



UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE CUNDINAMARCA
SELLO EDITORIAL

Modelos biológicos utilizados en estudios de ecotoxicología y su impacto en la salud humana

Ruth Mérida Sánchez Mora - Yenny Yolanda Lozano Jiménez
Laura Rocío Martínez León - Dayana Rodríguez Morales
Andrea Viviana Gualteros Bustos

MODELOS BIOLÓGICOS UTILIZADOS EN ESTUDIOS DE ECOTOXICOLOGÍA Y SU IMPACTO EN LA SALUD HUMANA

**Ruth Mélida Sánchez Mora
Yenny Yolanda Lozano Jiménez
Laura Rocío Martínez León
Dayana Rodríguez Morales
Andrea Viviana Gualteros Bustos**



**UNIVERSIDAD COLEGIO
MAYOR DE CUNDINAMARCA**
SELLO EDITORIAL

Catalogación en la publicación – Biblioteca Nacional de Colombia

Sánchez Mora, Ruth Mérida, autora

Modelos biológicos utilizados en estudios de ecotoxicología y su impacto en la salud humana / Ruth Mérida Sánchez Mora [y otros cuatro]. – [Bogotá]: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, 2023.
110 páginas.

Incluye glosario – Incluye referencias bibliográficas.

ISBN 978-958-5198-12-8

1. Toxicología ambiental 2. Modelos biológicos 3. Salud I. Lozano Jiménez, Yenny Yolanda, autora II. Martínez León, Laura Rocío, autora III. Rodríguez Morales, Dayana, autora IV. Gualteros Bustos, Andrea Viviana, autora

CDD: 571.95 ed. 23

CO-BoBN- a1121379

Primera edición, 2023

© Ruth Mérida Sánchez Mora, Yenny Yolanda Lozano Jiménez, Laura Rocío Martínez León, Dayana Rodríguez Morales, Andrea Viviana Gualteros Bustos

© Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Sello Editorial Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Carrera 13 No. 38- 29, Edificio San Juan, noveno piso

selloeditorial@unicolmayor.edu.co

www.unicolmayor.edu.co

Diseño de portada y diagramación: Xpress Estudio Gráfico y Digital

Corrección de Estilo: Xpress Estudio Gráfico y Digital

Bogotá, Colombia, 2023

ISBN: 978-958-5198-12-8

El contenido de esta obra está protegido por las leyes y tratados internacionales en materias del Derecho de autor. Queda prohibida su reproducción total o parcial por cualquier medio impreso o digital conocido o por conocer sin contar con la previa autorización de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

RUTH MÉLIDA SÁNCHEZ MORA

Líder Grupo Biotecnología y Genética UCMC
Docente Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Bacterióloga y Laboratorista Clínico, Magister en Genética Humana
Doctora en Biotecnología
E-mail: rmsanchezm@unicolmayor.edu.co
Dirección: Calle 28 B No 5-02

YENNY YOLANDA LOZANO JIMÉNEZ

Grupo de Entomología y enfermedades transmitidas por vectores
Bacterióloga y Laboratorista Clínico y Química Universidad Nacional
Doctorado en Ciencias Farmacéuticas
E-mail: jylozano@unisalle.edu.co
Universidad de La Salle
Dirección: Carrera 2 No 10-70
Teléfono: 353 53 60

ANDREA VIVIANA GUALTEROS BUSTOS

Bacterióloga y Laboratorista clínico
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Grupo y Semillero de investigación de Biotecnología y Genética UCMC
Joven talento profesional en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Convocatoria 874 Minciencias
E-mail: vivis_1894@hotmail.com
Dirección: Calle 28 B No 5-02

DAYANA RODRIGUEZ MORALES

Estudiante de décimo semestre de Bacteriología y Laboratorio clínico
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Grupo y Semillero de investigación de Biotecnología y Genética UCMC.
Joven talento estudiante en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
Convocatoria 874 Minciencias
E-mail: droduiguez@unicolmayor.edu.co

LAURA ROCÍO MARTÍNEZ LEÓN

Estudiante de noveno semestre de Bacteriología y Laboratorio clínico
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Grupo y Semillero de investigación de Biotecnología y Genética UCMC.
Joven talento estudiante en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
Convocatoria 874 Minciencias
E-mail: lmartinez@unicolmayor.edu.co
Dirección: Calle 28 B No 5-02

PREFACIO

Para las autoras es un logro presentar una obra que permite recopilar los tres principales modelos biológicos usados en toxicología ambiental. Estos conocimientos permitirán a nuestros estudiantes, profesionales y personas interesadas en el tema adquirir una mayor comprensión del uso de estos modelos en las diferentes áreas como toxicología ambiental, biotecnología y afines. Los usos de estos modelos son una herramienta útil en diversas áreas del conocimiento científico, es de suma importancia su difusión para aumentar el saber en las diferentes repercusiones que tiene la contaminación ambiental en la salud humana.

Para tal fin, este libro ha sido conceptualmente dividido en tres capítulos; en cada uno de los cuales se abordan las características generales de *C. elegans*, *H. vulgaris* y *D. rerio* desde una perspectiva ecotoxicológica. Se abarcan aspectos básicos como crecimiento, mantenimiento, anatomía, avances logrados por medio de su estudio en diversas áreas de la ciencia y finalmente su aplicabilidad en la investigación en el campo de la toxicología ambiental, las novedades actuales y su impacto en la salud. Además, se muestran consultas sistemáticas sobre estos modelos con el fin de brindar información importante acerca de estos seres vivos útiles para estudios toxicológicos.

Para los que tiene interés en el tema cada capítulo incluye referencias de artículos de revisión, libros más especializados en el tema y artículos de la literatura original. Algunos de estos artículos presentan dificultad para seguir por algunos principiantes, sin embargo, algunos son hitos históricos o contienen algún aspecto valioso.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	8
GLOSARIO	9
INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO 1	15
<i>Caenorhabditis elegans</i> EN EL ESTUDIO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL	15
1.1 HISTORIA	16
1.2 GENERALIDADES DEL MODELO	23
1.2.1 Crecimiento, alimentación y mantenimiento del nematodo	25
1.2.2 Ciclo de vida	26
1.2.3 Anatomía y reproducción	27
1.3 MANIPULACIÓN MODELO EN EL LABORATORIO	29
1.4 APLICACIÓN EN TOXICOLOGÍA	33
1.4.1 Ventajas de usar <i>C. elegans</i> en toxicología	36
1.4.2 Limitaciones de <i>C. elegans</i> en toxicología ambiental	38
1.4.3 La novedad en el estudio de la Epigenética ambiental	39
1.4.4 Ventajas del uso de <i>C. elegans</i> en epigenética	41
1.5 CONCLUSIÓN	42
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	43

CAPITULO 2	53
<i>Danio rerio</i> EN EL ESTUDIO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL	53
2.1 HISTORIA	53
2.2 GENERALIDADES DEL MODELO	57
2.2.1 Ciclo de vida	59
2.2.2 Anatomía	61
2.3 MANIPULACIÓN DEL MODELO EN EL LABORATORIO	66
2.4 APLICACIÓN EN TOXICOLOGÍA	67
2.4.1 Compuestos tóxicos que afectan a <i>D. rerio</i> y se correlacionan con enfermedades humanas	68
2.4.2 Cepas transgénicas de <i>D. rerio</i> usadas en el área de la Salud Ambiental	71
2.4.3 Ventajas de usar a <i>D. rerio</i> como modelo en Ecotoxicología	74
2.4.4 Limitaciones de usar a <i>D. rerio</i> como modelo en toxicología	76
2.5 CONCLUSIÓN	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	78
CAPÍTULO 3	89
<i>Hydra vulgaris</i> EN EL ESTUDIO DE LA TOXICOLOGÍA AMBIENTAL	89
3.1 HISTORIA	90
3.2 GENERALIDADES DEL MODELO	93
3.2.1 Distribución geográfica y hábitat	95
3.2.2 Morfología	95
3.3 MANIPULACIÓN DEL MODELO EN EL LABORATORIO	100

3.4 HIDRA COMO MODELO Y SU APOORTE A LA TOXICOLOGÍA AMBIENTAL	102
3.5 CONCLUSIÓN	106
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Infograma de los hallazgos importantes en la secuenciación del genoma de <i>C. elegans</i> . Elaboración propia de los autores.	18
Figura 2. Observación general de <i>C. elegans</i> .	24
Figura 3. Ciclo de vida biótico de <i>C. elegans</i> .	25
Figura 4. Estadios larvarios de <i>C. elegans</i> .	26
Figura 5. Morfología del estadio Dauer de <i>C. elegans</i> .	27
Figura 6. Los dos sexos de <i>C. elegans</i> .	28
Figura 7. Cultivo en agar NMG de la cepa silvestre N2 de <i>C. elegans</i> .	30
Figura 8. Medición longitud del cuerpo en cepa transgénica TJ356.	31
Figura 9. Diseño general de métodos para trabajar con <i>C. elegans</i> en el campo de la toxicología ambiental.	35
Figura 10. Esquema que representa las fortalezas de <i>C. elegans</i> para su uso en el ámbito de la toxicología ambiental.	38
Figura 11. Clasificación taxonómica de <i>D. rerio</i> .	58
Figura 12. Ciclo de vida de <i>D. rerio</i> .	60
Figura 13. Similitudes y diferencias anatómicas entre el humano y el pez cebra.	61
Figura 14. Características según género de <i>D. rerio</i> .	65
Figura 15. Se observa <i>H. vulgaris</i> en su hábitat.	94

Figura 16. Se observa anatomía de <i>H. vulgaris</i> .	113
Figura 17. Reproducción sexual de <i>H. vulgaris</i> .	115
Figura 18. Esquema ventajas y desventajas del uso en el laboratorio de <i>Hidra vulgaris</i> . Elaboración propia.	101
Figura 19. Descripción de la morfología de <i>H. vulgaris</i> en respuesta a la toxicidad.	103
Figura 20. Mecanismo de desintoxicación de <i>H. vulgaris</i> .	105

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Línea de tiempo de <i>C. elegans</i> . Elaboración propia de los autores.	19
Tabla 2 Evaluación de toxicidad por contaminantes ambientales.	34
Tabla 3 Línea de tiempo <i>D. rerio</i> . Hitos históricos importantes y relacionados con genética y ecotoxicología.	56
Tabla 4 Compuestos usados en el modelo <i>D. rerio</i> y sus órganos implicados.	69
Tabla 5 Cepas <i>D. rerio</i> utilizados en toxicología ambiental.	73
Tabla 6 Línea del tiempo de <i>H. vulgaris</i> .	92
Tabla 7 Taxonomía de <i>H. vulgaris</i> .	93

GLOSARIO

- **ADN:** Acido desoxirribonucleico, proteína que constituye el material genético de los seres vivos.
- **Ahr:** Aril hidrocarburo, es un receptor de hidrocarburos y funciona como un factor de transcripción.
- **Apo:** Apolipoproteína, molécula transportadora de lípidos.
- **Cas 9:** CRISPR asociado a la proteína 9, enzima endonucleasa de ADN
- **CGC:** Por sus siglas en inglés Caenorhabditis Genetics Center (Centro de Genética de Caenorhabditis).
- **CP450:** Citocromo P450, Responsables del metabolismo de xenobióticos.
- **CRISPR:** Por sus siglas en inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas), sistema de defensa de procariontas.
- **dpy-7:** Gen de *Caenorhabditis elegans* involucrado en el desarrollo de la cutícula.
- **dvr1:** Gen que codifica para la proteína DVR1 de *Danio rerio* la cual cumple funciones en la embriología del pez.
- **E. coli OP50:** Cepa de *Escherichia coli* utilizada para alimentar en laboratorio de *Caenorhabditis elegans*.
- **ER α :** Receptor de estrógeno alfa, factor de transcripción que participa en la regulación procesos fisiológicos.
- **ER β :** Receptor de estrógeno beta, factor de transcripción que participa en la regulación procesos fisiológicos.
- **ERR γ :** Receptor de estrógeno gamma del Pez cebra, factor de transcripción que participa en la regulación procesos fisiológicos.

- **Fbox:** Proteínas de caja F, en *Caenorhabditis elegans*, median interacciones proteicas.
- **GFP:** Green Fluorescent Protein, por sus siglas en inglés (Proteína verde fluorescente), proteína que emite bioluminiscencia.
- **lncRNA:** Ácido ribonucleico largo no codificante que controla la expresión génica.
- **k-ras:** Proteína de transcripción que controla la multiplicación, maduración y destrucción de las células.
- **L1, L2, L3, L4:** Hace referencia a los estadios larvarios de *Caenorhabditis elegans* conforme a su desarrollo en función de tiempo.
- **lpr-5:** Proteína de *Caenorhabditis elegans* que permite la trasportación de lípidos.
- **miRNA:** Ácido ribonucleico pequeño no codificante, actúa en el silenciamiento o degradación del ácido ribonucleico mensajero.
- **nhf:** Receptor de hormonas nucleares, proteína responsable de detectar hormonas.
- **NRF-2:** Proteína que regula la expresión de genes que ayudan a proteger la célula del daño que causan los radicales libres.
- **nr2f2:** Este gen codifica un miembro de la súperfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas tiroideas.
- **p450 CYP:** Citocromo P450, promueve el metabolismo de xenobióticos.
- **SKN-1:** Proteína skinhead-1, factor de transcripción que actúa en la regulación embrionaria.

INTRODUCCIÓN

La idea de salud humana fue definida desde un inicio como la ausencia de enfermedad, sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó una revisión del concepto para extender la definición, no solo desde la mirada del funcionamiento normal del organismo, es decir, desde la idea de que el bienestar solo depende de los hábitos de la persona, sino también desde el aspecto ecológico, tomando en cuenta el medio ambiente, desde sus diferentes elementos como el aire, el suelo, el agua, la luz, el ruido y el clima, en donde se pueden encontrar diferentes contaminantes que afectan la salud humana.

La sobrepoblación, las actividades antropogénicas y el progreso tecnológico e industrial, han dado lugar a un sin fin de residuos contaminantes que conllevan a la producción de toxinas que afectan el medio ambiente. Lo anterior obliga a vigilar e identificar estos compuestos químicos y al mismo tiempo a reconocer el impacto negativo de dicha exposición en los seres vivos, destacando sus consecuencias sobre mecanismos biológicos, químicos y genéticos.

Según lo establece la OMS, en los últimos años 12,6 millones de personas perdieron la vida por habitar o trabajar en ambientes poco saludables, entre los que se incluye la contaminación del aire, agua o suelo, la exposición a productos químicos, el cambio climático y la radiación ultravioleta. Todo lo anterior conlleva a la aparición de cientos de enfermedades, siendo los niños menores de cinco años y los adultos entre 50 a 75 años los principalmente afectados.

Así mismo, la OMS expone que 844 millones de personas carecen de un servicio básico de agua potable, es decir, 159 millones de personas dependen de aguas superficiales contaminadas, que pueden producir enfermedades como la diarrea, la disentería, la fiebre tifoidea, entre otras. Además, los seres humanos están expuestos a la volatilidad de compuestos tóxicos presentes en fuentes hídricas, que pueden llegar a producirles una toxicidad aguda y consecuencias a largo plazo.

La contaminación del suelo es generada por múltiples causas, el principal agente es la agricultura, porque a partir de esta actividad económica son depositados en el suelo sustancias químicas provenientes de los herbicidas, abonos sintéticos e insecticidas, también son usados plaguicidas que se concentran en la cadena alimentaria y resultan afectando la salud humana. La contaminación del suelo también proviene de las industrias y de la construcción de ciudades donde son generados compuestos contaminantes al ambiente.

Por otro lado, también se asocian dificultades respiratorias como el asma y alergias a causa de la contaminación del aire, generada por agentes como el óxido de nitrógeno, azufre, metales, compuestos volátiles y aquellos originados a través del tabaquismo, el cual también genera contaminación ambiental.

Como se mencionó anteriormente más allá de reconocer los contaminantes ambientales, es necesario usar modelos biológicos que permitan identificar su repercusión toxicológica en el humano, para así comprender las consecuencias y plantear estrategias que permitan mejorar la calidad medioambiental, restablecer la flora y fauna, y al mismo tiempo minimizar los índices de mortalidad y morbilidad humana debido al déficit de salud ambiental en el mundo.

Entre los modelos biológicos se destacan algunos seres vivos que permiten evaluar en tiempo real, patologías ecotoxicológicas, estrés celular, vías de señalización, moléculas inmunes, funcionalidad de órganos y sistemas tras la exposición a compuestos tóxicos durante todo su periodo de vida. Al mismo tiempo, algunos de estos modelos deben presentar

características importantes como el tener una progenie amplia o sea fácilmente reproducible, con el fin de poder analizar respuesta poblacional compleja a corto y largo plazo.

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*), *Hydra vulgaris* (*H. vulgaris*) y *Danio rerio* (*D. rerio* o *Pez cebra*), son modelos biológicos valiosos para los investigadores en diferentes áreas del conocimiento. Son muchas las investigaciones que usan estos modelos biológicos con el fin de abordar problemas apremiantes en salud ambiental, como la identificación de contaminantes, seguimiento continuo y sistemático de las variables ambientales, ensayos de teratogenicidad, estudios sobre mecanismos de acción y fenotipos de enfermedades asociados al medio ambiente, entre otros.

En este libro se presentan las características generales de *C. elegans*, *H. vulgaris* y *D. rerio* desde una perspectiva ecotoxicológica. Se abarcan aspectos básicos como crecimiento, mantenimiento, anatomía, avances logrados por medio de su estudio en diversas áreas de la ciencia y finalmente su aplicabilidad en la investigación en el campo de la toxicología ambiental, las novedades actuales y su impacto en la salud.

CAPÍTULO 1

***Caenorhabditis elegans* EN EL ESTUDIO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL**

Andrea Viviana Gualteros Bustos
Yenny Yolanda Lozano Jiménez

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) se constituye en una alternativa como modelo inferior que brinda una plataforma novedosa y reproducible en ensayos de toxicología ambiental, al ser un nematodo de vía libre, corto ciclo de vida, óptima reproducción, pequeño tamaño corporal, cuantificación y visibilidad de fenotipos externos e internos. Se estableció como el primer organismo multicelular en tener su genoma completamente secuenciado, dentro de sus 20.000 genes, el 40% son homólogos al de los mamíferos, compartiendo similitud en cuanto a procesos metabólicos (1). Sin contar con que anualmente durante los últimos cinco años se han publicado cerca de 1.200 artículos en múltiples áreas de estudio (2).

En este capítulo se expondrán las características de *C. elegans* desde una perspectiva general hacia el ámbito específico de la toxicología ambiental, abarcando aspectos básicos como el crecimiento, mantenimiento, anatomía, avances logrados por medio de su estudio, finalmente su aplicabilidad en la investigación en el campo de la toxicología ambiental y las novedades actuales.

Inicialmente es importante dar a conocer la historia de este modelo y cómo ha contribuido a la comprensión de procesos fundamentales en el estudio de la toxicidad y genotoxicidad, humana y ecológica.

1.1 HISTORIA

C. elegans es un invertebrado que desde su primera descripción llamó la atención por sus cualidades versátiles, que a través de la historia han permitido realizar valiosos descubrimientos y aportes a la ciencia; lo cual es sorprendente, ya que *C. elegans* es un organismo inferior con una gran maquinaria funcional que aún falta por explorar, según lo que parcialmente se evidencia en la línea del tiempo (Tabla 1).

La primera vez que se escribió de *C. elegans* fue en 1.900 en los alrededores de la ciudad de Argel (Argelia), por el bibliotecario y biólogo francés Emile Maupas, quien lo nombró *Elegans rhabditis*. Adicionalmente estudió su desarrollo, anatomía e indujo respuesta a estímulos como la inanición (3, 4).

Luego en 1940, Victor Nigon y Ellsworth Dougherty modificaron y optimizaron las metodologías de mantenimiento de nematodos en el laboratorio. Sin embargo, en 1970 el biólogo sudafricano Sydney Brenner fue quien estableció a *C. elegans* como un modelo biológico, siendo su intención principal esclarecer los fundamentos moleculares de la biología del desarrollo y el sistema nervioso. Desde 1963 Brenner inició su trabajo con *Caenorhabditis briggsae*, pero durante la experimentación fue *C. elegans* la especie que demostró un mejor desarrollo en el laboratorio (5).

Más tarde, en 1975 John White, Sydney Brenner, Donna Albertson, Eileen Southgate, Sam Ward y Nichol Thomson; describieron la anatomía y conectividad de las 302 neuronas del hermafrodita adulto y durante 1977 John Sulston, Robert Horvitz y colaboradores describieron la división celular desde el cigoto unicelular hasta la larva adulta, caracterizando el primer linaje completo de un organismo multicelular (5).

Posteriormente, en 1983 los investigadores Hartman, Herman, Fatt, Dougherty, Blum y Fridovich sentaron las bases del uso de *C. elegans* como un modelo para el estudio del daño en el ADN. Por otro lado, se realizó la caracterización de vías de apoptosis (muerte celular programada) por Hedgecock y colaboradores (6), lo que permitió su incursión en la investigación toxicológica por sus respuestas fenotípicas y genéticas al estrés ambiental. Sin embargo, fue en 1990 cuando Phil Williams y sus colaboradores experimentaron con *C. elegans* como organismo modelo toxicológico, abriendo la posibilidad para que en ese mismo año Jonathan Freedman y sus colegas determinaran las respuestas del nematodo frente a la exposición a metales pesados (6).

Adicionalmente, la primera evidencia de microARN (miARN) fue informada por Lee y colaboradores en 1993 empleando a *C. elegans* como modelo de estudio, posteriormente Morris y Mattick continuaron con investigación en este ámbito en 2014. En el desarrollo del nematodo son relevantes los miARN reguladores *lin-4* y *let-7*. También se destacan los ARN largos no codificantes (lncARN), los cuales son ARN largos sin marcos de lectura abiertos de más de 100 pares de bases; en *C. elegans* son conservados en cuanto a estructura y procesos de transcripción (6).

En 1998, *C. elegans* fue el primer organismo multicelular con su genoma completamente secuenciado gracias al *C. elegans* Sequencing Consortium (Figura 1) (5). Otro descubrimiento por Fire y colaboradores en el año 1998 fue el silenciamiento de genes por ARN de interferencia (ARNi), que en años posteriores se estableció como una técnica para silenciar cualquier gen en diversos organismos, incluso dio la posibilidad a Andrew Fire y Craig Mello el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2006 (5).

Figura 1. Infografía de los hallazgos importantes en la secuenciación del genoma de *C. elegans*. Elaboración propia de los autores.



En el año 2001 Richard Nass y colaboradores propusieron el uso de *C. elegans* para ensayos de neurodegeneración inducida por sustancias químicas (7). Posteriormente, en 2003 Horvitz y Sulston fueron merecedores del premio Nobel por su proyecto de linaje de *C. elegans* como plataforma para el descubrimiento de genes, además de describir los mecanismos genéticos de la apoptosis (5).

Para el año 2007 Cui, Boyd y colaboradores estandarizaron los análisis toxico-genómicos y las pruebas de toxicidad de rendimiento medio empleando *C. elegans*. Todo lo anterior ha demostrado la evolución en la experimentación y la ampliación del estudio de *C. elegans* en procesos como: la respuesta al daño del ADN, la apoptosis, la autofagia, defensas antioxidantes, señalización del receptor nuclear, respuestas de estrés mitocondrial y respuestas de metales pesados; lo cual ha conllevado a su adecuada caracterización para estudios de toxicidad, genotoxicidad humana y ecológica (7).

Tabla 1 Línea de tiempo de *C. elegans*.
Elaboración propia de los autores.

AÑO	SUCESO
1974	Identificación de mutaciones que afectan el comportamiento animal. Realizado por Brenner en 1974 (8) y Dusenberry y colaboradores en 1975 (9).
1977	Primera clonación y secuenciación de un gen de miosina; llevado a cabo por Macleod y colaboradores en 1977 (10).
1981	Se identifica el primer nicho de células madre de la línea germinal, desarrollado por Kimble y White en 1981 (11) y luego por Crittenden en 2005 (12).
1983	Caracterización completa del primer linaje celular en metazoos. Realizada por Sulston y Horvitz en 1977 (13), posteriormente por Kimble y Hirsh en 1979 (14) y finalmente por Sulston y colaboradores 1983 (15).

AÑO	SUCESO
1983	<p>Descubrimiento de genes de apoptosis (muerte celular programada) y caracterización de las vías involucradas en el proceso. Esto ha sido desarrollado a través de varias décadas por los siguientes investigadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hedgecock y colaboradores en 1983 (16). • Ellis y Horvitz en 1986 (17). • Yuan y Horvitz en 1992 (18). • Yuan y colaboradores en 1993 (19). • Conradt y Xue en 2005 (20).
1986	<p>Primer diagrama de cableado completo de un sistema nervioso. Estudio iniciado por White y colaboradores en 1986 (21), continuado por Jarrell y colaboradores en 2012 (22) y finalizado por White en 2013 (23).</p>
1987	<p>Identificación del papel de la señalización de Notch en blastómeros embrionarios. Llevado a cabo por Priess y colaboradores en 1987 y 2005 (24, 25).</p>
1990	<p>Primera descripción de la función de la señalización RAS en el desarrollo de metazoos. Desarrollada por:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Beitel y colaboradores en 1990 (26) • Han y Sternberg en 1990 (27) • Sternberg en 2005 (28) • Sundaram en 2013 (29).
1993	<p>Demostración del papel de los genes de la vía de la insulina en la regulación de la esperanza de vida. Estudio llevado a cabo por:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Friedman y Johnson en 1988 (30). • Kenyon y colaboradores en 1993 (31). • Kimura y colaboradores en 1997 (32). • Collins y colaboradores en 2007 (33).
1993	<p>Descripción del primer microARN (<i>lin-4</i>) junto con su objetivo de ARNm (<i>lin-14</i>). Estudio iniciado por Lee y colaboradores en 1993 (34), continuada por Wightman y colaboradores en 1993 (35) y finalizada por Vella y Slack en 2005 (36).</p>

AÑO	SUCESO
1994	Introducción de GFP como marcador biológico de genes y proteínas. Investigación llevada a cabo por Chalfie y colaboradores en 1994 (37) posteriormente por Boulin y colaboradores en 2006 (38).
1998	Secuenciación del primer genoma de metazoos. Realizada por <i>C. elegans</i> Sequencing Consortium en 1998 (1) y Schwarz en 2005 (39).
1998	Descubrimiento de ARN de interferencia (ARNi). Desarrollado por Fire y colaboradores en 1998 (40).
2000	Conservación y ubicuidad de microARN (miARN). Estudio realizado por Pasquinelli y colaboradores en 2000 (41).
2000	Desarrollo de detección de ARNi en todo el genoma/ primer perfil completo de la función génica en todo el genoma. Estudio llevado a cabo por Fraser y colaboradores en 2000 (42) y luego por Kamath y colaboradores en 2001 (43).
2002	Descubrimiento de la primera polimerasa citoplasmática poliA (<i>gld-2</i>). Desarrollado por Wang y colaboradores en 2002 (44) y completado por Kimble y Crittenden en 2005 (12).
2005	Primer perfil de ARNi de la embriogénesis temprana en el genoma completo, fue llevado a cabo por Sönnichsen y colaboradores en 2005 (45).
2005	Primer uso de optogenética empleando Canalrodopsina-2 en un organismo intacto, esta innovación fue desarrollada por Nagel y colaboradores en 2005 (46).
2011	Descubrimiento de los primeros virus nematodos, llevado a cabo por Félix y colaboradores en 2011 (47).

AÑO	SUCESO
2014	Uso de <i>C. elegans</i> como modelo en la evaluación de niveles de Selenio a nivel ambiental, teniendo en cuenta los efectos producidos en parámetros como longitud corporal, supervivencia y reproducción. Estudio llevado a cabo por Wen-Hsuan Li , Yun-Ru Ju , Chung-Min Liao, Vivian Hsiu-Chuan Liao en 2014 (48).
2015	<i>C. elegans</i> como modelo en el estudio de nanotoxicidad, o toxicología de sistemas integrados, para este estudio se emplearon nanotubos de carbono. Se analizaron las vías de endocitosis, fagocitosis, estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico en el nematodo. Esto fue desarrollado por Hyun-Jeong Eom y colaboradores en 2015 (49).
2016	Evaluación <i>In vivo</i> de la calidad de recursos hídricos utilizando a <i>C. elegans</i> . Este monitoreo fue realizado por Araceli Clavijo y colaboradores en 2016 (50).
2018	Incurción de <i>C. elegans</i> en la epigenética, biología de la cromatina y genotoxicidad química. Esta descripción detallada fue descrita por Caren Weinhouse y colaboradores en 2018 (6).
2020	Análisis ecotoxigenómico de los efectos producidos por metales pesados provenientes de suelos contaminados empleando <i>C. elegans</i> . Se usaron pruebas ecotoxicológicas y análisis de transcriptoma global con microarrays de ADN. Este estudio fue llevado a cabo por Carmen fajardo y colaboradores en 2020 (51). Yogendra Nagar y colaboradores en este mismo año 2020 propusieron a <i>C. elegans</i> como un modelo para evaluación de la toxicidad producida por los residuos de parabenos en el medio ambiente (52).
2021	Jessica H Hartman y colaboradores en el año 2021 establecen la utilidad de <i>C. elegans</i> como un modelo en toxicología y farmacología debido a la naturaleza de su metabolismo xenobiotico (53).

Finalmente, Marty Chalfie recibió el Premio Nobel de Química en 2008, gracias a su trabajo desarrollado desde 1994, en el cual estableció a la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador biológico empleando a *C. elegans*, debido a su cuerpo transparente que permitió una mejor caracterización (5, 37).

Esta línea de tiempo permite observar que *C. elegans* presenta características fisiológicas inherentes que lo hacen apropiado para la investigación como en el ámbito de la Ecotoxicología.

1.2 GENERALIDADES DEL MODELO

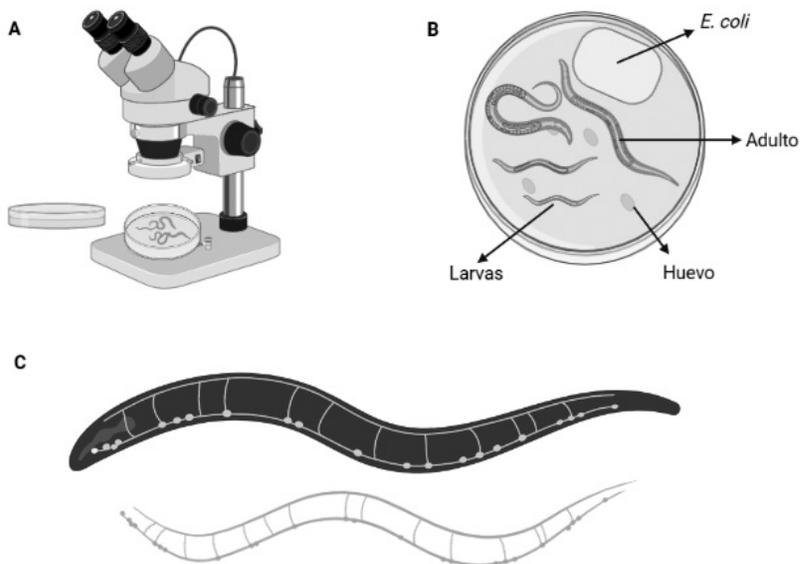
C. elegans es un nematodo de vía libre, con un tamaño promedio de 1 mm en su estadio adulto (Figura 2) al ser observado en un estereoscopio (Figura 2A). Su ciclo de vida es rápido, aproximadamente en tres días, pasa de huevo a larva adulta; se encuentra como hermafrodita autofertilizante y macho, el cual surge con una frecuencia < 0.2% (Figura 2B).

En el ámbito filogenético *C. elegans* pertenece al clado *Ecdysozoa*, filo Nematoda, subclase *Chromadoria*, orden *Rhabditida*, género *Caenorhabditis* y la cepa salvaje tiene por nomenclatura N2. Como rasgos importantes, en el clado *Ecdysozoa* los organismos se caracterizan por presentar muda de cutícula, permitiendo deducir que *C. elegans* se encuentra más relacionado con *Drosophila* que con moluscos y lombrices de tierra; adicionalmente en el orden *Rhabditida* se incluyen parásitos animales y vegetales de vía libre pertenecientes a ecosistemas acuáticos y terrestres (5).

A nivel somático posee un número invariable de células permitiendo el desarrollo de investigaciones relacionadas con los destinos celulares de linajes específicos, como, por ejemplo, el de las 302 neuronas, de las cuales se ha logrado realizar un diagrama de cableado completo (Figura 2C). A nivel genómico es importante resaltar que en promedio el 38% de genes que codifican proteínas en el nematodo han permitido encontrar ortólogos en el genoma humano, 60-80 % de genes humanos tienen un ortólogo en el genoma de *C. elegans* y el 40 % de

genes que participan en el desarrollo de patologías humanas tienen homólogos específicos en el nematodo (54); lo cual lo hace un modelo en el estudio de enfermedades humanas (5, 55).

Figura 2. Observación general de *C. elegans*.



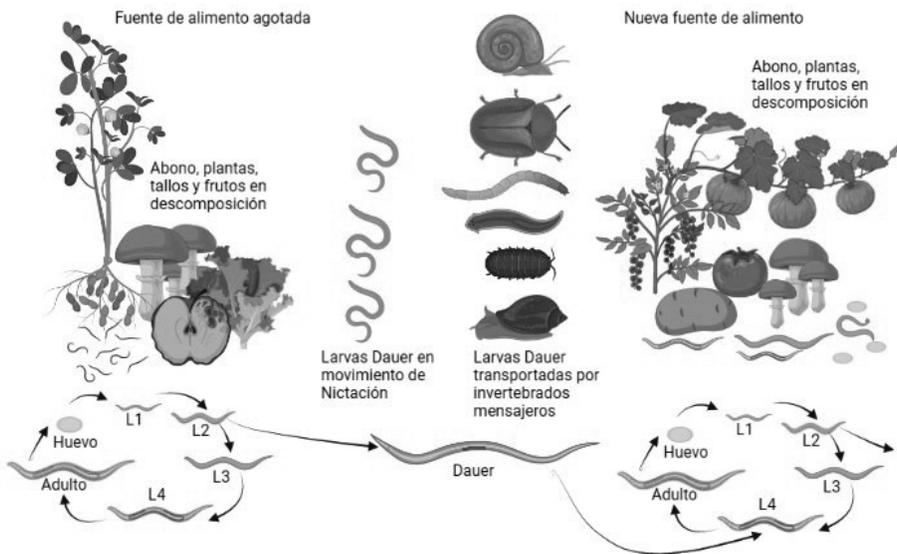
A. Medio NGM colocado en microscopio de disección/ estereoscopio con el fin de visualizar el nematodo debido a su tamaño. B. visualización de *C. elegans*, se observa el botón de *E. coli* OP50 como fuente de alimento, huevos, larvas adultas y larvas en estadios inferiores. C. Por medio de fluorescencia empleando GFP (*sto-6 :: gfp*) se observa el sistema nervioso (cableado) de *C. elegans*. Elaboración propia de los autores.

A continuación, se describirán los aspectos más relevantes concernientes al nematodo *C. elegans*, con el fin de conocer los requerimientos básicos para su mantenimiento y sus características fisiológicas.

1.2.1 Crecimiento, alimentación y mantenimiento del nematodo

En un contexto silvestre *C. elegans* habita en el suelo siendo el abono, las plantas, tallos y frutos en descomposición, el material de su predilección por su alto contenido de microorganismos que sirven como fuente de alimento (56). *C. elegans* se caracteriza por tener una forma de dispersión, cuando hay escasez de fuentes de alimento, el nematodo entra en estadio Dauer (éste será explicado con mayor profundidad en el ciclo de vida), el cual por movimientos de “Nictación” en el que se paran sobre la cola y mueven la cabeza en el aire, logran ser atrapados por otros invertebrados mensajeros como los isópodos y así ser transportados a una nueva fuente de alimento (Figura 3) (4, 5).

Figura 3. Ciclo de vida biótico de *C. elegans*.



Se observa el ciclo de *C. elegans* teniendo en cuenta la influencia y las interacciones con otros microorganismos y macroorganismos. Elaboración propia de los autores.

1.2.2 Ciclo de vida

A nivel general el nematodo aumenta de tamaño durante 4 estadios larvarios caracterizados L1 a L4. Todo inicia con la embriogénesis, la cual tiene una duración promedio de 16 horas, después de la fertilización se forma la cutícula del huevo, la cual es una barrera impermeable que permite el desarrollo independiente del embrión. Cuando se llega a la formación de 24 células, la madre hermafrodita deposita el huevo. En el momento en el que el embrión cuenta con 558 células eclosiona, dando lugar a la larva L1, la cual dura aproximadamente 16 horas, entre L2, L3 y L4 se calcula que hay 12 horas de duración. Al final de cada estadio el nematodo entra en un leve letargo en el que muda de cutícula (capa externa formada principalmente por colágeno) (Figura 4) (5, 56, 57).

Figura 4. Estadios larvarios de *C. elegans*.



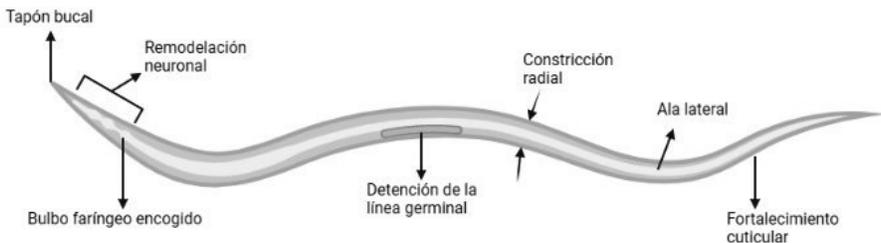
Se observa la cepa Salvaje N2 en sus diferentes estadios (Huevo, L1, L2, L3, L4 y adulto, desarrollado en el laboratorio). Fotografías tomadas por los integrantes del grupo Biotecnología y genética UCMC. Microscopio invertido 40X.

La etapa reproductiva de los hermafroditas adultos comienza 12 horas después de la muda de la larva L4, la mayor parte de la progenie se da en un periodo de 2 a 3 días. Cuando ya se han agotado los espermatozoides almacenados, es posible generar progenie adicional si ocurre

apareamiento con un macho. Después de finalizado el periodo reproductivo el nematodo hermafrodita vive unas semanas más hasta que llega a la senescencia (5).

En situaciones de escasez de alimento o de una alta densidad poblacional el nematodo entra a un estado alternativo al L3 denominado Dauer. Cuando ocurren situaciones estresantes desde estadio L1, el nematodo empieza a procesar esa información para que a finales del estadio L2 se inicie la transformación fenotípica. La larva Dauer se caracteriza por tener una cutícula de mayor resistencia que impide agresiones externas de tipo químico y físico, además envuelve completamente al nematodo impidiendo su alimentación y crecimiento; por esta razón, las Dauer pueden sobrevivir durante varios meses, en la naturaleza permiten la dispersión a diferentes ambientes. Cuando la larva Dauer es colocada en un contexto favorable, se caen los tapones bucales, dejan la cutícula y continúan con su crecimiento a larva L4 (Figura 5) (5, 58).

Figura 5. Morfología del estadio Dauer de *C. elegans*.



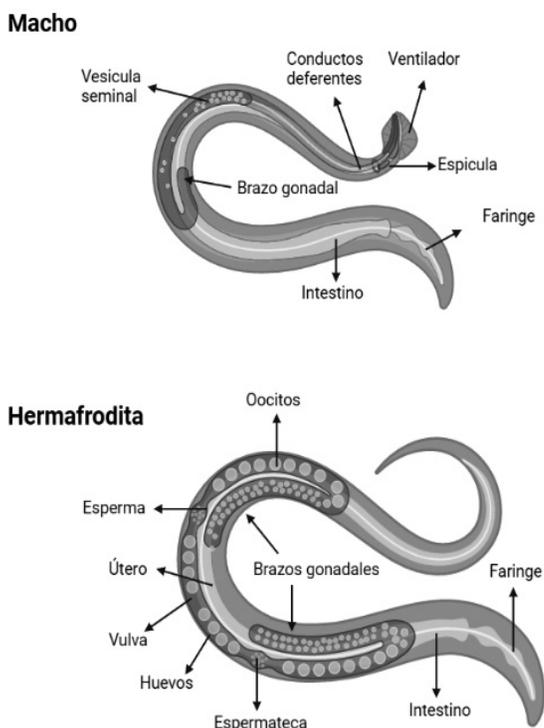
La larva Dauer de *C. elegans* sufre una transformación fenotípica en varios tipos de tejidos. Elaboración propia de los autores.

1.2.3 Anatomía y reproducción

El nematodo cuenta con dos sexos: hermafrodita y macho, los cuales visualmente se distinguen hasta la etapa L4. Los hermafroditas poseen una cola en punta y la vulva se observa como un semicírculo ventral, mientras que de los machos es característico una cola ancha en

forma de abanico (Figura 6). En el periodo reproductivo los ovocitos pueden ser fecundados por espermatozoides del mismo hermafrodita, lo cual se denomina autofecundación; mientras que cuando la fecundación de los ovocitos la realizan los espermatozoides provenientes del macho se denomina apareamiento (5); siendo la autofecundación el mecanismo más común y el más útil, pues con un solo nematodo hermafrodita se podría poblar todo un medio de cultivo (5, 59). Ambos sexos son diploides para los cinco cromosomas autosómicos, los hermafroditas tienen dos cromosomas XX y los machos un solo cromosoma XO, debido a que *C. elegans* no cuenta con un cromosoma Y como los humanos (5).

Figura 6. Los dos sexos de *C. elegans*.



Los hermafroditas y los machos difieren notablemente en el tamaño corporal general y en las estructuras como la gónada y la cola somáticas. Elaboración propia de los autores.

Cuando el nematodo se encuentra en etapa L4 la gónada de los hermafroditas produce espermatozoides ameboides haploides que son almacenados en la espermateca, cuando llega a la edad adulta la gónada cambia y empieza a producir ovocitos, los cuáles serán fertilizados por los espermatozoides y producirán en promedio 300 progenies durante su periodo reproductivo (2-3 días después de llegar a adulto). Cuando ocurre apareamiento con un macho hay la posibilidad de producir 1000 progenies durante el periodo reproductivo (5).

La autofecundación da lugar a la homocigosis, debido a que los hermafroditas no pueden aparearse entre ellos, las poblaciones presentan tendencia a perder la heterocigosis; por lo cual, las cepas mutantes son isogénicas. Adicionalmente la autofecundación sigue la herencia mendeliana de segregación 1:2:1, de esta manera el 25% de larvas hijas serán homocigotas para el alelo de interés o alelo mutante y evidenciará el rasgo autosómico recesivo en su fenotipo. Otra característica, es que cuando una mutación afecta la función de neuronas que posibilitan el apareamiento, el nematodo puede mantenerse en el tiempo debido a la autofecundación (5).

Gracias al apareamiento con machos es posible el intercambio de material genético, lo que permite la diversidad genética en posteriores generaciones, facilitando el mapeo de genes y la posibilidad de obtener progenies cruzadas, útiles en investigación (5, 60).

1.3 MANIPULACIÓN MODELO EN EL LABORATORIO

En el laboratorio, *C. elegans* es mantenido en agar NGM (Nematode Growth Medium) especial para nematodos y como fuente de alimento se usa *Escherichia coli* OP50 (*E. coli* OP50), la cual es una *E. coli* que tiene una mutación flagelar que elimina su movilidad, para que no se propague por el medio NGM, facilitando la visualización del nematodo durante la ejecución de diversos ensayos. Por esta razón, para su manipulación básica en el laboratorio deben emplearse microscopios de disección o estereoscopios, que facilitan la visualización de su desarrollo, reproducción y movimiento (Figura 7). En la experimentación más avanzada, los microscopios compuestos o confocal permiten la observación de células y tejidos con adecuada resolución.

Figura 7. Cultivo en agar NMG de la cepa silvestre N2 de *C. elegans*.



Tomada en microscopio invertido 40X por los integrantes del grupo Biotecnología y Genética UCMC.

En el laboratorio es versátil, pues permite ser congelado por varios meses y recuperarse al descongelarse y ser expuesto a condiciones favorables, lo cual permite la creación de ceparios del nematodo, donde es posible mantener cepas mutantes y transgénicas útiles en innumerables estudios; por su tamaño es posible realizar su cultivo y experimentación en laboratorios básicos, adicionalmente, este no es exigente con la temperatura por lo que es posible prescindir de incubadoras sofisticadas, pues sobrevive en un rango de 12°C - 25°C. Es importante mencionar que a una temperatura superior el nematodo se vuelve estéril (61), sin embargo, en un lapso corto de tiempo un aumento de temperatura provocaría el aumento de machos en la población (5, 56, 62).

Para el desarrollo de cualquier ensayo es posible sincronizar los nematodos desde huevos a partir de un experimento denominado Sincronización, donde con una solución compuesta por hipoclorito de sodio 5 % e hidróxido de sodio 2N se destruyen las larvas grávidas liberando los huevos que posteriormente eclosionaran. Todo lo anterior

permite usar *C. elegans* para experimentación básica como visualización a través de microscopía convencional hasta el análisis en plataformas bioquímicas y genómicas (5, 63-65).

Se han diseñado cinco estudios básicos que son útiles en tamizajes toxicológicos, ya que permiten evaluar aspectos fisiológicos esenciales en el nematodo, dando la posibilidad de inferir procesos y rutas de acción, ya sea de sustancias compuestas o de metabolitos aislados.

Estos ensayos corresponden a reproducción, longevidad, longitud del cuerpo, locomoción y estrés oxidativo. La reproducción permite evaluar el tamaño de la progenie, la mayoría de los compuestos tienen efectos sobre la reproducción del nematodo bien sea durante la formación de gametos, del embrión o sobre las conexiones nerviosas que modulan la función vulvar. Este ensayo consiste en tomar un número específico de larvas hermafroditas en estadio adulto y empezar a pasar a diario las larvas de forma individual a nuevos medios hasta finalizar su periodo reproductivo; los medios donde los nematodos colocaron huevos deben guardarse hasta que eclosionen y se deben contar las larvas hijas en estadio L2 y L3, para al final realizar una suma estableciendo el tamaño total de la progenie durante el periodo reproductivo de una larva hermafrodita (66, 67).

