del cuerpo como se evidencia en este estudio preliminar.

Aunque los datos más confiables para la extrapolación de los efectos tóxicos de los seres humanos se obtienen a través de estudios con roedores de laboratorio, estos son de elevado costo, consumen tiempo y por cuestiones bioéticas están más restringidos por la ley. Debido a que los genes, los receptores y los procesos moleculares son muy conservados a través de los filos animales, los estudios con animales de otras especies podrían ser representativos de los más complejos animales como el ser humano. En particular, los genes de la programación y el desarrollo en las etapas tempranas de vida de todos los vertebrados son muy conservados, en la medida en que hay importantes similitudes en la morfología de todos los embriones de vertebrados. Además, así como existe la transferencia transplacentaria de productos químicos del cuerpo de la madre al embrión y al feto de mamíferos, también se transfieren productos químicos de la hembra de los huevos de peces, anfibios y aves. El huevo se convierte en la fuente de embriones de exposición a sustancias químicas que se quieren estudiar.

En contraste con las especies más grandes, el diminuto tamaño de las larvas y los peces cebra adultos minimiza los costos a través de pequeñas cantidades de soluciones de dosificación (productos químicos, medicamentos, contaminantes) y por lo tanto crea limitados volúmenes de residuos para su eliminación y reduce al mínimo las cantidades de material de laboratorio y productos químicos, tanto para el tratamiento y mantenimiento de los peces y para realizar diversos análisis (pequeñas cantidades de reactivos) y las evaluaciones histológicas (pequeña cantidad de incrustación de materiales y portaobjetos). Además, los embriones pequeños permiten realizar múltiples ensayos y repeticiones en una sola placa de cultivo celular o serie de placas de Petri para proveer varias réplicas experimentales al mismo tiempo. Esto permite un alto rendimiento para las pruebas de toxicidad, la detección de moléculas pequeñas, y

detección de drogas. Desde la etapa de huevo, los embriones de pez Cebra pueden sobrevivir durante varios días y evaluarse cualquier malformación embrionaria.

6 CONCLUSIONES.

1. Tanto para la solución de etanol como de peróxido de hidrógeno se observó efectos genotóxicos sobre los glóbulos rojos del pez Cebra a partir desde una cuarta parte de la CL_{50} . (etanol es $18\,964.80\text{ mg.L}^{-1}$ y peróxido de hidrogeno fue 163.9 mg.L^{-1})
2. Para el etanol y el peróxido de hidrógeno se observaron células con núcleos fragmentados (Tipo V), células con dos micronúcleos (Tipo II), células con un micronúcleo (Tipo I), células con núcleo arriñonado (Tipo III) y células con núcleo no uniforme y membrana nuclear rota (Tipo IV).
3. Para el etanol y el peróxido de hidrógeno se observaron mayormente células con núcleos fragmentados (Tipo V) para todas las fracciones del CL_{50} . En menor número se encontró células con núcleo arriñonado (Tipo III) y células con núcleo no uniforme y membrana nuclear rota (Tipo IV) seguido de células con dos micronúcleos (Tipo II) y células con un micronúcleo (Tipo I).
4. Se logró observar micronúcleos en un tiempo aproximado de 2 horas de procesamiento acortándose el tiempo de otras metodologías al reducirse el número de pasos normalmente seguidos por la mayoría de protocolos. Así mismo, se eliminó el uso de ácido acético glacial que redujo los costos de procesamiento que habitualmente utilizan este reactivo.

