

Tesis de Posgrado

Efectos de los metales pesados en bufo arenarum

Perez de Coll, Cristina Silvia

1994

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Perez de Coll, Cristina Silvia. (1994). Efectos de los metales pesados en bufo arenarum. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2633_PerezdeColl.pdf

Cita tipo Chicago:

Perez de Coll, Cristina Silvia. "Efectos de los metales pesados en bufo arenarum". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2633_PerezdeColl.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES**

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Tema: EFECTOS DE LOS METALES PESADOS EN
BUFO ARENARUM**

Autora: Lic. CRISTINA SILVIA PEREZ de COLL

**Director de tesis
Dr. JORGE HERKOVITS**

**Consejera de Estudios
Dra. MARIA CRISTINA MAGGESE.**

**Lugar de Trabajo: Instituto de Ciencias Ambientales y
Salud (ICAS). Programa de Seguridad Química y
Reproducción (CONICET)**

1994

A José y a mis hijos Constanza, Lucía y Martín

INDICE

- Agradecimientos.....	1
- Abreviaturas.....	2
- Resúmen.....	3
- Objetivos.....	5
- Introducción general	6
- Objetivo 1. Estudiar los efectos de los metales pesados sobre los embriones de <u>Bufo arenarum</u> expuestos en forma continua a partir del estadio de 2 blastómeros en adelante	11
1.1. Cadmio	11
1.2. Plomo	21
1.3. Zinc	26
- Objetivo 2. Estudiar una eventual susceptibilidad diferencial de los embriones a los metales pesados según el estadio de desarrollo en que son expuestos	30
2.1. Introducción	30
2.1.1. Cadmio	30
2.1.2. Plomo	33
- Objetivo 3. Estudiar los efectos de los metales pesados sobre el desarrollo larval temprano de <u>Bufo arenarum</u>	37
- Objetivo 4. Estudiar el efecto de la temperatura sobre la toxicidad de los metales pesados tomando como caso particular el cadmio	40
- Objetivo 5. Cuantificar los contenidos netos de Cd en embriones de <u>Bufo arenarum</u> en determinados estadios del desarrollo y en función de la concentración y tiempo de exposición.....	43
- Objetivo 6. Evaluar algunos procedimientos orientados a reducir los efectos tóxicos del Pb y del Cd y a mejorar el rendimiento de embriones con baja viabilidad.....	46
6. A. Efectos de la interacción Cd/Zn a altas concentraciones de Cd	46

6. B. Efecto protector del Zn contra la toxicidad de bajas concentraciones de Cd	48
6. C. Efectos antagónicos y sinérgicos entre Pb y Zn en las larvas de <u>Bufo arenarum</u>	51
6. D. Efecto protector del Zn en embriones de <u>Bufo arenarum</u> con alta incidencia de mortalidad y malformaciones espontáneas	53
6. E. Efecto protector de los pretratamientos con bajas concentraciones de Cd/Zn sobre la sobrevivencia de las larvas de <u>Bufo arenarum</u> tratadas con Cd	57
- Conclusiones.....	61
- Tablas.....	T.1 - T.14
- Figuras.....	Fig.1 - Fig 17
- Láminas.....	Lám.1 - Lám 5

AGRADECIMIENTOS.

A José Coll, mi esposo y analista de sistemas, quien me asesoró permanentemente en el trabajo de computación, utilización de los softwares más adecuados para procesar los textos, realizar láminas y figuras y utilizar los programas para hacer el análisis estadístico de los datos.

A mi familia, en particular a José y a mis tres hijos por su comprensión y su tiempo y a mis padres que me dieron la posibilidad de comenzar a estudiar biología sin la preocupación por el tiempo y el aspecto económico.

Al Dr Alfredo Salibián quien fue inicialmente mi director de beca para hacer investigación y con quien compartimos los primeros resultados de esta tesis.

Al Dr. Jorge Herkovits por su valiosa actuación como director del trabajo de tesis.

A la Dra María Cristina Maggese quien me dio su oportuna orientación durante la realización del trabajo de tesis y en la selección de los cursos de postgrado realizados.

Al Dr Angel Zaninovich y al Dr Lucas Colombo, quienes me dieron el estímulo, el impulso y la insistencia necesarios para llevar a cabo este trabajo.

Al Dr Enrique Rodríguez, por prestarme tan cordialmente su ayuda en la utilización de los softwares de estadística.

A mis compañeros, ex compañeros de trabajo y amigos, por su estímulo y afecto.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Buenos Aires (CIC), al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas de la Nación (CONICET) y a la Organización Panamericana de Salud (OPS) por los subsidios recibidos que hicieron posible el financiamiento económico del trabajo.

ABREVIATURAS

- **S.H.:** solución de Holtfreter al 10%, solución fisiológica para anfibios.
- **CL 50 24 48 72 o 96 hs:** concentración letal para el 50% de los individuos a las 24, 48, 72 o 96 horas de tratamiento.
- **ANOVA:** Análisis de varianza.
- **Transf. arcsen mort:** Transformación arcoseno del porcentaje de individuos muertos:
$$\text{arc sen} \sqrt{\% \text{ muertos}}$$
- **Transf. arcsen mort + malf:** Transformación arcoseno del porcentaje de individuos muertos y malformados:
$$\text{arc sen} \sqrt{\% \text{ muertos} + \text{malformados}}$$
- **M.O.:** Microscopía óptica.
- **M.E.B.:** Microscopía Electrónica de Barrido.
- **E.:** Estadio. **B.M.:** Blástula media. **B.F.:** Blástula final. **G.I.:** Gástrula inicial. **P.N.:** Placa neural. **C.N.:** Canal neural. **T.N.:** Tubo neural. **A.N.:** Actividad neuromuscular. **L.C.:** Latido cardíaco. **C.B.:** Circulación en las branquias. **B.A.:** Boca abierta. **C.A.:** Circulación en la aleta. **P.O.:** Pliegue opercular. **O.C.:** Opérculo completo.
- **S.N.C.:** Sistema Nervioso Central.
- **S.N.P.:** Sistema Nervioso Periférico.
- **Mo:** Mortalidad.
- **Mf:** Malformaciones

RESUMEN

Se estudió la toxicidad del Cd, Pb y Zn en embriones y larvas tempranas de Bufo arenarum. Los metales pesados produjeron efectos letales y subletales en relación directa a la concentración y tiempo de exposición. Los embriones expuestos a los metales pesados a partir del estadio de 2 blastómeros (E.3) en adelante fueron afectados significativamente ($p < 0.05$) a partir de las siguientes concentraciones: 0.06 mg Cd⁺⁺/L, 0.25 mg Pb⁺⁺/L y 4 mg Zn⁺⁺/L. Las CL 50 96 h fueron: 0.13 mg Cd⁺⁺/L, 0.42 mg Pb⁺⁺/L y 16.85 mg Zn⁺⁺/L, o sea puede decirse que la toxicidad del Pb fue tres veces menor que la del Cd y la del Zn fue 130 veces menor que la del Cd y 40 veces menor que la del Pb. Los efectos subletales se expresaron principalmente en: - retraso en el desarrollo, - reducción en la talla, - malformaciones del tipo de microcefalia, hidropesía, incurvaciones axiales, pliegues en el ectodermo general y neural, fallas durante la gastrulación y desarrollo parcial de branquias y aletas, - alteración en la distribución de las células ectodérmicas y pigmento, - disociación celular y - alteraciones en el comportamiento. Se discute la inespecificidad de los efectos, como asimismo la obtención de efectos similares por exposición de embriones de otros vertebrados a distintos agentes xenobióticos. Como mecanismos de acción se conoce que los metales pesados: - establecen fuertes "bindings" con las bases y fosfatos de los ácidos nucleicos y con los grupos -SH de las proteínas estructurales y enzimáticas, alterando tanto la estructura como la función de los mismos, - compiten con otros cationes divalentes con roles fisiológicos como el Ca, desplazándolos y alterando el metabolismo en forma integral, - desacoplan la fosforilación oxidativa de la respiración celular, reduciendo la disponibilidad de moléculas energéticas.

Por otro lado, se demostró la existencia de una susceptibilidad diferencial a los metales pesados en función del estadio embrionario en que son expuestos. Así, el comienzo de diferenciación de órganos y tejidos fue el período más sensible, siendo por ejemplo para el Cd, el estadio de tubo neural, 16 y 4 veces más sensible que la segmentación y fin del desarrollo embrionario, respectivamente.

También se hicieron estudios de incorporación de Cd a tiempos cortos en algunos estadios del desarrollo embrionario comprendiendo estadios de mayor y menor sensibilidad de los que resultaron que la incorporación de Cd se incrementó tres veces entre el E.19, estadio de alta sensibilidad y E.25, fin del desarrollo embrionario, de menor sensibilidad. Esta posibilidad de aumentar la incorporación, incrementando la resistencia, indicaría un cambio en la permeabilidad de las membranas junto probablemente a una maduración en los mecanismos detoxificadores.

Los metales pesados resultaron menos tóxicos durante el desarrollo larval temprano que durante la embriogénesis, obteniéndose las siguientes CL 50 96 h: 0.65 mg Cd⁺⁺/L, 12.46 mg Pb⁺⁺/L y 32.29 mg Zn⁺⁺/L. Los metales pesados también afectaron el comportamiento de las larvas con las mismas características que en los embriones.

También se evaluó la posibilidad de reducir la toxicidad del Cd y del Pb a través del empleo de Zn. El Zn es un micronutriente con múltiples funciones metabólicas que ejerce además un rol importante en la reproducción y la embriogénesis. En contraste con la toxicidad del Cd y del Pb, el Zn tiene un reconocido efecto protector contra determinados agentes tóxicos, tanto físicos como químicos. De estos estudios resultó que el Zn no pudo prevenir la toxicidad de altas concentraciones de Cd (1 mg Cd⁺⁺/L, a partir del E.3) pero sí pudo reducir significativamente ($p < 0.01$) la mortalidad, malformaciones y retraso en el desarrollo a bajas concentraciones (0.25 mg Cd⁺⁺/L a partir del E.3 y del E.14) en una relación 1 Cd:8 Zn. El Zn también pudo prevenir parcialmente la toxicidad del Pb en larvas en forma más efectiva que con Cd, así una relación 1 Pb:2 Zn fue suficiente para disminuir significativamente ($p < 0.01$) la mortalidad de las larvas tratadas con Pb. También se evaluó la posibilidad de tratar con Zn a fin de disminuir la letalidad y mejorar la morfogénesis de embriones provenientes de ovulaciones con alta incidencia de mortalidad y malformaciones espontáneas. De este estudio resultó que 1 mg Zn⁺⁺/L pudo proteger significativamente ($p < 0.01$) contra la mortalidad y las malformaciones en estos embriones.

Los efectos letales del Cd también pudieron ser prevenidos en larvas tempranas con pretratamientos con bajas concentraciones de Cd y Zn. La capacidad de detoxificación de los metales pesados está relacionada principalmente con las metalotioninas, proteínas de bajo peso molecular, presentes en el citosol, ricas en aminoácidos con grupos -SH que ligan metales pesados con alta afinidad. Las metalotioninas reducen la toxicidad del metal pesado ligándose a él, disminuyendo de esta forma el pool de cationes tóxicos libres. Por otra parte es posible obtener un incremento en la resistencia contra las concentraciones letales de un metal tóxico por un proceso de hormosis, un fenómeno de aclimatación por el cual una preexposición a bajas concentraciones de dichos cationes, incrementan la tolerancia a una subsiguiente exposición al mismo metal. Este efecto protector es frecuentemente explicado por uno o combinación de distintos factores como la inducción de la síntesis de ciertas proteínas conocidas como "heat shock proteins", una reducción en la incorporación de los cationes tóxicos por una disminución en la permeabilidad de las membranas y un incremento en la excreción de los metales tóxicos.

OBJETIVOS

- 1- Estudiar los efectos de los metales pesados - cadmio, plomo y zinc - sobre el desarrollo embrionario de Bufo arenarum.
- 2- Estudiar una eventual susceptibilidad diferencial de los embriones a los metales pesados según el estadio del desarrollo en que son expuestos.
- 3- Estudiar el efecto de los metales pesados sobre el desarrollo larval temprano de Bufo arenarum.
- 4- Estudiar el efecto de la temperatura sobre la toxicidad de los metales pesados tomando como caso particular el Cd.
- 5- Cuantificar los contenidos netos de Cd en embriones de Bufo arenarum en determinados estadios del desarrollo y en función de la concentración y tiempo de exposición.
- 6- Evaluar algunos procedimientos orientados a reducir los efectos tóxicos del Cd y Pb y a mejorar el rendimiento de embriones con baja viabilidad.

INTRODUCCION GENERAL

El crecimiento de la actividad industrial y agropecuaria implica la utilización de un número cada vez mayor de sustancias químicas. Estas sustancias penetran en los ecosistemas con potenciales tóxicos variables generalmente desconocidos y afectan a todos los organismos expuestos incluyendo al hombre. Entre estas sustancias se encuentran los metales pesados, cuyos efectos cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos comenzaron a preocupar desde hace aproximadamente 30 años a causa del importante impacto social, económico y ecológico que producen (Waalkes *et al.*, 1992).

Algunos metales pesados como el cadmio (Cd) y el plomo (Pb) están presentes en los organismos como consecuencia exclusivamente de la contaminación ambiental, son tóxicos para todos los sistemas estudiados y no tienen funciones biológicas establecidas. En cambio, otros como el zinc (Zn), tienen numerosos roles metabólicos dentro de los rangos de concentraciones fisiológicas, pero resultan muy tóxicos si son superadas las concentraciones regulables por los sistemas biológicos.

En cuanto a la presencia de los metales pesados en la naturaleza, el cadmio es un elemento poco frecuente y su contribución a la contaminación ambiental es consecuencia del amplio espectro de usos que tiene en la actualidad tanto en la industria como en la agricultura (Lucas, 1980). En cambio, el plomo es uno de los contaminantes ambientales más antiguos y más ampliamente distribuidos debido a la enorme cantidad de usos que tiene, si bien actualmente y a causa de su toxicidad está siendo reemplazado principalmente por plásticos (Rathjen, 1980). En consecuencia, la contaminación con metales pesados surge de una intensa actividad antropogénica y a la deficiencia de medidas destinadas a prevenir y/o neutralizar su incorporación a los ecosistemas.

Estos metales pesados junto con otros contaminantes ambientales comprometen la integridad de los ecosistemas, principalmente por un fenómeno de bioamplificación que alcanzaría en el nivel de los consumidores primarios, valores de 13-15 veces mayores que en el nivel de los productores (Dmowsky y Karolewsky, 1979, Mariné-Font y Vidal-Caron, 1990)

Existe una extensa bibliografía acerca de los efectos deletéreos de los metales pesados, por ejemplo con referencia al Cd pueden verse varios trabajos de revisión que ocuparon todo un número de la revista *Experientia* (Ray, 1984, Hallenbeck, 1984). Sin embargo es escaso lo que se conoce en relación a anfibios (Manson y O'Flaherty, 1978), particularmente durante el desarrollo embrionario. La toxicidad del Cd fue descrita tanto para organismos autótrofos (Reddy y Prasad, 1990) como heterótrofos principalmente mamíferos incluido el hombre en el cual la intoxicación con Cd puede conformar el síndrome de "Itai-ítai", enfermedad descrita en Japón en

los años 50 caracterizada por daño renal, hepático y óseo (Walkes *et al*, *op cit*). El Pb también ha sido estudiado en una amplia variedad de especies, habiéndose demostrado importantes efectos tóxicos en todas ellas (Goyer, 1981). En el hombre estas alteraciones conocidas como saturnismo se caracterizan por desórdenes neurológicos y anemia. En animales experimentales incluyendo mamíferos también produce alteraciones en el sistema reproductor y durante el desarrollo embrionario (Wittmers *et al*, 1988).

La situación es diferente con respecto al Zn, ya que se trata de un elemento traza esencial para el metabolismo cuyos efectos tóxicos comienzan a expresarse una vez superadas las concentraciones fisiológicas, motivo por el cual es comparativamente menor la información acerca de la toxicidad de este elemento (Gordon *et al*, 1992, Ringwood, 1992). En contraste con los metales tóxicos Cd y Pb, el Zn tiene un reconocido efecto protector contra determinados agentes tóxicos, tanto físicos como químicos e inclusive Cd (Ferm y Carpenter, 1967).

En particular, los metales pesados también afectan el desarrollo embrionario de vertebrados, pudiendo producir reducción en la talla y el peso de los embriones, disminución de la sobrevivencia, retraso en el crecimiento, neuropatías y distintos tipos de malformaciones (Levin *et al*, 1987, De Genaro, 1987, Wide, 1985).

Con relación a los mecanismos que disponen las células para protegerse de los metales pesados tóxicos "per se" y/o regular la concentración de metales traza esenciales, cabe mencionar la existencia de las metalotioninas. Estas, son proteínas de bajo peso molecular, presentes principalmente en la fracción citosol, inducibles por metales pesados y por una variedad de agentes que involucran por ejemplo, stress físico y químico, hormonas y agentes citotóxicos. Se ha confirmado la inducción de la síntesis de metalotioninas por administración de diferentes metales, por ejemplo, Zn, Cd, Hg, Si, Co, Mn, Ca, Ni and Pb (Suzuki *et al*, 1986). Estas proteínas se unen muy específicamente tanto a metales tóxicos como el Cd y el Hg como también a elementos esenciales como el Zn y el Cu. Si bien las funciones biológicas de estas proteínas no están completamente dilucidadas, se sabe que cumplen un rol fundamental en el almacenamiento y detoxificación de los metales pesados y de regulación de elementos esenciales (Dunn *et al*, 1987). Es interesante mencionar que otras funciones de las metalotioninas estarían vinculadas con procesos de reparación celular, crecimiento y diferenciación. En particular, la importancia del Zn en la embriogénesis, su participación en ciertas DNA- y RNA- polimerasas sugieren que el complejo Zn-metalotionina podría tomar parte en el almacenamiento, transmisión y expresión de la información genética (Kagi y Schaffer, 1988). Con respecto al Pb pudo demostrarse después de mucha controversia su capacidad de inducir síntesis de metalotioninas como mecanismo detoxificador del mismo (Maitani *et al*, 1986). Ya se conocía que la protección de las células frente a la intoxicación con Pb se realizaba a través de la capacidad del núcleo de secuestrar el elemento y unirlo a proteínas en corpúsculos intranucleares (Goyer, *op cit*). La presencia de proteínas tipo metalotioninas tanto en condición fisiológica como de intoxicación fue demostrada en casi todos los organismos estudiados, eucariotas e inclusive algunos procariontes (Kagi y Schaffer, 1988, Reddy y Prasad, 1990).

En vertebrados, se ha demostrado la síntesis de estas proteínas en una diversidad de órganos, principalmente aquellos con tejidos parenquimatosos como hígado y riñón, páncreas e intestino, (Heilmaier *et al*, 1987). También hay estudios

relacionados con la ontogenia de estas proteínas y su distribución diferencial según el sexo en mamíferos (Andrews *et al*, 1987, Kagi y Schaffer, *op cit*).

En anfibios, es escaso lo que se conoce si bien se han identificado en algunas especies de anuros una metalotionina nativa capaz de regular las concentraciones de Zn y Cu y que es inducida por Zn, Cd y Cu (Yamamura y Suzuki, 1983, Suzuki *et al*, *op cit*).

Cabe mencionar que la utilización de anfibios está ampliamente aceptada como indicadores de contaminación ambiental, como animales-prueba para determinar la toxicidad de sustancias como por ejemplo pesticidas y herbicidas (Cooke, 1981; Sloof y Baerselman, 1980) y en estudios de genotoxicidad (Fernández *et al*, 1989). Los embriones de anfibios especialmente en su etapa temprana de su desarrollo son muy sensibles a las sustancias tóxicas (Herkovits y Fernández, 1979). La posibilidad de obtener a partir de una pareja de anfibios hasta 10.000 embriones que son de desarrollo externo, observables a simple vista, de sencillo y poco costoso mantenimiento, todo esto sumado a que Bufo arenarum es un integrante ampliamente distribuido en los ecosistemas acuáticos continentales de Sudamérica justifican ampliamente su elección como material biológico para realizar el presente trabajo de tesis.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Andrews, G.K., Adamson, E.D. y Gedamu, L. The ontogeny of expression of murine metallothionein: Comparison with the α -fetoprotein gene. *Dev. Biol.* 103:294-303, 1984.
- Cooke, A.S. Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. *Env. Poll.* 25:123-133, 1981.
- De Genaro, L.D. The effects of lead nitrate on the central nervous system of the chick embryo. II Electron microscopy and histochemistry: Peroxisomes. *Growth* 51: 213-223, 1987.
- Dmovsky, K. y Karolewsky, M.A. Cumulation of zinc, cadmium and lead in invertebrates and in some vertebrates according to the degree of an area contamination. *Ekol. Pol.* 27:333-349, 1979.
- Dunn, M.A., Blalock, T.L. y Cousins, R.J. Metallothionein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 185:107-119, 1987.
- Ferm, V.H. y Carpenter, S.J. Teratogenic effects of cadmium and its inhibition by zinc. *Nature* 216:1123-1124, 1967.
- Fernández, M., Gauthier, L. y Jaylet, A. Use of newt larvae for "in vivo" genotoxicity testing of water: results on 19 compounds evaluated by the micronucleus test. *Mutagenesis* 4(1):17-26, 1989.

- Goyer, R.A. Lead. En Disorders of mineral metabolism I. Academic Press Inc (ed) pp.159-199, 1981.
- Gordon, T., Chen, L.C., Fine, J.M., Schelesinger, R.B., Su, W.Y., Kimmel, J.A. y Amdur, M.O. Pulmonary effects of inhaled zinc oxide in human subjects, guinea pigs, rats and rabbits. Amer. Industr. Hyg. Assoc. J. 53:(8): 503-509, 1992.
- Hallenbeck, W.H. Human health effects of exposure to cadmium. Experientia 40: 136-142, 1984.
- Heilmaier, H.E., Drasch, G.A., Kretschmer, E. y Summer, K.H. Metallothionein, cadmium, copper and zinc levels of human and rat tissues. Toxicol. Lett. 38:205-211, 1987.
- Herkovits, J. y Fernández, A. Tolerancia a noxas durante el desarrollo embrionario. Medicina (Bs. As.) 39:400-408, 1979.
- Kagi, J.H.R. y Schaffer, A. Biochemistry of metallothioneins. Biochem. 27:8509-8515, 1988.
- Levin, A.A., Kilpper, R.W. y Miller, R.K. Fetal toxicity of cadmium chloride: The pharmacokinetics in the pregnant Wistar rat. Teratology 36:163-170, 1987.
- Lucas, J.M. Cadmium. En Mineral Facts and Problems. (U.S. Dept. Interior, Bureau of Mines Staff), Bull. 671, 131-142, 1980.
- Maitani, K., Watahiki, A. y Kazuo, T. Induction of metallothionein after lead administration by three injection routes in mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 83:211-217, 1986.
- Manson, J.L. y O'Flaherty, E.J. Effects of cadmium on salamander survival and limb regeneration. Env. Res. 16:62- 69, 1978.
- Mariné-Font, A. y Vidal-Caron, M.C. Environmental pollution and food security. Proc. Env. Contam. 4th Int. Conf. 13-22, 1990.
- Rathjen, J.A. Lead. En Mineral Facts and Problems. (U.S. Dept. Interior, Bureau of Mines Staff), Bull. 493-511, 1980.
- Ray, S. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. Experientia 40:14-23, 1984.
- Reddy, G.N. y Prasad, M.N.V. Heavy metal - binding proteins / peptides: occurrence, structure, synthesis and functions. A review. Env. Exp. Botany 30:251-264, 1990.
- Ringwood, A.H. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (Echinometra mathaei) and a bivalve species

(Isognomon californium) during metal exposures. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 22 (3):288-295, 1992.

- Sloof, W.B. y Baerselman, R. Comparison of the usefulness of the mexican axolotl (Ambystoma mexicanum) and the clawed toad (Xenopus laevis) in toxicological bioassays. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 24:439-443, 1980.
- Suzuki, K.T., Itoh, N., Ohta, K. y Sunaga, H. Amphibian metallothionein. Induction in the frogs Rana japonica, R. nigromaculata and Racophorus schlegelii. Comp. Biochem. Physiol. 83 (2):253-259, 1986.
- Waalkes, M.P., Coogan, T.P. y Barter, R.A. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. Crit. Rev. Toxicol. 22(3-4):175-201, 1992.
- Wide, M. Lead exposure on critical days of fetal life affects fertility in the female mouse. Teratology 32:375-380, 1985.
- Wittmers, L., Wallgren, J., Alich, A., Aufderheide, A.C. y Rapp, G. Lead in bone. IV Distribution of lead in the human skeleton. Arch. Env. Health 43(6):381-390, 1988.
- Yamamura, M. y Suzuki, K.T. Metallothionein induced in the frog Xenopus laevis. Experientia 39:1370-1373, 1983.

1. ESTUDIAR LOS EFECTOS DE LOS METALES PESADOS SOBRE LOS EMBRIONES DE BUFO ARENARUM EXPUESTOS EN FORMA CONTINUA A PARTIR DEL ESTADIO DE 2 BLASTOMEROS EN ADELANTE.

1.1. CADMIO.

1.1.1. INTRODUCCION.

El cadmio es un elemento poco frecuente en la naturaleza que proviene principalmente de la actividad volcánica y se lo extrae de los depósitos de zinc, cobre y plomo con los que se lo encuentra en cantidades traza, siendo por ejemplo la relación Zn/Cd de 100/1. La contribución del Cd a la contaminación ambiental es consecuencia del amplio espectro de usos que tiene en la actualidad (baterías, pinturas, centrales nucleares etc. (Lucas, 1980). Existe una extensa bibliografía acerca de los efectos deletéreos de los metales pesados, por ejemplo con referencia al Cd pueden verse varios trabajos de revisión que ocuparon todo un número de la revista *Experientia* (Hallenbeck, 1984, Ray, 1984). La toxicidad del Cd fue descrita tanto para organismos autótrofos (Reddy y Prasad, 1990) como heterótrofos principalmente mamíferos incluido el hombre en el cual la intoxicación con Cd conforma el síndrome de "Itai-itai", enfermedad caracterizada en Japón en los años 50 por daño renal y hepático, osteomalacia y fragilidad ósea que afectó principalmente a mujeres multíparas en edad menopáusica, con carencias en elementos esenciales (Jennette, 1981, Waalkes *et al*, 1992). También existe extensa información acerca de la toxicidad del Cd en peces de consumo humano (Rombough y Garside, 1982), aves (Hutton, 1982) e invertebrados (Stuhlbacher y Maltby, 1992), sin embargo es escaso lo que se conoce en relación a anfibios (Bando, 1976, Demichelis *et al*, 1992), particularmente durante el desarrollo embrionario. Los órganos "blanco" del Cd son el hígado y riñón, órganos en los que también se acumula, siendo además los efectos tóxicos más conspicuos, los desórdenes en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), en el sistema circulatorio, hipertrofia y cáncer de próstata (Piscator, 1982, Ueda *et al*, 1988, Waalkes *op cit*). Con respecto a los efectos del Cd sobre el desarrollo embrionario de vertebrados, se han descrito disminución en la sobrevivencia de embriones, deformaciones en la columna vertebral y otras estructuras óseas (Ferm y Carpenter, 1967, Rehwoldt y Karimian-Teherani, 1976, Dethlefsen *et al*, 1976) y disminución en el peso y/o talla de los embriones (Rombough y Garside, *op cit*, Levin *et al*, 1987) y alteraciones en el potencial de regeneración de miembros de urodelos (Manson y O'Flaherty, 1978).

Las metalotioninas, proteínas de bajo peso molecular están involucradas en la regulación y detoxificación de metales pesados, inclusive cadmio. Tanto las

metalotioninas como otras proteínas "like metalothioneins" se han encontrado en todos los organismos estudiados. En vertebrados, se ha demostrado la síntesis de estas proteínas en una diversidad de órganos, principalmente aquellos con tejidos parenquimatosos como hígado y riñón, páncreas e intestino, siendo el Cd y el Zn almacenado en particular en los dos primeros órganos mencionados (Dunn *et al*, 1987, Heilmaier *et al*, 1987).

En anfibios, es escaso lo que se conoce si bien se han identificado en algunas especies de anuros una metalotionina nativa capaz de regular las concentraciones de Zn y Cu y que es inducida por Zn, Cd y Cu (Yamamura y Suzuki, 1983, Suzuki *et al*, 1986).

El objetivo de este ítem fue caracterizar la toxicidad del cadmio en embriones de Bufo arenarum expuestos desde el comienzo de su desarrollo en forma continua, evaluando los efectos sobre la sobrevivencia y los efectos teratogénicos a nivel de microscopía óptica y electrónica de barrido.

1.1.2. MATERIALES Y METODOS.

1.1.2.1. Obtención del material.

Los huevos de Bufo arenarum se obtuvieron a partir de hembras (de aproximadamente 200-250 g de peso, provenientes de los alrededores de Bs. As.), cuya ovulación fue inducida por la administración (inyección subcutánea) de un macerado de hipófisis homólogas (Pisanó, 1956) o de la inyección subcutánea de una mezcla de hormonas heterólogas, esto es, 1000 U.I. de gonadotrofina de suero de yegua preñada (PMSG) más 2000 U.I. de gonadotrofina coriónica humana (HCG). Luego de 16 a 24 horas, las hembras comenzaron a ovular. En este momento, fueron desmeduladas y los ovocitos provenientes de los ovisacos fueron fecundados en cápsulas de Petri con un macerado testicular de un macho también desmedulado, preparado en un pequeño volumen de solución de Holtfreter al 10% (SH). Al alcanzar el estadio de 2 blastómeros (E.3), los huevos fueron deglatinizados con una solución de ácido tioglicólico al 2% neutralizado con NaOH a pH 7.2 e intensamente lavados con SH a fin de eliminar el ácido lo más completamente posible. El diagnóstico de los estadios se realizó según la tabla de estadios embrionarios de Del Conte y Sirlin (1951). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Solución de Holtfreter: La solución madre contiene (en g/L): NaCl 3.5; KCl 0.05; CaCl₂ 0.1 y NaHCO₃ 0.02. Para su uso esta solución fue diluida 1:10. Cuando los pH de las soluciones variaron de los de la solución de Holtfreter (6.7-7), fueron corregidos con base o ácido concentrados.

1.1.2.2. Determinación de la toxicidad del cadmio sobre la sobrevivencia de los embriones.

La toxicidad del cadmio fue evaluada sobre los embriones de Bufo arenarum provenientes de 5 ovulaciones. Los efectos tóxicos causados por el tratamiento continuo con Cd fueron estudiados poniendo 2 grupos de 30 embriones cada uno, de cada ovulación para cada una de las 10 condiciones (N total= 30 X 2 X 5 X 10 = 3000 embriones) en cápsulas de Petri con 40ml de solución. Las soluciones empleadas

fueron: SH(control), 0.03, 0.06, 0.12, 0.16, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 y 4.00 mg Cd⁺⁺/L. Las soluciones fueron preparadas a partir de una solución madre de Cl₂Cd 2 1/2 H₂O 1000 mg Cd⁺⁺/L (Mallinckrodt). Los experimentos se hicieron a 20-21°C. Las soluciones fueron cambiadas diariamente y los embriones muertos fueron registrados y retirados inmediatamente. Las CL 50 72 y 96 horas fueron calculadas analíticamente a través de la aplicación del método probit a partir de los datos de mortalidad de los embriones provenientes de cada una de las 5 parejas, utilizando un programa de computación de la U.S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA, 1988) o por el procedimiento de Lichfield y Wilcoxon. Se realizaron ANOVA multifactorial con transformación arcsen de los porcentajes de los embriones afectados, en un caso tomando en cuenta la mortalidad y en otro los embriones muertos más los vivos malformados a fin de comparar los efectos de las distintas concentraciones de Cd entre distintas ovulaciones y análisis de grupos homogéneos (Scheffe).

1.1.2.3. Caracterización de la toxicidad del cadmio sobre la estructura y comportamiento de los embriones.

1.1.2.3.1. Estudios de microscopía óptica.

La evaluación de los efectos del cadmio sobre la morfología interna de los embriones tratados con 0.16 mg Cd⁺⁺/L se realizó con microscopía óptica (MO) utilizando un microscopio Zeiss. La preparación de los embriones consistió en fijarlos en formol al 4%, inclusión en parafina, cortes seriados con micrótomo de 7µm. de espesor y tinción con hematoxilina-eosina.

1.1.2.3.2. Estudios con microscopía electrónica de barrido (MEB).

Los efectos sobre las superficies celulares externas se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido "scanning" utilizando un microscopio electrónico Jeol JSM/U3 operado a 5 kw. Los embriones fueron fijados con glutaraldehído al 2% en buffer fosfato 0.1M, se lavaron 3 veces con el mismo buffer, se deshidrataron con soluciones de concentración creciente de acetona y fueron tratados con la técnica del punto crítico.

1.1.2.3.3. Estudios con microscopía estereoscópica.

La morfología externa de los embriones y los efectos sobre el comportamiento se evaluó con microscopía estereoscópica utilizando un microscopio estereoscópico Wild.

1.1.3. RESULTADOS.

La Fig.1 muestra los datos de sobrevivencia de los embriones de Bufo arenarum tratados con las concentraciones más altas de Cd (0.25-4.00 mg Cd⁺⁺/L). El desarrollo de los embriones tratados con 2.00 y 4.00 mg Cd⁺⁺/L se detuvo antes de las 24 horas de tratamiento, esto es, durante la gástrula inicial (E.10) para los embriones expuestos a 4.00 mg Cd⁺⁺/L y durante la gástrula media (E.11) para los embriones

expuestos a 2.00 mg Cd⁺⁺/L (Fig. 1). La totalidad de los embriones expuestos a 1.00 y 0.5 mg Cd⁺⁺/L, se detuvo antes de las 48 hs., o sea entre los estadios de canal neural (E.15) y tubo neural (E.16), (Fig. 1). El estadio máximo alcanzado por los embriones tratados con 0.25 mg Cd⁺⁺/L fue el de latido cardíaco (E.19, Fig. 1) con una mortalidad que varió entre el 63% y el 85% (datos para las 96 horas), (T.1). Sólomente con soluciones de concentración menor o igual a 0.25 mg Cd⁺⁺/L, se pudo obtener sobrevida más allá de las 48 hs. de tratamiento.

La T.1 y Fig. 2, A muestran los datos de mortalidad de los embriones de Bufo arenarum tratados con diferentes concentraciones de Cd comprendidas entre 0.03 y 0.25 mg Cd⁺⁺/L. La CL 50 72 hs de cadmio para los embriones tratados en forma continua a partir del estadio de 2 blastómeros estuvo comprendida entre 0.09 y 0.20 mg Cd⁺⁺/L, mientras que la CL 50 96 hs no varió significativamente (P<0.01) con los valores anteriores, estando comprendidos entre 0.07 y 0.19 mg Cd⁺⁺/L (T.4). El ANOVA multifactorial comparando la mortalidad de los embriones dio diferencias significativas (P<0.004) entre las distintas ovulaciones y entre las concentraciones empleadas en conjunto (P=0 fig. 2, A). Al considerar conjuntamente embriones muertos y vivos malformados para cada concentración las diferencias también fueron muy significativas (P=0). El análisis de comparaciones múltiples (Scheffe) dio un grupo de homogeneidad entre las parejas 3, 4, 2 y 5 y otro entre las parejas 4, 2, 5 y 1 (P<0.05). Con respecto a las concentraciones, no hubo diferencias significativas (P<0.05) en la mortalidad dentro de los siguientes grupos de concentraciones pero si entre ellos: a) 0 y 0.03 mg Cd⁺⁺/L, b) 0.06 mg Cd⁺⁺/L (difirió del control pero no de 0.03) c) 0.12 mg Cd⁺⁺/L y d) 0.16 y 0.25 mg Cd⁺⁺/L (Fig. 2, A).