El ensayo de longevidad permite determinar el tiempo de vida del nematodo, representa un estándar de envejecimiento. Permite evaluar si una sustancia tiene efectos sobre vías que modulan el lapso de vida. Similar al ensayo de reproducción en estadio L4, se deben empezar a pasar las larvas hermafroditas de forma individual a diferentes medios, deben transferirse a diario para que no se mezclen generaciones. Al final del periodo reproductivo es posible realizar los pases cada dos días, hasta que la larva ya no responda a ningún estímulo, momento en que se establece la muerte del nematodo. Se debe realizar una curva para determinar el número promedio de días en los cuales el nematodo estuvo vivo (8, 68).

El ensayo de longitud del cuerpo permite evidenciar efectos de sustancias sobre el crecimiento del nematodo, mientras que la locomoción permite observar alteraciones neurológicas específicamente en

los procesos de sinapsis neuronal (8, 69, 70). Ambos ensayos deben realizarse en el primer día de adulto, la longitud del cuerpo puede realizarse de forma sencilla en microscopio óptico convencional con reglilla milimetrada (Figura 8). Caso similar aplica para determinar locomoción donde puede realizarse un conteo de la frecuencia de la curvatura corporal en 30 segundos; cabe resaltar que actualmente se han diseñado softwares especializados que permiten mediciones más exactas en diferentes estadios y en el caso de la locomoción permiten evaluar múltiples aspectos en diversas condiciones (como los medios líquidos y medios sólidos) (71).

Figura 8. Medición longitud del cuerpo en cepa transgénica TJ356.



Medición de longitud del cuerpo de larva de la cepa transgénica TJ356 en primer día de adulto. Medición realizada en microscopio óptico con reglilla milimetrada 40X. Tomada por integrantes del grupo Biotecnología y Genética UCMC.

Finalmente, el estrés oxidativo es un parámetro evaluable en *C. elegans* y se caracteriza por ser precursor de varias enfermedades crónicas y degenerativas, incluyendo el envejecimiento, al generarse un incremento de especies reactivas de oxígeno. En la sensibilidad al estrés oxidativo, *C. elegans* permite la evaluación de diversos procesos como la capacidad de equilibrio, desintoxicación de especies reactivas de oxígeno, reparación de daños producidos con diversos ensayos en varios estadios y con múltiples técnicas (72, 73). Los principales tipos de ensayo miden el agente al cual se encuentran expuestos,

el tiempo/tasa de exposición ya sea aguda o crónica y el tejido/órgano/compartimiento celular afectado, por ejemplo, el caso más común son las mitocondrias (74)

Todo lo anterior permite concluir que para trabajar con el nematodo no se requieren de los más sofisticados insumos, con él puede realizarse investigación básica, permitiendo desglosar valiosos resultados y llegar a muy concretas aproximaciones útiles en varios campos como el de la toxicología ambiental.

1.4 APLICACIÓN EN TOXICOLOGÍA

Las sustancias químicas usadas en la optimización de procesos industriales y en la innovación de productos, ya sea de uso comercial o doméstico, presentan un impacto en el medio ambiente, las características inherentes de los ecosistemas y la vida silvestre. Adicionalmente, la mayoría de estos compuestos presentan tendencia a la persistencia y bioacumulación en la naturaleza (cuerpos hídricos y suelos) y en los seres vivos. En el caso de los seres humanos la bioacumulación se presenta en tejidos y órganos, donde se generan efectos adversos alterando el sistema endocrino, sistema reproductor y sistema nervioso (75-79).

Los modelos de tipo biológico permiten evidenciar los efectos a la exposición aguda o crónica a diversos compuestos, *C. elegans* se destaca por permitir identificar alteraciones de forma rápida, concreta y fácil en el marco de la fisiología de un organismo completo en diferentes etapas de desarrollo, lo cual facilita la observación por sistemas y órganos como el sistema nervioso y el sistema reproductor (Figura 9) (80).

Este nematodo es muy útil en ensayos predictivos de toxicología, por ejemplo, posee un sistema inmunológico innato bien establecido que permite evaluar los efectos de sustancias tóxicas como los metales pesados (mercurio inorgánico y el metilmercurio) (81, 82). Adicionalmente, la función mitocondrial se encuentra caracterizada y en diversos estudios ha mostrado utilidad; por ejemplo, para determinar el efecto del arsénico inorgánico y otros efectos asociados a alteraciones en la función mitocondrial (6, 83). También es relevante mencionar

que gracias a la constante investigación sobre este nematodo se ha logrado establecer la toxicocinética de contaminantes ambientales como nanopartículas, cisplatino, clorpirifos y fenantreno (6), algunos ejemplos se presentan en la Tabla 2.

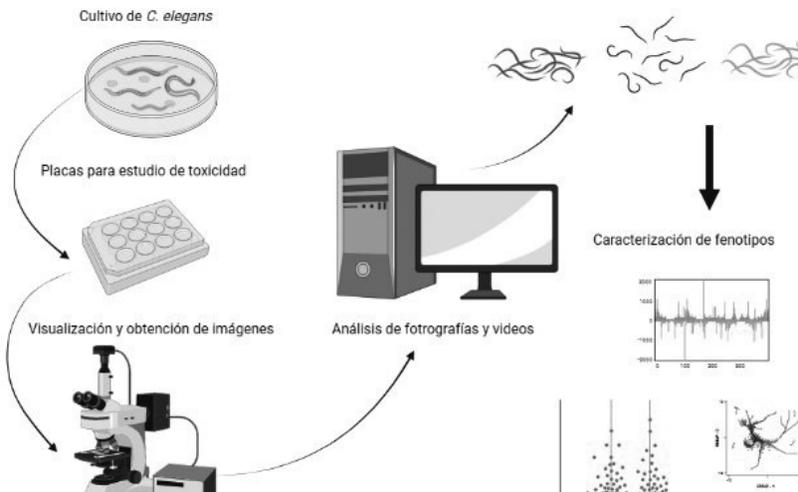
Tabla 2 Evaluación de toxicidad por contaminantes ambientales.
Elaboración propia de los autores.

CONTAMINANTE	PRINCIPALES OBSERVACIONES
Exposición a sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y ácido perfluorooctanoico (PFOA)	La exposición a PFOS y PFOA causó toxicidad reproductiva en los nematodos machos: reducción del número de células germinales, el tamaño y la motilidad de los espermátides y un aumento en la tasa de malformación de los espermatozoides (84).
Mezclas de plaguicidas: carbamatos (CM) y plaguicidas organofosforados (OP)	Efectos inhibitorios sobre el comportamiento de locomoción de <i>C. elegans</i> (69).
Exposición a cinco tipos comunes de microplásticos: poliamidas (PA), polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC) y partículas de poliestireno (PS)	Letalidad inducida por partículas microplásticas, disfunción reproductiva, reducción de los niveles de calcio intestinal y el aumento de la expresión del gen del estrés oxidativo <i>gst-4</i> (85). La toxicidad de los microplásticos depende de su tamaño (86).
Evaluación de metales pesados en suelo y sedimentos	La exposición generó inhibición de la tasa de supervivencia y crecimiento de <i>C. elegans</i> (87). Aumento de la expresión génica y actividad enzimática relacionada con el estrés oxidativo (87).

CONTAMINANTE	PRINCIPALES OBSERVACIONES
Exposición conjunta de nanopartículas - clordano y hexaclorociclohexano (HCH)	Efectos de letalidad, inhibición del crecimiento y reducción de la vida útil (88).
Exposición a tolueno (volátil)	Letalidad y retrasos significativos en el desarrollo dependiente de la concentración (89). Mayor incidencia de eventos apoptóticos en las células de la línea germinal (89). Cambios de comportamiento reflejados en los movimientos de natación y locomoción radial (89).

Por otro lado, los estudios de toxicidad pueden ir dirigidos a identificar efectos en procesos metabólicos en *C. elegans*, siendo útil en la determinación de intoxicación aguda *In Vivo* por compuestos químicos y contaminantes ambientales, adicionalmente es posible establecer de forma adecuada Dosis Letal 50 % (DL50) y Tiempo Letal 50 % (TL 50 %) mediante el uso de softwares especializados (Figura 9) (2).

Figura 9. Diseño general de métodos para trabajar con *C. elegans* en el campo de la toxicología ambiental.



Cultivo de nematodos, puede ser en medio sólido/líquido NGM o en placas con diferentes muestras contaminadas, productos químicos y tomar video para cada pocillo. Procesamiento de imágenes/videos con el fin de cuantificar los fenotipos de los nematodos bajo exposición a las muestras de tipo ambiental, basándose en estos fenotipos cuantificados de los nematodos inferir y caracterizar los efectos de las muestras evaluadas. Elaboración propia de los autores.

La posibilidad de mantener a *C. elegans* en condiciones de laboratorio tanto en medios sólidos como en medios líquidos, permite gran variedad de ensayos toxicológicos, tales como: neurotoxicidad, toxicidad conductual, toxicidad de nanopartículas, reproducción, inductores de hsp-60 mitocondrial e inhibidores de SKN-1 (homólogo de NRF-2) (6).

1.4.1 Ventajas de usar *C. elegans* en toxicología

Al poseer un ciclo de vida corto, *C. elegans* permite identificar las alteraciones en cada una de las etapas de desarrollo y de las que trascienden entre generaciones, lo cual en modelos más complejos representaría aumento de costos, mano de obra y tiempo (6).

Por otra parte, su genoma completamente secuenciado con un 60-80% de homología con el ser humano y la posibilidad de contar con un banco (*Caenorhabditis elegans* Natural Diversity Resource (CeNDR)) de cepas silvestres encontradas a nivel mundial, permiten el constante estudio genómico y molecular, lo cual se constituye en un aporte relevante para el ámbito de la toxicología molecular (6). Adicionalmente, en Minnesota existe el *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC) donde se encuentran cepas mutantes y transgénicas estables y son enviadas a otras naciones por un bajo costo para la investigación en muchas áreas.

El avance en herramientas genéticas ha permitido incursionar en el campo de la epigenética ambiental; por ejemplo, actualmente se cuenta con una Biblioteca de ARN de interferencia, lo cual ha maximizado la investigación de las interacción gen-ambiente en *C. elegans* (6). Cabe mencionar que la gran variedad de cepas transgénicas estables permite la experimentación desde ensayos básicos con GFP hasta los

de más alta complejidad como análisis genómico, metabólico y proteómico. Hay que resaltar que *C. elegans* es un organismo que permite la edición genética con herramientas como CRISPR cas-9 (90, 91), permitiendo el análisis *In Vivo* de rasgos fenotípicos, morfológicos y genómicos (Figura 10) (6).

Al ser de anatomía transparente permite detectar cambios morfológicos a simple vista. Los estudios han demostrado que este nematodo tiene una utilidad comparable a la de los vertebrados, ya que permite predecir efectos de sustancias tóxicas debido a sus objetivos moleculares y vías de señalización conservadas en seres superiores como los humanos (6).

Por otra parte, *C. elegans* permite el estudio de la neurotoxicología por sus versátiles características como un genoma completamente secuenciado, transgénicos con genes reporteros como GFP, cuerpo transparente, corto ciclo de vida, fácil mantenimiento y manipulación. Adicionalmente, *C. elegans* cuenta con 8 neuronas DAérgicas: dos neuronas deiridas anteriores, cuatro cefálicas y dos neuronas deiridas posteriores, lo que hace posible la investigación *in situ* de la vulnerabilidad de las neuronas DAérgicas (92).

Es importante destacar que *C. elegans* es útil como modelo para el monitoreo de metales, pesticidas y herbicidas con tecnologías que permiten apreciar la composición de biomoléculas, desde cambios fenotípicos como la estereoscopia Raman, la cual junto con análisis multivariado permiten detectar la respuesta que tiene un organismo completo frente a sustancias químicas, además de identificar los umbrales de los efectos tóxicos (7).

Figura 10. Esquema que representa las fortalezas de *C. elegans* para su uso en el ámbito de la toxicología ambiental.

Caenorhabditis elegans



Regulación transcripcional altamente conservada



Ciclo de vida corto

El cuerpo transparente permite la obtención de imágenes de una sola célula

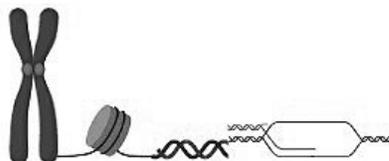
Linaje celular invariante y completamente mapeado



Células germinales accesibles



Epigenética ambiental



Orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad

Homogeneidad tisular



Vías de transcripción en tiempo real



Línea germinal / epigenética transgeneracional

Respuestas epigenéticas basadas en la población



Al lado izquierdo se observan las características de *C. elegans* al lado derecho sus aportes para los estudios de epigenética ambiental como fortalezas. Elaboración propia de los autores.

1.4.2 Limitaciones de *C. elegans* en toxicología ambiental

A pesar de que *C. elegans* representa una plataforma para múltiples estudios, como otros organismos biológicos, también presenta una serie de limitaciones. En primera instancia esta su anatomía, pues carece de células (sanguíneas e inmunológicas), órganos (como los pulmones) y sistema inmunológico adaptativo. No hay presencia de procesos como el transporte de sangre, paso a barrera hematoencefálica, metabolismo en hígado y filtración en el riñón (6). Se describen otras limitaciones a continuación:

- No permite la evaluación de un órgano intacto completo, únicamente de vías metabólicas y de señalización.

- A pesar de que la toxicología aguda en *C. elegans* es comparable a la de seres superiores, parámetros toxicocinéticos y toxicodinámicos no pueden ser evaluados en una totalidad sistémica.
- Alteración en la sensibilidad a compuestos químicos, debido a la cutícula que compone al nematodo y los huevos, pues estas barreras poseen un adecuado equilibrio osmolar y excreción de compuestos.
- Todavía las rutas de exposición a químicos no son completamente claras, se sugieren vías de ingestión y transdérmicas.
- Variación genética y bioquímica en la regulación de la actividad enzimática, como por ejemplo el citocromo P450, en comparación con seres superiores, *C. elegans* posee un complemento más grande de genes que regulan el funcionamiento de citocromo P450; caso similar ha sido evidenciado con el receptor de hormonas nucleares (*nhr*) y genes *Fbox*.

Finalmente, es de aclarar que las condiciones de cultivo en el laboratorio influyen en los resultados de cada ensayo, ya que afectan de forma directa el metabolismo, el comportamiento y los fenotipos de resistencia al estrés del organismo (6). Sin embargo, esto no ha representado un impedimento para continuar investigando a profundidad con este poderoso modelo.

1.4.3 La novedad en el estudio de la Epigenética ambiental

La epigenética ambiental se define como influencia ambiental en el epigenoma, *C. elegans* es un modelo apto para identificar la regulación transcripcional a partir de estímulos exógenos – factores ambientales estresantes (6); se ha demostrado que es un organismo respondedor ante parámetros ambientales como: variaciones osmolares, ausencia de alimento (periodos de inanición), fluctuaciones de temperatura y presencia de sustancias tóxicas como contaminantes químicos en todas sus presentaciones incluyendo nanopartículas (6).

Desde el 2005 se han establecido varios hallazgos de relevancia en este ámbito, ha sido posible distinguir el epigenoma de la línea germinal

respecto del que pertenece a células somáticas en *C. elegans*, asimismo, se ha demostrado la herencia transgeneracional de las respuestas a estímulos ambientales en el nematodo. Básicamente la investigación se ha centrado en el desarrollo de la enfermedad frente a la exposición a diferentes estados larvarios, los diseños de exposición más conocidos han sido:

- a. Exposición del desarrollo somático a menudo durante el desarrollo larvario, por ejemplo en el año 2017 Rudgalvyte y colaboradores expusieron a *C. elegans* durante todo su desarrollo larvario a metilmercurio, evidenciando un aumento en el gen de la proteína relacionada con la lipocalina *lpr-5* y el gen del colágeno cuticular *dpy-7*, los cuales desarrollan la cutícula externa que representa una barrera ante agresiones químicas, y se estableció como un mecanismo de defensa epigenético ante la exposición a metilmercurio (6).
- b. Efectos multigeneracionales de la exposición, consiste en la exposición de larvas en estado de gravidez, en el trasfondo lo que se desea es estimular no solo a la larva adulta, sino también a los embriones y a la línea germinal dentro de los embriones (6). Por ejemplo, en 2016 Schultz y colaboradores expusieron 10 generaciones a iones de plata y nanopartículas de plata, observando una disminución en la esperanza de vida y toxicidad reproductiva desde la primera generación hasta la décima, caracterizándose por una disminución de los efectos a medida que se pasaba de generación (6).
- c. Efectos transgeneracionales de la exposición, consiste en exponer una determinada generación y analizar una generación posterior que no estuviese expuesta ni directa e indirectamente. Este tipo de análisis se facilita en *C. elegans*, debido a su corto tiempo de generación y ciclo de vida que tarda semanas, mientras que en otros modelos podría tardar meses hasta años. Por ejemplo, en el año 2014 Taki y colaboradores identificaron la expresión de microARN durante la exposición a nicotina, observándose la expresión diferencial de 40 microARN de los cuales 37 se relacionaron con una alta exposición y 3 a una baja exposición a la nicotina. Los microARN identificados se relacionaron con procesos metabólicos, neuronales y conductuales, adicionalmente cerca de 14

microARN mostraron expresión diferencial en más de una generación, es decir que, el efecto a la exposición de nicotina fue transgeneracional (6, 93).

La proyección a futuro es que la mayoría de estudios de toxicología ambiental determinen los efectos transgeneracionales y los mecanismos de herencia (histonas y ARN) de los efectos causados por los compuestos químicos, con el fin de establecer una relación entre la exposición ambiental efectuada y las alteraciones epigenéticas. La limitación en epigenética ambiental más relevante es la dificultad de extrapolar en el contexto de otros modelos o seres superiores las dosis farmacocinéticas/farmacodinamias (6).

1.4.4 Ventajas del uso de *C. elegans* en epigenética

La respuesta epigenética a estímulos ambientales, ha cobrado relevancia en la investigación de los últimos años, los investigadores han hallado en *C. elegans* la posibilidad de dirigir la regulación transcripcional por medio de técnicas moleculares como ARN de interferencia, logrando destinos celulares específicos, lo cual es fundamental en los experimentos de epigenética. Así también, el linaje celular invariante y mapeado asegura un análisis trazable en el mismo número de células ya sea de un tejido específico o en el organismo completo (6).

A continuación, se describen las características de *C. elegans* en el estudio de epigenética:

- *C. elegans* permite evidenciar procesos epigenéticos/epigenómicos en tiempo real, mediante el uso de microscopía avanzada y robusta como la de contraste de interferencia diferencial, que permite la visualización del desarrollo del linaje en embriones individuales. Por medio de microscopía fluorescente confocal se han observado las divisiones nucleares en embriones donde las histonas se encuentran fusionadas con proteínas fluorescentes. También la transparencia del cuerpo del nematodo facilita el estudio de moléculas individuales, procesos bioquímicos y de transcripción junto con ordenamientos de la cromatina en tiempo real.

- La conservación general de la regulación génica y el estudio de la línea germinal en espermatozoides/ovocitos, facilita el estudio de la heredabilidad meiótica de las alteraciones epigenéticas y los fenotipos hereditarios.
- Con la creación del consorcio modENCODE (Model Organism Encyclopedia of DNA Elements) se dio inicio al mapeo genómico de *Drosophila melanogaster* y *C. elegans*, en el cual se incluyeron sitios de unión de factores reguladores, transcripciones de ARNm, orígenes de la replicación del ADN y modificaciones de cromatina postraduccionales (6). Esto ha permitido evidenciar la conservación entre especies de parámetros genético-moleculares como la transcripción, el procesamiento del ARN co-transcripcional y los estados de la cromatina (6). En cuanto al control epigenético de la regulación génica en invertebrados *C. elegans* ha mostrado relevancia en la identificación y caracterización de una histona desmetilasa. Sin embargo, dentro de las limitaciones de *C. elegans* en el ámbito de la epigenética, el nemátodo carece de procesos de metilación del ADN y no utiliza una regulación transcripcional de largo alcance (6).

1.5 CONCLUSIÓN

Actualmente los avances tecnológicos han permitido observar lo que antes era imperceptible, sin embargo, ha sido la naturaleza la que ha brindado la mayor herramienta de estudio y son los modelos biológicos como *C. elegans*. Este nematodo demuestra la complejidad de la vida y de la evolución, entre más se estudia, más se descubre, no ofrece un límite de conocimiento, a tal punto que hoy es posible hablar del estudio de la epigenética ambiental y genotoxicidad en un organismo completo, permitiendo llegar a deducciones más precisas de lo que sucede en la biosfera, además de los efectos y la huella de cada acción impuesta por el hombre.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Consortium CeS. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 1998;282(5396):2012-8.
2. Gao S, Chen W, Zeng Y, Jing H, Zhang N, Flavel M, et al. Classification and prediction of toxicity of chemicals using an automated phenotypic profiling of *Caenorhabditis elegans*. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2018;19(1):18.
3. Maupas E. Modes et formes de reproduction des nématodes. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*. 1900;8:463-624.
4. Frezal L, Felix MA. *C. elegans* outside the Petri dish. *Elife*. 2015;4.
5. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2015;200(2):387-407.
6. Weinhouse C, Truong L, Meyer JN, Allard P. *Caenorhabditis elegans* as an emerging model system in environmental epigenetics. *Environ Mol Mutagen*. 2018;59(7):560-75.
7. Mugova F, Read DS, Riding MJ, Martin FL, Tyne W, Svendsen C, et al. Phenotypic responses in *Caenorhabditis elegans* following chronic low-level exposures to inorganic and organic compounds. *Environ Toxicol Chem*. 2018;37(3):920-30.
8. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974;77(1):71-94.
9. Dusenbery DB, Sheridan RE, Russell RL. Chemotaxis-defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1975;80(2):297-309.
10. MacLeod AR, Waterston RH, Fishpool RM, Brenner S. Identification of the structural gene for a myosin heavy-chain in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of molecular biology*. 1977;114(1):133-40.
11. Kimble JE, White JG. On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*. 1981;81(2):208-19.

12. Kimble J, Crittenden SL. Germline proliferation and its control. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2005:1-14.
13. Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*. 1977;56(1):110-56.
14. Kimble J, Hirsh D. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*. 1979;70(2):396-417.
15. Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*. 1983;100(1):64-119.
16. Hedgecock EM, Sulston JE, Thomson JN. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1983;220(4603):1277-9.
17. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. 1986;44(6):817-29.
18. Yuan J, Horvitz HR. The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development*. 1992;116(2):309-20.
19. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 1993;75(4):641-52.
20. Conradt B, Xue D. Programmed cell death. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2005:1-13.
21. White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1986;314(1165):1-340.
22. Jarrell TA, Wang Y, Bloniarz AE, Brittin CA, Xu M, Thomson JN, et al. The connectome of a decision-making neural network. *Science*. 2012;337(6093):437-44.

23. White JG. Getting into the mind of a worm--a personal view. WormBook : the online review of *C elegans* biology. 2013:1-10.
24. Priess JR, Schnabel H, Schnabel R. The *glp-1* locus and cellular interactions in early *C. elegans* embryos. *Cell*. 1987;51(4):601-11.
25. Priess JR. Notch signaling in the *C. elegans* embryo. WormBook: the online review of *C elegans* biology. 2005:1-16.
26. Beitel GJ, Clark SG, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* *ras* gene *let-60* acts as a switch in the pathway of vulval induction. *Nature*. 1990;348(6301):503-9.
27. Han M, Sternberg PW. *let-60*, a gene that specifies cell fates during *C. elegans* vulval induction, encodes a *ras* protein. *Cell*. 1990;63(5):921-31.
28. Sternberg PW. Vulval development. WormBook: the online review of *C elegans* biology. 2005:1-28.
29. Sundaram MV. Canonical RTK-Ras-ERK signaling and related alternative pathways. WormBook : the online review of *C elegans* biology. 2013:1-38.
30. Friedman DB, Johnson TE. A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics*. 1988;118(1):75-86.
31. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. 1993;366(6454):461-4.
32. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1997;277(5328):942-6.
33. Collins JJ, Huang C, Hughes S, Kornfeld K. The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. WormBook : the online review of *C elegans* biology. 2008:1-21.
34. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.

35. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-62.
36. Vella MC, Slack FJ. *C. elegans* microRNAs. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2005:1-9.
37. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994;263(5148):802-5.
38. Boulin T, Etchberger JF, Hobert O. Reporter gene fusions. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2006:1-23.
39. Schwarz EM. Genomic classification of protein-coding gene families. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2005:1-23.
40. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
41. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-9.
42. Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*. 2000;408(6810):325-30.
43. Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol*. 2001;2(1):RESEARCH0002.
44. Wang L, Eckmann CR, Kadyk LC, Wickens M, Kimble J. A regulatory cytoplasmic poly(A) polymerase in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2002;419(6904):312-6.

45. Sonnichsen B, Koski LB, Walsh A, Marschall P, Neumann B, Brehm M, et al. Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2005;434(7032):462-9.
46. Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E, Gottschalk A. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Current biology : CB*. 2005;15(24):2279-84.
47. Felix MA, Ashe A, Piffaretti J, Wu G, Nuez I, Belicard T, et al. Natural and experimental infection of *Caenorhabditis* nematodes by novel viruses related to nodaviruses. *PLoS Biol*. 2011;9(1):e1000586.
48. Li WH, Ju YR, Liao CM, Liao VH. Assessment of selenium toxicity on the life cycle of *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology*. 2014;23(7):1245-53.
49. Eom HJ, Roca CP, Roh JY, Chatterjee N, Jeong JS, Shim I, et al. A systems toxicology approach on the mechanism of uptake and toxicity of MWCNT in *Caenorhabditis elegans*. *Chem Biol Interact*. 2015;239:153-63.
50. Clavijo A, Kronberg MF, Rossen A, Moya A, Calvo D, Salatino SE, et al. The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. *Sci Total Environ*. 2016;569-570:252-61.
51. Fajardo C, Martin M, Nande M, Botias P, Garcia-Cantalejo J, Mengs G, et al. Ecotoxicogenomic analysis of stress induced on *Caenorhabditis elegans* in heavy metal contaminated soil after nZVI treatment. *Chemosphere*. 2020;254:126909.
52. Nagar Y, Thakur RS, Parveen T, Patel DK, Ram KR, Satish A. Toxicity assessment of parabens in *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 2020;246:125730.
53. Hartman JH, Widmayer SJ, Bergemann CM, King DE, Morton KS, Romersi RF, et al. Xenobiotic metabolism and transport in *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2021;24(2):51-94.

54. Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(5):387-98.
55. Hayden AN, Leptich EJ, Arey RN. Invited review: Unearthing the mechanisms of age-related neurodegenerative disease using *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2022;267:111166.
56. Felix MA, Braendle C. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.* 2010;20(22):R965-9.
57. Irion U, Nusslein-Volhard C. Developmental genetics with model organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(30):e2122148119.
58. Androwski RJ, Flatt KM, Schroeder NE. Phenotypic plasticity and remodeling in the stress-induced *Caenorhabditis elegans* dauer. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology.* 2017;6(5).
59. Teotonio H, Carvalho S, Manoel D, Roque M, Chelo IM. Evolution of outcrossing in experimental populations of *Caenorhabditis elegans*. *PloS one.* 2012;7(4):e35811.
60. Pandey R, Sharma M, Saluja D. SIN-3 as a key determinant of lifespan and its sex dependent differential role on healthspan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany NY).* 2018;10(12):3910-37.
61. Petrella LN. Natural variants of *C. elegans* demonstrate defects in both sperm function and oogenesis at elevated temperatures. *PloS one.* 2014;9(11):e112377.
62. Wood WB. *The Nematode Caenorhabditis Elegans*: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.
63. Suen KM, Sheard TMD, Lin C-C, Milonaityte D, Jayasinghe I, Ladbury JE. Expansion microscopy reveals subdomains in *C. elegans* germ granules. *bioRxiv.* 2022:2022.05.29.493872.
64. Yu CJ, Orozco Cosio DM, Boyden ES. ExCel: Super-Resolution Imaging of *C. elegans* with Expansion Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2022;2468:141-203.

65. J VANK, Taris KH, Peterman EJG. Imaging adult *C. elegans* live using light-sheet microscopy. *J Microsc.* 2021;281(3):214-23.
66. Middendorf PJ, Dusenbery DB. Fluoroacetic Acid Is a Potent and Specific Inhibitor of Reproduction in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Nematol.* 1993;25(4):573-7.
67. Dhawan R, Dusenbery DB, Williams PL. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health A.* 1999;58(7):451-62.
68. Park HH, Jung Y, Lee SV. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells.* 2017;40(2):90-9.
69. Wang Y, Liu SS, Huang P, Wang ZJ, Xu YQ. Assessing the combined toxicity of carbamate mixtures as well as organophosphorus mixtures to *Caenorhabditis elegans* using the locomotion behaviors as endpoints. *Sci Total Environ.* 2021;760:143378.
70. Garcia-Espineira M, Tejeda-Benitez L, Olivero-Verbel J. Toxicity of atrazine- and glyphosate-based formulations on *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018;156:216-22.
71. Seidenthal M, Vettkotter D, Gottschalk A. WormRuler: A software to track body length used to characterize a super red-shifted channelrhodopsin in *Caenorhabditis elegans*. *MicroPubl Biol.* 2022;2022.
72. Yenny Y. Lozano, Sara E. Giraldo, Harold S. Castro, Sánchez RM. Plantas con actividad neuroprotectora estudiadas en *C. elegans*. *J Pharm Pharmacogn* 2022;10(5):812-36.
73. Gutierrez Sánchez JS, Castro Cárdenas HS, Giraldo Quintero SE, Lozano Jiménez YY, Sánchez Mora RMJÁI. *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio de enfermedades neurodegenerativas. 2020;5(2):24-33.
74. Senchuk MM, Dues DJ, Van Raamsdonk JM. Measuring Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans*: Paraquat and Juglone Sensitivity Assays. *Bio Protoc.* 2017;7(1).

75. Dan L, Wu S, Xu H, Zhang Q, Zhang S, Shi L, et al. Distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in water, sediment and fishes in a shallow Chinese freshwater lake: Implications for ecological and human health risks. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017;140:222-9.
76. Montano L, Pironi C, Pinto G, Ricciardi M, Buono A, Brogna C, et al. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in the Environment: Occupational and Exposure Events, Effects on Human Health and Fertility. *Toxics.* 2022;10(7).
77. Collin MS, Venkatraman SK, Vijayakumar N, Kanimozhi V, Arbaaz SM, Stacey RGS, et al. Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects on human: A review. *Journal of Hazardous Materials Advances.* 2022;7:100094.
78. Kothapalli CR. Differential impact of heavy metals on neurotoxicity during development and in aging central nervous system. *Current Opinion in Toxicology.* 2021;26:33-8.
79. Yin K, Wang Y, Zhao H, Wang D, Guo M, Mu M, et al. A comparative review of microplastics and nanoplastics: Toxicity hazards on digestive, reproductive and nervous system. *Science of The Total Environment.* 2021;774:145758.
80. Behl M, Rice JR, Smith MV, Co CA, Bridge MF, Hsieh JH, et al. Editor's Highlight: Comparative Toxicity of Organophosphate Flame Retardants and Polybrominated Diphenyl Ethers to *Caenorhabditis elegans*. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology.* 2016;154(2):241-52.
81. McElwee MK, Ho LA, Chou JW, Smith MV, Freedman JH. Comparative toxicogenomic responses of mercuric and methylmercury. *BMC Genomics.* 2013;14(1):698.
82. Ruszkiewicz JA, Pinkas A, Miah MR, Weitz RL, Lawes MJA, Akinyemi AJ, et al. *C. elegans* as a model in developmental neurotoxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2018;354:126-35.

83. Camacho J, de Conti A, Pogribny IP, Sprando RL, Hunt PR. Assessment of the effects of organic vs. inorganic arsenic and mercury in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Res Toxicol*. 2022;3:100071.
84. Yin J, Jian Z, Zhu G, Yu X, Pu Y, Yin L, et al. Male reproductive toxicity involved in spermatogenesis induced by perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021;28(2):1443-53.
85. Lei L, Wu S, Lu S, Liu M, Song Y, Fu Z, et al. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Sci Total Environ*. 2018;619-620:1-8.
86. Yu Y, Chen H, Hua X, Dang Y, Han Y, Yu Z, et al. Polystyrene microplastics (PS-MPs) toxicity induced oxidative stress and intestinal injury in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Sci Total Environ*. 2020;726:138679.
87. Li X, Yang Q, Wang L, Song C, Chen L, Zhang J, et al. Using *Caenorhabditis elegans* to assess the ecological health risks of heavy metals in soil and sediments around Dabaoshan Mine, China. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022;29(11):16332-45.
88. Li X, Hu J, Qiu R, Zhang X, Chen Y, He D. Joint toxic effects of polystyrene nanoparticles and organochlorine pesticides (chlordane and hexachlorocyclohexane) on *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science: Nano*. 2020;7(10):3062-73.
89. Soares MV, Charao MF, Jacques MT, Dos Santos ALA, Luchese C, Pinton S, et al. Airborne toluene exposure causes germline apoptosis and neuronal damage that promotes neurobehavioural changes in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Pollut*. 2020;256:113406.
90. Du X, McManus DP, French JD, Jones MK, You H. CRISPR/Cas9: A new tool for the study and control of helminth parasites. *Bioessays*. 2021;43(1):e2000185.
91. Vicencio J, Ceron J. A Living Organism in your CRISPR Toolbox: *Caenorhabditis elegans* Is a Rapid and Efficient Model for Developing CRISPR-Cas Technologies. *CRISPR J*. 2021;4(1):32-42.

92. Lu M, Li H, Li Y, Lu Y, Wang H, Wang X. Exploring the Toxicology of Depleted Uranium with *Caenorhabditis elegans*. *ACS Omega*. 2020;5(21):12119-25.
93. Taki FA, Pan X, Zhang B. Chronic nicotine exposure systemically alters microRNA expression profiles during post-embryonic stages in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Physiol*. 2014;229(1):79-89.

CAPÍTULO 2

Danio rerio EN EL ESTUDIO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

Dayana Rodríguez Morales
Ruth Mélida Sánchez Mora

El Pez Cebra, Zebra Fish anteriormente conocido como *Brachydanio rerio* (*B. rerio*) y actualmente como *Danio rerio* (*D. rerio*) es un pez tropical de agua dulce, de origen Asiático, ubicado específicamente en India. Primariamente era común tenerlo como pez de acuario, sin embargo, en la actualidad se considera un organismo modelo promotor en el campo de la genética del desarrollo y la ecotoxicología (1-4). A lo largo de este capítulo se describe a *D. rerio* desde un punto histórico, siguiendo con la perspectiva general y finalizando en el ámbito específico del modelo y su aplicabilidad en la toxicología ambiental.

2.1 HISTORIA

Aunque en muchas investigaciones se establece que el pionero en el pez cebra es George Streisinger a principios de los años 80's, hay publicaciones que incluyen este pez desde el año 1952 en donde *D. rerio* fue expuesto a diferentes sustancias como el sulfato de zinc, 2-acetilaminofluoreno, uretano, ácido barbitúrico y dietilbarbitúrico, N-acetilhistidina, dietilnitrosamina, etanol y antes de los años 1970, también prevalecen estudios de embriogenesis, nervios ópticos y tumores en el pez (5-17).

George Streisinger realizó estudios con el Pez Cebra desde 1980 y existen publicaciones a su nombre hasta 1992, a él se le atribuyen la gran mayoría de avances con *D. rerio* a nivel genético ya que fue él quien lo propuso como modelo biológico de investigación. Desde entonces, este modelo es usado para tal fin y hoy en día proporciona un gran número de información científica (3, 18-27).

El primer nombre de este pez fue *Brachydanio rerio*, sin embargo, en 1993 tras diversas investigaciones y la Reunión de Pez Cebra de ese año, la cual se llevó a cabo en el Laboratorio de Cold Spring Harbor, sugirieron que debería usarse el nombre científico *D. rerio* que es como lo conocemos actualmente (19, 28).

Para los años 1995 y 1996, diversos investigadores usaron al pez cebra para llevar a cabo estudios iniciales a nivel genético, identificando genes críticamente involucrados en el desarrollo de varios sistemas y órganos como el sistema nervioso y el encéfalo, el sistema reproductor y la embriogénesis, el sistema digestivo y sus órganos y el sistema cardiovascular junto con células hematopoyéticas del pez (29-37).

En 1997 fue publicado un estudio de Allizard F. y colaboradores donde buscaban saber si las escamas de Pez Cebra eran útiles como modelo para investigaciones sobre los procesos del desarrollo del esqueleto dérmico (38). A finales de la década de 1990 se estableció un centro genético para el mantenimiento y distribución de líneas de Pez Cebra mutantes, conocido como Zebrafish International Resource Center (ZIRC), donde se han desarrollado desde entonces nuevos modelos transgénicos y de tipo salvaje. Para esta misma época se creó el recurso en línea "<http://zfin.org>" The Zebrafish Information Network (ZFIN), en este se obtienen datos e información sobre la genética, las publicaciones y los laboratorios del pez cebra (19, 39). Finalmente en 1999 Metscher B. y Ahlberg P. contribuyeron con la comprensión evolutiva del pez y al mismo tiempo Takeda H, establecieron un protocolo para el establecimiento de *D. rerio* (40, 41).

Ya para el 2000, Wixon J. realiza una revisión general de lo que se sabía al momento sobre el pez, direcciona los estudios futuros de la genómica de *D. rerio* y simultáneamente se propone como modelo

para enfermedades humanas (42, 43). En este mismo año, *D. rerio* se utilizó para detectar teratógenos, comprender e identificar los mecanismos de acción de tóxicos comunes y establecer la especificidad tóxica tisular en vertebrados (18, 44-46).

Para el 2001, se destaca una investigación sobre la toxicocinética de la atrazina en embriones de pez cebra y junto al siguiente año se realizan diversas investigaciones abarcando diferentes temas en los que se destacan estudios sobre el sistema reproductor de *D. rerio* (47-50). De manera continua en el año 2003 se demuestra una vez más que efectivamente el modelo es útil para estudios toxicológicos y genéticos, a su vez se resalta su valor para modelar enfermedades de vertebrados (49, 51, 52).

Entre tantas de las investigaciones y temas abordados durante los siguientes 3 años hematoencefálica hematoencefálica, en este capítulo queremos destacar los estudios que comprenden los mecanismos de desarrollo y comportamiento de *D. rerio* tal y como lo exponen los autores de los artículos a continuación citados (53-56). En el 2007, los estudios anteriormente realizados permiten usar de manera más clara el modelo en el ámbito toxicológico, como lo expresan Bretaud S. y colaboradores en su estudio con morfina y Yang L. et al. y su investigación en el campo toxicogenómico (57, 58).

A nivel ambiental en los años 2008 y 2009 sobresalen los estudios relacionados con toxicología reproductiva en *D. rerio*, el uso del modelo pez cebra en la evaluación de riesgos ambientales y el transporte del arsénico dentro del animal a través de acuagliceroporinas (59-61). Durante el 2010 al 2015 el campo de la toxicología generó un gran impacto, es por ello que en diversas investigaciones se propuso al pez cebra como modelo para evaluar y determinar la susceptibilidad a fármacos, biomarcadores, ototoxicos, hepatotoxicos, oculotóxicos, entre otros. (62-71).

Entre las diversas aplicaciones que existen con el modelo *D. rerio*, y todo lo que se ha mencionado a lo largo de esta historia (tabla 2), se añade que durante la última década así como lo que lleva este año, en el ámbito ecotoxicológico el pez cebra se ha utilizado para

el monitoreo a través de técnicas avanzadas y moleculares, las cuales han podido ser aplicadas en el pez sin presentar mayor complicación (18, 72-96).

Tabla 3 Línea de tiempo *D. rerio*. Hitos históricos importantes y relacionados con genética y ecotoxicología. Elaboración propia.

TABLA	SUCESO
1952 - 1979	<i>Brachydanio rerio</i> (<i>D. rerio</i>) es expuesto a diversas sustancias y se evalúa su comportamiento, al mismo tiempo se desarrollan estudios de embriogénesis, nervios ópticos y tumores (5-15).
1980 - 1992	George Streisinger es considerado como el pionero en usar a Pez Cebra como modelo y contribuye a la comprensión y genética de <i>B. rerio</i> o <i>D. rerio</i> , Aparecen nuevas publicaciones utilizando el modelo (20-27).
1993	Se deja de usar el nombre de <i>Brachydanio rerio</i> el cual es cambiado por <i>Danio rerio</i> (28).
1995 - 1996	Son identificados los genes involucrados en el desarrollo morfológico y anatómico del pez cebra (29-36).
1997	Se propone <i>D. rerio</i> como modelo del desarrollo del esqueleto dérmico (38).
1998 - 1999	Se Funda el Zebrafish International Resource Center (ZIRC), The Zebrafish Information Network (ZFIN) y se logra la comprensión evolutiva del pez, así como también se establece el protocolo para el mantenimiento del <i>D. rerio</i> (40-41).
2000	El pez cebra se propone como modelo para enfermedades humanas y se usa para detectar teratógenos y comprender los mecanismos de acción de tóxicos comunes (42-45).
2001 - 2002	Se usa a <i>D. rerio</i> para modelar la toxicocinética de la atrazina en embriones y al mismo tiempo se avanza sobre la comprensión del sistema reproductor (47,48, 50).
2003	Se demuestra que el modelo pez cebra es útil para estudios toxicológicos y genéticos debido a sus ortólogos con vertebrados (49-52).

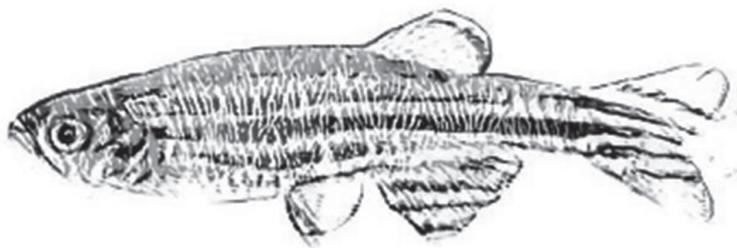
TABLA	SUCESO
2004 - 2006	Se describen los mecanismos de desarrollo y comportamiento de <i>D. rerio</i> (53-56).
2007	<i>D. rerio</i> es propuesto como modelo toxicogenómico. (57-58).
2008 - 2009	Se establece el modelo <i>D. rerio</i> en la toxicología reproductiva, también se usa para la valuación de riesgos ambientales y el metabolismo de arsénico por las acuagliceroporinas del pez (59-62).
2010 - 2015	Se propone a <i>D. rerio</i> como modelo para evaluar fármacos, biomarcadores, ototóxicos, hepatotóxicos, oculotóxicos (62-71).
2016 - 2021	A nivel ambiental <i>D. rerio</i> es usado para modelar estudios de Biomonitorio (73-86).
2022	<i>D. rerio</i> ha permitido evaluar los efectos tóxicos de los microplásticos de poliestireno, pesticidas como phoxim y deltamethrin y sustancias polifluoroalquiladas (94-97).

2.2 GENERALIDADES DEL MODELO

El pez cebra pertenece al reino Animalia, clase Teleostei, orden Cypriniformes familia Cyprinidae, género *Danio*, especie *rerio* por tanto es conocido como *D. rerio*, sin embargo, en la literatura es posible encontrarlo también como; *Cyprinus rerio*, *Brachydanio rerio*, *Danio frankei*, leopardo danio, cebra danio, pez cebra o pez leopardo (Figura 11). Este animal es originario de los ríos de agua dulce ubicados en la India, distribuido ampliamente en Bangladesh, Nepal, Nyanmar y Pakistán (1, 85-87).

Figura 11. Clasificación taxonómica de *D. rerio*.

<i>Danio rerio</i>	
Reino	<i>Animalia</i>
Orden	<i>Teleostei</i>
Clase	<i>Cypriniformes</i>
Familia	<i>Cyprinidae</i>
Genero	<i>Danio</i>
Especie	<i>rerio</i>



En la parte superior se observa la clasificación taxonómica del pez, en la parte inferior una ilustración aproximada. Elaboración propia de los autores

Su hábitat común son aguas cálidas, sin embargo, este pez puede sobrevivir entre 25 a 37° C. *D. rerio* es un animal sociable y omnívoro, es común hallarlo en acuarios como mascota ya que su adquisición es demasiado fácil, debido a que tiene una alta capacidad de reproducción, por lo que no posee riesgo de extinción ni es una especie protegida (3, 39, 87).

El desarrollo embrionario y larval del pez cebra sucede de manera externa y se completa desde la fertilización hasta la adultez durante tres meses llegando a medir de 2 a 5 cm de largo y en las primeras etapas de vida, embrionaria y larval *D. rerio* es transparente. Su genoma tiene una homología del 70% con el ser humano y en cuanto a enfermedades se asocia en un 82% (2, 87)

2.2.1 Ciclo de vida

Para llevar a cabo la reproducción *D. rerio* se aparea en horas de la mañana, tanto en su hábitat natural como en el laboratorio, aunque en algunos casos la liberación de huevos puede suceder en horas de la tarde. El proceso de cotejo dura aproximadamente 30 minutos, pero en algunos casos se extiende hasta una hora. En algunos casos las hembras alejan a los machos agresivamente cuando ellas perciben que el acercamiento es desfavorable, puesto que el pez macho y la hembra tienen comportamientos de apareamiento muy diferentes, los cuales veremos a continuación (4).

Por un lado, el macho persigue a la hembra con el fin de tener un contacto con ella usando su nariz y su cola, posteriormente, el macho la rodea con movimientos rápidos en forma de zig-zag sin perder el contacto. Por otra parte, la hembra inicia acercándose al varón, nadando junto a los machos, permaneciendo quieta cuando él la persigue o deteniéndose frente a él. Ellas usualmente nadan hacia un sitio seguro de forma repetida donde desean realizar el desove o puesta de huevos (4).

