

## Pez cebra (*Danio rerio*): modelo experimental en la evaluación de compuestos xenobióticos

## Zebrafish (*Danio rerio*): experimental model in the evaluation of xenobiotic compounds

D. L. Castillo-Salas <sup>a,\*</sup>, J. C. Gaytán-Oyarzun <sup>a</sup>, M. López-Herrera <sup>a</sup>, M. A. Sánchez-Olivares <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Área Académica de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42184, Pachuca, Hidalgo, México.

### Resumen

Actualmente, los compuestos xenobióticos representan un potencial de riesgo para la salud humana y la biodiversidad. Por consiguiente, la búsqueda de nuevas herramientas que permitan contribuir a la investigación de los efectos potenciales de estas sustancias es de gran relevancia para la identificación, evaluación de efectos y mecanismos de acción de agentes nocivos para la salud. En los últimos 30 años, *Danio rerio* se ha convertido en uno de los sistemas biológicos más importantes y utilizados en diversas áreas científicas, entre las que destaca la toxicología. En este contexto, *D. rerio* presenta varias ventajas como bioensayo y/o biomonitor siendo un organismo ideal para estudiar múltiples efectos biológicos dentro del área toxicológica.

**Palabras Clave:** *Danio rerio*, xenobiótico, modelo experimental, teratogénesis, genotoxicidad.

### Abstract

Currently, xenobiotic compounds represent a potential risk to human health and biodiversity. Therefore, the search for new tools to contribute to the investigation of the potential effects of these substances is of great relevance for the identification, evaluation of effects and mechanisms of action of agents harmful to health. In the last 30 years, *Danio rerio* has become one of the most important biological systems used in several scientific areas, among which toxicology stands out. In this context, *D. rerio* has several advantages as a bioassay and/or biomonitor and is an ideal organism to study multiple biological effects within the toxicological area.

**Keywords:** *Danio rerio*, xenobiotic, experimental model, teratogenesis, genotoxicity.

## 1. Introducción

La búsqueda por explorar nuevas medidas que documenten el alcance de la exposición y los efectos de la contaminación ambiental ha permitido el desarrollo de diversos indicadores biológicos que faciliten la estimación del daño con datos fáciles de observar y cuantificar. Los peces están íntimamente ligados a su hábitat acuoso, respiran osmoregulan, alcanzan equilibrio ácido-base y obtienen su carácter térmico en relación con el agua circundante, sus adaptaciones estructurales y fisiológicas les permiten interactuar con compuestos xenobióticos que se encuentran en el medio circundante (Kleinow *et al.*, 2008). En este contexto, el pez cebrera (*Danio rerio*), ha sido utilizado como modelo

experimental en diversas áreas científicas, con el propósito de realizar evaluaciones no solo toxicológicas, sino también con aplicaciones médicas gracias a su sensibilidad ante diversos compuestos químicos (Valles *et al.*, 2018). La importancia de *D. rerio* dentro del ámbito científico como modelo experimental, radica en su patrón de desarrollo al de los vertebrados superiores, incluidos los mamíferos, teniendo similitudes de su genoma con el humano (Moreno, 2013).

## 2. Ventajas como bioensayo en la toxicología

Una de las ramas en las que *D. rerio* destaca considerablemente es en el ámbito de la toxicología, ya que sus características morfológicas y fisiológicas lo convierten en un

\*Autor para la correspondencia: ca295625@uaeh.edu.mx

Correo electrónico: ca295625@uaeh.edu.mx (Diana Laura Castillo Salas); jcgaytan@uaeh.edu.mx (Juan Carlos Gaytán Oyarzun); maritzalh2003@gmail.com (Maritza López Herrera); sa394513@uaeh.edu.mx (Marco Antonio Sánchez Olivares).