Con respecto a los efectos del Cd sobre la morfogénesis, se observó que los embriones tratados con 4.00 mg Cd⁺⁺/L no presentaron diferencias con los controles hasta terminar la segmentación. Sin embargo entre la blástula final y el inicio de la gastrulación, con la formación del labio dorsal del blastoporo, se detuvo el desarrollo y comenzaron a disociarse aproximadamente 3 hs más tarde. Las células del endo y ectodermo se disociaron en forma paulatina, primero se afectaron zonas focalizadas, luego áreas más amplias y finalmente todo el embrión resultó desintegrado. Durante este proceso, la superficie apical de las células se presentó muy abovedada, mientras que la de los controles fue aplanada. Los embriones tratados con 2 mg Cd⁺⁺/L prosiguieron su desarrollo hasta gástrula inicial o media disociándose posteriormente con las mismas características ya mencionadas aproximadamente 4 hs después de que se detuviera el desarrollo.

La Fig. 1 resume las malformaciones obtenidas por tratamiento con altas concentraciones de Cd. Aproximadamente el 70% de los embriones tratados con 1 mg Cd⁺⁺/L alcanzaron el estadio de placa neural. El 30% de los embriones restantes formaron un canal neural corto y con pliegues longitudinales en su interior. En ambos casos, 6 hs después que los embriones detuvieran su desarrollo, comenzaron a disociarse. Sólomente el 10% de los embriones tratados con 0.5 mg Cd⁺⁺/L logró concretar la neurulación sin alteraciones. El 40% de los embriones presentó cierre incompleto del tubo neural y el 50% se detuvo en placa-canal neural (E.13-E.14), con los pliegues ya mencionados. El 30% tuvo tapones vitelinos persistentes y un 20% fueron hidrópicos. Antes de iniciarse la disociación celular se observó en todos los casos la formación de mamelones ectodérmicos. Los embriones tratados con 0.25 mg

Cd⁺⁺/L presentaron retraso en el desarrollo, esto significa que el desarrollo fue sincrónico con el de los controles hasta el estadio de tubo neural, retrasándose subsiguientemente de tal forma que el último estadio alcanzado fue el de latido cardíaco (E.19) mientras los controles estaban en boca abierta (E.21). En cuanto a las malformaciones, hubo hidropesía y desviación en el eje del cuerpo en el 35% de los casos. El 100% de los individuos presentó disminución tanto en el desarrollo de las branquias como de la aleta.

Las soluciones de 0.16 mg Cd⁺⁺/L o menores fueron tóxicas en relación directa a la concentración (T.1). La toxicidad se manifestó en: a) Retraso en el crecimiento que fue más notable hasta proximidad del E.20. A partir de este estadio, los embriones exhibieron un fenómeno de recuperación que les permitió finalizar la etapa embrionaria junto con los controles. b) Significativa reducción en la talla. c) Malformaciones: microcefalia, desarrollo incompleto de branquias, hidropesía, incurvaciones en el eje del cuerpo, pliegues en el ectodermo general y neural y angulaciones en la aleta (Lám. 1, fig. 1). d) En particular, el desarrollo de la aleta podía estar reducido, en los casos más severos, básicamente a las estructuras de su eje (Lám. 1, fig. 2), en los menos graves hubo deficiencia en el desarrollo de las porciones ventral y caudal y en los aún menos afectados, sin la porción ventral. e) En algunos casos hubo dificultad en la invaginación del endodermo (tapón vitelino persistente). En consecuencia, en etapas ulteriores, se observó con microscopía electrónica de barrido (MEB) un área pericloacal con células epiteliales sin cilias, delimitada en forma abrupta por células ciliadas normales del ectodermo (Lám. 1, fig. 2 y 3). f) Los estudios con MEB mostraron en el ectodermo, predominio de células ciliadas o distribución anormal de las mismas formando cordones y/o acúmulos celulares (Lám. 1, fig. 4). También se observó que la superficie apical de las células glandulares era abovedada. Además en las zonas de pliegues, se observaron células esferoidales desprendiéndose del epitelio. En los embriones controles (en estadio de circulación branquial, E. 20) el ectodermo presentaba células ciliadas rodeadas por células glandulares, típicas con su superficie apical aplanada. g) Los cortes para microscopía óptica mostraron: en la epidermis: tendencia a la separación de las capas celulares apical de la basal con formación de "globos" o "ampollas", con células de forma abovedada y una moderada hiperplasia, en el ectodermo neural: células con la cromatina muy homogénea. Además hubo acúmulos de plaquetas vitelinas en la notocorda y músculo, megaloblastos en circulación, mientras que el corazón, el músculo y los túbulos mesonéfricos se formaron normalmente.

1.1.4. DISCUSION.

La capacidad teratogénica de distintos metales pesados como el mercurio, cobre y arsénico sobre embriones y larvas de anfibios ha sido informada en diferentes estudios. Existen coincidencias entre algunos de los efectos descritos para los metales mencionados y los observados para el cadmio en este trabajo. Así Ghate y Mulherkar (1980) describieron entre otros efectos para el ClHg (II) (200-250 ug Cl₂Hg/L) en embriones de *Microhyla ornata*, tratados a partir de la gastrulación, incurvaciones en el eje del cuerpo y retraso en el desarrollo; con concentraciones menores (100-150 ug Cl₂Hg/L) se observaron alteraciones en el comportamiento incluyendo pérdida del equilibrio y nado anormal. El retraso en el desarrollo también

fue indicado por Landé y Guttman (1973) como un efecto tóxico del cobre (0.16 mg Cu/L) sobre las larvas de Rana pipiens si bien estas dosis no afectaron el desarrollo temprano de esta especie. Las aberraciones en el comportamiento y la desviación en el eje del cuerpo con distintos grados de angulación de la cola, tumefacciones en el ectodermo general e hidropesía fueron también descritas por Vega y Pisanó (1980) para embriones de Bufo arenarum expuestos a arsénico (25-50 mg As/L).

En mamíferos y peces, los efectos de diversos metales pesados sobre el desarrollo y crecimiento son similares a los informados para anfibios. En ratas intoxicadas tanto con cadmio como con plomo a partir del nacimiento se observó retraso en el crecimiento con respecto a sus controles (Levin, op cit, Mykkanen et al, 1982). En una amplia variedad de embriones y larvas de peces expuestos a soluciones con cadmio se encontraron alteraciones similares a las descritas para anfibios en desarrollo expuestos a otros metales pesados, tales como aletas de bordes irregulares, flexiones en la columna vertebral, talla subnormal, retraso en el desarrollo, alteraciones en los movimientos de nado y comportamiento general atípico (Rombough y Garside, op cit, Spehar, 1976).

Los efectos teratogénicos descritos no son exclusivos siquiera para el conjunto de metales pesados, ya que diversas condiciones físico-químicas adversas para el desarrollo embrionario, p. ej. litio, agua pesada, dinitrofenol, shock térmico, restricción espacial del entorno, inhibidores de síntesis proteica (Bustuoabad et al, 1977, Herkovits et al, 1975, Rosenthal y Alderdice, 1976, Herkovits y Fernández, 1979, Brachet, 1974), pueden desencadenar algunas respuestas comunes. Estos efectos inespecíficos informados para distintos "stressantes" también en peces (Rosenthal y Alderdice, op cit) dificultan una interpretación causal que explique el tipo de interferencia que se produce en cada caso. Posiblemente esto se deba a los efectos múltiples de las sustancias tóxicas sobre los sistemas biológicos. Así en el caso particular del Cd, este catión tiene una fuerte afinidad por las bases de los ácidos nucleicos y por los grupos -SH de las proteínas pudiendo alterar tanto la estructura de las membranas si las proteínas afectadas son estructurales como la fisiología celular si las alteradas son proteínas enzimáticas. Asimismo también se produciría una alteración en las actividades enzimáticas debido a una competencia del Cd⁺⁺ con otros cationes divalentes como Zn⁺⁺ y Ca⁺⁺ que suelen ser cofactores de enzimas (Jacobson y Turner, 1980). El Cd también produce una disminución en la disponibilidad de moléculas energéticas por interferencia con el proceso de fosforilación oxidativa al desacoplarla de la respiración celular (Vallee y Ulmer, 1972, Waalkes et al, 1992).

Entre los efectos observados a nivel celular por el tratamiento con Cd, la disociación celular podría deberse al desplazamiento del Ca por competencia del Cd con la consiguiente dificultad para mantener las uniones celulares. Podría pensarse que la adición de cadmio a la solución fisiológica podría producir un cambio osmótico responsable de los efectos descritos, sin embargo esto puede ser descartado ya que previamente se había comprobado que los embriones de Bufo arenarum son capaces de completar su desarrollo en soluciones con osmolaridad más de diez veces mayor que con respecto a la utilizada en nuestros grupos control (12.42mOsm) sin mostrar signos externos similares a los observados por el tratamiento con Cd. las cantidades de cadmio agregadas a las soluciones experimentales modifican la osmolaridad entre 12.42 y 12.52 mOsm, cambios que no pueden dar cuenta per se de los efectos observados. El abovedamiento de la superficie apical de las células glandulares podría deberse a alteraciones en el citoesqueleto, ya que con tratamiento con agua pesada que afecta dicha estructura, las células epiteliales también adquieren esa forma (Herkovits

et al, op cit). La ausencia de células ciliadas en la región pericloacal de algunos embriones podría deberse a la incompleta invaginación de las células endodérmicas durante la gastrulación, expresando durante el desarrollo embrionario subsiguiente una potencialidad de diferenciación apical similar a la que corresponde a las células que revisten el intestino primitivo. El límite nítidamente marcado entre estas células y las ectodérmicas ciliadas parece indicar que esta potencialidad funcional queda ya definida durante la gastrulación. La persistencia de agrupamientos celulares ciliados en forma de cordones o acúmulos durante etapas avanzadas del desarrollo embrionario (latido cardíaco, E.19) en los embriones experimentales podría deberse a una perturbación en la formación de las células glandulares que normalmente se intercalan entre la población de células ciliadas de tal manera que en el estadio mencionado, las células ciliadas no contactan entre sí (Herkovits y Pisanó, 1980).

En cuanto a los cortes con microscopía óptica revelaron también un retraso en el desarrollo, en cuanto por ejemplo a la presencia de megaloblastos en la circulación y la existencia de plaquetas vitelinas en músculo y notocorda. Con respecto a esto último, las sustancias de reserva no podrían ser utilizadas siendo esto un indicio de interferencia en la síntesis proteica. Con respecto a la formación de la aleta, el eje de la misma es la parte menos susceptible al Cd, mientras que podría existir un gradiente de susceptibilidad creciente en las porciones dorsal, caudal y ventral de la aleta. Los desórdenes etológicos observados representan fenómenos habituales por intoxicación con metales pesados (Rombough y Garside, op cit, Opehar, op cit, Ghate y Mulherkar, op cit, Vega y Pisanó, op cit). Desde el punto de vista ecológico, sería interesante conocer la máxima cantidad de Cd que pueda estar presente en los tejidos embrionarios sin interferir con el desarrollo (objetivo 5) ya que se conoce que estos organismos participan en la bioamplificación del cadmio como se sabe que lo hacen con muchas otras sustancias (Dmowsky y Karolewsky, 1979).

1.1.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Bando, R. Heavy metal concentrations (chromium, copper, manganese and lead) in tadpoles and adults of Rana sculentata (L.) *Memorie Ist. Ital. Idrobiol.* 33: 325-344, 1976.
- Brachet, J. *Introduction to Molecular Embryology.* Springer Verlag, New York, p.125, 1974.
- Bustuoabad, O., Herkovits, J. y Pisanó, A. Different sensitivity to lithium ion during the segmentation of Bufo arenarum eggs. *Acta Embryol. Exp.* 3: 271-282, 1977.
- Demichelis, S.O., Rovedatti, M.G., Castañé, P.M. y Salibián, A. Acumulación de Cd en el hígado de Bufo arenarum. *Res. Congreso Arg. de Toxicología (ATA)*, 104, 1992.
- Del Conte, E. y Sirlin, J.L. Los primeros estadios embrionarios en Bufo arenarum. *Acta Zool. Lilloana* 12:495-499, 1951.

- Dethlefsen, V., Westernhagen, H. Von y Rosenthal, H. Cadmium uptake by marine fish larvae. *Helgol. Wiss. Meeresunters* 27:396-407, 1976.
- Dmovsky, K. y Karolewsky, M.A. Cumulation of zinc, cadmium and lead in invertebrates and in some vertebrates according to the degree of an area contamination. *Ekol. Pol.* 27:333-349, 1979.
- Dunn, M.A., Blalock, T.L. y Cousins, R.J. Metallothionein *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 185:107-119, 1987.
- Ferm, V.H. y Carpenter, S.J. Teratogenic effects of cadmium and its inhibition by zinc. *Nature* 216:1123-1124, 1967.
- Ghate, H.V. y Mulherkar, L. Effect of mercuric chloride on embryonic development of the frog *Microhyla ornata*. *Indian J. Exper. Biol.* 18:1094-1096, 1980.
- Hallenbeck, W.H. Human health effects of exposure to cadmium. *Experientia* 40: 136-142, 1984.
- Heilmaier, H.E., Drasch, G.A., Kretschmer, E. y Summer, K.H. Metallothionein, cadmium, copper and zinc levels of human and rat tissues. *Toxicol. Lett.* 38:205-211, 1987.
- Herkovits, J., Pisanó, A. y Fernández, A. Alteraciones en el desarrollo embrionario y en el proceso de recuperación morfogenético por efectos del agua pesada. *Rev. Biol.Med. Nucl.* 7:161-162, 1975.
- Herkovits, J. y Fernández, A. Tolerancia a noxas durante el desarrollo embrionario. *Medicina (Bs. As.)* 39:400-408, 1979.
- Herkovits, J. y Pisanó, A. Estudio con microscopía electrónica de barrido de la evolución de la células ciliadas ectodérmicas en embriones de *Bufo arenarum*. *An. Soc. Cient. Arg.* 206:23-28, 1980.
- Hutton, M. The role of wild life species in the assessment of biological impact from chronic exposure to persistent chemicals. *Ecotoxicol. Environm. Safety* 6:471-478, 1982
- Jacobson, K.B. y Turner, J.E. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology* 16:1-37, 1980.
- Jennette, K.W. The role of metals in carcinogenesis: biochemistry and metabolism. *Environm. Health Perp.* 40:233-252, 1981.
- Landé, S.P. y Guttman, S.I. The effects of copper sulfate on the growth and mortality rate of *Rana pipiens* tadpoles. *Herpetologica* 29:22-27, 1973.

- Levin, A.A., Kilpper, R.W. y Miller, R.K. Fetal toxicity of cadmium chloride: The pharmacokinetics in the pregnant Wistar rat. *Teratology* 36:163-170, 1987.
- Lucas, J.M. Cadmium. En *Mineral Facts and Problems*. (U.S.Dept. Interior, Bureau of Mines Staff, Bull. 671, 131-142, 1980.
- Manson, J.L. y O'Flaherty, E.J. Effects of cadmium on salamander survival and limb regeneration. *Env. Res.* 16:62-69, 1978.
- Mykkanen, H.M., Lancaster, M.C. y Dickerson, J.W.T. Concentrations of lead in the soft tissues of male rates during a long-term dietary exposure. *Env. Res.* 28:147-153, 1982
- Pisanó, A. Método para mantener la hipófisis de anfibio fisiológicamente "in vitro". *Arch. Bioquim. Quim. Farm. Tucumán* 7: 387-392, 1956.
- Piscator, M. Cadmium. Exposure and effects in the general population and in occupationally exposed workers. En *Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements*. (Ed. Prasad, A.S.) Alan R. Liss, New York, pp 521-536, 1982.
- Ray, S. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Experientia* 40: 14-23, 1984.
- Reddy, G.N. y Prasad, M.N.V. Heavy metal - binding proteins / peptides: occurrence, structure, synthesis and functions. A review. *Env. Exp. Botany* 30:251-264, 1990.
- Rehwoldt, R. y Karimian-Teherani, D. Uptake and effect of cadmium on zebrafish. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 15 442-446, 1976.
- Rombough, P.J. y Garside, E.T. Cadmium toxicity and accumulation in eggs and alevins of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Can. J. Zool.* 60:2006-2014, 1982.
- Rosenthal, H. y Alderdice, D.F. Sublethal effects of environmental stressors, natural and pollutional on marine fish eggs and larvae. *J. Fish. Res. Board Can.* 33:2047-2065, 1976.
- Spehar, R.L. Cadmium and zinc toxicity to flagfish *Jordanella floridae*. *J. Fish. Res. Board Can.* 33:1939-1945, 1976.
- Stuhlbacher A. y Maltby, L. Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L). *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 22(3): 319-324, 1992.
- Suzuki, K.T., Itoh, N., Ohta, K. y Sunaga, H. Amphibian metallothionein induction in the frogs *Rana japonica*, *R. nigromaculata* and *Racophorus schlegelii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 83 (2):253-259, 1986.

- Ueda, F., Nagata, M., Nagata, T. y Shimazaki, Y. Effects of zinc and EDTA on tissue cadmium in various smooth muscles in rabbit and guinea-pig. *Gen. Pharmac.* 19(5): 661-664, 1988.
- U.S. Environmental Protection Agency. Users guide for a computer program for probit analysis of data from acute and short term chronic toxicity test with aquatic organisms. *Biological Methods, Environmental Monitoring and Support Lab.*, 1988.
- Vallee, B.L. y Ulmer, D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41:91-128, 1972.
- Vega, D.E. y Pisanó, A. Teratogénesis experimental por arsénico durante el desarrollo de un anfibio. *Rev. Mus. Hist. Nat. San Rafael (Mendoza)*, 8:29-34, 1980
- Waalkes, M.P., Coogan, T.P. y Barter, R.A. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit. Rev. Toxicol.* 22(3-4):175-201, 1992.
- Yamamura, M. y Suzuki, K.T. Metallothionein induced in the frog Xenopus laevis. *Experientia* 39:1370-1373, 1983.

1.2. PLOMO

1.2.1. INTRODUCCION

El plomo, uno de los contaminantes más antiguos y más ampliamente distribuido, produce importantes efectos tóxicos en una amplia variedad de especies. En el hombre la intoxicación con plomo conforma el síndrome de saturnismo. El Pb ingresa a los organismos principalmente por vía respiratoria, es absorbido por la sangre y a partir del hígado, uno de sus órganos "blanco" es distribuido al resto de los órganos expresando la toxicidad en distintas localizaciones. Así, el Pb interfiere la síntesis de hemoglobina produciendo anemia, causa desórdenes en el SNC y SNP alterando masivamente sus funciones, desordena la función renal y reproductora afectando principalmente la formación de gametas masculinas, disminuyendo la fertilidad (Goyer, 1981).

Es interesante notar que la toxicidad de este elemento se expresa en los tejidos blandos en los que se encuentra solamente un 10% de la carga total del organismo y que el 90% es acumulado en huesos, a partir de donde es muy lentamente movilizado (Wittmers *et al*, 1988). Con respecto a las alteraciones que produce el Pb sobre la reproducción, se ha informado en animales experimentales, reducción en el tamaño de las camadas, retraso en el crecimiento y en el desarrollo y reducción en el tamaño corporal (Goyer, *op cit*). Como mecanismo de detoxificación del plomo, ya se conocía la habilidad que tienen determinadas preteínas principalmente intranucleares de secuestrarlo, determinando la formación de corpúsculos intranucleares (Goyer, *op cit*). Posteriormente y después de mucha controversia lograron identificarse también metalotioninas capaces de ligar a este elemento como ya se habían determinado para muchos otros metales pesados (Maitani *et al*, 1986). El objetivo de este ítem fue caracterizar la toxicidad del plomo en embriones de Bufo arenarum expuestos desde el estadio de 2 blastómeras en forma continua, determinando la CL50 72 y 96 hs y los efectos teratogénicos con microscopía estereoscópica y electrónica de barrido (MEB).

1.2.2. MATERIALES Y METODOS.

1.2.2.1. Obtención del material.

Los embriones de Bufo arenarum se obtuvieron como se detalló en la Sección 1.1.2.1.

1.2.2.2. Determinación de la toxicidad del plomo sobre la sobrevivencia de los embriones.

La toxicidad del plomo fue evaluada sobre los embriones de Bufo arenarum provenientes de 5 ovulaciones. Los efectos tóxicos causados por el tratamiento continuo con Pb fueron estudiados poniendo 2 grupos de 30 embriones cada uno, de cada ovulación para cada una de las 10 condiciones ($N_{total}=30 \times 2 \times 5 \times 10 = 3000$ embriones) en cápsulas de Petri con 40ml de solución de Holtfreter al 10% (SH). Las soluciones empleadas fueron: SH (control), 0.12, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 16.00 y 32.00 mg Pb^{++}/L . Los experimentos se hicieron a 20-21°C. Las soluciones

fueron preparadas a partir de una solución stock de Pb (NO₃)₂, Merck (1.20 g Pb⁺⁺/L). Las soluciones fueron cambiadas diariamente y los embriones muertos fueron registrados y retirados inmediatamente. Los resultados fueron analizados estadísticamente, con probit y ANOVA multifactorial con contrastes múltiples como se indicó anteriormente (secc.1.1.2.2.)

1.2.2.3. Caracterización de las toxicidad del plomo sobre la estructura y comportamiento de los embriones.

1.2.2.3.1. Estudios con microscopía electrónica de barrido (MEB).

Los efectos sobre las superficies celulares externas se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido "scanning" del modo explicado en la Sección 1.1.2.3.2.

1.2.2.3.2. Estudios con microscopía estereoscópica.

La morfología externa de los embriones y los efectos sobre el comportamiento se evaluaron como se indicó en la Sección 1.1.2.3.3.

1.2.3. RESULTADOS

En el rango de concentraciones comprendidas entre 8.00 y 32.00 mg Pb⁺⁺/L, se registró una mortalidad del 100% antes de las 48 hs. (blástula media-final). Estos embriones exhibieron desplazamiento del pigmento del polo animal al vegetativo, posteriormente se disociaron, comenzando con la pérdida de las uniones intercelulares, luego con la aparición de células esferoidales principalmente en el área marginal, hasta culminar con la disociación completa del embrión. Los efectos fueron proporcionales a la concentración. Las concentraciones comprendidas entre 2.00 y 4.00 mg Pb⁺⁺/L interrumpieron el desarrollo de los embriones entre gástrula final (E.12) y néurula temprana (E.13). Los embriones tratados con 4.00 mg Pb⁺⁺/L mostraron pérdida de las uniones intercelulares en las células ectodérmicas de los labios dorsal y laterales del blastoporo, mientras que los individuos expuestos a 2.00 mg Pb⁺⁺/L tuvieron tapones vitelinos persistentes con células esféricas y pigmentadas.

Con concentraciones menores a 1.00 mg Pb⁺⁺/L, se registró un efecto diferencial del Pb sobre los embriones provenientes de distintas ovulaciones con 2 patrones posibles: 1) Alta incidencia de malformaciones (tapones vitelinos persistentes, neurulación incompleta, microcefalia, cuerpo piriforme) seguido de la muerte de la amplia mayoría de los embriones en néurula con 0.5 y 1.00 mg Pb⁺⁺/L (parejas 2 y 4, respectivamente, T.2). Los embriones que sobrevivieron después de las 72 hs. exhibieron branquias subdesarrolladas, microcefalia, desarrollo retrasado, reducción en la talla e incurvaciones en el eje del cuerpo (Lám. 2, fig. 1 y 2). 2) Incremento gradual en la mortalidad y la teratogénesis (parejas 1, 3 y 5) con las siguientes características: Con 1.00 mg Pb⁺⁺/L, aproximadamente el 80-100% de los embriones no lograron sobrevivir más allá de las 48 hs. de tratamiento con malformaciones similares a las

descriptas para 2.00 mg Pb⁺⁺/L. 35-50% de los embriones tratados con 0.5 mg Pb⁺⁺/L murieron dentro de las 48 hs. de tratamiento (T.2) y los restantes tuvieron desarrollo anormal (dificultad en la invaginación del tapón vitelino y desórdenes en la neurulación). La sobrevida de los embriones fue constante a partir del estadio de circulación branquial (E.20) si bien los embriones continuaron desarrollando 1-2 estadios retrasados en relación a los controles. Estos embriones tuvieron talla reducida, hidropesía (Lám.2, fig. D y E) y rugosidades en las superficies celulares que culminaron en la descamación de la epidermis de los embriones. Las branquias de estos embriones aunque subdesarrolladas, mostraron circulación sanguínea. Otros efectos fueron la forma sigmoideal del cuerpo debido a marcadas incurvaciones en el eje corporal (Lám. 2, fig. A y E) y espinas bifidas (Fig. D). También se registraron disturbios etológicos como natación con trayectorias circulares y movimientos espasmódicos. Aproximadamente el 25% de los embriones tratados con 0.25 mg Pb⁺⁺/L detuvieron su desarrollo en la néurula (E.16). Los restantes desarrollaron ya sea normalmente o con alguna de las alteraciones descriptas para 0.5 mg Pb⁺⁺/L. No se observaron efectos significativos con 0.12 mg Pb⁺⁺/L.

Los estudios con "scanning" de los embriones controles y experimentales demostraron desarrollo normal de las células ciliadas y glandulares de la epidermis.

Las CL50 72 y 96 h para Pb estuvieron comprendidas entre 0.40 y 0.45 mg Pb⁺⁺/L (T.4), no habiendo diferencia entre las 72 y 96 horas. La comparación de los resultados realizados con un ANOVA multifactorial dio diferencias significativas entre las concentraciones empleadas (P=0 Fig. 2, B). Al considerar conjuntamente embriones muertos y vivos malformados para cada concentración, las diferencias también fueron muy significativas (P=0). Si bien el análisis de comparaciones múltiples (Scheffe) dio un único grupo de homogeneidad entre las parejas, lo hizo en el siguiente orden 5, 1, 3, 2 y 4. En cuanto a las concentraciones, no hubo diferencias significativas (P<0.05 Fig. 2, B) dentro de los siguientes grupos de concentraciones pero si entre ellos: a) 0 y 0.12 mg Pb⁺⁺/L, b) 0.25 mg Pb⁺⁺/L, c) 0.5 mg Pb⁺⁺/L y d) 1 y 2 mg Pb⁺⁺/L.

1.2.4. DISCUSION

La susceptibilidad de los anfibios a los metales pesados tales como cobre, mercurio y arsénico en los estadios tempranos de desarrollo se ha informado en distintos estudios (Landé y Guttman, 1973, Ghate y Mulherkar, 1980, Vega y Pisanó, 1980).

Los resultados presentados aquí indican que el Pb interfiere con el desarrollo normal de Bufo arenarum a partir de 0.25 mg Pb⁺⁺/L. Como se indicó en el estudio de tratamiento continuo con cadmio, las alteraciones no parecen ser específicas tampoco para el plomo, ya que las mismas malformaciones fueron informadas para distintas condiciones fisico-químicas adversas, como Li, CN, D2O o shock térmico (Herkovits y Fernández, 1979, Rosenthal y Alderdice, 1976) en embriones de anfibios, peces y mamíferos. Probablemente esta falta de especificidad se deba a los efectos múltiples que ejercen estos agentes sobre los sistemas biológicos.

Particularmente en el presente estudio, para los cationes divalentes, Pb y Cd se han obtenido efectos similares, lo cual podría estar relacionado con la existencia de mecanismos de acción similares para ambos cationes. En efecto, desde un punto de

vista bioquímico, los dos metales interfieren con las proteínas, ácidos nucleicos, moléculas energéticas y también compiten con elementos esenciales disminuyendo las actividades celulares en su conjunto (Vallee y Ulmer, 1972, Marion y Denizeau, 1983). El plomo se liga a los grupos -SH de los polipéptidos y con los fosfatos de los ácidos nucleicos, produciendo distorsiones conformacionales de las proteínas y la escisión de los ácidos nucleicos (Eisinger, 1978) que se expresaría en el nivel celular y de tejidos en las alteraciones informadas. La interferencia del plomo con el calcio podría explicar la disociación celular observada con altas concentraciones de Pb (Craan *et al.*, 1986). Por otro lado, la acción neurotóxica del plomo que se hace evidente cuando comienza la actividad neuromuscular, podría estar relacionada al ligamiento de los iones Pb^{++} a las uniones neuromusculares, alterando las concentraciones de calcio y por lo tanto la liberación espontánea del transmisor (Kotton y Yaari, 1982). Las deformaciones en los huesos también se han descrito como resultado del tratamiento con Pb en embriones de peces (Ozoh, 1980). El plomo también inhibe la actividad Na-K ATPasa en diversos tipos de células, incluyendo las de los túbulos renales, una acción que podría explicar los disturbios en los mecanismos osmoreguladores que ocurren en los embriones hidrópicos. Con relación a la disposición del pigmento, se conoce que el plomo se une a la melanina con alta afinidad (Ireland *et al.*, 1979), lo que podría producir el desplazamiento del pigmento.

La utilidad de los anuros y urodelos tanto adultos como en sus estadios larvales como indicadores biológicos en bioensayos toxicológicos ha sido informada (Slooff y Baerselman, 1980, Cook, 1981). Aunque los datos disponibles del contenido de plomo en nuestras aguas continentales (Riachuelo) está comprendido entre 0.045 y 0.067 mg Pb^{++}/l (INCYTH - CTUA, 1985) y por lo tanto el desarrollo de los embriones de Bufo arenarum en esta circunstancia no pareciera estar comprometido, esta especie podría ser considerada como un indicador sensible a la contaminación con plomo a partir de 1 mg Pb^{++}/L , concentraciones que producen altos niveles de mortalidad y malformaciones en todos los casos en cuestión de horas.

1.2.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Craan, A.G., Malick, M.A. y P'An, A.J.S. Segmental and intracellular distribution of lead ann rat kidney and salivary glands. *Toxicology* 42:157-170, 1986.
- Cook, A.S. Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. *Environm. Pollut.* 25:123-133, 1981.
- Eisinger, J. Biochemistry and measurement of environmental lead intoxication. *G. Rev. Biophys.* II:439-466, 1978.
- Ghate, H.V. y Mulherkar, L. Effect of mercuric chloride on embryonic development of the frog Microhyla ornata. *Indian J. Exper. Biol.* 18:1094-1096, 1980
- Goyer, R.A. Lead. Academic Press Inc. (ed). *Dissorders of mineral metabolism I.* pp.159-199, 1981.

- Herkovits, J. y Fernández, A. Tolerancia a noxas durante el desarrollo embrionario. *Medicina (Bs. As.)* 39:400-408, 1979.
- Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Hídrica (Argentina). Monitoreo de calidad de aguas en la cuenca del Río Matanza-Riachuelo en el período octubre 1982- septiembre 1984: Informe final. Comisión municipal de la vivienda, gabinete Riachuelo Ezeiza I pp. 40-50, 1985.
- Ireland, M.P., Richards, K.S., Gwynn, I. The localisation of lead in the skin of light and dark adapted Xenopus laevis. *Histochemistry* 65:31-34, 1979.
- Kotton, L. y Yaari, Y. Sites of action of lead on spontaneous transmitter release from motor nerve terminals. *Israel J. Med. Sci.* 18:165-170, 1982.
- Landé, S.P. y Guttman, S.I. The effects of copper sulfate on the growth and mortality rate of Rana pipiens tadpoles. *Herpetologica* 29:22-27, 1973.
- Maitani, T., Watahiki, A. y Suzuki, K.T. Induction of metallothionein after lead administration by three injection routes in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83:211-217, 1986.
- Marion, M.M. y Denizeau, F. Rainbow trout and human cells in culture for the evaluation of the toxicity of aquatic pollutants: a study with lead. *Aquatic Toxicol.* 3:47-60, 1983.
- Ozoh, P.T.E. Effects of reversible incubations of zebrafish eggs in copper and lead ions with or without shell membranes. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 24:270-275, 1980.
- Rosenthal, H. y Alderdice, D.F. Sublethal effects of environmental stressors, natural and pollutional on marine fish eggs and larvae. *J. Fish. Res. Board Can.* 33:2047-2065, 1976.
- Sloof, W.B. y Baerselman, R. Comparison of the usefulness of the mexican axolotl (Ambystoma mexicanum) and the clawed toad (Xenopus laevis) in toxicological bioassays *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 24:439-443, 1980.
- Vallee, B.L. y Ulmer, D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41:91-128, 1972.
- Vega, D.E. y Pisanó, A. Teratogénesis experimental por arsénico durante el desarrollo de un anfibio. *Res. Mus. Hist. Nat. San Rafael (Mendoza)*, 8:29-34, 1980.
- Wittmers, L.E., Wallgren, J., Alich, A., Aufderheide, A.C. and Rapp, G. Lead in bone. IV Distribution of lead in the human skeleton. *Arch. Env. Health* 43(6):381-390, 1988.

1.3. ZINC

1.3.1. INTRODUCCION

De los tres metales pesados estudiados en este trabajo, el zinc es el que se encuentra en cantidades más importantes en la naturaleza, siendo el Cd extraído prácticamente como un elemento traza de los yacimientos de Zn (Lucas, 1980). Esta vinculación del Zn con el Cd también se extiende a muchos aspectos biológicos como se verá más adelante. El Zn, a diferencia del Cd que es un elemento tóxico sin funciones biológicas conocidas, cumple numerosos roles metabólicos dentro de los rangos de concentraciones fisiológicas (Cousins, 1986), pero puede resultar muy tóxico si se superan las concentraciones regulables por los sistemas biológicos.

Es relativamente menor la información acerca de la toxicidad del Zn (Gordon *et al.*, 1992, Ringwood, 1992). Mayormente los estudios de toxicidad del Zn se realizaron en especies de hábitats contaminados con el objeto de encontrar la relación entre las concentraciones del medio, la incorporación y la producción de efectos tóxicos (Miller *et al.*, 1992, Kumari y Nair, 1992) y sobre los efectos del Zn en especies utilizadas como indicadores de contaminación con el objeto de monitorear la polución del medio con este metal (Kufcsak *et al.*, 1992, Weeks, 1992). En contraste con los metales tóxicos Cd y Pb, el Zn tiene un reconocido efecto protector contra determinados agentes tóxicos, tanto físicos como químicos, inclusive contra la toxicidad del Cd (Introducción general, obj.6). También se mencionó la relación entre el Zn y las metalotioninas, proteínas relacionadas con la regulación y detoxificación de metales (Introducción general, obj.6). El objetivo de este ítem fue caracterizar la toxicidad del zinc en embriones de Bufo arenarum expuestos desde el comienzo de su desarrollo en forma continua, evaluando los efectos sobre la sobrevida y los efectos teratogénicos a nivel de microscopía estereoscópica.