7. RECOMENDACIONES.

- Realizar ensayos con diferentes contaminantes o agentes mutagénicos. Como por ejemplo ciclofosfamida, mercurio, arsénico, cianuro, entre otros.
- Evaluar el daño genotóxico a las 48, 72 y 96 horas de exposición del contaminante a elegir con la finalidad de medir daño crónico.
- Comparar el ensayo de micronúcleos utilizando diferentes colorantes que puedan teñir el núcleo de las células. Como por ejemplo Wright, Hematoxilina-Eosina u otra que sirva para teñir el núcleo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anitha, B., N. Chandra, P.M. Gopinath & G. Durairaj. (2000). Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*). Mutation Research, 469: 1-8.
- Asociación Toxicológica Argentina (2007). Acta Toxicológica Argentina. 15 (suplemento). ISSN 0327-9286.
- Ayala, M., Hernández, Y., Piñeiro, J., Gonzales, E. (2004). Uso Del ensayo de cometa para evaluar El efecto de La temperatura sobre la reparación del daño genético inducido por peróxido de hidrógeno y la radiación ultravioleta en células sanguíneas humanas. Acta Farm. Bonaerense 23 (3): 277-84
- Benítez-Leite S, Macchi ML, Fernández V, Franco D, Ferro EA, Mojoli A, Cuevas F, Alfonso J, Sales L. Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. Pediatr. (Asunción), Vol. 37; Nº 2; 2010
- Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, *et-al.* An increased micronucleus frequency in peripheral, blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis. 2007; 28 (3):625-31.
- Borrego, J., Pérez, P., Ibarra, O., Pérez, J. 1998. Ingestión letal de peróxido de hidrógeno. Nota Clínica. Anales Españoles de Pediatría. 18:647-649.
- Camacho, G., Morán, J., Betancourt, N., Monreal K., Benitez, M. 2010. Evaluación por ensayo cometa de daño celular inducido con peróxido de hidrógeno a linfocitos de sangre periférica *In vitro*. Departamento de Biología Celular. Universidad Autónoma de Aguas Calientes, México.
- Carvan, M.; Loucks, E.; Weber, D. & Williams, F. (2004). Ethanol effects on the developing zebrafish: neurobehavior and skeletal morphogenesis. Neurotoxicology and Teratology, 26:757–768.
- Cayuela, P., Alcaraz, F., Angélin, M. 2012. El pez cebra al servicio de la investigación en cáncer. Revista Eubacteria. 28:1-4. ISSN-1697-0071.

- Cavas, T. & Ergene-Gözükara, S. 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat Res.*, 538(1-2): 81-91.
- COLL J.M., 2001. El transposon SB de salmonidos como vector para transferencia de genes en vertebrados. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* Vol. 16 (2), 237-244.
- CometAssay. Catalog Number TA800 (2000).
http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/RSD_/TA800.20051227.pdf
- Conde, J. (2004). Daño en sangre periférica de ratones mutantes de catalasa. Trabajo para obtener el grado de licenciatura en Biología. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- De Flora, S., L. Vigano, F. D'Agostini, A. Camoirano, M. Bagnasco, C. Bennicelli, F. Melodia & A. Arillo (1993). Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Research*, 319: 167-177.
- Detrich H., Westerfield M., Zon L 1999. The zebrafish: Biology, Genetics and Genomics. *Methods in Cell Biology*. Academic Press, N.Y. 59, 60.
- Di Giorgio, M., Taja, M., Nasazzi, N., Bustos, N.; Cavaliere, H., Bolgiani, A. (2001). El ensayo de cometa como herramienta de la dosimetría biológica en la evaluación de sobreexposiciones fuertemente localizadas. 5th Regional Congress on Radiation Protection and Safety, Recife, Brasil.
- Estruch, R. (2002). Efectos del alcohol en la fisiología humana. *Adicciones*. 14(1):43-61.
- Fernandes, T., Mazzeo, D. & Marin-Morales, M. (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pest Biochem Physiol.*; 88(3): 252-59.

- Hill, A., Teraoka, H., Heideman, W. & Peterson, R. (2004). Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. 103-108.
- Ivics Z., Izsvak Z., Hackett P.B., 1997. Molecular reconstruction of sleeping beauty, a Tc1-like transposon system from fish and its transposition in human cells. *Cell*. 91, 501-510.
- Izsvak Z., Ivics Z., Hackett P.B., 1997. Repetitive elements and their genetic applications in zebrafish. *Biochemical Cell Biology*. 75, 507-523.
- Kiechle, F. & Zhang, X. 2007. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta.*; 326(1-2): 27-45.
- Kotwani, A.; Mehta, V.; Gupta, U.; Prabhu, S. & Bapna, J. (1995). Methods for teratogenicity testing - existing and future models. *Indian Journal of Pharmacology*. 27:204–213.
- Maldonado, E. 2003. Experimentación en el pez cebra, un modelo de biología del desarrollo. *Mensaje bioquímico*. 27:147-156. ISSN-0188-137X.
- McHugh, Nombre completo... Es un solo autor...! (2001). Mechanistic considerations in small fish carcinogenity testing. *Ilar Journal*. Vol. 42(4): 274-284.
- McMurry, J. 2004. Química Orgánica 6ta edición. Madrid. 623-624.
- Medina, G. 2006. Efecto del Alcohol etílico sobre la actividad específica de aminopeptidas reguladoras de neuropeptidos en neuronas y astrogliá en cultivo. Trabajo de investigación de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad de Jaén – España.
- Neri M, Ugolini D, Bonassi S, Fucic A, Holland N, Knudsen LE, *et-al*. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat Res*. 2006;612(1):14-39.