bioensayo adaptable a condiciones de laboratorio, agregando que se puede inducir su conducta reproductiva, el desarrollo embrionario es externo (ovovivíparo), está ampliamente descrito y cuenta con una abundante descendencia en un corto periodo de eclosión (72 h), los huevos son manipulables con una membrana traslúcida y semipermeable; amplio conocimiento de su biología básica y genoma, además de su alto grado de semejanza genética y fisiológica con el ser humano. Concluyendo así, que *D. rerio* es un organismo experimental óptimo para el estudio de múltiples efectos biológicos asociados a la exposición de xenobióticos (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007; Moreno, 2013; Mussali-Galante *et al.*, 2013; Covarrubias-López, 2018; Estévez *et al.*, 2019) como pueden ser embriotoxicidad y teratogénesis (Sánchez-Olivares *et al.*, 2021; ATSDR, 2000), genotoxicidad (Qi *et al.*, 2000; De Lemos *et al.*, 2001; Normann *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2019) y alteraciones en el metabolismo (Begum *et al.*, 2006; Oner *et al.*, 2008). Estas pruebas proporcionan información de referencia que puede ser utilizada para evaluar los riesgos de estos compuestos bajo diversos métodos de exposición (Rinkwitz *et al.*, 2011; Zada *et al.*, 2014).

### 3. Determinación de efectos letales en peces

La evaluación de la toxicidad se realiza a través de establecer la relación dosis respuesta y la relación dosis efecto, las cuales funcionan como herramientas principales en este tipo de investigación. En el caso de *D. rerio*, están establecidas varias metodologías para evaluar el efecto letal (sistémico) asociado a la exposición a un xenobiótico en organismos adultos y en embriones.

Para el análisis de efectos letales en adultos, se recomiendan las metodologías propuestas por Rivera (2006) y Cruz (2012) para determinar la  $CL_{50}$  de diferentes xenobióticos, consistiendo en exposiciones a altas concentraciones en tiempos cortos por 24 hrs. de manera dérmica, oral y respiratoria, simultáneamente.

Mientras que para la determinación de los efectos letales en embriones, una de las metodologías que más se usan es la descrita en el 2013, por el Grupo de Trabajo de Coordinadores Nacionales (WNT, por sus siglas en inglés), del Programa de Directrices de Pruebas de la OCDE, denominada la “Prueba de toxicidad en embriones de peces” (FET, por sus siglas en inglés) (Braunbeck *et al.*, 2014).

#### 3.1 Prueba de toxicidad en embriones de peces” (FET)

Originalmente FET, fue diseñado como una alternativa a las pruebas agudas para peces, ya que esta solo detecta efectos en peces adultos, mientras que FET evalúa el desarrollo completo del huevo y embrionario hasta la eclosión, sustentándose en que la membrana de los huevos es semipermeable, permitiendo una exposición sin métodos invasivos (Braunbeck *et al.*, 2014).

De acuerdo con Braunbeck *et al.* (2014) los embriones de Danio rerio recién fertilizados están expuestos al químico de prueba durante un total de 96 h. Cada 24 h, se registran hasta cuatro observaciones apicales como indicadores de letalidad: (1) coagulación de huevos fertilizados, (2) falta de formación de somitas, (3) falta de desprendimiento de la yema de la cola del saco vitelino, y (4) falta de latidos cardíacos.

### 4. Teratogénesis

La teratogénesis es el proceso por el cual se producen anomalías estructurales o funcionales durante el desarrollo embrionario, que puede ir desde la muerte fetal o embrionaria, pasando por el retraso de crecimiento y patrones distintivos de malformaciones anatómicas o alteraciones fisiológicas (Roldán, 2016).

Entre las causas que generan este fenómeno se incluyen factores genéticos y ambientales; dentro de los efectos ambientales o inducidos, pueden deberse a la exposición o contacto con agentes teratógenos físicos, químicos o biológicos. Estos agentes ocasionan anomalías en los siguientes procesos celulares: división, migración y apoptosis, afectando la histogénesis general o alterando la exposición génica de grupos de células particulares, así como, cambiar las características celulares (Roldán, 2016).