1.3.2. MATERIALES Y METODOS

1.3.2.1. Obtención del material.

Los embriones de Bufo arenarum se obtuvieron como se detalló en la Sección 1.1.2.1.

1.3.2.2. Determinación de la toxicidad del zinc sobre la sobrevida de los embriones.

La toxicidad del zinc fue evaluada sobre los embriones de Bufo arenarum provenientes de 3 ovulaciones. Los efectos tóxicos causados por el tratamiento continuo con Zn fueron estudiados poniendo 2 grupos de 30 embriones cada uno, de cada ovulación para cada una de las 10 condiciones ($N_{total}=30 \times 2 \times 3 \times 10 = 1800$ embriones) en cápsulas de Petri con 40ml de solución de Holtfreter al 10% (SH). Las soluciones empleadas fueron: SH (control), 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00, 16.00, 24.00, 32.00 y 48.00 mg Zn^{++}/L . Los experimentos se hicieron a $20 \pm 1^\circ C$. Las soluciones fueron preparadas a partir de una solución stock de $SO_4Zn \cdot 7 H_2O$, 1000

mg Zn⁺⁺, Mallinckrodt. Las soluciones fueron cambiadas diariamente y los embriones muertos fueron registrados y retirados inmediatamente. Los resultados fueron analizados estadísticamente con probit y ANOVA multifactorial con contrastes múltiples como se explicó anteriormente (Secc. 1.1.2.2.).

1.3.2.3. Caracterización de la toxicidad del zinc sobre la estructura y comportamiento de los embriones.

1.3.2.3.1. Estudios con microscopía estereoscópica.

La morfología externa de los embriones y los efectos sobre el comportamiento se evaluó como se indicó en la Sección 1.1.2.3.3.

1.3.3. RESULTADOS

La T.3 muestra los datos de sobrevida y malformaciones de los embriones de Bufo arenarum tratados con diferentes concentraciones de Zn comprendidas entre 1.0 y 48.00 mg Zn⁺⁺/L.

Previamente se habían ensayado soluciones con concentraciones de Zn menores de 1 mg Zn⁺⁺/L que no produjeron alteraciones significativas, aún en las ovulaciones más sensibles. Con respecto a la sobrevida, recién con 4 mg Zn⁺⁺; se observaron diferencias significativas con los controles (P<0.05, Fig. 2, C). Con respecto tanto a la sobrevida como a la incidencia de las malformaciones, los valores aumentaron con la dosis y tiempo de exposición. Durante la gastrulación las malformaciones más comunes fueron tapones vitelinos persistentes y mamelones ectodérmicos que daban aspecto rugoso a la superficie. Fue frecuente observar un número importante de embriones con plaquetas vitelinas desprendidas, flotando en el espacio perivitelino y que 24-48 horas después habían cicatrizado y proseguido su desarrollo, muchas veces sin ninguna otra alteración morfológica, por lo que dicho aspecto no fue considerado como alteración en el registro de la T.3. Durante la neurulación (E.13-E.15), las alteraciones más frecuentes fueron el aspecto piriforme del cuerpo, la dificultad para concretar el cierre del tubo neural y una disociación generalizada en el ectodermo, principalmente en los embriones que no proseguirían su desarrollo más que por algunas horas más. A partir del período organogénico (E.17-E.18), se observaron incurvaciones en el eje del cuerpo, ocasionalmente espinas bifidas, microcefalia y alteraciones en la aleta, formándose colas incompletas y angostas y una reducción en la talla de aproximadamente un 20%. En los embriones más afectados, la cola estuvo prácticamente ausente.

Las CL50 72 y 96 hs para Zn estuvieron comprendidas entre 17.93 y 26.46 y 13.61 y 23.11 mg Zn⁺⁺/L, respectivamente (T.4). La comparación de los resultados de la mortalidad de embriones provenientes de distintas parejas realizados con un ANOVA multifactorial y contrastes múltiples (Scheffe) dio diferencias significativas (P<0.03) entre las parejas, y entre las concentraciones ensayadas (P=0). Al considerar conjuntamente embriones muertos y vivos malformados para cada concentración las diferencias también fueron muy significativas (P=0). El análisis de las concentraciones no dio diferencias significativas dentro de los siguientes grupos pero si entre ellos

($P < 0.05$): a) desde 0 a 2 mg Zn^{++}/L , b) 4 y 8 mg Zn^{++}/L , c) 16 mg Zn^{++}/L . d) 24 mg Zn^{++}/L , e) 32 mg Zn^{++}/L y f) 48 mg Zn^{++}/L .

1.3.4 DISCUSION

Como en el caso del Cd y del Pb, el Zn también produce muchos de los efectos teratogénicos descritos en la bibliografía para otros metales pesados en larvas y embriones de anfibios como también en embriones de otros vertebrados (Secc. 1.1.4). Estos efectos son inespecíficos también para una amplia variedad de agentes fisico-químicos adversos y dificultan hacer un análisis causa-efecto de los mismos.

Esto podría deberse a la multiplicidad de efectos tóxicos que produce una sustancia en los distintos sistemas biológicos. Hay que destacar que el Zn a pesar de ser un elemento esencial para el metabolismo, puede causar, superado un umbral, variable según la sensibilidad de los embriones, efectos teratogénicos y/o letales. Asimismo se le adjudica un efecto citoprotector, estabilizador de membranas y participante de los mecanismos antioxidantes (Dreosti y Partick, 1987), sin embargo como lo indica este estudio puede tener un efecto disociante a concentraciones tóxicas.

Las alteraciones en la formación de la aleta y en el eje del cuerpo dificultaron la natación normal de esos embriones. Los individuos que no tenían cola, permanecían en el lugar haciendo pequeñas y breves contracciones musculares.

Teniendo en cuenta la variabilidad significativa (test ANOVA multifactorial, $P < 0.05$) en la sensibilidad de los embriones provenientes de distintas ovulaciones, se decidió realizar los futuros experimentos con los embriones que tuvieran una sensibilidad intermedia, con una incidencia de malformaciones del 50-75% a las 24 hs de tratamiento con 0.25mg Cd^{++}/L y/o una mortalidad menor al 10% a partir del estadio de 2 blastómeras (E.3), excepto en el objetivo 6.D. en el que se evalúa el efecto del Zn en los embriones con alta incidencia de mortalidad y malformaciones espontáneas.

1.3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Cousins, R. Toward a molecular understanding of zinc metabolism. En *Clinical Physiology and Biochemistry*. (Karger AG, ed.) Basilea, 20-30, 1986
- Dreosti, I.E. y Partick, E.J. Zinc, ethanol and lipid peroxidation in adult and fetal rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 14:179-191, 1987.
- Gordon, T., Chen, L.C., Fine, J.M., Schelesinger, R.B., Su, W.Y., Kimmel, J.A. y Amdur, M.O. Pulmonary effects of inhaled zinc oxide in human subjects, guinea pigs, rats and rabbits. *Amer. Industr. Hyg. Assoc. J.* 53:(8): 503-509, 1992.
- Kufcsak, O., Aszbalos, B., Nemcsok, J., Gotz, K.H. y Juhasz, A. Biomonitoring of environmental pollution by measuring of biochemical and physiological parameters in fish. *Zool. Physiol. Tiere* 96 (1):1-10, 1992.

- Kumari, L.K. y Nair, V.R. Uptake and bioconcentration of copper and zinc by the Molluscs Saccostrea cucullata (Born) and Certhium rubus (Desch) from the coastal waters of Bombay. Indian J. Mar. Sci. 21 (1): 74-76, 1992.
- Lucas, J.M. Cadmium. En Mineral Facts and Problems. (U.S. Dept. Interior, Bureau of Mines Staff, Bull. 671, 131-142, 1980.
- Miller, P.A., Munkittrick, K.R. y Dixon, D.G. Relationship between concentrations of copper and zinc in water, sediment, benthic invertebrates and tissues of white sucker (Catostomus commersoni) at metal- contaminated sites. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49(5):978-984, 1992.
- Ringwood, A.H. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (Echinometra mathaei) and a bivalve species (Isognomon californium) during metal exposures. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 22 (3):288-295, 1992.
- Weeks, J. M. The use of terrestrial amphipod Arcitalitrus dorrieni (Crustacea, Amphipoda, Talitridae) as a potential biomonitor of ambient Zn and Cu availabilities in leaf-litter. Chemosphere 24 (10): 1505-1522, 1992.

2. ESTUDIAR UNA EVENTUAL SUSCEPTIBILIDAD DIFERENCIAL DE LOS EMBRIONES A LOS METALES PESADOS SEGUN EL ESTADIO DE DESARROLLO EN QUE SON EXPUESTOS.

2.1. INTRODUCCION

Los embriones en general, representan la etapa más sensible del ciclo vital de un organismo a agentes tóxicos siendo determinados estadios del desarrollo embrionario aún más sensibles que otros.

En el objetivo 1, habian quedado demostrados los efectos letales, subletales incluidos los teratogénicos, reducción en la talla final alcanzada y etológicos del cadmio, plomo y zinc sobre los embriones de Bufo arenarum expuestos en forma continua desde el estadio de 2 blastómeros en adelante. Esta acción tóxica puede manifestarse en forma aguda con la exposición a altas concentraciones durante estadios muy tempranos del desarrollo, interrumpiéndolo y causando la muerte de los embriones, mientras que con concentraciones más bajas, los estadios tempranos no son visiblemente alterados, el desarrollo puede continuar, observándose los efectos tóxicos de tipo letal o subletal en etapas subsiguientes, según la concentración de la solución a la que son expuestos. Existe información sobre una sensibilidad diferencial a agentes nocivos según la etapa del desarrollo que está cursando el organismo cuando es expuesto, siendo el tema más estudiado en mamíferos (Wilson, 1972) pero disponiéndose de alguna información en anfibios (Bandó, 1976, Herkovits y Fernández, 1979). El conocimiento de estadios más sensibles a agentes tóxicos puede ser de gran utilidad en la implementación de bioensayos para determinar calidad de aguas, toxicidad de sustancias simples o en combinación, etc. En orden de establecer una relación entre determinados efectos tóxicos y estadios particulares del desarrollo, se estudiarán las alteraciones provocadas por los distintos metales pesados en diferentes etapas del desarrollo de los embriones de Bufo arenarum.

2.1.1 CADMIO

2.1.1.1 MATERIALES Y METODOS

La obtención y fecundación de los huevos de Bufo arenarum fueron realizados como se explicó anteriormente (Secc. 1.1.2.1).

La toxicidad diferencial del Cd fue estudiada sobre los siguientes estadios del desarrollo: A) 2 blastómeros (E.3), B) gástrula tardía (E.12), C) tubo neural (E.16), D)

circulación branquial (E.20), E) pliegue opercular (E.23) y F) opérculo cerrado (E.25). Los efectos tóxicos causados por el tratamiento con Cd fueron estudiados poniendo 2 grupos de 30 embriones cada uno, en 20 soluciones de diferente concentración para cada uno de los estadios estudiados en cápsulas de Petri con 40ml de solución. Las soluciones estuvieron comprendidas entre 0.1 y 4.0 mg Cd⁺⁺/L. Los controles se mantuvieron en solución de Holtfreter al 10% (SH). Los experimentos se hicieron a 20+/-1°C. Las soluciones fueron cambiadas diariamente y los embriones muertos fueron registrados y retirados inmediatamente. A partir de los datos de mortalidad de los embriones, se estudió para cada estadio, la concentración más baja que produjo el 100% de mortalidad antes de las 24 horas de tratamiento.

2.1.1.2. RESULTADOS

La Fig 3 muestra comparativamente, la concentración de Cd más baja que produjo el 100% de mortalidad de los embriones en distintos estadios del desarrollo antes de las 24 horas de tratamiento existiendo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ellas. El estadio más susceptible en este estudio resultó ser el de la formación del tubo neural (E.16), que fué aproximadamente 16 y 8 veces más sensible que el de la segmentación (E.3) y fin de la gastrulación (E.12) respectivamente. En los estadios postneurales los embriones se volvieron gradualmente más resistentes al metal pesado, si bien no alcanzaron la tolerancia desarrollada durante la segmentación (al final del desarrollo embrionario, E.25, la tolerancia fué 4 veces menor que al comienzo del desarrollo, E.3).

2.1.1.3. DISCUSION

Este estudio confirmó la elevada toxicidad del cadmio sobre los embriones de Bufo arenarum, ya que por ejemplo, 0.25 mg Cd⁺⁺/L detuvo el desarrollo de los embriones durante la neurulación dentro de las 24 horas de tratamiento. Con respecto a este estudio de susceptibilidad dependiente del estadio, se decidió enfatizar en un parámetro capaz de unificar el criterio de evaluación como el de la letalidad de los embriones más que el de las malformaciones u otros criterios ya que: a) si bien los mismos efectos teratogénicos pueden obtenerse por diferentes agentes tóxicos y aún en diferentes estadios del desarrollo, algunos otros ocurren específicamente sólo en determinados estadios y b) este estudio incluye también estadios embrionarios en los que los procesos morfogénicos están parcialmente completados o aún culminados, por lo que de haber optado por el parámetro de malformaciones hubiese complicado la comparación entre la sensibilidad entre estadios tempranos y tardíos del desarrollo.

La sobrevida de los embriones tratados con cadmio fue significativamente ($p < 0.05$) dependiente del estadio, siendo la formación del tubo neural (E.16), 16 veces más sensible que el inicio de la segmentación (E.3), mientras que durante los estadios postneurales los embriones se vuelven gradualmente más resistentes. Sin embargo, al final del desarrollo embrionario la tolerancia al cadmio es todavía 4 veces menor que durante la segmentación temprana. Como se mencionó anteriormente, la interferencia que ejerce el cadmio sobre el desarrollo embrionario podría estar relacionada con sus múltiples efectos a nivel macromolecular con los ácidos nucleicos, proteínas enzimáticas y estructurales (Jacobson y Turner, 1980, Waalkes et al, 1992), y

disponibilidad de moléculas energéticas (Reddy *et al*, 1988), como también a la competencia con elementos esenciales para el metabolismo y los efectos sobre el consumo de oxígeno (Herkovits y Jatimliasky, 1986), todo lo cual podría resultar en una reducción de la adaptación de los embriones a su medio y más críticamente en su imposibilidad de sobrevivir. La susceptibilidad diferencial al cadmio podría deberse a cambios en la incorporación del metal por variaciones en la permeabilidad de las membranas (Michibata, 1981) y otros mecanismos, como cambios en la capacidad de detoxificación, por ejemplo a través de la síntesis de metalotioninas (Suzuki *et al*, 1986) y ciertas proteínas conocidas como "heat shock proteins" (Furst, 1987) y cambios en la capacidad de excreción del metal pesado. Es notable que en el caso del cadmio como también de otros agentes tóxicos, el comienzo de la diferenciación de órganos y tejidos es el período más susceptible del desarrollo embrionario (Herkovits y Fernández, *op cit*).

2.1.1.4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bando, R. Heavy metal concentrations (chromium, copper, manganese and lead) in tadpoles and adults of Rana sculentata (L.) *Memorie Ist. Ital. Idrobiol.* 33: 325-344, 1976.
- Del Conte, E. y Sirlin, J.L. Los primeros estadios embrionarios en Bufo arenarum. *Acta Zool. Lilloana* 12:495-499, 1951.
- Furst, A. Hormetic effects in pharmacology: pharmacological inversions as prototypes of hormesis. *Health Phys.* 52:527, 1987.
- Herkovits, J. y Fernández, A. Tolerancia a noxas durante el desarrollo embrionario. *Medicina (Bs. As.)* 39:400-408, 1979.
- Herkovits, J. y Jatimliasky, J. Cadmium effect on oxygen consumption in Bufo arenarum embryos. *Medicina (Bs.As.)* 46:603, 1986.
- Jacobson, K.B. y Turner, J.E. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology* 16:1-37, 1980.
- Michibata, H. Uptake and distribution of cadmium in the egg of the teleost Oryzias latipes *J. Fish. Biol.* 19:691-696, 1981.
- Reddy, R.S., Jinna, R.R., Uzodinna, J.E. y Desai, D. In vitro effect of mercury and cadmium on brain Ca^{++} ATPase of the catfish Ictalurus punctatus. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 41:324-328, 1988.
- Suzuki, K.T., Itoh, N., Ohta, K. and Sunaga, H. Amphibian metallothionein. Induction in the frogs Rana japonica, R. nigromaculata and Racophorus schlegelii. *Comp. Biochem. Physiol.* 83 (2):253-259, 1986.

- Waalkes, M.P., Coogan, T.P. and Barter, R.A. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. Crit. Rev. Toxicol. 22(3-4):175-201, 1992.
- Wilson, J.D. The use of non human Primates in research of human reproduction. E. Diczpelusy & C.C. Standly, ed., Pág. 261, 1972

2.1.2. PLOMO

2.1.2.1. MATERIALES Y METODOS

La obtención y fecundación de los huevos de Bufo arenarum se realizó como se indica en el objetivo 1, secc. 1.1.2.1. Se seleccionaron embriones en 3 estadios del desarrollo, A) gástrula final (E.12), B) actividad neuromuscular (E.18) y C) circulación branquial (E.20) que se sometieron a una misma concentración de Pb (1.00 mg Pb⁺⁺/L) durante 20h, luego, los embriones fueron lavados con SH y evaluados durante las siguientes 96 horas para sobrevida y malformaciones. Se colocaron 2 grupos de 30 embriones para cada uno de los 3 estadios ensayados para las 2 condiciones, experimental y control. La caracterización de la toxicidad del Pb sobre la estructura y comportamiento de los embriones se realizó con microscopía electrónica de barrido, según se indica en el objetivo 1, secc. 1.1.2.3.2. y microscopía estereoscópica, secc. 1.1.2.3.3. Se realizaron ANOVA multifactorial con transformación arcsen de los porcentajes de los embriones afectados, en un caso tomando en cuenta la mortalidad y en otro los embriones muertos más los vivos malformados a fin de comparar los efectos del Pb en los distintos estadios y análisis de grupos homogéneos (Scheffe).

2.1.2.2. RESULTADOS

Los resultados se muestran en la T.5 y Fig. 4. El análisis de varianza global de la mortalidad de los embriones a los distintos tiempos en función del plomo, del estadio de tratamiento y la ovulación fue muy significativo ($P < 0.006$). Para todos los estadios de tratamiento, la diferencia entre los controles y los tratados también fue muy significativa ($P < 0.01$, Fig. 5), no existiendo diferencia significativa entre las parejas.

Los embriones tratados a partir de la gástrula final (E.12) alcanzaron el estadio de brote caudal (E.17) simultáneamente con los controles no alterándose significativamente ni la sobrevida ni la estructura general de los embriones. Sin embargo, 24 horas más tarde, entre el 43 y el 58% de los embriones exhibió malformaciones y hacia el fin del desarrollo (E.25) se registraron alrededor de un 80% de embriones malformados. Con respecto a las malformaciones, el 9% de los embriones presentó dificultad durante la neurulación, en particular en el cierre del tubo neural (Fig.4). El 47% de los embriones presentó colas cilíndricas y pequeñas e incurvaciones en el eje principal del cuerpo mientras que el 58% de los individuos presentó branquias y aletas parcialmente desarrolladas. En el 23% de los embriones hubo hidropesía y el 100% de los individuos tuvo una reducción del 20% en el tamaño del cuerpo. Unos pocos individuos tuvieron dificultades para eclosionar,

fenómeno que culminó con la muerte de esos embriones. Al comienzo de la actividad neuromuscular todos los embriones presentaron temblores.

La susceptibilidad al plomo fue mayor a partir del estadio de actividad neuromuscular (E.18). En estos embriones, la mortalidad (entre 28 y 38%) y las malformaciones (alrededor del 90%) fueron significativamente más altas a las 24 horas (P=0, Fig. 5) que con otros tratamientos. Finalmente, a las 72 horas, la mortalidad y las malformaciones alcanzaron los valores más altos, siendo en promedio del 63% y del 89% respectivamente (T.5). El 50% de los embriones alterados fueron hidrópicos (Fig. 4, lámina 3, fig. C), el 25% tuvo colas cilíndricas y pequeñas y el 100% de los embriones alterados presentó colas parcialmente desarrolladas con bordes irregulares, incurvaciones en el eje del cuerpo, branquias subdesarrolladas y reducción en el tamaño corporal (Fig. 4 y lám. 3, Fig. A). El desarrollo neuromuscular también fue apreciablemente afectado, los embriones permanecían quietos, con el abdomen hacia arriba o inclinados lateralmente produciendo movimientos breves y débiles cuando eran estimulados.

Los embriones tratados a partir del estadio de circulación branquial (E.20) tuvieron una sobrevida significativamente mayor de la de los tratados en E.12 y E.18 (T.5, Fig. 5). En el 100% de los individuos afectados se observó desarrollo incompleto de las aletas, branquias subdesarrolladas y reducción en el tamaño del cuerpo y en el 25%, incurvaciones en el eje corporal (Fig. 4) Con respecto al comportamiento, los efectos fueron similares a los obtenidos por tratamiento en E.18. En estos embriones, aunque la cola era más angosta, la misma estaba proporcionalmente bien desarrollada. Estos embriones presentaron ampollas a las pocas horas de iniciado el tratamiento, las que desaparecieron 24 horas más tarde.

2.1.2.3. DISCUSION

El plomo, como asimismo otros metales pesados interfieren el desarrollo embrionario de vertebrados, fenómeno más estudiado en aves y mamíferos (Goyer, 1981, Mas y Arola, 1985, Narbaitz, 1985, Wide, 1985). En el objetivo 1 de este trabajo había quedado demostrado que el plomo aplicado en forma continua a partir del estadio de 2 blastómeros interfiere el desarrollo de Bufo arenarum, significativamente a partir de 0.25 mg Pb⁺⁺/L.

En este capítulo quedó confirmado que la sobrevida de los embriones tratados con Pb resultó ser significativamente dependiente del estadio, siendo el estadio de actividad neuromuscular (E.18) dos veces más sensible al Pb que los períodos de neurulación o circulación branquial. Con respecto a las malformaciones, el estadio de circulación branquial fue el menos sensible, probablemente a causa de que el proceso organogenético ya está muy avanzado en ese estadio. Asimismo se pudo identificar una diferencia cualitativa entre los tres grupos que consistió en que en los embriones tratados a partir del estadio de gástrula final, los efectos fueron visibles únicamente al finalizar el tratamiento. Esta diferencia podría deberse a una reducida incorporación de Pb durante este período (a causa de la persistencia aún de la membrana vitelina o a una reducida permeabilidad del epitelio), por otra parte, las actividades celulares durante este período podrían ser menos sensibles al Pb. Con respecto al desarrollo anormal, la dificultad en el cierre del tubo neural también se había observado con el tratamiento

con Cd, tanto en mamíferos (Schmid *et al*, 1985), como también en embriones de anfibio, como fue demostrado para Bufo arenarum.

Estos efectos, como se interpretaron para la exposición al cadmio, podrían estar relacionados con los cambios histopatológicos del epitelio neural (Sippel *et al*, 1983). Las ampollas y la distorsión de las cavidades corporales en los embriones tratados podría deberse a disturbios ocasionados por el Pb en los mecanismos de osmorregulación, por ejemplo, la inhibición de la Na-K ATPasa, efecto característico de muchos metales pesados (Vallee y Ulmer, 1972) y/o por el efecto antinatriurético del Pb (Powers y Foulkes, 1985). Algunos efectos, tales como la reducción del tamaño corporal y las incurvaciones en el eje del cuerpo fueron informadas para varios agentes teratogénicos fisicoquímicos como se analizó previamente (Secc. 1.1.4.), y por lo tanto pueden ser considerados como efectos inespecíficos.

Independientemente del estadio de tratamiento, siempre se observaron desórdenes neurológicos, como temblores y alteraciones en la natación y en el equilibrio, confirmando la conocida acción neurotóxica del Pb.

Desde el punto de vista bioquímico, los efectos del Pb podrían estar relacionados con una marcada inhibición en el incremento de las proteínas totales, ADN y ARN, como también a una disminución global de las actividades celulares resultante de la inhibición de los procesos metabólicos en general (Marion y Denizeau, 1983). Además, el Pb se une a los grupos -SH de las proteínas, produciendo la distorsión de las cadenas polipeptídicas lo que resulta en la inhibición de distintos sistemas (Eisinger, 1978).

2.1.2.4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Eisinger, J. Biochemistry and measurement of environmental lead intoxication. *Quart. Rev. Biophys.* 2:439-466, 1978.
- Goyer, R.A. Lead. Academic Press Inc (ed). *Dissorders of mineral metabolism I.* pp.159-199, 1981.
- Marion, M. y Denizeau, F. Rainbow trout and human cells in culture for the evaluation of the toxicity of aquatic pollutants: a study with lead. *Aquatic Toxicol.* 3:47-60, 1983.
- Mas, A. y Arola, L. Cadmium and lead toxic effects on Zn, Ni, Cu and Fe distribution in the developing chick embryos. *Comp. Biochem. Physiol.* 80:185-189, 1985.
- Narbaitz, R. Lead induced early lesions in the brain of the chick embryo. *Teratology* 32:389-394, 1985.
- Powers, W.J.Jr. and Foulkes, E.C. Effects of lead on the renal response to extracellular volume expansion. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 178:367-372, 1985.
- Schmid, B.P., Kao, J. y Goulding, E. Evidency for re-opening of the cranial neural tube in mouse embryos treated with cadmium chloride. *Experientia* 41:271-272, 1985.

- Sippel, A.J.A., Geraci, J.R. y Hodson, P.V. Histopathological and physiological responses of rainbow trout (Salmo gairdneri) to sublethal levels of lead. *Wat. Res.* 17:115-1118, 1983.
- Vallee, B.L. y Ulmer, D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41:91-128, 1972.
- Wide, M. Lead exposure on critical days of fetal life affects fertility in the female mouse. *Teratology* 32:375-380, 1985.

3. ESTUDIAR LOS EFECTOS DE LOS METALES PESADOS, CADMIO, PLOMO Y ZINC SOBRE EL DESARROLLO LARVAL TEMPRANO DE BUFO ARENARUM

3.1. INTRODUCCION.

En el objetivo 1 quedó demostrado cómo afectan los metales pesados tanto la sobrevivencia como la morfogénesis de los embriones de Bufo arenarum. En el segundo objetivo, se evaluó la diferente sensibilidad de las etapas del desarrollo embrionario temprano a los metales tóxicos. En este objetivo interesa conocer cómo se altera la sobrevivencia de los organismos por la presencia de un metal tóxico en una etapa relativamente estable, no caracterizada por los cambios profundos en la morfogénesis como ocurre en la etapa embrionaria o posteriormente durante la metamorfosis.

3.2. MATERIALES Y METODOS.

La obtención y fecundación de los huevos de Bufo arenarum fueron realizados como se explicó anteriormente (Secc. 1.1.2.1). Los embriones se mantuvieron con suficiente SH en bandejas plásticas hasta el E.25 - E.26 en que comenzaron los experimentos.

A) Grupos de 15 larvas provenientes de 3 ovulaciones, por sextuplicado fueron colocados en cápsulas conteniendo 500ml. de solución e incubadas en las siguientes soluciones con Cd, preparadas en SH: 0.008, 0.015, 0.030, 0.06, 0.12, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 y 4.00 mg Cd⁺⁺/L.

B) Otros sets de larvas provenientes de 3 ovulaciones, por cuatruplicado fueron tratados con Pb a las siguientes concentraciones: 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 16.0, 18.0 y 20.0 mg Pb⁺⁺/L.

C) Otros sets de larvas provenientes de tres ovulaciones, por cuatruplicado fueron tratados con Zn a las siguientes concentraciones: 16.0, 24.0, 32.0, 40.0 y 48 mg Zn⁺⁺/L.

Las soluciones ensayadas fueron preparadas a partir de soluciones madre de 1000 mg de Cd, Pb y Zn (preparadas a partir de las mismas sales utilizadas para embriones, objetivos 1 y 2). Simultáneamente fueron ensayados grupos de larvas controles (en SH, sin metal pesado) de cada una de las ovulaciones. Los experimentos se realizaron a temperatura controlada de 20 +/- 1 °C. Las soluciones se cambiaron diariamente y las larvas muertas fueron registradas y retiradas inmediatamente. La mortalidad fue registrada cada 24h durante 96h. Los valores de CL 50 fueron calculados analíticamente a través de la aplicación del método probit a partir de los datos de mortalidad de las larvas provenientes de cada una de las 3 parejas, utilizando un programa de computación de la U.S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA, 1988) o por el procedimiento de Lichfield y Wilcoxon. Se realizaron ANOVA multifactorial (con transformación arcsen de los porcentajes de mortalidad) para

comparar los efectos de los metales entre distintas ovulaciones y comparaciones múltiples (Scheffe). Las anomalías en la morfología externa y las alteraciones en el comportamiento fueron observadas con un microscopio estereoscópico "Wild".

3.3. RESULTADOS Y DISCUSION

Los datos de la sobrevivencia de las larvas de Bufo arenarum provenientes de 3 ovulaciones, expuestas al Cd, Pb y Zn se muestran en las Tablas 6, 7 y 8, respectivamente. La CL 50 24 hs de cadmio para las larvas estuvo comprendida entre (mg Cd⁺⁺/L) 0.77 y 0.81 (\bar{x} =0.78, s =0.02), I.C. 95%: 0.72-0.84, mientras que la CL 50 96 hs descendió a valores comprendidos entre (mg Cd⁺⁺/L) 0.64 y 0.65 (\bar{x} =0.65, s =0.006), I.C. 95%: 0.60-0.70 mientras que para el Pb la CL 50 24 estuvo comprendida entre (mg Pb⁺⁺/L) 15.00 y 16.89 (\bar{x} =15.67, s =1.06) I.C. 95%: 15.04-16.28 y la CL 96 hs entre 11.89 y 12.77 (\bar{x} =12.46, s =0.49), I.C. 95%: 11.76-13.05. La CL 50 24 hs de zinc estuvo entre (mg Zn⁺⁺/L) 39.21 y 41.81 (\bar{x} =40.44, s =1.31) I.C. 95%: 38.88-42.17, mientras que la CL 50 96 hs fue de 31.22 a 32.87 (\bar{x} =32.29, s =0.93) I.C. 95%: 30.39-34.26.

La comparación de los resultados de la mortalidad de las larvas dio diferencias significativas entre las concentraciones empleadas de cada uno de los tres metales pesados ($P=0$), no habiendo diferencias significativas ($P<0.05$) entre las distintas parejas que presentaron un único grupo de homogeneidad. Con respecto a las concentraciones: hubo diferencias significativas entre los siguientes grupos de concentraciones ($P<0.01$), para Cd: a) de 0 a 0.25, b) 0.5, c) 1, 2 y 4 mg Cd⁺⁺/L; para Pb, a) de 0 a 12, b) 16, c) 18 y 20 mg Pb⁺⁺ y para Zn: todas difirieron significativamente (Fig. 6).

Entre 1.0 y 2.0 mg Cd⁺⁺/L, estaría comprendida la concentración máxima tolerada, por encima de la cual no hay sobrevivencia significativa a las 24 h de tratamiento, mientras que para el Pb, la concentración máxima tolerada para el mismo tiempo estaría comprendida entre 18.0 y 20.0 mg Pb⁺⁺/L, o sea que mientras que 1.0 mg Cd⁺⁺/L fue significativamente tóxico ($P<0.005$) a las 24 h de tratamiento (Tabla 6), se necesitó una exposición a 18.0 mg Pb⁺⁺/L durante el mismo tiempo para obtener una mortalidad semejante (Tablas 6 y 7).

Asimismo, haciendo la relación entre las CL 50 obtenidas para el Cd y el Pb (Tabla 9) surge que el Cd es casi 20 veces más tóxico que el Pb. Comparando la toxicidad del zinc con la de los otros dos metales (T.9) surge que el Zn es entre 2.5 y 3 veces menos tóxico que el Pb y 50 veces menos tóxico que el Cd. La concentración máxima tolerada, por encima de la cual no hay sobrevivencia significativa a las 24 hs estaría en aproximadamente los 48 mg Zn⁺⁺/L.

Con respecto a los efectos tóxicos del Cd, Pb y Zn sobre la morfología externa, se observaron contracturas en la aleta caudal, la que adoptaba forma sigmoidea, en zig-zag, ampollas en la pared del cuerpo que se continuaban con descamación y desórdenes en el comportamiento como inactividad espontánea, temblores, pérdida del equilibrio que afectaba el patrón normal de la natación por lo que las larvas nadaban describiendo círculos o hélices. Además en el caso de las larvas expuestas al Cd, antes de morir exudaban abundante mucosidad a través de la superficie de todo el cuerpo.

3.4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- U.S. Environmental Protection Agency. Users guide for a computer program for probit analysis of data from acute and short term chronic toxicity test with aquatic organisms. Biological Methods, Environmental Monitoring and Support Lab., 1988.

4. ESTUDIAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS TOMANDO COMO CASO PARTICULAR EL CADMIO

4.1. INTRODUCCION.

La temperatura es uno de los factores físicos que tiene una gran influencia sobre la toxicidad de una sustancia. Esto es en particular muy importante cuando la sustancia de que se trata es un contaminante del agua. Así un ecosistema acuático va a resultar diferencialmente afectado por un xenobiótico según por ejemplo, su ubicación geográfica, factores estacionales o la temperatura de la descarga del efluente que lo contiene. La temperatura influye sobre los procesos bioquímicos, fisiológicos y etológicos ya que altera la velocidad con que ocurren las reacciones químicas, la cinética de las enzimas, las estructuras químicas y los mecanismos de membrana (Carrier y Beitinger, 1988). Por otro lado considerando que durante la gastrulación comienza a aumentar la sensibilidad a los metales pesados (objetivo 2) y que se trata de una etapa del desarrollo que involucra importantes eventos morfogénicos: desplazamientos celulares, cambios en la adhesividad celular e inducciones que establecen el patrón básico del organismo, se eligió dicho estadio para evaluar los cambios de susceptibilidad de los embriones al cadmio expuestos a diferentes temperaturas.

4.2. MATERIALES Y METODOS.

La obtención y fecundación de los huevos de Bufo arenarum fueron realizados como se explicó anteriormente (Secc.1.1.2.1). Tres grupos de 30 embriones (N=90) provenientes de tres ovulaciones fueron tratados al comienzo de la gastrulación (E.10) con las siguientes soluciones: 0.05, 0,25, y 2.00 mg Cd⁺⁺/L, a dos temperaturas, 20 y 30°C hasta que los controles finalizaron la gastrulación (E.12), entonces se mantuvieron en SH a 20 +/- 1 °C. Los correspondientes grupos controles fueron mantenidos simultáneamente en SH, sin Cd a las dos temperaturas entre E.10 y E.12 y luego a 20 +/- 1 °C hasta que completaron su desarrollo. Los efectos teratogénicos y las alteraciones en la ultraestructura fueron evaluados como en las Secc. 1.1.2.3.2. y 1.1.2.3.3.

4.3. RESULTADOS.

Los resultados se muestran en la Tabla 10 y Fig. 7 y 8. Los embriones expuestos a las distintas concentraciones de Cd mantenidos a 20°C sufrieron un retraso en su desarrollo durante la gastrulación (cont.: E.12, Experim.: E.11) pero el desarrollo fue similar a partir del estadio de pliegue neural (E.14) en adelante.

