



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

División Académica de Ciencias Biológicas



**Respuesta fisiológica de embriones y
eleutero-embriones de pejelagarto
Atractosteus tropicus expuestos a petróleo**

**Tesis para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias Ambientales**

Presenta:

Biol. Simrith Elizabeth Córdova de la Cruz

Directores:

Dr. Carlos Alfonso Álvarez González

Dr. Warren W. Burggren





**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

ENERO 8 DE 2021

**C. SIMRITH ELIZABETH CÓRDOVA DE LA CRUZ
PAS. DE LA MAESTRIA EN CIENCIAS AMBIENTALES
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **"RESPUESTA FISIOLÓGICA DE EMBRIONES Y ELEUTEROEMBRIONES DE PEJELAGARTO *Atractosteus tropicus* EXPUESTO A PETRÓLEO"**, asesorado por el Dr. Carlos Alfonso Álvarez González y Dr. Warren W. Burggren sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado integrado por Dr. Rafael Martínez García, Dra. Susana Camarillo Coop, Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Dr. Gabriel Núñez Nogueira y Dr. Randy Howard Adams Schroeder.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR**

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **"RESPUESTA FISIOLÓGICA DE EMBRIONES Y ELEUTEROEMBRIONES DE PEJELAGARTO *Atractosteus tropicus* EXPUESTO A PETRÓLEO"**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el día 8 de Enero del dos mil veintiuno.

AUTORIZO



SIMRITH ELIZABETH CÓRDOVA DE LA CRUZ

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

A mi papá:

Que con su partida, me enseñó que un sacrificio por amor vale mucho más que la pena.

Descansa en Paz.



Índice

1. Índice de Figuras	6
2. Agradecimientos	7
3. Resumen	8
4. Introducción	9
5. Antecedentes	12
6. Justificación	16
7. Objetivos	17
7.1 General.....	17
7.2 Específicos.....	17
8. Materiales y Métodos	18
8.1. <i>Obtención y cuidado de los organismos.</i>	18
8.2. <i>Preparación de las fracciones acomodadas de agua de alta energía (HEWAF)</i>	18
8.3. <i>Diseño experimental.</i>	19
8.4. <i>Evaluación de la función cardíaca.</i>	19
8.4.1. <i>Ritmo cardíaco.</i>	20
8.4.2. <i>Volumen sistólico.</i>	20
8.4.3. <i>Gasto cardíaco.</i>	21
8.5. <i>Diferencias en masa y longitud.</i>	21
8.6. <i>Factor de condición de Fulton para clasificar el tamaño de los edemas.</i>	21
8.7. <i>Análisis estadísticos.</i>	21
9. Resultados	22
9.1. <i>Función cardíaca</i>	22
9.2. <i>Ritmo cardíaco en eleutero-embriones.</i>	22
9.3. <i>Masa</i>	24
9.4. <i>Longitud</i>	24
9.5. <i>Factor de Fulton para caracterizar el tamaño de los edemas.</i>	25
10. Discusión	31
11. Conclusiones	34
12. Referencias	35
13. Artículo científico	47



1. Índice de Figuras

Figura 1. Separación de las fracciones acomodadas de agua de alta energía (HEWAF).	19
Figura 2. Tiempo de exposición de embriones y eleutero-embriones del pejelagarto a diferentes concentraciones de HEWAF.	19
Figura 3. Variables utilizadas para calcular el volumen del ventrículo al finalizar un evento diastólico y sistólico.	20
Figura 4. Función cardíaca en embriones de <i>A. tropicus</i> .	23
Figura 5. Ritmo cardíaco en eleutero-embriones de <i>A. tropicus</i> .	24
Figura 6. Masa corporal de embriones y eleutero-embriones de <i>A. tropicus</i> .	26
Figura 7. Longitud corporal de embriones y eleutero-embriones de <i>A. tropicus</i>	27
Figura 8. Factor de condición de Fulton en eleutero-embriones de <i>A. tropicus</i> .	28
Figura 9. Regresión lineal, para determinar la relación entre el tamaño de los edemas.	29
Figura 10. Determinación del tamaño de los edemas en eleutero-embriones de <i>A. tropicus</i>	30



2. Agradecimientos

Primeramente a Dios porque a pesar de todo nunca me ha abandonado.

A mi familia por sus oraciones e impulsarme a ser mejor cada día.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología por la beca otorgada para mi estudio de posgrado.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco y a mi hogar la División Académica de Ciencias Biológicas por formarme académicamente.

Al Posgrado en Ciencias Ambientales por darme un espacio y guiarme en cada paso de mi formación

Al Dr. Carlos Alfonso Álvarez por aceptarme con este proyecto y facilitarme las instalaciones a su cargo, así como lo necesario para poder llevar a cabo la investigación.

Al Dr, Warren W. Burggren por sus correctas revisiones.

Al Dr. Emyr Peña por todo el apoyo incondicional que siempre me ha brindado a lo largo de este proyecto.

A la Dr. Edmundo Rosique por su amistad, consejos y su estereoscopio que facilito este proyecto.