La capacidad de inducir un efecto teratogénico inducido por agentes físicos, químicos o biológicos, se conoce como “Potencial Efecto Teratogénico (pET)” y se refiere a la capacidad potencial de compuestos xenobióticos para producir malformaciones o defectos en la descendencia; este efecto se refleja por la producción o incremento de la frecuencia de malformaciones estructurales, congénitas, no-hereditarias, en la progenie, visualmente detectables al nacimiento; que pueden ser asociadas a la exposición durante el desarrollo embrionario, de acuerdo a la FDA (Food and Drugs Administration) (McQueen, 2018). Se han establecido 5 categorías para indicar el potencial teratogénico de un compuesto xenobiótico (A, B, C, D y X).

- **Categoría A:** Los estudios controlados en mujeres no evidencian riesgo para el feto durante el primer trimestre y la posibilidad de daño fetal parece remota o se desconocen reportes de daño teratogénico (McQueen, 2018).
- **Categoría B:** Los estudios en animales no indican riesgo para el feto y, no existen estudios controlados en humanos o los estudios en animales si indican un efecto adverso para el feto, pero, en estudios con mujeres gestantes no ha sido demostrado riesgo fetal (McQueen, 2018).
- **Categoría C:** Los estudios en animales han demostrado que los compuestos químicos ejercen efectos teratogénicos o embriocidas, pero, no existen estudios controlados con mujeres gestantes o no se dispone de estudios ni en animales ni en mujeres (McQueen, 2018).
- **Categoría D:** Existe evidencia positiva de riesgo fetal en humanos.
- **Categoría X:** Los estudios en animales o en humanos han demostrado anomalías fetales o existe evidencia de riesgo fetal basada en la exposición con seres humanos, o son aplicables las dos situaciones (McQueen, 2018).

Diversas agencias en materia de salud pública como Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA) y Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW), han empleado diferentes ensayos clínicos para evaluar la inocuidad de productos de interés público, tal es el caso de

alimentos, medicamentos, cosméticos, productos biológicos, entre otros. Entre estos análisis, se encuentran las pruebas de teratogénesis, mismas que son necesarias en la aprobación de productos químicos, por lo que tienen que pasar rigurosos bioensayos en organismos mamíferos y no mamíferos (McQueen, 2018), entre los que destaca el uso de *Danio rerio*.

#### 4.1 *Danio rerio* Teratology Assay (DarTA)

La prueba DarTA, es un modelo alternativo de estudio de efecto teratogénico en un sistema no mamífero, con ventajas en costo, tiempo y cuestiones éticas. Evalúa a diferentes concentraciones, el daño teratogénico de compuestos xenobióticos durante el desarrollo embrionario y posterior a la eclosión, permitiendo registrar biomarcadores morfológicos como: malformaciones en columna vertebral, opérculo, aleta y alteraciones cardíacas (edemas del saco vitelino y pericárdico) (Rivera, 2006; Gaytán *et al.*, 2008; Sánchez-Olivares *et al.*, 2021; Sánchez-Olivares, 2021).

Siguiendo el método descrito por diversos autores, la prueba consiste en el tratamiento de entre 180 a 200 embriones (Rivera, 2006; Gaytán *et al.*, 2008), o incluso 450 embriones (Sánchez-Olivares *et al.*, 2021), en lotes experimentales con la finalidad de exponerlos embriones a diferentes concentraciones del compuesto xenobiótico a evaluar. La observación de daño morfo-fisiológico se realiza directamente en placas Petri utilizando microscopio estereoscópico a las 72 horas comenzada la exposición (Rivera, 2006; Gaytán *et al.*, 2008; Sánchez-Olivares *et al.*, 2021).