De la ANOVA resultó que los embriones tratados no tuvieron malformaciones significativas ($P=0$) en los primeros estadios (Fig.: 8, A y B) pero si a partir de E.19 en adelante en que dependieron tanto de la concentración (Fig.: 8, A) como de la temperatura de incubación (Fig.: 8, B) siendo la morfogénesis significativamente mejor ($P<0.01$) a 30 °C (Fig.: 8, B) y a concentraciones bajas (< 0.25 mg Cd⁺⁺/L, Fig.: 8, C).

A 20 °C en el estadio de latido cardíaco, una amplia mayoría de embriones exhibieron incurvaciones en el eje del cuerpo, microcefalia y subdesarrollo de las branquias (consideradas como malformaciones leves, lám. 4, fig. A). Sin embargo la frecuencia de alteraciones no se incrementó significativamente al avanzar el desarrollo (Tabla 10, Fig.: 8, B). Estas malformaciones leves disminuyeron significativamente ($P<0.01$) a 30 °C (Fig.: 8, B). La superficie de los embriones experimentales observada con microscopía electrónica de barrido (MEB) mostró pliegues en el ectodermo (lám. 4, fig. B) y aumento en el número de células ciliadas.

El desarrollo de los embriones mantenidos a 30°C no sufrió retraso. Sin embargo, entre el 23 y 27% de los embriones tratados con 2.00 mg Cd⁺⁺/L, tuvo fallas en el cierre del tapón vitelino e incurvaciones axiales severas, hidropesía y formación anormal de la cola (todas consideradas como malformaciones severas, muy significativas con respecto a los otros grupos, Fig.: 8, D, lámina 4, fig C). Las incurvaciones en el eje y las maformaciones en la aleta fueron tan severas que afectaron críticamente el comportamiento de natación. La MEB mostró células ciliadas distribuidas atípicamente formando cordones o agrupamientos celulares. En las dos concentraciones más bajas se registraron pocos casos de hidropesía y formación anormal de la cola (malformaciones severas, Tabla 10).

Del ANOVA resultó que la mortalidad de los embriones fue independiente tanto de la concentración como de la temperatura de incubación en los primeros estadios ($P<0.05$), pero no a partir de E.19 en adelante (Fig.: 7, A y C) en que la mortalidad fué dependiente de la temperatura siendo la sobrevida significativamente mayor ($P<0.05$) a 30 °C (Fig.:7, A).

4.4. DISCUSION

Los resultados más conspicuos están relacionados más con la morfogénesis que con la sobrevida de los embriones bajo estas condiciones. Los embriones experimentales exhibieron malformaciones con distinta incidencia según la concentración y la temperatura de exposición. El hecho de que la temperatura afecte la toxicidad del Cd fue informada para otros organismos acuáticos (Carrier y Beitinge, 1988). En el caso de los embriones de Bufo arenarum, las altas temperaturas podrían protegerlos contra los efectos teratogénicos del Cd a bajas concentraciones, pero a altas concentraciones de Cd las malformaciones tempranas aumentan. Estas observaciones podrían ser importantes ya que desde un punto de vista ecotoxicológico es más probable que los embriones sean expuestos a bajas concentraciones de cadmio que a concentraciones más altas. Además, a medida que el desarrollo continúa, el efecto protector inicial de la alta temperatura desaparece, debido probablemente a un fenómeno de recuperación ("catch up") que ocurre en los embriones mantenidos a 20 °C. Con respecto a la hidropesía, esta malformación podría estar relacionada con una falla producida por el Cd en el mecanismo osmoregulador. Las incurvaciones axiales podrían deberse al conocido efecto de desplazamiento del Ca por el Cd, produciendo alteraciones en el sistema esquelético como ha sido informado para peces y mamíferos

(Ferm y Carpenter, 1967, Rehwoldt y Karimian-Teherani, 1976). La presencia de cordones y acúmulos de células ciliadas podría deberse a disturbios en la diferenciación de las células glandulares, las que normalmente se intercalan entre las células ciliadas. La interferencia que ejerce el Cd sobre el desarrollo embrionario estaría relacionada con sus múltiples efectos sobre las proteínas estructurales enzimáticas, ácidos nucleicos como también a la disponibilidad de elementos esenciales y moléculas energéticas, con la consecuente reducción del rendimiento del embrión, como se discutió anteriormente (Secc.1.1.4.)

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Carrier, R. y Beitinger, T.L. Reduction in thermal tolerance of Notropis lutrensis and Pimephalis promelas exposed to cadmium. Wat. Res. 4: 511-515, 1988.
- Ferm, V.H. and Carpenter, S.J. Teratogenic effects of cadmium and its inhibition by zinc. Nature 216:1123-1124, 1967.
- Rehwoldt, R. y Karimian-Teherani, D. Uptake and effect of cadmium on zebrafish. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 15 442-446, 1976.

5. CUANTIFICAR LOS CONTENIDOS NETOS DE CADMIO EN EMBRIONES DE BUFO ARENARUM EN DETERMINADOS ESTADIOS DEL DESARROLLO Y EN FUNCION DE LA CONCENTRACION Y TIEMPO DE EXPOSICION.

5.1. INTRODUCCION.

El periodo embrionario de un organismo, es por lo general, la etapa más sensible a los agentes tóxicos. Además se ha descrito una sensibilidad diferente a una determinada noxa según el estadio del desarrollo embrionario en que el organismo es expuesto y en el objetivo 2 se informó la susceptibilidad diferencial a los metales pesados que presenta Bufo arenarum en función del estadio del desarrollo embrionario. Esta sensibilidad diferencial podría deberse a distintos factores como la capacidad para inducir síntesis de proteínas protectoras por ejemplo, metalotioninas, cambios en la incorporación de los cationes tóxicos por variaciones en la permeabilidad de las membranas y cambios en la excreción de los metales (Jin y Nordberg, 1986). En el presente estudio, se decidió concentrar el esfuerzo en medir la incorporación de uno de los metales, cadmio, en embriones de Bufo arenarum en cuatro estadios embrionarios comprendidos entre el estadio de latido cardíaco (E.19) y el final del desarrollo embrionario, opérculo completo (E.25), por los siguientes motivos: 1) A partir de los resultados obtenidos, de los tres metales pesados, el cadmio resultó ser el más tóxico. 2) Se eligieron estadios comprendidos entre el de mayor y el de menor susceptibilidad, descartándose para este estudio, el estadio de tubo neural (E.16), por la presencia de membrana y líquido vitelino. 3) Se conoce que durante el desarrollo temprano, los embriones de anfibio no incorporan, al menos, metales pesados en forma significativa (Herkovits *et al.*, 1991). Los objetivos de este estudio fueron: 1) establecer las relaciones de concentración entre el Cd del medio y el incorporado y 2) comparar los datos de incorporación con la susceptibilidad al Cd en diferentes estadios.

5.2. MATERIALES Y METODOS

La obtención y fecundación de los huevos de Bufo arenarum fueron realizados como se explicó anteriormente (Secc.1.1.2.1). Los experimentos fueron realizados a temperatura controlada de 20+/-0.5°C. La incorporación del Cd fue estudiada en los siguientes estadios: latido cardíaco (E.19), circulación branquial (E.20), boca abierta (E.21) y opérculo completo (S.25). Se colocaron grupos de 50 embriones en cápsulas de Petri de vidrio conteniendo 40 ml de solución (por duplicado) con

distintas concentraciones de Cd y durante los siguientes periodos de tiempo: 15, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos como sigue:

Estadio	mg Cd ⁺⁺ /L
Latido cardíaco (E.19).....	0.015, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.50 y 1.00
Circulac.branquial(E.20).....	0.06, 0.12, 0.25 y 0.50
Boca abierta (E.21).....	0.06, 0.12, 0.25 y 0.50
Opérculo completo (E.25)...	0.06, 0.12, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 y 3.00

Las soluciones de cadmio fueron preparadas a partir de una solución estándar de 1000 mg Cd⁺⁺/L (Cl₂Cd 2 1/2 H₂O, Mallinckrodt) y diluidas con SH. Los controles fueron grupos de 50 embriones (por duplicado) en los mismos estadios de desarrollo que los tratados, incubados en SH y mantenidos simultáneamente con aquellos. Al finalizar el tratamiento, los embriones fueron lavados dos veces con SH y digeridos con una solución ácida sulfonítrica (1:1 v/v, Merck), hasta mineralización completa. Los contenidos intraembrionarios de Cd fueron cuantificados por espectrofotometría de absorción atómica usando calibración con estándares. Los resultados fueron analizados estadísticamente con un test de Kruskal Wallis con contrastes múltiples.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSION.

En la Fig. 9 puede observarse la incorporación de Cd durante los cuatro estadios de tratamiento. La incorporación aumentó con el tiempo de exposición para cada concentración de Cd en el medio significativamente (P<0.05) pero no siempre de una forma proporcional, siempre y cuando la condición fuera compatible con la vida. Durante el estadio de latido cardíaco (E.19), con concentraciones menores de 0.25 mg Cd⁺⁺/L, la incorporación de Cd se incrementó en función del tiempo de exposición y la concentración en el medio, pero no en forma proporcional. A partir de 0.25 mg Cd⁺⁺/L en adelante, comenzó a haber mortalidad con las dosis ensayadas, de tal manera que con 0.25 y 0.5 mg Cd⁺⁺/L, hubo 100% de mortalidad a los 180 minutos de tratamiento y con 1 mg Cd⁺⁺/L a los 120 minutos, por lo que para estos grupos, los últimos tiempos de incorporación medidos fueron 120 y 60 minutos respectivamente, confirmando la alta susceptibilidad de los embriones en esta etapa del desarrollo que se había informado en el objetivo 2. Comparando los contenidos intraembrionarios de Cd en los distintos estadios, a los 60 minutos de tratamiento (Fig. 10), se observa que la incorporación va disminuyendo leve pero no significativamente (P<0.05) desde E.19 hasta E.21 y que vuelve a aumentar hacia el final del desarrollo, pero tampoco de forma significativa (P<0.05), si bien la incorporación de Cd aumentó significativamente (P<0.05) en función de la concentración del medio para cada estadio. Sin embargo, a las 4 horas de tratamiento (Fig. 11), la incorporación alcanza un "plateau", en los E.19, 20 y 21, y únicamente los embriones en el E.25, continúan incorporando Cd de una forma significativa (P<0.05) con respecto al tiempo y a la concentración de Cd en el medio. Por ejemplo con 0.5 mg Cd⁺⁺/L, la incorporación fue de aproximadamente 3 veces la que ocurrió en E.20 o E.21. (Fig. 11). Esta posibilidad de aumentar la incorporación,

incrementando la resistencia, indicaría un cambio en la permeabilidad de las membranas junto probablemente con un incremento muy significativo en los mecanismos detoxificadores (síntesis de metalotioninas, "heat shock proteins"). Este hecho indica que el organismo ha conseguido desarrollar rápidos mecanismos de adaptación al Cd que le permiten incrementar su resistencia aproximadamente 25 veces la concentración de Cd en el medio (de 0.12 en E.19 a 3 mg Cd⁺⁺/L en E.25), y casi 15 veces el valor de incorporación a la concentración más alta ensayada y tolerada a los 240 min. (de 5.2 a 76.75 x 10⁻³ ug Cd⁺⁺/embrión, Fig. 12) en sólo cuatro días de desarrollo.

5.4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Herkovits, J, Cardellini, P, Cassini, A y Vicenzo, A. Sobrevida, malformaciones, alteraciones ultraestructurales e incorporación de cadmio en embriones de Xenopus laevis tratados a partir de néurula con este metal pesado. Medicina 51(5):480, 1991.
- Jin, T y Nordberg, G.F. Cadmium toxicity in kidney cells. Resistance induced by short term pretreatment "in vitro" and "in vivo". Acta Pharmacol. et toxicol. 58: 137-143, 1986.

6. EVALUAR ALGUNOS PROCEDIMIENTOS ORIENTADOS A REDUCIR LOS EFECTOS TOXICOS DEL Pb Y DEL Cd Y A MEJORAR EL RENDIMIENTO DE EMBRIONES CON BAJA VIABILIDAD.

6.A. EFECTOS DE LA INTERACCION Cd/Zn A ALTAS CONCENTRACIONES DE CADMIO

6.A.1. INTRODUCCION

El cadmio, uno de los metales pesados más tóxicos produce retraso en el desarrollo, teratogénesis y eventualmente hasta la muerte de los embriones de mamíferos (Belmonte *et al.*, 1989). Con respecto a los anfibios, en los objetivos 1 y 2 quedaron demostrados los efectos tóxicos producidos por cadmio sobre el desarrollo embrionario de Bufo arenarum. Por otra parte, el Zn es un micronutriente con diversas funciones metabólicas (Cousins, 1986), que ejerce además un rol importante en la reproducción (Eberhardt y Halas, 1987). En contraste con los metales tóxicos Cd y Pb, el Zn tiene un reconocido efecto protector contra determinados agentes tóxicos, tanto físicos como químicos, por ejemplo, radiación UV, drogas como el acetaminopheno, acetozolamida y Ca-EDTA, entre otras. (Matsubara *et al.*, 1986, Chengelis *et al.*, 1986, Brownie *et al.*, 1986). El Zn también puede prevenir los efectos tóxicos del Cd en mamíferos (Ferm y Carpenter, 1967).

En un intento de neutralizar la acción tóxica del Cd en los embriones de Bufo arenarum, se estudió el efecto del Zn y su eventual interacción con Cd en tratamientos equimoleculares y a concentraciones de cadmio probadas como teratogénicas.

6.A.2. MATERIALES Y METODOS.

La obtención y fecundación de los huevos de Bufo arenarum fueron realizados como se explicó anteriormente (Secc.1.1.2.1).

A partir del estadio de dos blastómeras (E.3) en adelante, se trataron grupos de 30 embriones (por duplicado), con zinc (grupo A), cadmio (grupo B), zinc y cadmio (grupo C) y SH (grupo D) a las siguientes concentraciones : A: 0.5, 1.0 y 2.0 mg Zn⁺⁺/L, B: 1.0 mg Cd⁺⁺/L, C: 1.0 mg Cd⁺⁺/L + 1.0 mg Zn⁺⁺/L, 1.0 mg Cd⁺⁺/L + 0.5 mg Zn⁺⁺/L, 1.0 mg Cd⁺⁺/L + 2.0 mg Zn⁺⁺/L y D: SH sóloamente. Las soluciones fueron cambiadas diariamente y los embriones muertos fueron registrados y retirados inmediatamente. La toxicidad del cadmio sobre la estructura y comportamiento de los embriones, fue estudiada con microscopía estereoscópica, según se indica en la Secc. 1.1.2.3.3. Los tratamientos se hicieron a temperatura controlada de 20+/-1°C. Los

datos fueron analizados estadísticamente utilizando un ANOVA multifactorial seguido por un test de Scheffé.

6.A.3. RESULTADOS.

Los resultados se resumen en la Tabla 11 y Fig.: 13. El ANOVA de los efectos de los tratamientos sobre los embriones dio diferencias significativas ($P=0$) entre los mismos en forma global. El zinc, en las concentraciones ensayadas no tuvo efecto significativo sobre la sobrevivencia de los embriones ($P<0.01$), lo mismo que para la incidencia de malformaciones que fue levemente mayor en los tratados que en los controles e independiente de la concentración (7.40-10.52%, para los controles y 9.26-13.46%, para los tratados). Se confirmó que los embriones tratados con 1.00 mg Cd^{++} , desarrollan hasta la neurulación, deteniéndose entre los estadios de canal neural y tubo neural (aproximadamente entre 48 y 60 horas después de iniciado el tratamiento), presentando disociación celular, desarrollo retrasado, tapones vitelinos persistentes, canal neural con pliegues, etc.

Tanto la sobrevivencia como las malformaciones de los embriones tratados con ambos metales no fueron significativamente diferentes ($P<0.01$) de las obtenidas en los tratamientos con Cd solamente.

6.A.4. DISCUSION

El rol del Zn en la reproducción (Dreosti y Partick, 1987) y su acción protectora contra el cadmio en lo relacionado con la reproducción, son conocidos desde la década de los '60 (Kar *et al.*, 1960). En el presente estudio, las concentraciones de Zn utilizadas no lograron en cuanto al objetivo propuesto, prevenir la toxicidad del Cd. El zinc tuvo un efecto teratogénico leve. Los embriones tratados simultáneamente con ambos metales presentaron el mismo efecto que con Cd solamente. De estos resultados puede concluirse que el efecto de los cationes sobre la sobrevivencia en estas condiciones sería independiente entre sí.

6.A.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Belmonte, N.M., Rivera, O.E. y Herkovits. Zinc protection against cadmium effects on preimplantation mice embryos. J. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 43: 107, 1989.
- Brownie, C.F., Brownie, C., Noden, D., Krook, L., Haluska, M. and Aronson, A.L. Teratogenic effect of calcium edetate (CaEDTA) in rats and the protective effect of zinc. Toxicol. Appl. Pharmacol. 82:426-443, 1986.
- Chengelis, C.P., Dood, D.C., Means, M. y Kotsonis, F.N. Protection by zinc against acetaminophen induced hepatotoxicity in mice. Fund. Appl. Toxicol. 6:278-284, 1986

- Cousins, R. Toward a molecular understanding of zinc metabolism. *Clinical Physiology and Biochemistry*. (Karger AG, ed.) Basilea, 20-30, 1986
- Dreosti, I.E. y Partick, E.J. Zinc, ethanol and lipid peroxidation in adult and fetal rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 14:179-191, 1987.
- Eberhardt, M.J. y Halas, E.S. Developmental delays in offspring of rats undernourished or Zn deprived during lactation. *Physiol. Behav.* 41:309-314
- Ferm, V.H. and Carpenter, S.J. Teratogenic effects of cadmium and its inhibition by zinc. *Nature* 216:1123-1124, 1967.
- Kar, A.B., Das, R.P. y Mukerji, B. Prevention of cadmium induced changes in the gonads of rat by zinc and selenium. A study in antagonism between metals in biological systems. *Proc. Natl. Inst. Sci. India (suppl.)* 26: 40-50, 1960.
- Matsubara, J., Shida, T., Ishioka, K., Egawa, S., Inada, T. y Machida, K. Protective effect of zinc against lethality in irradiated mice. *Environm. Res.* 41:558-567, 1986.

6.B. EFECTO PROTECTOR DEL Zn CONTRA LA TOXICIDAD DE BAJAS CONCENTRACIONES DE CADMIO.

6.B.1. INTRODUCCION.

En la sección anterior (secc. 6.A.1.), se mencionó la acción protectora del Zn contra numerosos agentes tóxicos y su acción beneficiosa sobre la reproducción, sin embargo como se informó también (secc. 6.A.), los efectos letales producidos por altas concentraciones de Cd no pudieron ser prevenidos con tratamiento con Zn. Por otra parte, en el objetivo 1 se informó que 0.25 mg Cd⁺⁺/L produce efectos letales y teratogénicos en los embriones de Bufo arenarum. A fin de evaluar el efecto protector del Zn contra la toxicidad de bajas concentraciones de Cd, principalmente retraso en el desarrollo y malformaciones leves, efectos menores de la toxicidad del Cd, grupos de embriones a partir del comienzo del desarrollo embrionario, fueron tratados con distintas concentraciones de Zn/Cd tanto en forma simultánea como con pretratamiento de Zn en la solución de mantenimiento.

6.B.2. MATERIALES Y METODOS

La obtención y fecundación de los huevos de Bufo arenarum fueron realizados como se explicó anteriormente (Secc. 1.1.2.1).

A partir del estadio de dos blastómeras (E.3) comenzaron a tratarse grupos de 50 embriones por duplicado (un total de 100 individuos para cada condición de cada ovulación) provenientes de tres ovulaciones con las siguientes soluciones: A) control,

en SH, solamente, B) 0.25 mg Cd⁺⁺/L, C) 0.25 mg Cd⁺⁺/L + 2 mg Zn⁺⁺/L, D) 0.25 mg Cd⁺⁺/L + 4 mg Zn⁺⁺/L, E) 2 mg Zn⁺⁺/L, F) 4 mg Zn⁺⁺/L, G) embriones tratados con 2 mg Zn⁺⁺/L hasta el estadio de pliegue neural (E.14) y después tratados con 0.25 mg Cd⁺⁺/L, H) embriones tratados con 4 mg Zn⁺⁺/L hasta E.14 y después tratados con 0.25 mg Cd⁺⁺/L e I) embriones tratados con 0.25 mg Cd⁺⁺/L a partir de E.14 en adelante. Todas las soluciones se prepararon en SH. Los experimentos se realizaron a 25°C. Al alcanzar el estadio de circulación branquial (E.20), se evaluaron la sobrevida y las malformaciones con microscopía estereoscópica y scanning como se indicó en las secc. 1.1.2.3.2. y 1.1.2.3.3. Los datos fueron analizados estadísticamente usando un test de ANOVA multifactorial seguido por un test de Scheffe.

6.B.3. RESULTADOS.

Los efectos del Cd y del Zn sobre la sobrevida, morfogénesis y velocidad de desarrollo se muestran en la T.12 y Fig.: 14. El ANOVA para los efectos de los distintos tratamientos sobre los embriones dio diferencias significativas (P=0). Los embriones mantenidos con 0.25 mg Cd⁺⁺/L tuvieron una talla corporal reducida, malformaciones del tipo de incurvaciones en el eje del cuerpo y desarrollo parcial de aletas y mortalidad significativamente diferente a la de los controles (P<0.01), efecto que fue más marcado en el tratamiento continuo a partir de 2 blastómeras, E.3 (T.12, B, Fig.: 14 y lám. 5). En este grupo (B), entre el 61% y el 72% de los embriones sobrevivientes tuvieron un retraso significativo (P=0) en su desarrollo de 2-3 estadios con respecto a los controles. La superficie de estos embriones experimentales, observada con microscopía electrónica de barrido (MEB), mostró un número incrementado de células ciliadas atípicamente distribuidas en acúmulos o cordones y distintos grados de disociación. Aunque entre el 61-75% de los embriones tratados a partir de la neurulación (E.14) (T.12, I) tuvo un desarrollo retrasado (P=0), su morfología fue prácticamente normal, siendo inclusive significativamente mejor (P<0.01) que la de los embriones controles. Tanto los tratamientos simultáneos con Cd y Zn (T.12, C y D) como los tratamientos previos con Zn (T.12, G y H) previnieron los efectos letales, teratogénicos y citológicos del Cd, alcanzando valores de sobrevida e incidencia de malformaciones similares a los controles (P<0.05, Fig.: 14).

6.B.4. DISCUSION.

Estos resultados confirman y amplían la información con respecto a los efectos de 0.25 mg Cd⁺⁺/L sobre el desarrollo de Bufo arenarum (obj. 1 y 2). La alteración aguda causada en el desarrollo, por 0.25 mg Cd⁺⁺/L, administrada a los embriones a partir del estadio de 2 blastómeras en adelante, se expresó principalmente en el retraso en el desarrollo.

Particularmente en este estudio que se llevó a cabo a una temperatura un poco más elevada que en los descriptos anteriormente (25°C) es notable que la sobrevida fue significativamente más elevada que en los experimentos realizados a 20°C (obj.1). Sin embargo esta sobrevida continúa siendo significativamente menor que la de los controles (P=0). Estos efectos dependientes de la temperatura están de acuerdo con los resultados de los embriones tratados con Cd durante la gastrulación a dos temperaturas (obj. 4) en los que se observaba que la temperatura tiene un efecto modulador de la toxicidad del Cd. Aunque los efectos letales del Cd podrían no ser prevenidos por Zn al menos con los tratamientos utilizados hasta ahora, como se informó en la secc. 6.A.1., estos resultados nos permiten extender el concepto de la protección del Zn contra bajas concentraciones de Cd (0.25 mg Cd⁺⁺/L). De acuerdo a los resultados obtenidos por otros, trabajando con mamíferos (Ferm y Carpenter, 1967, Belmonte et al, 1989), aunque el efecto protector del Zn contra la toxicidad del Cd podría ser obtenido a partir de una relación de 1 Cd : 1 Zn, en el presente estudio, la relación 1 Cd : 8 Zn fue la que otorgó mayor protección en los embriones de anfibio. En cuanto al efecto disociante del Cd sobre los epitelios de los embriones, el mismo pudo ser neutralizado por el Zn, demostrando su conocida acción como citoprotector, estabilizador de membranas y participante de los mecanismos antioxidantes (Dreosti y Partick, 1987).

Hay por lo menos dos mecanismos a través de los cuáles, el Zn interfiere con el Cd: una competencia directa por los mismos sitios en las metaloenzimas (Dunn et al, 1987) y una acción indirecta por la cual una deficiencia de Zn en la dieta reduce la capacidad de detoxificación de los organismos (Record y Dreosti, 1988). En resumen estos resultados contribuyen al concepto de que el Zn ejerce una acción beneficiosa en la función reproductiva, en este caso previniendo la toxicidad del Cd.

6.B.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Belmonte, N.M., Rivera, O.E. y Herkovits. Zinc protection against cadmium effects on preimplantation mice embryos. J. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 43: 107, 1989.
- Dreosti, I.E. y Partick, E.J. Zinc, ethanol and lipid peroxidation in adult and fetal rats. Biol. Trace Elem. Res. 14:179-191, 1987.
- Dunn, M.A., Blalock, T.L. and Cousins, R.J. Metallothionein Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 185:107-119, 1987.
- Ferm, V.H. and Carpenter, S.J. Teratogenic effects of cadmium and its inhibition by zinc. Nature 216:1123-1124, 1967.

- Record, I.R. y Dreosti, I.E. Zinc and riboflavin interactions with salicylate in pregnant rats. Nutr. Rep.Internatl. 38:1041-1048, 1988.

6.C. EFECTOS ANTAGONICOS Y SINERGICOS ENTRE PLOMO Y ZINC EN LAS LARVAS DE BUFO ARENARUM.

6.C.1. INTRODUCCION

En el objetivo 3 se estudió la toxicidad del Pb sobre la sobrevivencia de las larvas de Bufo arenarum, habiéndose obtenido una CL 50 24 horas comprendida entre 14.82 y 16.89 mg Pb⁺⁺/L (\bar{x} =15.61, s =1.12) y la CL 96 comprendida entre 10.88 y 11.18 mg Pb⁺⁺/L (\bar{x} =11.05, s =0.15). También se estudiaron las alteraciones que produce el Pb sobre los epitelios, la actividad neuromuscular y el comportamiento (secc. 3.3.). Por otro lado, en las dos secciones anteriores (6.A y 6.B), se analizó la interacción Zn/Cd bajo diferentes condiciones experimentales. Es de destacar que la protección del Zn contra la toxicidad del Cd puede obtenerse con diferentes proporciones Cd/Zn. En mamíferos, una relación 1 Cd:1 Zn es suficiente para proteger la función reproductiva de la hembra (Ferm y Carpenter, 1967), incluyendo el desarrollo embrionario normal (Belmonte et al, 1989) y en anfibios, la relación Cd/Zn que otorga más protección en cuanto al retraso en el desarrollo y malformaciones leves producidas por bajas concentraciones de Cd es de 1 Cd:8 Zn (secc. 6.B.). En este estudio, el objetivo es evaluar el tipo de interacciones que ocurre entre el Pb y el Zn, y si es posible obtener protección del Zn contra el Pb, en este caso, en larvas tempranas de Bufo arenarum.

6.C.2. MATERIALES Y METODOS.

La obtención y fecundación de los huevos de Bufo arenarum fueron realizados como se explicó anteriormente (Secc.1.1.2.1). Los embriones se mantuvieron con suficiente SH en bandejas plásticas hasta el E.23 en que comenzaron a ser alimentados con lechuga hervida enfriada. Una vez alcanzado el E.25 y un día antes del experimento, las larvas fueron ayunadas a fin de descartar la presencia de heces que pudieran adsorber los cationes disminuyendo las concentraciones efectivas de los metales. Se colocaron grupos de 50 larvas (por duplicado, a partir de cada una de tres ovulaciones) en cápsulas de 500 ml y se trataron durante 120 horas de la siguiente manera: A) 8 mg Pb⁺⁺/L, B) 16 mg Pb⁺⁺/L, C) 4 mg Zn⁺⁺/L, D) 8 mg Zn⁺⁺/L, E) 16 mg Zn⁺⁺/L, F) 32 mg Zn⁺⁺/L, G) 8 mg Pb⁺⁺/L + 4 mg Zn⁺⁺/L, H) 8 mg Pb⁺⁺/L + 8 mg Zn⁺⁺/L, I) 8 mg Pb⁺⁺/L + 16 mg Zn⁺⁺/L, J) 16 mg Pb⁺⁺/L + 8 mg Zn⁺⁺, K) 16 mg Pb⁺⁺/L + 16 mg Zn⁺⁺/L, L) 16 mg Pb⁺⁺/L + 32 mg Zn⁺⁺/L, M) controles, en SH, sólo. Los experimentos se hicieron a 20±1°C y las soluciones se prepararon en SH. La sobrevivencia se evaluó a las 24, 72 y 120 horas de tratamiento. Los resultados fueron estudiados estadísticamente utilizando un test de ANOVA multifactorial seguido por un test de comparaciones múltiples de Scheffe. Los desórdenes en el

comportamiento y los efectos sobre los epitelios fueron observados con un microscopio estereoscópico.

6.C.3. RESULTADOS Y DISCUSION.

Los efectos del Pb y del Zn administrados en forma separada y en tratamientos combinados se resumen en la tabla 13 y Fig.: 15. El ANOVA para los efectos de los distintos tratamientos sobre las larvas dio diferencias significativas ($P=0$). A las 120 hs, las dos concentraciones más bajas de Zn y el tratamiento combinado de 8 mg Pb^{++}/L + 16 mg Zn^{++}/L no dieron diferencias significativas ($P<0.01$) en la mortalidad con respecto a los controles. El tratamiento con 8 mg Pb^{++}/L + 8 mg Zn^{++}/L , si bien dio una mortalidad significativamente diferente a la de los controles, mejoró ($P<0.01$) la sobrevivencia de los embriones tratados con Pb solamente. Es de destacar que la sobrevivencia de las larvas fue mucho más afectada por el Pb que por el Zn. Por ejemplo, después de 120 horas de tratamiento, hubo que cuatriplicar la concentración de Zn (32 mg Zn^{++}/L) para obtener una sobrevivencia similar a la obtenida con plomo (8 mg Pb^{++}/L). Las larvas de Bufo arenarum son significativamente más resistentes al Pb que los embriones de la misma especie al menos en determinados estadios del desarrollo. Por ejemplo, aproximadamente el 60% de los embriones tratados con 1 mg Pb^{++}/L en el estadio de actividad neuromuscular (E.18) durante solamente 20 horas de tratamiento morían 72 horas después (objetivo 2, secc. 2.1.2.2.). Este resultado también está de acuerdo con la mayor resistencia de las larvas al Cd, con respecto a determinados estadios embrionarios. Así, entre 1.0 y 2.0 mg Cd^{++}/L , estaba comprendida la concentración máxima tolerada por las larvas, por encima de la cual no había sobrevivencia significativa a partir de las 24 h de tratamiento (objetivo 3), mientras que 0.25 mg Cd^{++}/L producía la mortalidad del 100% de los embriones tratados a partir del estadio de tubo neural, después del mismo tiempo de tratamiento (objetivo 2, secc. 2.1.1.2.). Con respecto a los efectos del Pb sobre el comportamiento general, se confirmaron la escasa motilidad, la natación errática y la pérdida del equilibrio, efectos del Pb sobre el SNC, ya discutidos (obj. 1, secc. 1.2.4.). Las deformaciones de los huesos, lordosis y descamación del epitelio fueron proporcionales a la concentración de Pb en el medio y también se discutieron (obj. 1, secc. 1.2.4.).

El Zn en tratamiento simultáneo con Pb podría ejercer un efecto beneficioso luego de 120 hs de tratamiento, cuando el Pb es administrado a concentraciones por debajo de 8 mg Pb^{++}/L , alcanzándose una sobrevivencia no significativamente diferente ($P<0.05$) de la de los embriones control o tratados con las concentraciones bajas de Zn solamente. Este efecto de protección pareciera ser mayor que el informado para la toxicidad de Cd, en la que solamente se podían prevenir con Zn, alteraciones leves causadas por Cd (secc. 6.B.). La relación Pb/Zn que dio mayor protección fue 1 Pb:2 Zn (grupo I) pero es notable que el Zn pudo disminuir la toxicidad del Pb también a una proporción 1 Pb:1 Zn (grupo H), la misma relación que fue útil para prevenir los efectos del Cd sobre la función reproductiva de mamíferos (Rivera *et al*, 1990) y sobre los embriones de mamíferos (Belmonte *et al*, 1989). O sea que la relación de metal tóxico/ Zn, útil para dar protección es variable. Así, las concentraciones bajas de Zn no solamente fueron insuficientes para prevenir la toxicidad del Pb, sino que por el contrario, incrementaron los efectos deletéreos de este metal (2 Pb:1 Zn, grupo G), las concentraciones más elevadas de Zn tuvieron efectos beneficiosos en una relación 1

Pb:2 Zn (grupo I). A concentraciones más altas de Pb, los tratamientos con Zn en cualquier proporción resultaron en un efecto tóxico sinérgico (grupos J, K y L). La interferencia del Pb con las proteínas, ácidos nucleicos y metales esenciales ya se discutió anteriormente (obj. 1, secc. 1.2.4).

Estos resultados contribuyen al concepto de que el Zn podría ejercer un efecto beneficioso sobre la reproducción y el desarrollo, en este caso reduciendo la toxicidad del Pb. Sin embargo el grado de intoxicación y aún la relación Pb/Zn podría ser crítica para conseguir un efecto protector o tóxico del Zn.

6.C.4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Belmonte, N.M., Rivera, O.E. y Herkovits. Zinc protection against cadmium effects on preimplantation mice embryos. *J. Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 43:107-110, 1989.
- Ferm, V.H. and Carpenter, S.J. Teratogenic effects of cadmium and its inhibition by zinc. *Nature* 216:1123-1124, 1967.
- Rivera, O.E., Belmonte, N. y Herkovits, J. Zinc protection against cadmium effect on estrual cycle of Wistar rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 25:35-38, 1990.

6.D. EFECTO PROTECTOR DEL ZINC EN EMBRIONES DE BUFO ARENARUM CON ALTA INCIDENCIA DE MORTALIDAD Y MALFORMACIONES ESPONTANEAS

6.D.1. INTRODUCCION.

La importancia del Zn en los procesos de la reproducción, el desarrollo embrionario y la diferenciación, ya se mencionó anteriormente (Secc. 6.A., 6.B y 6.C.). Estos efectos estarían relacionados con la participación del Zn en numerosos procesos metabólicos (Cousins, 1986).

En relación con la reproducción y el desarrollo, las alteraciones producidas por la deficiencia de Zn incluyen desarrollo anormal del ovario, disfunción de la ovulación, alteración en los procesos de la meiosis (Watanabe *et al.*, 1983) y una elevada incidencia de malformaciones congénitas (Dreoste *et al.*, 1972, Sato *et al.*, 1985). Por otra parte, ya se mencionó el rol protector del Zn contra distintos agentes etiológicos de malformaciones, como la acetozolamida, Ca-EDTA, acetominofeno, ácido salicílico y cadmio (secc. 6.A.1.)