A mi comité revisor, Dr. Rafael Martínez, Dra. Susana Camarillo, Dr. Gabriel Núñez, Dr. Randy Adams por sus buenos consejos, ideas y material que ayudaron a la realización de este trabajo.

Al Dr. Naim Bautista por dirigirme en mis primeros pasos para realizar este proyecto.

A Gil Martínez Bautista por ser mi compañero en esta aventura, por siempre exigirme al máximo para hacer de este trabajo lo mejor posible y por siempre ser esa persona que me sostiene cuando creo no poder más, TE AMO.

A mi hermanita Conacyt Talhia Martínez por tu apoyo incondicional, por el café que me mantenía despierta y por todas las buenas pláticas que siempre hacían más amena esta investigación.



3. Resumen

Los peces durante sus primeras etapas de vida llevan a cabo diferentes procesos fisiológicos y morfológicos que posibilitan su organogénesis, crecimiento y supervivencia. Dicho periodo puede verse afectado por diferentes contaminantes ambientales como el petróleo crudo. Debido a su composición química compleja la exposición de embriones y larvas al petróleo crudo causa diferentes alteraciones que incluyen disfunción cardíaca y la formación de edemas. Para evaluar las alteraciones fisiológicas que causa la exposición al petróleo sobre peces dulceacuícolas tropicales, se expusieron a embriones y larvas del pejelagarto *Atractosteus tropicus* a cinco diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15 y 20%) de fracciones acomodadas de agua de alta energía (HEWAF, por sus siglas en inglés) por un lapso de 48 h para cada etapa. Los resultados mostraron que a mayor concentración de crudo se observaron mayores afectaciones. Los embriones de pejelagarto mostraron edemas en el saco vitelino sin alteraciones en la función cardíaca. Por otro lado, los eleutero-embriones mostraron edemas moderados y severos, así como una disminución en el ritmo cardíaco. El presente estudio muestra que la exposición corta al petróleo durante las primeras etapas tiene una repercusión en la fisiología cardiovascular del pejelagarto.

Palabras clave: embriones, eleutero-embriones, petróleo, edemas, función cardíaca, pejelagarto, HEWAF.



4. Introducción

En las primeras etapas de vida de los peces se llevan a cabo diferentes procesos fisiológicos y morfológicos que son esenciales para la organogénesis, crecimiento y supervivencia (Finn y Kapoor, 2008). Los organismos durante este periodo son más susceptibles a diferentes factores (extrínsecos o intrínsecos) y su supervivencia dependerá de su adaptación al medio y su rendimiento biológico (Eddy y Handy, 2012; Rudneva, 2013). Algunos de los factores que causan efectos en los peces son los contaminantes ambientales (Scott y Sloman, 2004; Meador, et al., 2018; Faria et al., 2019; Toumisto et al., 2020). En ese sentido, uno de los contaminantes que se ha estudiado en los últimos años debido a su composición química compleja y al gran impacto en las poblaciones naturales de los peces, es el petróleo crudo (Incardona et al., 2012; Hodson, 2017; Rodger et al., 2018; O'Shaughnessy et al., 2018; Meador y Nahrgang, 2019). Dentro de sus componentes se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Los cuales son una mezcla de cientos de componentes químicamente relacionados, persistentes en el medio ambiente con diversas estructuras y variada toxicidad. Debido a sus efectos mutagénicos, cancerígenas e inmunosupresores (Abdel-Shafy y Mansour, 2016) se han catalogado como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental (EPA). Se ha demostrado que los HPAs promueven cambios en la fisiología y morfología de los peces en desarrollo (Pasparakis et al., 2016; Cherr et al., 2017) y causan alteraciones en la forma y función del corazón (Incardona et al., 2004, 2013; Li et al., 2018; Morris et al., 2018).

El sistema cardiovascular empieza a formarse durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, siendo el primer sistema funcional para los peces. El corazón de los peces consta de cinco cámaras especializadas en serie: el seno venoso, el atrio, el ventrículo, el cono arterioso y el bulbo arterioso (Icardio y Colvee, 2011). En la mayoría de los peces, el corazón comienza a latir antes de la eclosión produciendo un flujo convectivo, en el cual las contracciones son movimientos peristálticos descoordinados, que luego se vuelven regulares y secuenciales (Bekkers, 2011; Burggreen, 2013; Burggren et al., 2017). El corazón en formación



será el encargado del transporte de gases respiratorios (O_2), nutrientes (aminoácidos, carbohidratos, grasas), desechos (productos nitrogenados y otros desechos creados por el metabolismo celular) productos reguladores (hormonas, acompañantes moleculares) y circulación arterial (Burggren, 2013). Debido a que la organogénesis cardíaca requiere el ensamble de múltiples proteínas estructurales y de vías de transporte activas y pasivas que son reguladas por canales iónicos, bombas e intercambiadores, innumerables contaminantes, incluido los HAPs en los hábitats acuáticos, pueden interrumpir los procesos que posibilitarán tejidos cardiovasculares adecuadamente formados y funcionales (Incardona y Scholz, 2016). El resultado de lo anterior se traduce en deficiencias en la función cardíaca de los organismos, es decir, alteraciones en el ritmo cardíaco, el volumen sistólico y el gasto cardíaco así como la acumulación de líquido (edema) en el pericardio y saco vitelino.