En años recientes, Sánchez-Olivares *et al.* (2021), describen que las anomalías se pueden clasificar de acuerdo con el tiempo de expresión, es decir, la malformación aparece durante las primeras etapas del desarrollo embrionario en contacto con el compuesto químico (malformaciones tempranas) o durante los últimos estadios del desarrollo embrionario los cuales son evidentes en el proceso de eclosión del embrión (malformaciones tardías) (Fig. 1). Los principales biomarcadores de esta prueba son: columna vertebral, opérculo y aleta, siendo el de la columna vertebral el biomarcador con mejores resultados observados, ya que se desarrolla al 100% después de las 72 horas del desarrollo embrionario (eclosión), mientras que las malformaciones de opérculo y aleta se hacen evidentes hasta las 96 hrs después de la eclosión (Fig. 2). (Rodríguez-Anaya, 2015). Las alteraciones morfológicas a nivel cardíaco también pueden ser evaluadas y registradas durante la observación, estas pueden ser edemas del saco vitelino y edemas pericárdicos, entre otros (Nagel, 2002; Sánchez-Olivares *et al.*, 2021).

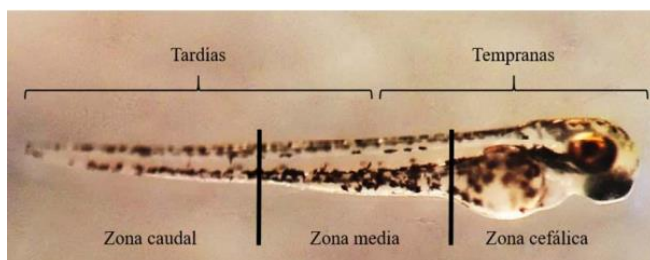


Figura 1: Divisiones del cuerpo del alevín de *D. rerio* sin daños en columna vertebral (Tomado de Sánchez-Olivares, 2021).

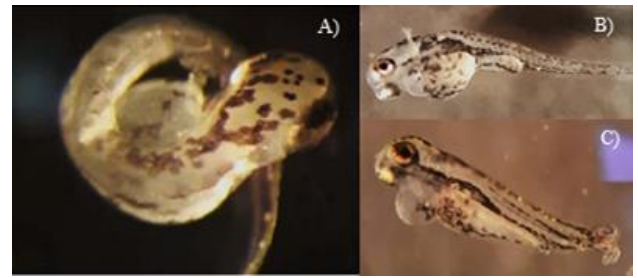


Figura 2: **A)** Alevín con daño en la columna vertebral en forma de curva. **B)** La columna presenta dobleces visibles. **C)** El daño se observa en la zona caudal (Tomado de Sánchez-Olivares, 2021).

## 5. Genotoxicidad

La genotoxicidad es el estudio del daño genético al material hereditario resultante en alteraciones genéticas. Se incluyen agentes químicos y físicos que causan mutagenicidad o alteraciones genéticas transmisibles y genotoxicidad (Dixit y Kumar, 2017; Klapacz y Bhaskar, 2019). La genotoxicidad cubre criterios de valoración como lo son roturas, daño de cadenas de ADN, biomarcadores de aductos de ADN, mecanismos por los que se produce el daño y las respuestas celulares frente a ese daño (Klapacz y Bhaskar, 2019), mientras que la mutagénesis se refiere a los cambios en el ADN, debido a la exposición a ciertos mutágenos (ya sea agentes físicos, químicos o biológicos) y las células carecen de la capacidad para reparar los cromosomas dañados (Dixit y Kumar, 2017). Las mutaciones se pueden dividir en tres categorías importantes:

- **Mutaciones genéticas:** En esta categoría se incluyen la transición, transversión, desplazamiento de marco, mutación neutra, silenciosa y mutación sin sentido o sentido perdido (Dixit y Kumar, 2017).
- **Mutaciones cromosómicas:** Aquí se encuentran las que se tratan de una delección, duplicación, inversión o traslocación de un grupo de genes (Dixit y Kumar, 2017).
- **Mutaciones del genoma:** Estas mutaciones incluyen aneuploidías, como monosómica, nulisómica, doble monosómica, trisómica, doble trisómica y tetrasómica (Dixit y Kumar, 2017).

