



FREQUENT ANOMALIES IN A POPULATION OF *Hyla plicata*
(ANURA: HYLIDAE) EXPOSED TO LEAD AND IRON DURING
POSTEMBRYONIC DEVELOPMENT

ANOMALÍAS FRECUENTES EN UNA POBLACIÓN DE *Hyla plicata*
(ANURA: HYLIDAE) EXPUESTA A PLOMO Y FIERRO DURANTE
EL DESARROLLO POSTEMBRIONARIO

David Ramiro Aguillón-Gutiérrez^{1,1} y Aurelio Ramírez-Bautista^{2,2*}

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Universidad s/n. Fracc. Filadelfia. C.P. 35010. Gómez Palacio, Durango, México. davidrag@gmail.com

²Laboratorio de Ecología de Poblaciones, Centro de Investigaciones Biológicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Ciudad del Conocimiento. Carretera Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Colonia Carboneras. CP. 42184, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

*ramibautistaa@gmail.com

ABSTRACT

In this work was conducted a bio-monitoring and a bioassay in a population exposed to lead and iron of the frog *Hyla plicata* from Hidalgo, Mexico, to identify possible anomalies caused by contact with these elements. This species was used, as it is in the category "threatened" by the NOM-059-SEMARNAT-2001, and some of their populations living near urban areas. In this work were used specimens in post-embryonic stage. In the bioassay were formed three groups, a control, one in contact with iron (Fe), and another with lead (Pb). Macroscopic anomalies were identified in individuals of the pond and in those analyzed in laboratory conditions. Were found anomalies in gut, skin, pigmentation, spine and limbs. Individuals of the bioassay had higher rates of anomalies than those obtained by biomonitoring directly from the environment. In the bioassay were shown highest rates of individuals with anomalies in the groups in contact with Fe and Pb than those in the control group. This suggests that the presence of heavy metals produce macroscopic anomalies in this species.

Key words: Anomalies, *Hyla plicata*, lead, iron, postembryonic development.

Manuscrito recibido el 10 de octubre de 2014, aceptado el 11 de diciembre de 2014.

RESUMEN

En este trabajo se realizó un biomonitoreo y un bioensayo con una población expuesta a plomo y fierro de la ranita *Hyla plicata* del estado de Hidalgo, México, para identificar posibles anomalías causadas por el contacto con estos elementos. Se utilizó esta especie ya que se encuentra en la categoría "amenazada" de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2001, y algunas de sus poblaciones viven cerca de zonas urbanas. Se utilizaron individuos en etapa postembrionaria. En el bioensayo se formaron tres grupos, uno control, otro en contacto con fierro y otro en contacto con plomo. Se identificaron anomalías macroscópicas tanto en los individuos del lago como en aquellos analizados en condiciones de laboratorio. Se encontraron anomalías en intestino, piel, pigmentación, extremidades y la espina dorsal. Los individuos del bioensayo presentaron mayores índices de anomalías que los obtenidos por biomonitoreo directamente de la naturaleza. En el bioensayo se presentaron mayores porcentajes de individuos con anomalías en los grupos en contacto con fierro y plomo que en el grupo control. Esto sugiere que la presencia de metales pesados produce anomalías macroscópicas en esta especie.

Palabras Clave: Anomalías, *Hyla plicata*, plomo, fierro, desarrollo postembrionario.

INTRODUCCIÓN

Desde el año 1980, las poblaciones de diversas especies de anfibios se han visto amenazadas por múltiples factores como la pérdida y fragmentación del hábitat, contaminación de cuerpos acuáticos, rayos ultravioleta, cambio climático, especies introducidas y enfermedades (Young et al., 2001).

La ranita arborícola *Hyla plicata* Brocchi 1877 (familia Hylidae) es endémica de México y se distribuye en parte de la Sierra Madre Oriental, en el centro de Hidalgo, Tlaxcala, Veracruz y el centro de la Cordillera de la Faja Volcánica Transmexicana y Valle de México (Duellman, 2001). Esta especie es de talla pequeña, presenta una longitud hocico cloaca (LHC) media de 38.8 ± 4.2 mm; se reproduce en los meses de primavera y verano y pone sus huevos dentro de cuerpos de agua estancada o con corriente, entre la vegetación, rocas, troncos y ramas que estén dentro del agua (Ramírez-Bautista et al., 2009).

La IUCN la mantiene en la categoría de "Preocupación menor" (Santos y Canseco, 2004), sin embargo, la NOM-059-SEMARNAT-2001 la coloca en la categoría de "Amenazada" (Ramírez-Bautista et al., 2010).

Un problema común en algunas poblaciones de anfibios en declive, es el alto índice de anomalías macroscópicas (Johnson et al., 2001). Ouellet (2000) menciona que es normal encontrar un 2% de individuos con anomalías en una población de anfibios, sin embargo, se han reportado poblaciones con más del 5% de individuos con anomalías en Europa, América y Asia (Johnson et al., 2001; Taylor et al., 2005; Bacon et al., 2006). En Australia, Read y Tyler (1990) reportaron 3.8% de incidencia de anomalías en algunas poblaciones de anfibios, mientras que en Ekaterinburgo, Rusia, Vershinin (1989) encontró poblaciones en intervalos que van de 1.5 hasta un 15% de presencia de anomalías en individuos de *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 y de 2.6 a 4% en ejemplares de *Rana arvalis* Nilsson, 1842, Severtsova et al. (2012), reportaron 18% de individuos de *R. temporaria* y 16.5% en ejemplares de *R. arvalis* con anomalías para las áreas urbanas y suburbanas de Moscú, Rusia.