Luego de que ambos tienen estos comportamientos de forma continua, los machos extienden sus aletas caudal y dorsal en torno a ellas con el fin de alinear sus poros genitales y simultáneamente liberan espermatozoides, al mismo tiempo estimulan a la hembra para que suceda el desove y se lleve a cabo el encuentro del óvulo y el espermatozoide. La puesta de huevos sucede frecuentemente cada 6 días y como característica principal, los huevos del pez cebra son translúcidos, se dice que son más grandes (7 mm de diámetro) en comparación a otros peces similares, cabe resaltar que una sola pareja de *D. rerio* genera hasta 200 huevos en un solo apareamiento. (3, 4, 87).

La luz, el volumen de agua, la temperatura, el pH, y condiciones que proporcionan un hábitat natural, es decir aquellos que tengan plantas y sustratos acuáticos, son necesarios para que a *D. rerio* no se le vea afectado su rendimiento reproductivo. El peso ideal del pez para una efectiva reproducción es de 0,50 g a 0,70 g para hembras y para machos hasta de 0,95 g. Lo anterior se consigue a través de la alimentación rica en nutrientes ya que este es omnívoro y come entre una o

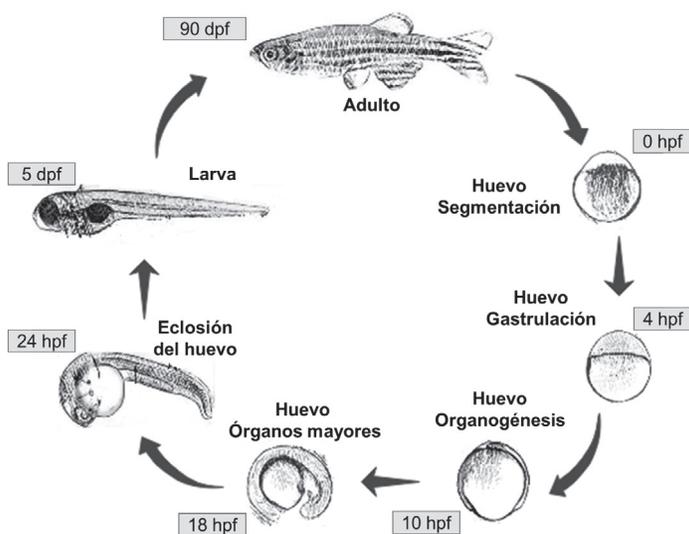
dos veces al día, más adelante se expondrán algunos de los alimentos frecuentes de *D. rerio* a nivel natural o para criadero y sus características morfológicas externas (4).

El desarrollo temprano del pez cebra ocurre entre las primeras 48 y 72 horas luego de la fecundación, donde la mayoría de los órganos ya casi están formados exceptuando el tracto gastrointestinal. Para las 72 horas el hígado, el páncreas y el intestino se encuentran completamente desarrollados, pero el tracto gastrointestinal se completa hasta las 96 horas.

Simultáneamente durante los primeros 5 días de vida se desarrolla el sistema endocrino. El pez alcanza la madurez reproductiva dentro de los 3 a 6 meses posteriores a la fertilización, logrando un tamaño máximo de 5 centímetros de largo (2, 3).

D. rerio cursa por tres cambios morfológicos durante su desarrollo, huevo, larva y pez adulto. En la figura (Figura 12) se describe su tiempo de desarrollo, morfogénesis y procedimientos embrionarios importantes durante toda su etapa de vida, la cual se completa 90 días luego de la fecundación.

Figura 12. Ciclo de vida de *D. rerio*.

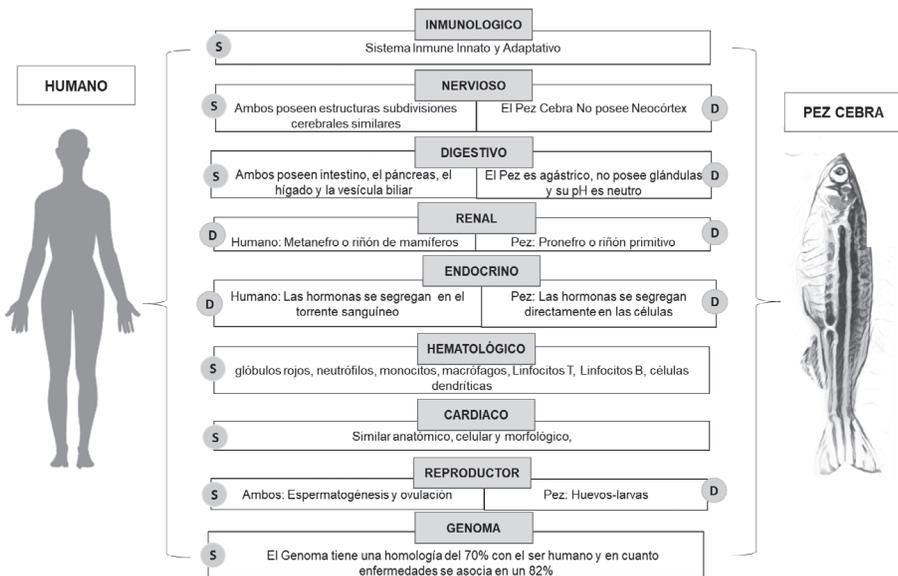


Se observan los 3 cambios morfológicos del pez; huevo, larva y adulto en función de tiempo acompañado de los sucesos embriológicos. (hpf): Horas postfecundación, (dpf): Días postfecundación. Elaboración propia de los autores.

2.2.2 Anatomía

El pescado *D. rerio* al ser un modelo biológico desarrollado tiene características bien definidas como sistema inmunológico, nervioso, reproductor, endocrino y digestivo, lo que permite que tenga órganos estructurales y funcione como modelo de enfermedades humanas (Figura 13), a continuación, se darán a conocer características básicas de cada sistema que posee este pez, haciendo un énfasis especial en la homología con vertebrados superiores y el ser humano (18, 88).

Figura 13. Similitudes y diferencias anatómicas entre el humano y el pez cebra.



Al lado izquierdo (humano) se encuentran características anatómicas del hombre que son similares al pez o están ausentes. Al lado derecho (pez cebra) se exponen órganos o características que diferencian con el humano. Los bloques que tienen

la letra (S) indican similitud, los bloques con letra (D) indican diferencia. Elaboración propia de los autores.

Sistema inmunológico y sistema nervioso

El sistema inmune del pez cebra a nivel innato es altamente conservado, contiene diversos tipos de células y moléculas de señalización, además se sabe que la larva de este animal desarrolla células inmunes innatas alrededor de los dos días posteriores a la fertilización. Por otro lado, en cuanto a la respuesta inmune adaptativa se presenta aproximadamente tres semanas después de la fertilización (88).

El sistema nervioso de *D. rerio* está bien descrito en múltiples etapas de la vida, está distribuido de manera similar al de otros vertebrados, en el momento se sabe que las estructuras principales y subdivisiones cerebrales que porta el pez cebra poseen fuertes asociaciones entre las funciones y regiones del cerebro humano, sin embargo, el pez cebra no cuenta con neocórtex, por lo que no se pueden usar para modelar procesos cognitivos que dependen de esa región (2, 89).

Como modelo, el pez ha contribuido en investigaciones de neurotransmisores receptores y transportadores, como la dopamina, GABA, glutamato, noradrenalina, serotonina, histamina y acetilcolina, por lo que se ha usado para estudiar los mecanismos y la patogenia de los trastornos y enfermedades neurológicos (2, 89).

Sistema digestivo

El sistema digestivo *D. rerio* está formado por el intestino, el páncreas, el hígado y la vesícula biliar que funcionan de manera conservada con mamíferos, no obstante el pez cebra carece de criptas intestinales, células de Paneth, placas de Peyer y una capa submucosa, es decir los músculos lisos se conectan a la capa mucosa directamente. Por otro lado, se sabe que este pez es agástrico, sin embargo, la porción

anterior del intestino (bulbo intestinal), posee un lumen agrandado sin glándulas gástricas (pH neutro) donde se almacena el alimento (2, 33).

De manera similar a mamíferos el pez cebra media el movimiento intestinal con músculos lisos los cuales se controlan por el sistema nervioso. Del mismo modo la maduración, diferenciación y renovación de las células epiteliales son análogas en ambas especies quienes también poseen un epitelio con vellosidades, enterocitos, células caliciformes y células enteroendocrinas (2).

Sistema renal y endocrino

Aunque *D. rerio* posee un sistema renal como los mamíferos, su órgano principal carece de complejidad pues el pronefro o riñón primitivo larvario del pez cebra tiene una anatomía más simple que la del metanefro o riñón de mamíferos. Básicamente el pronefro posee solo dos nefronas con glomérulos fusionados. El glomérulo del pez cebra posee células endoteliales capilares fenestradas, podocitos y células epiteliales polarizadas con cilios primarios quienes recubren los túbulos de la nefrona, las cuales se dividen y distribuyen en regiones especializadas para la secreción diferencial y la reabsorción en la sangre (2, 90).

Sin embargo, pese a estas circunstancias el pez ha sido funcional como modelo para modelar la enfermedad renal o la nefrotoxicidad, de hecho, en este último resulta relevante puesto que el riñón es vulnerable a la toxicidad que pueden generar compuestos externos, porque su función es eliminar las moléculas tóxicas de la circulación (2).

A nivel endocrino en los seres vivos vertebrados terrestres, existe un sistema hipotalámico-hipofisario y por lo tanto los péptidos neuroendocrinos producidos en el hipotálamo se secretan a los vasos sanguíneos con el fin de llegar a la adenohipófisis. Por otro parte, en *D. rerio*, no se presenta el sistema hipotalámico-hipofisario, por lo tanto las moléculas neurosecretoras ingresan a la hipófisis y las hormonas se segregan directamente en las células adenohipofisarias. El pez cebra

carece de una glándula suprarrenal distintiva, pero presenta una glándula funcionalmente comparable con mamíferos (2, 3).

Hematología del pez cebra y sistema cardiovascular

Al igual que el ser humano, el pez cebra tiene diferentes células sanguíneas tales como glóbulos rojos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, Linfocitos T, Linfocitos B, células dendríticas y como plaqueta se tiene el trombocito. De hecho, se han generado indicadores para cada línea celular a través de la fluorescencia, por consiguiente, es posible observar las células sanguíneas de *D. rerio* en diferentes colores y evaluar la toxicidad (2, 34).

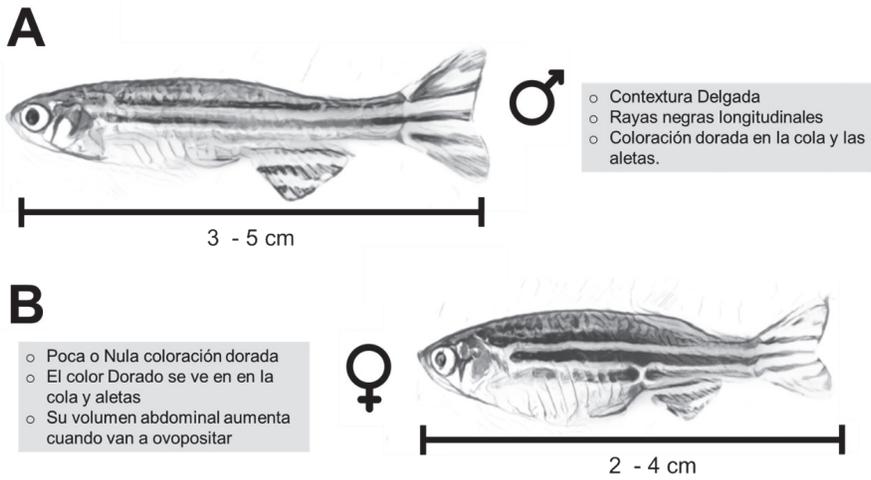
Se ha demostrado que la fisiología cardiovascular es conservada evolutivamente entre humanos y el pez cebra a nivel anatómico, celular y morfológico, de hecho, se han reportado estudios donde se evidencia que el pez es un modelo viable de cardiotoxicidad e incluso diversos fármacos cardiovasculares del hombre han evidenciado respuestas similares en el pez cebra y numerosos trastornos cardiovasculares humanos se han estudiado ampliamente en transgénicos de *D. rerio* (2).

Sistema reproductor

Como sucede en la mayoría de los sistemas anteriormente mencionados en este caso, el pez cebra posee una anatomía de los órganos de células germinales muy correlacionada con vertebrados. Por un lado, los machos *D. rerio* (Figura 14 A), poseen testículos emparejados con pequeños túbulos y dentro de estos las paredes están revestidas por células de Sertoli, que al igual que el ser humano promueven la morfogénesis y la espermatogénesis. Por otro lado las células de Leydig ubicadas en espacios intersticiales producen testosterona. Como diferencia a los vertebrados superiores en la espermatogénesis se tiene que el pez cebra posee un quiste espermatogénico conformado por

células de Sertoli las cuales envuelven las células germinales con el fin de desarrollarse sincrónicamente (4).

Figura 14. Características según género de *D. rerio*.



Se observa un pez cebra macho en la parte superior (A) y un pez cebra hembra en la parte inferior (B), donde se diferencian sus características externas, como color, tamaño y proporción. (cm): Centímetros. Elaboración Propia de los autores

En cuanto a las hembras (Figura 14B), la similitud con vertebrados superiores a nivel de sistema reproductivo se basa en la estructura y función de los ovarios, los cuales se desarrollan en cuatro etapas ováricas. En este caso en *D. rerio*, primero sucede la etapa de ovocito primario, donde se observan células esféricas relativamente pequeñas, luego, la etapa cortical-alveolar con ovocitos agrandados llenos de alvéolos corticales, después, la etapa vitelogénica, caracterizada por la presencia de yema de huevo en los ovocitos y, por último, la etapa de maduración en el que se pueden observar ovocitos con capa irregular (4).

2.3 MANIPULACIÓN DEL MODELO EN EL LABORATORIO

El pez cebrá se mantiene típicamente a 28° C en el laboratorio, sin embargo para estudios de xenoinjertos de cáncer o infecciones con patógenos, la temperatura del agua donde se desarrollan los peces oscila entre los 35 a 37° C, generando un entorno acorde al crecimiento de tumores humanos, parásitos, bacterias y hongos. Aunque *D. rerio* es muy resistente a cambios medioambientales hay condiciones básicas establecidas para su mantenimiento las cuales veremos a continuación (39, 87).

Es importante mantener la inocuidad del entorno y del agua a través de parámetros como temperatura (25° C) y pH (6.8 a 7.5), así como también el oxígeno disuelto (OD, mg / L), desechos nitrogenados (NH₃ y NH₄⁺) turbidez, salinidad, entre otros, ya que cualquier microorganismo o alteración en los parámetros mencionados podría contribuir a enfermedades, alterar vías de señalización e inducir estrés afectando los resultados de la investigación (39, 87, 91).

Este pescado es demasiado sociable, por lo que como mínimo se deben mantener 5 animales por cada litro de agua, la cual debe ser cambiada en un 10 - 25% semanalmente y cada mes se deben lavar los acuarios y cambiar los filtros (87). En cuanto a la turbidez del agua, esta debe ser inducida por algas en su entorno ("agua verde"), puesto que es necesaria, ya que de esta forma aumenta el contraste de los organismos zooplanctónicos y disminuye la distancia de reacción de la presa, dando como resultado condiciones de luz dispersa y, en consecuencia, suele conducir a una disminución dramática de las interacciones agresivas entre las larvas, el comportamiento de adherencia y el canibalismo (39).

Los procedimientos actuales de cría del pez cebrá se basan casi uniformemente en el ciclo diurno de luz de 14 horas y 10 horas de oscuridad (14:10 h), puesto que el pez cebrá no sobrevive en la oscuridad continua y bajo luz constante su tamaño poblacional es menor que el de los peces criados en condiciones de ciclo de luz-oscuridad. Se ha revelado que *D. rerio* presenta características fisiológicas y de comportamiento similares a las del sueño de los mamíferos cuya

regularidad depende del ciclo diario debido a la producción de melatonina por el órgano pineal del pez quien regula el ritmo circadiano tal y como sucede en humanos (2, 87, 91).

Actualmente se cuenta con alimentos comerciales de tipo granulados o en hojuelas como Gemma Micro 300 el cual se debe administrar al 5% del peso corporal del pez una o dos veces al día, con el fin de garantizar un balance nutricional. Sin embargo, este alimento procesado solo se recomienda en adultos ya que en las etapas tempranas es recomendable brindar alimento vivo. En cualquier etapa de la vida los peces de *D. rerio* se pueden alimentar con *Artemia* salina o nauplios de *Artemia* en la mañana y en la noche, *Spirulina platensis* tres veces al día al 5% del peso corporal, aceite de calamar, hoja de moringa, aceite de linaza, Gusano tubefex, protozoos, ortíferos, paramecios y camarones en salmuera, entre otros (1, 4, 39, 87, 91).

Es importante tener en cuenta que los óvulos y embriones de *D. rerio* se deben separar de los peces adultos, puesto que estos devoran sus crías. Usualmente los machos y hembras en edad fértil se separan y solo se colocan en un mismo acuario al momento de la reproducción, en una relación de 2 a 3 machos por cada hembra (87).

Para disminuir las infecciones y mantener la progenie, los embriones se desinfectan con cloro y/o yodo o se preservan con frío la mayoría de las líneas y se usan machos adultos para obtener esperma y criopreservar, luego de esto, los machos se sacrifican, fijan y procesan en bloques de parafina para estudios histopatológicos y así mantener un control reproductivo. Luego de descongelar el esperma para su uso se realiza una fertilización *in vitro* (39).

2.4 APLICACIÓN EN TOXICOLOGÍA

El pez cebra es usado como modelo de enfermedades humanas por medio de la manipulación genética y fluorescencia donde se incluyen órganos como el corazón, riñón, hígado y los sistemas hematopoyético, inmunológico, nervioso, entre otros. También se utiliza para modelar el impacto negativo de compuestos externos, contribuyendo así

a la comprensión etiológica, los efectos en la salud y los mecanismos de acción de enfermedades, relacionando los hallazgos con los seres humanos en campos de morbimortalidad a nivel agudo y crónico (18).

En el ser humano el contacto frecuente a compuestos externos que se encuentran en productos de uso diario, agua contaminada, condiciones de aire insalubres, alimentos manipulados o expuestos a contaminantes durante el desarrollo, genera un impacto negativo en el embrión, conduciendo a anomalías congénitas, reproductivas, mortinatos y consecuencias en el desarrollo luego del nacimiento a nivel endocrino o en el sistema nervioso central, así como, afectaciones para la salud a largo plazo durante la vida de un individuo como el cáncer (18, 88, 89).

A nivel ecotoxicológico se utiliza para modelar el impacto negativo de compuestos externos contribuyendo así a la comprensión etiológica, los efectos en la salud y los mecanismos de acción de enfermedades, relacionando los hallazgos con los seres humanos en campos de morbimortalidad a nivel agudo y crónico (1, 18).

2.4.1 Compuestos tóxicos que afectan a *D. rerio* y se correlacionan con enfermedades humanas

Se han estudiado diversos compuestos tales como dietilestilbestrol, atrazina, dioxina, entre otros, sobre embriones del pez cebra donde se han encontrado fallas neuroendocrinas, alteraciones morfológicas y daño gonadal en adultos expuestos durante todo su ciclo de vida a estos compuestos externos. Los estudios anteriores sugieren que el pez cebra logra ser usado como modelo favorable para evidenciar los efectos tempranos y tardíos a la exposición a toxinas (18, 50, 59, 70).

En *D. rerio* es posible observar los efectos de toxinas o compuestos químicos *in vivo*, gracias a los genes GFP o técnicas fluorescentes, además de evaluar directamente la toxicidad, formas de absorción, distribución, metabolismo y mecanismos de eliminación. De esta forma es posible incluso extender su uso en la detección y validación de tratamientos. Cabe resaltar que el pez cebra se ha usado como

modelo para estudiar el comportamiento ante compuestos como metales y metaloides, así como también componentes sintéticos de productos de consumo, pesticidas y subproductos del procesamiento industrial y la incineración de desechos (18).

Se sabe que *D. rerio* expresa genes del citocromo P450 (CYP) necesarios para el metabolismo y la biotransformación de xenobióticos (18). Los xenobióticos son sustancias químicas que un organismo absorbe a causa de la exposición constante a un ambiente contaminado, además no se pueden metabolizar de forma natural. Al no ser utilizados como nutrientes los xenobióticos pueden alcanzar concentraciones tóxicas que interfieren en los procesos metabólicos normales a nivel celular (92, 93).

En el genoma del pez cebra, se han identificado aproximadamente 86 genes CYP con características metabólicas homólogas humanas (18). Diversos son los compuestos que generan daños específicos en órganos y sistemas del pez (Tabla 3). *D. rerio* se puede exponer a xenobióticos con solo disolver una sustancia química en el agua y monitorear los cambios fenotípicos y / o los efectos tóxicos (2).

Tabla 4 Compuestos usados en el modelo *D. rerio* y sus órganos implicados.

COMPUESTOS	ORGANOS, SISTEMAS O VIAS DE SEÑALIZACION INVOLUCRADOS
Dietilestilbestrol, Atrazina, Dioxina	Conduce a daños neuroendocrinos, alteraciones morfológicas, daño gonadal (11, 83).
Toxinas, Metales, Pesticidas Y Agentes Oxidantes	Inducen estrés celular en el pez (94-97).
Bisfenol A	Disruptor endocrino, afecta la salud reproductiva, el desarrollo temprano de larvas y contribuye a la obesidad del Pez Cebra (59).

COMPUESTOS	ORGANOS, SISTEMAS O VIAS DE SEÑALIZACION INVOLUCRADOS
Arsénico	Defectos cardiovasculares y alteraciones hepáticas en <i>D. rerio</i> (61,73).
Acetaminofén, Etanol, Diurón, Diazinón Y Fenvalerato	Afectan el hígado y el sistema nervioso del pez (94-97).

Los compuestos de la columna izquierda se han usado en *D. rerio* y conducen a daños específicos los cuales se mencionan en la columna derecha y se correlacionan con la salud humana. Elaboración propia de los autores

Por otro lado, se sabe que la exposición a toxinas, metales, pesticidas y agentes oxidantes, induce una respuesta de tipo estrés celular altamente conservada. Como consecuencia al estrés se desarrollan enfermedades neurodegenerativas, disfunción metabólica, enfermedades inflamatorias y cáncer, estas patologías pueden verse agravadas debido al contacto constante a las sustancias antes mencionadas (18).

Algunos contaminantes ambientales alteran el sistema endocrino como por ejemplo el Bisfenol A que es un disruptor debido a su capacidad para provocar efectos tanto proestrogénicos como antiestrogénicos al unirse a los receptores de estrógeno ER α y ER β . Este compuesto se encuentra en diversos productos industriales y de consumo, como los plásticos, y también es el resultado de la fabricación y la lixiviación que como consecuencia tiene efectos adversos sobre la salud reproductiva, el desarrollo temprano y contribuye a la obesidad. En el pez cebra se une al receptor gamma relacionado con el estrógeno del pez ($ERR\gamma$) *in vivo* y como resultados se han encontrado fenotipos relacionados (18, 49).

Por otra parte, las acuagliceroporinas y la metiltransferasa son enzimas necesarias para la absorción y el metabolismo del arsénico inorgánico, el pez cebra expresa estas enzimas específicas del arsénico y como consecuencia a la exposición del arsénico en el desarrollo morfológico general de embriones y larvas de pez, se han encontrado defectos

cardiovasculares debido a la regulación baja de *Dvr1*, el cual es esencial para una adecuada morfogénesis cardíaca (18, 61).

En esa misma línea, luego de la exposición al arsénico los factores *nr2f2*, *jun*, *k-ras* y *apo* son regulados positivamente en el hígado del pez cebra. Estos factores están implicados en vías que pueden contribuir a la enfermedad hepática inducida por arsénico, por ejemplo cáncer. A nivel crónico el Arsénico se retiene en ojo, piel e hígado de *D. rerio* y continuamente conlleva a un aumento de la frecuencia cardíaca y defectos neurológicos, además se sabe que la progenie se reduce en relación con la progenie no expuesta a arsénico (18, 67).

Como órgano base para el estudio de compuestos externos se tiene el hígado ya que en su gran mayoría las toxinas afectan específicamente este órgano, debido a que en él sucede el metabolismo xenobiótico en los vertebrados, desarrollando necrosis, hígado graso, esteatohepatitis y cáncer de hígado (18).

En el pez cebra se han identificado respuestas hepáticas específicas de toxinas por medio de expresión génica en una variedad de plataformas en respuesta a arsénico, acetaminofén y etanol, además se sabe que el diurón, diazinón y fenvalerato también generan toxicidad en el animal, y que entre las enzimas marcadoras de estos últimos compuestos en el hígado están la catalasa y la superóxido dismutasa (1, 18, 63).

2.4.2 Cepas transgénicas de *D. rerio* usadas en el área de la Salud Ambiental

En el pez cebra se han realizado estudios con aril hidrocarburo, este es un receptor citosólico que se expresa en tejidos durante el desarrollo. Las cepas utilizadas son conocidas como; Tg (*cyp1a: nls-gfp*) y Tg (*cyp1a: gfp*). El Ahr se activa en respuesta a hidrocarburos aromáticos (arilo) sintéticos y naturales, funcionando como un factor de transcripción e induciendo la expresión de genes, entre los que codifican las enzimas CYP mencionadas anteriormente (18).

Los metales pesados como Plomo, Platino, Cadmio y Zinc, entre otros, en concentraciones altas tienen efectos tóxicos graves en los seres humanos y los animales. Estos compuestos suelen encontrarse tras la explotación minera en el medio ambiente. El pez cebra cepa Tg (mt: egfp), se ha utilizado ampliamente para estudiar las consecuencias de la exposición a metales, permitiendo detectar la presencia de metales en el agua, se ha encontrado que la exposición a varios metales diferentes se asocia con déficits en el desarrollo neurológico (18).

En el pez cebra, debido a que es un animal vertebrado y muy bien caracterizado, se puede evaluar y tratar el estrés celular en cualquier célula, órgano o sistema a través de la cepa huORFZ. De manera similar la cepa GFP TgBAC (hspb11: GFP), se ha desarrollado con el fin de poder observar respuestas de tipo choque térmico y como estrategia celular utilizada para proteger la célula debido al estrés. Esta reacción puede ser inducida por el envejecimiento, enfermedades por plegamiento de proteínas y la exposición a sustancias químicas tóxicas, lo que permite evaluar diferentes condiciones como modelo candidato, de hecho por medio de esta cepa ha sido posible identificar los efectos específicos de plaguicidas en un tejido (18).

Del mismo modo, existen varias moléculas exógenas capaces de interferir en la señalización hormonal y simultáneamente pueden alterar el sistema endocrino. Por ejemplo, diferentes cepas transgénicas como la Tg (5xERE: GFP) y Tg (cyp19a1b: GFP) se utilizan para la detección de la señalización del receptor de estrógeno y han sido útiles para identificar estrógenos concentrados en muestras de agua ambiental (18).

La persistencia de compuestos químicos, la exposición a tóxicos y contaminantes ambientales son características de la salud ambiental que pueden ser evaluables en el pez cebra a través de diversos transgénicos (Tabla 4). Los productos químicos simplemente se pueden agregar al medio del embrión y el pez cebra transparente y en desarrollo se puede evaluar para determinar la letalidad y las anomalías del desarrollo, desde la fertilización hasta las etapas larvarias (18).

Tabla 5. Cepas *D. rerio* utilizados en toxicología ambiental.

CEPAS	APLICACIÓN EN ECOTOXICOLOGIA
Tg (cyp1a: nls-gfp) y Tg (cyp1a: gfp)	Permite realizar estudios con hidrocarburos aromáticos (arilo) sintéticos y naturales.
Tg (mt: egfp)	Detecta metales pesados en el ambiente como; Plomo, Platino, Cadmio y Zinc.
huORFZ.	Se activa cuando hay xenobióticos en el medio que inducen estrés celular.
TgBAC (hspb11: GFP)	Respuesta tipo choque térmico cuando el pez es expuesto a compuestos químicos tóxicos.
Tg (5xERE: GFP) y Tg (cyp19a1b: GFP)	Útil para evaluar algunos disruptor endocrino, en este caso para estrógeno.

Cepas transgénicas de *D. rerio* usadas para evaluar el comportamiento de diversos compuestos tóxicos. Elaboración Propia

Ghanim K. y colaboradores han estandarizado técnicas para evaluar el impacto del fenvalerato sobre este pez <https://www.unicolmayor.edu.co/universidad/dependencias/vicerrectoria-academica/eventos/encuentros-pedagogia-unicolmayor/v-encuentro-pedagogia>. Para determinar la concentración letal 50 (LC 50), estos investigadores mantuvieron los peces 15 días y después los expusieron a diversas concentraciones hasta 96 horas. Para obtener el total de proteínas de estos órganos, seleccionaron animales de manera aleatoria y capturaron 0.2g de tejidos como branquias e hígado, los cuales fueron disecados para ser diluidos en 2,0 ml de tampón de fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,4) y posteriormente centrifugados a 10.000 g durante 15 min (1).

De la misma manera, a partir de los órganos expuestos al compuesto en estudio se pueden realizar ensayos como el de superóxido dismutasa, por medio de la reducción fotoquímica de Nitroblue tetrazolium

y su lectura a 560 nanómetros (nm) frente al blanco de reactivo, o también se puede llevar a cabo ensayos como Catalasa a una temperatura de 37° C y a una lectura a 240 nm, con el fin de evaluar el aumento o la disminución de estas enzimas, ya que su alteración sugiere que existe un daño celular (1).

Entre los ensayos mayormente correlacionados con parámetros clínicos en humanos, se tienen las muestras de sangre, las cuales pueden ser tomadas entre la aleta anal y la aleta caudal. Posteriormente se lleva a cabo una centrifugación según lo establece Ghanim K y colaboradores a 10.000 g durante 10 minutos, con el fin de obtener una muestra viable y analizar cualquier proteína de interés (1).

Otra técnica que se ha utilizado en *D. rerio* a nivel ambiental es la cuantificación automatizada de transgénicos *in vivo* (ARQiv), donde básicamente por medio de la fluorescencia y su intensidad, se logra una detección de alto rendimiento en embriones y larvas de pez cebra vivos a lo largo del tiempo. Por otro lado se ha utilizado el cribado químico impulsado por fenotipos con el fin de identificar compuestos tóxicos que afectan la migración de células marcadas con fluorescencia (18).

Entre las técnicas más modernas se ha utilizado el mapeo de conectividad en salud ambiental utilizando pez cebra. Un estudio expone que mediante la extracción de conjuntos de datos de microarrays disponibles públicamente se compararon las respuestas transcripcionales a una variedad de exposiciones y dosis químicas en diferentes órganos del pez cebra (18).

2.4.3 Ventajas de usar a *D. rerio* como modelo en Ecotoxicología

Entre las ventajas más destacadas de utilizar el pez cebra se basa en que los embriones y las larvas son transparentes lo que permite por ejemplo, visualizar imágenes de interacciones entre las células inmunes y los tejidos somáticos a nivel de todo el organismo (2, 18). Además, es sencillo generar transgénicos y adicionar genes, lo que lo convierte en un modelo ideal para el cribado genético y de compuestos de alto rendimiento, de hecho la información de la secuencia total del genoma de

D. rerio y los avances en bioinformática lo convierte en un organismo ideal para analizar la toxicidad *in vivo* en tiempo real de mecanismos tóxicos de los plaguicidas y el análisis de enzimas marcadoras (1, 2, 88)

Es importante aclarar que por medio de la fluorescencia es posible marcar genes que se estimulan o inducen estrés, por ejemplo, cuando hay una exposición a contaminantes o factores ambientales del medio (18). Lo anterior permite un examen no invasivo del desarrollo, metabolismos, características de órganos y puntos finales de tóxicos en pez cebrá joven (2).

En el pez cebrá es posible realizar ensayos que por ejemplo se desarrollan en un cultivo celular, pero en este caso se realizan en un modelo *in vivo* vertebrado interpolable a roedores, pero mucho más económico (18). A nivel de homología con el ser humano los órganos del pez cebrá realizan funciones fisiológicas bien conservadas (2).

La descendencia del pez cebrá es rápida pues un solo apareamiento genera cientos de embriones fertilizados externamente que se desarrollan rápidamente, posee una alta fecundidad y es posible mantener criaderos de manera sencilla, usando acuarios estándar, lo que lo convierte en un modelo ventajoso, ya que los estudios en este animal permiten la evaluación continua de la toxicidad de un compuesto, o permiten estudiar diferentes mecanismos moleculares y metabólicos que interfieren en el desarrollo normal de un ser vivo y de esta manera asociarlo a la salud humana (2, 18).

Recientemente, se destaca que el pez cebrá es un sistema que modela alternativamente la detección de fármacos, el desarrollo de nuevos productos y la evaluación de los efectos ecotóxicos de los contaminantes y especies biomonitorizadas en la evaluación de riesgos ambientales, por lo anterior se sabe que las líneas transgénicas constitutivas son el principal tipo de transgénico usado en este tipo de estudios y dentro de las cepas más frecuentes se recalca Tg(fli1: EGFP), debido a sus condiciones estáticas donde GFP y EGFP son las principales proteínas indicadoras (97).

Por lo anterior, las líneas transgénicas de pez cebra están emergiendo como un sistema modelo *in vivo* adecuado para evaluar el mecanismo de acción y la toxicidad de los productos químicos y nuevos productos biotecnológicos, y los efectos de los contaminantes tradicionales y emergentes (94-96).

2.4.4 Limitaciones de usar a *D. rerio* como modelo en toxicología

Aunque este pez y sus cepas han sido ampliamente utilizadas en diferentes campos de la ciencia, una de las desventajas que este modelo presenta es que al usar proteínas fluorescentes como GFP, tardan en madurar y tienen una vida media larga, por ello no pueden capturar la respuesta dinámica o constante a compuesto exógenos, químicos o toxinas (18).

Una segunda limitación es que la fluorescencia puede verse obstaculizada por un posicionamiento o expresión transgénica no uniforme en el pez cebra, lo que indica que no existe una precisión para cuantificar dicha expresión, además las diferencias fisiológicas entre el pez cebra y los mamíferos no permiten evaluar una totalidad de enfermedades, de hecho, el sistema respiratorio, difiere morfológicamente de los humanos y a nivel reproductivo el pez cebra no tiene cromosomas sexuales discernibles y no se vuelve sexualmente dimórfico hasta 3 semanas después de la fecundación. Sin embargo, varias de las vías de desarrollo y señalización se conservan de manera evolutiva entre el pez cebra y los humanos (3, 18).

Las exposiciones a compuestos pueden no ser comparables en todos los casos a humanos. Esto se debe a que el tóxico se agrega directamente al agua, por lo que los primeros contactos son a nivel dérmico, ya que en las primeras etapas del desarrollo del pez cebra los embriones no tragan agua para respirar. Además, muchos tóxicos se introducen en el cuerpo humano a través del consumo de agua potable o alimentos contaminados, como tal, las concentraciones de ingesta son diferentes y por ende la absorción, distribución, metabolismo y excreción es variada (18).

Sin embargo, pese a la distancia evolutiva entre el pez cebra y los mamíferos, los transgénicos de *D. rerio* permiten la evaluación de vasotoxicidad, neurotoxicidad, toxicidad sistémica, hepatotoxicidad, disrupción endocrina, cardiotoxicidad, inmunotoxicidad, hematotoxicidad, ototoxicidad y pancreotoxicidad, por lo que de alguna manera es posible interpolar estas ecotoxicidades con el ser humano de manera ortóloga (97).

2.5 CONCLUSIÓN

Tras el frecuente crecimiento industrial para la producción de sintéticos que buscan mantener el ritmo de la economía, el medio ambiente y los efectos de la exposición a sustancias tóxicas en la salud humana y en general en todos los seres vivos, el pez cebra está cobrando valor en áreas investigativas. La principal ventaja de usar a *D. rerio* como modelo biológico de contaminación es que sus características de desarrollo proporcionan un sistema para indagar diferentes procesos *in vitro* e *in vivo*.

Su rápida producción de progenie permite una evaluación completa de la toxicidad en todo un ser vivo. Además, al ser un modelo económico y de fácil manejo permite desarrollar una investigación rápida para analizar efectos latentes y respuestas adversas ante la exposición temprana a contaminantes ambientales.

La conservación a nivel genético, molecular y celular entre el pez cebra y los mamíferos, contribuye a una aplicabilidad cercana a la exposición y las enfermedades humanas. Por lo anterior, los estudios que utilizan el pez cebra han proporcionado información valiosa sobre los efectos de los contaminantes ambientales en el desarrollo normal de vertebrados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Al-Ghanim KA, Mahboob S, Vijayaraghavan P, Al-Misned FA, Kim YO, Kim HJ. Sub-lethal effect of synthetic pyrethroid pesticide on metabolic enzymes and protein profile of non-target Zebra fish, *Danio rerio*. Saudi J Biol Sci. 2020;27(1):441-7.
2. Cassar S, Adatto I, Freeman JL, Gamse JT, Iturria I, Lawrence C, et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. Chem Res Toxicol. 2020;33(1):95-118.
3. Gut P, Reischauer S, Stainier DYR, Arnaout R. Little Fish, Big Data: Zebrafish as a Model for Cardiovascular and Metabolic Disease. Physiol Rev. 2017;97(3):889-938.
4. Hoo JY, Kumari Y, Shaikh MF, Hue SM, Goh BH. Zebrafish: A Versatile Animal Model for Fertility Research. Biomed Res Int. 2016;2016:9732780.
5. Skidmore JF. Resistance to zinc sulphate of the zebrafish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan) at different phases of its life history. 1965;56(1):47-53.
6. Hisaoka KK. The effects of 2-acetylaminofluorene on the embryonic development of the zebrafish. II. Histochemical studies. Cancer Res. 1958;18(6):664-7.
7. Hisaoka KK. The effects of 4-acetylaminofluorene on the embryonic development of the zebrafish. I. Morphological studies. Cancer Res. 1958;18(5):527-35.
8. Battle HI, Hisaoka KK. Effects of ethyl carbamate (urethan) on the early development of the teleost *Brachydanio rerio*. Cancer Res. 1952;12(5):334-40.
9. Hisaoka KK, Hopper AF. Some effects of barbituric and diethylbarbituric acid on the development of the zebra fish, *Brachydanio rerio*. Anat Rec. 1957;129(3):297-307.

10. Baslow MH, Ruggieri G. N-acetylhistidine in developing embryos of the killifish, *Fundulus heteroclitus* and the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Life Sci.* 1967;6(6):609-14.
11. Stanton MF. Diethylnitrosamine-Induced Hepatic Degeneration and Neoplasia in the Aquarium Fish, *Brachydanio Rerio*. *J Natl Cancer Inst.* 1965;34:117-30.
12. Laale HW. Ethanol induced notochord and spinal cord duplications in the embryo of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Exp Zool.* 1971;177(1):51-64.
13. Pliss GB, Khudoley VV. Tumor induction by carcinogenic agents in aquarium fish. *J Natl Cancer Inst.* 1975;55(1):129-36.
14. Bloom HD, Perlmutter A. A sexual aggregating pheromone system in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J Exp Zool.* 1977;199(2):215-26.
15. Fischer HA, Schmatolla E. Axonal transport of tritium-labeled putrescine in the embryonic visual system of zebrafish. *Science.* 1972;176(4041):1327-9.
16. Schmatolla E. Retino-tectal course of optic nerves in cyclopic and synophthalmic zebrafish embryos. *Anat Rec.* 1974;180(2):377-83.
17. Laale H, Singh L. The antigenic pattern of the developing brain of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. II. Brain specific antigens. *J Exp Zool.* 1973;186(3):257-68.
18. Bambino K, Chu J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. *Curr Top Dev Biol.* 2017;124:331-67.
19. Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Eugene. USA: Elsevier; 2000 [cited 2021 29/07/2021]. Available from: https://zfinfo.org/zf_info/zfbook/zfbk.html.
20. Grunwald DJ, Streisinger G. Induction of recessive lethal and specific locus mutations in the zebrafish with ethyl nitrosourea. *Genetical Research.* 1992;59(2):103-16.

21. Grunwald DJ, Streisinger G. Induction of mutations in the zebrafish with ultraviolet light. *Genetical Research*. 1992;59(2):93-101.
22. Felsenfeld AL, Walker C, Westerfield M, Kimmel C, Streisinger G. Mutations affecting skeletal muscle myofibril structure in the zebrafish. *Development*. 1990;108(3):443-59.
23. Streisinger G, Coale F, Taggart C, Walker C, Grunwald DJ. Clonal origins of cells in the pigmented retina of the zebrafish eye. *Developmental biology*. 1989;131(1):60-9.
24. Grunwald DJ, Kimmel CB, Westerfield M, Walker C, Streisinger G. A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish. *Developmental biology*. 1988;126(1):115-28.
25. Streisinger G, Singer F, Walker C, Knauber D, Dower N. Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. *Genetics*. 1986;112(2):311-9.
26. Nawrocki L, BreMiller R, Streisinger G, Kaplan M. Larval and adult visual pigments of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Vision Res*. 1985;25(11):1569-76.
27. Streisinger G. Attainment of minimal biological variability and measurements of genotoxicity: production of homozygous diploid zebra fish. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1984;65:53-8.
28. Meyer A, Biermann CH, Orti G. The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. *Proc Biol Sci*. 1993;252(1335):231-6.
29. Brand M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Beuchle D, Lun K, Furutani-Seiki M, et al. Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development*. 1996;123:179-90.
30. Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*. 1996;123:37-46.
31. Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, et al. The identification of genes with unique and es-

- sential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. 1996;123:1-36.
32. Heisenberg CP, Brand M, Jiang YJ, Warga RM, Beuchle D, van Eeden FJ, et al. Genes involved in forebrain development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. 1996;123:191-203.
 33. Pack M, Solnica-Krezel L, Malicki J, Neuhauss SC, Schier AF, Stemple DL, et al. Mutations affecting development of zebrafish digestive organs. *Development*. 1996;123:321-8.
 34. Ransom DG, Haffter P, Odenthal J, Brownlie A, Vogelsang E, Kelsh RN, et al. Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. *Development*. 1996;123:311-9.
 35. Stainier DY, Fouquet B, Chen JN, Warren KS, Weinstein BM, Meiler SE, et al. Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development*. 1996;123:285-92.
 36. Izsvak Z, Ivics Z, Hackett PB. Characterization of a Tc1-like transposable element in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol Gen Genet*. 1995;247(3):312-22.
 37. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995;203(3):253-310.
 38. Sire JY, Allizard F, Babiari O, Bourguignon J, Quilhac A. Scale development in zebrafish (*Danio rerio*). *J Anat*. 1997;190 (Pt 4):545-61.
 39. Kent ML, Sanders JL, Spagnoli S, Al-Samarrie CE, Murray KN. Review of diseases and health management in zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822) in research facilities. *J Fish Dis*. 2020;43(6):637-50.
 40. Metscher BD, Ahlberg PE. Zebrafish in context: uses of a laboratory model in comparative studies. *Developmental biology*. 1999;210(1):1-14.
 41. Takeda H. [Maintenance of laboratory strain of zebrafish, *Danio rerio*]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 1999;44(6):803-6.

42. Wixon J. Featured organism: *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast*. 2000;17(3):225-31.
43. Dooley K, Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2000;10(3):252-6.
44. Samson JC, Shenker J. The teratogenic effects of methylmercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Aquat Toxicol*. 2000;48(2-3):343-54.
45. Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;67(4):773-82.
46. Meinelt T, Schulz C, Wirth M, Kurzinger H, Steinberg C. Correlation of diets high in n-6 polyunsaturated fatty acids with high growth rate in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Med*. 2000;50(1):43-5.
47. Poleo GA, Denniston RS, Reggio BC, Godke RA, Tiersch TR. Fertilization of eggs of zebrafish, *Danio rerio*, by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod*. 2001;65(3):961-6.
48. Bardet PL, Horard B, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Vanacker JM. Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *J Mol Endocrinol*. 2002;28(3):153-63.
49. Lindholm C, Wynne PM, Marriott P, Pedersen SN, Bjerregaard P. Metabolism of bisphenol A in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to estrogenic response. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2003;135(2):169-77.
50. Wiegand C, Krause E, Steinberg C, Pflugmacher S. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2001;49(3):199-205.
51. Murtha JM, Qi W, Keller ET. Hematologic and serum biochemical values for zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Med*. 2003;53(1):37-41.
52. Gerhard GS. Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Exp Gerontol*. 2003;38(11-12):1333-41.
53. Keller ET, Murtha JM. The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2004;138(3):335-41.

54. Ng AN, de Jong-Curtain TA, Mawdsley DJ, White SJ, Shin J, Appel B, et al. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Developmental biology*. 2005;286(1):114-35.
55. Fleisch VC, Neuhauss SC. Visual behavior in zebrafish. *Zebrafish*. 2006;3(2):191-201.
56. Brockerhoff SE. Measuring the optokinetic response of zebrafish larvae. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2448-51.
57. Bretaud S, Li Q, Lockwood BL, Kobayashi K, Lin E, Guo S. A choice behavior for morphine reveals experience-dependent drug preference and underlying neural substrates in developing larval zebrafish. *Neuroscience*. 2007;146(3):1109-16.
58. Yang L, Kemadjou JR, Zinsmeister C, Bauer M, Legradi J, Muller F, et al. Transcriptional profiling reveals barcode-like toxicogenomic responses in the zebrafish embryo. *Genome Biol*. 2007;8(10):R227.
59. Heiden TCK, Struble CA, Rise ML, Hessner MJ, Hutz RJ, Carvan MJ, 3rd. Molecular targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) within the zebrafish ovary: insights into TCDD-induced endocrine disruption and reproductive toxicity. *Reprod Toxicol*. 2008;25(1):47-57.
60. Scholz S, Fischer S, Gundel U, Kuster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environmental science and pollution research international*. 2008;15(5):394-404.
61. Hamdi M, Sanchez MA, Beene LC, Liu Q, Landfear SM, Rosen BP, et al. Arsenic transport by zebrafish aquaglyceroporins. *BMC Mol Biol*. 2009;10:104.
62. Strahle U, Grabher C. The zebrafish embryo as a model for assessing off-target drug effects. *Dis Model Mech*. 2010;3(11-12):689-92.
63. Mathur P, Berberoglu MA, Guo S. Preference for ethanol in zebrafish following a single exposure. *Behav Brain Res*. 2011;217(1):128-33.