La evaluación del daño genético mediante el uso de una combinación de diferentes ensayos como, *in silico*, *in vitro* e *in vivo* permitirán utilizar un enfoque de ponderación de la evidencia para llegar a una conclusión sobre el potencial mutagénico o carcinogénico de una sustancia química (Stice *et al.*, 2019).

Existe cierta confusión entre la genotoxicidad con la mutagenicidad, sin embargo, Mohamed *et al.* (2017), explica que los genotóxicos presentan categorías de acuerdo con sus efectos, por lo que se consideran como biomarcadores de efecto por su evaluación de las secuelas por compuestos xenobióticos, que pueden desembocar en una enfermedad clínica (Mussali-Galante *et al.*, 2013). Se pueden nombrar tres categorías: mutágenos, carcinógenos y teratogénicos (Repetto y Repetto, 2009).

▪ **Mutágenos:** Estas compuestos son capaces de provocar cambios en el ADN que se transmiten durante la división celular, ya sea en células germinales o somáticas (Aleksunes y Eaton, 2019). En este tipo de compuestos, podemos encontrar los responsables de causar respuestas clastogénicas y aneugénicas en los cromosomas (Krishna y Gopalakrishnan, 2016).

○ **Clastógenos:** Los agentes clastógenos ocasionan alteraciones cromosómicas con acción directa sobre el ADN, induciendo rompimientos de las cadenas de ADN. Estos tóxicos están relacionados con la formación de Aberraciones Cromosómicas Estructurales (ACE), como lo son los micronúcleos, ya que estos se originan a partir de fragmentos de cromosomas (Krishna y Gopalakrishnan, 2016; Roldán, 2016).

○ **Aneugénicos:** Son compuestos que se ejercen su acción sobre diversas estructuras que se ven involucradas tanto en la división celular, como en los cromosomas mismos. Son capaces de producir aneuploidías, las cuales son anomalías numéricas en donde aumenta o disminuye el número de cromosomas ya sea de células diploides o haploides (Roldán, 2016).

▪ **Cancerígenos:** Cuando los mutágenos modifican la capacidad de la célula para controlar su reproducción y se estimula la proliferación celular, conducen a la formación de una población de células genéticamente diferentes de la original, que llegan a desarrollar variantes genéticas susceptibles al cáncer. Siendo así que no todos los mutágenos son cancerígenos y no todos los cancerígenos son mutágenos (Repetto y Repetto, 2009; Gupta, 2016).

▪ **Teratógenos:** Los teratógenos son compuestos capaces de producir malformaciones fetales, siendo el periodo embrionario el más susceptible a daño teratogénico (Repetto y Repetto, 2009). Estos agentes actúan en la división, migración y apoptosis de la división celular (Roldán, 2016).

### 5.1 Micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica

De los biomarcadores mayormente utilizados para la detección del daño al ADN se encuentran los micronúcleos (Zúñiga et al., 2001; Cristaldi et al., 2004). Los micronúcleos se originan durante la división celular, si el proceso de replicación es alterado o existe una ruptura de cromosomas, la distribución del material genético durante el anafase de la división celular se puede ver afectada, de manera que cromosomas enteros o fragmentados de estos no se incorporan al núcleo principal de las células hijas. En la telofase, estas estructuras cromosómicas se envuelven en membrana celular y asumen gradualmente la morfología y demás características de un núcleo en interfase, con un tamaño menor que el primario (Holland et al., 2008; Bolognesi y Hayashi, 2011; Simoniello, 2010). Esto puede ser visualizado por la presencia de estructuras derivadas del núcleo, más pequeñas y que pueden contener o bien cromosomas enteros o bien fragmentados cromosómicos derivados de roturas no reparadas (Terradas et al., 2010).