Con cierta frecuencia, se obtienen ovulaciones de Bufo arenarum atípicas, esto es con una elevada incidencia de malformaciones y mortalidad (Verhoeff-Defremery *et al.*, 1985)

Este es un estudio retrospectivo, en el que se evaluó un eventual rol protector del Zn sobre embriones de Bufo arenarum provenientes de tales ovulaciones. Además, considerando la capacidad de recuperación de los embriones que desarrollan con

deformaciones experimentales (Herkovits,1977), se evaluaron los efectos del Zn sobre la capacidad de recuperación de los embriones con alteraciones morfológicas espontáneas.

6.D.2. MATERIALES Y METODOS.

La obtención y fecundación de los huevos de Bufo arenarum fueron realizados como se explicó anteriormente (Secc.1.1.2.1). Los ovocitos fueron obtenidos a partir de 6 parejas, 3 que produjeron embriones normales (con tasa de mortalidad o malformaciones no mayores al 5% en el estadio de circulación branquial, E.20) y 3 que rindieron ovulaciones atípicas (con tasa de mortalidad y malformaciones mayores al 25% en el mismo estadio). A partir de cada ovulación se tomaron grupos de 30 embriones (por duplicado) que se colocaron en las siguientes soluciones: 1) control, en SH, 2) 1 mg Zn⁺⁺/L en SH y 3) 2 mg Zn⁺⁺/L en SH. Se evaluaron la mortalidad y malformaciones en los siguientes estadios: circulación branquial (E.20), pliegue opercular (E.23) y opérculo completo (E.25) con microscopía estereoscópica. Los experimentos se realizaron a 20+/-1°C. Los resultados fueron analizados estadísticamente con ANOVA multifactorial, seguido por un test de Scheffe.

6.D.3. RESULTADOS.

Los datos comparativos de los efectos del zinc sobre los embriones provenientes de ovulaciones normales y anormales o atípicas están resumidos en la T.14. El ANOVA confirmó la diferencia significativa entre los resultados obtenidos para ovulaciones normales y anormales (P<0.01, Fig.: 16, A). El ANOVA de los resultados de la mortalidad teniendo en cuenta los estadios, las concentraciones, el tipo de ovulación (normal o anormal) y las parejas en forma global dio muy significativo (P=0). La mortalidad fue dependiente del tipo de ovulación y la concentración de Zn (P=0, Fig.: 16, B). El ANOVA de los resultados del efecto total (mortalidad + malformaciones) de los tratamientos dio aún más significativo (P<0.01, Fig.: 16, C y D).

Ya en el estadio de gástrula final (E.12), los embriones anormales que no recibieron tratamiento exhibieron alteraciones en su desarrollo, tal como la derivada de una dificultad en la gastrulación como son los tapones vitelinos persistentes. Al alcanzar el E.20, en promedio el 35.5% de los embriones sobrevivientes, (T.14) presentó una o varias de las siguientes alteraciones: tamaño corporal reducido, incurvaciones en el eje, hidropesía y espinas bifidas. La mortalidad de estos grupos de embriones en los estadio 20 y 25 fue en promedio de 30,6% y 37.8% respectivamente, siendo la diferencia significativa entre el E.20 con respecto a los E.23 y E.25, pero no, entre estos dos últimos (P<0.01, Fig.: 16, A).

El tratamiento de los embriones anormales con 1 mg Zn⁺⁺/L mejoró significativamente tanto la sobrevivencia como la morfogénesis de los embriones (P<0.01, Fig.: 16, B y D). Sólomente un promedio de 7.6% de los embriones sobrevivientes de ovulaciones anormales tratados con 1 mg Zn⁺⁺/L exhibieron alteraciones al alcanzar el E.20, tales como incurvaciones leves en el eje, tamaño corporal reducido y espinas

bifidas. Hacia el final del desarrollo, un promedio de 15.8% de los embriones sobrevivientes presentaron malformaciones leves a las que se sumó la hidropesía. En contraste con los embriones no tratados, estos embriones registraron una mejora en la sobrevivencia con valores entre el 92.2 % y el 91.1% entre E.20 y E.25. Considerando el conjunto de embriones muertos y malformados en relación al número inicial de embriones se observó que este valor bajó significativamente ($P < 0.01$) de 55% en E.20 para los embriones provenientes de ovulaciones anormales a 12.8% cuando son tratados con 1 mg Zn^{++}/L , o sea que mejora su condición en aproximadamente 4 veces, mientras que al final del desarrollo (E.25), continuó siendo significativa la diferencia ($P < 0.01$) entre los valores correspondientes para los embriones no tratados (52.2%) y para los tratados (23.4%), o sea una reducción del 50% de la letalidad y teratogénesis.

Los embriones anormales también presentaron una mejora significativa ($P < 0.01$) cuando tratados con 2 mg Zn^{++}/L , no tan conspicua como en los tratados con 1 mg Zn^{++}/L , teniendo alteraciones similares a las de los otros grupos, alcanzando un promedio de 32% de malformaciones en el E.20. Como consecuencia de la muerte de los embriones más afectados, el porcentaje de malformaciones disminuyó al 27.9% en el E.25.

En los embriones provenientes de ovulaciones normales el porcentaje de embriones muertos y malformados en el E.25 fue de 6.1%, mientras que el tratamiento con Zn, aún con la concentración que mejoró la condición de los embriones anormales, aumentó leve pero no significativamente la letalidad ($P < 0.05$, Fig.:16, B) aunque se hizo significativa al considerarla junto con la teratogénesis ($P < 0.05$, Fig.: 16, D).

6.D.4. DISCUSION.

El efecto protector del zinc, ya demostrado contra una variedad de teratógenos, como también su condición de micronutriente involucrado en muchos procesos metabólicos (Cousins, *op cit*), podría ser responsable del efecto protector del Zn en embriones con alta incidencia de mortalidad y malformaciones espontáneas. En este contexto la mejora en la sobrevivencia por efecto del Zn fue dependiente de la concentración, siendo 1 mg Zn^{++}/L , la concentración que ejerció protección más significativa.

Desde un punto de vista bioquímico, el Zn es un componente estructural y funcional de varias metaloenzimas, incluyendo DNA- y RNA- polimerasas y también participa en la síntesis proteica (Dreoste *et al*, 1972). Se ha sugerido que una reducción en la actividad enzimática de las Zn metaloenzimas y particularmente una alteración en la síntesis de ácidos nucleicos podrían explicar las malformaciones obtenidas como consecuencia de la deficiencia de Zn (Dreoste *et al*, *op cit*, 1972).

Aunque en este estudio no se tienen datos del estado nutricional de los animales utilizados, las parejas de anfibios a partir de las cuales se obtuvieron tanto las ovulaciones normales como las anormales parecían saludables, con buen estado nutricional y provenían del mismo medio. En adultos de *Xenopus laevis* mantenidos en condiciones homogéneas de laboratorio, también se registraron diferencias significativas en la calidad de los embriones (Verhoeff-Defremery *et al*, *op cit*), lo que parecería indicar una etiología genética de este fenómeno. Una situación similar podría

darse en el caso de Bufo arenarum. En efecto, el Zn uno de los más efectivos agentes "animalizantes" modifica la expresión genética ectodérmica (Lallier, 1975), y a través de esta vía podría mejorar el desarrollo de estos embriones anormales.

Por otra parte, una disminución en las alteraciones morfológicas obtenidas a partir del E.20 llevaría a concluir que los embriones independientemente del tratamiento, tienen alguna capacidad de recuperación espontánea por lo menos a partir de la finalización del periodo organogenético embrionario más crítico.

6.D.5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Cousins, R. En *Clinical Physiology and Biochemistry*. (Karger AG, ed.) Basilea, 20-30, 1986.
- Dreoste, I.E., Grey, P.C. y Wilkins, F.J. *S. Afr. Med. J.* 46:1585, 1972.
- Herkovits, J. *Experientia* 36: 510-511, 1977.
- Lallier, R., En *The Sea Urchin Embryo*, G. Czihak, ed., Springer Verlag, Berlin, 477-509, 1975.
- Sato, F., Watanabe, T. y Endo, A. *Teratology* 31:13, 1985.
- Watanabe, T, Sato, F y Endo A. *Yamagata Med. J.* 1:13-19, 1983.

6.E. EFECTO PROTECTOR DE LOS PRETRATAMIENTOS CON BAJAS CONCENTRACIONES DE CADMIO/ZINC SOBRE LA SOBREVIVENCIA DE LAS LARVAS DE BUFO ARENARUM TRATADAS CON CADMIO.

6.E.1. INTRODUCCION.

En secciones anteriores se demostró que el Zn bajo determinadas condiciones puede prevenir al menos parcialmente los efectos teratogénicos y letales del Cd.

Ya se mencionó que como mecanismo de acción, el Cd establece fuertes uniones con los grupos -SH de las proteínas y con las bases de los ácidos nucleicos y compite fuertemente con otros cationes divalentes con funciones metabólicas importantes tales como el Zn y el Ca (secc. 1.1.4.). La capacidad de detoxificación del Cd está relacionada principalmente con las metalotioninas (Introducción general).

Algunas de estas proteínas reducen la toxicidad del Cd ligándose al metal, disminuyendo de esta forma el pool de Cd libre. Por otra parte, es posible obtener un incremento en la resistencia contra las concentraciones letales de Cd por un proceso de hormosis, fenómeno por el cual, aún una sustancia tóxica podría producir un efecto beneficioso cuando se encuentra en baja concentración (Furst, 1987). Además, la preexposición a bajas concentraciones de dichos cationes, como asimismo a bajas cantidades de otros agentes como shock térmico y radiación, incrementan la tolerancia a una subsiguiente exposición al Cd. Este efecto protector es frecuentemente explicado por uno o combinación de distintos factores como la inducción de la síntesis de ciertas proteínas conocidas como "heat shock proteins" (Furst, 1987), una reducción en la incorporación de los cationes tóxicos por una disminución en la permeabilidad de las membranas y un incremento en la excreción de los metales tóxicos (Jin y Nordberg, 1986). También existen casos de reducción o prevención de efectos deletéreos producidos por sustancias tóxicas por preexposición a bajas concentraciones de la misma sustancia (Spehar *et al.*, 1978). Por ejemplo, se ha detectado un efecto beneficioso por la preexposición a baja concentración de un metal tóxico en un pez, *Jordanella floridae* durante su desarrollo embrionario (Spehar *et al.*, *op cit.*).

Aunque el Cd parece ser uno de los cationes más eficientes para inducir la síntesis de metalotioninas, por su elevada toxicidad no es frecuente que se lo utilice con el objetivo de brindar protección. Por otra parte, el efecto protector del Zn contra la toxicidad de Cd, a través de la capacidad de inducción de metalotioninas del Zn, se ha informado en muchos modelos como carcinogénesis (Gunn *et al.*, 1964), daño testicular (Waalkes *et al.*, 1989) como también en la embriogénesis de mamíferos (Belmonte *et al.*, 1989) y anfibios como se lo ha demostrado previamente (secc. 6.B.)

El principal objetivo de esta sección fue intentar incrementar la resistencia al Cd de las larvas de Bufo arenarum pretratándolas con soluciones de concentración creciente de Cd/Zn.

6.E.2. MATERIALES Y METODOS.

La obtención y fecundación de los huevos de Bufo arenarum fueron realizados como se explicó anteriormente (Secc. 1.1.2.1). Los embriones se mantuvieron en SH hasta el final del desarrollo embrionario (E.25), en que comenzaron los experimentos que se realizaron a temperatura controlada de 20+/-0.5°C. Las larvas se colocaron en recipientes de vidrio en la proporción de 50 por 500 ml de solución. Grupos de 50 larvas (por duplicado, grupos B, C y D) provenientes de tres ovulaciones se incubaron en SH con la misma concentración inicial (día 1) de Zn⁺⁺/Cd⁺⁺ 0.05/0.025 mg/L la cual fue cambiada diariamente hasta obtener distintas concentraciones finales (día 4), siempre manteniendo la relación Zn/Cd de 2/1 como se describe más abajo. Otros dos grupos de 50 larvas (también por duplicado) se incubaron en SH solamente hasta alcanzar el 5° día, entonces un grupo continuó en la misma condición (control absoluto, grupo E) y el otro se cambió a SH con 1 mg Cd⁺⁺/L hasta el final del experimento (grupo A), simultáneamente con los tres grupos experimentales. Antes de comenzar el experimento se buscó la CL 100 24h para estas larvas, que fue de 1 mg Cd⁺⁺/L. Los efectos de los tratamientos fueron evaluados considerando la mortalidad a las 24 y 48 horas a partir de su exposición a la CL 100 24h.

Se realizaron ANOVA multifactorial con transformación arcsen de los porcentajes de las larvas muertas y análisis de grupos homogéneos (Scheffe) a fin de comparar los efectos de los distintos tratamientos.

Grupo	tiempo de exposición (días)			CdCL100 24	
	1°	2°	3°	4°	5°
A	0/0 *	0/0	0/0	0/0	1
B	0.05/0.025	0.05/0.025	0.05/0.025	0.05/0.025	1
C	0.05/0.025	0.15/0.075	0.20/0.100	0.25/0.125	1
D	0.05/0.025	0.30/0.150	0.35/0.175	0.40/0.20	1
E	0/0	0/0	0/0	0/0	SH**

* relación Zn/Cd

** solución de Holtfreter 10%.

6.E.3. RESULTADOS Y DISCUSION.

La Fig. 17 muestra la diferencia significativa entre las sobrevividas a 24 y 48 horas (P=0) entre las larvas de Bufo arenarum tratadas con 1 mg Cd⁺⁺/L que recibieron y las que no recibieron el pretratamiento (comparar el grupo A contra los grupos B, C y D). La CL 100 24 horas en el E.25 para estos grupos de larvas de Bufo arenarum fue de 1 mg Cd⁺⁺/L, 24 horas antes de comenzar los ensayos. La toxicidad del Cd pudo ser significativamente reducida por todos los pretratamientos ensayados, habiendo resultado óptimas la 3° y 4° condiciones (grupos C y D). Además, si las concentraciones de Zn/Cd de la solución se incrementan a través de pequeños valores, es posible obtener una prevención muy significativa contra la toxicidad del Cd (grupo C). Hay que mencionar que en ningún caso, el pretratamiento "per se" fue nocivo para las larvas.

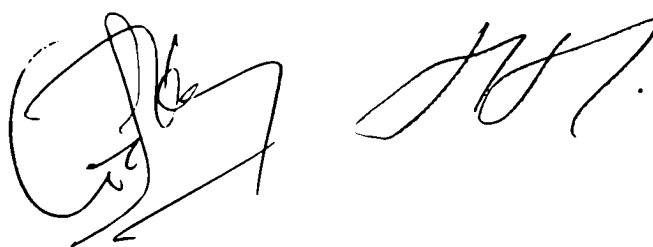
Está bien documentado que el Cd y el Zn se encuentran entre los metales pesados más efectivos para inducir síntesis de metalotioninas y además hay un acuerdo general con respecto a que el Zn ejerce protección contra la toxicidad del Cd (Waalkes y Poirier, 1984). Además la preexposición simultánea al Cd y al Zn que se hizo en estos experimentos podría combinar los efectos beneficiosos de los metales sin los efectos deletéreos de la toxicidad del Cd. Por otra parte, el Zn mismo podría ejercer un efecto beneficioso sobre las larvas, como se obtuvo anteriormente en los embriones con elevada incidencia de mortalidad y malformaciones espontáneas (secc. 6.D.). Además, el aumento en la resistencia de las larvas pretratadas contra la toxicidad del Cd podría deberse al menos parcialmente a cambios en la permeabilidad de las membranas como se ha informado para otros modelos que utilizaron células renales (Jin y Nordberg, op. cit.). La protección contra la toxicidad del Cd mediada por pretratamientos podría ser complementaria a la obtenida por tratamientos simultáneos con Zn como se informó previamente (secc. 6.B.).

6.E.4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Belmonte, N.M., Rivera, O.E. and Herkovits, J. Zinc protection against cadmium effects on preimplantation mice embryos. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 43:107-110, 1989
- Dunn, M.A., Blalock, T.L. and Cousins, R.J. Metallothionein Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 185:107-119, 1987.
- Gunn, S.A., Gould, T.C. and Anderson, W.A.D. Effect of zinc on cancerogenesis by cadmium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115:653, 1964.
- Furst, A. Hormetic effects in pharmacology: pharmacological inversions as prototypes of hormesis. Health Phys. 52:527, 1987.
- Jacobson, K.B. y Turner, J.E. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. Toxicology 16:1-37, 1980.
- Jin, T y Nordberg, G.F. Cadmium toxicity in kidney cells. Resistance induced by short term pretreatment "in vitro" and "in vivo". Acta Pharmacol. et toxicol. 58: 137-139, 1986.
- Spehar, R.L. Cadmium and zinc toxicity to flagfish Jordanella floridae. J. Fish. Res. Board Can. 33:1939-1945, 1976.
- Waalkes, M.P. and Poirier, L.A. In vitro cadmium-DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium and zinc. Toxicol. Appl. Pharmacol. 75: 539, 1984.
- Waalkes, M.P., Coogan, T.P. and Barter, R.A. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. Crit. Rev. Toxicol. 22 (3-4) :175-201, 1992.

CONCLUSIONES

- La toxicidad relativa entre los metales pesados estudiados es: $Cd > Pb > Zn$.
- Cuando los embriones son expuestos desde el comienzo de su desarrollo, los metales pesados son significativamente ($p < 0.05$) tóxicos a partir de $0.06 \text{ mg Cd}^{++}/\text{L}$, $0.25 \text{ mg Pb}^{++}/\text{L}$ y $4 \text{ mg Zn}^{++}/\text{L}$.
- Los metales pesados son significativamente ($p < 0.01$) más tóxicos durante el desarrollo embrionario de Bufo arenarum que durante el período larval.
- Dentro del período embrionario, el comienzo de la diferenciación de órganos y tejidos es el período más sensible, siendo por ejemplo para el Cd, 16 y 4 veces más sensible que la segmentación y fin del desarrollo embrionario respectivamente.
- La incorporación de Cd se incrementa tres veces entre el E.19, estadio de alta sensibilidad y el E.25, fin del desarrollo embrionario. Esta posibilidad de aumentar la incorporación, incrementando la resistencia, indicaría un cambio en la permeabilidad de las membranas junto probablemente a una maduración en los mecanismos detoxificadores.
- El Zn no puede prevenir la toxicidad de altas concentraciones de Cd ($1 \text{ mg Cd}^{++}/\text{L}$, a partir del E.3), pero si puede prevenir la mortalidad, las malformaciones y el retraso en el desarrollo a bajas concentraciones ($0.25 \text{ mg Cd}^{++}/\text{L}$, a partir de E.3 y de E.14) en una relación 1 Cd:8 Zn.
- El Zn también puede prevenir la toxicidad del Pb en larvas en forma más efectiva que con Cd, así una relación 1Pb:2Zn es suficiente para prevenir la mortalidad de las larvas tratadas con Pb.
- El Zn en 1 y 2 $\text{mg Zn}^{++}/\text{L}$ protege contra la mortalidad y las malformaciones en embriones provenientes de ovulaciones con alta incidencia de mortalidad y malformaciones espontáneas.
- Los efectos tóxicos del Cd en larvas también pueden prevenirse con pretratamientos con bajas concentraciones de Cd y Zn.



TABLAS

ABLA 1:

Mortalidad y malformaciones (%) producidas por el tratamiento con cadmio administrado en forma continua a partir del estadio de 2 blastomeros en los embriones de Bufo arenarum. (1)

Pareja 1
Horas de tratamiento y Estadio (2)

mg Cd + +/l	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)	
	Mo(3)	Mf(4)	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	0.00	1.67	0.00	3.33	0.00	3.33	0.00	3.33
0.03	0.00	0.00	3.33	3.45	20.00	10.42	26.67	12.20
0.06	0.00	1.67	10.00	7.40	33.33	20.00	36.67	18.42
0.12	0.00	16.67	13.33	15.09	56.67	30.00	58.33	28.57
0.16	0.00	55.00	53.33	38.50	75.00	100.00	81.67	100.00
0.25	0.00	71.66	66.67	100.00	76.67	100.00	85.00	100.00

Pareja 2
Horas de tratamiento y Estadio

mg Cd + +/l	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)	
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	0.00	3.33	0.00	3.33	3.33	3.45	3.33	3.45
0.03	0.00	0.00	0.00	3.33	3.33	6.89	8.33	12.73
0.06	0.00	0.00	0.00	8.33	13.33	15.38	13.33	18.37
0.12	0.00	0.00	0.00	11.66	25.00	40.00	36.67	36.84
0.16	0.00	0.00	0.00	35.00	58.33	72.00	60.00	62.50
0.25	0.00	0.00	0.00	60.00	66.67	100.00	71.67	100.00

Pareja 3
Horas de tratamiento y Estadio

mg Cd + +/l	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)	
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.03	0.00	0.00	0.00	3.33	0.00	6.66	3.33	6.90
0.06	0.00	0.00	0.00	3.33	0.00	8.33	6.67	10.53
0.12	0.00	0.00	0.00	8.33	16.67	16.00	20.00	29.17
0.16	0.00	0.00	0.00	21.67	50.00	83.33	50.00	73.33
0.25	0.00	0.00	0.00	33.33	58.33	100.00	63.33	100.00

Pareja 4
Horas de tratamiento y Estadio

mg Cd + +/l	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)	
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	0.00	1.67	3.33	3.45	5.00	1.75	5.00	1.75
0.03	0.00	1.67	3.33	3.33	0.00	3.33	0.00	3.33
0.06	0.00	10.00	8.33	3.33	0.00	3.33	0.00	3.33
0.12	0.00	13.33	16.67	10.00	20.00	6.67	28.33	34.78
0.16	0.00	50.00	46.67	31.67	56.67	100.00	58.33	100.00
0.25	0.00	56.67	58.33	100.00	75.00	100.00	75.00	100.00

Pareja 5
Horas de tratamiento y Estadio

mg Cd + +/l	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)	
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	0.00	1.67	0.00	3.33	0.00	3.33	0.00	3.33
0.03	0.00	3.33	8.33	3.67	15.00	9.80	20.00	14.58
0.06	0.00	8.33	11.67	3.77	30.00	21.43	35.00	20.51
0.12	0.00	20.00	25.00	24.00	58.33	36.00	61.67	34.78
0.16	0.00	63.33	56.67	46.15	63.33	100.00	80.00	100.00
0.25	0.00	63.33	66.67	100.00	71.67	100.00	80.00	100.00

Continua

Notas:

(1) Nro. de embriones tratados con cada concentracion:30 (por duplicado):60

(2) Estadios de los embriones control. E.12:gastrula tardia, E.18:actividad neuromuscular, E.21:boca abierta, E.22:circulacion en la aleta

(3) Mo: % de mortalidad sobre el N total

(4) Mf: nro. de embriones anormales/nro de embriones sobrevivientes (en porcentaje)

TABLA 2: Mortalidad y malformaciones (%) producidas por el tratamiento con plomo administrado en forma continua a partir del estadio de 2 blastomeros en los embriones de Bufo arenarum.

Pareja 1
Horas de tratamiento y Estadio

mg/l Pb++	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)	
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	0.00	0.00	0.00	1.70	0.00	5.00	0.00	5.00
0.12	0.00	0.00	0.00	3.00	0.00	5.00	0.00	5.00
0.25	0.00	19.70	23.33	10.90	23.33	11.00	23.33	11.00
0.50	13.33	21.80	33.33	75.60	53.33	100.00	53.33	100.00
1.00	20.00	19.20	80.00	100.00	100.00		100.00	
2.00	30.00	100.00	100.00		100.00		100.00	

Pareja 3
Horas de tratamiento y Estadio

mg/l Pb++	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)	
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	0.00	0.00	0.00	3.33	3.33	3.45	3.33	3.45
0.12	0.00	0.00	6.67	3.70	10.00	3.70	10.00	3.70
0.25	0.00	13.30	26.67	4.50	26.67	4.50	26.67	4.50
0.50	3.33	62.00	50.00	76.00	53.33	100.00	53.33	100.00
1.00	10.00	100.00	100.00		100.00	-	100.00	
2.00	20.00	100.00	100.00		100.00		100.00	

Pareja 5
Horas de tratamiento y Estadio

mg/l Pb++	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)	
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	0.00	0.00	3.33	6.90	6.67	5.50	6.67	5.50
0.12	0.00	0.00	6.67	3.50	6.67	5.40	6.67	5.40
0.25	0.00	15.00	26.67	6.70	26.67	6.70	26.67	6.70
0.50	6.67	40.00	43.33	61.80	46.67	100.00	46.67	100.00
1.00	13.33	23.10	93.33	100.00	100.00	-	100.00	-
2.00	23.33	100.00	100.00	-	100.00		100.00	

Pareja 2
Horas de tratamiento y Estadio

mg/l Pb++	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)	
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	3.33	0.00	3.33	0.00	6.67	3.60	6.67	3.60
0.12	3.33	13.80	3.33	13.80	3.33	17.20	3.33	17.20
0.25	0.00	73.30	6.67	78.60	13.33	100.00	13.33	100.00
0.50	6.67	100.00	83.33	100.00	100.00	-	100.00	-
1.00	3.33	100.00	100.00	-	100.00		100.00	
2.00	30.00	100.00	100.00		100.00		100.00	

Pareja 4
Horas de tratamiento y Estadio

mg/l Pb++	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)	
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	0.00	0.00	3.33	0.00	3.33	1.60	3.33	1.60
0.12	0.00	0.00	3.33	0.00	3.33	0.00	3.33	0.00
0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	0.00	5.00
0.50	0.00	0.00	3.33	0.00	3.33	100.00	3.33	100.00
1.00	0.00	100.00	96.67	100.00	100.00	-	100.00	-
2.00	0.00	100.00	100.00	-	100.00		100.00	

Continua

Notas:

Estadios de los embriones control. E.12:gastrula tardia,
E.18:actividad neuro muscular, E.21:boca abierta, E.22: circulacion
en la aleta

Nro. de embriones tratados con cada concentracion:30 (por
duplicado):60

Mo: % de mortalidad sobre el N inicial.

Mf: nro. de embriones anormales/nro de embriones
sobrevivientes (en porcentaje)

Concentraciones mayores de 2 mgPb+ +/l produjeron 100% de
muerte antes de las 48 horas

TABLA 3: Mortalidad y malformaciones (%) producidas por el tratamiento con zinc administrado en forma continua a partir del estadio de 2 blastomeros en los embriones de Bufo arenarum.

Pareja 1									
Horas de tratamiento y Estadio									
mg Zn + /l	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)		
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	
0.00	0.00	1.67	3.33	3.45	5.00	1.75	5.00	1.75	
1.00	0.00	0.00	3.33	1.72	5.00	3.51	5.00	3.51	
2.00	5.00	1.75	5.00	3.51	6.67	3.57	10.00	3.70	
4.00	5.00	7.02	5.00	7.02	6.67	12.50	15.00	11.76	
8.00	5.00	7.02	5.00	7.02	13.33	13.46	21.67	12.77	
16.00	13.33	6.90	21.67	23.40	23.33	21.74	58.33	12.00	
24.00	30.00	26.67	40.00	77.78	53.33	85.71	73.33	87.50	
32.00	91.67	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	
48.00	100.00	-	100.00	-	100.00	-	100.00	-	

Pareja 2									
Horas de tratamiento y Estadio									
mg Zn + /l	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)		
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
1.00	0.00	5.00	0.00	5.00	0.00	10.00	0.00	11.67	
2.00	0.00	5.00	0.00	5.00	0.00	11.67	0.00	13.33	
4.00	0.00	5.00	5.00	5.26	5.00	35.09	5.00	35.09	
8.00	5.00	7.02	5.00	7.02	10.00	11.11	10.00	11.11	
16.00	8.33	7.27	20.00	20.83	23.33	13.04	23.33	13.04	
24.00	15.00	7.84	23.00	26.10	26.67	29.55	48.33	22.58	
32.00	29.33	30.23	38.33	67.57	46.67	81.25	51.67	75.86	
48.00	85.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	

Pareja 3									
Horas de tratamiento y Estadio									
mg Zn + /l	24 (E.12)		48 (E.18)		72 (E.21)		96 (E.22)		
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	
0.00	0.00	3.33	0.00	3.33	3.33	3.45	3.33	3.45	
1.00	0.00	0.00	0.00	3.33	3.33	3.45	5.00	3.51	
2.00	0.00	5.00	5.00	3.51	5.00	3.51	11.67	11.32	
4.00	0.00	0.00	5.00	7.02	5.00	10.53	15.00	27.45	
8.00	6.67	8.93	10.00	7.41	13.33	11.54	21.67	14.89	
16.00	13.33	5.77	18.33	14.29	23.33	10.87	46.67	12.50	
24.00	36.67	31.58	46.67	84.38	61.67	82.61	71.67	82.35	
32.00	93.33	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	
48.00	100.00	-	100.00	-	100.00	-	100.00	-	

Notas:

Estadios de los embriones control. E.12:gastrula tardia,
E.18:actividad neuro muscular, E.21:boca abierta, E.22:circulacion
en la aleta

Nro. de embriones tratados con cada concentracion:30 (por
duplicado):60

Mo: % de mortalidad sobre el N inicial.

Mf: nro. de embriones anormales/nro de embriones
sobrevivientes (en porcentaje)

TABLA 4: CL50 72 y 96 horas (metodo Probit) de los embriones de Bufo arenarum tratados con Cd, Pb y Zn a partir de 2 blastomeros

Pareja Nr	CADMIO			
	CL50 72	I.C. 95%	CL50 96	I.C. 95%
1	0.09	0.07 - 0.12	0.07	0.05 - 0.10
2	0.17	0.14 - 0.22	0.15	0.12 - 0.19
3	0.20	0.17 - 0.31	0.19	0.15 - 0.26
4	0.17	0.14 - 0.19	0.16	0.13 - 0.19
5	0.11	0.08 - 0.14	0.08	0.06 - 0.10
x	0.15		0.13	
s	0.05		0.05	

Pareja Nr	PLOMO			
	CL50 72	I.C. 95%	CL50 96	I.C. 95%
1	0.41	0.37 - 0.46	0.41	0.37 - 0.46
3	0.40	0.35 - 0.45	0.40	0.35 - 0.45
5	0.45	0.39 - 0.50	0.45	0.39 - 0.50
2(*)	-	-	-	-
4(*)	-	-	-	-
x	0.42		0.42	
s	0.03		0.03	

Pareja Nr	ZINC			
	CL50 72	I.C. 95%	CL50 96	I.C. 95%
1	21.62	20.09 - 23.02	13.61	11.92 - 15.39
2	26.46	23.32 - 30.42	23.11	20.48 - 26.19
3	17.93	15.88 - 20.18	13.84	13.07 - 15.60
x	22.00		16.85	
s	4.28		5.42	

Nota:

(*): Los datos de mortalidad "todo o nada" no permiten calcular CL 50

TABLA 5: Mortalidad y malformaciones de los embriones de Bufo arenarum tratados con 1 mg Pb++/L a partir de diferentes estadios durante 20 horas (Obj. 2).

NroP	E(2)	Cond	Horas de tratamiento (1)							
			24		48		72		96	
			%Mo(3)	%Mf(4)	%Mo	%Mf	%Mo	%Mf	%Mo	%Mf
1		Cont.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.30	0.00	3.30
		Exper.	3.30	8.60	10.00	43.30	11.70	79.20	11.70	79.20
2	12	Cont.	3.30	5.20	5.00	5.30	6.70	3.60	6.70	3.60
		Exper.	6.70	16.10	8.30	58.30	15.00	78.40	15.00	78.40
3		Cont.	5.00	5.30	6.70	3.60	8.30	1.90	8.30	1.90
		Exper.	10.00	14.80	13.30	51.67	16.70	78.00	16.70	78.00

NroP	E	Cond	Horas de tratamiento							
			24		48		72		96	
			%Mo	%Mf	%Mo	%Mf	%Mo	%Mf	%Mo	%Mf
1		Cont.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		Exper.	28.30	93.00	48.30	87.10	55.00	92.60	55.00	92.60
2	18	Cont.	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70	1.70
		Exper.	35.00	94.90	58.30	88.00	63.30	91.00	63.30	91.00
3		Cont.	1.70	3.40	3.30	3.40	5.00	1.75	5.00	1.75
		Exper.	38.30	83.80	63.30	81.80	70.00	83.30	70.00	83.30

NroP	E	Cond	Horas de tratamiento							
			24		48		72		96	
			%Mo	%Mf	%Mo	%Mf	%Mo	%Mf	%Mo	%Mf
1		Cont.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		Exper.	3.30	6.90	13.30	32.70	20.00	46.70	20.00	46.70
2	20	Cont.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		Exper.	8.30	10.90	15.00	39.20	23.30	54.30	23.30	54.30
3		Cont.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
		Exper.	13.30	13.50	20.00	31.30	31.70	46.30	31.70	46.30

(1) Los tiempos de observacion se refieren al comienzo del tratamiento.

(2) Estadios de iniciacion de tratamiento: E.12: gastrula final,
E.18: actividad neuromuscular, E.20: circulacion branquial

(3) Nro.emb.muertos/Nro.inicial %

(4) Nro.emb.malform./Nro.emb.sobrev. %

TABLA 6: Sobrevida de las larvas de Bufo arenarum tratadas con Cd (Obj. 3).

Pareja 1

t (h)	mg Cd++/L										
	0.00	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00
24	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.5	16.2	4.5	0.0
48	100.0	100.0	100.0	97.8	100.0	100.0	100.0	94.4	4.5	0.0	0.0
72	97.8	100.0	97.8	97.8	97.7	96.6	94.4	89.9	3.3	0.0	0.0
96	96.7	97.4	96.7	96.7	96.7	95.5	94.4	86.6	2.2	0.0	0.0

Pareja 2

t (h)	mg Cd++/L										
	0.00	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.50	1.0	2.0	4.0
24	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	94.4	12.2	2.7	0.0
48	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.7	92.1	4.4	0.0	0.0
72	96.7	100.0	100.0	97.8	96.7	96.6	95.5	91.0	3.3	0.0	0.0
96	95.5	97.8	97.8	96.7	96.7	95.5	94.4	88.8	2.2	0.0	0.0

Pareja 3

t (h)	mg Cd++/L										
	0.00	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00
24	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	92.1	14.4	3.3	0.0
48	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	92.1	6.7	0.0	0.0
72	96.7	97.8	97.8	96.7	96.7	96.7	95.5	89.9	4.4	0.0	0.0
96	96.7	96.7	95.5	95.5	95.5	95.5	94.4	85.5	2.2	0.0	0.0

Tabla 7: Sobrevida (%) de las larvas de Bufo arenarum tratadas con Pb (Obj. 3)

Pareja 1

t (h)	mg Pb++/L										
	0.00	0.50	1.00	2.00	4.00	6.00	8.00	12.00	16.00	18.00	20.00
24	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	80.0	11.7	5.0
48	95.0	100.0	100.0	96.7	96.7	96.7	96.7	95.0	41.4	5.0	3.3
72	95.0	100.0	100.0	95.0	95.0	95.0	93.3	85.0	5.0	1.7	1.7
96	93.3	100.0	100.0	95.0	95.0	91.7	85.0	65.0	3.3	1.7	1.7

Pareja 2

t (h)	mg Pb++/L										
	0.00	0.50	1.00	2.00	4.00	6.00	8.00	12.00	16.00	18.00	20.00
24	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	93.3	83.3	73.3	15.0	3.3
48	100.0	100.0	100.0	100.0	96.7	95.0	90.0	80.0	36.7	10.0	3.3
72	98.3	100.0	100.0	95.0	95.0	91.7	88.3	68.3	3.3	3.3	1.7
96	96.7	100.0	100.0	95.0	93.3	86.7	85.0	63.3	1.7	1.7	1.7

Pareja 3

t (h)	mg Pb++/L										
	0.00	0.50	1.00	2.00	4.00	6.00	8.00	12.00	16.00	18.00	20.00
24	100.0	100.0	100.0	100.0	98.3	98.3	93.3	87.7	73.0	10.0	3.3
48	100.0	98.3	97.8	98.3	96.7	96.7	90.0	80.3	36.7	5.0	3.3
72	96.7	96.7	96.7	95.0	95.0	93.3	86.3	68.3	3.3	3.3	1.7
96	96.7	96.7	95.0	95.0	93.3	91.7	85.0	63.3	1.7	1.7	1.7

TABLA 8: Sobrevida (%) de las larvas de Bufo arenarum tratadas con Zn (Obj. 3).