64. Niihori M, Platto T, Igarashi S, Hurbon A, Dunn AM, Tran P, et al. Zebrafish swimming behavior as a biomarker for ototoxicity-induced hair cell damage: a high-throughput drug development platform targeting hearing loss. *Transl Res.* 2015;166(5):440-50.
65. Gustafson AL, Stedman DB, Ball J, Hillegass JM, Flood A, Zhang CX, et al. Inter-laboratory assessment of a harmonized zebrafish developmental toxicology assay - progress report on phase I. *Reprod Toxicol.* 2012;33(2):155-64.
66. Uribe PM, Sun H, Wang K, Asuncion JD, Wang Q, Chen CW, et al. Aminoglycoside-induced hair cell death of inner ear organs causes functional deficits in adult zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS one.* 2013;8(3):e58755.
67. Xu H, Lam SH, Shen Y, Gong Z. Genome-wide identification of molecular pathways and biomarkers in response to 67,73^{en}ic exposure in zebrafish liver. *PLoS one.* 2013;8(7):e68737.
68. Zhang X, Li C, Gong Z. Development of a convenient in vivo hepatotoxin assay using a transgenic zebrafish line with liver-specific DsRed expression. *PLoS one.* 2014;9(3):e91874.
69. Deeti S, O'Farrell S, Kennedy BN. Early safety assessment of human oculotoxic drugs using the zebrafish visualmotor response. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2014;69(1):1-8.
70. Wirbisky SE, Weber GJ, Sepulveda MS, Xiao C, Cannon JR, Freeman JL. Developmental origins of neurotransmitter and transcriptome alterations in adult female zebrafish exposed to atrazine during embryogenesis. *Toxicology.* 2015;333:156-67.
71. Cassar S, Huang X, Cole T. A high-throughput method for predicting drug effects on gut transit time using larval zebrafish. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2015;76:72-5.
72. Canedo A, Rocha TL. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. *Sci Total Environ.* 2021;762:144084.
73. Hallauer J, Geng X, Yang HC, Shen J, Tsai KJ, Liu Z. The Effect of Chronic Arsenic Exposure in Zebrafish. *Zebrafish.* 2016;13(5):405-12.

74. Horie Y, Yamagishi T, Takahashi H, Shintaku Y, Iguchi T, Tatarazako N. Assessment of the lethal and sublethal effects of 20 environmental chemicals in zebrafish embryos and larvae by using OECD TG 212. *Journal of applied toxicology : JAT*. 2017;37(10):1245-53.
75. Sant KE, Jacobs HM, Borofski KA, Moss JB, Timme-Laragy AR. Embryonic exposures to perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) disrupt pancreatic organogenesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental pollution*. 2017;220(Pt B):807-17.
76. Matsumoto H, Fujiwara S, Miyagi H, Nakamura N, Shiga Y, Ohta T, et al. Carbonic Anhydrase Inhibitors Induce Developmental Toxicity During Zebrafish Embryogenesis, Especially in the Inner Ear. *Mar Biotechnol (NY)*. 2017;19(5):430-40.
77. Rah YC, Yoo MH, Choi J, Park S, Park HC, Oh KH, et al. In vivo assessment of hair cell damage and developmental toxicity caused by gestational caffeine exposure using zebrafish (*Danio rerio*) models. *Neurotoxicol Teratol*. 2017;64:1-7.
78. Stengel D, Zindler F, Braunbeck T. An optimized method to assess ototoxic effects in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2017;193:18-29.
79. Takemoto Y, Hirose Y, Sugahara K, Hashimoto M, Hara H, Yamashita H. Protective effect of an astaxanthin nanoemulsion against neomycin-induced hair-cell damage in zebrafish. *Auris Nasus Larynx*. 2018;45(1):20-5.
80. Philip RC, Rodriguez JJ, Niihori M, Francis RH, Mudery JA, Caskey JS, et al. Automated High-Throughput Damage Scoring of Zebrafish Lateral Line Hair Cells After Ototoxin Exposure. *Zebrafish*. 2018;15(2):145-55.
81. Jacobs HM, Sant KE, Basnet A, Williams LM, Moss JB, Timme-Laragy AR. Embryonic exposure to Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) disrupts pancreatic organogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 2018;195:498-507.
82. Miller GW, Chandrasekaran V, Yaghoobi B, Lein PJ. Opportunities and challenges for using the zebrafish to study neuronal connecti-

- vity as an endpoint of developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 2018;67:102-11.
83. Yoshioka W, Tohyama C. Mechanisms of Developmental Toxicity of Dioxins and Related Compounds. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
 84. Shen C, Zuo Z. Zebrafish (*Danio rerio*) as an excellent vertebrate model for the development, reproductive, cardiovascular, and neural and ocular development toxicity study of hazardous chemicals. *Environmental science and pollution research international*. 2020;27(35):43599-614.
 85. Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020;2020.
 86. Taxonomy N. *Danio rerio* 2020 [cited 2021 29/07/2021]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=7955&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s&log_op=lineage_toggle.
 87. Vargas-Vargas RA. Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anestesia en México*. 2017;29(1):86-96.
 88. Hsu AY, Gurol T, Sobreira TJP, Zhang S, Moore N, Cai C, et al. Development and Characterization of an Endotoxemia Model in Zebra Fish. *Front Immunol*. 2018;9:607.
 89. Khan KM, Collier AD, Meshalkina DA, Kysil EV, Khatsko SL, Kolesnikova T, et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2017;174(13):1925-44.
 90. Lavergne A, Tarifeno-Saldivia E, Pirson J, Reuter AS, Flasse L, Manfroid I, et al. Pancreatic and intestinal endocrine cells in zebrafish share common transcriptomic signatures and regulatory programmes. *BMC Biol*. 2020;18(1):109.
 91. Dabrowski K, Miller M. Contested Paradigm in Raising Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*. 2018;15(3):295-309.

92. Rodríguez González JC, Rodeiro Guerra I. El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos %J Revista Cubana de Farmacia. 2014;48:495-507.
93. Croom E. Chapter Three - Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. In: Hodgson E, editor. Progress in Molecular Biology and Translational Science. 112: Academic Press; 2012. p. 31-88.
94. Satbhai K, Vogs C, Crago J. Comparative toxicokinetics and toxicity of PFOA and its replacement GenX in the early stages of zebrafish. Chemosphere.; Chemosphere. 2022;308(1):136-131
95. Lv, L., Gao, Z., Mao, L. et al. Insights into the combined toxic impacts of phoxim and deltamethrin on the embryo-larval stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Eur* 2022;34-90
96. Hongwei L, Qingping D, Zuanjia Z, Yanbin X, Jinping P, Protein-coated microplastics corona complex: An underestimated risk of microplastics, *Science of The Total Environment*, 2022;851(1):157-948
97. Silva Brito R, Canedo A, Farias D, Rocha TL. Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends. *Sci Total Environ*. 2022; 848:157-665.

CAPÍTULO 3

***HYDRA VULGARIS* EN EL ESTUDIO DE LA TOXICOLOGÍA AMBIENTAL**

Laura Rocío Martínez León
Ruth Mélida Sánchez Mora

La información que se relaciona con las enfermedades causadas por la contaminación ambiental, ha sido producto de diversos ensayos a nivel de laboratorio, en la experimentación de animales, estudios toxicológicos y el uso de modelos. Esto ha permitido establecer una relación entre la afectación del medio ambiente y las consecuencias en la salud humana, las cuales generan un problema de salud pública (1,2).

Gracias a sus características *Hydra vulgaris* (*H. vulgaris*) ha surgido como un modelo en biología acerca del desarrollo y el envejecimiento, es un organismo indicador. Por ejemplo hematoencefálica, en él se han realizado ensayos de toxicidad para observar las consecuencias teratogénicas causadas por compuestos químicos (3). Por lo anterior, en el presente capítulo se describe el modelo biológico *H. vulgaris*, su historia y sus principales aportes a la ciencia, las generalidades, uso en el laboratorio y en especial, las aplicaciones del modelo a investigaciones que tienen relación con la toxicología ambiental.

3.1 HISTORIA

Hydra es un modelo importante desde el año 1950, fecha en la cual se establecieron los protocolos para su cultivo (3). En el área de la enseñanza ha sido útil para explicar procesos como la reproducción asexual o la regeneración de los tejidos, ya que es un modelo fácil de mantener en el laboratorio, y a su vez de recolectar en el medio ambiente. Además, puede ser alimentado con presas vivas y solo requiere de un mantenimiento higiénico para sobrevivir.

Por lo anterior, a partir del estudio de este modelo se pueden conocer las alteraciones a nivel morfológico, reproductivo y fisiológico del animal, que se provocan por la exposición de sustancias tóxicas, ya sean químicas o contaminantes ambientales, así como las relacionadas con la temperatura y pH del medio, permitiendo el análisis de cada modificación gracias a su sensibilidad a los cambios bruscos en su medio de desarrollo (4). Sus aportes más importantes se recopilan en la línea del tiempo (Tabla 5).

En 1740 Abraham Trembley, en un recorrido por la mansión donde trabajaba, vio un estanque donde se observaban unas pequeñas plantas gelatinosas que tenían unas protuberancias largas, esta planta se trataba del famoso pólipo de agua dulce *H. vulgaris*, que para el año 1703 ya Anton Van Leeuwenhoek había clasificado como planta en su comunidad científica. Trembley movido por la curiosidad tomó varias plantas y las adicionó en frascos de vidrio para realizar sus observaciones, allí descubrió que estas plantas tenían más un comportamiento animal, porque mostraban una serie de contracciones, además las protuberancias con las que contaban respondían al tacto y una de ellas atrapaba presas para acercarlas a una abertura (boca) para su ingestión (5). La planta también contaba con una capacidad de regenerarse al ser amputado alguno de sus tentáculos, es allí donde en compañía del científico René Antoine Fercchault de Réaumur, se decide incorporar este ser vivo al reino animal.

En 1970, la regeneración de la *H. vulgaris* genera gran curiosidad, y para poder analizar mejor este fenómeno se plantea el uso de inhibidores del metabolismo energético para evaluar cómo afecta este

proceso. Uno de los inhibidores fue la actinomicina D, la cual fue adicionada a las hidras que con anterioridad fueron amputadas. Se tuvo en cuenta la longitud del tentáculo regenerado y se evidenció que el tiempo de reconstitución se retrasó, la tasa de regeneración tuvo una disminución y posterior a esto ocurrió la citólisis (6).

Para 1991, al ver los cambios morfológicos tan notorios que presentaba hidra, se quiso evaluar el efecto que tenían ciertos insecticidas sobre este organismo, se usó Dimiline, Torak y Gamacide. Mediante los ensayos se pudo comprobar que los tres provocaron cambios citológicos e histológicos en hidra; además el insecticida Dimiline fue considerado como el menos perjudicial ya que solo afectó los tentáculos, a diferencia de los otros dos insecticidas, quienes además causaron un daño a la cúpula (donde salen los tentáculos) llamada hipostoma, y también se vio interrumpida la contracción del animal, la cual es una característica propia (7).

Por otro lado, en 1994, se analizó de diversas maneras las interacciones que se dan en la célula con la matriz extracelular, a través del uso de injertos de hidra usando sustratos *In Vivo* como beta-aminopropionitrilo, beta-xilosido, fibronectina y péptido sintético, los cuales actuaron como inhibidores de la migración celular, mostrando que las interacciones que se dan célula-matriz son indispensables para que se dé la migración celular (8). Asimismo, en relación con la matriz extracelular también aparece el concepto de clonación y la manera en que la lamina de *H. vulgaris* se conserva y desempeña su función biológica (9).

H. vulgaris también ha permitido realizar estudios complejos en sus genes, en 1999 se lograron aislar diversos genes relacionados con proteínas, como por ejemplo, el gen que codifica para tirosina-quinasa (10), ya para el año 2002 se realizan estudios sobre la toxicidad producida en la hidra con compuestos encontrados en agua dulce, analizando la regeneración de los pólipos, el movimiento y la supervivencia, mostrando que los procesos básicos de *H. vulgaris* no se ven afectados por concentraciones mínimas de compuestos como el bisfenol A y el 17 β -etinilestradiol (11).

A medida que ha transcurrido el tiempo, el modelo *H. vulgaris* ha evolucionado en su estudio y conocimiento proporcionado, lo que ha permitido profundizar en temas como el sueño y el desarrollo del sistema nervioso central (12). Estas grandes capacidades y características han hecho de este organismo un modelo fácil de manejar y le han permitido ser catalogado como modelo estrella para el estudio de la senescencia y el envejecimiento (ver estudios realizados a través del tiempo - Tabla 5) (13).

Tabla 6. Línea del tiempo de *H. vulgaris*.
Elaboración propia de los autores.

AÑO	SUCESO
1950	Protocolos para el cultivo de <i>H. vulgaris</i> (5).
1703	Anton Van Leeuwenhoeck clasifica a la hidra como una planta (5).
1704	Abraham Trembley encuentra al pequeño pólipo de agua dulce en su trabajo, y se da cuenta de su regeneración (5).
1970	Se empiezan a usar sustancias para analizar cómo afecta la regeneración en <i>H. vulgaris</i> , se probó actinomicina D (6).
1991	Evaluación de los efectos de tres insecticidas, Dimiline, Torak y Gamacide, sobre la morfología de <i>H. vulgaris</i> (7).
1999	Se lograron aislar diversos genes de <i>H. vulgaris</i> (10).
2002	Se realizan estudios sobre la toxicidad producida en <i>H. vulgaris</i> por compuestos de agua dulce como Bisfenol A y el 17 α -etinilestradiol (11).
2004	Evidencia inmunohistoquímica de un receptor en células disociadas de <i>H. vulgaris</i> (31).
2009	Participación del óxido nítrico en la regeneración de <i>H. vulgaris</i> (32).
2010	Estudios de respuestas a estrés en <i>H. vulgaris</i> (33).
2014	Obtención del genoma mitocondrial completo de <i>H. vulgaris</i> (34).

AÑO	SUCESO
2015	<i>H. vulgaris</i> como excelente modelo para la senescencia (35).
2017	Señalización de insulina e IGF en respuesta a la alimentación en <i>H. vulgaris</i> (36).
2020	Estudios del sueño y sistema nervioso central de <i>H. vulgaris</i> (37).
2021	Toxicidad en <i>H. vulgaris</i> a causa de micotoxinas ambientales (38).

3.2 GENERALIDADES DEL MODELO

Las hidras son animales marinos que pertenecen al filo *Cnidaria* (Tabla 6). Al igual que las medusas, corales y aeromonas, las hidras también se encuentran en agua dulce y allí se conocen como pólipos de agua dulce, estas pertenecen a la clase *Hydrozoa* (14).

Tabla 7 Taxonomía de *H. vulgaris*.
Elaboración propia de los autores.

Reino	Animalia
Filo	<i>Cnidaria</i>
Clase	<i>Hydrozoa</i>
Orden	<i>Anthoathecatae</i>
Familia	<i>Hydridae</i>
Género	<i>Hydra</i>
Especie	<i>Hydra vulgaris</i>

H. vulgari conocido también como el pólipo de agua dulce, se encuentra en la literatura como *Hydra attenuata* e *Hydra magnipapillata*, los cuales son sinónimos de su nombre (15). Es un microinvertebrado que mide alrededor de 15 mm sin incluir tentáculos, se encuentra de manera abundante en los estanques y corrientes, adherido a las piedras

y vegetación acuática (16). Por otro lado, posee de 4 a 12 tentáculos que surgen de la parte exterior de la boca, estos le sirven de agarre a las rocas y además es por medio de estos que se alimenta, pues una vez los tentáculos tocan el alimento es llevado a la boca para la ingestión y digestión. (Figura 15). Esta especie de hidra se mueve dejándose llevar por la corriente, aunque también se mueve inclinándose, realizando un agarre sobre sus tentáculos y dando una vuelta sobre sí mismo (17).

H. vulgaris ha sido elegida como modelo para estudiar los principios de la regeneración, debido a que puede regenerar tejidos completos a partir de pólipos afectados (18). Este organismo es de fácil cultivo en el laboratorio, tiene una rápida reproducción, también posee una estructura primaria que hace más fácil el intercambio intra y extracelular y de esta misma manera la detección de sustancias tóxicas, lo que a su vez permite que presente cambios a nivel de su morfología que pueden ser observables e interpretados (19).

Por otra parte, *H. vulgaris* desde 1741 ha permitido grandes aportes a nivel de la biología, al permitir estudiar la ecotoxicidad de los ecosistemas y respuestas inmunológicas al estrés, además de procesos del ciclo celular, muerte celular, neurogénesis y comportamientos de neuroseñalización, envejecimiento inducible, reversión del sexo, germinación de células madre, transdiferenciación, pedagogía y comunicación científica (20).

Figura 15. Se observa *H. vulgaris* en su hábitat.

Tomada de <https://www.flickr.com/photos/microagua/16624195064>



3.2.1 Distribución geográfica y hábitat

Las hidras viven en cualquier depósito de agua dulce, en su mayoría se encuentran distribuidas en las aguas de América del Norte. El agua debe estar limpia y con buen oxígeno, ya sea con corriente o estancada, lo que interesa en el ambiente es que el agua no esté contaminada y que exista abundante zooplancton y fitoplancton. La buena vegetación y buena oxigenación hacen que el desarrollo de la hidra se favorezca.

Al ser de un tamaño reducido, resulta difícil su observación en la naturaleza, ya que en su mayoría están adheridas a pequeñas plantas y rocas, además que suelen contraerse con facilidad. *H. vulgaris* tiene una simbiosis obligada con *Chlorella*, un alga verde que habita dentro de las células del gastrodermo, las sustancias que se obtienen de esta simbiosis sirven para su metabolismo.(1,9)

Por otro lado, las hidras también poseen una capacidad adaptativa, a pesar de que su hábitat debe ser agua dulce sin contaminación, estas resisten al aumento de la concentración de nutrientes como nitratos y fosfatos (eutrofización), además toleran los cambios de temperatura y pH, pero son sensibles a la exposición de metales pesados. Estas características hacen que se puedan encontrar distribuidas a nivel mundial (10,11).

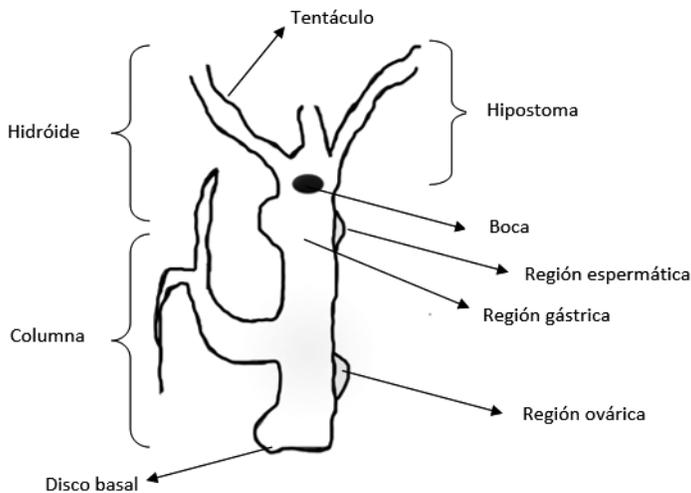
3.2.2 Morfología

H. vulgaris es un organismo multicelular simple, posee un tubo con una cabeza en su parte apical, la cual está compuesta de 6 a 8 tentáculos que contienen unas células llamadas nematocistos. Los tentáculos salen de una estructura que tiene forma de cúpula conocida como hipostoma, la cual está rodeando la boca. Su boca no solo cumple funciones de ingestión si no también actúa como aparato excretor cuando ya ha aprovechado su alimento, al final de la columna posee un disco basal.

Este animal tiene dos capas de células, una llamada epidermis y otra gastrodermis, las cuales están separadas por una matriz extracelular que se conoce como mesoglea. Estas capas hacen que se den las interacciones célula a célula (22), las células epiteliales están siempre en contacto con el ambiente acuoso, permitiendo que todas las sustancias tóxicas lleguen a la superficie total de animal (3) (Figura 16).

Figura 16. Se observa anatomía de *H. vulgaris*. Elaboración propia.

Tomada y modificada: <https://www.medigraphic.com/pdfs/bolclinhosinfson/bis-2011/bis1111h.pdf> - <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/573/cap3.pdf>



La columna está dividida en cuatro secciones: la parte gástrica está ubicada en medio de los tentáculos y la primera yema, la siguiente sección es la que produce los brotes, continuo a esta sección se encuentra el pedúnculo que esta entre la yema más baja y el disco basal y por último el disco basal que es la estructura que tiene forma de pie y sirve de agarre. La complejidad y sencillez estructural de este ser vivo hace que se pueda comparar a un tejido vivo que posee células y regiones con una fisiología conectada (3).

En cuanto a las dos capas de tejido, el endodermo es aquel que recubre la parte gastrovascular del organismo, el cual actúa como un esqueleto hidrostático y es allí donde se produce la digestión de los alimentos y también la absorción de los nutrientes. El sistema nervioso también es simple y lo compone una red nerviosa que se expande por todo el organismo (3).

• Reproducción

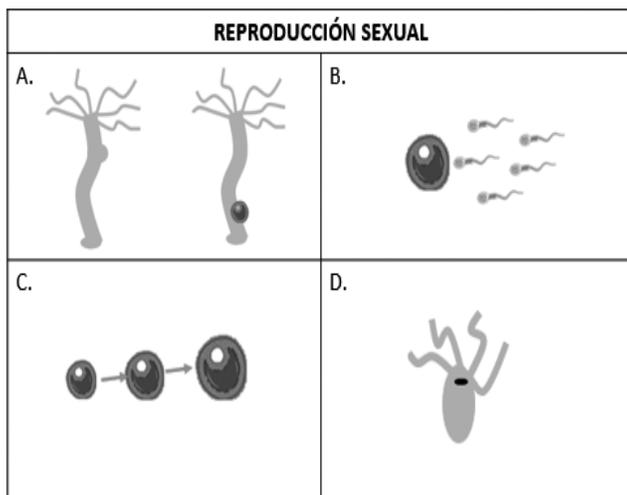
Este organismo se reproduce tanto asexual como sexualmente. La forma asexual se da por gemación, dicho proceso dura de 2 a 4 días y finaliza cuando la célula hija se separa para ser un organismo independiente (23). De este tipo de reproducción se originan un número enorme de microorganismos, los cuales son idénticos genéticamente, esto otorga una ventaja a la hora de experimentar con este organismo ya que, gracias a la poca variación genética los resultados se reproducen más fácilmente con una variación mínima, además permite que se cultiven grandes cantidades de hidras en poco tiempo.

La reproducción sexual, se da gracias a que posee gónadas masculinas y femeninas, las cuales dan lugar a que se desarrolle el ciclo sexual, este tipo de reproducción se da en condiciones de estrés, por ejemplo, cuando varía la temperatura del agua, altos niveles de dióxido de carbono (23), o cuando hay estrés a causa de la densidad de la población (3).

Los testículos están formados por células intersticiales y se da lugar a una protuberancia, por otro lado, en el ovario se forma un ovocito grande. Posterior a la ruptura de la epidermis el ovulo maduro es fecundado por los espermatozoides que han sido liberados en el agua, este ovulo se mantiene en el ovario de los padres y es allí donde se da origen al embrión por medio de la división y la gastrulación, luego se forma una capa alrededor del embrión que lo protege, el ovulo siguiente en ser fertilizado permanece inactivo mientras el embrión que surge se forma como un pólipo pequeño que ya tiene boca, tentáculos y cuerpo (23) (Figura 17).

Existe otro llamado mecanismo de reproducción o supervivencia, y este ocurre cuando una hidra al cortarse en varios segmentos, obtiene segmentos de gran tamaño, donde uno de ellos se convierte en una hidra nueva de un tamaño parecido al segmento cortado (17).

Figura 17. Reproducción sexual de *H. vulgaris*.



A. Formación de protuberancia en la región espermática (imagen izquierda), región ovárica (imagen derecha), B. Liberación del ovulo al agua y fecundación por los espermatozoides libres. C. Formación del embrión por medio de la gastrulación y división. D. Formación de un pólipo pequeño con cuerpo, boca y tentáculos. Elaboración propia.

• Alimentación

Las hidras toman con sus protuberancias partículas que se encuentran en el agua, las partículas son vegetales como detritos, fitoplancton o también animales como larvas y restos de invertebrados microscópicos como *Daphnia* o *Cyclops*. En este proceso para alimentarse también intervienen los nematocistos, los cuales liberan algunas sustancias con función neurotóxica permitiendo que se fijen las partículas, para luego dirigir el alimento a la boca. Esta alimentación tiene un efecto directo

sobre la reproducción, la abundancia y el crecimiento de la población, ya que si esta alimentación se da con sustancias tóxicas afectaría a la población y la supervivencia. Varios estudios han mostrado que la tasa de población está relacionada con la frecuencia con la que ocurre la alimentación (1,11).

La captura e ingestión de las partículas es denominada respuesta o reacción de alimentación, esto porque la alimentación de hidra empieza con una relación entre el glutatión con un quimiorreceptor, ya que gracias a esto son detectados los fluidos liberados a raíz de las heridas de la presa ocasionadas por los nematocistos, esta relación en algunas ocasiones se ve afectada por condiciones ambientales, obstaculizando el proceso de alimentación por el estrés oxidativo o porque se encuentren cantidades disminuidas de glutatión. Esta reacción de alimentación que se da en las hidras es lo que ha permitido que se lleven a cabo con gran éxito estudios de los efectos de productos farmacéuticos y de compuestos tóxicos como los son los metales pesados (3).

Locomoción y Regeneración

H. vulgaris es un animal sedentario, pero a veces suele moverse con rapidez y esto ocurre en su mayoría cuando se dispone a cazar o atrapar su alimento, para esto, inicialmente ejerce un movimiento hacia delante de inclinación, para luego adherirse con los tentáculos y la boca para soltar el pie, que es la estructura de agarre inicial. Posterior a este movimiento inclina nuevamente el cuerpo para poder anclar el pie en otro lugar para ir avanzando poco a poco, con estos pequeños pasos *H. vulgaris* logran avanzar hasta 100 mm, aunque en su mayoría estos diminutos animales prefieren dejarse llevar por la corriente (14).

Hidra tiene la capacidad de regeneración y por esto es considerado un organismo con vida eterna o difícil de extinguir, esta característica que lo hace un animal muy particular se da porque es capaz de renovar sin límite de veces sus partes amputadas a partir de células pluripotentes, incluyendo sus células nerviosas. Cuando hidra pierde la cabeza o el pie, estos vuelven a crecer en corto tiempo, además cuando pierde

segmentos que quedan libres estos suelen desarrollar nuevamente una cabeza en su parte apical y un pie en la parte basal terminal dando origen a un nuevo individuo (3,14).

Esta característica original del individuo ha permitido que a través de la disgregación de un individuo se pueda obtener un complejo celular, que en conjunto empiezan a formar unas esferas celulares que posteriormente dan origen a los tentáculos y cuerpos que en unos días será un individuo independiente, y esto se origina debido a que en el centro corporal del individuo se está dando una continua multiplicación y división de las células madre que van migrando hacia las extremidades del individuo, para luego iniciar el proceso de diferenciación y así mismo, ir reemplazando las células que son eliminadas a través del pie o de los tentáculos. En consecuencia, esta regeneración de manera continua hace que este individuo permanezca joven y que por la misma razón a través del estudio de los marcadores de envejecimiento estos den resultados negativos (21).

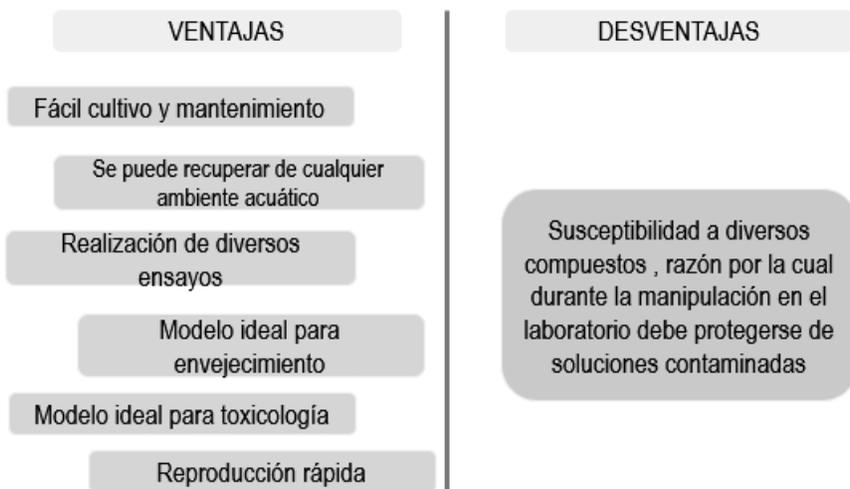
A nivel de laboratorio la regeneración ha podido ser medida mediante el uso de células ya disociadas para generar un embrión de manera artificial, y también se ha implementado el uso de regiones gástricas disecadas, la cual es una zona rica en células madre multipotentes que están activas para poder analizar este fenómeno, por estos descubrimientos, hidra ha servido como modelo indispensable para medir el potencial teratogénico de varias sustancias químicas, muestras de agua, productos farmacéuticos o sustancias que actúan como disruptores endocrinos (3).

3.3 MANIPULACIÓN DEL MODELO EN EL LABORATORIO

A la hora de realizar un cultivo de *H. vulgaris*, se tienen ventajas y desventajas (Figura 18), inicialmente lo ideal es usar recipientes de 20 cm diámetro, en el cual se puedan adicionar de 2 a 3 cm de medio de cultivo para que los animales estén sumergidos (19), la temperatura óptima debe ser baja ya que se desarrollan mejor en temperaturas frías y los animales son más fuertes y grandes, el rango de temperatura oscila entre los 18 a 21°C, los recipientes tienen que permanecer

en fotoperiodo, donde 16 horas son de luz y 8 de oscuridad. Es importante tener en cuenta que estos animales normalmente pasan por unas etapas de depresión donde el desarrollo se ve ralentizado, no se alimentan y empiezan a desintegrarse, para ello es recomendable que se hagan varios cultivos al tiempo, además también se recomienda usar solo agua de estanque o mezclada con agua desionizada, y si se llegase a usar agua de grifo eliminar las sales presentes y realizar la respectiva filtración para evitar el cambio de agua diario (23).

Figura 18. Esquema ventajas y desventajas del uso en el laboratorio de *Hidra vulgaris*. Elaboración propia.



El medio de cultivo contiene $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, N-tris (hidroximetil) metil 1-2 aminoetanosulfónico, Buffer TES, ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) y agua destilada, estos reactivos son disueltos en 1 Litro de agua, después se adiciona una solución de polipropileno y se completa a 20 L con agua destilada, esto con anterioridad ha sido pasado por un filtro con carbón activado, grava y algodón, el pH indicado es de 7.0 ± 0.1 , el cual se puede ajustar con solución NaOH o HCl, el volumen que se prepara se puede almacenar a medio ambiente para seguir adicionando medio fresco al cultivo (24).

H. vulgaris puede ser alimentada con *Artemia sp* o cuando es de gran tamaño también se le puede proporcionar larvas de *Daphnia sp*, esto debe realizarse por lo menos cuatro días a la semana, junto con una limpieza dos veces al día, que se recomienda sea después de la alimentación (19).

Para el proceso de alimentación los huevos tanto de *Artemia sp* como los de *Daphnia sp*, deben pasar por un proceso de eclosión para liberar los nauplios o larvas respectivamente, para esto se puede hacer uso de solución salina en una concentración de 10 g NaCl/L. Luego de esto los nauplios o larvas se quedan flotando y los huevos que no eclosionan se sedimentan. Con una pipeta Pasteur se toman las larvas y se procede a realizar el proceso de desinfección para no contaminar el cultivo, posterior a esto se toman las larvas y se alimenta la hidra colocándolos en forma de zigzag, luego de 4 a 5 horas de la alimentación se procede a realizar una limpieza para eliminar restos de la digestión (25).

3.4 HIDRA COMO MODELO Y SU APORTE A LA TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

En el campo de la investigación se hace necesario el uso a nivel de laboratorio de células y organismos microscópicos o macroscópicos que sirvan de modelo para el estudio y la comprobación de diversas hipótesis en los distintos campos de la ciencia. Se conoce en cuanto al medio ambiente que uno de los recursos más implicados en la contaminación es el agua, estudio que es de vital importancia, ya que si se conocen los tipos de contaminantes que afectan las aguas, es más probable emprender acciones de protección sobre este gran ecosistema (3). Por lo anterior, se busca informar en este apartado de nuestro libro sobre aquellos estudios donde *H. vulgaris* ha hecho su aparición.

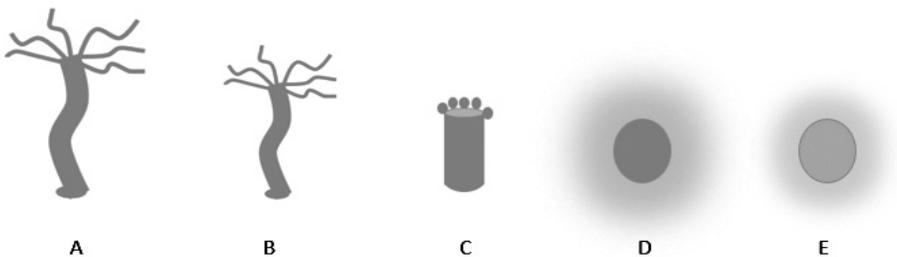
H. vulgaris ha cobrado importancia a través del tiempo en la toxicología acuática, porque en ella se ha logrado evidenciar sensibilidad a diferentes compuestos y debido a la cantidad en la que se encuentra en aguas, también permite que sea bioindicador demostrable, además de las múltiples evaluaciones que se pueden hacer mientras se estudia con este

cnidario, tales como su reproducción asexual, estrés oxidativo, cambios en su morfología, comportamiento y en su alimentación (3).

Uno de los contaminantes mayormente encontrados en agua son los metales pesados, ya que estos originan efectos crónicos, toxicidad y en algunas ocasiones defectos en los fetos, normalmente estas sustancias en mínimas concentraciones son inofensivas y también son necesarias para los procesos bioquímicos que se dan en el ser humano, estos son cromo, zinc y cobre, por el contrario, otros metales pesados son no esenciales y tienen la característica de acumularse en los tejidos como cadmio, mercurio, arsénico y plomo. Por esto, es importante realizar estudios *in vitro* para conocer más a fondo que efectos causan a diferentes concentraciones estos compuestos en la salud humana (26).

En varios estudios se ha podido demostrar que los metales pesados causan gran daño a *H. vulgaris* (Figura 19) y se acumulan en los nematocistos porque este cnidario no posee metalotioneina, la cual es una proteína de unión que ayuda a retener los metales pesados (26).

Figura 19. Descripción de la morfología de *H.vulgaris* en respuesta a la toxicidad.



A. Morfología normal. B. Tentáculo acortado/aplastado. C. Tulipan. D. Pérdida de regulación. E. Desintegración. Elaboración propia basada en: <https://journals.mcmaster.ca/sciential/article/view/2136/1554>

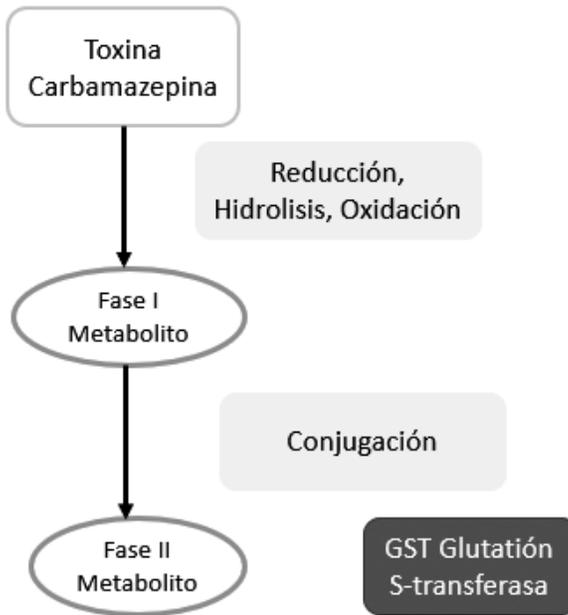
En un estudio realizado en el año 2000, para evaluar la toxicidad crónica causada en *H. vulgaris* por cadmio y zinc, se cultivó *H. vulgaris* teniendo en cuenta el uso de agua debidamente esterilizada para evitar infecciones, se alimentó con nauplios de *Artemia sp*, además se midieron

diariamente parámetros como la temperatura, pH, oxígeno disuelto, dureza de calcio y magnesio del agua que se usa para cada solución, se midió toxicidad aguda y crónica, se utilizó concentración letal 50 y se realizaron diferentes observaciones para evaluar los cambios. Mediante estos ensayos se evidenció que *H. vulgaris* murió a una concentración de cadmio de 82.5 g/L, y también se demostró que el crecimiento poblacional también se vio afectado por este compuesto(27).

Por otro lado, al realizar los ensayos con zinc se pudo evidenciar que la concentración a la que ocurrían los daños en *H. vulgaris* era mayor, 8.000 g/L, no solo morían si no también la tasa de crecimiento poblacional se veía afectada, tal como ocurrió con el cadmio. Lo anterior tiene relación en el hecho que cadmio es un metal no esencial por lo cual mínimas concentraciones podrían causar daño, por el contrario el compuesto zinc, es esencial para muchas funciones biológicas que se desarrollan en los organismos, por lo tanto, se concluyó que se ven afectados en *H. vulgaris* los procesos metabólicos y biológicos del cnidario (27).

A través de los estudios de toxicidad, se ha logrado establecer que *H. vulgaris* también posee enzimas de desintoxicación, tales como Glutathion S-transferasa, la cual es importante en la biotransformación de compuestos exógenos y endógenos. Esto se evidenció mediante el uso de un medicamento llamado carbamazepina, (Figura 20), el cual también se encuentra en diferentes concentraciones ambientalmente. Al alimentar a hidra con este fármaco se mostró su capacidad de conjugación y por lo tanto la ausencia de la bioacumulación de este compuesto (3).

Figura 20. Mecanismo de desintoxicación de *H. vulgaris*. Elaboración propia. Información tomada de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22689364/>



Otro compuesto analizado en *H. vulgaris* ha sido el Bisfenol A, el cual es proveniente de las industrias que manejan el plástico de policarbonato. Este no solo llega a las fuentes hídricas a través de los residuos provocados por las empresas manipuladoras, si no también hace presencia en recipientes de plástico, tales como biberones, juguetes, utensilios de cocina, incluso revestimiento de empaque de alimentos, lo cual hace que este en contacto de manera constante con el ser humano. Este compuesto ha sido catalogado como un disruptor endocrino, lo que quiere decir que se comporta y realiza funciones en el organismo similares a las que realizan las hormonas disparando procesos metabólicos de manera incontrolable (28).

Tras la exposición a hidra con Bisfenol A, se demostró que sufrió cambios morfológicos notorios, además la capacidad de regeneración y

alimentación se vieron altamente afectadas, esto fortaleció la idea de que este organismo es sensible a diversos contaminantes ambientales, teniendo en cuenta que las concentraciones de bisfenol A utilizadas son las que normalmente se encuentran en los cuerpos de agua (28).

En el mismo sentido, los compuestos teratogénicos son aquellos agentes ya sean biológicos, físicos o químicos que tienen la capacidad de generar malformaciones en el embrión. Dentro de este grupo de contaminantes se encuentran antibióticos, extractos, humo de cigarrillo y sustancias psicoactivas como la cocaína, y en este caso *H. vulgaris* se ha convertido en un modelo prueba para la ecotoxicología, ya que posee una capacidad regenerativa que permite analizar el efecto de los teratogénicos en su desarrollo. Lo que ocurre es que tras exponer a *H. vulgaris* a muestras de agua se evidencia que la regeneración se ve retrasada totalmente (29).

3.5 CONCLUSIÓN

A raíz del aumento de tóxicos en el ambiente y de la gran posibilidad de *H. vulgaris* de permitir variedad de métodos, donde lo que se busca es la correlación de las afectaciones causadas por el aumento de los tóxicos en el medio donde crece, es que se han desarrollado ensayos relevantes que destacan a *H. vulgaris* como el modelo óptimo para usar en diversas investigaciones y con mayor aplicación en el área de la toxicología ambiental, por su regeneración. Es importante resaltar que en la actualidad se sigue fortaleciendo el uso de este pólipo de agua dulce en las investigaciones, tanto con sustancias conocidas como con soluciones de las cuales no se conoce su composición (30).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Villar Aguirre M. Determining factors in health: Importance of prevention. *Acta Med Per* [Internet]. 2011;28(4):237-41. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172011000400011&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172011000400011
2. Guadalupe D, Pulido TA. Viva salud noviembre diciembre. [cited 2021 Jul 19]; Available from: <http://www.jornada.unam.mx/2007/08/16/index.php?section=sociedad&article=039n1soc>
3. Quinn B, Gagné F, Blaise C. Hydra, a model system for environmental studies. *Int J Dev Biol*. 2012;56(6-8):613-25.
4. Ghaskadbi S. Hydra: A Powerful Biological Model. *Resonance*. 2020;25(9):1197-213.
5. Bernat P. El pòlip de Trembley: L' "animal-planta" que va sacsejar la biologia del segle XVIII. *Mètode Pop Sci J*. 2013;0(78).
6. Datta S, Chakrabarty A. Effects of actinomycin D on the distal end regeneration in *Hydra vulgaris* Pallas. *Experientia*. [Internet] 1970 [cited 2021 Jul 22] (8):855-6. Available from: <https://doi.org/10.1007/bf02114220>
7. Kalafatic M, Znidaric D, Lui A, Wrischer M. Effect of insecticides (Dimiline WP 25, Torak EC 24 and Gamacide 20) on hydra (*Hydra vulgaris* Pallas). *Int J Dev Biol*. [Internet] 1991; [cited 2021 Jul 22] 35(3):335-40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1726048/>
8. Sarras MP, Zhang X, Huff JK, Accavitti MA, St. John PL, Abrahamson DR. Extracellular matrix (Mesoglea) of *hydra vulgaris*: III. Formation and function during morphogenesis of hydra cell aggregates. *Dev Biol*. . [Internet]. 1993 [cited 2021 Jul 22]; 157(2):383-98. Available from: <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1143>
9. Sarras MP, Yan L, Grens A, Zhang X, Agbas A, Huff JK, et al. Cloning and biological function of laminin in *hydra vulgaris*.

- Dev Biol. [Internet]. 1994 [cited 2021 Jul 22]; 164(1):312-24. Available from: <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1201>
10. Pillai A, Gungi A, Reddy PC, Galande S. Epigenetic Regulation in Hydra: Conserved and Divergent Roles. *Front Cell Dev Biol*. May 10;9:663208. [Internet]. 2021 [cited 2021 Jul 22]; Available from: doi: 10.3389/fcell.2021.663208.
 11. Traversetti, L., Del Grosso, F., Malafoglia, V. et al. The Hydra regeneration assay reveals ecological risks in running waters: a new proposal to detect environmental teratogenic threats. *Ecotoxicology* 26, 184–195 [Internet]. 2017 [cited 2021 Jul 22];43(1):56–63. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1753-4>
 12. Kanaya H, et al. A sleep-like state in Hydra unravels conserved sleep mechanisms during the evolutionary development of the central nervous system. *Sci Adv* [Internet]. 2020 Oct 7 [cited 2021 Jul 22];6(41). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33028524/>
 13. AJ, Bellantuono, AJ, D, Bridge, DE, Martínez. Hydra as a tractable, long-lived model system for senescence. *Invertebr Reprod Dev* [Internet]. 2015 Jan 30 [cited 2021 Jul 22];59(sup1):39–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26136619/>
 14. Hidras - EcuRed [Internet]. [cited 2021 Jun 17]. Available from: https://www.ecured.cu/Hidras#Taxonom.C3.ADA_y_sistem.C3.A1tica
 15. Navegador de taxonomía (Hydra vulgaris) [Internet]. [cited 2021 Jun 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
 16. F, Keifer GEffenberger. Identificación y evaluación del riesgo. *Angew Chemie Int Ed* 6(11), 951–952. 1967.
 17. Hydra vulgaris [Internet]. [cited 2021 Jun 19]. Available from: https://tvd.wiki/wiki/Hydra_vulgaris

18. Vogg MC, Galliot B, Tsiairis CD. Model systems for regeneration: Hydra. *Dev* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Jun 19];146(21). Available from: <https://dev.biologists.org/collection/>
19. Granados YP, Ronco A. Ensayo de toxicidad aguda con el cnidario. 2004;41-54.
20. Galliot B. Hydra, a fruitful model system for 270 years. *Int J Dev Biol*. 2012;56(6-8):411-23.
21. Hydra vulgaris - enciclopedia de la naturaleza de Mónaco [Internet]. [cited 2021 Jun 24]. Available from: <https://www.monaco-natureencyclopedia.com/hydra-vulgaris/?lang=en>
22. Field-cortazares J, Calderón-campos R. Hidra de Agua Dulce. *Boletín Clínico Hosp Infant del Estado Son*. 2011;28(1):31-3.
23. Gloman C, Pescatore M. Working with HDV. *Work with HDV*. 2006;
24. Huarachi R, Gonzalez R. La calidad de aguas del Río chili, Arequipa, Perú. *The Biologist*. [Internet] 2012; [cited 2021 Jul 25].125-37. Available from: https://www.academia.edu/9113585/Hydra_vulgaris_Pallas_1766_Hydrozoa_Hydridae_como_bioindicador_de_calidad_de_aguas_del_r%C3%ADo_Chili_Arequipa_Per%C3%BA
25. Granados YP, Ronco A, Díaz Báez MC. Ensayos de toxicidad aguda con el cnidario Hydra attenuata. [Internet] 2004; [cited 2021 Jul 25].125-37. Available from: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/573/cap3.pdf>
26. Visión de la hidra inmortal como organismo modelo para estudios de toxicidad de metales [Internet]. [cited 2021 Jul 25]. Available from: <https://journals.mcmaster.ca/sciential/article/view/2136/1554>
27. Malhotra N, Hsu HS, Liang ST, Roldan MJM, et al. An Updated Review of Toxicity Effect of the Rare Earth Elements (REEs) on Aquatic Organisms. *Animals*. [Internet] 2020; [cited 2021 Jul 25] 16;10(9):1663. Available from: doi: 10.3390/ani10091663.