En diversas líneas celulares y tejidos, la prueba de micronúcleos posee un alto valor predictivo en estudios que tratan de detectar efectos citogenéticos en exposiciones ocupacionales y medioambientales. Una de las líneas celulares más utilizadas es la prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica (Fig. 3) (Torres-Bugarin et al., 2007; Ahmed et al., 2011). Este análisis es un test que se encuentra estandarizado como biomarcador de daño genotóxico de diferentes compuestos xenobióticos (Bolognesi et al., 2011).

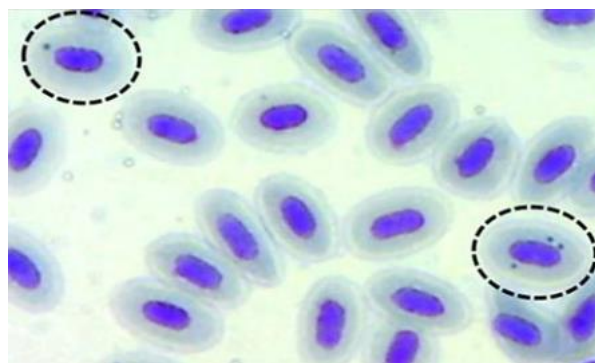


Figura 3: Vista al microscopio de eritrocitos de *D. rerio* (Tomado de Shaw et al., 2019).

## 6. Conclusiones

El conjunto de las características fisiológicas, morfológicas y genéticas de *Danio rerio*, le confieren ventaja como bioensayo en toxicología para evaluar xenobióticos que pudieran relacionarse con efectos deletéreos en la biota, permitiendo así, analizar una gran diversidad de sustancias peligrosas como metales pesados, pesticidas, hidrocarburos, contaminantes emergentes, entre otros; siendo por lo tanto un modelo no mamífero muy versátil, económico y eficiente en el área de la toxicología. Sin embargo, aún queda un largo camino sobre la difusión, aplicación e implementación de ciertas metodologías dentro de la ecotoxicología, que sin duda son áreas de oportunidad para el crecimiento y desarrollo en la investigación experimental con *D. rerio* como un bioensayo de referencia.

## Referencias

- Ahmed, M. K., Habibullah-Al-Mamun, M., Hossain, M. A., Arif, M., Parvin, E., Akter, M. S., Khan, M. S. y Islam, M. M. (2011). Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*, 84(1), 143-149. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.02.025.
- Aleksunes, L. M. y Eaton, D. L. (2019). Principles of Toxicology. En Klaassen, C. D. (Ed.), *Casarett & Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons* (pp. 25-64). McGraw-Hill Education.
- Barrio, D., Ávila, A., Solimano, P., Piñuel, L., Boeri, P., Zubillaga, F. y Cantoni, G. E. (2015). El pez cebrá (*Danio rerio*) como un sistema modelo para la valoración biológica de las toxinas producidas por la marea roja. *SNS* 8.
- Begum, G., Rao, J. V. y Srikanth, K. (2006). Oxidative stress and changes in locomotor behavior and gill morphology of *Gambusia affinis* exposed to chromium. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 88: 355365. DOI: 10.1080/02772240600635985
- Bolognesi, C. y Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205-213. DOI: 10.1093/mutage/geq073
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggeri, P., Pampanin, D. y Sciotto, A. (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish

- Exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*, 78(1), 93-98.
- Covarrubias-López, A. C. (2018). Toxicidad del plomo en el pez cebra (*Danio rerio*). Tesis de posgrado. Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Pue. México.
- Cristaldi, M., Anna, L., Udroui, I. y Zilli, R. (2004). Comparative evaluation of background micronucleus frequencies in domestic mammals. *Mutation Research*, 559(1-2), 1-9.
- Cruz, M. A. N. (2012). Evaluación del efecto teratogénico a concentraciones observadas de Mercurio (Hg) en el agua del río Tula, a través de la prueba *Danio rerio* Teratology Assay (DarTA), para establecer su efecto biológico. Tesis de licenciatura. Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hgo. México.
- De Lemos, C. T., Rodel, P. M., Terra, N. R. y Erdtmann, B. (2001). Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 1320-1324. DOI: 10.1002/etc.5620200621
- Dixit, M. y Kumar, A. (2017). Mutagenesis, genetic disorders and diseases. En Kumar, A., Dobrovolsky, V. N., Dhawan, A. y Shanker, R. (Ed.), *Mutagenicity: assays and applications* (pp. 1-34). Academic Press, Elsevier.
- Estévez, J., Vilanova, E. y Sogorb, M. A. (2019). Biomarkers for testing toxicity and monitoring exposure to xenobiotics. En Gupta, R. C. (Ed.), *Biomarkers in Toxicology* (pp. 1165-1174). Academic Press.
- Gaytán, O. J. C., González, L. L., Pulido-Flores, G., Scoot, M., Gordillo-Martínez, A. J., Cabrera-Cruz, R. y Pérez-Cruz, E. (2008). Evaluación de la calidad del agua en la reserva de la biosfera Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México a través de la inducción de malformaciones en columna vertebral en pez cebra (*Danio rerio* Hamilton, 1822). En Libro estudios biológicos en las áreas naturales del Estado de Hidalgo, México, UAEH.
- Gupta, P. K. (2016). *Fundamentals of Toxicology*. Academic Press, BS Publications.
- Holland, N., Harmatz, P., Golden, D., Hubbard, A., Wu, Y. y Bae, J. (2007). Cytogenetic damage in blood lymphocytes and exfoliated epithelial cells of children with inflammatory bowel disease. *Pediatric Research*, 61(2), 209-214.
- Klapacz, J. y Bhaskar, G. B. (2020). Genetic toxicology. En Klaassen, C. D. (Ed.), *Casarett & Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons* (pp. 497-545). McGraw-Hill Education.
- Kleinow, K. M., Nichols, J. W., Hayton, W. L., McKim, J. M. y Barron, M. G. (2008). Toxicokinetics in fishes. En Di Giulio, R. y Hinton, D. E. (Ed.), *The toxicology of fishes* (pp. 55-152). CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Krishna, G. y Gopalakrishnan, G. (2016). Alternative in vitro Models for safety and toxicity evaluation of nutraceuticals. En Gupta, R. C. (Ed.), *Nutraceuticals: Efficacy, safety and toxicity* (pp. 355-385). Academic Press.
- McQueen, C. A. (2018). *Comprehensive Toxicology*. Amsterdam, Netherlands. Elsevier.
- Mohamed, S., Sabita, U., Rajendra, U. y Raman, D. (2017). Genotoxicity: mechanisms, testing guidelines and methods. *Glob J Pharmaceu Sci*, 1, 001-006. DOI: 10.19080/GJPPS.2017.02.555575
- Moreno, F. M. (2013). Mantenimiento en el laboratorio del pez cebra (*Danio rerio*). Tesis de licenciatura. Biología Celular en Toxicología Ambiental. Universidad del País Vasco. Lejona, España.
- Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M. y Rojas del Castillo, E. (2013). Biomarkers of exposure for environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Rev. Int. Contam. Ambie*, 29(1), 117-140.
- Nagel, R. (2002). DarT: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* – a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. ALTEX: Alternatives to animal experimentation, 19, Suppl. 1/02.
- Normann, C., Moreira, J. C. F. y Cardoso, V. V. (2008). Micronuclei in red blood cells of armored catfish *Hypostomus plecostomus* exposed to potassium dichromate. *African Journal of Biotechnology*, 7: 893-896.