La combinación de los métodos de biomonitorio (muestreo directo de la naturaleza) y de bioensayo (muestreo en condiciones experimentales) muestran un panorama completo de los efectos de sustancias químicas o contaminantes sobre la ontogénesis de organismos como los anfibios y eventualmente los mecanismos de acción que causan defectos en el desarrollo (Melekhova y Aguillón-Gutiérrez, 2014).

Los anfibios son considerados buenos bioindicadores de contaminación ambiental, especialmente de cuerpos acuáticos, ya que parte de su vida la desarrollan en el agua y parte en la tierra, cumpliendo un ciclo de vida anfibia, además tienen una piel muy permeable y sensible que absorbe sustancias del ambiente, consumen materia vegetal y animal en diferentes etapas de su desarrollo y son también buenos modelos para estudios ecotoxicológicos en bioensayos (Demichelis et al., 2001; Newman y Unger, 2003; Selvi et al., 2003; Mitchell et al., 2005; Marques et al., 2008, 2009; Burlibasa y Gavrilá, 2010). Por ejemplo, la rana africana de uñas *Xenopus laevis* Daudin, 1802 es un excelente modelo en bioensayos, ya que es de fácil reproducción en cautiverio y su desarrollo embrionario, así como los procesos moleculares implicados en su desarrollo han sido ampliamente descritos (Weinstein y Hemmati-Brivanlou, 1999). Dos tipos de bioensayos que usan a *X. laevis* para evaluar el efecto de sustancias químicas en organismos son el "Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus" (FETAX) y el "Xenopus Metamorphosis Assay" (XEMA) (Opitz et al., 2005; Mouche et al., 2011).

La etiología precisa de las anomalías no siempre es completamente entendida, sin embargo, se han identificado diversas causas como infestación parasitaria por el tremátodo *Ribeiroia ondatrae* Looss, 1907 que ocasiona un exceso de extremidades o la ausencia de ellas (Johnson et al., 1999, 2001, 2003; Blaustein y Bancroft, 2007). Por otro lado, también están los agentes químicos, por ejemplo, metales pesados que actúan como teratógenos (Bancroft y Prahlá, 1973; Abbasi y Soni, 1984; Fulton y Chambers, 1985; Snawder y Chambers, 1989, 1990; Plowman et al., 1994; Schuytema y Nebeker, 1998; Fort et al., 1999a, 1999b, 2001; Ouellet, 2000), la exposición a rayos ultravioleta (Ankley et al., 1998, 2000; Ouellet, 2000), temperaturas extremas y bajo pH (Ouellet, 2000; Johnson et al., 2001), interruptores endócrinos que a su vez disminuyen las defensas inmunológicas de los anfibios (Hayes et al., 2010) e incluso intentos de predación (Surova y Severtsov, 1985).

Las anomalías más comunes en anfibios adultos son de las extremidades y curvatura de la espina dorsal (Vershinin, 1997; Kovalenko, 2011); aunque en estadios del desarrollo tempranos hay mayor sensibilidad a contaminantes ambientales (Owens y Baer, 2000; Loewengart, 2001; Greulich y Pflugmacher, 2003), la mayoría de los estudios sobre anomalías en anfibios se enfocan en estadios posteriores a la metamorfosis o adultos y se desconoce el efecto de muchas sustancias en diferentes estadios embrionarios y larvarios o premetamorfósicos.

Las anomalías pueden ser causa directa de muerte o bien causa indirecta, afectando la capacidad de alimentarse o de huir de los depredadores (Zamaletdinov, 2003). Aunque algunos individuos persisten con alguna anomalía hasta el estadio adulto (Blaustein et al., 1997). Naturalmente es difícil encontrar anomalías en adultos, ya que la mayoría de los individuos presentaron desde una etapa temprana alguna malformación o deformidad, lo que provocó que murieran en estas fases.

En este estudio se analizó la influencia de los metales pesados hierro (Fe) y plomo (Pb) en el desarrollo postembrionario de la ranita *H. plicata* de una población del estado de Hidalgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron 900 individuos de la especie *H. plicata* en etapa postembrionaria en octubre de 2013 en un cuerpo de agua localizado en un lugar llamado "La cabaña del lobo", ubicado en el Km. 5 de la carretera al Parque Nacional El Chico, en el municipio Mineral del Chico, Hidalgo, México (20°09'54.7"N 98°41'25.2"W). La captura se realizó con redes, obteniendo los ejemplares directamente del lago. Todos los organismos fueron colocados en botes de plástico con capacidad de 19 L con agua del lugar de captura y transportados al lugar de trabajo. Los ejemplares capturados se encontraban en una etapa de desarrollo del estadio 32 al 46. El estadio de desarrollo de los ejemplares se determinó de acuerdo a las tablas de desarrollo normal de Gosner (1960).

Procedimiento

Se sacrificaron y fijaron en formol (10%) 300 individuos y 600 fueron utilizados para realizar un bioensayo para observar el efecto de los metales pesados hierro y plomo en el desarrollo postembrionario a través de la incidencia de anomalías macroscópicas y de índices de mortalidad.

De los 600 ejemplares utilizados en el bioensayo, 200 formaron el grupo "Control", 200 el grupo experimental "Hierro (Fe)" y 200 el grupo experimental "Plomo (Pb)". Todos los organismos fueron sometidos a un periodo de aclimatación de una semana.

Se utilizaron acuarios de 70 litros sin aireación. En cada uno fueron colocados 100 ejemplares (dos acuarios por grupo experimental). Se utilizó agua de la llave reposada durante tres días para la dechloración.