28. Vimalkumar K, Sangeetha S, et al. A systematic review on toxicity assessment of persistent emerging pollutants (EPs) and associated microplastics (MPs) in the environment using the Hydra animal model. Elsevier. [Internet] 2022 Jun. [cited 2021 Jul 25]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1532045622000552?via%3Dihub>
29. Traversetti L, Del Grosso F, Malafoglia V, Colasanti M, Ceschin S, Larsen S, et al. The Hydra regeneration assay reveals ecological risks in running waters: a new proposal to detect environmental teratogenic threats. *Ecotoxicology*. [Internet] 2017 [cited 2021 Jul 25] 184–195. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1753-4>
30. Marchesano V, Ambrosone A, Bartelmess J, Strisciante F, Tino A, Echegoyen L, Tortiglione C, Giordani S. Impact of Carbon Nano-Onions on *Hydra vulgaris* as a Model Organism for Nanoecotoxicology. *Nanomaterials (Basel)*. [Internet] 2015 [cited 2021 Jul 25] 5(3):1331-1350. Available from: doi: 10.3390/nano5031331.

Tabla de contenido

Lista de figuras	5
Lista de tablas	6
Prefacio	7
Introducción	9

CAPÍTULO 1. *Caenorhabditis elegans* en el estudio de Toxicología Ambiental

1.1 Historia	14
1.2 Generalidades del modelo	21
1.2.1 Crecimiento, alimentación y mantenimiento del nematodo	23
1.2.2 Ciclo de vida	24
1.2.3 Anatomía y reproducción	25
1.3 Manipulación modelo en el laboratorio	27
1.4 Aplicación en toxicología	31
1.4.1 Ventajas de usar <i>C. elegans</i> en toxicología	34
1.4.2 Limitaciones de <i>C. elegans</i> en toxicología ambiental	37
1.4.3 La novedad en el estudio de la epigenética ambiental	38
1.4.4 Ventajas del uso de <i>C. elegans</i> en epigenética	39
1.5 Conclusión	41
Referencias bibliograficas	41

CAPITULO 2. *Danio rerio* en el estudio de toxicología ambiental

2.1 Historia	51
2.2 Generalidades del modelo	55
2.2.1 Ciclo de vida	57

2.2.2 Anatomía	58
2.3 Manipulación del modelo en el laboratorio	64
2.4 Aplicación en toxicología	65
2.4.1 Compuestos tóxicos que afectan a <i>D. rerio</i> y se correlacionan con enfermedades humanas	66
2.4.2 Cepas transgénicas de <i>D. rerio</i> usadas en el área de la Salud Ambiental	69
2.4.3 Ventajas de usar a <i>D. rerio</i> como modelo en ecotoxicología	72
2.4.4 Limitaciones de usar a <i>D. rerio</i> como modelo en toxicología	74
2.5 conclusión	75
Referencias bibliográficas	76
CAPÍTULO 3. <i>Hydra vulgaris</i> en el estudio de la toxicología ambiental	
3.1 Historia	88
3.2 Generalidades del modelo	91
3.2.1 Distribución geográfica y hábitat	93
3.2.2 Morfología	93
3.3 Manipulación del modelo en el laboratorio	98
3.4 Hidra como modelo y su aporte a la toxicología ambiental	100
3.5 Conclusión	104
Referencias bibliográficas	105
Glosario	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Infograma de los hallazgos importantes en la secuenciación del genoma de <i>C. elegans</i> .	16
Figura 2. Observación general de <i>C. elegans</i> .	22
Figura 3. Ciclo de vida biótico de <i>C. elegans</i> .	23
Figura 4. Estadios larvarios de <i>C. elegans</i> .	24
Figura 5. Morfología del estadio Dauer de <i>C. elegans</i> .	25
Figura 6. Los dos sexos de <i>C. elegans</i> .	26
Figura 7. Cultivo en agar NMG de la cepa silvestre N2 de <i>C. elegans</i> .	28
Figura 8. Medición longitud del cuerpo en cepa transgénica TJ356.	30
Figura 9. Diseño general de métodos para trabajar con <i>C. elegans</i> en el campo de la toxicología ambiental	34
Figura 10. Esquema que representa las fortalezas de <i>C. elegans</i> para su uso en el ámbito de la toxicología ambiental	36
Figura 11. Clasificación taxonómica de <i>D. rerio</i>	56
Figura 12. Ciclo de vida de <i>D. rerio</i>	59
Figura 13. Similitudes y diferencias anatómicas entre el humano y el pez cebra	59
Figura 14. Características según género de <i>D. rerio</i>	63
Figura 15. Se observa <i>H. vulgaris</i> en su hábitat	92
Figura 16. Se observa anatomía de <i>H. vulgaris</i>	94
Figura 17. Reproducción sexual de <i>H. vulgaris</i>	96
Figura 18. Esquema ventajas y desventajas del uso en el laboratorio de <i>Hidra vulgaris</i> . Elaboración propia	99
Figura 19. Descripción de la morfología de <i>H. vulgaris</i> en respuesta a la toxicidad	101
Figura 20. Mecanismo de desintoxicación de <i>H. vulgaris</i>	103

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Línea de tiempo de <i>C. elegans</i> . Elaboración propia de los autores.	17
Tabla 2 Evaluación de toxicidad por contaminantes ambientales	32
Tabla 3 Línea de tiempo <i>D. rerio</i> . Hitos históricos importantes y relacionados con genética y ecotoxicología	54
Tabla 4 Compuestos usados en el modelo <i>D. rerio</i> y sus órganos implicados	67
Tabla 5 Cepas <i>D. rerio</i> utilizados en toxicología ambiental	71
Tabla 6 Línea del tiempo de <i>H. vulgaris</i>	90
Tabla 7 Taxonomía de <i>H. vulgaris</i>	91

Prefacio

Para las autoras es un logro presentar una obra que permite recopilar los tres principales modelos biológicos usados en toxicología ambiental. Estos conocimientos permitirán a nuestros estudiantes, profesionales y personas interesadas en el tema adquirir una mayor comprensión del uso de estos modelos en las diferentes áreas como toxicología ambiental, biotecnología y afines. Los usos de estos modelos son una herramienta útil en diversas áreas del conocimiento científico, es de suma importancia su difusión para aumentar el saber en las diferentes repercusiones que tiene la contaminación ambiental en la salud humana.

Para tal fin, este libro ha sido conceptualmente dividido en tres capítulos; en cada uno de los cuales se abordan las características generales de *C. elegans*, *H. vulgaris* y *D. rerio* desde una perspectiva ecotoxicológica. Se abarcan aspectos básicos como crecimiento, mantenimiento, anatomía, avances logrados por medio de su estudio en diversas áreas de la ciencia y finalmente su aplicabilidad en la investigación en el campo de la toxicología ambiental, las novedades actuales y su impacto en la salud. Además, se muestran consultas sistemáticas sobre estos modelos con el fin de brindar información importante acerca de estos seres vivos útiles para estudios toxicológicos.

Para los que tiene interés en el tema cada capítulo incluye referencias de artículos de revisión, libros más especializados en el tema y artículos de la literatura original. Algunos de estos artículos presentan dificultad para seguir por algunos principiantes, sin embargo, algunos son hitos históricos o contienen algún aspecto valioso.

Introducción

La idea de salud humana fue definida desde un inicio como la ausencia de enfermedad, sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó una revisión del concepto para extender la definición, no solo desde la mirada del funcionamiento normal del organismo, es decir, desde la idea de que el bienestar solo depende de los hábitos de la persona, sino también desde el aspecto ecológico, tomando en cuenta el medio ambiente, desde sus diferentes elementos como el aire, el suelo, el agua, la luz, el ruido y el clima, en donde se pueden encontrar diferentes contaminantes que afectan la salud humana.

La sobrepoblación, las actividades antropogénicas y el progreso tecnológico e industrial, han dado lugar a un sin fin de residuos contaminantes que conllevan a la producción de toxinas que afectan el medio ambiente. Lo anterior obliga a vigilar e identificar estos compuestos químicos y al mismo tiempo a reconocer el impacto negativo de dicha exposición en los seres vivos, destacando sus consecuencias sobre mecanismos biológicos, químicos y genéticos.

Según lo establece la OMS, en los últimos años 12,6 millones de personas perdieron la vida por habitar o trabajar en ambientes poco saludables, entre los que se incluye la contaminación del aire, agua o suelo, la exposición a productos químicos, el cambio climático y la radiación ultravioleta. Todo lo anterior conlleva a la aparición de cientos de enfermedades, siendo los niños menores de cinco años y los adultos entre 50 a 75 años los principalmente afectados.

Así mismo, la OMS expone que 844 millones de personas carecen de un servicio básico de agua potable, es decir, 159 millones de personas dependen de aguas superficiales contaminadas, que pueden producir enfermedades como la diarrea, la disentería, la fiebre tifoidea, entre otras. Además, los seres humanos están expuestos a la volatilidad de compuestos tóxicos presentes en fuentes hídricas, que pueden llegar a producirles una toxicidad aguda y consecuencias a largo plazo.

La contaminación del suelo es generada por múltiples causas, el principal agente es la agricultura, porque a partir de esta actividad económica son depositados en el suelo sustancias químicas provenientes de los herbicidas, abonos sintéticos e insecticidas, también son usados plaguicidas que se concentran en la cadena alimentaria y resultan afectando la salud humana. La contaminación del suelo también proviene de las industrias y de la construcción de ciudades donde son generados compuestos contaminantes al ambiente.

Por otro lado, también se asocian dificultades respiratorias como el asma y alergias a causa de la contaminación del aire, generada por agentes como el óxido de nitrógeno, azufre, metales, compuestos volátiles y aquellos originados a través del tabaquismo, el cual también genera contaminación ambiental.

Como se mencionó anteriormente más allá de reconocer los contaminantes ambientales, es necesario usar modelos biológicos que permitan identificar su repercusión toxicológica en el humano, para así comprender las consecuencias y plantear estrategias que permitan mejorar la calidad medioambiental, restablecer la flora y fauna, y al mismo tiempo minimizar los índices de mortalidad y morbilidad humana debido al déficit de salud ambiental en el mundo.

Entre los modelos biológicos se destacan algunos seres vivos que permiten evaluar en tiempo real, patologías ecotoxicológicas, estrés celular, vías de señalización, moléculas inmunes, funcionalidad de órganos y sistemas tras la exposición a compuestos tóxicos durante todo su periodo de vida. Al mismo tiempo, algunos de estos modelos deben presentar

características importantes como el tener una progenie amplia o sea fácilmente reproducible, con el fin de poder analizar respuesta poblacional compleja a corto y largo plazo.

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*), *Hydra vulgaris* (*H. vulgaris*) y *Danio rerio* (*D. rerio* o *Pez cebra*), son modelos biológicos valiosos para los investigadores en diferentes áreas del conocimiento. Son muchas las investigaciones que usan estos modelos biológicos con el fin de abordar problemas apremiantes en salud ambiental, como la identificación de contaminantes, seguimiento continuo y sistemático de las variables ambientales, ensayos de teratogenicidad, estudios sobre mecanismos de acción y fenotipos de enfermedades asociados al medio ambiente, entre otros.

En este libro se presentan las características generales de *C. elegans*, *H. vulgaris* y *D. rerio* desde una perspectiva ecotoxicológica. Se abarcan aspectos básicos como crecimiento, mantenimiento, anatomía, avances logrados por medio de su estudio en diversas áreas de la ciencia y finalmente su aplicabilidad en la investigación en el campo de la toxicología ambiental, las novedades actuales y su impacto en la salud.

CAPÍTULO 1

Caenorhabditis elegans en el estudio de Toxicología Ambiental

Andrea Viviana Gualteros Bustos
Yenny Yolanda Lozano Jiménez

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) se constituye en una alternativa como modelo inferior que brinda una plataforma novedosa y reproducible en ensayos de toxicología ambiental, al ser un nematodo de vía libre, corto ciclo de vida, óptima reproducción, pequeño tamaño corporal, cuantificación y visibilidad de fenotipos externos e internos. Se estableció como el primer organismo multicelular en tener su genoma completamente secuenciado, dentro de sus 20.000 genes, el 40% son homólogos al de los mamíferos, compartiendo similitud en cuanto a procesos metabólicos (1). Sin contar con que anualmente durante los últimos cinco años se han publicado cerca de 1.200 artículos en múltiples áreas de estudio (2).

En este capítulo se expondrán las características de *C. elegans* desde una perspectiva general hacia el ámbito específico de la toxicología ambiental, abarcando aspectos básicos como el crecimiento, mantenimiento, anatomía, avances logrados por medio de su estudio, finalmente su aplicabilidad en la investigación en el campo de la toxicología ambiental y las novedades actuales.

Inicialmente es importante dar a conocer la historia de este modelo y cómo ha contribuido a la comprensión de procesos fundamentales en el estudio de la toxicidad y genotoxicidad, humana y ecológica.

1.1 Historia

C. elegans es un invertebrado que desde su primera descripción llamó la atención por sus cualidades versátiles, que a través de la historia han permitido realizar valiosos descubrimientos y aportes a la ciencia; lo cual es sorprendente, ya que *C. elegans* es un organismo inferior con una gran maquinaria funcional que aún falta por explorar, según lo que parcialmente se evidencia en la línea del tiempo (Tabla 1).

La primera vez que se escribió de *C. elegans* fue en 1.900 en los alrededores de la ciudad de Argel (Argelia), por el bibliotecario y biólogo francés Emile Maupas, quien lo nombró *Elegans rhabditis*. Adicionalmente estudió su desarrollo, anatomía e indujo respuesta a estímulos como la inanición (3, 4).

Luego en 1940, Victor Nigon y Ellsworth Dougherty modificaron y optimizaron las metodologías de mantenimiento de nematodos en el laboratorio. Sin embargo, en 1970 el biólogo sudafricano Sydney Brenner fue quien estableció a *C. elegans* como un modelo biológico, siendo su intención principal esclarecer los fundamentos moleculares de la biología del desarrollo y el sistema nervioso. Desde 1963 Brenner inició su trabajo con *Caenorhabditis briggsae*, pero durante la experimentación fue *C. elegans* la especie que demostró un mejor desarrollo en el laboratorio (5).

Más tarde, en 1975 John White, Sydney Brenner, Donna Albertson, Eileen Southgate, Sam Ward y Nichol Thomson; describieron la anatomía y conectividad de las 302 neuronas del hermafrodita adulto y durante 1977 John Sulston, Robert Horvitz y colaboradores describieron la división celular desde el cigoto unicelular hasta la larva adulta, caracterizando el primer linaje completo de un organismo multicelular (5).

Posteriormente, en 1983 los investigadores Hartman, Herman, Fatt, Dougherty, Blum y Fridovich sentaron las bases del uso de *C. elegans* como un modelo para el estudio del daño en el ADN. Por otro lado, se realizó la caracterización de vías de apoptosis (muerte celular programada) por Hedgecock y colaboradores (6), lo que permitió su incursión en la investigación toxicológica por sus respuestas fenotípicas y genéticas al estrés ambiental. Sin embargo, fue en 1990 cuando Phil Williams y sus colaboradores experimentaron con *C. elegans* como organismo modelo toxicológico, abriendo la posibilidad para que en ese mismo año Jonathan Freedman y sus colegas determinaran las respuestas del nematodo frente a la exposición a metales pesados (6).

Adicionalmente, la primera evidencia de microARN (miARN) fue informada por Lee y colaboradores en 1993 empleando a *C. elegans* como modelo de estudio, posteriormente Morris y Mattick continuaron con investigación en este ámbito en 2014. En el desarrollo del nematodo son relevantes los miARN reguladores *lin-4* y *let-7*. También se destacan los ARN largos no codificantes (lncARN), los cuales son ARN largos sin marcos de lectura abiertos de más de 100 pares de bases; en *C. elegans* son conservados en cuanto a estructura y procesos de transcripción (6).

En 1998, *C. elegans* fue el primer organismo multicelular con su genoma completamente secuenciado gracias al *C. elegans* Sequencing Consortium (Figura 1) (5). Otro descubrimiento por Fire y colaboradores en el año 1998 fue el silenciamiento de genes por ARN de interferencia (ARNi), que en años posteriores se estableció como una técnica para silenciar cualquier gen en diversos organismos, incluso dio la posibilidad a Andrew Fire y Craig Mello el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2006 (5).

Figura 1. Infografía de los hallazgos importantes en la secuenciación del genoma de *C. elegans*.



Fuente: Elaboración propia.

En el año 2001 Richard Nass y colaboradores propusieron el uso de *C. elegans* para ensayos de neurodegeneración inducida por sustancias químicas (7). Posteriormente, en 2003 Horvitz y Sulston fueron merecedores del premio Nobel por su proyecto de linaje de *C. elegans* como plataforma para el descubrimiento de genes, además de describir los mecanismos genéticos de la apoptosis (5).

Para el año 2007 Cui, Boyd y colaboradores estandarizaron los análisis toxico-genómicos y las pruebas de toxicidad de rendimiento medio empleando *C. elegans*. Todo lo anterior ha demostrado la evolución en la experimentación y la ampliación del estudio de *C. elegans* en procesos como: la respuesta al daño del ADN, la apoptosis, la autofagia, defensas antioxidantes, señalización del receptor nuclear, respuestas de estrés mitocondrial y respuestas de metales pesados; lo cual ha conllevado a su adecuada caracterización para estudios de toxicidad, genotoxicidad humana y ecológica (7).

Tabla 1. Línea de tiempo de *C. elegans*

AÑO	SUCESO
1974	Identificación de mutaciones que afectan el comportamiento animal. Realizado por Brenner en 1974 (8) y Dusenberry y colaboradores en 1975 (9).
1977	Primera clonación y secuenciación de un gen de miosina; llevado a cabo por Macleod y colaboradores en 1977 (10).
1981	Se identifica el primer nicho de células madre de la línea germinal, desarrollado por Kimble y White en 1981 (11) y luego por Crittenden en 2005 (12).
1983	Caracterización completa del primer linaje celular en metazoos. Realizada por Sulston y Horvitz en 1977 (13), posteriormente por Kimble y Hirsh en 1979 (14) y finalmente por Sulston y colaboradores 1983 (15).

Continúa

AÑO	SUCESO
1983	<p>Descubrimiento de genes de apoptosis (muerte celular programada) y caracterización de las vías involucradas en el proceso. Esto ha sido desarrollado a través de varias décadas por los siguientes investigadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hedgecock y colaboradores en 1983 (16). • Ellis y Horvitz en 1986 (17). • Yuan y Horvitz en 1992 (18). • Yuan y colaboradores en 1993 (19). • Conradt y Xue en 2005 (20).
1986	<p>Primer diagrama de cableado completo de un sistema nervioso. Estudio iniciado por White y colaboradores en 1986 (21), continuado por Jarrell y colaboradores en 2012 (22) y finalizado por White en 2013 (23).</p>
1987	<p>Identificación del papel de la señalización de Notch en blastómeros embrionarios. Llevado a cabo por Priess y colaboradores en 1987 y 2005 (24, 25).</p>
1990	<p>Primera descripción de la función de la señalización RAS en el desarrollo de metazoos. Desarrollada por:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Beitel y colaboradores en 1990 (26) • Han y Sternberg en 1990 (27) • Sternberg en 2005 (28) • Sundaram en 2013 (29).
1993	<p>Demostración del papel de los genes de la vía de la insulina en la regulación de la esperanza de vida. Estudio llevado a cabo por:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Friedman y Johnson en 1988 (30). • Kenyon y colaboradores en 1993 (31). • Kimura y colaboradores en 1997 (32). • Collins y colaboradores en 2007 (33).
1993	<p>Descripción del primer microARN (<i>lin-4</i>) junto con su objetivo de ARNm (<i>lin-14</i>). Estudio iniciado por Lee y colaboradores en 1993 (34), continuada por Wightman y colaboradores en 1993 (35) y finalizada por Vella y Slack en 2005 (36).</p>

AÑO	SUCESO
1994	Introducción de GFP como marcador biológico de genes y proteínas. Investigación llevada a cabo por Chalfie y colaboradores en 1994 (37) posteriormente por Boulin y colaboradores en 2006 (38).
1998	Secuenciación del primer genoma de metazoos. Realizada por <i>C. elegans</i> Sequencing Consortium en 1998 (1) y Schwarz en 2005 (39).
1998	Descubrimiento de ARN de interferencia (ARNi). Desarrollado por Fire y colaboradores en 1998 (40).
2000	Conservación y ubicuidad de microARN (miARN). Estudio realizado por Pasquinelli y colaboradores en 2000 (41).
2000	Desarrollo de detección de ARNi en todo el genoma/ primer perfil completo de la función génica en todo el genoma. Estudio llevado a cabo por Fraser y colaboradores en 2000 (42) y luego por Kamath y colaboradores en 2001 (43).
2002	Descubrimiento de la primera polimerasa citoplasmática poliA (<i>gld-2</i>). Desarrollado por Wang y colaboradores en 2002 (44) y completado por Kimble y Crittenden en 2005 (12).
2005	Primer perfil de ARNi de la embriogénesis temprana en el genoma completo, fue llevado a cabo por Sönnichsen y colaboradores en 2005 (45).
2005	Primer uso de optogenética empleando Canalrodopsina-2 en un organismo intacto, esta innovación fue desarrollada por Nagel y colaboradores en 2005 (46).
2011	Descubrimiento de los primeros virus nematodos, llevado a cabo por Félix y colaboradores en 2011 (47).

Continúa

AÑO	SUCESO
2014	Uso de <i>C. elegans</i> como modelo en la evaluación de niveles de Selenio a nivel ambiental, teniendo en cuenta los efectos producidos en parámetros como longitud corporal, supervivencia y reproducción. Estudio llevado a cabo por Wen-Hsuan Li , Yun-Ru Ju , Chung-Min Liao, Vivian Hsiu-Chuan Liao en 2014 (48).
2015	<i>C. elegans</i> como modelo en el estudio de nanotoxicidad, o toxicología de sistemas integrados, para este estudio se emplearon nanotubos de carbono. Se analizaron las vías de endocitosis, fagocitosis, estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico en el nematodo. Esto fue desarrollado por Hyun-Jeong Eom y colaboradores en 2015 (49).
2016	Evaluación <i>In vivo</i> de la calidad de recursos hídricos utilizando a <i>C. elegans</i> . Este monitoreo fue realizado por Araceli Clavijo y colaboradores en 2016 (50).
2018	Incursión de <i>C. elegans</i> en la epigenética, biología de la cromatina y genotoxicidad química. Esta descripción detallada fue descrita por Caren Weinhouse y colaboradores en 2018 (6).
2020	Análisis ecotoxigenómico de los efectos producidos por metales pesados provenientes de suelos contaminados empleando <i>C. elegans</i> . Se usaron pruebas ecotoxicológicas y análisis de transcriptoma global con microarrays de ADN. Este estudio fue llevado a cabo por Carmen fajardo y colaboradores en 2020 (51). Yogendra Nagar y colaboradores en este mismo año 2020 propusieron a <i>C. elegans</i> como un modelo para evaluación de la toxicidad producida por los residuos de parabenos en el medio ambiente (52).
2021	Jessica H Hartman y colaboradores en el año 2021 establecen la utilidad de <i>C. elegans</i> como un modelo en toxicología y farmacología debido a la naturaleza de su metabolismo xenobiotico (53).

Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, Marty Chalfie recibió el Premio Nobel de Química en 2008, gracias a su trabajo desarrollado desde 1994, en el cual estableció a la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador biológico empleando a *C. elegans*, debido a su cuerpo transparente que permitió una mejor caracterización (5, 37).

Esta línea de tiempo permite observar que *C. elegans* presenta características fisiológicas inherentes que lo hacen apropiado para la investigación como en el ámbito de la Ecotoxicología.

1.2 Generalidades del modelo

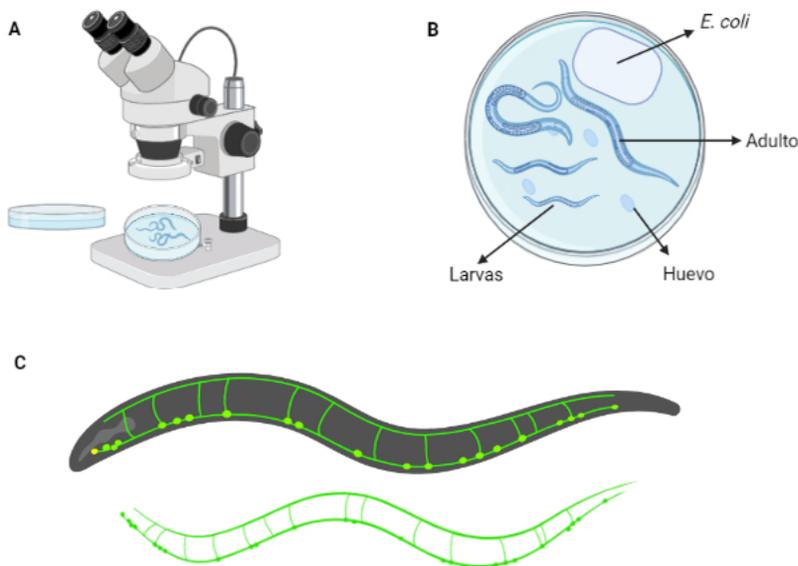
C. elegans es un nematodo de vía libre, con un tamaño promedio de 1 mm en su estadio adulto (Figura 2) al ser observado en un estereoscopio (Figura 2A). Su ciclo de vida es rápido, aproximadamente en tres días, pasa de huevo a larva adulta; se encuentra como hermafrodita autofertilizante y macho, el cual surge con una frecuencia $< 0.2\%$ (Figura 2B).

En el ámbito filogenético *C. elegans* pertenece al clado *Ecdysozoa*, filo Nematoda, subclase *Chromadoria*, orden *Rhabditida*, género *Caenorhabditis* y la cepa salvaje tiene por nomenclatura N2. Como rasgos importantes, en el clado *Ecdysozoa* los organismos se caracterizan por presentar muda de cutícula, permitiendo deducir que *C. elegans* se encuentra más relacionado con *Drosophila* que con moluscos y lombrices de tierra; adicionalmente en el orden *Rhabditida* se incluyen parásitos animales y vegetales de vía libre pertenecientes a ecosistemas acuáticos y terrestres (5).

A nivel somático posee un número invariable de células permitiendo el desarrollo de investigaciones relacionadas con los destinos celulares de linajes específicos, como, por ejemplo, el de las 302 neuronas, de las cuales se ha logrado realizar un diagrama de cableado completo (Figura 2C). A nivel genómico es importante resaltar que en promedio el 38% de genes que codifican proteínas en el nematodo han permitido encontrar ortólogos en el genoma humano, 60-80 % de genes humanos tienen un ortólogo en el genoma de *C. elegans* y el 40 % de

genes que participan en el desarrollo de patologías humanas tienen homólogos específicos en el nematodo (54); lo cual lo hace un modelo en el estudio de enfermedades humanas (5, 55).

Figura 2. Observación general de *C. elegans*



Nota: A. Medio NGM colocado en microscopio de disección/ estereoscopio con el fin de visualizar el nematodo debido a su tamaño. B. visualización de *C. elegans*, se observa el botón de *E. coli* OP50 como fuente de alimento, huevos, larvas adultas y larvas en estadios inferiores. C. Por medio de fluorescencia empleando GFP (*sto-6 :: gfp*) se observa el sistema nervioso (cableado) de *C. elegans*.

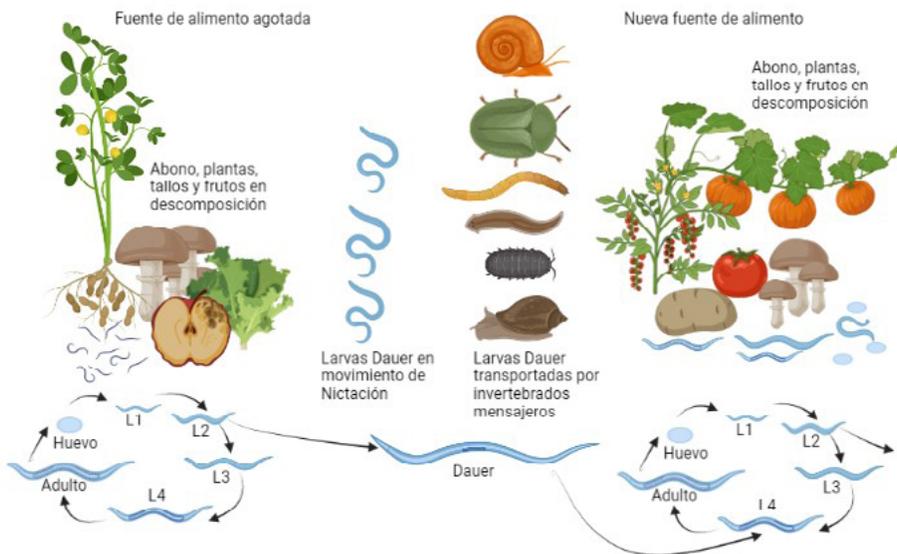
Fuente: Elaboración propia.

A continuación, se describirán los aspectos más relevantes concernientes al nematodo *C. elegans*, con el fin de conocer los requerimientos básicos para su mantenimiento y sus características fisiológicas.

1.2.1 Crecimiento, alimentación y mantenimiento del nematodo

En un contexto silvestre *C. elegans* habita en el suelo siendo el abono, las plantas, tallos y frutos en descomposición, el material de su predilección por su alto contenido de microorganismos que sirven como fuente de alimento (56). *C. elegans* se caracteriza por tener una forma de dispersión, cuando hay escasez de fuentes de alimento, el nematodo entra en estadio Dauer (éste será explicado con mayor profundidad en el ciclo de vida), el cual por movimientos de “Nictación” en el que se paran sobre la cola y mueven la cabeza en el aire, logran ser atrapados por otros invertebrados mensajeros como los isópodos y así ser transportados a una nueva fuente de alimento (figura 3) (4, 5).

Figura 3. Ciclo de vida biótico de *C. elegans*



Nota: Se observa el ciclo de *C. elegans* teniendo en cuenta la influencia y las interacciones con otros microorganismos y macroorganismos.

Fuente: Elaboración propia.

1.2.2 Ciclo de vida

A nivel general el nematodo aumenta de tamaño durante 4 estadios larvarios caracterizados L1 a L4. Todo inicia con la embriogénesis, la cual tiene una duración promedio de 16 horas, después de la fertilización se forma la cutícula del huevo, la cual es una barrera impermeable que permite el desarrollo independiente del embrión. Cuando se llega a la formación de 24 células, la madre hermafrodita deposita el huevo. En el momento en el que el embrión cuenta con 558 células eclosiona, dando lugar a la larva L1, la cual dura aproximadamente 16 horas, entre L2, L3 y L4 se calcula que hay 12 horas de duración. Al final de cada estadio el nematodo entra en un leve letargo en el que muda de cutícula (capa externa formada principalmente por colágeno) (figura 4) (5, 56, 57).

Figura 4. Estadios larvarios de *C. elegans*



Nota: Se observa la cepa Salvaje N2 en sus diferentes estadios (Huevo, L1, L2, L3, L4 y adulto, desarrollado en el laboratorio).

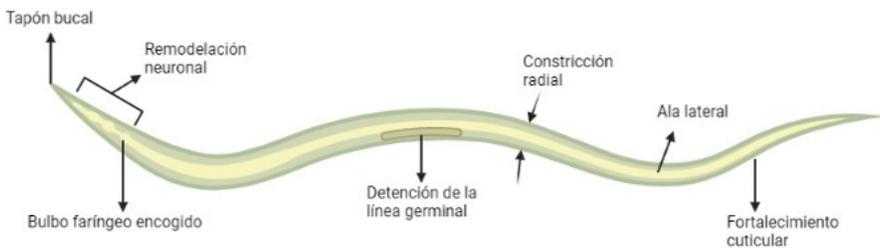
Fuente: Fotografías tomadas por los integrantes del grupo Biotecnología y genética UCMC. Microscopio invertido 40X.

La etapa reproductiva de los hermafroditas adultos comienza 12 horas después de la muda de la larva L4, la mayor parte de la progenie se da en un periodo de 2 a 3 días. Cuando ya se han agotado los espermatozoides almacenados, es posible generar progenie adicional si ocurre apareamiento con un macho. Después de finalizado el periodo

reproductivo el nematodo hermafrodita vive unas semanas más hasta que llega a la senescencia (5).

En situaciones de escasez de alimento o de una alta densidad poblacional el nematodo entra a un estado alternativo al L3 denominado Dauer. Cuando ocurren situaciones estresantes desde estadio L1, el nematodo empieza a procesar esa información para que a finales del estadio L2 se inicie la transformación fenotípica. La larva Dauer se caracteriza por tener una cutícula de mayor resistencia que impide agresiones externas de tipo químico y físico, además envuelve completamente al nematodo impidiendo su alimentación y crecimiento; por esta razón, las Dauer pueden sobrevivir durante varios meses, en la naturaleza permiten la dispersión a diferentes ambientes. Cuando la larva Dauer es colocada en un contexto favorable, se caen los tapones bucales, dejan la cutícula y continúan con su crecimiento a larva L4 (figura 5) (5, 58).

Figura 5. Morfología del estadio Dauer de *C. elegans*



Nota: La larva Dauer de *C. elegans* sufre una transformación fenotípica en varios tipos de tejidos.

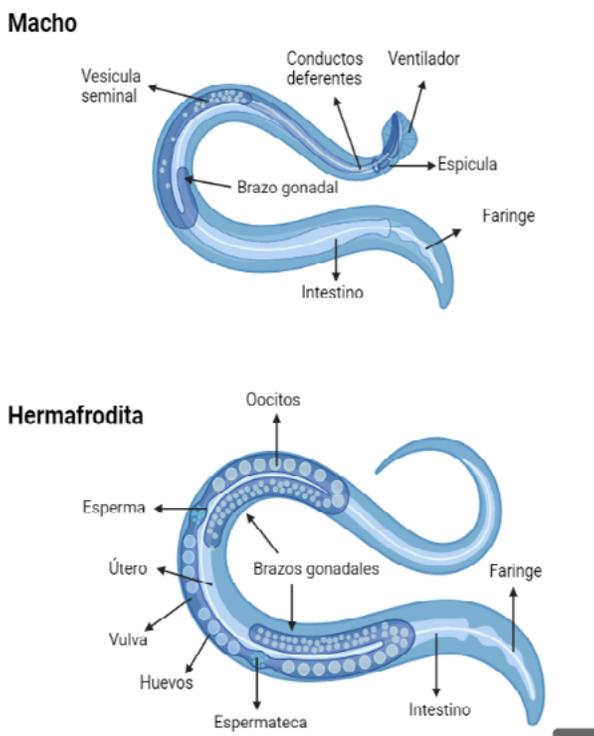
Fuente: Elaboración propia.

1.2.3 Anatomía y reproducción

El nematodo cuenta con dos sexos: hermafrodita y macho, los cuales visualmente se distinguen hasta la etapa L4. Los hermafroditas poseen una cola en punta y la vulva se observa como un semicírculo ventral, mientras que de los machos es característico una cola ancha en forma de abanico (figura 6). En el periodo reproductivo los ovocitos

pueden ser fecundados por espermatozoides del mismo hermafrodita, lo cual se denomina autofecundación; mientras que cuando la fecundación de los ovocitos la realizan los espermatozoides provenientes del macho se denomina apareamiento (5); siendo la autofecundación el mecanismo más común y el más útil, pues con un solo nematodo hermafrodita se podría poblar todo un medio de cultivo (5, 59). Ambos sexos son diploides para los cinco cromosomas autosómicos, los hermafroditas tienen dos cromosomas XX y los machos un solo cromosoma XO, debido a que *C. elegans* no cuenta con un cromosoma Y como los humanos (5).

Figura 6. Los dos sexos de *C. elegans*



Nota: Los hermafroditas y los machos difieren notablemente en el tamaño corporal general y en las estructuras como la gónada y la cola somáticas.

Fuente: Elaboración propia.

Cuando el nematodo se encuentra en etapa L4 la gónada de los hermafroditas produce espermatozoides ameboides haploides que son almacenados en la espermateca, cuando llega a la edad adulta la gónada cambia y empieza a producir ovocitos, los cuáles serán fertilizados por los espermatozoides y producirán en promedio 300 progenies durante su periodo reproductivo (2-3 días después de llegar a adulto). Cuando ocurre apareamiento con un macho hay la posibilidad de producir 1000 progenies durante el periodo reproductivo (5).

La autofecundación da lugar a la homocigosis, debido a que los hermafroditas no pueden aparearse entre ellos, las poblaciones presentan tendencia a perder la heterocigosis; por lo cual, las cepas mutantes son isogénicas. Adicionalmente la autofecundación sigue la herencia mendeliana de segregación 1:2:1, de esta manera el 25% de larvas hijas serán homocigotas para el alelo de interés o alelo mutante y evidenciará el rasgo autosómico recesivo en su fenotipo. Otra característica, es que cuando una mutación afecta la función de neuronas que posibilitan el apareamiento, el nematodo puede mantenerse en el tiempo debido a la autofecundación (5).

Gracias al apareamiento con machos es posible el intercambio de material genético, lo que permite la diversidad genética en posteriores generaciones, facilitando el mapeo de genes y la posibilidad de obtener progenies cruzadas, útiles en investigación (5, 60).

1.3 Manipulación modelo en el laboratorio

En el laboratorio, *C. elegans* es mantenido en agar NGM (Nematode Growth Medium) especial para nematodos y como fuente de alimento se usa *Escherichia coli* OP50 (*E. coli* OP50), la cual es una *E. coli* que tiene una mutación flagelar que elimina su movilidad, para que no se propague por el medio NGM, facilitando la visualización del nematodo durante la ejecución de diversos ensayos. Por esta razón, para su manipulación básica en el laboratorio deben emplearse microscopios de disección o estereoscopios, que facilitan la visualización de su desarrollo, reproducción y movimiento (Figura 7). En la experimentación más avanzada, los microscopios compuestos o confocal permiten la observación de células y tejidos con adecuada resolución.

Figura 7. Cultivo en agar NMG de la cepa silvestre N2 de *C. elegans*



Fuente: Fotografía tomada en microscopio invertido 40X por los integrantes del grupo Biotecnología y Genética UCMC.

En el laboratorio es versátil, pues permite ser congelado por varios meses y recuperarse al descongelarse y ser expuesto a condiciones favorables, lo cual permite la creación de ceparios del nematodo, donde es posible mantener cepas mutantes y transgénicas útiles en innumerables estudios; por su tamaño es posible realizar su cultivo y experimentación en laboratorios básicos, adicionalmente, este no es exigente con la temperatura por lo que es posible prescindir de incubadoras sofisticadas, pues sobrevive en un rango de 12°C - 25°C. Es importante mencionar que a una temperatura superior el nematodo se vuelve estéril (61), sin embargo, en un lapso corto de tiempo un aumento de temperatura provocaría el aumento de machos en la población (5, 56, 62).

Para el desarrollo de cualquier ensayo es posible sincronizar los nematodos desde huevos a partir de un experimento denominado Sincronización, donde con una solución compuesta por hipoclorito de sodio 5 % e hidróxido de sodio 2N se destruyen las larvas grávidas liberando los huevos que posteriormente eclosionaran. Todo lo anterior

permite usar *C. elegans* para experimentación básica como visualización a través de microscopía convencional hasta el análisis en plataformas bioquímicas y genómicas (5, 63-65).

Se han diseñado cinco estudios básicos que son útiles en tamizajes toxicológicos, ya que permiten evaluar aspectos fisiológicos esenciales en el nematodo, dando la posibilidad de inferir procesos y rutas de acción, ya sea de sustancias compuestas o de metabolitos aislados.

Estos ensayos corresponden a reproducción, longevidad, longitud del cuerpo, locomoción y estrés oxidativo. La reproducción permite evaluar el tamaño de la progenie, la mayoría de los compuestos tienen efectos sobre la reproducción del nematodo bien sea durante la formación de gametos, del embrión o sobre las conexiones nerviosas que modulan la función vulvar. Este ensayo consiste en tomar un número específico de larvas hermafroditas en estadio adulto y empezar a pasar a diario las larvas de forma individual a nuevos medios hasta finalizar su periodo reproductivo; los medios donde los nematodos colocaron huevos deben guardarse hasta que eclosionen y se deben contar las larvas hijas en estadio L2 y L3, para al final realizar una suma estableciendo el tamaño total de la progenie durante el periodo reproductivo de una larva hermafrodita (66, 67).

El ensayo de longevidad permite determinar el tiempo de vida del nematodo, representa un estándar de envejecimiento. Permite evaluar si una sustancia tiene efectos sobre vías que modulan el lapso de vida. Similar al ensayo de reproducción en estadio L4, se deben empezar a pasar las larvas hermafroditas de forma individual a diferentes medios, deben transferirse a diario para que no se mezclen generaciones. Al final del periodo reproductivo es posible realizar los pases cada dos días, hasta que la larva ya no responda a ningún estímulo, momento en que se establece la muerte del nematodo. Se debe realizar una curva para determinar el número promedio de días en los cuales el nematodo estuvo vivo (8, 68).

El ensayo de longitud del cuerpo permite evidenciar efectos de sustancias sobre el crecimiento del nematodo, mientras que la locomoción permite observar alteraciones neurológicas específicamente en

los procesos de sinapsis neuronal (8, 69, 70). Ambos ensayos deben realizarse en el primer día de adulto, la longitud del cuerpo puede realizarse de forma sencilla en microscopio óptico convencional con reglilla milimetrada (Figura 8). Caso similar aplica para determinar locomoción donde puede realizarse un conteo de la frecuencia de la curvatura corporal en 30 segundos; cabe resaltar que actualmente se han diseñado softwares especializados que permiten mediciones más exactas en diferentes estadios y en el caso de la locomoción permiten evaluar múltiples aspectos en diversas condiciones (como los medios líquidos y medios sólidos) (71).

Figura 8. Medición longitud del cuerpo en cepa transgénica TJ356



Nota: Medición de longitud del cuerpo de larva de la cepa transgénica TJ356 en primer día de adulto. Medición realizada en microscopio óptico con reglilla milimetrada 40X.

Fuente: Medición tomada por integrantes del grupo Biotecnología y Genética UCMC en microscopio óptico con reglilla milimetrada 40X.

Finalmente, el estrés oxidativo es un parámetro evaluable en *C. elegans* y se caracteriza por ser precursor de varias enfermedades crónicas y degenerativas, incluyendo el envejecimiento, al generarse un incremento de especies reactivas de oxígeno. En la sensibilidad al estrés oxidativo, *C. elegans* permite la evaluación de diversos procesos como la capacidad de equilibrio, desintoxicación de especies reactivas de oxígeno, reparación de daños producidos con diversos ensayos en varios estadios y con múltiples técnicas (72, 73). Los principales

tipos de ensayo miden el agente al cual se encuentran expuestos, el tiempo/tasa de exposición ya sea aguda o crónica y el tejido/órgano/compartimiento celular afectado, por ejemplo, el caso más común son las mitocondrias (74)

Todo lo anterior permite concluir que para trabajar con el nematodo no se requieren de los más sofisticados insumos, con él puede realizarse investigación básica, permitiendo desglosar valiosos resultados y llegar a muy concretas aproximaciones útiles en varios campos como el de la toxicología ambiental.

1.4 Aplicación en toxicología

Las sustancias químicas usadas en la optimización de procesos industriales y en la innovación de productos, ya sea de uso comercial o doméstico, presentan un impacto en el medio ambiente, las características inherentes de los ecosistemas y la vida silvestre. Adicionalmente, la mayoría de estos compuestos presentan tendencia a la persistencia y bioacumulación en la naturaleza (cuerpos hídricos y suelos) y en los seres vivos. En el caso de los seres humanos la bioacumulación se presenta en tejidos y órganos, donde se generan efectos adversos alterando el sistema endocrino, sistema reproductor y sistema nervioso (75-79).

Los modelos de tipo biológico permiten evidenciar los efectos a la exposición aguda o crónica a diversos compuestos, *C. elegans* se destaca por permitir identificar alteraciones de forma rápida, concreta y fácil en el marco de la fisiología de un organismo completo en diferentes etapas de desarrollo, lo cual facilita la observación por sistemas y órganos como el sistema nervioso y el sistema reproductor (Figura 9) (80).