- Organización Marítima Internacional. (2006). Código IMDG, Código Internacional de Mercancías Peligrosas. Londres. Vol I. ISBN 978-92-801-0132-4.
- Palhares, D. & Grisolia, C. 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genet Mol Biol.* 25(3): 281-84.
- Prieto García, F., Báez, O., Scoot, W., Gaytán, C. & Zúñiga, A. (2006). Revista científica de la Sociedad Española de Acuicultura. No. 24:72-85.
- Pulido, M. & Parrish, A. 2003. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res.;* 533(1-2): 227-41.
- Rocha, A., Ruiz, S. & Coll, J. (2002). Método sencillo para producir huevos embrionados de pez cebra. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* Vol. 17 (1-2).
- Rojas-Muñoz, A., Bernad Miana a., Izipisúa Belmonte, J., (2007). El pez cebra, Versatilidad al servicio de la biomedicina. *Revista Investigación y Ciencia.* Salk Institute for Biological Studies.
- Ruíz-Bernes, S., Flores A., Ramos, M., Moya, M., Aguiar, P., Sanchez, R., Torres, O. 2013. Micronúcleos en células de mucosa bical como bioindicador de riesgo para cáncer. *Revista Fuente Nueva Época.* 4(13):34-39. ISSN-2007-0713.
- Tejedor, I. 2011. Biomonitorio de células bucales a partir de micronúcleos en soldadores de metales en Cartagena (Bolívar). Tesis para optar el grado de magister en toxicología en la Universidad Nacional de Colombia.
- Torres de Lemos, C., Milan Rödel, P., Regina Terra, N., D'Avila de Oliveira, N. & Erdtmann, B. (2007). River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicol Environ Saf.;* 66(3):391-401.
- Valenciano, G. 1995. Micronucleos (MN) e intercambio de cromatides hermanas (ICH) como pruebas indicadoras de la acción mutagénica de diazepam y del difenilhidantoniato de sodio. Tesis para optar el grado de Magister en Ciencias con especialidad en Genética. Universidad Autónoma de Nueva León. México.

- Wade, L. (2004). Química Orgánica. 5ta edición. España. 413-415.
- Westerfield M., 1995. The zebrafish book. Guide fpor laboratory use of zebrafish (Danio rerio). 3rd.ed. In Univ. Oregon Press, Eugene, USA.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	4
2.1 Antecedentes	4
2.2 Generalidades	5
2.2.1 Pez Cebra (<i>Danio rerio</i>)	5
2.2.2 Prueba de Micronúcleos	7
2.2.3 Concentración letal media	9
2.2.4 Peróxido de Hidrogeno	9
2.2.5 Etanol	9
3. Metodología	11
3.1 Materiales	11
3.2 Métodos	11
3.2.1 Tipos de estudio	11
3.2.2 Localización	12
3.2.3 Características y manejos de <i>Danio rerio</i>	12
3.2.4 Población y muestra de estudio	12
3.2.5 Prueba de micronuleos	13
3.2.6 Técnicas de recolección de datos	13
3.2.7 Técnicas de análisis y procesamientos de datos	13
4. Resultados	15
4.1 Concentración letal	15
4.2 Fraccionamiento de la concertación Letal Media (CL ₅₀) para la solución de etanol y al solución de peróxido de hidrogeno	16
5. Discusiones	22
6. Conclusiones	26
7. Recomendaciones	27
8. Referencias bibliográficas	28

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Pez cebra (<i>Danio rerio</i>).	4
Figura 2: Pez cebra fluorescente (GFP)	6
Figura 3: Pez cebra línea Casper	6
Figura 4: Esquema que explica la formación de los Micronúcleos	7
Figura 5: Tipos de micronúcleos producidos por daño genotóxico sobre los glóbulos rojos en el pez cebra <i>Danio rerio</i>	20
Figura 6: Presencia de Micronúcleos tipo I y IV (400x)	20
Figura 7: Presencia de Micronúcleos tipo V. 400x	20
Figura 8: Comparación del número de micronucleos según la dilución del CL ₅₀ de etanol	21
Figura 9: Comparación del número de micronucleos según el tipo de micronucleos en CL ₅₀ de etanol	21
Figura 10: Comparación del número de micronucleos según la dilución del CL ₅₀ de H ₂ O ₂ .	22
Figura 11: Comparación del número de micronucleos según el tipo de micronucleos en CL ₅₀ de H ₂ O ₂ .	22

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Toxicidad aguda de etanol entre las 2 h hasta las 24 h en <i>Danio rerio</i>	15
Tabla 2. Toxicidad aguda de peróxido de hidrogeno entre las 2 h hasta las 24 h en <i>Danio rerio</i>	16
Tabla 3. Presencia de Micronúcleos en las fracciones de CL ₅₀ de Etanol.	18
Tabla 4. Presencia de Micronúcleos en las fracciones de CL ₅₀ de Peróxido de hidrógeno	19