Pareja 1

		mg Zn++/L					
t (h)	0.00	16.00	24.00	32.00	40.00	48.00	
24	100.0	100.0	100.0	80.0	76.7	5.0	
48	100.0	100.0	100.0	71.7	58.3	3.3	
72	100.0	100.0	98.3	65.0	41.7	0.0	
96	100.0	95.0	91.7	55.0	35.0	0.0	

Pareja 2

		mg Zn++/L					
t (h)	0.00	16.00	24.00	32.00	40.00	48.00	
24	100.0	100.0	100.0	76.7	68.3	3.3	
48	100.0	100.0	96.7	61.7	53.3	1.7	
72	100.0	100.0	95.0	58.3	36.7	0.0	
96	100.0	91.7	88.3	48.3	31.7	0.0	

Pareja 3

		mg Zn++/L					
t (h)	0.00	16.00	24.00	32.00	40.00	48.00	
24	100.0	100.0	100.0	83.3	80.0	13.3	
48	100.0	100.0	98.3	71.7	65.0	5.0	
72	100.0	100.0	98.3	63.3	48.3	0.0	
96	100.0	90.0	88.3	60.0	41.7	0.0	

TABLA 9:

CL50 a 24 y 96 h de las larvas de Bufo arenarum
tratadas con Cd, Pb y Zn (Obj. 3).

Pareja Nr	CADMIO			
	CL50 24	I.C.95%	CL50 96	I.C.95%
1	0.81	0.75-0.88	0.65	0.61-0.70
2	0.77	0.71-0.82	0.64	0.59-0.69
3	0.77	0.71-0.83	0.65	0.60-0.70
x	0.80	0.72-0.84	0.65	0.60-0.70
s	0.04		0.01	

Pareja Nr	PLOMO			
	CL50 24	I.C.95%	CL50 96	I.C.95%
1	16.89	16.54-16.21	12.72	12.01-13.31
2	15.12	14.36-15.87	12.77	12.14-13.32
3	15.00	14.23-15.77	11.89	11.12-12.53
x	15.67	15.04-16.28	12.46	11.76-13.05
s	1.06		0.49	

Pareja Nr	ZINC			
	CL50 24	I.C.95%	CL50 96	I.C.95%
1	40.32	38.78-41.97	32.78	31.00-34.60
2	39.21	37.70-40.79	31.22	29.37-33.11
3	41.81	40.15-43.74	32.87	30.81-35.06
x	40.44	38.88-42.17	32.29	30.39-34.26
s	1.31		0.93	

TABLA 10: Efectos del cadmio a 20 y 30 grados C sobre los embriones de Bufo arenarum durante la gastrulacion (Obj. 4).

Pareja 1		Estadio								
		14			19			25		
mg Cd++/L	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.00	20	0.0	0.0	0.0	0.00	0.0	0.0	3.30	0.0	0.0
0.05		0.0	0.0	0.0	10.00	3.7	86.4	10.00	3.7	86.4
0.25		0.0	0.0	0.0	10.00	3.7	86.7	10.00	3.7	86.4
2.00		0.0	0.0	0.0	0.00	6.7	93.3	10.00	0.0	90.0
0.00	30	0.0	0.0	0.0	0.00	6.7	3.3	0.00	6.7	3.3
0.05		0.0	0.0	0.0	3.30	3.5	11.5	6.70	3.6	7.1
0.25		0.0	0.0	0.0	6.70	7.1	13.1	6.70	7.1	13.1
2.00		0.0	27.0	0.0	3.30	33.3	63.2	3.30	40.2	57.5

Pareja 2		Estadio								
		14			19			25		
mg Cd++/L	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.00	20	1.1	1.1	2.2	1.10	1.1	2.2	2.20	0.0	2.3
0.05		2.20	2.3	3.4	12.20	6.3	86.1	12.20	5.1	87.3
0.25		1.10	2.2	1.1	11.10	6.3	86.3	12.20	5.1	87.3
2.00		2.20	3.4	2.3	2.20	9.1	94.3	11.10	2.5	87.5
0.00	30	2.20	2.3	2.3	2.20	9.1	4.5	3.30	8.0	5.7
0.05		0.00	2.2	1.1	1.10	5.6	12.4	5.60	3.5	9.4
0.25		1.10	1.1	2.2	7.80	9.6	14.5	7.80	9.6	12.0
2.00		3.30	23.0	3.4	4.50	39.5	69.8	4.50	46.5	65.1

continua

Pareja 3

Estadio

mg Cd++/L	C	14			19			25		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.00	20	1.10	1.1	0.0	1.10	1.1	0.0	2.20	0.0	0.0
0.05		0.00	0.0	0.0	11.10	5.0	80.0	11.10	2.5	82.5
0.25		0.00	1.1	1.1	12.20	3.8	83.5	13.30	1.3	87.2
2.00		2.20	1.1	1.1	2.20	6.8	90.9	3.30	6.9	86.2
0.00	30	0.00	0.0	0.0	1.10	7.9	2.2	1.10	6.7	3.4
0.05		0.00	0.0	0.0	2.20	2.3	8.0	5.60	2.4	5.9
0.25		2.20	1.1	0.0	4.50	4.7	9.3	5.60	4.7	8.2
2.00		3.30	23.0	1.1	3.30	28.7	57.5	3.70	36.8	52.9

A: % de mortalidad sobre N inicial de embriones

B: % de malformaciones severas

C: % de malformaciones leves

A= (N muertos/90) %

B=(N malf.sev./N sobrev) %

C=(N malf.leves/N sobrev) %

TABLA 11:

Mortalidad y malformaciones producidas por los tratamientos con altas concentraciones de Cd, Zn y Cd + Zn administrados a partir del E.3 en adelante (Obj. 6 A).

Pareja 1								
Horas de tratamiento								
mg/L	24 (B.M.)		48 (C.N.)		72 (A.N.)		96 (C.B.)	
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	3.03	0.00	6.06	8.06	10.61	10.17	13.04	10.52
1.0 Cd	8.20	0.00	24.59	6.52	100.00	-	100.00	-
0.5 Zn	5.00	0.00	8.33	0.00	11.66	11.32	13.33	13.46
1.0 Zn	5.36	0.00	8.47	9.26	10.17	11.32	10.17	11.32
2.0 Zn	3.39	0.00	10.17	11.32	13.56	11.76	13.56	13.21
1 Cd/1 Zn	4.69	0.00	26.56	12.76	100.00	-	100.00	-
1 Cd/0.5 Zn	4.84	0.00	24.11	19.15	100.00		100.00	
1 Cd/2 Zn	1.61	0.00	25.81	19.57	100.00		100.00	

Pareja 2								
Horas de tratamiento								
mg Cd+ +/l	24 (B.M.)		48 (C.N.)		72 (A.N.)		96 (C.B.)	
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	3.23	0.00	3.23	6.67	6.45	8.62	6.45	8.62
1.0 Cd	12.07	5.88	22.41	8.89	100.00	-	100.00	-
0.5 Zn	3.28	0.00	6.67	0.00	8.33	9.09	11.66	11.32
1.0 Zn	5.08	0.00	6.78	7.27	10.17	7.55	10.17	9.43
2.0 Zn	5.08	3.57	8.47	11.11	10.17	11.32	11.86	11.32
1 Cd/1 Zn	5.17	0.00	20.69	17.39	100.00	-	100.00	-
1 Cd/0.5 Zn	3.28	3.45	24.59	17.39	100.00		100.00	
1 Cd/2 Zn	3.23	1.67	22.58	20.83	100.00		100.00	

Pareja 3								
Horas de tratamiento								
mg Cd+ +/l	24 (B.M.)		48 (C.N.)		72 (A.N.)		96 (C.B.)	
	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf	Mo	Mf
0.00	1.67	0.00	5.00	3.51	8.33	5.45	10.00	7.40
1.0 Cd	18.33	4.08	31.67	17.07	100.00	-	100.00	-
0.5 Zn	3.33	3.45	6.67	8.93	8.33	9.09	13.33	9.62
1.0 Zn	3.33	1.72	8.33	9.09	10.00	9.26	10.00	9.26
2.0 Zn	5.00	3.51	8.33	9.09	11.67	9.43	11.67	11.32
1 Cd/1 Zn	3.33	0.00	30.00	21.43	100.00	-	100.00	-
1 Cd/0.5 Zn	1.67	0.00	28.33	20.93	100.00		100.00	
1 Cd/2 Zn	5.00	0.00	28.33	23.26	100.00		100.00	

Tabla 12: Efecto de diferentes tratamientos con bajas concentraciones de Cd y/o Zn sobre los embriones de *Bufo arenarum* (Obj. 6 B).

Pareja Nro 1		(a)			Cd/Zn
Grupo	mg/L	% Mo	% Mf	% Rt	
A	control (SH)	5	9	2	-
B	0.25 Cd (E.3)	20	15	72	-
C	0.25 Cd + 2 Zn	8	11	3	1/8
D	0.25 Cd + 4 Zn	8	10	3	1/16
E	2 Zn	7	7	2	-
F	4 Zn	4	9	7	-
G	2 Zn / 0.25 Cd	4	6	3	1/8
H	4 Zn / 0.25 Cd	8	9	4	1/16
I	0.25 Cd (E.14)	12	3	70	-

Pareja Nro 2		(a)			Cd/Zn
Grupo	mg/L	% Mo	% Mf	% Rt	
A	control (SH)	10	7	5	-
B	0.25 Cd (E.3)	25	20	66	-
C	0.25 Cd + 2 Zn	11	9	5	1/8
D	0.25 Cd + 4 Zn	11	8	5	1/16
E	2 Zn	10	6	4	-
F	4 Zn	7	6	0	-
G	2 Zn / 0.25 Cd	8	5	5	1/8
H	4 Zn / 0.25 Cd	11	8	5	1/16
I	0.25 Cd (E.14)	27	6	61	-

Pareja Nro 3		(a)			Cd/Zn
Grupo	mg/L	% Mo	% Mf	% Rt	
A	control (SH)	8	10	3	-
B	0.25 Cd (E.3)	17	18	61	-
C	0.25 Cd + 2 Zn	10	13	2	1/8
D	0.25 Cd + 4 Zn	9	11	3	1/16
E	2 Zn	11	9	1	-
F	4 Zn	5	8	3	-
G	2 Zn / 0.25 Cd	3	6	2	1/8
H	4 Zn / 0.25 Cd	11	9	2	1/16
I	0.25 Cd (E.14)	15	4	75	-

continua

(a) Los porcentajes de mortalidad (Mo), malformaciones (Mf) y embriones retrasados en su desarrollo (Rt) fueron registrados en el estadio de circulación branquial (E.20)
Cada grupo consta de 50 embriones (por duplicado, total= 100)

CDZNEMBR.WQ1

Tabla 13:

Mortalidad de las larvas de *Bufo arenarum* tratadas con Pb y/o Zn a diferentes tiempos de tratamiento (Obj. 6 C).

Pareja Nro 1

Grupo	mg/L	% Mortalidad			Pb/Zn
		24hs	72hs	120hs	
A	8 Pb++	0	0	40	-
B	16 Pb++	0	70	90	-
C	4 Zn++	0	0	0	-
D	8 Zn++	0	0	0	-
E	16 Zn++	0	0	5	-
F	32 Zn++	20	35	35	-
G	8 Pb++/4 Zn++	0	5	35	2/1
H	8 Pb++/8 Zn++	0	0	15	1/1
I	8 Pb++/16 Zn++	0	5	5	1/2
J	16 Pb++/8 Zn++	0	10	100	2/1
K	16 Pb++/16 Zn++	0	20	100	1/1
L	16 Pb++/32 Zn++	0	20	100	1/2
M	Control (SH)	0	0	0	-

Pareja Nro 2

Grupo	mg/L	% Mortalidad			Pb/Zn
		24hs	72hs	120hs	
A	8 Pb++	0	0	55	-
B	16 Pb++	0	73	81	-
C	4 Zn++	0	0	0	-
D	8 Zn++	0	0	0	-
E	16 Zn++	0	0	8	-
F	32 Zn++	23	40	45	-
G	8 Pb++/4 Zn++	2	7	70	2/1
H	8 Pb++/8 Zn++	3	5	20	1/1
I	8 Pb++/16 Zn++	0	5	5	1/2
J	16 Pb++/8 Zn++	3	20	100	2/1
K	16 Pb++/16 Zn++	10	27	100	1/1
L	16 Pb++/32 Zn++	0	20	100	1/2
M	Control (SH)	0	3	3	-

Continua

Pareja Nro 3

Grupo	mg/L	% Mortalidad			Pb/Zn
		24hs	72hs	120hs	
A	8 Pb++	0	0	34	-
B	16 Pb++	0	63	87	-
C	4 Zn++	0	0	0	
D	8 Zn++	0	0	0	
E	16 Zn++	0	0	2	-
F	32 Zn++	16	29	35	-
G	8 Pb++/4 Zn++	0	5	62	2/1
H	8 Pb++/8 Zn++	0	5	11	1/1
I	8 Pb++/16 Zn++	0	3	3	1/2
J	16 Pb++/8 Zn++	0	8	100	2/1
K	16 Pb++/16 Zn++	0	18	100	1/1
L	16 Pb++/32 Zn++	0	16	100	1/2
M	Control (SH)	0	0	0	-

Tabla 14: Datos de sobrevida y malformaciones de los embriones de *Bufo arenarum* provenientes de ovulaciones anormales (A) y normales (N) tratados con Zn (Obj. 6 D).

Pareja 1

		Estadio								
		20			23			25		
Tipo ov.	mg Zn/L	% Mo	% Mf	% Mu	% Mo	% Mf	% Mu	% Mo	% Mf	% Mu
A	0 (SH)	30.0	33.3	53.3	36.7	21.1	50.0	38.3	10.8	45.0
	1	5.0	8.8	13.3	10.0	18.5	26.7	10.0	18.5	26.7
	2	16.7	34.0	45.0	33.3	25.0	50.0	33.3	25.0	50.0
N	0 (SH)	3.3	3.4	6.7	3.3	3.4	6.7	3.3	3.4	6.7
	1	0.0	3.3	3.3	15.0	2.0	16.7	15.0	2.0	16.7
	2	5.0	5.3	10.0	15.0	9.8	23.3	15.0	9.8	23.3

Pareja 2

		Estadio								
		20			23			25		
Tipo ov.	mg Zn/L	% Mo	% Mf	% Mu	% Mo	% Mf	% Mu	% Mo	% Mf	% Mu
A	0 (SH)	26.7	29.5	48.3	33.3	35.0	56.7	33.3	35.0	56.7
	1	0.0	5.0	5.0	5.0	14.0	18.3	8.3	14.5	21.7
	2	8.3	27.3	33.3	23.3	26.1	43.3	25.0	26.7	45.0
N	0 (SH)	0.0	1.7	1.7	1.7	3.4	5.0	3.3	1.7	5.0
	1	1.7	3.4	5.0	6.7	1.8	8.3	6.7	1.8	8.3
	2	3.3	5.2	8.3	11.7	9.4	20.0	11.7	9.4	20.0

Pareja 3

		Estadio								
		20			23			25		
Tipo ov.	mg Zn/L	% Mo	% Mf	% Mu	% Mo	% Mf	% Mu	% Mo	% Mf	% Mu
A	0 (SH)	35.0	43.6	63.3	40.0	38.9	63.3	41.7	22.9	55.0
	1	8.3	9.1	20.0	8.3	14.5	21.7	8.3	14.5	21.7
	2	18.3	34.7	46.7	21.7	31.9	46.7	21.7	31.9	46.7
N	0 (SH)	1.7	1.7	3.3	5.0	3.4	6.7	5.0	3.4	6.7
	1	3.3	1.7	5.0	11.7	3.8	15.0	13.3	1.9	15.0
	2	6.7	7.1	13.3	13.3	11.5	23.3	15.0	9.8	23.3

% Mo: % de mortalidad sobre N inicial de embriones (60)

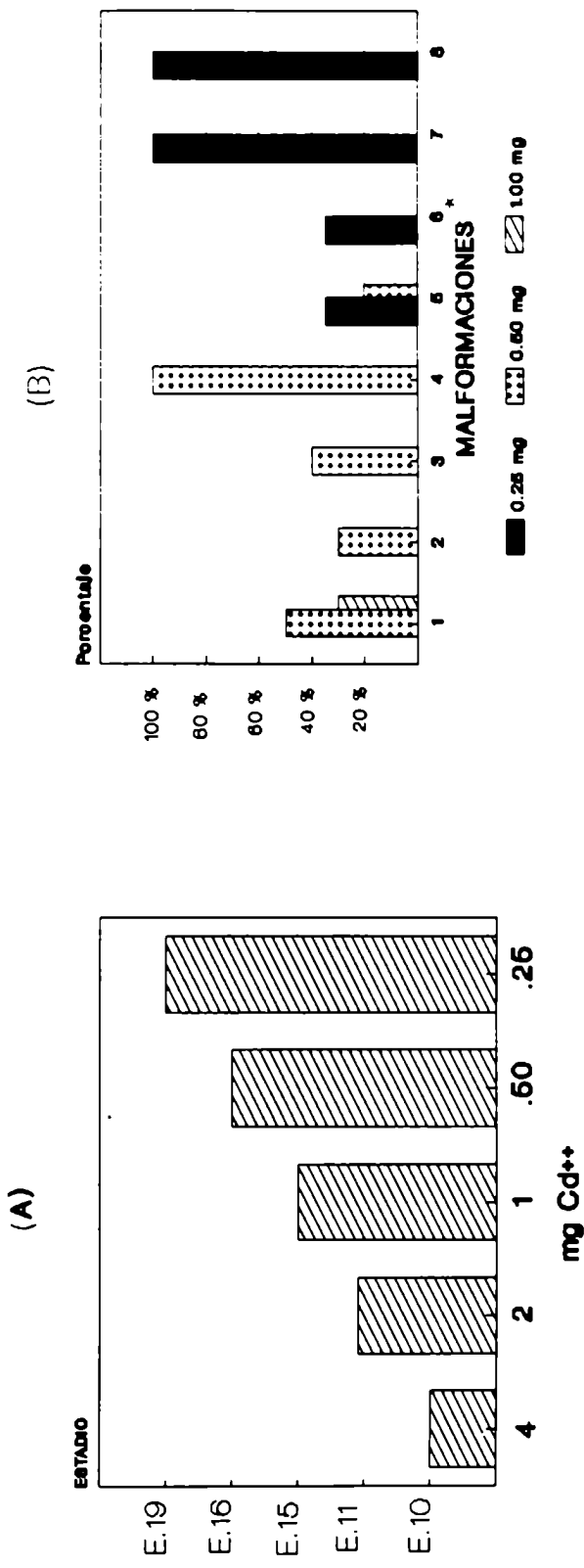
% Mf: % de embriones malformados sobrevivientes.

% Mu Mf: % de embriones muertos y malformados sobre el N inicial de embriones (60)

FIGURAS

FIGURA 1

Estadio máximo alcanzado (A) y porcentaje de malformaciones observadas (B) en embriones de *Bufo arenarum* expuestos a Cd a partir de 2 blastómeros



- 1: Placa-canal neural con pliegues longitudinales
- 2: Tapón vitelino persistente
- 3: Cierre incompleto de tubo neural
- 4: Mamelones ectodérmicos
- 5: Hidropesia
- 6: desviación del eje corporal
- 7: Desarrollo parcial de la aleta
- 8: Desarrollo parcial de branquias

Fig. 2: Valores medios e intervalos de confianza (Scheffe 95%) de la mortalidad de los embriones de Bufo arenarum, tratados con Cd, Pb y Zn a partir del estadio de 2 blastómeros.

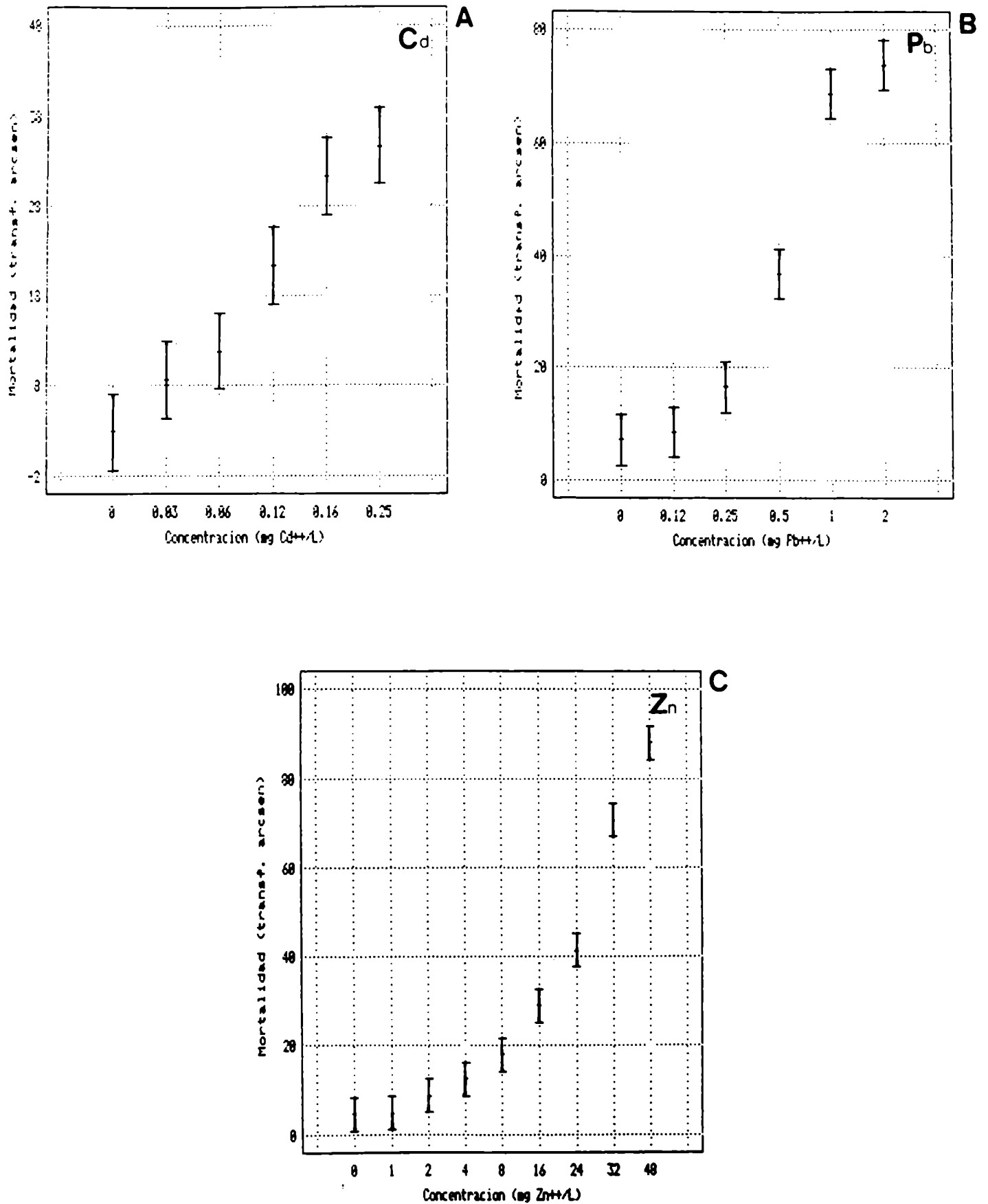


FIG 3: Concentracion de Cd que produce el 100% de mortalidad en 24 h en los embriones tratados en distintos estadios

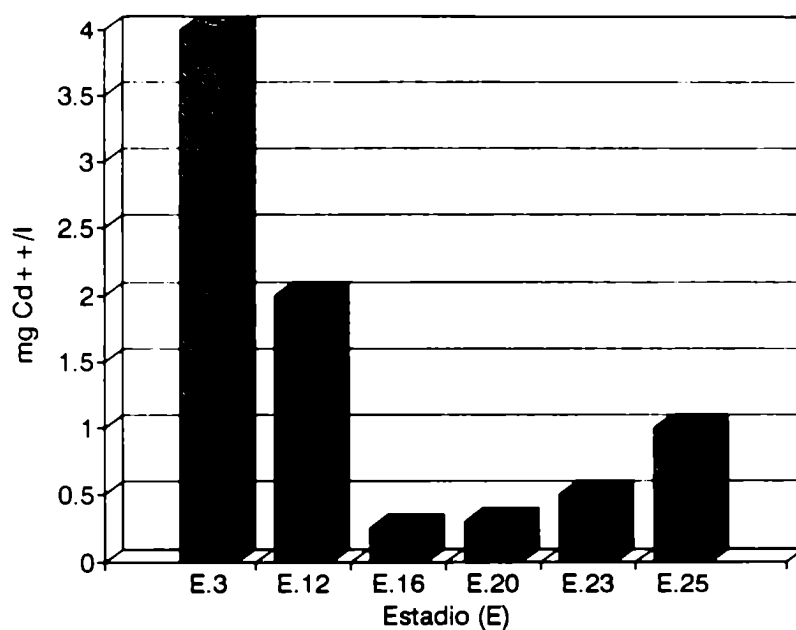
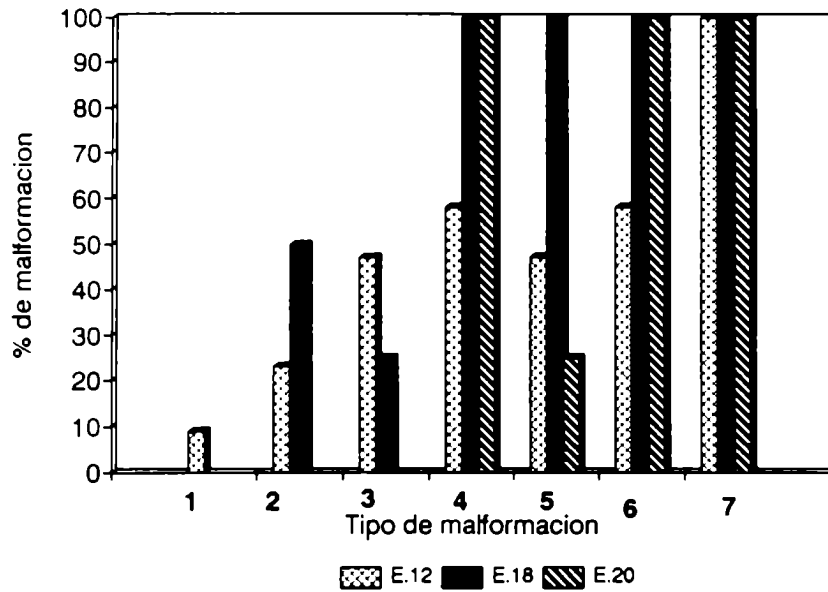


FIGURA 4:

Tipos de malformaciones observadas en los embriones de *Bufo arenarum* expuestos al plomo en distintos estadios.



- 1: Cierre incompleto de tubo neural
- 2: Hidropesia
- 3: Colas reducidas y cilindricas
- 4: Aletas parcialmente desarrolladas con bordes irregulares
- 5: Desviacion del eje corporal
- 6: Desarrollo parcial de branquias
- 7: Reduccion del tamaño corporal

FIG. 5: Valores medios e intervalos de confianza (Scheffe 99%) de la mortalidad de los embriones tratados con 1 mg Pb++/L, en distintos estadios.

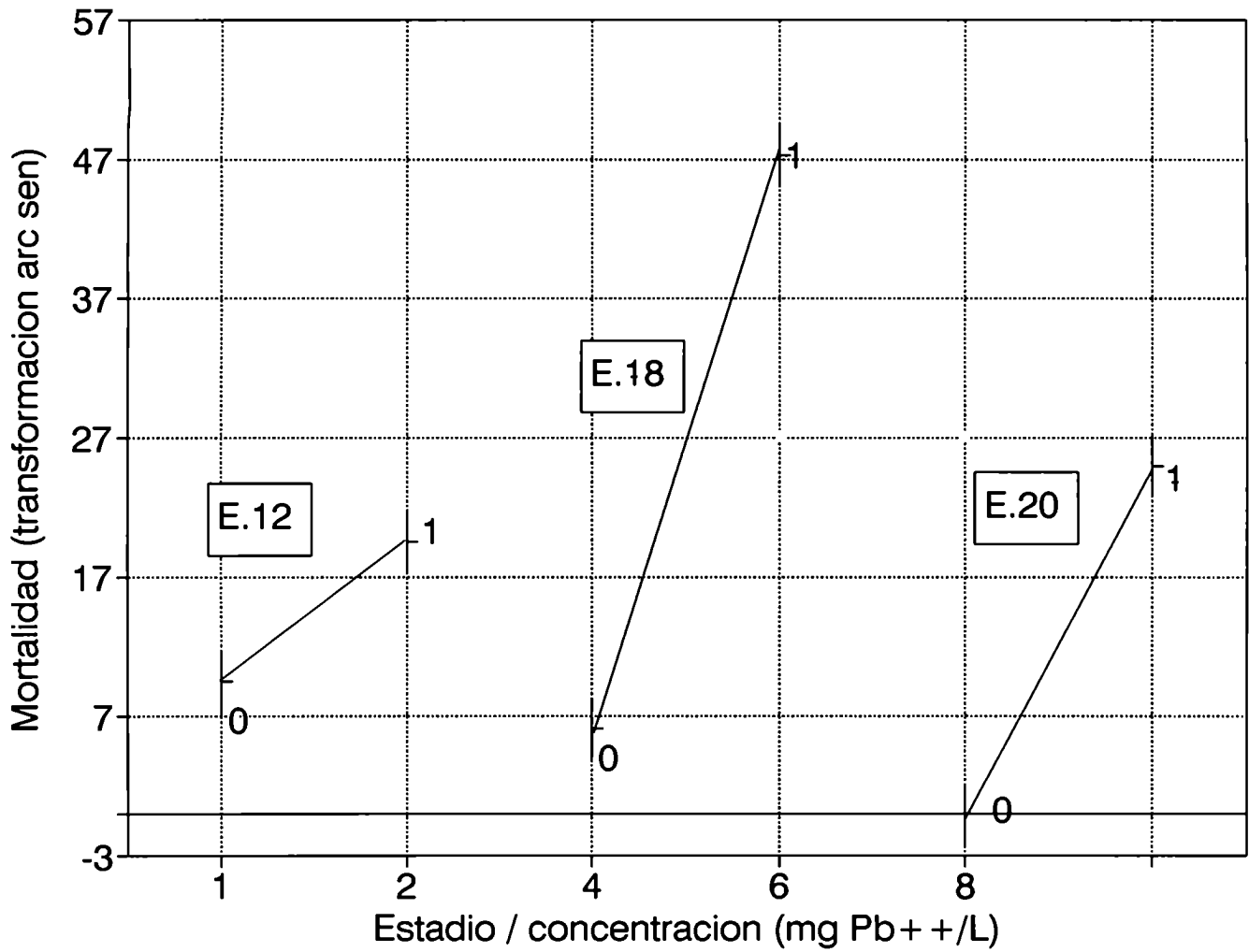


Fig. 6: Intervalos de confianza (Scheffe 99%) para los valores medios de la mortalidad de las larvas de Bufo arenarum, tratados con Cd, Pb y Zn.

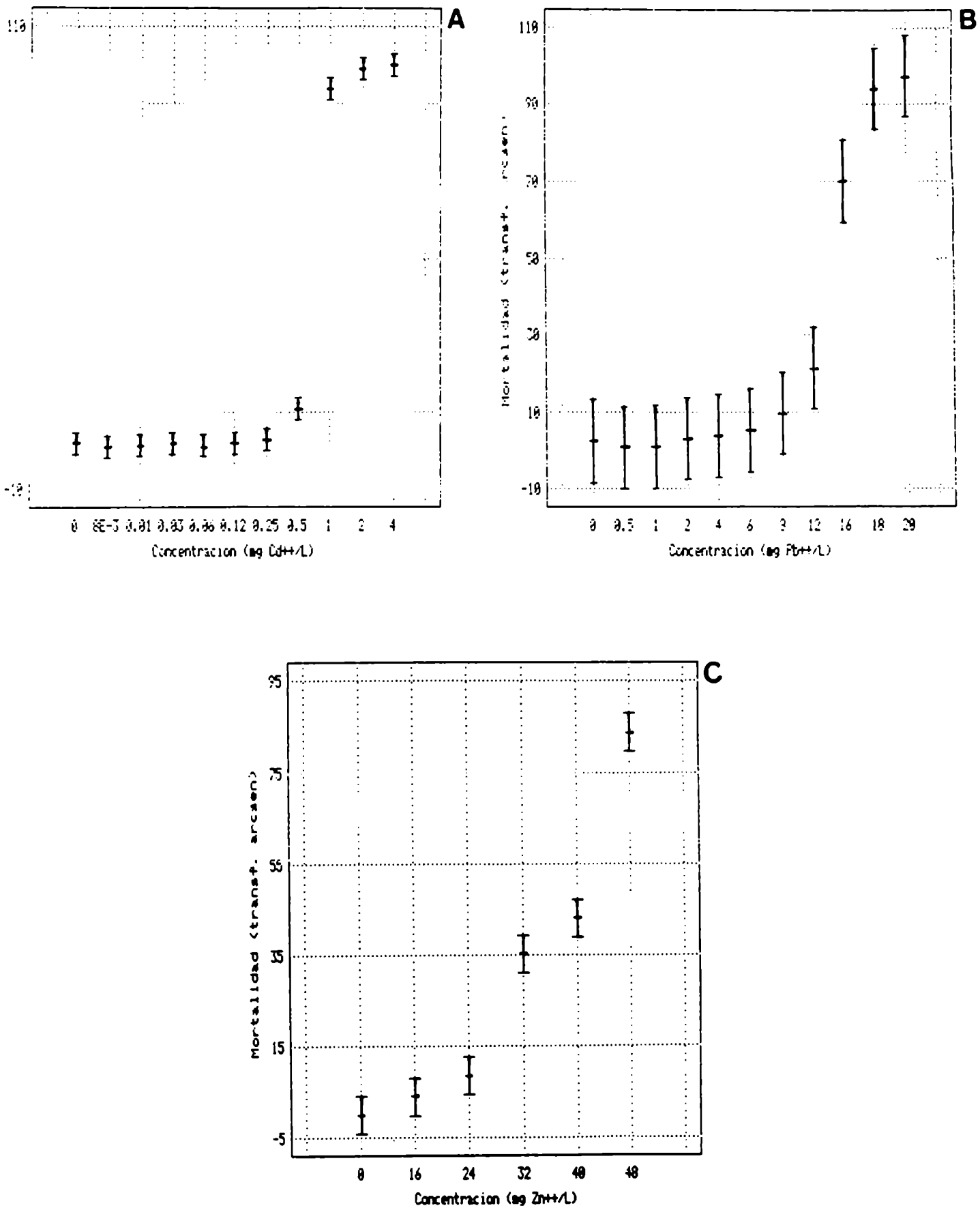


Fig: 7 Valores medios e intervalos de confianza (Scheffe 95%) de la mortalidad de los embriones de *Bufo arenarum* tratados con Cd durante la gastrulación.