Este nematodo es muy útil en ensayos predictivos de toxicología, por ejemplo, posee un sistema inmunológico innato bien establecido que permite evaluar los efectos de sustancias tóxicas como los metales pesados (mercurio inorgánico y el metilmercurio) (81, 82). Adicionalmente, la función mitocondrial se encuentra caracterizada y en diversos estudios ha mostrado utilidad; por ejemplo, para determinar el efecto del arsénico inorgánico y otros efectos asociados a alteraciones

en la función mitocondrial (6, 83). También es relevante mencionar que gracias a la constante investigación sobre este nematodo se ha logrado establecer la toxicocinética de contaminantes ambientales como nanopartículas, cisplatino, clorpirifos y fenantreno (6), algunos ejemplos se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2 Evaluación de toxicidad por contaminantes ambientales

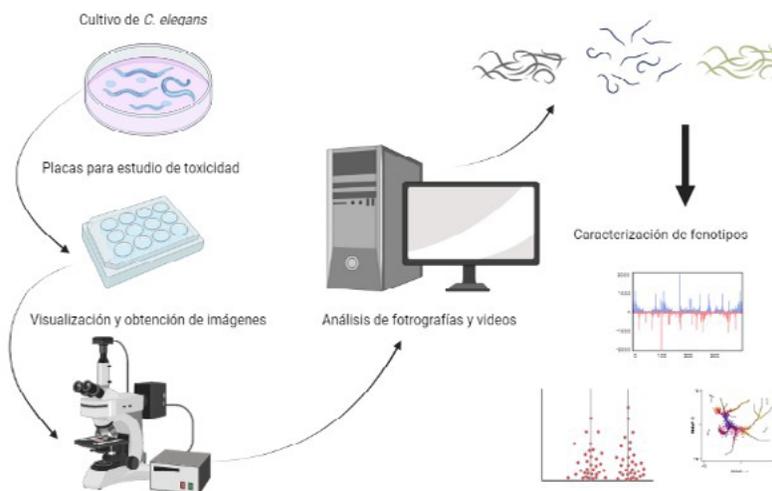
CONTAMINANTE	PRINCIPALES OBSERVACIONES
Exposición a sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y ácido perfluorooctanoico (PFOA)	La exposición a PFOS y PFOA causó toxicidad reproductiva en los nematodos machos: reducción del número de células germinales, el tamaño y la motilidad de los espermátides y un aumento en la tasa de malformación de los espermatozoides (84).
Mezclas de plaguicidas: carbamatos (CM) y plaguicidas organofosforados (OP)	Efectos inhibitorios sobre el comportamiento de locomoción de <i>C. elegans</i> (69).
Exposición a cinco tipos comunes de microplásticos: poliamidas (PA), polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC) y partículas de poliestireno (PS)	Letalidad inducida por partículas microplásticas, disfunción reproductiva, reducción de los niveles de calcio intestinal y el aumento de la expresión del gen del estrés oxidativo <i>gst-4</i> (85). La toxicidad de los microplásticos depende de su tamaño (86).
Evaluación de metales pesados en suelo y sedimentos	La exposición generó inhibición de la tasa de supervivencia y crecimiento de <i>C. elegans</i> (87). Aumento de la expresión génica y actividad enzimática relacionada con el estrés oxidativo (87).

CONTAMINANTE	PRINCIPALES OBSERVACIONES
Exposición conjunta de nanopartículas - clordano y hexaclorociclohexano (HCH)	Efectos de letalidad, inhibición del crecimiento y reducción de la vida útil (88).
Exposición a tolueno (volátil)	Letalidad y retrasos significativos en el desarrollo dependiente de la concentración (89). Mayor incidencia de eventos apoptóticos en las células de la línea germinal (89). Cambios de comportamiento reflejados en los movimientos de natación y locomoción radial (89).

Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, los estudios de toxicidad pueden ir dirigidos a identificar efectos en procesos metabólicos en *C. elegans*, siendo útil en la determinación de intoxicación aguda *In Vivo* por compuestos químicos y contaminantes ambientales, adicionalmente es posible establecer de forma adecuada Dosis Letal 50 % (DL50) y Tiempo Letal 50 % (TL 50 %) mediante el uso de softwares especializados (figura 9) (2).

Figura 9. Diseño general de métodos para trabajar con *C. elegans* en el campo de la toxicología ambiental



Nota: Cultivo de nematodos, puede ser en medio sólido/líquido NGM o en placas con diferentes muestras contaminadas, productos químicos y tomar video para cada pocillo. Procesamiento de imágenes/videos con el fin de cuantificar los fenotipos de los nematodos bajo exposición a las muestras de tipo ambiental, basándose en estos fenotipos cuantificados de los nematodos inferir y caracterizar los efectos de las muestras evaluadas.

Fuente: Elaboración propia.

1.4.1 Ventajas de usar *C. elegans* en toxicología

Al poseer un ciclo de vida corto, *C. elegans* permite identificar las alteraciones en cada una de las etapas de desarrollo y de las que trascienden entre generaciones, lo cual en modelos más complejos representaría aumento de costos, mano de obra y tiempo (6).

La posibilidad de mantener a *C. elegans* en condiciones de laboratorio tanto en medios sólidos como en medios líquidos, permite gran variedad de ensayos toxicológicos, tales como: neurotoxicidad, toxicidad conductual, toxicidad de nanopartículas, reproducción, inductores de hsp-60 mitocondrial e inhibidores de SKN-1 (homólogo de NRF-2) (6).

Por otra parte, su genoma completamente secuenciado con un 60-80% de homología con el ser humano y la posibilidad de contar con un banco (*Caenorhabditis elegans* Natural Diversity Resource (CeNDR)) de cepas silvestres encontradas a nivel mundial, permiten el constante estudio genómico y molecular, lo cual se constituye en un aporte relevante para el ámbito de la toxicología molecular (6). Adicionalmente, en Minnesota existe el *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC) donde se encuentran cepas mutantes y transgénicas estables y son enviadas a otras naciones por un bajo costo para la investigación en muchas áreas.

El avance en herramientas genéticas ha permitido incursionar en el campo de la epigenética ambiental; por ejemplo, actualmente se cuenta con una Biblioteca de ARN de interferencia, lo cual ha maximizado la investigación de la interacción gen-ambiente en *C. elegans* (6). Cabe mencionar que la gran variedad de cepas transgénicas estables permite la experimentación desde ensayos básicos con GFP hasta los de más alta complejidad como análisis genómico, metabólico y proteómico. Hay que resaltar que *C. elegans* es un organismo que permite la edición genética con herramientas como CRISPR cas-9 (90, 91), permitiendo el análisis *In Vivo* de rasgos fenotípicos, morfológicos y genómicos (Figura 10) (6).

Al ser de anatomía transparente permite detectar cambios morfológicos a simple vista. Los estudios han demostrado que este nematodo tiene una utilidad comparable a la de los vertebrados, ya que permite predecir efectos de sustancias tóxicas debido a sus objetivos moleculares y vías de señalización conservadas en seres superiores como los humanos (6).

Por otra parte, *C. elegans* permite el estudio de la neurotoxicología por sus versátiles características como un genoma completamente secuenciado, transgénicos con genes reporteros como GFP, cuerpo transparente, corto ciclo de vida, fácil mantenimiento y manipulación. Adicionalmente, *C. elegans* cuenta con 8 neuronas DAérgicas: dos neuronas deiridas anteriores, cuatro cefálicas y dos neuronas deiridas posteriores, lo que hace posible la investigación *in situ* de la vulnerabilidad de las neuronas DAérgicas (92).

Es importante destacar que *C. elegans* es útil como modelo para el monitoreo de metales, pesticidas y herbicidas con tecnologías que permiten apreciar la composición de biomoléculas, desde cambios fenotípicos como la estereoscopia Raman, la cual junto con análisis multivariado permiten detectar la respuesta que tiene un organismo completo frente a sustancias químicas, además de identificar los umbrales de los efectos tóxicos (7).

Figura 10. Esquema que representa las fortalezas de *C. elegans* para su uso en el ámbito de la toxicología ambiental

Caenorhabditis elegans



Regulación transcripcional altamente conservada



Ciclo de vida corto

El cuerpo transparente permite la obtención de imágenes de una sola célula

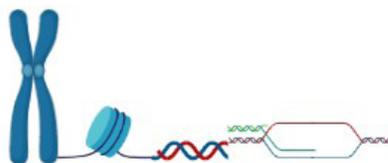
Linaje celular invariante y completamente mapeado



Células germinales accesibles



Epigenética ambiental



Orígenes del desarrollo de la salud y la enfermedad

Homogeneidad tisular



Vías de transcripción en tiempo real



Línea germinal / epigenética transgeneracional

Respuestas epigenéticas basadas en la población



Nota: Al lado izquierdo se observan las características de *C. elegans* al lado derecho sus aportes para los estudios de epigenética ambiental como fortalezas.

Fuente: Elaboración propia.

1.4.2 Limitaciones de *C. elegans* en toxicología ambiental

A pesar de que *C. elegans* representa una plataforma para múltiples estudios, como otros organismos biológicos, también presenta una serie de limitaciones. En primera instancia esta su anatomía, pues carece de células (sanguíneas e inmunológicas), órganos (como los pulmones) y sistema inmunológico adaptativo. No hay presencia de procesos como el transporte de sangre, paso a barrera hematoencefálica, metabolismo en hígado y filtración en el riñón (6). Se describen otras limitaciones a continuación:

- No permite la evaluación de un órgano intacto completo, únicamente de vías metabólicas y de señalización.
- A pesar de que la toxicología aguda en *C. elegans* es comparable a la de seres superiores, parámetros toxicocinéticos y toxicodinámicos no pueden ser evaluados en una totalidad sistémica.
- Alteración en la sensibilidad a compuestos químicos, debido a la cutícula que compone al nematodo y los huevos, pues estas barreras poseen un adecuado equilibrio osmolar y excreción de compuestos.
- Todavía las rutas de exposición a químicos no son completamente claras, se sugieren vías de ingestión y transdérmicas.
- Variación genética y bioquímica en la regulación de la actividad enzimática, como por ejemplo el citocromo P450, en comparación con seres superiores, *C. elegans* posee un complemento más grande de genes que regulan el funcionamiento de citocromo P450; caso similar ha sido evidenciado con el receptor de hormonas nucleares (*nhr*) y genes Fbox.

Finalmente, es de aclarar que las condiciones de cultivo en el laboratorio influyen en los resultados de cada ensayo, ya que afectan de forma directa el metabolismo, el comportamiento y los fenotipos de resistencia al estrés del organismo (6). Sin embargo, esto no ha representado un impedimento para continuar investigando a profundidad con este poderoso modelo.

1.4.3 La novedad en el estudio de la epigenética ambiental

La epigenética ambiental se define como influencia ambiental en el epigenoma, *C. elegans* es un modelo apto para identificar la regulación transcripcional a partir de estímulos exógenos – factores ambientales estresantes (6); se ha demostrado que es un organismo respondedor ante parámetros ambientales como: variaciones osmolares, ausencia de alimento (periodos de inanición), fluctuaciones de temperatura y presencia de sustancias tóxicas como contaminantes químicos en todas sus presentaciones incluyendo nanopartículas (6).

Desde el 2005 se han establecido varios hallazgos de relevancia en este ámbito, ha sido posible distinguir el epigenoma de la línea germinal respecto del que pertenece a células somáticas en *C. elegans*, asimismo, se ha demostrado la herencia transgeneracional de las respuestas a estímulos ambientales en el nematodo. Básicamente la investigación se ha centrado en el desarrollo de la enfermedad frente a la exposición a diferentes estados larvarios, los diseños de exposición más conocidos han sido:

- a. Exposición del desarrollo somático a menudo durante el desarrollo larvario, por ejemplo en el año 2017 Rudgalvyte y colaboradores expusieron a *C. elegans* durante todo su desarrollo larvario a metilmercurio, evidenciando un aumento en el gen de la proteína relacionada con la lipocalina *lpr-5* y el gen del colágeno cuticular *dpy-7*, los cuales desarrollan la cutícula externa que representa una barrera ante agresiones químicas, y se estableció como un mecanismo de defensa epigenético ante la exposición a metilmercurio (6).
- b. Efectos multigeneracionales de la exposición, consiste en la exposición de larvas en estado de gravidez, en el trasfondo lo que se desea es estimular no solo a la larva adulta, sino también a los embriones y a la línea germinal dentro de los embriones (6). Por ejemplo, en 2016 Schultz y colaboradores expusieron 10 generaciones a iones de plata y nanopartículas de plata, observando una disminución en la esperanza de vida y toxicidad reproductiva desde la primera generación hasta la décima, caracterizándose

por una disminución de los efectos a medida que se pasaba de generación (6).

- c. Efectos transgeneracionales de la exposición, consiste en exponer una determinada generación y analizar una generación posterior que no estuviese expuesta ni directa e indirectamente. Este tipo de análisis se facilita en *C. elegans*, debido a su corto tiempo de generación y ciclo de vida que tarda semanas, mientras que en otros modelos podría tardar meses hasta años. Por ejemplo, en el año 2014 Taki y colaboradores identificaron la expresión de microARN durante la exposición a nicotina, observándose la expresión diferencial de 40 microARN de los cuales 37 se relacionaron con una alta exposición y 3 a una baja exposición a la nicotina. Los microARN identificados se relacionaron con procesos metabólicos, neuronales y conductuales, adicionalmente cerca de 14 microARN mostraron expresión diferencial en más de una generación, es decir que, el efecto a la exposición de nicotina fue transgeneracional (6, 93).

La proyección a futuro es que la mayoría de estudios de toxicología ambiental determinen los efectos transgeneracionales y los mecanismos de herencia (histonas y ARN) de los efectos causados por los compuestos químicos, con el fin de establecer una relación entre la exposición ambiental efectuada y las alteraciones epigenéticas. La limitación en epigenética ambiental más relevante es la dificultad de extrapolar en el contexto de otros modelos o seres superiores las dosis farmacocinéticas/farmacodinamias (6).

1.4.4 Ventajas del uso de *C. elegans* en epigenética

La respuesta epigénética a estímulos ambientales, ha cobrado relevancia en la investigación de los últimos años, los investigadores han hallado en *C. elegans* la posibilidad de dirigir la regulación transcripcional por medio de técnicas moleculares como ARN de interferencia, logrando destinos celulares específicos, lo cual es fundamental en los experimentos de epigenética. Así también, el linaje celular invariante y mapeado asegura un análisis trazable en el mismo número de células ya sea de un tejido específico o en el organismo completo (6).

A continuación, se describen las características de *C. elegans* en el estudio de epigenética:

- *C. elegans* permite evidenciar procesos epigenéticos/epigenómicos en tiempo real, mediante el uso de microscopía avanzada y robusta como la de contraste de interferencia diferencial, que permite la visualización del desarrollo del linaje en embriones individuales. Por medio de microscopía fluorescente confocal se han observado las divisiones nucleares en embriones donde las histonas se encuentran fusionadas con proteínas fluorescentes. También la transparencia del cuerpo del nematodo facilita el estudio de moléculas individuales, procesos bioquímicos y de transcripción junto con ordenamientos de la cromatina en tiempo real.
- La conservación general de la regulación génica y el estudio de la línea germinal en espermatozoides/ovocitos, facilita el estudio de la heredabilidad meiótica de las alteraciones epigenéticas y los fenotipos hereditarios.
- Con la creación del consorcio modENCODE (Model Organism Encyclopedia of DNA Elements) se dio inicio al mapeo genómico de *Drosophila melanogaster* y *C. elegans*, en el cual se incluyeron sitios de unión de factores reguladores, transcripciones de ARNm, orígenes de la replicación del ADN y modificaciones de cromatina postraduccionales (6). Esto ha permitido evidenciar la conservación entre especies de parámetros genético-moleculares como la transcripción, el procesamiento del ARN co-transcripcional y los estados de la cromatina (6). En cuanto al control epigenético de la regulación génica en invertebrados *C. elegans* ha mostrado relevancia en la identificación y caracterización de una histona desmetilasa. Sin embargo, dentro de las limitaciones de *C. elegans* en el ámbito de la epigenética, el nemátodo carece de procesos de metilación del ADN y no utiliza una regulación transcripcional de largo alcance (6).

1.5 Conclusión

Actualmente los avances tecnológicos han permitido observar lo que antes era imperceptible, sin embargo, ha sido la naturaleza la que ha brindado la mayor herramienta de estudio y son los modelos biológicos como *C. elegans*. Este nematodo demuestra la complejidad de la vida y de la evolución, entre más se estudia, más se descubre, no ofrece un límite de conocimiento, a tal punto que hoy es posible hablar del estudio de la epigenética ambiental y genotoxicidad en un organismo completo, permitiendo llegar a deducciones más precisas de lo que sucede en la biosfera, además de los efectos y la huella de cada acción impuesta por el hombre.

Referencias Bibliográficas

1. Consortium CeS. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 1998; 282 (5396): 2012-8.
2. Gao S, Chen W, Zeng Y, Jing H, Zhang N, Flavel M, et al. Classification and prediction of toxicity of chemicals using an automated phenotypic profiling of *Caenorhabditis elegans*. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2018; 19(1): 18.
3. Maupas E. Modes et formes de reproduction des nématodes. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*. 1900; 8: 463-624.
4. Frezal L, Felix MA. *C. elegans* outside the Petri dish. *Elife*. 2015; 4.
5. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2015; 200(2): 387-407.
6. Weinhouse C, Truong L, Meyer JN, Allard P. *Caenorhabditis elegans* as an emerging model system in environmental epigenetics. *Environ Mol Mutagen*. 2018; 59(7): 560-75.
7. Mugova F, Read DS, Riding MJ, Martin FL, Tyne W, Svendsen C, et al. Phenotypic responses in *Caenorhabditis elegans* following chronic low-level exposures to inorganic and organic compounds. *Environ Toxicol Chem*. 2018; 37(3): 920-30.

8. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974; 77(1): 71-94.
9. Dusenbery DB, Sheridan RE, Russell RL. Chemotaxis-defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1975; 80(2): 297-309.
10. MacLeod AR, Waterston RH, Fishpool RM, Brenner S. Identification of the structural gene for a myosin heavy-chain in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of molecular biology*. 1977; 114(1): 133-40.
11. Kimble JE, White JG. On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*. 1981; 81(2): 208-19.
12. Kimble J, Crittenden SL. Germline proliferation and its control. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2005: 1-14.
13. Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*. 1977; 56(1): 110-56.
14. Kimble J, Hirsh D. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*. 1979; 70(2): 396-417.
15. Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*. 1983; 100(1): 64-119.
16. Hedgecock EM, Sulston JE, Thomson JN. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1983; 220(4603): 1277-9.
17. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. 1986; 44(6): 817-29.
18. Yuan J, Horvitz HR. The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development*. 1992; 116(2): 309-20.

19. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 1993; 75(4): 641-52.
20. Conradt B, Xue D. Programmed cell death. *WormBook: the online review of C elegans biology*. 2005: 1-13.
21. White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1986; 314(1165): 1-340.
22. Jarrell TA, Wang Y, Bloniarz AE, Brittin CA, Xu M, Thomson JN, et al. The connectome of a decision-making neural network. *Science*. 2012; 337(6093): 437-44.
23. White JG. Getting into the mind of a worm—a personal view. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2013: 1-10.
24. Priess JR, Schnabel H, Schnabel R. The *glp-1* locus and cellular interactions in early *C. elegans* embryos. *Cell*. 1987; 51(4): 601-11.
25. Priess JR. Notch signaling in the *C. elegans* embryo. *WormBook: the online review of C elegans biology*. 2005: 1-16.
26. Beitel GJ, Clark SG, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* *ras* gene *let-60* acts as a switch in the pathway of vulval induction. *Nature*. 1990; 348(6301): 503-9.
27. Han M, Sternberg PW. *let-60*, a gene that specifies cell fates during *C. elegans* vulval induction, encodes a *ras* protein. *Cell*. 1990; 63(5): 921-31.
28. Sternberg PW. Vulval development. *WormBook: the online review of C elegans biology*. 2005: 1-28.
29. Sundaram MV. Canonical RTK-Ras-ERK signaling and related alternative pathways. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2013: 1-38.
30. Friedman DB, Johnson TE. A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics*. 1988; 118(1): 75-86.

31. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. 1993; 366(6454): 461-4.
32. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1997; 277(5328): 942-6.
33. Collins JJ, Huang C, Hughes S, Kornfeld K. The measurement and analysis of age-related changes in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2008: 1-21.
34. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5) 843-54.
35. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993; 75(5): 855-62.
36. Vella MC, Slack FJ. *C. elegans* microRNAs. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2005: 1-9.
37. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994; 263(5148): 802-5.
38. Boulin T, Etchberger JF, Hobert O. Reporter gene fusions. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2006:1-23.
39. Schwarz EM. Genomic classification of protein-coding gene families. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2005: 1-23.
40. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391(6669): 806-11.
41. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000; 408(6808): 86-9.

42. Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*. 2000; 408(6810): 325-30.
43. Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol*. 2001; 2(1): RESEARCH0002.
44. Wang L, Eckmann CR, Kadyk LC, Wickens M, Kimble J. A regulatory cytoplasmic poly(A) polymerase in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2002; 419(6904): 312-6.
45. Sonnichsen B, Koski LB, Walsh A, Marschall P, Neumann B, Brehm M, et al. Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2005; 434(7032): 462-9.
46. Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E, Gottschalk A. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Current biology: CB*. 2005; 15(24): 2279-84.
47. Felix MA, Ashe A, Piffaretti J, Wu G, Nuez I, Belicard T, et al. Natural and experimental infection of *Caenorhabditis* nematodes by novel viruses related to nodaviruses. *PLoS Biol*. 2011;9(1):e1000586.
48. Li WH, Ju YR, Liao CM, Liao VH. Assessment of selenium toxicity on the life cycle of *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology*. 2014; 23(7): 1245-53.
49. Eom HJ, Roca CP, Roh JY, Chatterjee N, Jeong JS, Shim I, et al. A systems toxicology approach on the mechanism of uptake and toxicity of MWCNT in *Caenorhabditis elegans*. *Chem Biol Interact*. 2015; 239: 153-63.
50. Clavijo A, Kronberg MF, Rossen A, Moya A, Calvo D, Salatino SE, et al. The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. *Sci Total Environ*. 2016; 569-570: 252-61.

51. Fajardo C, Martin M, Nande M, Botias P, Garcia-Cantalejo J, Mengs G, et al. Ecotoxicogenomic analysis of stress induced on *Caenorhabditis elegans* in heavy metal contaminated soil after nZVI treatment. *Chemosphere*. 2020; 254: 126909.
52. Nagar Y, Thakur RS, Parveen T, Patel DK, Ram KR, Satish A. Toxicity assessment of parabens in *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 2020; 246: 125730.
53. Hartman JH, Widmayer SJ, Bergemann CM, King DE, Morton KS, Romersi RF, et al. Xenobiotic metabolism and transport in *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2021; 24(2): 51-94.
54. Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5(5): 387-98.
55. Hayden AN, Leptich EJ, Arey RN. Invited review: Unearthing the mechanisms of age-related neurodegenerative disease using *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2022; 267: 111166.
56. Felix MA, Braendle C. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*. 2010; 20(22): R965-9.
57. Irion U, Nusslein-Volhard C. Developmental genetics with model organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022; 119(30): e2122148119.
58. Androwski RJ, Flatt KM, Schroeder NE. Phenotypic plasticity and remodeling in the stress-induced *Caenorhabditis elegans* dauer. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology*. 2017; 6(5).
59. Teotonio H, Carvalho S, Manoel D, Roque M, Chelo IM. Evolution of outcrossing in experimental populations of *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*. 2012; 7(4): e35811.
60. Pandey R, Sharma M, Saluja D. SIN-3 as a key determinant of lifespan and its sex dependent differential role on healthspan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany NY)*. 2018; 10(12): 3910-37.

61. Petrella LN. Natural variants of *C. elegans* demonstrate defects in both sperm function and oogenesis at elevated temperatures. *PloS one*. 2014; 9(11):e 112377.
62. Wood WB. *The Nematode Caenorhabditis Elegans*: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.
63. Suen KM, Sheard TMD, Lin C-C, Milonaityte D, Jayasinghe I, Ladbury JE. Expansion microscopy reveals subdomains in *C. elegans* germ granules. *bioRxiv*. 2022: 2022.05.29.493872.
64. Yu CJ, Orozco Cosio DM, Boyden ES. ExCel: Super-Resolution Imaging of *C. elegans* with Expansion Microscopy. *Methods Mol Biol*. 2022;2468:141-203.
65. J VANK, Taris KH, Peterman EJG. Imaging adult *C. elegans* live using light-sheet microscopy. *J Microsc*. 2021; 281(3): 214-23.
66. Middendorf PJ, Dusenbery DB. Fluoroacetic Acid Is a Potent and Specific Inhibitor of Reproduction in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Nematol*. 1993; 25(4): 573-7.
67. Dhawan R, Dusenbery DB, Williams PL. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health A*. 1999; 58(7): 451-62.
68. Park HH, Jung Y, Lee SV. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells*. 2017; 40(2): 90-9.
69. Wang Y, Liu SS, Huang P, Wang ZJ, Xu YQ. Assessing the combined toxicity of carbamate mixtures as well as organophosphorus mixtures to *Caenorhabditis elegans* using the locomotion behaviors as endpoints. *Sci Total Environ*. 2021; 760: 143378.
70. Garcia-Espineira M, Tejeda-Benitez L, Olivero-Verbel J. Toxicity of atrazine- and glyphosate-based formulations on *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018; 156: 216-22.
71. Seidenthal M, Vettkotter D, Gottschalk A. WormRuler: A software to track body length used to characterize a super red-shifted channelrhodopsin in *Caenorhabditis elegans*. *MicroPubl Biol*. 2022; 2022.

72. Yenny Y. Lozano, Sara E. Giraldo, Harold S. Castro, Sánchez RM. Plantas con actividad neuroprotectora estudiadas en *C. elegans*. *J Pharm Pharmacogn* 2022; 10(5): 812-36.
73. Gutierrez Sánchez JS, Castro Cárdenas HS, Giraldo Quintero SE, Lozano Jiménez YY, Sánchez Mora RMJÁI. *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio de enfermedades neurodegenerativas. 2020; 5(2): 24-33.
74. Senchuk MM, Dues DJ, Van Raamsdonk JM. Measuring Oxidative Stress in *Caenorhabditis elegans*: Paraquat and Juglone Sensitivity Assays. *Bio Protoc*. 2017; 7(1).
75. Dan L, Wu S, Xu H, Zhang Q, Zhang S, Shi L, et al. Distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in water, sediment and fishes in a shallow Chinese freshwater lake: Implications for ecological and human health risks. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2017; 140: 222-9.
76. Montano L, Pironti C, Pinto G, Ricciardi M, Buono A, Brogna C, et al. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in the Environment: Occupational and Exposure Events, Effects on Human Health and Fertility. *Toxics*. 2022; 10(7).
77. Collin MS, Venkatraman SK, Vijayakumar N, Kanimozhi V, Arbaaz SM, Stacey RGS, et al. Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects on human: A review. *Journal of Hazardous Materials Advances*. 2022;7: 100094.
78. Kothapalli CR. Differential impact of heavy metals on neurotoxicity during development and in aging central nervous system. *Current Opinion in Toxicology*. 2021; 26: 33-8.
79. Yin K, Wang Y, Zhao H, Wang D, Guo M, Mu M, et al. A comparative review of microplastics and nanoplastics: Toxicity hazards on digestive, reproductive and nervous system. *Science of The Total Environment*. 2021; 774: 145758.
80. Behl M, Rice JR, Smith MV, Co CA, Bridge MF, Hsieh JH, et al. Editor's Highlight: Comparative Toxicity of Organophosphate Flame Retardants and Polybrominated Diphenyl Ethers to

- Caenorhabditis elegans. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology. 2016; 154(2): 241-52.
81. McElwee MK, Ho LA, Chou JW, Smith MV, Freedman JH. Comparative toxicogenomic responses of mercuric and methylmercury. BMC Genomics. 2013; 14(1): 698.
 82. Ruszkiewicz JA, Pinkas A, Miah MR, Weitz RL, Lawes MJA, Akinyemi AJ, et al. *C. elegans* as a model in developmental neurotoxicology. Toxicology and Applied Pharmacology. 2018; 354: 126-35.
 83. Camacho J, de Conti A, Pogribny IP, Sprando RL, Hunt PR. Assessment of the effects of organic vs. inorganic arsenic and mercury in *Caenorhabditis elegans*. Curr Res Toxicol. 2022; 3: 100071.
 84. Yin J, Jian Z, Zhu G, Yu X, Pu Y, Yin L, et al. Male reproductive toxicity involved in spermatogenesis induced by perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid in *Caenorhabditis elegans*. Environmental Science and Pollution Research. 2021; 28(2): 1443-53.
 85. Lei L, Wu S, Lu S, Liu M, Song Y, Fu Z, et al. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. Sci Total Environ. 2018;619-620:1-8.
 86. Yu Y, Chen H, Hua X, Dang Y, Han Y, Yu Z, et al. Polystyrene microplastics (PS-MPs) toxicity induced oxidative stress and intestinal injury in nematode *Caenorhabditis elegans*. Sci Total Environ. 2020; 726: 138679.
 87. Li X, Yang Q, Wang L, Song C, Chen L, Zhang J, et al. Using *Caenorhabditis elegans* to assess the ecological health risks of heavy metals in soil and sediments around Dabaoshan Mine, China. Environ Sci Pollut Res Int. 2022; 29(11): 16332-45.
 88. Li X, Hu J, Qiu R, Zhang X, Chen Y, He D. Joint toxic effects of polystyrene nanoparticles and organochlorine pesticides (chlordane and hexachlorocyclohexane) on *Caenorhabditis elegans*. Environmental Science: Nano. 2020; 7(10): 3062-73.

89. Soares MV, Charao MF, Jacques MT, Dos Santos ALA, Luchese C, Pinton S, et al. Airborne toluene exposure causes germline apoptosis and neuronal damage that promotes neurobehavioural changes in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Pollut*. 2020; 256: 113406.
90. Du X, McManus DP, French JD, Jones MK, You H. CRISPR/Cas9: A new tool for the study and control of helminth parasites. *Bioessays*. 2021; 43(1): e2000185.
91. Vicencio J, Ceron J. A Living Organism in your CRISPR Toolbox: *Caenorhabditis elegans* Is a Rapid and Efficient Model for Developing CRISPR-Cas Technologies. *CRISPR J*. 2021; 4(1): 32-42.
92. Lu M, Li H, Li Y, Lu Y, Wang H, Wang X. Exploring the Toxicology of Depleted Uranium with *Caenorhabditis elegans*. *ACS Omega*. 2020; 5(21): 12119-25.
93. Taki FA, Pan X, Zhang B. Chronic nicotine exposure systemically alters microRNA expression profiles during post-embryonic stages in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Physiol*. 2014; 229(1): 79-89.

CAPÍTULO 2

Danio rerio en el estudio de Toxicología Ambiental

Dayana Rodríguez Morales
Ruth Mélida Sánchez Mora

El Pez Cebra, Zebra Fish anteriormente conocido como *Brachydanio rerio* (*B. rerio*) y actualmente como *Danio rerio* (*D. rerio*) es un pez tropical de agua dulce, de origen Asiático, ubicado específicamente en India. Primariamente era común tenerlo como pez de acuario, sin embargo, en la actualidad se considera un organismo modelo prometedora en el campo de la genética del desarrollo y la ecotoxicología (1-4). A lo largo de este capítulo se describe a *D. rerio* desde un punto histórico, siguiendo con la perspectiva general y finalizando en el ámbito específico del modelo y su aplicabilidad en la toxicología ambiental.

2.1 Historia

Aunque en muchas investigaciones se establece que el pionero en el pez cebra es George Streisinger a principios de los años 80's, hay publicaciones que incluyen este pez desde el año 1952 en donde *D. rerio* fue expuesto a diferentes sustancias como el sulfato de zinc, 2-acetilaminofluoreno, uretano, ácido barbitúrico y dietilbarbitúrico, N-acetilhistidina, dietilnitrosamina, etanol y antes de los años 1970, también prevalecen estudios de embriogenesis, nervios ópticos y tumores en el pez (5-17).

George Streisinger realizó estudios con el Pez Cebra desde 1980 y existen publicaciones a su nombre hasta 1992, a él se le atribuyen la gran mayoría de avances con *D. rerio* a nivel genético ya que fue él quien lo propuso como modelo biológico de investigación. Desde entonces, este modelo es usado para tal fin y hoy en día proporciona un gran número de información científica (3, 18-27).

El primer nombre de este pez fue *Brachydanio rerio*, sin embargo, en 1993 tras diversas investigaciones y la Reunión de Pez Cebra de ese año, la cual se llevó a cabo en el Laboratorio de Cold Spring Harbor, sugirieron que debería usarse el nombre científico *D. rerio* que es como lo conocemos actualmente (19, 28).

Para los años 1995 y 1996, diversos investigadores usaron al pez cebra para llevar a cabo estudios iniciales a nivel genético, identificando genes críticamente involucrados en el desarrollo de varios sistemas y órganos como el sistema nervioso y el encéfalo, el sistema reproductor y la embriogénesis, el sistema digestivo y sus órganos y el sistema cardiovascular junto con células hematopoyéticas del pez (29-37).

En 1997 fue publicado un estudio de Allizard F. y colaboradores donde buscaban saber si las escamas de Pez Cebra eran útiles como modelo para investigaciones sobre los procesos del desarrollo del esqueleto dérmico (38). A finales de la década de 1990 se estableció un centro genético para el mantenimiento y distribución de líneas de Pez Cebra mutantes, conocido como Zebrafish International Resource Center (ZIRC), donde se han desarrollado desde entonces nuevos modelos transgénicos y de tipo salvaje. Para esta misma época se creó el recurso en línea "<http://zfin.org>" The Zebrafish Information Network (ZFIN), en este se obtienen datos e información sobre la genética, las publicaciones y los laboratorios del pez cebra (19, 39). Finalmente en 1999 Metscher B. y Ahlberg P. contribuyeron con la comprensión evolutiva del pez y al mismo tiempo Takeda H, establecieron un protocolo para el establecimiento de *D. rerio* (40, 41).

Ya para el 2000, Wixon J. realiza una revisión general de lo que se sabía al momento sobre el pez, direcciona los estudios futuros de la genómica de *D. rerio* y simultáneamente se propone como modelo

para enfermedades humanas (42, 43). En este mismo año, *D. rerio* se utilizó para detectar teratógenos, comprender e identificar los mecanismos de acción de tóxicos comunes y establecer la especificidad tóxica tisular en vertebrados (18, 44-46).

Para el 2001, se destaca una investigación sobre la toxicocinética de la atrazina en embriones de pez cebra y junto al siguiente año se realizan diversas investigaciones abarcando diferentes temas en los que se destacan estudios sobre el sistema reproductor de *D. rerio* (47-50). De manera continua en el año 2003 se demuestra una vez más que efectivamente el modelo es útil para estudios toxicológicos y genéticos, a su vez se resalta su valor para modelar enfermedades de vertebrados (49, 51, 52).

Entre tantas de las investigaciones y temas abordados durante los siguientes 3 años hematoencefálica hematoencefálica, en este capítulo queremos destacar los estudios que comprenden los mecanismos de desarrollo y comportamiento de *D. rerio* tal y como lo exponen los autores de los artículos a continuación citados (53-56). En el 2007, los estudios anteriormente realizados permiten usar de manera más clara el modelo en el ámbito toxicológico, como lo expresan Bretaud S. y colaboradores en su estudio con morfina y Yang L. et al. y su investigación en el campo toxicogénico (57, 58).

A nivel ambiental en los años 2008 y 2009 sobresalen los estudios relacionados con toxicología reproductiva en *D. rerio*, el uso del modelo pez cebra en la evaluación de riesgos ambientales y el transporte del arsénico dentro del animal a través de acuagliceroporinas (59-61). Durante el 2010 al 2015 el campo de la toxicología generó un gran impacto, es por ello que en diversas investigaciones se propuso al pez cebra como modelo para evaluar y determinar la susceptibilidad a fármacos, biomarcadores, ototoxicos, hepatotoxicos, oculotóxicos, entre otros. (62-71).

Entre las diversas aplicaciones que existen con el modelo *D. rerio*, y todo lo que se ha mencionado a lo largo de esta historia (tabla 2), se añade que durante la última década así como lo que lleva este año, en el ámbito ecotoxicológico el pez cebra se ha utilizado para

el monitoreo a través de técnicas avanzadas y moleculares, las cuales han podido ser aplicadas en el pez sin presentar mayor complicación (18, 72-96).

Tabla 3. Línea de tiempo *D. rerio*. Hitos históricos importantes y relacionados con genética y ecotoxicología

TABLA	SUCESO
1952 - 1979	<i>Brachydanio rerio</i> (<i>D. rerio</i>) es expuesto a diversas sustancias y se evalúa su comportamiento, al mismo tiempo se desarrollan estudios de embriogénesis, nervios ópticos y tumores (5-15).
1980 - 1992	George Streisinger es considerado como el pionero en usar a Pez Cebra como modelo y contribuye a la comprensión y genética de <i>B. rerio</i> o <i>D. rerio</i> , Aparecen nuevas publicaciones utilizando el modelo (20-27).
1993	Se deja de usar el nombre de <i>Brachydanio rerio</i> el cual es cambiado por <i>Danio rerio</i> (28).
1995 - 1996	Son identificados los genes involucrados en el desarrollo morfológico y anatómico del pez cebra (29-36).
1997	Se propone <i>D. rerio</i> como modelo del desarrollo del esqueleto dérmico (38).
1998 - 1999	Se Funda el Zebrafish International Resource Center (ZIRC), The Zebrafish Information Network (ZFIN) y se logra la comprensión evolutiva del pez, así como también se establece el protocolo para el mantenimiento del <i>D. rerio</i> (40-41).
2000	El pez cebra se propone como modelo para enfermedades humanas y se usa para detectar teratógenos y comprender los mecanismos de acción de tóxicos comunes (42-45).
2001 - 2002	Se usa a <i>D. rerio</i> para modelar la toxicocinética de la atrazina en embriones y al mismo tiempo se avanza sobre la comprensión del sistema reproductor (47,48, 50).
2003	Se demuestra que el modelo pez cebra es útil para estudios toxicológicos y genéticos debido a sus ortólogos con vertebrados (49-52).

TABLA	SUCESO
2004 - 2006	Se describen los mecanismos de desarrollo y comportamiento de <i>D. rerio</i> (53-56).
2007	<i>D. rerio</i> es propuesto como modelo toxicogenómico. (57-58).
2008 - 2009	Se establece el modelo <i>D. rerio</i> en la toxicología reproductiva, también se usa para la valuación de riesgos ambientales y el metabolismo de arsénico por las acuagliceroporinas del pez (59-62).
2010 - 2015	Se propone a <i>D. rerio</i> como modelo para evaluar fármacos, biomarcadores, ototóxicos, hepatotóxicos, oculotóxicos (62-71).
2016 - 2021	A nivel ambiental <i>D. rerio</i> es usado para modelar estudios de Biomonitorio (73-86).
2022	<i>D. rerio</i> ha permitido evaluar los efectos tóxicos de los microplásticos de poliestireno, pesticidas como phoxim y deltamethrin y sustancias polifluoroalquiladas (94-97).

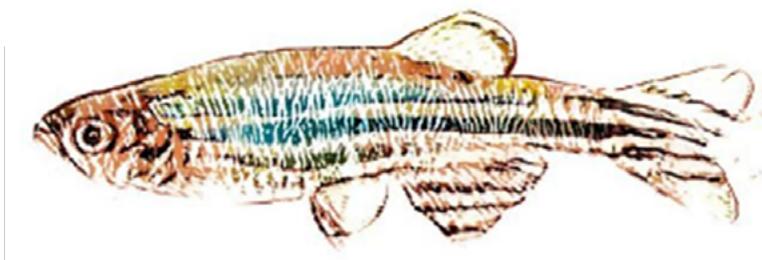
Fuente: Elaboración propia.

2.2 Generalidades del modelo

El pez cebra pertenece al reino Animalia, clase Teleostei, orden Cypriniformes familia Cyprinidae, género *Danio*, especie *rerio* por tanto es conocido como *D. rerio*, sin embargo, en la literatura es posible encontrarlo también como; *Cyprinus rerio*, *Brachydanio rerio*, *Danio frankei*, leopardo danio, cebra danio, pez cebra o pez leopardo (figura 11). Este animal es originario de los ríos de agua dulce ubicados en la India, distribuido ampliamente en Bangladesh, Nepal, Nyanmar y Pakistán (1, 85-87).

Figura 11. Clasificación taxonómica de *D. rerio*

<i>Danio rerio</i>	
Reino	<i>Animalia</i>
Orden	<i>Teleostei</i>
Clase	<i>Cypriniformes</i>
Familia	<i>Cyprinidae</i>
Genero	<i>Danio</i>
Especie	<i>rerio</i>



Nota: En la parte superior se observa la clasificación taxonómica del pez, en la parte inferior una ilustración aproximada.

Fuente: Elaboración propia.

Su hábitat común son aguas cálidas, sin embargo, este pez puede sobrevivir entre 25 a 37° C. *D. rerio* es un animal sociable y omnívoro, es común hallarlo en acuarios como mascota ya que su adquisición es demasiado fácil, debido a que tiene una alta capacidad de reproducción, por lo que no posee riesgo de extinción ni es una especie protegida (3, 39, 87).

El desarrollo embrionario y larval del pez cebra sucede de manera externa y se completa desde la fertilización hasta la adultez durante tres meses llegando a medir de 2 a 5 cm de largo y en las primeras etapas de vida, embrionaria y larval *D. rerio* es transparente. Su genoma tiene una homología del 70% con el ser humano y en cuanto a enfermedades se asocia en un 82% (2, 87).

2.2.1 Ciclo de vida

Para llevar a cabo la reproducción *D. rerio* se aparea en horas de la mañana, tanto en su hábitat natural como en el laboratorio, aunque en algunos casos la liberación de huevos puede suceder en horas de la tarde. El proceso de cotejo dura aproximadamente 30 minutos, pero en algunos casos se extiende hasta una hora. En algunos casos las hembras alejan a los machos agresivamente cuando ellas perciben que el acercamiento es desfavorable, puesto que el pez macho y la hembra tienen comportamientos de apareamiento muy diferentes, los cuales veremos a continuación (4).

Por un lado, el macho persigue a la hembra con el fin de tener un contacto con ella usando su nariz y su cola, posteriormente, el macho la rodea con movimientos rápidos en forma de zig-zag sin perder el contacto. Por otra parte, la hembra inicia acercándose al varón, nadando junto a los machos, permaneciendo quieta cuando él la persigue o deteniéndose frente a él. Ellas usualmente nadan hacia un sitio seguro de forma repetida donde desean realizar el desove o puesta de huevos (4).

Luego de que ambos tienen estos comportamientos de forma continua, los machos extienden sus aletas caudal y dorsal en torno a ellas con el fin de alinear sus poros genitales y simultáneamente liberan espermatozoides, al mismo tiempo estimulan a la hembra para que suceda el desove y se lleve a cabo el encuentro del óvulo y el espermatozoide. La puesta de huevos sucede frecuentemente cada 6 días y como característica principal, los huevos del pez cebrado son translúcidos, se dice que son más grandes (7 mm de diámetro) en comparación a otros peces similares, cabe resaltar que una sola pareja de *D. rerio* genera hasta 200 huevos en un solo apareamiento. (3, 4, 87).

La luz, el volumen de agua, la temperatura, el pH, y condiciones que proporcionan un hábitat natural, es decir aquellos que tengan plantas y sustratos acuáticos, son necesarios para que a *D. rerio* no se le vea afectado su rendimiento reproductivo. El peso ideal del pez para una efectiva reproducción es de 0,50 g a 0,70 g para hembras y para machos hasta de 0,95 g. Lo anterior se consigue a través de la alimentación rica en nutrientes ya que este es omnívoro y come entre una o

dos veces al día, más adelante se expondrán algunos de los alimentos frecuentes de *D. rerio* a nivel natural o para criadero y sus características morfológicas externas (4).

El desarrollo temprano del pez cebrá ocurre entre las primeras 48 y 72 horas luego de la fecundación, donde la mayoría de los órganos ya casi están formados exceptuando el tracto gastrointestinal. Para las 72 horas el hígado, el páncreas y el intestino se encuentran completamente desarrollados, pero el tracto gastrointestinal se completa hasta las 96 horas.

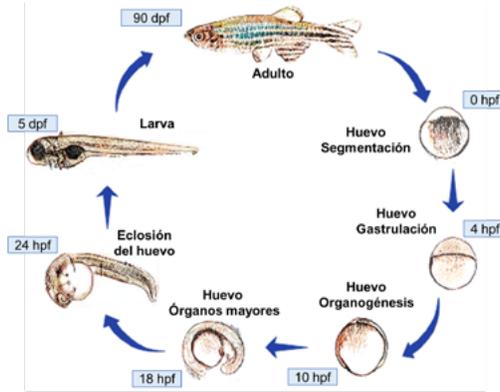
Simultáneamente durante los primeros 5 días de vida se desarrolla el sistema endocrino. El pez alcanza la madurez reproductiva dentro de los 3 a 6 meses posteriores a la fertilización, logrando un tamaño máximo de 5 centímetros de largo (2, 3).

D. rerio cursa por tres cambios morfológicos durante su desarrollo, huevo, larva y pez adulto. En la figura (Figura 12) se describe su tiempo de desarrollo, morfogénesis y procedimientos embrionarios importantes durante toda su etapa de vida, la cual se completa 90 días luego de la fecundación.

2.2.2 Anatomía

El pescado *D. rerio* al ser un modelo biológico desarrollado tiene características bien definidas como sistema inmunológico, nervioso, reproductor, endocrino y digestivo, lo que permite que tenga órganos estructurales y funcione como modelo de enfermedades humanas (Figura 13), a continuación, se darán a conocer características básicas de cada sistema que posee este pez, haciendo un énfasis especial en la homología con vertebrados superiores y el ser humano (18, 88).

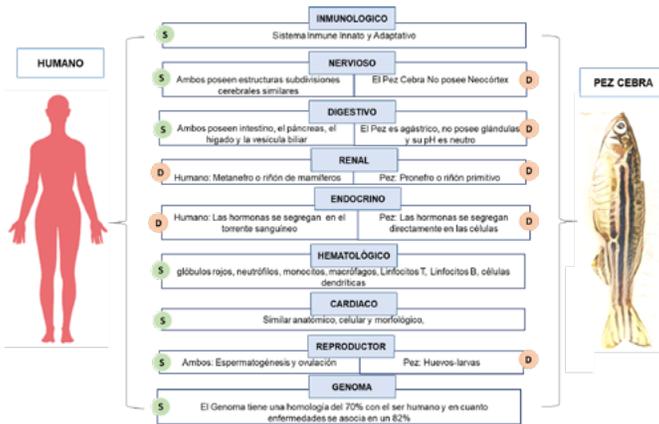
Figura 12. Ciclo de vida de *D. rerio*



Nota: Se observan los 3 cambios morfológicos del pez; huevo, larva y adulto en función de tiempo acompañado de los sucesos embriológicos. (hpf): Horas postfecundación, (dpf): Días postfecundación.