Posterior al alojamiento de los organismos, a cada acuario del grupo denominado "Hierro", se introdujeron 20 clavos no oxidados (99% Fe, 1% C) de 10 cm. de largo con un peso de 260 g. En los acuarios del grupo "Plomo" fueron agregadas 10 placas de plomo (98% pureza) de 3.5x3.5 cm por lado cada una, con un peso de 260 g. A los acuarios del grupo "Control" no se les suministró nada.

Los organismos fueron alimentados tres veces por semana con algas obtenidas de los lagos en los que habitan. Se realizaron recambios semanales del 50% de agua en todos los acuarios.

Cada semana fueron sacrificados y fijados 25 individuos por acuario (50 en total por grupo) durante cuatro semanas consecutivas.

Todos los organismos fijados fueron fotografiados en vista dorsal, ventral y lateral y observados para identificar posibles anomalías. Se siguió el criterio de (Aguillón-Gutiérrez, 2012) para definir las anomalías encontradas en el presente trabajo (Fig. 1).

Curvatura de la espina dorsal: anomalía en la rectitud del eje axial en dirección dorso-ventral, generalmente de manera pronunciada en la región central de la espina. También llamada hiperlordosis.

Anomalía cutánea: desprendimiento del epitelio (capa epidérmica) en uno o varios puntos del cuerpo.

Anomalía en extremidades anteriores y posteriores: Ausencia (amelia) o exceso de extremidades

(extremidades supernumerarias) o presencia de una o varias extremidades de tamaño más corto del normal (disimetría).

Anomalía en intestino: posición anormal del intestino dentro de la cavidad abdominal, o parte del intestino fuera de la cavidad abdominal. La posición normal del intestino en larvas de anfibios es en forma de espiral.

Anomalía en la pigmentación: anormalidad en la distribución uniforme de melanóforos ocasionando presencia de áreas despigmentadas o pobremente pigmentadas (hipopigmentación) o de áreas más oscuras de lo normal por un aumento de melanina (hiperpigmentación).

La concentración química de Fe y Pb presente en el agua de los lagos que habitan estos organismos y en el agua usada para el bioensayo fue determinada mediante un análisis espectroquímico por absorción atómica para la cual se realiza una digestión en ácido nítrico al 3% en una cámara u horno de grafito. La lectura se lleva a cabo por lámparas de absorción gaseosa (Hoffman y Stroobant, 2002).

La mortalidad en el bioensayo fue calculada al final del experimento. La parte experimental de la investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas y en el Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Los análisis estadísticos se realizaron con STATISTICS 6.0. Las diferencias en los porcentajes de mortalidad entre los grupos Control, Fierro y Plomo y anomalías morfológicas en los grupos Control, Fierro, Plomo y muestras directas se examinaron con χ^2 (df=1). Se utilizó esta prueba estadística por ser datos cualitativos (Zar, 2009).

RESULTADOS

La inspección de la morfología externa de los individuos mostró que 81 ejemplares (9%) de 900 mostraron algún carácter morfológico que no corresponde con el desarrollo postembriológico normal. En estos fueron identificadas las siguientes anomalías: "curvatura de la espina dorsal", "anomalía cutánea", "anomalía en extremidades", "anomalía en intestino" y "anomalía en la pigmentación".

En la figura 1 se aprecian un individuo normal y varios individuos con anomalías, representando los cinco tipos de anomalías observados en el presente trabajo.

En la figura 2A se observan los porcentajes de anomalías en biomonitoreo y en bioensayo, donde se observa que la anomalía más común fue en los intestinos, seguida por anomalías cutáneas, siguiendo un patrón similar en los individuos fijados directamente, en los que la anomalía más común también es en los intestinos, seguida de anomalía cutánea y curvatura de la espina (Fig. 2B); en el bioensayo (Fig. 2C), la anomalía más común se presentó en intestinos y las capas dérmicas, como el desprendimiento de la epidermis.