- Oner, M., Atli, G. y Canli, M. (2008). Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 360-366. DOI: 10.1897/07-281R.1
- Qi, W., Reiter, R. J., Tan, D. X., Garcia, J. J., Manchester, L. C., Karbownik, M. y Calvo, J. R. (2000). Chromium (III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. *Environmental Health Perspectives*, 108: 399-402. DOI: 10.1289/ehp.00108399
- Repetto, M. J. y Repetto, G. K. (2009). *Toxicología fundamental*. Díaz de Santos.
- Rinkwitz, S., Mourrain, P. y Becker, T. S. (2011). Zebrafish: an integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Progress in Neurobiology*, 93: 231243. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2010.11.003
- Rivera, C. I. V. (2006). Determinación de la frecuencia de malformaciones en columna vertebral, opérculo y aleta en *Danio rerio* Hamilton, 1822, como posibles biomarcadores en la valoración de daño teratogénico. Tesis de licenciatura. CIB-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hgo. México.
- Rodríguez-Anaya, A. (2015). Potencial de riesgo y efectos biológicos en *Danio rerio* por presencia en el ambiente de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) de alto consumo. Tesis de licenciatura. CIB-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hgo. México.
- Rojas-Muñoz, A., Miana, B. A. e Izpissúa, B. J. C. (2007). El pez cebra, sustentabilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y Ciencia*, 366, 62-69.
- Roldán, R. E. (2016). *Introducción a la toxicología*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Ciudad de México, México.
- Sánchez-Olivares, M. A. (2021). Evaluación toxicológica y gestión de riesgos del agua potable de Zimapán, Hidalgo. Tesis de Doctorado. CIB-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hgo. México.
- Sánchez-Olivares, M. A., Gaytán-Oyarzún, J. C., Gordillo-Martínez, A. J., Prieto-García, F. y Cabrera-Cruz, R. B. E. (2021). Toxicity and teratogenicity in zebrafish *Danio rerio* embryos exposed to chromium. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(2), 289-298. DOI: 10.3856/vol49-issue2-fulltext-X
- Shaw, P., Mondal, P., Bandyopadhyay, A. y Chattopadhyay, A. (2019). Environmentally relevant concentration of chromium induces nuclear deformities in erythrocytes and alters the expression of stress-responsive and apoptotic genes in brain of adult zebrafish. *Science of the Total Environment*. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135622
- Simoniello, M. F., Kleinsorge, E. C., Scagnetti, J. A., Mastandrea, C., Grigolato, R. A., Paonessa, A. M. y Carballo, M. A. (2010). Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population. *Biomarkers*, 15(1), 52-60.
- Stice, S. A., Beedanagari, S. R., Vulimiri, S. V., Bhatia, S. P. y Mahadevan, B. (2019). Genotoxicity Biomarkers: Molecular basis of genetic variability and susceptibility. En Gupta, R. C. (Ed.), *Biomarkers in Toxicology* (pp. 807-821). Academic Press, BS Publications.
- Terradas, M., Martin, M., Tusell, L. y Genesca, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation Research*, 705, 60-67.
- Torres-Bugarin, O., y Ramos-Ibarra, M. L. (2013). Utilidad de la prueba de micronúcleos y anomalías nucleares en células exfoliadas de mucosa oral en la evaluación de daño genotóxico y citotóxico. *Revista International Journal Morphology*, 31(2), 650-657.
- Valles, S., Gutiérrez, L. E. y Bardullas, U. (2018). Implementación de un sistema para evaluar la neurotoxicidad de los contaminantes ambientales en larvas de pez cebra (*Danio rerio*). *Investigación y Ciencia*, 26(74), 25-31.
- Zada, D., Tovin, A., Lerer-Goldshtein, T., Vatine, G. D. y Appelbaum, L. (2014). Altered behavioral performance and live imaging of circuit-specific neural deficiencies in a zebrafish model for psychomotor retardation. *Plos Genetics*, 10: e1004615. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004615