Fuente: Elaboración propia.

Figura 13. Similitudes y diferencias anatómicas entre el humano y el pez cebra



Nota: Al lado izquierdo (humano) se encuentran características anatómicas del hombre que son similares al pez o están ausentes. Al lado derecho (pez cebra) se exponen órganos o características que diferencian con el humano. Los bloques que tienen la letra (S) indican similitud, los bloques con letra (D) indican diferencia.

Fuente: Elaboración propia.

Sistema inmunológico y sistema nervioso

El sistema inmune del pez cebra a nivel innato es altamente conservado, contiene diversos tipos de células y moléculas de señalización, además se sabe que la larva de este animal desarrolla células inmunes innatas alrededor de los dos días posteriores a la fertilización. Por otro lado, en cuanto a la respuesta inmune adaptativa se presenta aproximadamente tres semanas después de la fertilización (88).

El sistema nervioso de *D. rerio* está bien descrito en múltiples etapas de la vida, está distribuido de manera similar al de otros vertebrados, en el momento se sabe que las estructuras principales y subdivisiones cerebrales que porta el pez cebra poseen fuertes asociaciones entre las funciones y regiones del cerebro humano, sin embargo, el pez cebra no cuenta con neocórtex, por lo que no se pueden usar para modelar procesos cognitivos que dependen de esa región (2, 89).

Como modelo, el pez ha contribuido en investigaciones de neurotransmisores receptores y transportadores, como la dopamina, GABA, glutamato, noradrenalina, serotonina, histamina y acetilcolina, por lo que se ha usado para estudiar los mecanismos y la patogenia de los trastornos y enfermedades neurológicos (2, 89).

Sistema digestivo

El sistema digestivo *D. rerio* está formado por el intestino, el páncreas, el hígado y la vesícula biliar que funcionan de manera conservada con mamíferos, no obstante el pez cebra carece de criptas intestinales, células de Paneth, placas de Peyer y una capa submucosa, es decir los músculos lisos se conectan a la capa mucosa directamente. Por otro lado, se sabe que este pez es agástrico, sin embargo, la porción anterior del intestino (bulbo intestinal), posee un lumen agrandado sin glándulas gástricas (pH neutro) donde se almacena el alimento (2, 33).

De manera similar a mamíferos el pez cebrá media el movimiento intestinal con músculos lisos los cuales se controlan por el sistema nervioso. Del mismo modo la maduración, diferenciación y renovación de las células epiteliales son análogas en ambas especies quienes también poseen un epitelio con vellosidades, enterocitos, células caliciformes y células enteroendocrinas (2).

Sistema renal y endocrino

Aunque *D. rerio* posee un sistema renal como los mamíferos, su órgano principal carece de complejidad pues el pronefro o riñón primitivo larvario del pez cebrá tiene una anatomía más simple que la del meta-nefro o riñón de mamíferos. Básicamente el pronefro posee solo dos nefronas con glomérulos fusionados. El glomérulo del pez cebrá posee células endoteliales capilares fenestradas, podocitos y células epiteliales polarizadas con cilios primarios quienes recubren los túbulos de la nefrona, las cuales se dividen y distribuyen en regiones especializadas para la secreción diferencial y la reabsorción en la sangre (2, 90).

Sin embargo, pese a estas circunstancias el pez ha sido funcional como modelo para modelar la enfermedad renal o la nefrotoxicidad, de hecho, en este último resulta relevante puesto que el riñón es vulnerable a la toxicidad que pueden generar compuestos externos, porque su función es eliminar las moléculas tóxicas de la circulación (2).

A nivel endocrino en los seres vivos vertebrados terrestres, existe un sistema hipotalámico-hipofisario y por lo tanto los péptidos neuroendocrinos producidos en el hipotálamo se secretan a los vasos sanguíneos con el fin de llegar a la adenohipófisis. Por otro parte, en *D. rerio*, no se presenta el sistema hipotalámico-hipofisario, por lo tanto las moléculas neurosecretoras ingresan a la hipófisis y las hormonas se segregan directamente en las células adenohipofisarias. El pez cebrá carece de una glándula suprarrenal distintiva, pero presenta una glándula funcionalmente comparable con mamíferos (2, 3).

Hematología del pez cebra y sistema cardiovascular

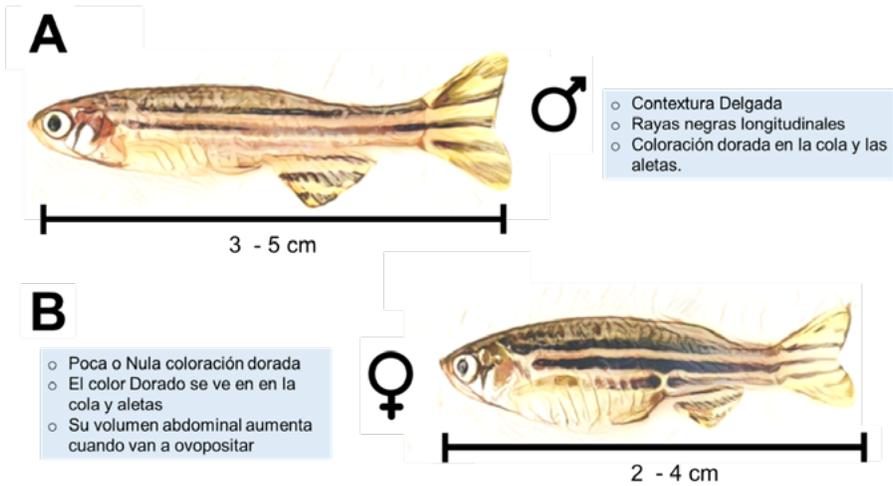
Al igual que el ser humano, el pez cebra tiene diferentes células sanguíneas tales como glóbulos rojos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, Linfocitos T, Linfocitos B, células dendríticas y como plaqueta se tiene el trombocito. De hecho, se han generado indicadores para cada línea celular a través de la fluorescencia, por consiguiente, es posible observar las células sanguíneas de *D. rerio* en diferentes colores y evaluar la toxicidad (2, 34).

Se ha demostrado que la fisiología cardiovascular es conservada evolutivamente entre humanos y el pez cebra a nivel anatómico, celular y morfológico, de hecho, se han reportado estudios donde se evidencia que el pez es un modelo viable de cardiotoxicidad e incluso diversos fármacos cardiovasculares del hombre han evidenciado respuestas similares en el pez cebra y numerosos trastornos cardiovasculares humanos se han estudiado ampliamente en transgénicos de *D. rerio* (2).

Sistema reproductor

Como sucede en la mayoría de los sistemas anteriormente mencionados en este caso, el pez cebra posee una anatomía de los órganos de células germinales muy correlacionada con vertebrados. Por un lado, los machos *D. rerio* (Figura 14 A), poseen testículos emparejados con pequeños túbulos y dentro de estos las paredes están revestidas por células de Sertoli, que al igual que el ser humano promueven la morfogénesis y la espermatogénesis. Por otro lado las células de Leydig ubicadas en espacios intersticiales producen testosterona. Como diferencia a los vertebrados superiores en la espermatogénesis se tiene que el pez cebra posee un quiste espermatogénico conformado por células de Sertoli las cuales envuelven las células germinales con el fin de desarrollarse sincrónicamente (4).

Figura 14. Características según género de *D. rerio*



Nota: Se observa un pez cebrá macho en la parte superior (A) y un pez cebrá hembra en la parte inferior (B), donde se diferencian sus características externas, como color, tamaño y proporción. (cm): Centímetros.

Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a las hembras (figura 14B), la similitud con vertebrados superiores a nivel de sistema reproductivo se basa en la estructura y función de los ovarios, los cuales se desarrollan en cuatro etapas ováricas. En este caso en *D. rerio*, primero sucede la etapa de ovocito primario, donde se observan células esféricas relativamente pequeñas, luego, la etapa cortical-alveolar con ovocitos agrandados llenos de alvéolos corticales, después, la etapa vitelogénica, caracterizada por la presencia de yema de huevo en los ovocitos y, por último, la etapa de maduración en el que se pueden observar ovocitos con capa irregular (4).

2.3 Manipulación del modelo en el laboratorio

El pez cebrá se mantiene típicamente a 28° C en el laboratorio, sin embargo para estudios de xenoinjertos de cáncer o infecciones con patógenos, la temperatura del agua donde se desarrollan los peces oscila entre los 35 a 37° C, generando un entorno acorde al crecimiento de tumores humanos, parásitos, bacterias y hongos. Aunque *D. rerio* es muy resistente a cambios medioambientales hay condiciones básicas establecidas para su mantenimiento las cuales veremos a continuación (39, 87).

Es importante mantener la inocuidad del entorno y del agua a través de parámetros como temperatura (25° C) y pH (6.8 a 7.5), así como también el oxígeno disuelto (OD, mg / L), desechos nitrogenados (NH₃ y NH₄⁺) turbidez, salinidad, entre otros, ya que cualquier microorganismo o alteración en los parámetros mencionados podría contribuir a enfermedades, alterar vías de señalización e inducir estrés afectando los resultados de la investigación (39, 87, 91).

Este pescado es demasiado sociable, por lo que como mínimo se deben mantener 5 animales por cada litro de agua, la cual debe ser cambiada en un 10 - 25% semanalmente y cada mes se deben lavar los acuarios y cambiar los filtros (87). En cuanto a la turbidez del agua, esta debe ser inducida por algas en su entorno (“agua verde”), puesto que es necesaria, ya que de esta forma aumenta el contraste de los organismos zooplanctónicos y disminuye la distancia de reacción de la presa, dando como resultado condiciones de luz dispersa y, en consecuencia, suele conducir a una disminución dramática de las interacciones agresivas entre las larvas, el comportamiento de adherencia y el canibalismo (39).

Los procedimientos actuales de cría del pez cebrá se basan casi uniformemente en el ciclo diurno de luz de 14 horas y 10 horas de oscuridad (14:10 h), puesto que el pez cebrá no sobrevive en la oscuridad continua y bajo luz constante su tamaño poblacional es menor que el de los peces criados en condiciones de ciclo de luz-oscuridad. Se ha revelado que *D. rerio* presenta características fisiológicas y de comportamiento similares a las del sueño de los mamíferos cuya

regularidad depende del ciclo diario debido a la producción de melatonina por el órgano pineal del pez quien regula el ritmo circadiano tal y como sucede en humanos (2, 87, 91).

Actualmente se cuenta con alimentos comerciales de tipo granulados o en hojuelas como Gemma Micro 300 el cual se debe administrar al 5% del peso corporal del pez una o dos veces al día, con el fin de garantizar un balance nutricional. Sin embargo, este alimento procesado solo se recomienda en adultos ya que en las etapas tempranas es recomendable brindar alimento vivo. En cualquier etapa de la vida los peces de *D. rerio* se pueden alimentar con *Artemia* salina o nauplios de *Artemia* en la mañana y en la noche, *Spirulina platensis* tres veces al día al 5% del peso corporal, aceite de calamar, hoja de moringa, aceite de linaza, Gusano tubefex, protozoos, ortíferos, paramecios y camarones en salmuera, entre otros (1, 4, 39, 87, 91).

Es importante tener en cuenta que los óvulos y embriones de *D. rerio* se deben separar de los peces adultos, puesto que estos devoran sus crías. Usualmente los machos y hembras en edad fértil se separan y solo se colocan en un mismo acuario al momento de la reproducción, en una relación de 2 a 3 machos por cada hembra (87).

Para disminuir las infecciones y mantener la progenie, los embriones se desinfectan con cloro y/o yodo o se preservan con frío la mayoría de las líneas y se usan machos adultos para obtener esperma y criopreservar, luego de esto, los machos se sacrifican, fijan y procesan en bloques de parafina para estudios histopatológicos y así mantener un control reproductivo. Luego de descongelar el esperma para su uso se realiza una fertilización *in vitro* (39).

2.4 Aplicación en toxicología

El pez cebra es usado como modelo de enfermedades humanas por medio de la manipulación genética y fluorescencia donde se incluyen órganos como el corazón, riñón, hígado y los sistemas hematopoyético, inmunológico, nervioso, entre otros. También se utiliza para modelar el impacto negativo de compuestos externos, contribuyendo así

a la comprensión etiológica, los efectos en la salud y los mecanismos de acción de enfermedades, relacionando los hallazgos con los seres humanos en campos de morbilidad a nivel agudo y crónico (18).

En el ser humano el contacto frecuente a compuestos externos que se encuentran en productos de uso diario, agua contaminada, condiciones de aire insalubres, alimentos manipulados o expuestos a contaminantes durante el desarrollo, genera un impacto negativo en el embrión, conduciendo a anomalías congénitas, reproductivas, mortinatos y consecuencias en el desarrollo luego del nacimiento a nivel endocrino o en el sistema nervioso central, así como, afectaciones para la salud a largo plazo durante la vida de un individuo como el cáncer (18, 88, 89).

A nivel ecotoxicológico se utiliza para modelar el impacto negativo de compuestos externos contribuyendo así a la comprensión etiológica, los efectos en la salud y los mecanismos de acción de enfermedades, relacionando los hallazgos con los seres humanos en campos de morbilidad a nivel agudo y crónico (1, 18).

2.4.1 Compuestos tóxicos que afectan a *D. rerio* y se correlacionan con enfermedades humanas

Se han estudiado diversos compuestos tales como dietilestilbestrol, atrazina, dioxina, entre otros, sobre embriones del pez cebra donde se han encontrado fallas neuroendocrinas, alteraciones morfológicas y daño gonadal en adultos expuestos durante todo su ciclo de vida a estos compuestos externos. Los estudios anteriores sugieren que el pez cebra logra ser usado como modelo favorable para evidenciar los efectos tempranos y tardíos a la exposición a toxinas (18, 50, 59, 70).

En *D. rerio* es posible observar los efectos de toxinas o compuestos químicos *in vivo*, gracias a los genes GFP o técnicas fluorescentes, además de evaluar directamente la toxicidad, formas de absorción, distribución, metabolismo y mecanismos de eliminación. De esta forma es posible incluso extender su uso en la detección y validación de tratamientos. Cabe resaltar que el pez cebra se ha usado como

modelo para estudiar el comportamiento ante compuestos como metales y metaloides, así como también componentes sintéticos de productos de consumo, pesticidas y subproductos del procesamiento industrial y la incineración de desechos (18).

Se sabe que *D. rerio* expresa genes del citocromo P450 (CYP) necesarios para el metabolismo y la biotransformación de xenobióticos (18). Los xenobióticos son sustancias químicas que un organismo absorbe a causa de la exposición constante a un ambiente contaminado, además no se pueden metabolizar de forma natural. Al no ser utilizados como nutrientes los xenobióticos pueden alcanzar concentraciones tóxicas que interfieren en los procesos metabólicos normales a nivel celular (92, 93).

En el genoma del pez cebra, se han identificado aproximadamente 86 genes CYP con características metabólicas homólogas humanas (18). Diversos son los compuestos que generan daños específicos en órganos y sistemas del pez (Tabla 3). *D. rerio* se puede exponer a xenobióticos con solo disolver una sustancia química en el agua y monitorear los cambios fenotípicos y / o los efectos tóxicos (2).

Tabla 4. Compuestos usados en el modelo *D. rerio* y sus órganos implicados

COMPUESTOS	ÓRGANOS, SISTEMAS O VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADOS
Dietilestilbestrol, Atrazina, Dioxina	Conduce a daños neuroendocrinos, alteraciones morfológicas, daño gonadal (11, 83).
Toxinas, Metales, Pesticidas Y Agentes Oxidantes	Inducen estrés celular en el pez (94-97).
Bisfenol A	Disruptor endocrino, afecta la salud reproductiva, el desarrollo temprano de larvas y contribuye a la obesidad del Pez Cebra (59).

Continúa

Arsénico	Defectos cardiovasculares y alteraciones hepáticas en <i>D. rerio</i> (61,73).
Acetaminofén, Etanol, Diurón, Diazinón Y Fenvalerato	Afectan el hígado y el sistema nervioso del pez (94-97).

Nota: Los compuestos de la columna izquierda se han usado en *D. rerio* y conducen a daños específicos los cuales se mencionan en la columna derecha y se correlacionan con la salud humana.

Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, se sabe que la exposición a toxinas, metales, pesticidas y agentes oxidantes, induce una respuesta de tipo estrés celular altamente conservada. Como consecuencia al estrés se desarrollan enfermedades neurodegenerativas, disfunción metabólica, enfermedades inflamatorias y cáncer, estas patologías pueden verse agravadas debido al contacto constante a las sustancias antes mencionadas (18).

Algunos contaminantes ambientales alteran el sistema endocrino como por ejemplo el Bisfenol A que es un disruptor debido a su capacidad para provocar efectos tanto proestrogénicos como antiestrogénicos al unirse a los receptores de estrógeno ER α y ER β . Este compuesto se encuentra en diversos productos industriales y de consumo, como los plásticos, y también es el resultado de la fabricación y la lixiviación que como consecuencia tiene efectos adversos sobre la salud reproductiva, el desarrollo temprano y contribuye a la obesidad. En el pez cebra se une al receptor gamma relacionado con el estrógeno del pez (ERR γ) *in vivo* y como resultados se han encontrado fenotipos relacionados (18, 49).

Por otra parte, las acuagliceroporinas y la metiltransferasa son enzimas necesarias para la absorción y el metabolismo del arsénico inorgánico, el pez cebra expresa estas enzimas específicas del arsénico y como consecuencia a la exposición del arsénico en el desarrollo morfológico general de embriones y larvas de pez, se han encontrado defectos cardiovasculares debido a la regulación baja de Dvr1, el cual es esencial para una adecuada morfogénesis cardíaca (18, 61).

En esa misma línea, luego de la exposición al arsénico los factores *nr2f2*, *jun*, *k-ras* y *apo* son regulados positivamente en el hígado del pez cebra. Estos factores están implicados en vías que pueden contribuir a la enfermedad hepática inducida por arsénico, por ejemplo cáncer. A nivel crónico el Arsénico se retiene en ojo, piel e hígado de *D. rerio* y continuamente conlleva a un aumento de la frecuencia cardíaca y defectos neurológicos, además se sabe que la progenie se reduce en relación con la progenie no expuesta a arsénico (18, 67).

Como órgano base para el estudio de compuestos externos se tiene el hígado ya que en su gran mayoría las toxinas afectan específicamente este órgano, debido a que en él sucede el metabolismo xenobiótico en los vertebrados, desarrollando necrosis, hígado graso, esteatohepatitis y cáncer de hígado (18).

En el pez cebra se han identificado respuestas hepáticas específicas de toxinas por medio de expresión génica en una variedad de plataformas en respuesta a arsénico, acetaminofén y etanol, además se sabe que el diurón, diazinón y fenvalerato también generan toxicidad en el animal, y que entre las enzimas marcadoras de estos últimos compuestos en el hígado están la catalasa y la superóxido dismutasa (1, 18, 63).

2.4.2 Cepas transgénicas de *D. rerio* usadas en el área de la Salud Ambiental

En el pez cebra se han realizado estudios con aril hidrocarburo, este es un receptor citosólico que se expresa en tejidos durante el desarrollo. Las cepas utilizadas son conocidas como; Tg (*cyp1a: nls-gfp*) y Tg (*cyp1a: gfp*). El Ahr se activa en respuesta a hidrocarburos aromáticos (arilo) sintéticos y naturales, funcionando como un factor de transcripción e induciendo la expresión de genes, entre los que codifican las enzimas CYP mencionadas anteriormente (18).

Los metales pesados como Plomo, Platino, Cadmio y Zinc, entre otros, en concentraciones altas tienen efectos tóxicos graves en los seres humanos y los animales. Estos compuestos suelen encontrarse tras la explotación minera en el medio ambiente. El pez cebra cepa Tg

(mt: egfp), se ha utilizado ampliamente para estudiar las consecuencias de la exposición a metales, permitiendo detectar la presencia de metales en el agua, se ha encontrado que la exposición a varios metales diferentes se asocia con déficits en el desarrollo neurológico (18).

En el pez cebra, debido a que es un animal vertebrado y muy bien caracterizado, se puede evaluar y tratar el estrés celular en cualquier célula, órgano o sistema a través de la cepa huORFZ. De manera similar la cepa GFP TgBAC (hspb11: GFP), se ha desarrollado con el fin de poder observar respuestas de tipo choque térmico y como estrategia celular utilizada para proteger la célula debido al estrés. Esta reacción puede ser inducida por el envejecimiento, enfermedades por plegamiento de proteínas y la exposición a sustancias químicas tóxicas, lo que permite evaluar diferentes condiciones como modelo candidato, de hecho por medio de esta cepa ha sido posible identificar los efectos específicos de plaguicidas en un tejido (18).

Del mismo modo, existen varias moléculas exógenas capaces de interferir en la señalización hormonal y simultáneamente pueden alterar el sistema endocrino. Por ejemplo, diferentes cepas transgénicas como la Tg (5xERE: GFP) y Tg (cyp19a1b: GFP) se utilizan para la detección de la señalización del receptor de estrógeno y han sido útiles para identificar estrógenos concentrados en muestras de agua ambiental (18).

La persistencia de compuestos químicos, la exposición a tóxicos y contaminantes ambientales son características de la salud ambiental que pueden ser evaluables en el pez cebra a través de diversos transgénicos (Tabla 4). Los productos químicos simplemente se pueden agregar al medio del embrión y el pez cebra transparente y en desarrollo se puede evaluar para determinar la letalidad y las anomalías del desarrollo, desde la fertilización hasta las etapas larvarias (18).

Tabla 5. Cepas *D. rerio* utilizados en toxicología ambiental

CEPAS	APLICACIÓN EN ECOTOXICOLOGÍA
Tg (cyp1a: nls-gfp) y Tg (cyp1a: gfp)	Permite realizar estudios con hidrocarburos aromáticos (arilo) sintéticos y naturales.
Tg (mt: egfp)	Detecta metales pesados en el ambiente como; Plomo, Platino, Cadmio y Zinc.
huORFZ.	Se activa cuando hay xenobióticos en el medio que inducen estrés celular.
TgBAC (hspb11: GFP)	Respuesta tipo choque térmico cuando el pez es expuesto a compuestos químicos tóxicos.
Tg (5xERE: GFP) y Tg (cyp19a1b: GFP)	Útil para evaluar algunos disruptor endocrino, en este caso para estrógeno.

Nota: Cepas transgénicas de *D. rerio* usadas para evaluar el comportamiento de diversos compuestos tóxicos.

Fuente: Elaboración propia.

Ghanim K. y colaboradores han estandarizado técnicas para evaluar el impacto del fenvalerato sobre este pez <https://www.unicolmayor.edu.co/universidad/dependencias/vicerrectoria-academica/eventos/encuentros-pedagogia-unicolmayor/v-encuentro-pedagogia>. Para determinar la concentración letal 50 (LC 50), estos investigadores mantuvieron los peces 15 días y después los expusieron a diversas concentraciones hasta 96 horas. Para obtener el total de proteínas de estos órganos, seleccionaron animales de manera aleatoria y capturaron 0.2g de tejidos como branquias e hígado, los cuales fueron disecados para ser diluidos en 2,0 ml de tampón de fosfato de sodio (0,1 M, pH 7,4) y posteriormente centrifugados a 10.000 g durante 15 min (1).

De la misma manera, a partir de los órganos expuestos al compuesto en estudio se pueden realizar ensayos como el de superóxido dismutasa, por medio de la reducción fotoquímica de Nitroblue tetrazolium y su lectura a 560 nanómetros (nm) frente al blanco de reactivo, o también se puede llevar a cabo ensayos como Catalasa a una temperatura de 37° C y a una lectura a 240 nm, con el fin de evaluar el aumento o la disminución de estas enzimas, ya que su alteración sugiere que existe un daño celular (1).

Entre los ensayos mayormente correlacionados con parámetros clínicos en humanos, se tienen las muestras de sangre, las cuales pueden ser tomadas entre la aleta anal y la aleta caudal. Posteriormente se lleva a cabo una centrifugación según lo establece Ghanim K y colaboradores a 10.000 g durante 10 minutos, con el fin de obtener una muestra viable y analizar cualquier proteína de interés (1).

Otra técnica que se ha utilizado en *D. rerio* a nivel ambiental es la cuantificación automatizada de transgénicos *in vivo* (ARQiv), donde básicamente por medio de la fluorescencia y su intensidad, se logra una detección de alto rendimiento en embriones y larvas de pez cebra vivos a lo largo del tiempo. Por otro lado se ha utilizado el cribado químico impulsado por fenotipos con el fin de identificar compuestos tóxicos que afectan la migración de células marcadas con fluorescencia (18).

Entre las técnicas más modernas se ha utilizado el mapeo de conectividad en salud ambiental utilizando pez cebra. Un estudio expone que mediante la extracción de conjuntos de datos de microarrays disponibles públicamente se compararon las respuestas transcripcionales a una variedad de exposiciones y dosis químicas en diferentes órganos del pez cebra (18).

2.4.3 Ventajas de usar a *D. rerio* como modelo en ecotoxicología

Entre las ventajas más destacadas de utilizar el pez cebra se basa en que los embriones y las larvas son transparentes lo que permite por ejemplo, visualizar imágenes de interacciones entre las células inmunes y los tejidos somáticos a nivel de todo el organismo (2, 18). Además, es

sencillo generar transgénicos y adicionar genes, lo que lo convierte en un modelo ideal para el cribado genético y de compuestos de alto rendimiento, de hecho la información de la secuencia total del genoma de *D. rerio* y los avances en bioinformática lo convierte en un organismo ideal para analizar la toxicidad *in vivo* en tiempo real de mecanismos tóxicos de los plaguicidas y el análisis de enzimas marcadoras (1, 2, 88)

Es importante aclarar que por medio de la fluorescencia es posible marcar genes que se estimulan o inducen estrés, por ejemplo, cuando hay una exposición a contaminantes o factores ambientales del medio (18). Lo anterior permite un examen no invasivo del desarrollo, metabolismos, características de órganos y puntos finales de tóxicos en pez cebra joven (2).

En el pez cebra es posible realizar ensayos que por ejemplo se desarrollan en un cultivo celular, pero en este caso se realizan en un modelo *in vivo* vertebrado interpolable a roedores, pero mucho más económico (18). A nivel de homología con el ser humano los órganos del pez cebra realizan funciones fisiológicas bien conservadas (2).

La descendencia del pez cebra es rápida pues un solo apareamiento genera cientos de embriones fertilizados externamente que se desarrollan rápidamente, posee una alta fecundidad y es posible mantener criaderos de manera sencilla, usando acuarios estándar, lo que lo convierte en un modelo ventajoso, ya que los estudios en este animal permiten la evaluación continua de la toxicidad de un compuesto, o permiten estudiar diferentes mecanismos moleculares y metabólicos que interfieren en el desarrollo normal de un ser vivo y de esta manera asociarlo a la salud humana (2, 18).

Recientemente, se destaca que el pez cebra es un sistema que modela alternativamente la detección de fármacos, el desarrollo de nuevos productos y la evaluación de los efectos ecotóxicos de los contaminantes y especies biomonitorizadas en la evaluación de riesgos ambientales, por lo anterior se sabe que las líneas transgénicas constitutivas son el principal tipo de transgénico usado en este tipo de estudios y dentro de las cepas más frecuentes se recalca Tg(fli1: EGFP), debido a sus

condiciones estáticas donde GFP y EGFP son las principales proteínas indicadoras (97).

Por lo anterior, las líneas transgénicas de pez cebra están emergiendo como un sistema modelo *in vivo* adecuado para evaluar el mecanismo de acción y la toxicidad de los productos químicos y nuevos productos biotecnológicos, y los efectos de los contaminantes tradicionales y emergentes (94-96).

2.4.4 Limitaciones de usar a *D. rerio* como modelo en toxicología

Aunque este pez y sus cepas han sido ampliamente utilizadas en diferentes campos de la ciencia, una de las desventajas que este modelo presenta es que al usar proteínas fluorescentes como GFP, tardan en madurar y tienen una vida media larga, por ello no pueden capturar la respuesta dinámica o constante a compuesto exógenos, químicos o toxinas (18).

Una segunda limitación es que la fluorescencia puede verse obstaculizada por un posicionamiento o expresión transgénica no uniforme en el pez cebra, lo que indica que no existe una precisión para cuantificar dicha expresión, además las diferencias fisiológicas entre el pez cebra y los mamíferos no permiten evaluar una totalidad de enfermedades, de hecho, el sistema respiratorio, difiere morfológicamente de los humanos y a nivel reproductivo el pez cebra no tiene cromosomas sexuales discernibles y no se vuelve sexualmente dimórfico hasta 3 semanas después de la fecundación. Sin embargo, varias de las vías de desarrollo y señalización se conservan de manera evolutiva entre el pez cebra y los humanos (3, 18).

Las exposiciones a compuestos pueden no ser comparables en todos los casos a humanos. Esto se debe a que el tóxico se agrega directamente al agua, por lo que los primeros contactos son a nivel dérmico, ya que en las primeras etapas del desarrollo del pez cebra los embriones no tragan agua para respirar. Además, muchos tóxicos se introducen en el cuerpo humano a través del consumo de agua potable o alimentos contaminados, como tal, las concentraciones de ingesta

son diferentes y por ende la absorción, distribución, metabolismo y excreción es variada (18).

Sin embargo, pese a la distancia evolutiva entre el pez cebra y los mamíferos, los transgénicos de *D. rerio* permiten la evaluación de vasotoxicidad, neurotoxicidad, toxicidad sistémica, hepatotoxicidad, disrupción endocrina, cardiotoxicidad, inmunotoxicidad, hematotoxicidad, ototoxicidad y pancreatotoxicidad, por lo que de alguna manera es posible interpolar estas ecotoxicidades con el ser humano de manera ortóloga (97).

2.5 Conclusión

Tras el frecuente crecimiento industrial para la producción de sintéticos que buscan mantener el ritmo de la economía, el medio ambiente y los efectos de la exposición a sustancias tóxicas en la salud humana y en general en todos los seres vivos, el pez cebra está cobrando valor en áreas investigativas. La principal ventaja de usar a *D. rerio* como modelo biológico de contaminación es que sus características de desarrollo proporcionan un sistema para indagar diferentes procesos *in vitro* e *in vivo*.

Su rápida producción de progenie permite una evaluación completa de la toxicidad en todo un ser vivo. Además, al ser un modelo económico y de fácil manejo permite desarrollar una investigación rápida para analizar efectos latentes y respuestas adversas ante la exposición temprana a contaminantes ambientales.

La conservación a nivel genético, molecular y celular entre el pez cebra y los mamíferos, contribuye a una aplicabilidad cercana a la exposición y las enfermedades humanas. Por lo anterior, los estudios que utilizan el pez cebra han proporcionado información valiosa sobre los efectos de los contaminantes ambientales en el desarrollo normal de vertebrados.

Referencias Bibliográficas

1. Al-Ghanim KA, Mahboob S, Vijayaraghavan P, Al-Misned FA, Kim YO, Kim HJ. Sub-lethal effect of synthetic pyrethroid pesticide on metabolic enzymes and protein profile of non-target Zebra fish, *Danio rerio*. Saudi J Biol Sci. 2020; 27(1): 441-7.
2. Cassar S, Adatto I, Freeman JL, Gamse JT, Iturria I, Lawrence C, et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. Chem Res Toxicol. 2020; 33(1): 95-118.
3. Gut P, Reischauer S, Stainier DYR, Arnaout R. Little Fish, Big Data: Zebrafish as a Model for Cardiovascular and Metabolic Disease. Physiol Rev. 2017; 97(3): 889-938.
4. Hoo JY, Kumari Y, Shaikh MF, Hue SM, Goh BH. Zebrafish: A Versatile Animal Model for Fertility Research. Biomed Res Int. 2016; 2016: 9732780.
5. Skidmore JF. Resistance to zinc sulphate of the zebrafish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan) at different phases of its life history. 1965; 56(1): 47-53.
6. Hisaoka KK. The effects of 2-acetylaminofluorene on the embryonic development of the zebrafish. II. Histochemical studies. Cancer Res. 1958; 18(6): 664-7.
7. Hisaoka KK. The effects of 4-acetylaminofluorene on the embryonic development of the zebrafish. I. Morphological studies. Cancer Res. 1958; 18(5): 527-35.
8. Battle HI, Hisaoka KK. Effects of ethyl carbamate (urethan) on the early development of the teleost *Brachydanio rerio*. Cancer Res. 1952; 12(5): 334-40.
9. Hisaoka KK, Hopper AF. Some effects of barbituric and diethylbarbituric acid on the development of the zebra fish, *Brachydanio rerio*. Anat Rec. 1957; 129(3): 297-307.

10. Baslow MH, Ruggieri G. N-acetylhistidine in developing embryos of the killifish, *Fundulus heteroclitus* and the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Life Sci.* 1967; 6(6): 609-14.
11. Stanton MF. Diethylnitrosamine-Induced Hepatic Degeneration and Neoplasia in the Aquarium Fish, *Brachydanio Rerio*. *J Natl Cancer Inst.* 1965; 34: 117-30.
12. Laale HW. Ethanol induced notochord and spinal cord duplications in the embryo of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Exp Zool.* 1971; 177(1): 51-64.
13. Pliss GB, Khudoley VV. Tumor induction by carcinogenic agents in aquarium fish. *J Natl Cancer Inst.* 1975; 55(1): 129-36.
14. Bloom HD, Perlmutter A. A sexual aggregating pheromone system in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J Exp Zool.* 1977; 199(2): 215-26.
15. Fischer HA, Schmatolla E. Axonal transport of tritium-labeled putrescine in the embryonic visual system of zebrafish. *Science.* 1972; 176(4041): 1327-9.
16. Schmatolla E. Retino-tectal course of optic nerves in cyclopic and synophthalmic zebrafish embryos. *Anat Rec.* 1974; 180(2): 377-83.
17. Laale H, Singh L. The antigenic pattern of the developing brain of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. II. Brain specific antigens. *J Exp Zool.* 1973; 186(3): 257-68.
18. Bambino K, Chu J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. *Curr Top Dev Biol.* 2017; 124: 331-67.
19. Westerfield M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). University of Oregon Eugene. USA: Elsevier; 2000 [cited 2021 29/07/2021]. Available from: https://zfinfo.org/zf_info/zfbook/zfbk.html.
20. Grunwald DJ, Streisinger G. Induction of recessive lethal and specific locus mutations in the zebrafish with ethyl nitrosourea. *Genetical Research.* 1992; 59(2): 103-16.

21. Grunwald DJ, Streisinger G. Induction of mutations in the zebrafish with ultraviolet light. *Genetical Research*. 1992; 59(2): 93-101.
22. Felsenfeld AL, Walker C, Westerfield M, Kimmel C, Streisinger G. Mutations affecting skeletal muscle myofibril structure in the zebrafish. *Development*. 1990; 108(3): 443-59.
23. Streisinger G, Coale F, Taggart C, Walker C, Grunwald DJ. Clonal origins of cells in the pigmented retina of the zebrafish eye. *Developmental biology*. 1989; 131(1): 60-9.
24. Grunwald DJ, Kimmel CB, Westerfield M, Walker C, Streisinger G. A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish. *Developmental biology*. 1988; 126(1): 115-28.
25. Streisinger G, Singer F, Walker C, Knauber D, Dower N. Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. *Genetics*. 1986; 112(2): 311-9.
26. Nawrocki L, BreMiller R, Streisinger G, Kaplan M. Larval and adult visual pigments of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Vision Res*. 1985; 25(11): 1569-76.
27. Streisinger G. Attainment of minimal biological variability and measurements of genotoxicity: production of homozygous diploid zebra fish. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1984; 65: 53-8.
28. Meyer A, Biermann CH, Orti G. The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. *Proc Biol Sci*. 1993; 252(1335): 231-6.
29. Brand M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Beuchle D, Lun K, Furutani-Seiki M, et al. Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development*. 1996; 123: 179-90.
30. Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, et al. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*. 1996; 123: 37-46.

31. Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. 1996; 123: 1-36.
32. Heisenberg CP, Brand M, Jiang YJ, Warga RM, Beuchle D, van Eeden FJ, et al. Genes involved in forebrain development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. 1996; 123: 191-203.
33. Pack M, Solnica-Krezel L, Malicki J, Neuhauss SC, Schier AF, Stemple DL, et al. Mutations affecting development of zebrafish digestive organs. *Development*. 1996; 123: 321-8.
34. Ransom DG, Haffter P, Odenthal J, Brownlie A, Vogelsang E, Kelsh RN, et al. Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. *Development*. 1996; 123: 311-9.
35. Stainier DY, Fouquet B, Chen JN, Warren KS, Weinstein BM, Meiler SE, et al. Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development*. 1996; 123: 285-92.
36. Izsvak Z, Ivics Z, Hackett PB. Characterization of a Tc1-like transposable element in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol Gen Genet*. 1995; 247(3): 312-22.
37. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995; 203(3): 253-310.
38. Sire JY, Allizard F, Babiari O, Bourguignon J, Quilhac A. Scale development in zebrafish (*Danio rerio*). *J Anat*. 1997;190 (Pt 4): 545-61.
39. Kent ML, Sanders JL, Spagnoli S, Al-Samarrie CE, Murray KN. Review of diseases and health management in zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822) in research facilities. *J Fish Dis*. 2020; 43(6): 637-50.
40. Metscher BD, Ahlberg PE. Zebrafish in context: uses of a laboratory model in comparative studies. *Developmental biology*. 1999; 210(1): 1-14.

41. Takeda H. [Maintenance of laboratory strain of zebrafish, *Danio rerio*]. Tanpakushitsu Kakusan Koso. 1999; 44(6): 803-6.
42. Wixon J. Featured organism: *Danio rerio*, the zebrafish. Yeast. 2000; 17(3): 225-31.
43. Dooley K, Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. Curr Opin Genet Dev. 2000; 10(3): 252-6.
44. Samson JC, Shenker J. The teratogenic effects of methylmercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*. Aquat Toxicol. 2000; 48(2-3): 343-54.
45. Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. Pharmacol Biochem Behav. 2000; 67(4): 773-82.
46. Meinelt T, Schulz C, Wirth M, Kurzinger H, Steinberg C. Correlation of diets high in n-6 polyunsaturated fatty acids with high growth rate in zebrafish (*Danio rerio*). Comp Med. 2000; 50(1): 43-5.
47. Poleo GA, Denniston RS, Reggio BC, Godke RA, Tiersch TR. Fertilization of eggs of zebrafish, *Danio rerio*, by intracytoplasmic sperm injection. Biol Reprod. 2001; 65(3): 961-6.
48. Bardet PL, Horard B, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Vanacker JM. Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). J Mol Endocrinol. 2002; 28(3): 153-63.
49. Lindholm C, Wynne PM, Marriott P, Pedersen SN, Bjerregaard P. Metabolism of bisphenol A in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to estrogenic response. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2003; 135(2): 169-77.
50. Wiegand C, Krause E, Steinberg C, Pflugmacher S. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicol Environ Saf. 2001; 49(3): 199-205.
51. Murtha JM, Qi W, Keller ET. Hematologic and serum biochemical values for zebrafish (*Danio rerio*). Comp Med. 2003; 53(1): 37-41.
52. Gerhard GS. Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. Exp Gerontol. 2003; 38(11-12): 1333-41.

53. Keller ET, Murtha JM. The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2004; 138(3): 335-41.
54. Ng AN, de Jong-Curtain TA, Mawdsley DJ, White SJ, Shin J, Appel B, et al. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Developmental biology*. 2005; 286(1): 114-35.
55. Fleisch VC, Neuhaus SC. Visual behavior in zebrafish. *Zebrafish*. 2006; 3(2): 191-201.
56. Brockerhoff SE. Measuring the optokinetic response of zebrafish larvae. *Nat Protoc*. 2006; 1(5): 2448-51.
57. Breaud S, Li Q, Lockwood BL, Kobayashi K, Lin E, Guo S. A choice behavior for morphine reveals experience-dependent drug preference and underlying neural substrates in developing larval zebrafish. *Neuroscience*. 2007; 146(3): 1109-16.
58. Yang L, Kemadjou JR, Zinsmeister C, Bauer M, Legradi J, Muller F, et al. Transcriptional profiling reveals barcode-like toxicogenomic responses in the zebrafish embryo. *Genome Biol*. 2007; 8(10): R227.
59. Heiden TCK, Struble CA, Rise ML, Hessner MJ, Hutz RJ, Carvan MJ, 3rd. Molecular targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) within the zebrafish ovary: insights into TCDD-induced endocrine disruption and reproductive toxicity. *Reprod Toxicol*. 2008; 25(1): 47-57.
60. Scholz S, Fischer S, Gundel U, Kuster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-applications beyond acute toxicity testing. *Environmental science and pollution research international*. 2008; 15(5): 394-404.
61. Hamdi M, Sanchez MA, Beene LC, Liu Q, Landfear SM, Rosen BP, et al. Arsenic transport by zebrafish aquaglyceroporins. *BMC Mol Biol*. 2009; 10: 104.
62. Strahle U, Grabher C. The zebrafish embryo as a model for assessing off-target drug effects. *Dis Model Mech*. 2010; 3(11-12): 689-92.

63. Mathur P, Berberoglu MA, Guo S. Preference for ethanol in zebrafish following a single exposure. *Behav Brain Res.* 2011; 217(1): 128-33.
64. Niihori M, Platto T, Igarashi S, Hurbon A, Dunn AM, Tran P, et al. Zebrafish swimming behavior as a biomarker for ototoxicity-induced hair cell damage: a high-throughput drug development platform targeting hearing loss. *Transl Res.* 2015; 166(5): 440-50.
65. Gustafson AL, Stedman DB, Ball J, Hillegass JM, Flood A, Zhang CX, et al. Inter-laboratory assessment of a harmonized zebrafish developmental toxicology assay - progress report on phase I. *Reprod Toxicol.* 2012; 33(2): 155-64.
66. Uribe PM, Sun H, Wang K, Asuncion JD, Wang Q, Chen CW, et al. Aminoglycoside-induced hair cell death of inner ear organs causes functional deficits in adult zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS one.* 2013; 8(3): e58755.
67. Xu H, Lam SH, Shen Y, Gong Z. Genome-wide identification of molecular pathways and biomarkers in response to 67,73enic exposure in zebrafish liver. *PLoS one.* 2013; 8(7): e68737.
68. Zhang X, Li C, Gong Z. Development of a convenient in vivo hepatotoxin assay using a transgenic zebrafish line with liver-specific DsRed expression. *PLoS one.* 2014;9(3):e91874.
69. Deeti S, O'Farrell S, Kennedy BN. Early safety assessment of human oculotoxic drugs using the zebrafish visualmotor response. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2014; 69(1): 1-8.
70. Wirbisky SE, Weber GJ, Sepulveda MS, Xiao C, Cannon JR, Freeman JL. Developmental origins of neurotransmitter and transcriptome alterations in adult female zebrafish exposed to atrazine during embryogenesis. *Toxicology.* 2015; 333: 156-67.
71. Cassar S, Huang X, Cole T. A high-throughput method for predicting drug effects on gut transit time using larval zebrafish. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2015; 76: 72-5.
72. Canedo A, Rocha TL. Zebrafish (*Danio rerio*) using as model for genotoxicity and DNA repair assessments: Historical review, current status and trends. *Sci Total Environ.* 2021; 762: 144084.

73. Hallauer J, Geng X, Yang HC, Shen J, Tsai KJ, Liu Z. The Effect of Chronic Arsenic Exposure in Zebrafish. *Zebrafish*. 2016; 13(5): 405-12.
74. Horie Y, Yamagishi T, Takahashi H, Shintaku Y, Iguchi T, Tatarazako N. Assessment of the lethal and sublethal effects of 20 environmental chemicals in zebrafish embryos and larvae by using OECD TG 212. *Journal of applied toxicology : JAT*. 2017; 37(10): 1245-53.
75. Sant KE, Jacobs HM, Borofski KA, Moss JB, Timme-Laragy AR. Embryonic exposures to perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) disrupt pancreatic organogenesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental pollution*. 2017; 220(Pt B): 807-17.
76. Matsumoto H, Fujiwara S, Miyagi H, Nakamura N, Shiga Y, Ohta T, et al. Carbonic Anhydrase Inhibitors Induce Developmental Toxicity During Zebrafish Embryogenesis, Especially in the Inner Ear. *Mar Biotechnol (NY)*. 2017; 19(5): 430-40.
77. Rah YC, Yoo MH, Choi J, Park S, Park HC, Oh KH, et al. In vivo assessment of hair cell damage and developmental toxicity caused by gestational caffeine exposure using zebrafish (*Danio rerio*) models. *Neurotoxicol Teratol*. 2017; 64: 1-7.
78. Stengel D, Zindler F, Braunbeck T. An optimized method to assess ototoxic effects in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2017; 193: 18-29.
79. Takemoto Y, Hirose Y, Sugahara K, Hashimoto M, Hara H, Yamashita H. Protective effect of an astaxanthin nanoemulsion against neomycin-induced hair-cell damage in zebrafish. *Auris Nasus Larynx*. 2018; 45(1): 20-5.
80. Philip RC, Rodriguez JJ, Niihori M, Francis RH, Mudery JA, Caskey JS, et al. Automated High-Throughput Damage Scoring of Zebrafish Lateral Line Hair Cells After Ototoxin Exposure. *Zebrafish*. 2018; 15(2): 145-55.
81. Jacobs HM, Sant KE, Basnet A, Williams LM, Moss JB, Timme-Laragy AR. Embryonic exposure to Mono(2-ethylhexyl) phthalate

- (MEHP) disrupts pancreatic organogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*. 2018; 195: 498-507.
82. Miller GW, Chandrasekaran V, Yaghoobi B, Lein PJ. Opportunities and challenges for using the zebrafish to study neuronal connectivity as an endpoint of developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 2018; 67: 102-11.
 83. Yoshioka W, Tohyama C. Mechanisms of Developmental Toxicity of Dioxins and Related Compounds. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(3).
 84. Shen C, Zuo Z. Zebrafish (*Danio rerio*) as an excellent vertebrate model for the development, reproductive, cardiovascular, and neural and ocular development toxicity study of hazardous chemicals. *Environmental science and pollution research international*. 2020; 27(35): 43599-614.
 85. Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020; 2020.
 86. Taxonomy N. *Danio rerio* 2020 [cited 2021 29/07/2021]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=7955&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s&log_op=lineage_toggle.
 87. Vargas-Vargas RA. Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anestesia en México*. 2017; 29(1): 86-96.
 88. Hsu AY, Gurol T, Sobreira TJP, Zhang S, Moore N, Cai C, et al. Development and Characterization of an Endotoxemia Model in Zebra Fish. *Front Immunol*. 2018; 9:607.
 89. Khan KM, Collier AD, Meshalkina DA, Kysil EV, Khatsko SL, Kolesnikova T, et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2017; 174(13): 1925-44.
 90. Lavergne A, Tarifeno-Saldivia E, Pirson J, Reuter AS, Flasse L, Manfroid I, et al. Pancreatic and intestinal endocrine cells in zebrafish share common transcriptomic signatures and regulatory programmes. *BMC Biol*. 2020; 18(1): 109.