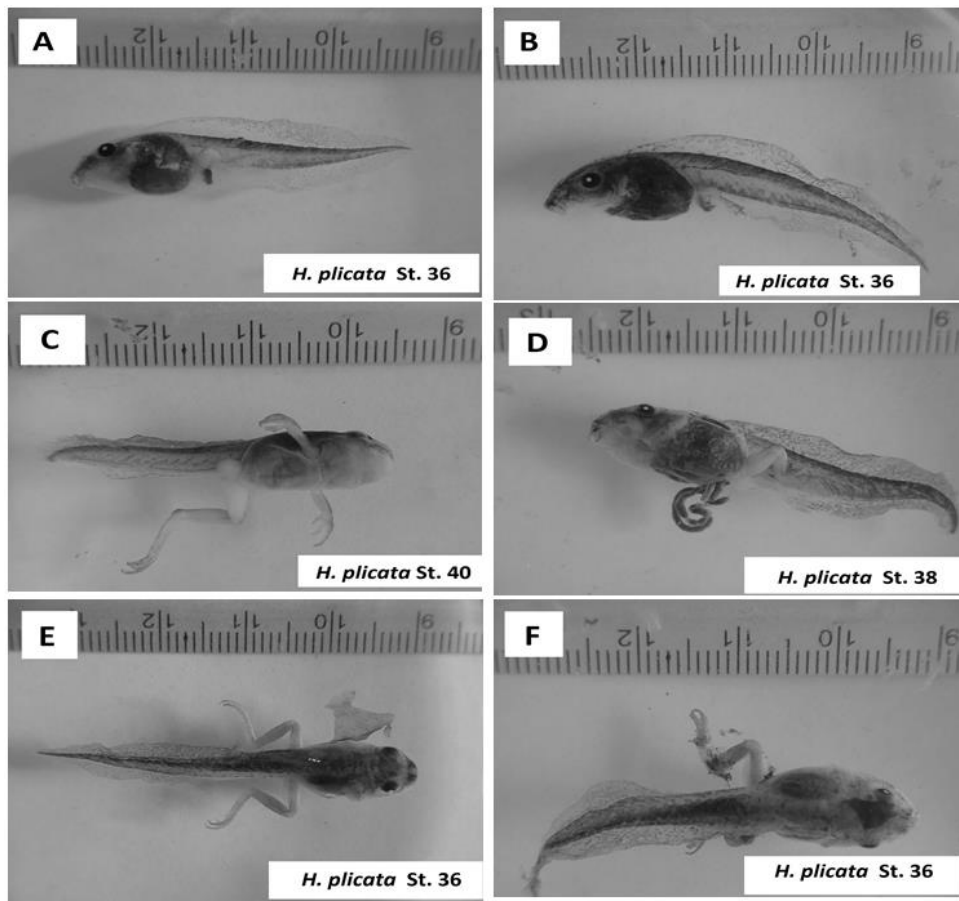


Fig. 1. A) Organismo normal. B) Curvatura de la espina dorsal. C) Ausencia de extremidad posterior derecha. D) Intestinos fuera de la cavidad abdominal. E) Anomalia cutánea. F) Anomalia en la pigmentación.

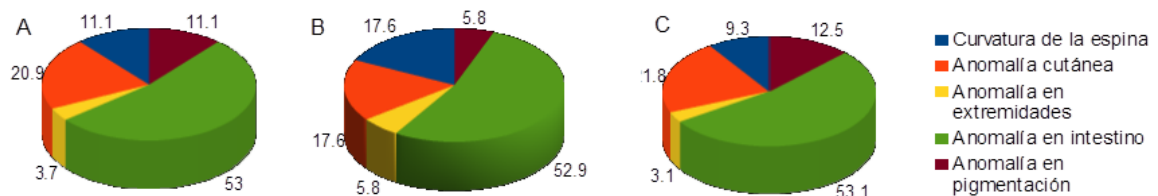


Fig. 2. A) Porcentaje de anomalías presentes en biomonitorio y bioensayo. B) Porcentaje de anomalías en los individuos fijados directamente. C) Porcentaje de individuos con anomalías en todos los grupos del bioensayo.

La figura 3 muestra el porcentaje de individuos con anomalías en el bioensayo por grupo, donde destacan los índices de anomalías en intestino en los grupos “control” y “plomo” los cuales tuvieron hasta un 56 y un 64%, respectivamente de individuos con esta anomalía.

En la tabla 1 se muestra el número de individuos analizados en cada grupo por semana en el bioensayo. El grupo con los mayores índices de mortalidad fue el grupo “Fierro”, donde murieron 88 individuos en el bioensayo. En la semana tres, en este grupo solo quedaban vivos diez individuos que fueron fijados, en la semana cuatro ya no había ningún ejemplar vivo.

Se observó una diferencia significativa en la frecuencia de muertes en *H. plicata* entre los tratamientos ($\chi^2 = 10.557$, g.l. = 2, $P = 0.005$). La mayor incidencia de muertes se observó en el grupo fierro (44%), seguido por el grupo control (21.5%) y finalmente en el grupo plomo (19%).

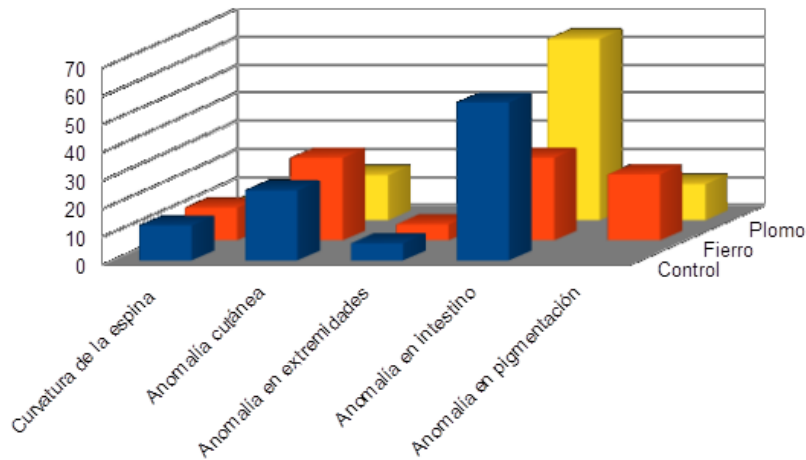


Fig. 3. Porcentaje de individuos por grupo con anomalías en el bioensayo.

Tabla 1. Número de individuos fijados y analizados por grupo y por semana y la mortalidad en el bioensayo.

Grupo	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	total	mortalidad
Control	50	53	44	10	157	43 (21.5%)
Fierro	51	51	10	0	112	88 (44%)
Plomo	49	52	49	12	162	38 (19%)

La tabla 2 muestra la cantidad de individuos con anomalías. En el grupo de individuos fijados directamente solo se registraron 12 individuos con anomalías de un total de 300 organismos analizados, mientras que de cada grupo del bioensayo se revisaron 200 animales. La anomalía con mayor incidencia fue “anomalía de intestino”, seguida de “anomalías cutáneas”. La cantidad de

individuos con anomalías en el bioensayo fue de 64 (10.6%) y de los individuos fijados directamente fue de 17 (5.6%). Se observó una diferencia significativa en la frecuencia de anomalías morfológicas en *H. plicata* entre los grupos experimentales ($\chi^2 = 7.642$, g.l. = 3, $P = 0.05$). La mayoría de las anomalías fueron causadas por el efecto del plomo (19.13%), seguido del fierro (15.17%), control (10.19%) y por último fijados directamente (5.6%).