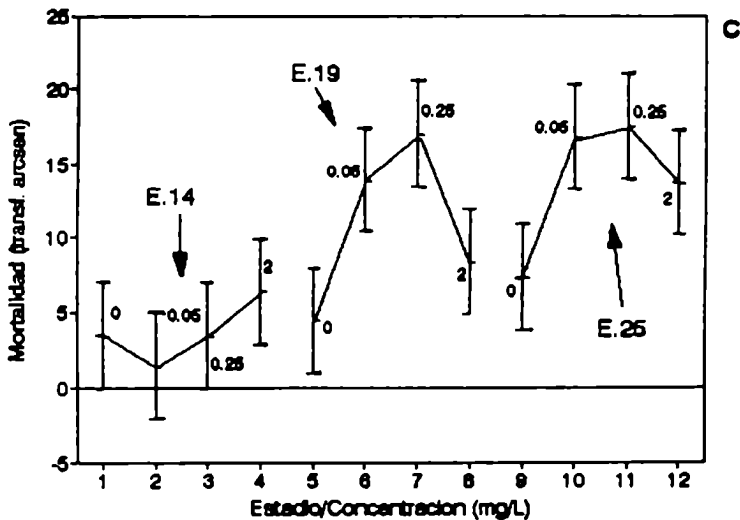
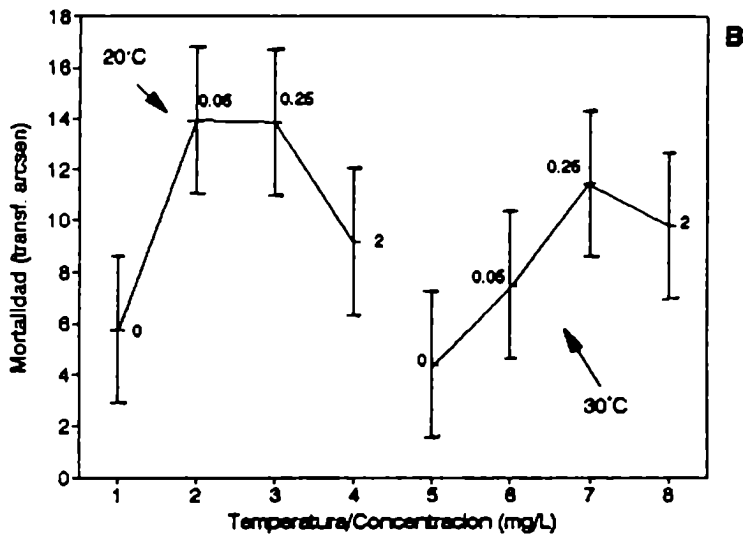
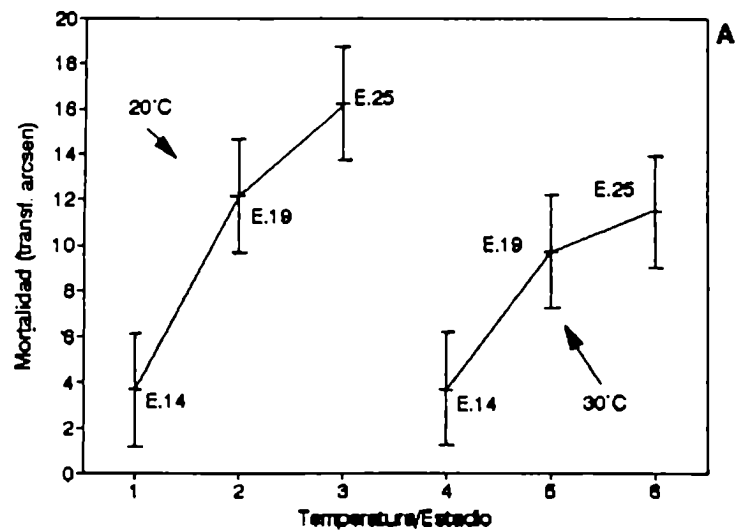


FIG. 8, A y B: Valores medios e intervalos de confianza (Scheffe 99%) de las malformaciones de los embriones tratados con Cd durante la gastrulacion

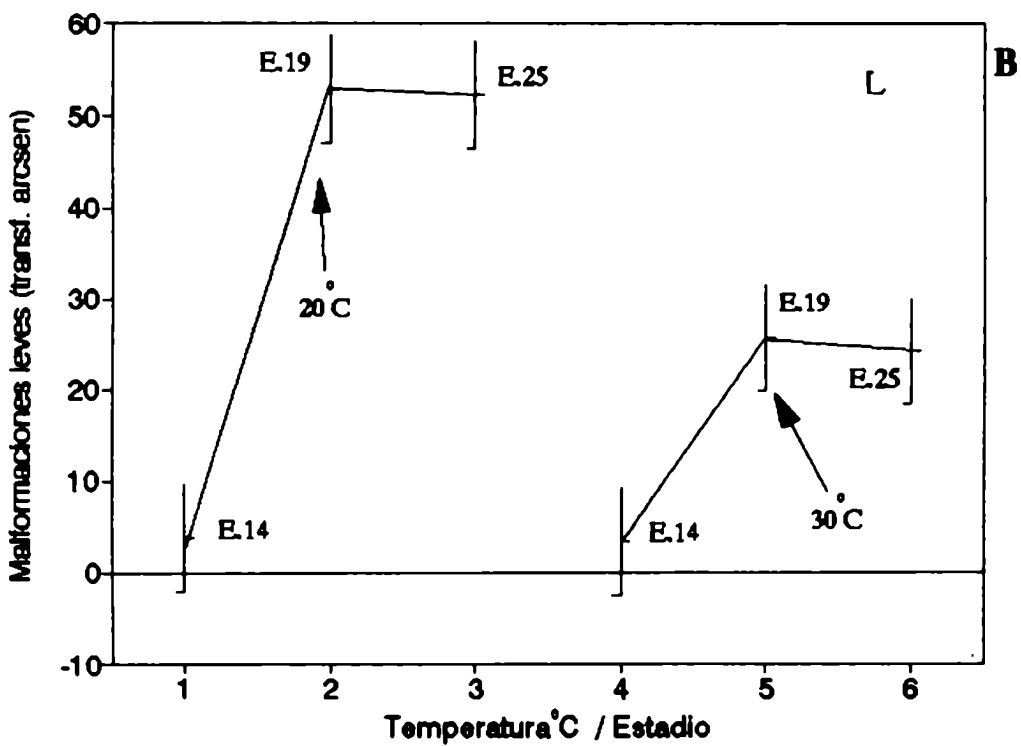
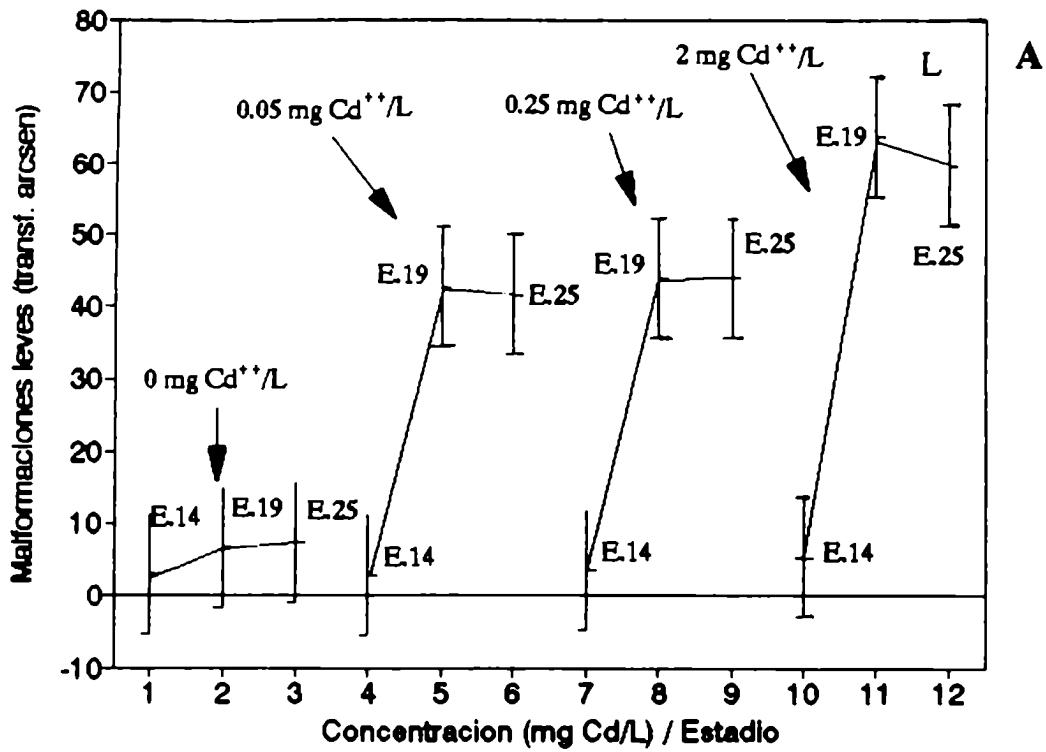


FIG. 8, C y D Valores medios e intervalos de confianza (Scheffe 99%) de las malformaciones de los embriones tratados con Cd durante la gastrulacion

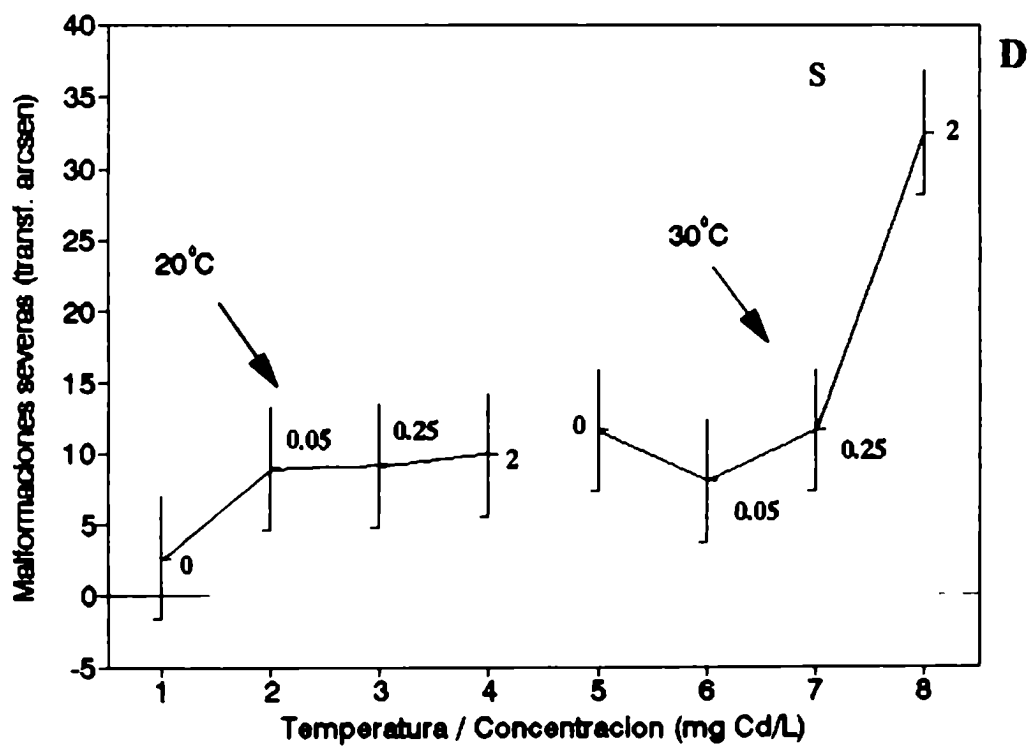
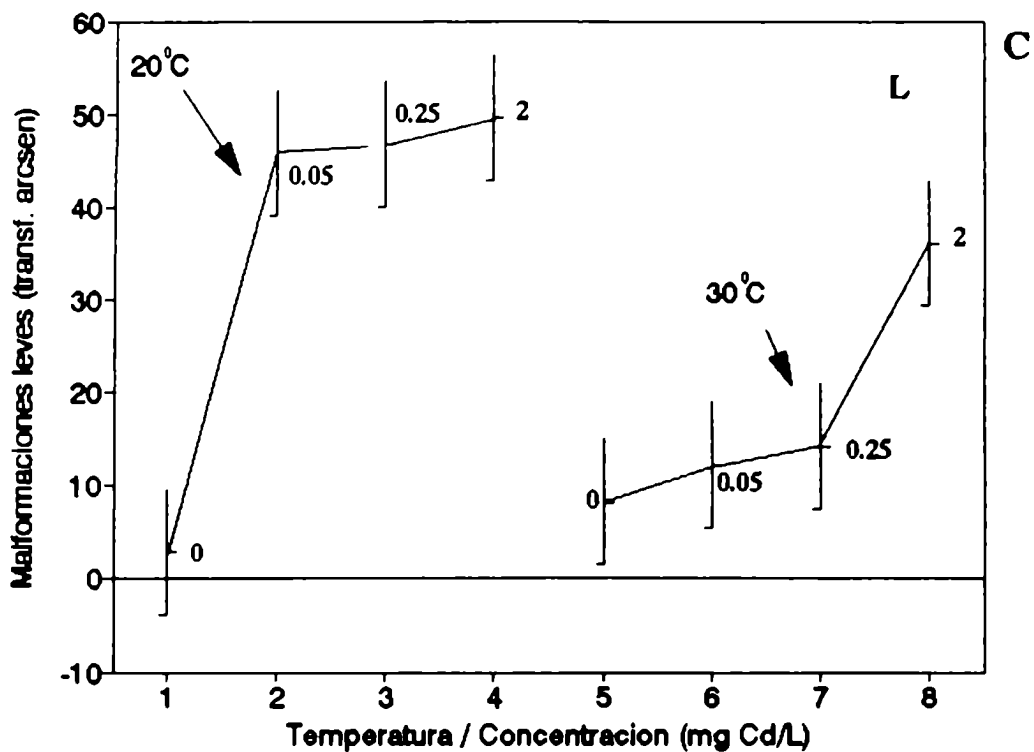
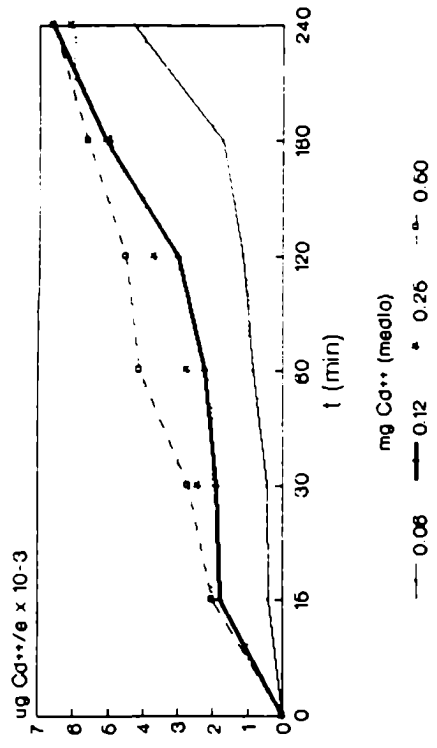
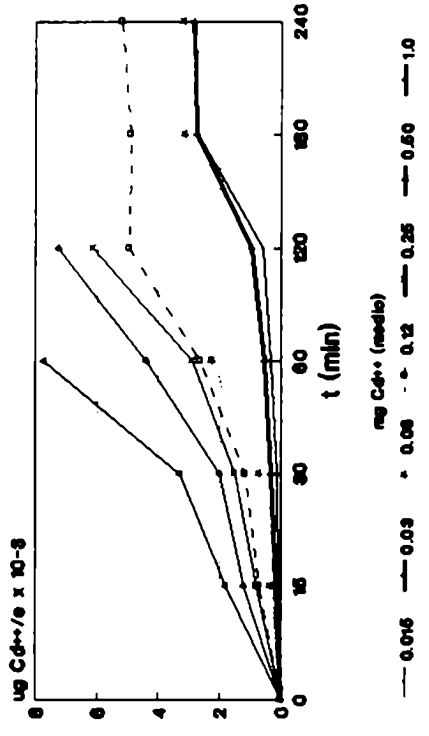
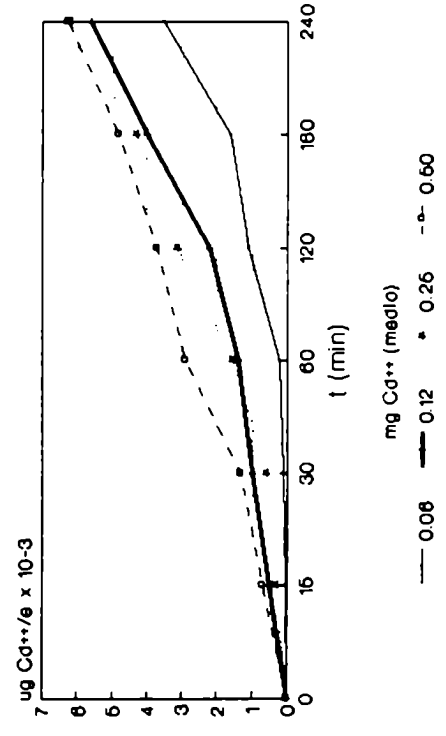


Fig. 9: INCORPORACION DE CADMIO

E.19



E 21



E.25

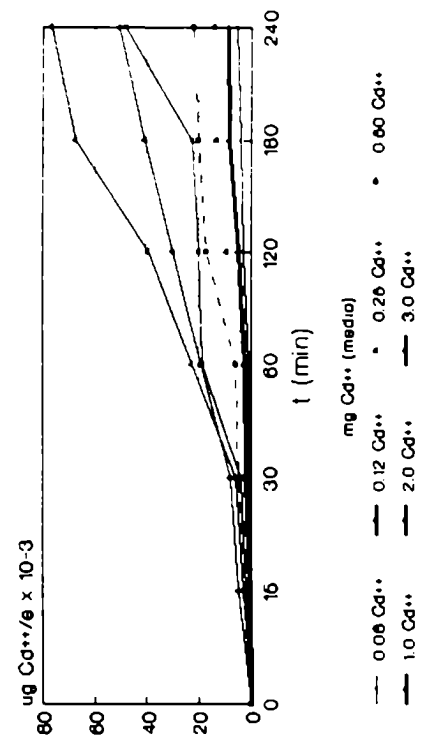


Fig. 10: CADMIO EN 4 ESTADIOS
Incorporacion a los 60 min.

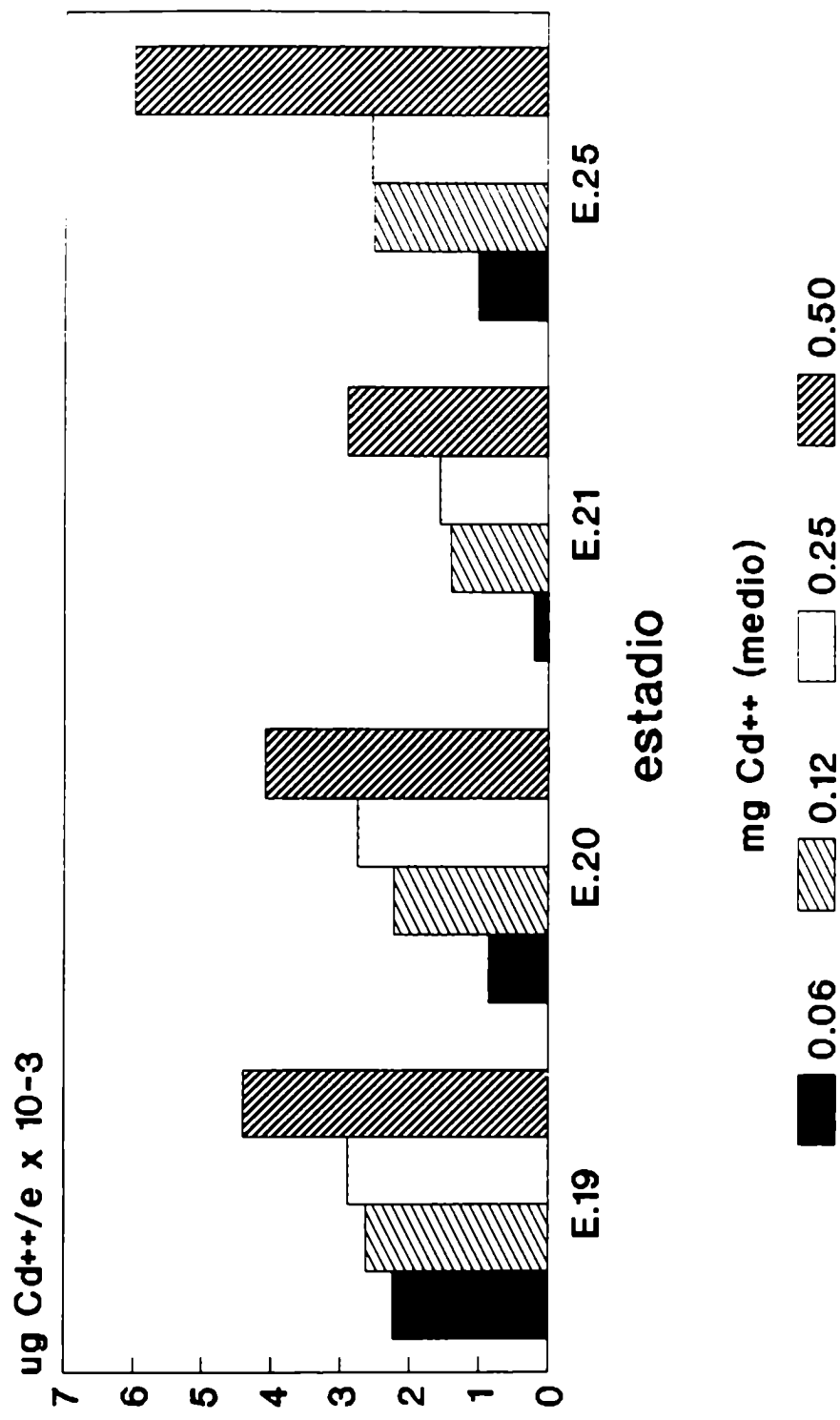


Fig. 11: CADMIO EN 4 ESTADIOS
Incorporacion a los 240 min.

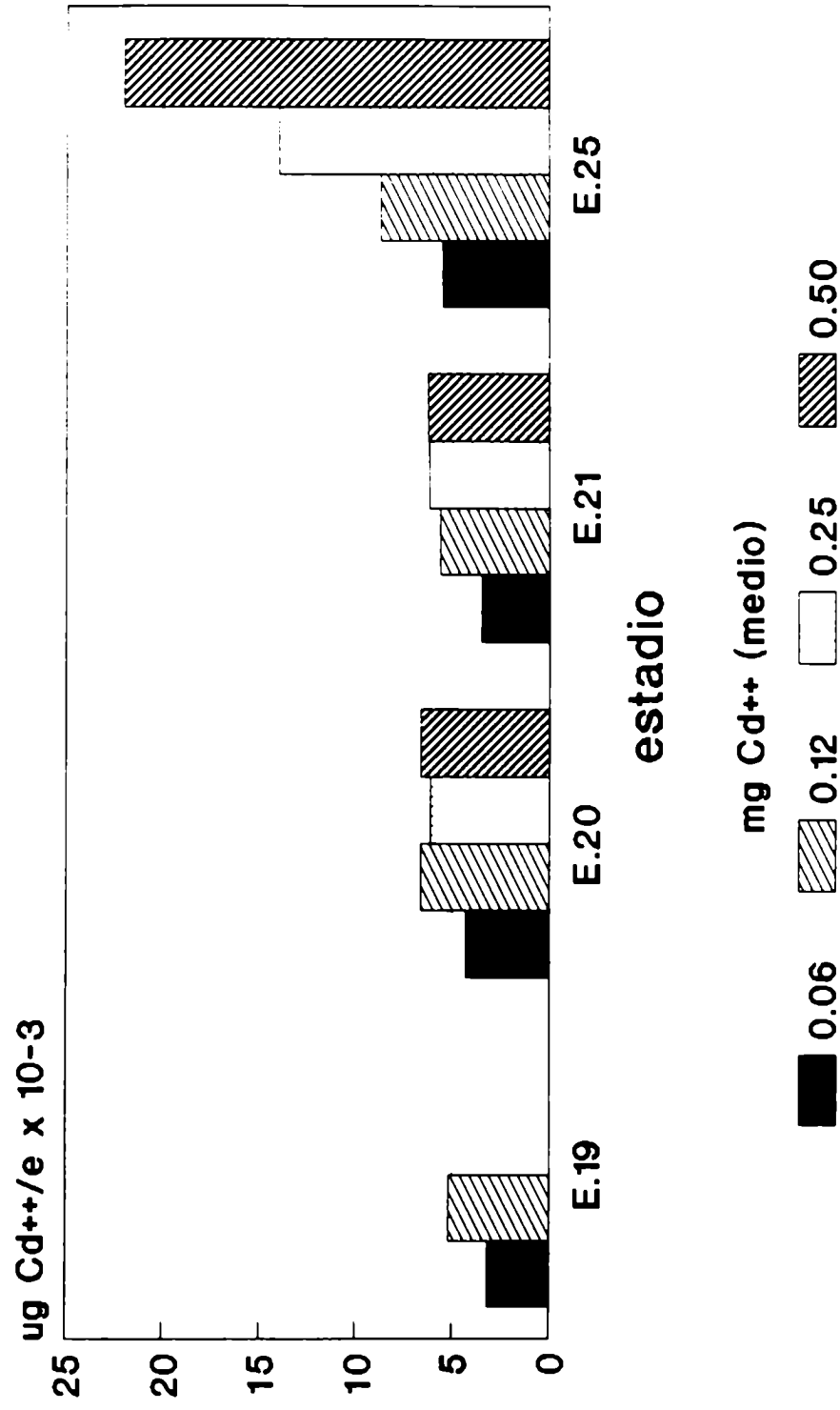


Fig. 12: Incorporacion de Cd a la concentracion más alta tolerada

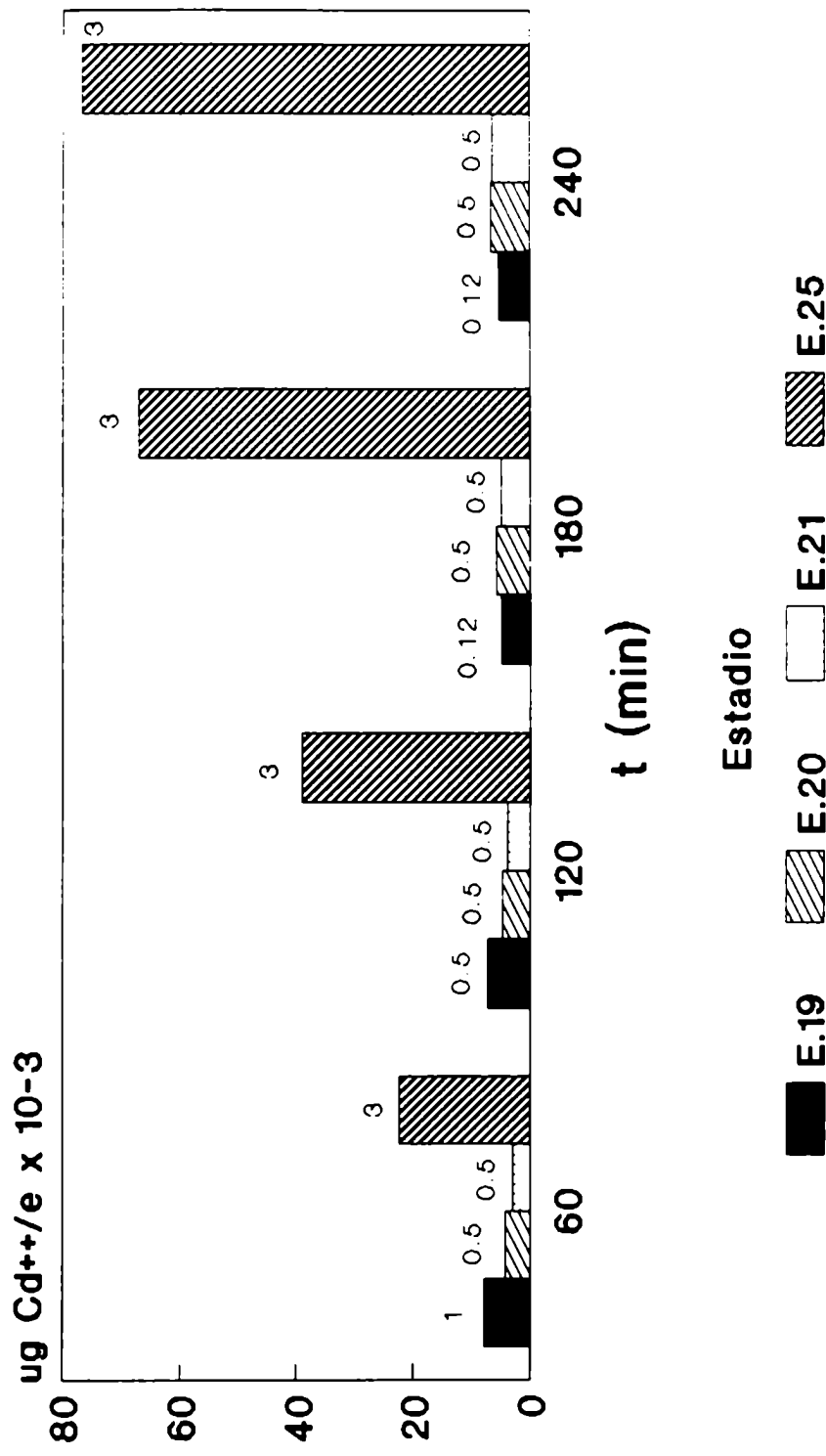
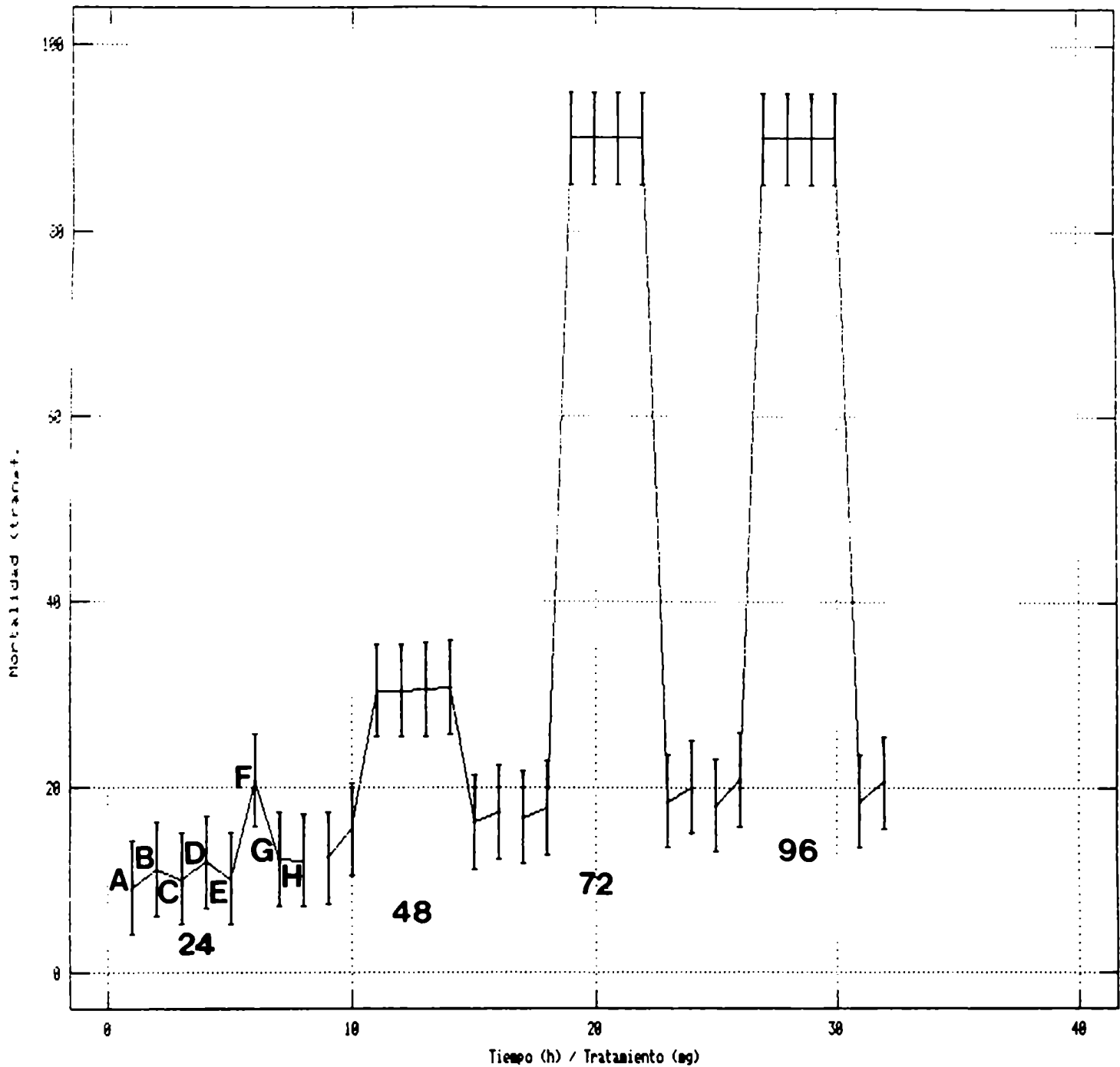


Fig. 13: Valores medios e intervalos de confianza (Scheffé 99%) de la mortalidad de los embriones de Bufo arenarum tratados con concentraciones altas de Cd y con Zn.



A: 0 (control)

B: 0.5 mg Zn⁺⁺/L

C: 1 mg Cd⁺⁺/L + 0.5 mg Zn⁺⁺/L

D: 1 mg Cd⁺⁺/L + 1 mg Zn⁺⁺/L

E: 1 mg Cd⁺⁺/L + 2 mg Zn⁺⁺/L

F: 1 mg Cd⁺⁺/L

G: 1 mg Zn⁺⁺/L

H: 2 mg Zn⁺⁺/L

Fig. 14: Valores medios e intervalos de confianza (Scheffe 99%) de la mortalidad de los embriones de Bufo arenarum tratados con bajas concentraciones de Cd y con Zn.