91. Dabrowski K, Miller M. Contested Paradigm in Raising Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*. 2018; 15(3): 295-309.
92. Rodríguez González JC, Rodeiro Guerra I. El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos %J *Revista Cubana de Farmacia*. 2014; 48: 495-507.
93. Croom E. Chapter Three - Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. In: Hodgson E, editor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 112: Academic Press; 2012. p. 31-88.
94. Satbhai K, Vogs C, Crago J. Comparative toxicokinetics and toxicity of PFOA and its replacement GenX in the early stages of zebrafish. *Chemosphere*.; *Chemosphere*. 2022; 308(1): 136-131
95. Lv, L., Gao, Z., Mao, L. et al. Insights into the combined toxic impacts of phoxim and deltamethrin on the embryo-larval stage of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Eur* 2022; 34-90
96. Hongwei L, Qingping D, Zuanjia Z, Yanbin X, Jinping P, Protein-coated microplastics corona complex: An underestimated risk of microplastics, *Science of The Total Environment*, 2022; 851(1): 157-948
97. Silva Brito R, Canedo A, Farias D, Rocha TL. Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends. *Sci Total Environ*. 2022; 848: 157-665.

CAPÍTULO 3

Hydra Vulgaris en el estudio de la Toxicología Ambiental

Laura Rocío Martínez León
Ruth Mélida Sánchez Mora

La información que se relaciona con las enfermedades causadas por la contaminación ambiental, ha sido producto de diversos ensayos a nivel de laboratorio, en la experimentación de animales, estudios toxicológicos y el uso de modelos. Esto ha permitido establecer una relación entre la afectación del medio ambiente y las consecuencias en la salud humana, las cuales generan un problema de salud pública (1,2).

Gracias a sus características *Hydra vulgaris* (*H. vulgaris*) ha surgido como un modelo en biología acerca del desarrollo y el envejecimiento, es un organismo indicador. Por ejemplo hematoencefálica, en él se han realizado ensayos de toxicidad para observar las consecuencias teratogénicas causadas por compuestos químicos (3). Por lo anterior, en el presente capítulo se describe el modelo biológico *H. vulgaris*, su historia y sus principales aportes a la ciencia, las generalidades, uso en el laboratorio y en especial, las aplicaciones del modelo a investigaciones que tienen relación con la toxicología ambiental.

3.1 Historia

Hydra es un modelo importante desde el año 1950, fecha en la cual se establecieron los protocolos para su cultivo (3). En el área de la enseñanza ha sido útil para explicar procesos como la reproducción asexual o la regeneración de los tejidos, ya que es un modelo fácil de mantener en el laboratorio, y a su vez de recolectar en el medio ambiente. Además, puede ser alimentado con presas vivas y solo requiere de un mantenimiento higiénico para sobrevivir.

Por lo anterior, a partir del estudio de este modelo se pueden conocer las alteraciones a nivel morfológico, reproductivo y fisiológico del animal, que se provocan por la exposición de sustancias tóxicas, ya sean químicas o contaminantes ambientales, así como las relacionadas con la temperatura y pH del medio, permitiendo el análisis de cada modificación gracias a su sensibilidad a los cambios bruscos en su medio de desarrollo (4). Sus aportes más importantes se recopilan en la línea del tiempo (Tabla 5).

En 1740 Abraham Trembley, en un recorrido por la mansión donde trabajaba, vio un estanque donde se observaban unas pequeñas plantas gelatinosas que tenían unas protuberancias largas, esta planta se trataba del famoso pólipo de agua dulce *H. vulgaris*, que para el año 1703 ya Anton Van Leeuwenhoek había clasificado como planta en su comunidad científica. Trembley movido por la curiosidad tomó varias plantas y las adicionó en frascos de vidrio para realizar sus observaciones, allí descubrió que estas plantas tenían más un comportamiento animal, porque mostraban una serie de contracciones, además las protuberancias con las que contaban respondían al tacto y una de ellas atrapaba presas para acercarlas a una abertura (boca) para su ingestión (5). La planta también contaba con una capacidad de regenerarse al ser amputado alguno de sus tentáculos, es allí donde en compañía del científico René Antoine Fercchault de Réaumur, se decide incorporar este ser vivo al reino animal.

En 1970, la regeneración de la *H. vulgaris* genera gran curiosidad, y para poder analizar mejor este fenómeno se plantea el uso de inhibidores del metabolismo energético para evaluar cómo afecta este

proceso. Uno de los inhibidores fue la actinomicina D, la cual fue adicionada a las hidras que con anterioridad fueron amputadas. Se tuvo en cuenta la longitud del tentáculo regenerado y se evidenció que el tiempo de reconstitución se retrasó, la tasa de regeneración tuvo una disminución y posterior a esto ocurrió la citólisis (6).

Para 1991, al ver los cambios morfológicos tan notorios que presentaba hidra, se quiso evaluar el efecto que tenían ciertos insecticidas sobre este organismo, se usó Dimiline, Torak y Gamacide. Mediante los ensayos se pudo comprobar que los tres provocaron cambios citológicos e histológicos en hidra; además el insecticida Dimiline fue considerado como el menos perjudicial ya que solo afectó los tentáculos, a diferencia de los otros dos insecticidas, quienes además causaron un daño a la cúpula (donde salen los tentáculos) llamada hipostoma, y también se vio interrumpida la contracción del animal, la cual es una característica propia (7).

Por otro lado, en 1994, se analizó de diversas maneras las interacciones que se dan en la célula con la matriz extracelular, a través del uso de injertos de hidra usando sustratos *In Vivo* como beta-aminopropionitrilo, beta-xilosido, fibronectina y péptido sintético, los cuales actuaron como inhibidores de la migración celular, mostrando que las interacciones que se dan célula-matriz son indispensables para que se dé la migración celular (8). Asimismo, en relación con la matriz extracelular también aparece el concepto de clonación y la manera en que la lamina de *H. vulgaris* se conserva y desempeña su función biológica (9).

H. vulgaris también ha permitido realizar estudios complejos en sus genes, en 1999 se lograron aislar diversos genes relacionados con proteínas, como por ejemplo, el gen que codifica para tirosina-quinasa (10), ya para el año 2002 se realizan estudios sobre la toxicidad producida en la hidra con compuestos encontrados en agua dulce, analizando la regeneración de los pólipos, el movimiento y la supervivencia, mostrando que los procesos básicos de *H. vulgaris* no se ven afectados por concentraciones mínimas de compuestos como el bisfenol A y el 17 -etinilestradiol (11).

A medida que ha transcurrido el tiempo, el modelo *H. vulgaris* ha evolucionado en su estudio y conocimiento proporcionado, lo que ha permitido profundizar en temas como el sueño y el desarrollo del sistema nervioso central (12). Estas grandes capacidades y características han hecho de este organismo un modelo fácil de manejar y le han permitido ser catalogado como modelo estrella para el estudio de la senescencia y el envejecimiento (ver estudios realizados a través del tiempo - Tabla 5) (13).

Tabla 6. Línea del tiempo de *H. vulgaris*

AÑO	SUCESO
1950	Protocolos para el cultivo de <i>H. vulgaris</i> (5).
1703	Anton Van Leeuwenhoek clasifica a la hidra como una planta (5).
1704	Abraham Trembley encuentra al pequeño pólipo de agua dulce en su trabajo, y se da cuenta de su regeneración (5).
1970	Se empiezan a usar sustancias para analizar cómo afecta la regeneración en <i>H. vulgaris</i> , se probó actinomicina D (6).
1991	Evaluación de los efectos de tres insecticidas, Dimiline, Torak y Gamacide, sobre la morfología de <i>H. vulgaris</i> (7).
1999	Se lograron aislar diversos genes de <i>H. vulgaris</i> (10).
2002	Se realizan estudios sobre la toxicidad producida en <i>H. vulgaris</i> por compuestos de agua dulce como Bisfenol A y el 17 α -etinilestradiol (11).
2004	Evidencia inmunohistoquímica de un receptor en células disociadas de <i>H. vulgaris</i> (31).
2009	Participación del óxido nítrico en la regeneración de <i>H. vulgaris</i> (32).
2010	Estudios de respuestas a estrés en <i>H. vulgaris</i> (33).
2014	Obtención del genoma mitocondrial completo de <i>H. vulgaris</i> (34).

AÑO	SUCESO
2015	<i>H. vulgaris</i> como excelente modelo para la senescencia (35).
2017	Señalización de insulina e IGF en respuesta a la alimentación en <i>H. vulgaris</i> (36).
2020	Estudios del sueño y sistema nervioso central de <i>H. vulgaris</i> (37).
2021	Toxicidad en <i>H. vulgaris</i> a causa de micotoxinas ambientales (38).

Fuente: Elaboración propia.

3.2 Generalidades del modelo

Las hidras son animales marinos que pertenecen al filo *Cnidaria* (Tabla 6). Al igual que las medusas, corales y aeromonas, las hidras también se encuentran en agua dulce y allí se conocen como pólipos de agua dulce, estas pertenecen a la clase *Hydrozoa* (14).

Tabla 7 Taxonomía de *H. vulgaris*

Reino	Animalia
Filo	<i>Cnidaria</i>
Clase	<i>Hydrozoa</i>
Orden	<i>Anthoathecatae</i>
Familia	<i>Hydridae</i>
Género	<i>Hydra</i>
Especie	<i>Hydra vulgaris</i>

Fuente: Elaboración propia.

H. vulgaris conocido también como el pólipo de agua dulce, se encuentra en la literatura como *Hydra attenuata* e *Hydra magnipapillata*, los cuales son sinónimos de su nombre (15). Es un microinvertebrado que mide alrededor de 15 mm sin incluir tentáculos, se encuentra de manera abundante en los estanques y corrientes, adherido a las

piedras y vegetación acuática (16). Por otro lado, posee de 4 a 12 tentáculos que surgen de la parte exterior de la boca, estos le sirven de agarre a las rocas y además es por medio de estos que se alimenta, pues una vez los tentáculos tocan el alimento es llevado a la boca para la ingestión y digestión (figura 15). Esta especie de hidra se mueve dejándose llevar por la corriente, aunque también se mueve inclinándose, realizando un agarre sobre sus tentáculos y dando una vuelta sobre sí mismo (17).

H. vulgaris ha sido elegida como modelo para estudiar los principios de la regeneración, debido a que puede regenerar tejidos completos a partir de pólipos afectados (18). Este organismo es de fácil cultivo en el laboratorio, tiene una rápida reproducción, también posee una estructura primaria que hace más fácil el intercambio intra y extracelular y de esta misma manera la detección de sustancias tóxicas, lo que a su vez permite que presente cambios a nivel de su morfología que pueden ser observables e interpretados (19).

Por otra parte, *H. vulgaris* desde 1741 ha permitido grandes aportes a nivel de la biología, al permitir estudiar la ecotoxicidad de los ecosistemas y respuestas inmunológicas al estrés, además de procesos del ciclo celular, muerte celular, neurogénesis y comportamientos de neuroseñalización, envejecimiento inducible, reversión del sexo, germinación de células madre, transdiferenciación, pedagogía y comunicación científica (20).

Figura 15. Se observa *H. vulgaris* en su hábitat



Fuente: Tomada de <https://www.flickr.com/photos/microagua/16624195064>

3.2.1 Distribución geográfica y hábitat

Las hidras viven en cualquier depósito de agua dulce, en su mayoría se encuentran distribuidas en las aguas de América del Norte. El agua debe estar limpia y con buen oxígeno, ya sea con corriente o estancada, lo que interesa en el ambiente es que el agua no esté contaminada y que exista abundante zooplancton y fitoplancton. La buena vegetación y buena oxigenación hacen que el desarrollo de la hidra se favorezca.

Al ser de un tamaño reducido, resulta difícil su observación en la naturaleza, ya que en su mayoría están adheridas a pequeñas plantas y rocas, además que suelen contraerse con facilidad. *H. vulgaris* tiene una simbiosis obligada con *Chlorella*, un alga verde que habita dentro de las células del gastrodermo, las sustancias que se obtienen de esta simbiosis sirven para su metabolismo.(1,9)

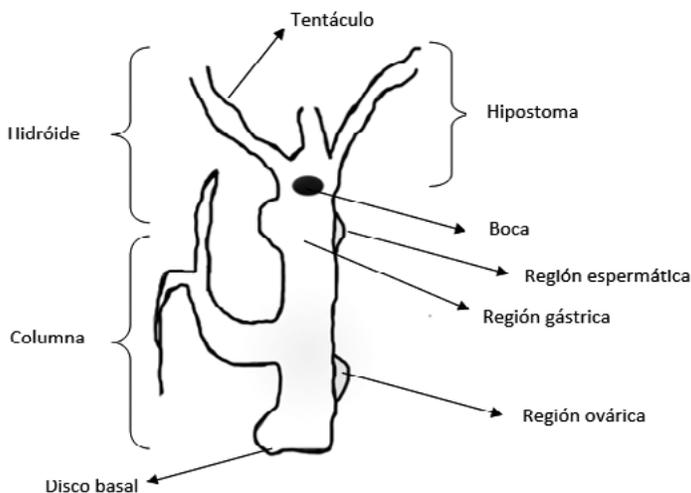
Por otro lado, las hidras también poseen una capacidad adaptativa, a pesar de que su hábitat debe ser agua dulce sin contaminación, estas resisten al aumento de la concentración de nutrientes como nitratos y fosfatos (eutrofización), además toleran los cambios de temperatura y pH, pero son sensibles a la exposición de metales pesados. Estas características hacen que se puedan encontrar distribuidas a nivel mundial (10,11).

3.2.2 Morfología

H. vulgaris es un organismo multicelular simple, posee un tubo con una cabeza en su parte apical, la cual está compuesta de 6 a 8 tentáculos que contienen unas células llamadas nematocistos. Los tentáculos salen de una estructura que tiene forma de cúpula conocida como hipostoma, la cual está rodeando la boca. Su boca no solo cumple funciones de ingestión si no también actúa como aparato excretor cuando ya ha aprovechado su alimento, al final de la columna posee un disco basal.

Este animal tiene dos capas de células, una llamada epidermis y otra gastrodermis, las cuales están separadas por una matriz extracelular que se conoce como mesoglea. Estas capas hacen que se den las interacciones célula a célula (22), las células epiteliales están siempre en contacto con el ambiente acuoso, permitiendo que todas las sustancias tóxicas lleguen a la superficie total de animal (3) (Figura 16).

Figura 16. Se observa anatomía de *H. vulgaris*



Fuente: Tomada y modificada: <https://www.medigraphic.com/pdfs/bolclinhosinfson/bis-2011/bis111h.pdf> <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/573/cap3.pdf>

La columna está dividida en cuatro secciones: la parte gástrica está ubicada en medio de los tentáculos y la primera yema, la siguiente sección es la que produce los brotes, continuo a esta sección se encuentra el pedúnculo que esta entre la yema más baja y el disco basal y por último el disco basal que es la estructura que tiene forma de pie y sirve de agarre. La complejidad y sencillez estructural de este ser vivo hace que se pueda comparar a un tejido vivo que posee células y regiones con una fisiología conectada (3).

En cuanto a las dos capas de tejido, el endodermo es aquel que recubre la parte gastrovascular del organismo, el cual actúa como un esqueleto hidrostático y es allí donde se produce la digestión de los alimentos y también la absorción de los nutrientes. El sistema nervioso también es simple y lo compone una red nerviosa que se expande por todo el organismo (3).

Reproducción

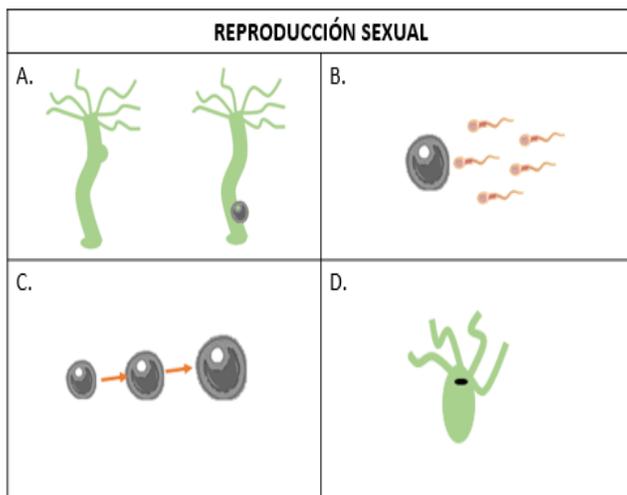
Este organismo se reproduce tanto asexual como sexualmente. La forma asexual se da por gemación, dicho proceso dura de 2 a 4 días y finaliza cuando la célula hija se separa para ser un organismo independiente (23). De este tipo de reproducción se originan un número enorme de microorganismos, los cuales son idénticos genéticamente, esto otorga una ventaja a la hora de experimentar con este organismo ya que, gracias a la poca variación genética los resultados se reproducen más fácilmente con una variación mínima, además permite que se cultiven grandes cantidades de hidras en poco tiempo.

La reproducción sexual, se da gracias a que posee gónadas masculinas y femeninas, las cuales dan lugar a que se desarrolle el ciclo sexual, este tipo de reproducción se da en condiciones de estrés, por ejemplo, cuando varía la temperatura del agua, altos niveles de dióxido de carbono (23), o cuando hay estrés a causa de la densidad de la población (3).

Los testículos están formados por células intersticiales y se da lugar a una protuberancia, por otro lado, en el ovario se forma un ovocito grande. Posterior a la ruptura de la epidermis el ovulo maduro es fecundado por los espermatozoides que han sido liberados en el agua, este ovulo se mantiene en el ovario de los padres y es allí donde se da origen al embrión por medio de la división y la gastrulación, luego se forma una capa alrededor del embrión que lo protege, el ovulo siguiente en ser fertilizado permanece inactivo mientras el embrión que surge se forma como un pólipo pequeño que ya tiene boca, tentáculos y cuerpo (23) (figura 17).

Existe otro llamado mecanismo de reproducción o supervivencia, y este ocurre cuando una hidra al cortarse en varios segmentos, obtiene segmentos de gran tamaño, donde uno de ellos se convierte en una hidra nueva de un tamaño parecido al segmento cortado (17).

Figura 17. Reproducción sexual de *H. vulgaris*



Nota: A. Formación de protuberancia en la región espermática (imagen izquierda), región ovárica (imagen derecha), B. Liberación del ovulo al agua y fecundación por los espermatozoides libres. C. Formación del embrión por medio de la gastrulación y división. D. Formación de un pólipo pequeño con cuerpo, boca y tentáculos.

Fuente: Elaboración propia.

Alimentación

Las hidras toman con sus protuberancias partículas que se encuentran en el agua, las partículas son vegetales como detritos, fitoplancton o también animales como larvas y restos de invertebrados microscópicos como *Daphnia* o *Cyclops*. En este proceso para alimentarse también intervienen los nematocistos, los cuales liberan algunas sustancias con

función neurotóxica permitiendo que se fijen las partículas, para luego dirigir el alimento a la boca. Esta alimentación tiene un efecto directo sobre la reproducción, la abundancia y el crecimiento de la población, ya que si esta alimentación se da con sustancias tóxicas afectaría a la población y la supervivencia. Varios estudios han mostrado que la tasa de población está relacionada con la frecuencia con la que ocurre la alimentación (1,11).

La captura e ingestión de las partículas es denominada respuesta o reacción de alimentación, esto porque la alimentación de hidra empieza con una relación entre el glutatión con un quimiorreceptor, ya que gracias a esto son detectados los fluidos liberados a raíz de las heridas de la presa ocasionadas por los nematocistos, esta relación en algunas ocasiones se ve afectada por condiciones ambientales, obstaculizando el proceso de alimentación por el estrés oxidativo o porque se encuentren cantidades disminuidas de glutatión. Esta reacción de alimentación que se da en las hidras es lo que ha permitido que se lleven a cabo con gran éxito estudios de los efectos de productos farmacéuticos y de compuestos tóxicos como los son los metales pesados (3).

Locomoción y Regeneración

H. vulgaris es un animal sedentario, pero a veces suele moverse con rapidez y esto ocurre en su mayoría cuando se dispone a cazar o atrapar su alimento, para esto, inicialmente ejerce un movimiento hacia delante de inclinación, para luego adherirse con los tentáculos y la boca para soltar el pie, que es la estructura de agarre inicia. Posterior a este movimiento inclina nuevamente el cuerpo para poder anclar el pie en otro lugar para ir avanzando poco a poco, con estos pequeños pasos *H. vulgaris* logran avanzar hasta 100 mm, aunque en su mayoría estos diminutos animales prefieren dejarse llevar por la corriente (14).

Hidra tiene la capacidad de regeneración y por esto es considerado un organismo con vida eterna o difícil de extinguir, esta característica que lo hace un animal muy particular se da porque es capaz de renovar sin límite de veces sus partes amputadas a partir de células pluripotentes,

incluyendo sus células nerviosas. Cuando hidra pierde la cabeza o el pie, estos vuelven a crecer en corto tiempo, además cuando pierde segmentos que quedan libres estos suelen desarrollar nuevamente una cabeza en su parte apical y un pie en la parte basal terminal dando origen a un nuevo individuo (3,14).

Esta característica original del individuo ha permitido que a través de la disgregación de un individuo se pueda obtener un complejo celular, que en conjunto empiezan a formar unas esferas celulares que posteriormente dan origen a los tentáculos y cuerpos que en unos días será un individuo independiente, y esto se origina debido a que en el centro corporal del individuo se está dando una continua multiplicación y división de las células madre que van migrando hacia las extremidades del individuo, para luego iniciar el proceso de diferenciación y así mismo, ir reemplazando las células que son eliminadas a través del pie o de los tentáculos. En consecuencia, esta regeneración de manera continua hace que este individuo permanezca joven y que por la misma razón a través del estudio de los marcadores de envejecimiento estos den resultados negativos (21).

A nivel de laboratorio la regeneración ha podido ser medida mediante el uso de células ya disociadas para generar un embrión de manera artificial, y también se ha implementado el uso de regiones gástricas disecadas, la cual es una zona rica en células madre multipotentes que están activas para poder analizar este fenómeno, por estos descubrimientos, hidra ha servido como modelo indispensable para medir el potencial teratogénico de varias sustancias químicas, muestras de agua, productos farmacéuticos o sustancias que actúan como disruptores endocrinos (3).

3.3 Manipulación del modelo en el laboratorio

A la hora de realizar un cultivo de *H. vulgaris*, se tienen ventajas y desventajas (Figura 18), inicialmente lo ideal es usar recipientes de 20 cm diámetro, en el cual se puedan adicionar de 2 a 3 cm de medio de cultivo para que los animales estén sumergidos (19), la temperatura óptima debe ser baja ya que se desarrollan mejor en temperaturas

frías y los animales son más fuertes y grandes, el rango de temperatura oscila entre los 18 a 21°C, los recipientes tienen que permanecer en fotoperiodo, donde 16 horas son de luz y 8 de oscuridad. Es importante tener en cuenta que estos animales normalmente pasan por unas etapas de depresión donde el desarrollo se ve ralentizado, no se alimentan y empiezan a desintegrarse, para ello es recomendable que se hagan varios cultivos al tiempo, además también se recomienda usar solo agua de estanque o mezclada con agua desionizada, y si se llegase a usar agua de grifo eliminar las sales presentes y realizar la respectiva filtración para evitar el cambio de agua diario (23).

Figura 18. Esquema ventajas y desventajas del uso en el laboratorio de *Hidra vulgaris*



Fuente: Elaboración propia.

El medio de cultivo contiene $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, N-tris (hidroximetil) metil 1-2 aminoetanosulfónico, Buffer TES, ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) y agua destilada, estos reactivos son disueltos en 1 Litro de agua, después se adiciona una solución de polipropileno y se completa a 20 L con agua destilada, esto con anterioridad ha sido pasado por un filtro con carbón activado, grava y algodón, el pH indicado es

de 7.0 +/- 0,1, el cual se puede ajustar con solución NaOH o HCl, el volumen que se prepara se puede almacenar a medio ambiente para seguir adicionando medio fresco al cultivo (24).

H. vulgaris puede ser alimentada con *Artemia sp* o cuando es de gran tamaño también se le puede proporcionar larvas de *Daphnia sp*, esto debe realizarse por lo menos cuatro días a la semana, junto con una limpieza dos veces al día, que se recomienda sea después de la alimentación (19).

Para el proceso de alimentación los huevos tanto de *Artemia sp* como los de *Daphnia sp*, deben pasar por un proceso de eclosión para liberar los nauplios o larvas respectivamente, para esto se puede hacer uso de solución salina en una concentración de 10 g NaCl/L. Luego de esto los nauplios o larvas se quedan flotando y los huevos que no eclosionan se sedimentan. Con una pipeta Pasteur se toman las larvas y se procede a realizar el proceso de desinfección para no contaminar el cultivo, posterior a esto se toman las larvas y se alimenta la hidra colocándolos en forma de zigzag, luego de 4 a 5 horas de la alimentación se procede a realizar una limpieza para eliminar restos de la digestión (25).

3.4 Hidra como modelo y su aporte a la toxicología ambiental

En el campo de la investigación se hace necesario el uso a nivel de laboratorio de células y organismos microscópicos o macroscópicos que sirvan de modelo para el estudio y la comprobación de diversas hipótesis en los distintos campos de la ciencia. Se conoce en cuanto al medio ambiente que uno de los recursos más implicados en la contaminación es el agua, estudio que es de vital importancia, ya que si se conocen los tipos de contaminantes que afectan las aguas, es más probable emprender acciones de protección sobre este gran ecosistema (3). Por lo anterior, se busca informar en este apartado de nuestro libro sobre aquellos estudios donde *H. vulgaris* ha hecho su aparición.

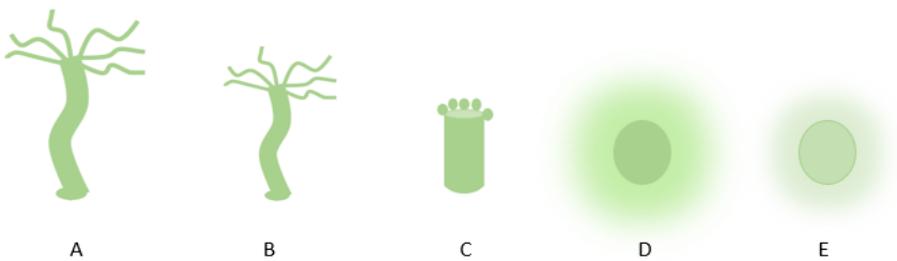
H. vulgaris ha cobrado importancia a través del tiempo en la toxicología acuática, porque en ella se ha logrado evidenciar sensibilidad a diferentes compuestos y debido a la cantidad en la que se encuentra en aguas,

también permite que sea bioindicador demostrable, además de las múltiples evaluaciones que se pueden hacer mientras se estudia con este cnidario, tales como su reproducción asexual, estrés oxidativo, cambios en su morfología, comportamiento y en su alimentación (3).

Uno de los contaminantes mayormente encontrados en agua son los metales pesados, ya que estos originan efectos crónicos, toxicidad y en algunas ocasiones defectos en los fetos, normalmente estas sustancias en mínimas concentraciones son inofensivas y también son necesarias para los procesos bioquímicos que se dan en el ser humano, estos son cromo, zinc y cobre, por el contrario, otros metales pesados son no esenciales y tienen la característica de acumularse en los tejidos como cadmio, mercurio, arsénico y plomo. Por esto, es importante realizar estudios *in vitro* para conocer más a fondo que efectos causan a diferentes concentraciones estos compuestos en la salud humana (26).

En varios estudios se ha podido demostrar que los metales pesados causan gran daño a *H. vulgaris* (figura 19) y se acumulan en los nematocistos porque este cnidario no posee metalotioneina, la cual es una proteína de unión que ayuda a retener los metales pesados (26).

Figura 19. Descripción de la morfología de *H.vulgaris* en respuesta a la toxicidad



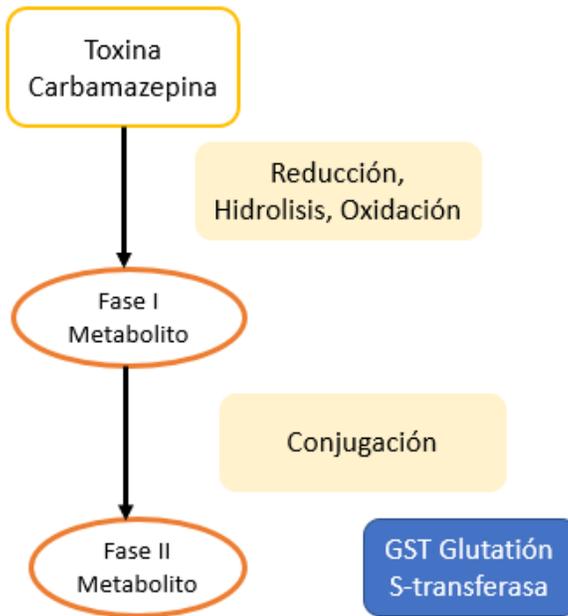
Nota: A. Morfología normal. B. Tentáculo acortado/aplastado. C. Tulipan. D. Pérdida de regulación. E. Desintegración.

Fuente: Elaboración propia basada en: <https://journals.mcmaster.ca/sciential/article/view/2136/1554>

En un estudio realizado en el año 2000, para evaluar la toxicidad crónica causada en *H. vulgaris* por cadmio y zinc, se cultivó *H. vulgaris* teniendo en cuenta el uso de agua debidamente esterilizada para evitar infecciones, se alimentó con nauplios de *Artemia sp*, además se midieron diariamente parámetros como la temperatura, pH, oxígeno disuelto, dureza de calcio y magnesio del agua que se usa para cada solución, se midió toxicidad aguda y crónica, se utilizó concentración letal 50 y se realizaron diferentes observaciones para evaluar los cambios. Mediante estos ensayos se evidenció que *H. vulgaris* murió a una concentración de cadmio de 82.5 g/L, y también se demostró que el crecimiento poblacional también se vio afectado por este compuesto(27).

Por otro lado, al realizar los ensayos con zinc se pudo evidenciar que la concentración a la que ocurrían los daños en *H. vulgaris* era mayor, 8.000 g/L, no solo morían si no también la tasa de crecimiento poblacional se veía afectada, tal como ocurrió con el cadmio. Lo anterior tiene relación en el hecho que cadmio es un metal no esencial por lo cual mínimas concentraciones podrían causar daño, por el contrario el compuesto zinc, es esencial para muchas funciones biológicas que se desarrollan en los organismos, por lo tanto, se concluyó que se ven afectados en *H. vulgaris* los procesos metabólicos y biológicos del cnidario (27).

A través de los estudios de toxicidad, se ha logrado establecer que *H. vulgaris* también posee enzimas de desintoxicación, tales como Glutathion S-transferasa, la cual es importante en la biotransformación de compuestos exógenos y endógenos. Esto se evidenció mediante el uso de un medicamento llamado carbamazepina, (figura 20), el cual también se encuentra en diferentes concentraciones ambientalmente. Al alimentar a hidra con este fármaco se mostró su capacidad de conjugación y por lo tanto la ausencia de la bioacumulación de este compuesto (3).

Figura 20. Mecanismo de desintoxicación de *H. vulgaris*

Fuente: Información tomada de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22689364/>

Otro compuesto analizado en *H. vulgaris* ha sido el Bisfenol A, el cual es proveniente de las industrias que manejan el plástico de policarbonato. Este no solo llega a las fuentes hídricas a través de los residuos provocados por las empresas manipuladoras, si no también hace presencia en recipientes de plástico, tales como biberones, juguetes, utensilios de cocina, incluso revestimiento de empaque de alimentos, lo cual hace que este en contacto de manera constante con el ser humano. Este compuesto ha sido catalogado como un disruptor endocrino, lo que quiere decir que se comporta y realiza funciones en el organismo similares a las que realizan las hormonas disparando procesos metabólicos de manera incontrolable (28).

Tras la exposición a hidra con Bisfenol A, se demostró que sufrió cambios morfológicos notorios, además la capacidad de regeneración y alimentación se vieron altamente afectadas, esto fortaleció la idea de que este organismo es sensible a diversos contaminantes ambientales,

teniendo en cuenta que las concentraciones de bisfenol A utilizadas son las que normalmente se encuentran en los cuerpos de agua (28).

En el mismo sentido, los compuestos teratogénicos son aquellos agentes ya sean biológicos, físicos o químicos que tienen la capacidad de generar malformaciones en el embrión. Dentro de este grupo de contaminantes se encuentran antibióticos, extractos, humo de cigarrillo y sustancias psicoactivas como la cocaína, y en este caso *H. vulgaris* se ha convertido en un modelo prueba para la ecotoxicología, ya que posee una capacidad regenerativa que permite analizar el efecto de los teratogénicos en su desarrollo. Lo que ocurre es que tras exponer a *H. vulgaris* a muestras de agua se evidencia que la regeneración se ve retrasada totalmente (29).

3.5 Conclusión

A raíz del aumento de tóxicos en el ambiente y de la gran posibilidad de *H. vulgaris* de permitir variedad de métodos, donde lo que se busca es la correlación de las afectaciones causadas por el aumento de los tóxicos en el medio donde crece, es que se han desarrollado ensayos relevantes que destacan a *H. vulgaris* como el modelo óptimo para usar en diversas investigaciones y con mayor aplicación en el área de la toxicología ambiental, por su regeneración. Es importante resaltar que en la actualidad se sigue fortaleciendo el uso de este pólipo de agua dulce en las investigaciones, tanto con sustancias conocidas como con soluciones de las cuales no se conoce su composición (30).

Referencias Bibliográficas

1. Villar Aguirre M. Determining factors in health: Importance of prevention. *Acta Med Per* [Internet]. 2011;28(4):237-41. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172011000400011&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172011000400011
2. Guadalupe D, Pulido TA. Viva salud noviembre diciembre. [cited 2021 Jul 19]; Available from: <http://www.jornada.unam.mx/2007/08/16/index.php?section=sociedad&article=039n1soc>
3. Quinn B, Gagné F, Blaise C. Hydra, a model system for environmental studies. *Int J Dev Biol*. 2012; 56(6-8): 613-25.
4. Ghaskadbi S. Hydra: A Powerful Biological Model. *Resonance*. 2020; 25(9): 1197-213.
5. Bernat P. El pòlip de Trembley: L'"animal-planta" que va sacsejar la biologia del segle XVIII. *Mètode Pop Sci J*. 2013; 0(78).
6. Datta S, Chakrabarty A. Effects of actinomycin D on the distal end regeneration in *Hydra vulgaris* Pallas. *Experientia*. [Internet] 1970 [cited 2021 Jul 22] (8): 855-6. Available from: <https://doi.org/10.1007/bf02114220>
7. Kalafatic M, Znidaric D, Lui A, Wrischer M. Effect of insecticides (Dimiline WP 25, Torak EC 24 and Gamacide 20) on hydra (*Hydra vulgaris* Pallas). *Int J Dev Biol*. [Internet] 1991; [cited 2021 Jul 22] 35(3):335-40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1726048/>
8. Sarras MP, Zhang X, Huff JK, Accavitti MA, St. John PL, Abrahamson DR. Extracellular matrix (Mesoglea) of *hydra vulgaris*: III. Formation and function during morphogenesis of hydra cell aggregates. *Dev Biol*. [Internet]. 1993 [cited 2021 Jul 22]; 157(2):383-98. Available from: <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1143>
9. Sarras MP, Yan L, Grens A, Zhang X, Agbas A, Huff JK, et al. Cloning and biological function of laminin in *hydra vulgaris*.

- Dev Biol. [Internet]. 1994 [cited 2021 Jul 22]; 164(1): 312-24. Available from: <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1201>
10. Pillai A, Gungi A, Reddy PC, Galande S. Epigenetic Regulation in Hydra: Conserved and Divergent Roles. *Front Cell Dev Biol*. May 10; 9:663208. [Internet]. 2021 [cited 2021 Jul 22]; Available from: doi: 10.3389/fcell.2021.663208.
 11. Traversetti, L., Del Grosso, F., Malafoglia, V. et al. The Hydra regeneration assay reveals ecological risks in running waters: a new proposal to detect environmental teratogenic threats. *Ecotoxicology* 26, 184-195 [Internet]. 2017 [cited 2021 Jul 22];43(1): 56-63. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1753-4>
 12. Kanaya H, et al. A sleep-like state in Hydra unravels conserved sleep mechanisms during the evolutionary development of the central nervous system. *Sci Adv* [Internet]. 2020 Oct 7 [cited 2021 Jul 22]; 6(41). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33028524/>
 13. AJ, Bellantuono, AJ, D, Bridge, DE, Martínez. Hydra as a tractable, long-lived model system for senescence. *Invertebr Reprod Dev* [Internet]. 2015 Jan 30 [cited 2021 Jul 22];59(sup1):39-44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26136619/>
 14. Hidras - EcuRed [Internet]. [cited 2021 Jun 17]. Available from: https://www.ecured.cu/Hidras#Taxonom.C3.ADA_y_sistem.C3.A1tica
 15. Navegador de taxonomía (Hydra vulgaris) [Internet]. [cited 2021 Jun 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
 16. F, Keifer GEffenberger. Identificación y evaluación del riesgo. *Angew Chemie Int Ed* 6(11), 951-952. 1967.
 17. Hydra vulgaris [Internet]. [cited 2021 Jun 19]. Available from: https://tvd.wiki/wiki/Hydra_vulgaris

18. Vogg MC, Galliot B, Tsiairis CD. Model systems for regeneration: Hydra. Dev [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Jun 19]; 146(21). Available from: <https://dev.biologists.org/collection/>
19. Granados YP, Ronco A. Ensayo de toxicidad aguda con el cnidario. 2004; 41-54.
20. Galliot B. Hydra, a fruitful model system for 270 years. Int J Dev Biol. 2012; 56(6-8): 411-23.
21. Hydra vulgaris - enciclopedia de la naturaleza de Mónaco [Internet]. [cited 2021 Jun 24]. Available from: <https://www.monaco-natureencyclopedia.com/hydra-vulgaris/?lang=en>
22. Field-cortazares J, Calderón-campos R. Hidra de Agua Dulce. Boletín Clínico Hosp Infant del Estado Son. 2011; 28(1): 31-3.
23. Gloman C, Pescatore M. Working with HDV. Work with HDV. 2006;
24. Huarachi R. Gonzalez R. La calidad de aguas del Río chili, Arequipa, Perú. The Biologist. [Internet] 2012; [cited 2021 Jul 25]. 125-37. Available from: https://www.academia.edu/9113585/Hydra_vulgaris_Pallas_1766_Hydrozoa_Hydridae_como_bioindicador_de_calidad_de_aguas_del_r%C3%ADo_Chili_Arequipa_Per%C3%BA
25. Granados YP, Ronco A, Díaz Báez MC. Ensayos de toxicidad aguda con el cnidario Hydra attenuata. [Internet] 2004; [cited 2021 Jul 25]. 125-37. Available from: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/573/cap3.pdf>
26. Visión de la hidra inmortal como organismo modelo para estudios de toxicidad de metales [Internet]. [cited 2021 Jul 25]. Available from: <https://journals.mcmaster.ca/sciential/article/view/2136/1554>
27. Malhotra N, Hsu HS, Liang ST, Roldan MJM, et al. An Updated Review of Toxicity Effect of the Rare Earth Elements (REEs) on Aquatic Organisms. Animals. [Internet] 2020; [cited 2021 Jul 25] 16;10(9):1663. Available from: doi: 10.3390/ani10091663.

28. Vimalkumar K, Sangeetha S, et al. A systematic review on toxicity assessment of persistent emerging pollutants (EPs) and associated microplastics (MPs) in the environment using the Hydra animal model. Elsevier. [Internet] 2022 Jun. [cited 2021 Jul 25]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1532045622000552?via%3Dihub>
29. Traversetti L, Del Grosso F, Malafoglia V, Colasanti M, Ceschin S, Larsen S, et al. The Hydra regeneration assay reveals ecological risks in running waters: a new proposal to detect environmental teratogenic threats. *Ecotoxicology*. [Internet] 2017 [cited 2021 Jul 25] 184–195. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1753-4>
30. Marchesano V, Ambrosone A, Bartelmess J, Strisciante F, Tino A, Echegoyen L, Tortiglione C, Giordani S. Impact of Carbon Nano-Onions on *Hydra vulgaris* as a Model Organism for Nanoecotoxicology. *Nanomaterials (Basel)*. [Internet] 2015 [cited 2021 Jul 25] 5(3):1331-1350. Available from: doi: 10.3390/nano5031331.

Glosario

- **ADN:** Acido desoxirribonucleico, proteína que constituye el material genético de los seres vivos.
- **Ahr:** Aril hidrocarburo, es un receptor de hidrocarburos y funciona como un factor de transcripción.
- **Apo:** Apolipoproteína, molécula transportadora de lípidos.
- **Cas 9:** CRISPR asociado a la proteína 9, enzima endonucleasa de ADN
- **CGC:** Por sus siglas en inglés Caenorhabditis Genetics Center (Centro de Genética de Caenorhabditis).
- **CP450:** Citocromo P450, Responsables del metabolismo de xenobióticos.
- **CRISPR:** Por sus siglas en inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas), sistema de defensa de procariotas.
- **dpy-7:** Gen de *Caenorhabditis elegans* involucrado en el desarrollo de la cutícula.
- **dvr1:** Gen que codifica para la proteína DVR1 de *Danio rerio* la cual cumple funciones en la embriología del pez.
- **E. coli OP50:** Cepa de *Escherichia coli* utilizada para alimentar en laboratorio de *Caenorhabditis elegans*.
- **ER α :** Receptor de estrógeno alfa, factor de transcripción que participa en la regulación procesos fisiológicos.
- **ER β :** Receptor de estrógeno beta, factor de transcripción que participa en la regulación procesos fisiológicos.
- **ERR γ :** Receptor de estrógeno gamma del Pez cebra, factor de transcripción que participa en la regulación procesos fisiológicos.

- **Fbox:** Proteínas de caja F, en *Caenorhabditis elegans*, median interacciones proteicas.
- **GFP:** Green Fluorescent Protein, por sus siglas en inglés (Proteína verde fluorescente), proteína que emite bioluminiscencia.
- **lncRNA:** Ácido ribonucleico largo no codificante que controla la expresión génica.
- **k-ras:** Proteína de transcripción que controla la multiplicación, maduración y destrucción de las células.
- **L1, L2, L3, L4:** Hace referencia a los estadios larvarios de *Caenorhabditis elegans* conforme a su desarrollo en función de tiempo.
- **lpr-5:** Proteína de *Caenorhabditis elegans* que permite la trasportación de lípidos.
- **miRNA:** Ácido ribonucleico pequeño no codificante, actúa en el silenciamiento o degradación del ácido ribonucleico mensajero.
- **nhf:** Receptor de hormonas nucleares, proteína responsable de detectar hormonas.
- **NRF-2:** Proteína que regula la expresión de genes que ayudan a proteger la célula del daño que causan los radicales libres.
- **nr2f2:** Este gen codifica un miembro de la súperfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas tiroideas.
- **p450 CYP:** Citocromo P450, promueve el metabolismo de xenobióticos.
- **SKN-1:** Proteína skinhead-1, factor de transcripción que actúa en la regulación embrionaria.



En la actualidad son diversas las problemáticas ambientales a las que los seres vivos están expuestos debido a las actividades antropogénicas que impactan de manera negativa en el suelo, agua y aire. Por lo anterior, surge la necesidad de abordar esta problemática y reconocer su impacto en la salud humana. Para ello, es necesario usar modelos animales que permitan identificar la repercusión toxicológica en un ser vivo y así comprender sus consecuencias, con el fin de plantear estrategias que permitan mejorar la calidad medioambiental, restablecer la flora y fauna, y al mismo tiempo minimizar los índices de mortalidad y morbilidad humana debido al déficit de salud ambiental en el mundo.

Entre los modelos ambientales se destacan seres vivos reproducibles, económicos y de fácil manejo, los cuales permiten evaluar dentro de su organismo, patologías ecotoxicológicas y sus respuestas a estas, para poder analizarlas poblacionalmente desde una perspectiva a corto y largo plazo.

En este libro se presentan las características generales de *C. elegans*, *H. vulgaris* y *D. rerio* desde una perspectiva ecotoxicológica. Se abarcan aspectos básicos como crecimiento, mantenimiento, anatomía, avances logrados por medio de su estudio en diversas áreas de la ciencia y finalmente su aplicabilidad en la investigación en el campo de la toxicología ambiental, las novedades actuales y su impacto en la salud. Además, se muestran consultas sistemáticas sobre estos modelos, con el fin de brindar información importante acerca de estos seres vivos útiles para estudios ecotoxicológicos.

ISBN: 978-958-5198-12-8



9 789585 198128