En la tabla 3 se presentan las concentraciones de Fe y Pb en agua del lago donde fue colectado el material biológico y en el agua de los acuarios utilizados en el bioensayo. En esta tabla se muestran también los límites permitidos de estos metales en agua según la NOM-127-SSA-1994.

Tabla 2. Número de individuos con anomalías.

Anomalía	Control (semanas)				Fierro (semanas)				Plomo (semanas)				Fijados directos	Total
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
Curvatura de la espina	2				2				1		1		3	9
Anomalía cutánea		4			1	2	2		2		2	1	3	17
Anomalía en extremidades			1		1								1	3
Anomalía en intestino	3	5	1		3	1	1		4	7	9		9	43
Anomalía en pigmentación						2	2		4				1	9
Total	5	9	2		7	5	5		11	7	12	1	17	
	16 (10.19%)				17 (15.17%)				31 (19.13%)					
					64 (10.6%)								17 (5.6%)	81

Tabla 3. Concentración de fierro (Fe) y plomo (Pb) en el agua del lago del que fueron colectados los organismos y de los grupos formados en el bioensayo, así como los límites permitidos de estos metales en agua según la NOM-127-SSA-1994.

	Lago	Grupo Control	Grupo Fierro	Grupo Plomo	Límite permitido
Fe (mg/l)	0.34	0.15	0.16		0.30
Pb (mg/l)	0.01	0.04		0.04	0.01

DISCUSIÓN

En la mayoría de los estudios sobre anomalías en anfibios se han empleado individuos adultos, criados en laboratorio y en contacto con reactivos comerciales para estudios ecotoxicológicos; por lo que en este estudio se decidió utilizar individuos en etapas postembrionarias, ejemplares colectados en su medio natural, y además se usaron los objetos que

causan directamente la contaminación en los cuerpos de agua, por lo que se crea un modelo más cercano a lo ocurrido en ambientes naturales con impacto antropogénico (Severtsova et al., 2013).

La mortalidad de *H. plicata* en el bioensayo fue mayor en el grupo que estuvo en contacto con fierro, mientras que en los grupos "Control" y "Plomo" fueron similares. Este resultado podría indicar que con el fierro ocurre de manera más marcada un fenómeno de bioacumulación y biomagnificación, en el que las concentraciones de este metal no son tan altas en el agua donde se desarrollaron los anfibios, pero sí lo son en el organismo mismo, ocasionando la muerte por intoxicación. Se pretende realizar posteriores análisis espectroquímicos e histoquímicos para esclarecer el porqué de este resultado, ya que los niveles de Fe en el bioensayo no superan los límites permitidos en agua, aunque sí lo hace en el cuerpo de agua que habita la población de esta especie, esto podría deberse a la presencia natural de Fe en el lugar de estudio, ya que, en el bioensayo, las moléculas de los clavos no tuvieron una disociación importante en el agua. En el caso del plomo ocurre lo contrario, en el bioensayo se superan los límites permitidos en agua, aunque no en el cuerpo de agua donde habita la población de la que se extrajeron los organismos para el experimento, no obstante, esto no repercutió en la mortalidad en el bioensayo. Posiblemente ocurrió una disociación mayor de moléculas de plomo en el agua, considerando que en el bioensayo no existió un sedimento fangoso, mientras que, en el lugar de estudio, tal vez las moléculas de plomo se depositan en el suelo o sedimento, disminuyendo su presencia en la columna de agua (Sparling et al., 2006).

Respecto a las anomalías, el grupo "Plomo" presentó el mayor índice, seguido del grupo Fierro y finalmente el grupo Control, esto demuestra el efecto de dichos metales en el desarrollo, se ha demostrado que el plomo ocasiona defectos en la formación ósea (Sparling et al., 2006), aunque no evidentes en estas etapas del desarrollo, y alteraciones histopatológicas en diferentes órganos (Ezemonye y Enuneku, 2012) y el fierro ocasiona alteraciones en el desarrollo de algunas estructuras morfológicas, siendo éstas en general de mayor tamaño (Severtsova y Aguillón-Gutiérrez, 2013). En el bioensayo se presentó un porcentaje dos veces mayor de individuos con anomalías que en aquellos individuos fijados directamente, lo cual también se esperaba, pues en el bioensayo existió un contacto directo con los metales y la cantidad de agua fue menor. También influyó el hecho de que las larvas se alimentan a veces en fondo, y en el bioensayo, el alimento cae directamente sobre los metales, ocasionando un contacto más directo entre las larvas y los objetos metálicos al momento de alimentarse (Severtsova y Aguillón-Gutiérrez, 2013).

La cantidad de anomalías encontrada en los individuos que fueron fijados directamente fue de 17 de un total de 300, lo que representa un 5.6%, un índice mayor al 2% que de acuerdo a Ouellet (2000) es el porcentaje normal de individuos con anomalías en una población de anfibios en su hábitat natural. Este porcentaje (5.6%) en *H. plicata* supera el 3.8% reportado por Read y Tyler (1990) en una población de Australia, pero es menor al 15% reportado por Vershinin (1989) para *R. temporaria*. Esto también es similar a lo reportado por Johnson et al. (2001), Taylor et al. (2005), y Bacon et al., (2006) quienes registraron índices de anomalías en diferentes especies de anuros de 5%, lo que difiere entre esos trabajos y el presente estudio del 2% de individuos con anomalías propuesto por Ouellet (2000), lo que indica que existen factores ambientales que propician las anomalías; sin embargo, cabe señalar que las investigaciones de los autores citados arriba fueron realizadas con animales adultos, por lo que se considera una mejor comparación con los resultados de Severtsova et al., (2012) cuyos autores reportaron para el área de Moscú y sus alrededores un 18% de larvas de *R. temporaria* con anomalías y 16.5% de larvas de *R. arvalis* con anomalías, siendo esos índices mayores a los encontrados en este trabajo, lo que indica claramente que en ciudades industrializadas como Moscú, los índices de anomalías suelen ser altos, incluso más altos que los

encontrados en el bioensayo de este estudio. En el lugar de recolecta de los organismos, aunque si existe un impacto antropogénico como es el paso de vehículos cerca de los lagos, éste no es tan grande.