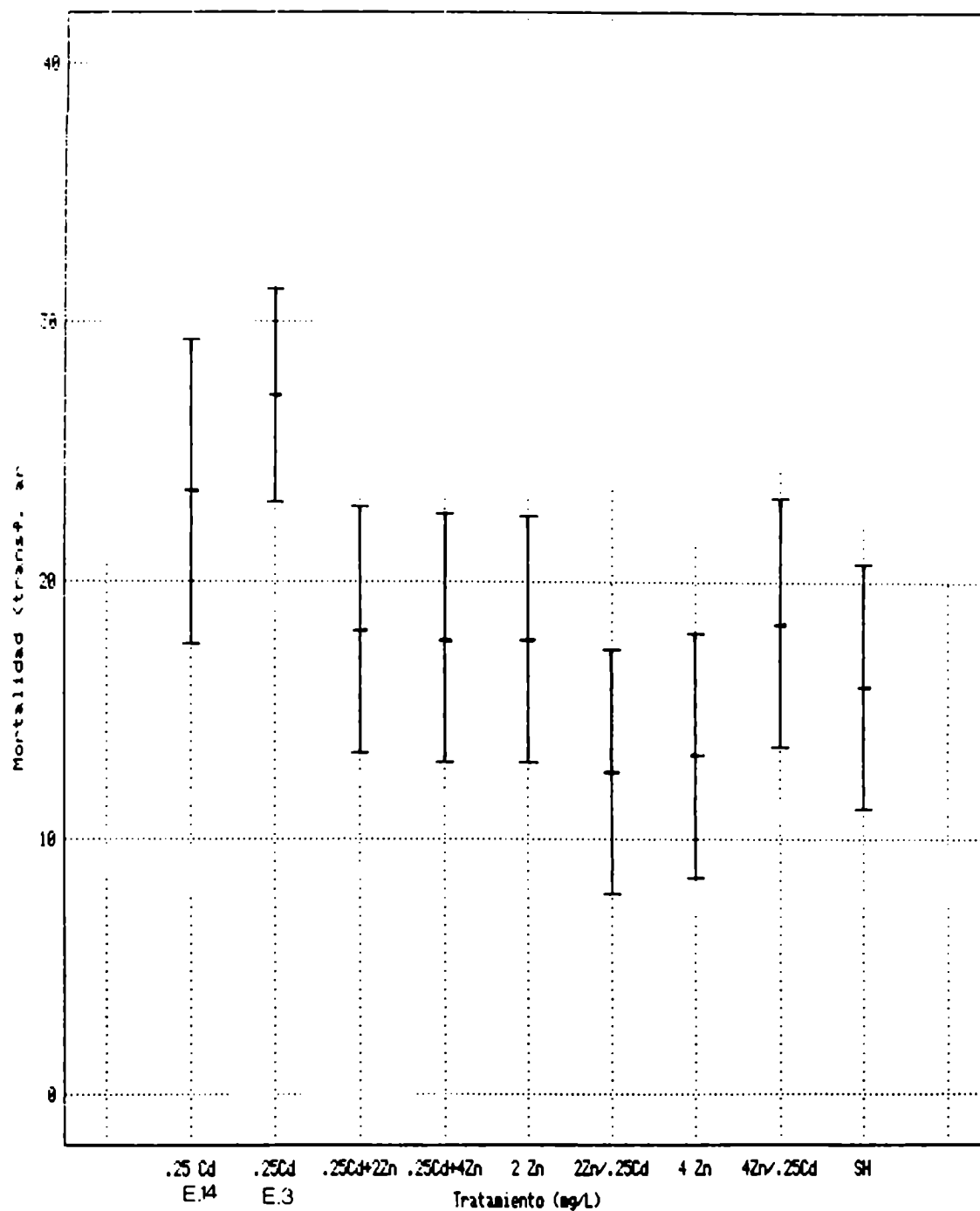


Fig. 15: Valores medios e intervalos de confianza (Scheffé 99%) de la mortalidad a las 120 horas de las larvas de Bufo arenarum, tratados con Pb y Zn.

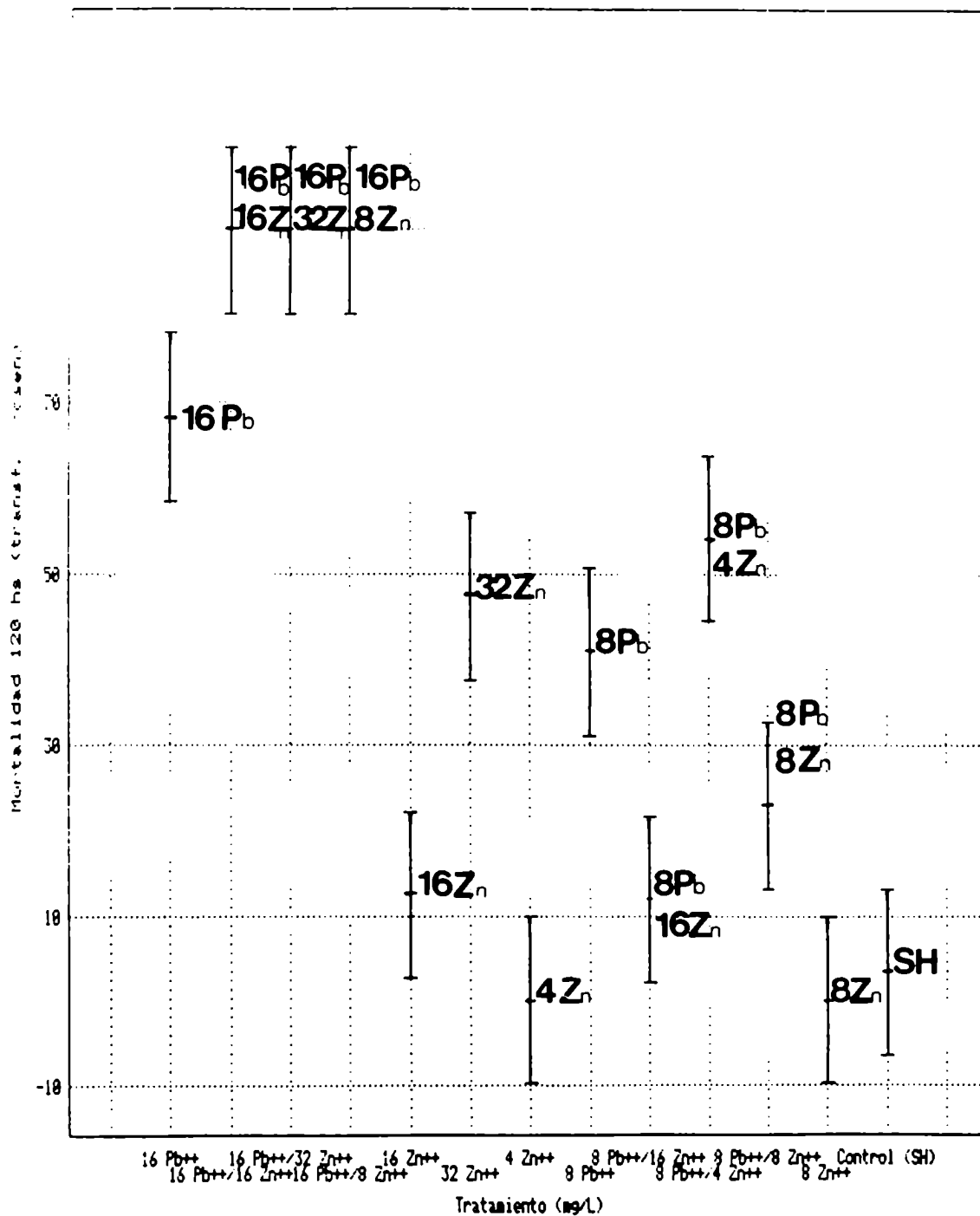


Fig. 16: Valores medios e intervalos de confianza (Scheffé 99%) de los efectos del Zn sobre los embriones de Bufo arenarum provenientes de ovulaciones normales y anormales.

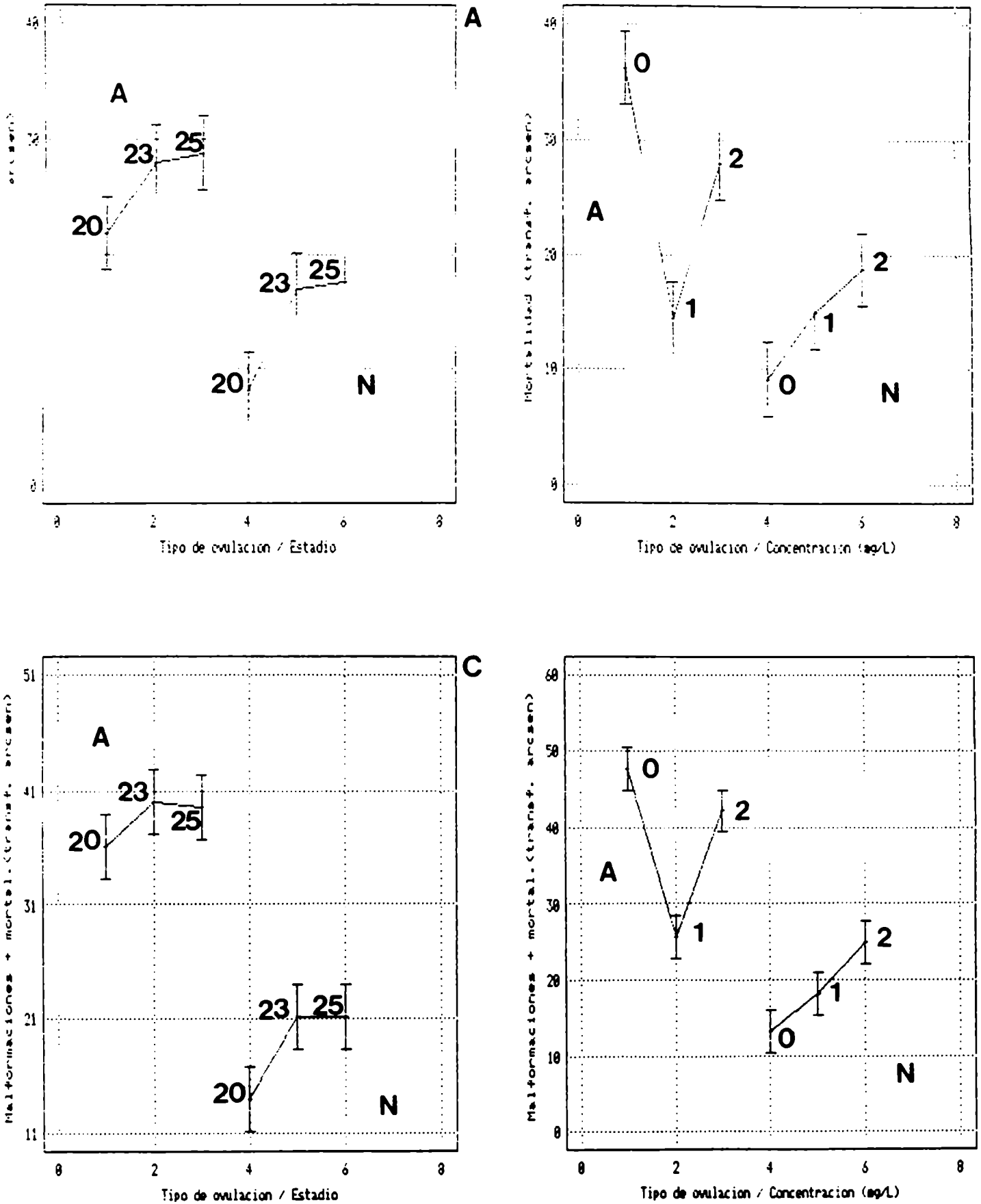
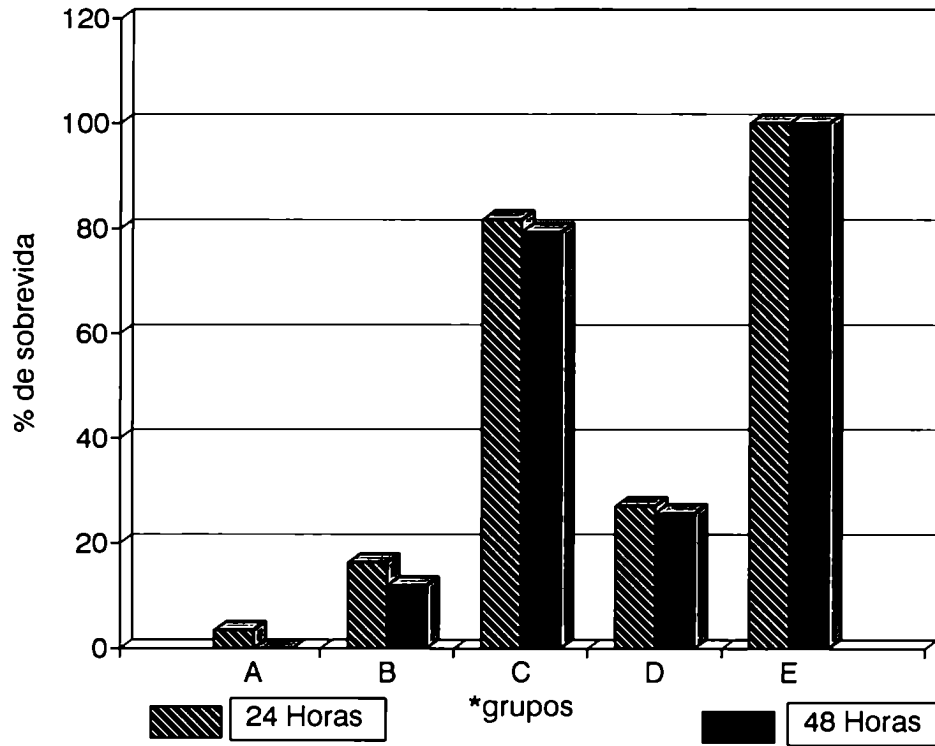


Fig. 17:

Sobrevida de los embriones con y sin pretratamiento a las 24 y 48 h a partir de la exposicion a la CL100 24 h.



* para referencia de los grupos, ver material y metodo.

LÁMINAS

Lámina 1

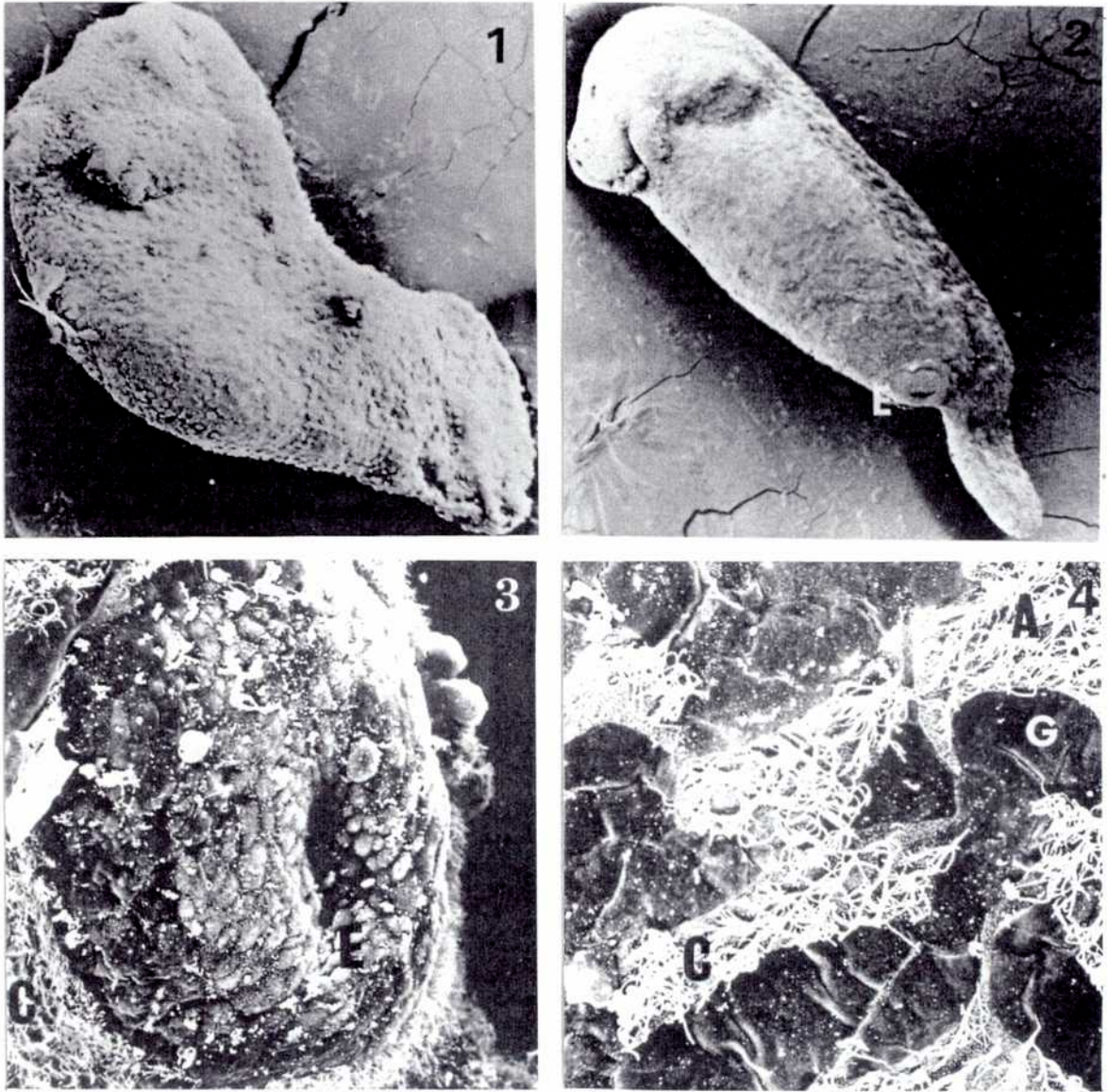


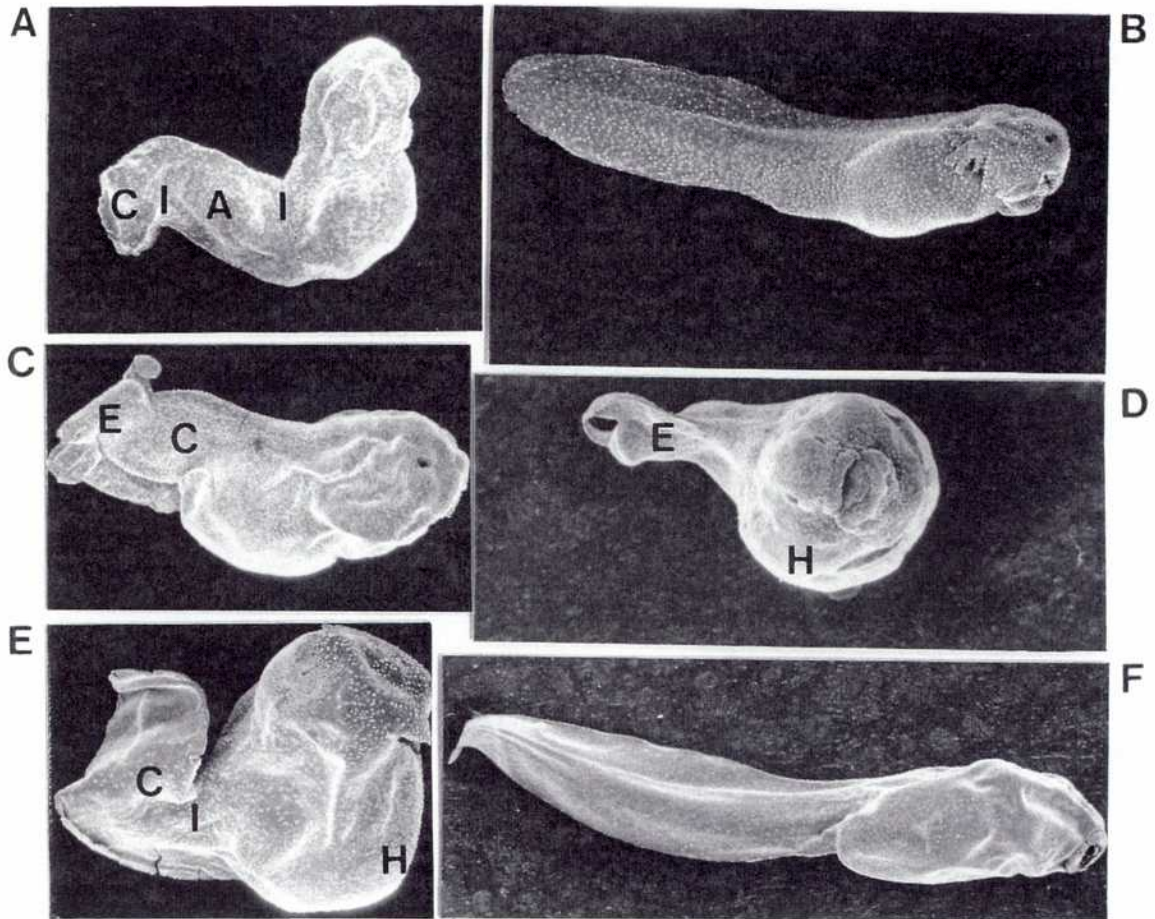
Fig. 1: Imágen al microscopio electrónico de barrido (MEB) de un embrión tratado con 0.25 mg Cd^{++}/L . Su aspecto general corresponde a un embrión en estadio de latido cardíaco, E.19 (control en circulación en la aleta, E.22). Presenta un pequeño y no armónico desarrollo de la cabeza y de la cola. 50 X

Fig. 2: Imágen MEB de un embrión tratado con 0.25 mg Cd^{++}/L . El aspecto general corresponde al de un embrión en estadio de latido cardíaco, E.19 (control en circulación en la aleta, E.22). Nótese la marcada reducción de la aleta y la presencia de una corona de células del tipo endodérmico (E) en la región de la cloaca. 50X

Fig. 3: Imágen MEB de la región pericloacal ampliada del embrión de la fig. 2. La cloaca aparece rodeada por células de tipo endodérmico (E) las que están abruptamente limitadas por células ciliadas (C) pertenecientes al ectodermo. 450 X

Fig. 4: Imágen MEB de la zona lateral de un embrión tratado con 0.25 mg Cd^{++}/L . Se observan grupos de células ciliadas formando acúmulos (A) o cordones (C) entre las células glandulares (G). 1000 X

Lámina 2



A. Vista panorámica de un embrión de *Bufo arenarum* tratado con 0.5 mg Pb^{++}/L (pareja 1) fijado en el estadio de boca abierta (E.21) 24 X. Nótese la forma sigmoideal debido a las incurvaciones en el eje del cuerpo (I), cola completamente malformada (C), aleta parcialmente desarrollada (A) y reducción general en el tamaño del cuerpo.

B. Embrión control fijado en el E.21.

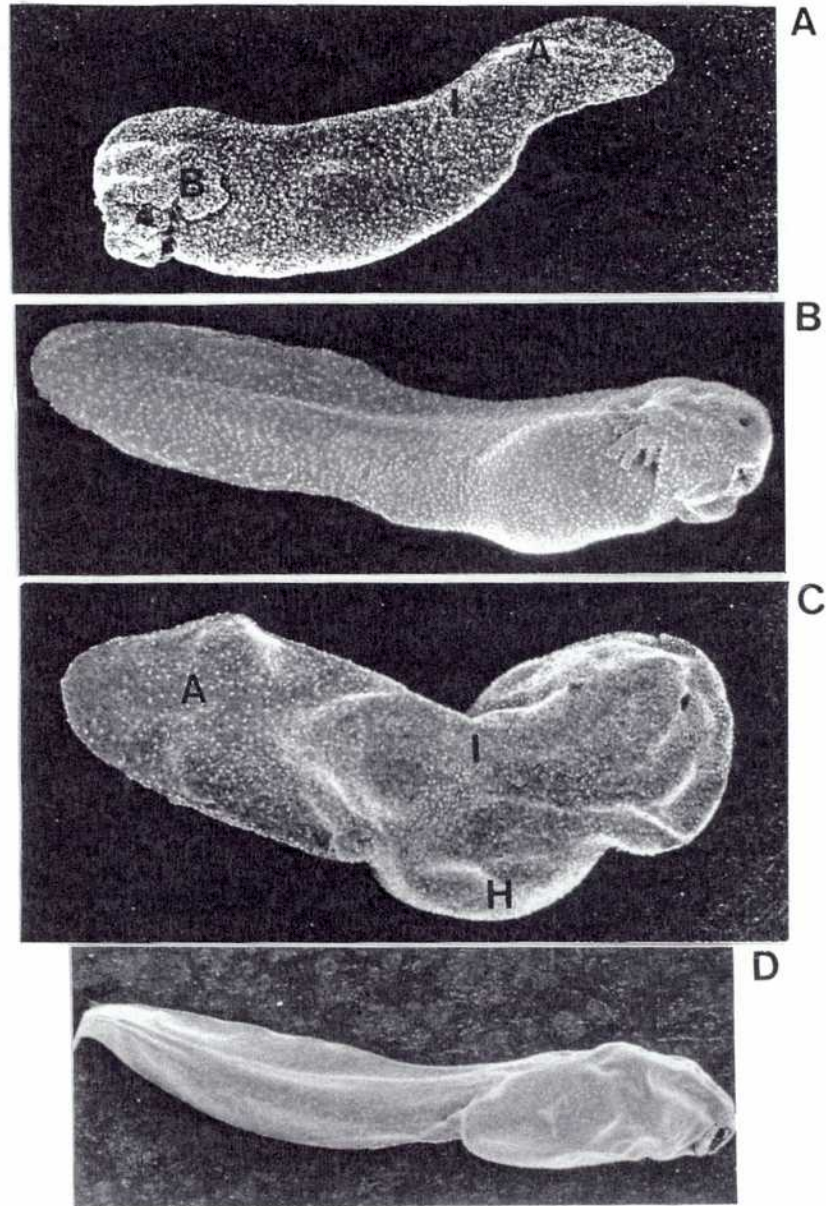
C. Embrión tratado con 0.5 mg Pb^{++}/L (pareja 1) fijado al final del desarrollo embrionario (E.25) 24 X. Obsérvese la reducción general del tamaño del cuerpo, cola completamente malformada (C) con bordes irregulares y espina bifida (E).

D. Embrión tratado con 0.25 mg Pb^{++}/L (pareja 2) fijado en el E.25, 27 X. Se observa la reducción en la talla corporal, espina bifida (E) e hidropesía (H).

E. Embrión tratado con 0.5 mg Pb^{++}/L (pareja 1) en el E. 25, 24 X. Se observan las incurvaciones en el eje del cuerpo (I) con bordes irregulares, hidropesía (H) y cola completamente malformada (C).

F. Embrión control fijado en el E.25, 20 X.

Lámina 3



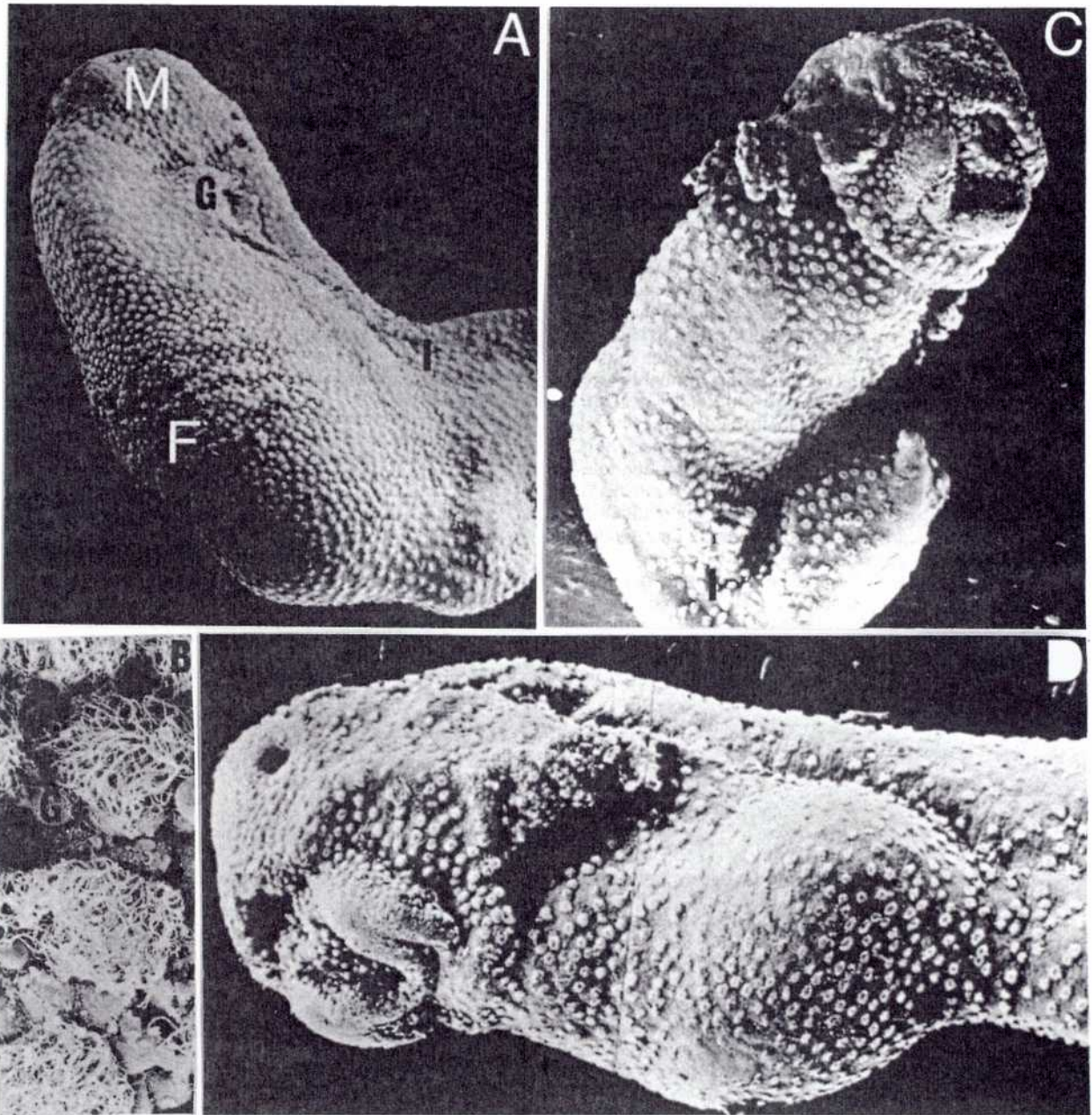
A. Vista panorámica de un embrión de Bufo arenarum tratado con 1 mg Pb⁺⁺/L a partir del estadio de actividad neuromuscular (E.18) durante 20 h y fijado en el estadio de circulación branquial (E.20). Obsérvense las branquias parcialmente desarrolladas (B), reducción de la talla corporal, aleta subdesarrollada (A) e incurvaciones en el eje corporal (I), 24 X.

B. Embrión control fijado en el E.20, 24 X.

C. Embrión del grupo ilustrado en la fig. A, fijado al final del desarrollo embrionario (E.25), 24 X. Nótese la severa incurvación del eje corporal (I), hidropesía (H) y aleta parcialmente desarrollada con protuberancias (A)

D. Embrión control fijado en el E.25, 20X

Lámina 4



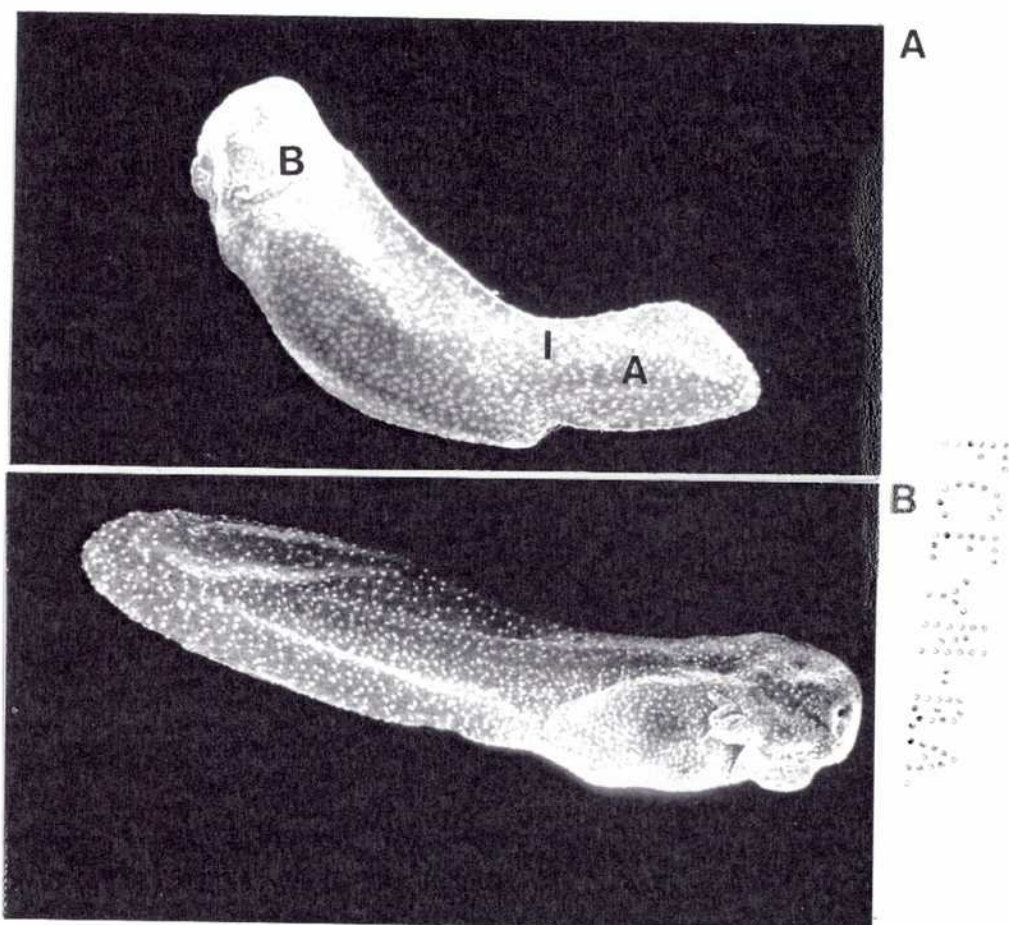
A. Vista parcial de un embrión de *Bufo arenarum* tratado con 2 mg Cd⁺⁺/L a 20°C, 50 X. Obsérvense los pliegues en el ectodermo ventral (F), microcefalia (M), subdesarrollo de branquias (G) e incurvación axial (I).

B. Detalle de la región de pliegues de la fig. A., 800 X. Se puede observar la superficie abovedada de las células glandulares (G).

C. Vista parcial de un embrión de *Bufo arenarum* tratado con 2 mg Cd⁺⁺/L a 30°C, 40 X. Nótese la severa incurvación axial (I) y la formación completamente anormal de la cola.

D. Vista parcial de un embrión control, 40 X.

Lámina 5



A. Embrión de *Bufo arenarum* tratado con 0.25 mg Cd⁺⁺/L a partir del estadio de 2 blastómeros (E.3) en adelante y fijado en el estadio de circulación branquial (E.20). Obsérvense la microcefalia (M), subdesarrollo de branquiúas (B) y de la aleta (A), incurvación axial (I) y la reducción general en el tamaño del cuerpo, 30 X.

B. Embrión control fijado en el E.20, 30 X.

Cristina S. Pérez de Coll