Vershinin (1997) y Kovalenko (2011) no observaron la presencia de edemas, pero sí anomalías en extremidades y espina dorsal; este mismo patrón se encontró en *H. plicata* donde se notó la presencia de anomalías de las extremidades y curvatura de la espina, pero no edemas. No se encontró la anomalía “tiempo de desarrollo lento” común en individuos en exposición a plomo como lo han reportado Severtsova et al. (2013), tampoco se encontraron deformaciones evidentes en el sistema óseo como lo reportado por Sparling et al. (2006), en anfibios expuestos a plomo. El desarrollo en los organismos usados en este trabajo se mantuvo uniforme, lo que indica que no existió un contacto importante con contaminantes en la naturaleza durante las primeras etapas del desarrollo.

La anomalía “curvatura de la espina” puede deberse a un defecto en la somitogénesis o bien a una falla en el proceso de rotación de las somitas (Aguillón-Gutiérrez, 2012, Severtsova et al, 2012), lo que ocurre por la exposición a materiales como el aluminio o el boro (Katagiri, 1976, Laposata y Dunson, 1998). La anomalía en las extremidades está relacionada a la infestación por el parásito tremátodo *R. ondatrae* (Johnson et al., 1999, 2001, 2003; Blaustein y Bancroft, 2007), sin embargo, no se han reportado casos para el estado de Hidalgo, y debido a la baja incidencia de esta anomalía en el presente estudio, entonces esto podría haber sido causado durante la ontogénesis, debido a factores genéticos (mutaciones) o epigenéticos.

Similar a lo reportado por Severtsova et al., (2012) en este estudio se observó una incidencia de anomalías cutáneas y de la pigmentación, siendo las anomalías de la pigmentación menos frecuentes que las cutáneas, esto debido a que las anomalías cutáneas pueden ser causadas por factores fisiológicos o mecánicos, por ejemplo, la presencia de objetos metálicos en el ambiente, mientras que las anomalías de pigmentación se deben a factores fisiológicos. Menon et al., (2000) mencionan que puede haber queratinización del integumento debido a un exceso de calcio; Aguillón-Gutiérrez (2012) reportó esto como el segundo tipo de anomalía más frecuente del intestino para *R. temporaria* en las áreas suburbanas de Moscú, aunque en el presente estudio fue la más común en los individuos fijados directamente y en el bioensayo, alcanzando más del 50% de incidencia. Esta anomalía al igual que los problemas cutáneos, puede deberse a factores fisiológicos, por ejemplo, la incompleta formación del intestino durante la organogénesis o el cierre incompleto de la cavidad abdominal, o a factores mecánicos como la apertura de la cavidad abdominal por algún objeto o intentos de predación.

Comparando los índices de anomalías entre los grupos del bioensayo, en el grupo control, solo la anomalía en intestinos fue superior que en el grupo fierro, en el resto de las anomalías los índices fueron menores o similares.

Sin duda, las condiciones del ambiente donde habitan los anfibios son cruciales en su ciclo de vida. Las técnicas de biomonitoreo y bioensayo en anfibios son de gran utilidad para observar los efectos que causan los metales pesados en su ontogénesis. En esta investigación se encontraron cinco tipos de anomalías en *H. plicata* presentes en intestinos, piel, pigmentación, espina y extremidades. La más común en biomonitoreo y bioensayo fue anomalía en los intestinos. Existió mayor porcentaje de individuos con anomalías en el bioensayo que en el biomonitoreo. Entre los grupos formados para el bioensayo, se observó una mortalidad mayor en el grupo Fierro y mayor número de individuos con anomalías en el grupo Plomo.

Los estudios ecotoxicológicos, tanto en ambientes naturales como en condiciones de laboratorio pueden ayudar a aclarar el fenómeno de disminución de poblaciones y extinción en algunas especies de anfibios.

REFERENCIAS

1. Abbasi S.A. y R. Soni, 1984. Teratogenic effects of chromium (VI) in environment as evidenced by the impact on larvae of amphibian *Rana tigrina*: Implications in the environmental management of chromium. *International Journal of Environmental Studies*, 23:131-137.
2. Aguillón-Gutiérrez D.R., 2012. Investigación sobre la influencia de contaminación antropogénica en cuerpos acuáticos y en el desarrollo postembrionario de tres especies de anfibios anuros. (Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad Estatal de Moscú M. V. Lomonosov. En ruso).
3. Ankley G.T., J.E. Tietge, D.L. DeFoe, K.M. Jensen, G.W. Holcombe, E.J. Durhan y S.A. Diamond, 1998. Effects of ultraviolet light and methoprene on survival and development of *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology Chemistry*, 17:2530-2542.
4. Ankley G.T., J.E. Tietge, G.H. Holcombe, D.L. DeFoe, S.A. Diamond, K.M. Jensen y S.J. Degitz, 2000. Effects of laboratory ultraviolet radiation and natural sunlight on survival and development of *Rana pipiens*. *Canadian Journal of Zoology*, 78:1092-1100.
5. Bacon J.P., D.W. Bacon, R.L. Bacon, y D.J. Bacon, 2006. Deformities in cane toad (*Bufo marinus*) populations in Bermuda: Part I. Frequencies and distribution of abnormalities. *Applied Herpetology*, 3:39-65.
6. Bancroft R. y K.V. Prahla, 1973. Effect of ethylenebis [dithiocarbamic acid] disodium salt (nabam) and ethylene-bis [dithiocarbamate] manganese (maneb) on *Xenopus laevis* development. *Teratology*, 7:143-150.
7. Blaustein A.R. y B.A. Bancroft, 2007. Amphibian population declines: evolutionary considerations. *BioScience*, 57:437-444.
8. Blaustein A.R., J.M. Kiesecker, D.P. Chivers y R.G. Anthony, 1997. Ambient UV-B radiation causes deformities in amphibian embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94:13735-13737.
9. Burlibasa L. y L. Gavril, 2010. Amphibians as model organisms for study environmental genotoxicity. *Applied Ecology and Environmental Research*, 9:1-15.
10. Demichelis S.O., F.R. De La Torre, L. Ferrari, M.E. Garcia, y A. Salibian, 2001. Tadpoles assay: its application to a water toxicity assessment of polluted urban river. *Environmental Monitoring Assessment*, 68:63-73.
11. Duellman W.E., 2001. *The Hylid frogs of Middle America*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles. Ithaca, New York.

12. Ezemonye L.I. y A.A. Enuneku, 2012. Bioaccumulation and histopathological alterations in the flat backed toad, *Bufo maculatus* exposed to sub lethal concentrations of lead. *New York Science Journal*, 5:15-19.
13. Fort D.J., T.L. Propst, E.L. Stover, J.C. Helgen, R.B. Levey, K. Gallagher y J.B. Burkhart, 1999a. Effects of pond water, sediment, and sediment extracts from Minnesota and Vermont, USA, on early development and metamorphosis of *Xenopus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18:2305-2315.
14. Fort D.J., R.L. Rogers, H.F. Copley, L.A. Bruning, E.L. Stover, J.C. Helgen y J.B. Burkhart, 1999b. Progress toward identifying causes of maldevelopment induced in *Xenopus* by pond water and sediment extracts from Minnesota, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18:2316-2324.
15. Fort D.J., R.L. Rogers, R.P. Paul, M.F. Miller, P. Clark, E.L. Stover, J. Yoshioko, F. Quimby, S.A. Sower, K.L. Reed, K.J. Babbitt y R. Rolland, 2001. Effects of pond water, sediment and sediment extract samples from New Hampshire USA on early *Xenopus* development and metamorphosis: comparison to native species. *Journal of Applied Toxicology*, 21:199-209.
16. Fulton M.H. y J.E. Chambers, 1985. The toxic and teratogenic effects of selected organophosphorus compounds on the embryos of three species of amphibians. *Toxicology Letters*, 26:175-180.
17. Gosner K.L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16:183-190.
18. Greulich, K. y S. Pflugmacher, 2003. Differences in susceptibility of various life stages of amphibians to pesticide exposure. *Aquatic Toxicology*, 65:329-336.
19. Hayes T.B., P. Falso, S. Gallipeau y M. Stice, 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213:921-933.
20. Hoffmann E. y V. Stroobant, 2002. Mass spectrometry principles and applications. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, England.
21. Johnson P.T.J., K.B. Lunde, E.G. Ritchie, y A.E. Launer, 1999. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science*, 284:802-804.
22. Johnson P.T.J., Lunde K.B., Ritchie E.G., Reaser J.K. y A.E. Launer, 2001. Morphological abnormality patterns in a California amphibian community. *Herpetologica*, 57:336-352.
23. Johnson P.T.J., K.B. Lunde, D.A. Zelmer y J.K. Werner, 2003. Limb deformities as an emerging parasitic disease in amphibians: evidence from museum specimens and resurvey data. *Conservation Biology*, 17:1724-1737.
24. Katagiri C., 1976. Properties of the hatching enzyme from frog embryos. *Journal of Experimental Zoology*, 193:109-118.
25. Kovalenko E.E., 2011. Properties of norm and variability. *Russian Journal of Developmental Biology*, 42:317-330.

26. Laposata M.M. y W.A. Dunson, 1998. Effects of boron and nitrate on amphibian egg hatching success. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35:615-619.
27. Loewengart G, 2001. Toxicity of boron to rainbow trout: a weight-of-the-evidence assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20:796-803.
28. Marques S.M., S.C. Antunes, H. Pissarra, M.L. Pereira, F. Goncalves y R. Pereira, 2009. Hiatopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi* Seoane) from a uranium mine pond. *Aquatic Toxicology*, 91:187-195.
29. Marques S.M., F. Goncalves y R. Pereira, 2008. Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of *Rana perezi* Seoane. *Science Total Environment*, 402:29-35.
30. Melekhova O.P. y D.R. Aguillón-Gutiérrez, 2014. Evaluación del riesgo ecológico y métodos biológicos de control de la calidad del agua. *Discusión científica: Aspectos médico-biológicos sobre la adaptación humana: Educación, Tecnología de Innovación y Salud en el Siglo XXI*. 121-124 (En ruso).
31. Menon J., E.E. Gardner y S. Vali, 2000. Developmental implication of differential effects of calcium in tail and body skin of anuran tadpoles. *Journal of Morphology*, 244:31-43.
32. Mitchell S.E., C.A. Caldwell, G. Gonzales, W.R. Gould, y R. Arimoto, 2005. Effects of depleted uranium on survival, growth, and metamorphosis in the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, A* 68:951-965.
33. Mouche I., L. Malesic, y O. Guillaudeau, 2011. FETAX assay for evaluation of developmental toxicity. *Methods of Molecular Biology*, 691:257-269.
34. Newman M.C. y M.A. Unger, 2003. *Fundamentals in Ecotoxicology*. CRC/Lewis Press, Boca Raton, Florida, USA.
35. Opitz R., C. Bogi, D.B. Pickford, G. Nentwig, J. Oehlmann, O. Tooi, I. Lutz y W. Kloas, 2005. Description and initial evaluation of *Xenopus* metamorphosis assay for detection of thyroid system disrupting activities of environmental compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24:653-664.
36. Ouellet M., 2000. Amphibian deformities: current state of knowledge. En: D.W. Sparling, G. Linder y C.A. Bishop (Eds.), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Technical publications series, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). Pensacola, Florida, USA.
37. Owens K.D. y K.N. Baer, 2000. Modifications of the topical japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo larval assay for assessing developmental toxicity of pentachlorophenol and p,p-dichlorodiphenyltrichloroethane. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 47:87-95.
38. Plowman M.C., S. Grbac-Ivankovic, J. Martin, S.M. Hopfer y F.W. Sunderman, 1994. Malformations persist after metamorphosis of *Xenopus laevis* tadpoles exposed to Ni²⁺, Co²⁺, or Cd²⁺ in FETAX assays. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 14:135-144.

39. Ramírez-Bautista A., U. Hernández-Salinas, U.O. García-Vázquez, A. Leyte-Manrique y L. Canseco-Márquez, 2009. Herpetofauna del Valle de México: Diversidad y Conservación. UAEH. CONABIO.
40. Ramírez-Bautista A., U. Hernández-Salinas, F. Mendoza-Quijano, R. Cruz-Elizalde, B.P. Stephenson, V.D. Vite-Silva y A. Leyte-Manrique, 2010. Lista anotada de los anfibios y reptiles del estado de Hidalgo, México. UAEH. CONABIO.
41. Read J.L. y M.J. Tyler, 1990. The nature and incidence of post-axial, skeletal abnormalities in the frog *Neobatrachus centralis* Parker at Olympic dam, South Australia. Transactions of the Royal Society of South Australia, 114:213-217.
42. Santos Barrera G y L. Canseco Márquez, 2004. *Hyla plicata*. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org; (accesado en septiembre 10, 2014).
43. Schuytema G.S. y A.V. Nebeker, 1998. Comparative toxicity of diuron on survival and growth of pacific treefrog, bullfrog, red-legged frog, and African clawed frog embryos and tadpoles. Archives Environmental Contamination Toxicology, 34:370-376.
44. Selvi M., A. Gul, y M. Yilmaz, 2003. Investigation of acute toxicity of cadmium chloride (CdCl₂-H₂O) metal salt and behavioral changes it causes on water frog (*Rana ridibunda* Pallas, 1771). Chemosphere, 52:259-263.
45. Severtsova E.A., A.I. Nikiforova y D.R. Aguillón-Gutiérrez, 2013. Spectrochemical and histochemical analyses of tissues of grass frog and gray toad tadpoles developing under simulation of pollution by plumbum and ferrum. Moscow University Biological Sciences Bulletin, 68:186-191.
46. Severtsova E.A. y D.R. Aguillón-Gutiérrez, 2013. Desarrollo postembrionario en anfibios anuros en lagos saturados de compuestos metálicos (Imitación experimental). Russian Journal of Zoology, 92:707-717. (En ruso).
47. Severtsova E.A., D.R. Aguillón-Gutiérrez y S.A. Severtsov, 2012. Frequent anomalies in larvae of common and moor frogs in Moscow area and in the Suburbs of Moscow, Russia. Russian Journal of Herpetology, 19:337-348.
48. Snawder J.E. y J.E. Chambers, 1989. Toxic and developmental effects of organophosphorus insecticides in embryos of the South African clawed frog. Journal of Environmental Science Health, B 24:205 -218.
49. Snawder J.E. y J.E. Chambers, 1990. Critical time periods and the effect of tryptophan in malathion induced developmental defects in *Xenopus* embryos. Life Science, 46:1635-1642.
50. Sparling, D.W., S. Krest y M. Ortiz-Santaliestra, 2006. Effects of lead-contaminated sediment on *Rana sphenocphala* tadpoles. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51:458-466.
51. Surova G.S. y A.S. Severtsov, 1985. The death of the grass frog (*Rana temporaria* L.) in early ontogenesis and factors causing it. Russian Journal of Zoology, 44:61-71.

52. Taylor B., D. Skelly, L.K. Demarchis, M.D. Slade, D. Galusha y P.M. Rabinowitz, 2005. Proximity to pollution sources and risk of amphibian limb malformation. *Environmental Health Perspectives*, 113:1497-1501.
53. Vershinin V.L., 1989. Morphological abnormalities of amphibians of the urban environment. *Russian Journal of Ecology*, 3:58-65.
54. Vershinin V.L., 1997. Características ecológicas de poblaciones de anfibios en territorios urbanizados. (Tesis de doctorado. Ekaterinburgo: Instituto de Ecología Animal y vegetal. Los Urales. Academia Rusa de Ciencias. En ruso).
55. Weinstein D.C. y A. Hemmati-Brivanlou, 1999. Neural induction. *Annual Review Cell Development Biology*, 15:411-433.
56. Young B.E., K.R. Lips, J.K. Reaser, R. Ibañez, A.W. Salas, J.R. Cedeño, L.A. Coloma, S. Ron, E.L. Marca, J.R. Meyer, A. Muñoz, F. Bolaños, G. Chavez y D. Romo, 2001. Population delcines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology*, 15:1213-1223.
57. Zamaletdinov R.I., 2003. The morphological anomalies in urban populations of anurans (in the city of Kazan). *Current Studies Herpetology*, 2:148-153.
58. Zar J.H., 2009. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall International, London.