A pesar de la cantidad de información disponible, existen muy pocos datos sobre los efectos que provocan los HAPs en la fisiología y morfología de las larvas de especies tropicales y de agua dulce. En ese sentido, una de las especies que cumple con ese criterio a nivel local es el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Es una de las siete especies dulceacuícolas pertenecientes a la familia Lepisosteidae, el cual se distribuye desde la cuenca del río Coatzacoalcos, Oaxaca y Veracruz, al este en la cuenca del río Usumacinta, Guatemala, así como la vertiente del Pacífico, desde el sur de Chiapas hasta la cuenca del lago en Nicaragua y su afluente en el río San Juan y de ahí hacia el sureste hasta laguna Tortuguero, Costa Rica (Miller et al., 2009). Es capaz de sobrevivir en ambientes de bajo oxígeno y altas temperaturas (Mora et al., 1997) ya que su hábitat natural son los ríos, arroyos, lagos y pantanos con abundante vegetación, la cual, es utilizada para el desove y temperaturas cálidas entre los 28 y 32 °C. Son peces carnívoros y se alimentan principalmente de peces, crustáceos e insectos, que se caracteriza por ser un pez cilíndrico y largo, de escamas ganoideas con una pigmentación marrón en la parte dorsal y amarilla en la parte ventral (Aguilera et al., 2002). La importancia de esta especie deriva de su función ecológica, debido a la regulación de poblaciones de otros peces y anfibios, así mismo para las comunidades locales, tiene una gran



importancia cultural, alimenticia y comercial, principalmente como producto típico, así como en la pesca deportiva y elaboración de artesanías (Reséndez, 1981; Reséndez y Salvadores, 1983). No obstante los estudios sobre aspectos fisiológicos para el pejelagarto son escasos, principalmente por la exposición de diferentes factores estresantes que promuevan cambios en su fisiología y morfología.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



5. Antecedentes

Los componentes del petróleo se encuentran dentro de los contaminantes más tóxicos para los peces (Hodson, 2017). Es por ello que se han realizado investigaciones principalmente en peces marinos sobre el efecto que producen en diferentes procesos fisiológicos y morfológicos. Por ejemplo, Incardona et al, (2014) demostró que los embriones de *Thunnus albacares*, *Seriola dumerili* y *Thunnus thynnus* expuestos al petróleo, presentan defectos específicos dependientes de la dosis, ya que las larvas eclosionadas mostraban edema pericárdico y del saco vitelino, así como una desaceleración de la frecuencia cardíaca o bradicardia y otras malformaciones secundarias, las cuales incluían una falta de los precursores de los rayos de las aletas, reducción en el crecimiento de los pliegues de las aletas, una curvatura dorsal y una marcada reducción en el crecimiento del ojo.

Por otra parte, los embriones y larvas de la curvina roja (*Sciaenops ocellatus*) mostraron disminuciones en la función cardíaca dependientes de la dosis de hidrocarburos. De esta forma, las dosis altas promovieron derrames cerebrales, una reducción en el gasto cardíaco de hasta un 70% y deformaciones en el cráneo y la columna vertebral caracterizada por una curvatura promovida por la formación de edemas (Khursigara et al., 2017).

En este mismo sentido, los embriones y larvas de *Cyprinodon variegatus* denotaron que la exposición aguda durante 48 h al petróleo disminuye el ritmo cardíaco a las 72, 96 y 120 horas post fertilización (hpf) en el tratamiento de 100% fracciones acomodadas de agua químicamente mejoradas (CEWAF) en comparación del grupo control, reduciendo el movimiento embrionario, retrasando el tiempo de eclosión y disminuyendo el número de crías con pigmentación ocular (Brösler et al., 2017).

Nelson et al, (2017) reportó que durante el desempeño cardiovascular en rutina de larvas de la cobia (*Rachycentron canadum*) la frecuencia cardíaca (fH) aumenta un 18%, y el volumen sistólico (Vs) disminuye un 36% en organismos expuestos al petróleo en comparación del grupo control, mientras que el gasto cardíaco (Q) es



similar entre los no expuestos y los peces expuestos. Sin embargo, durante la prueba de nado los peces del tratamiento control aumentaron su fH en un 61% y 36% los peces expuestos el Vs aumentó un 27%, mientras que el Q_{10} aumentó durante el transcurso de natación a un 71% en comparación a los del grupo control a un 55%.

A pesar de la información previamente mostrada, existen pocos estudios sobre los efectos que provoca el petróleo en la fisiología y morfología en peces de agua dulce. En ese sentido, Pollino y Holdway, (2002) observaron que las exposiciones de 96 h al petróleo en embriones del pez arcoíris australiano (*Melanotaenia fluviatilis*) causa anomalías durante la embriogénesis, incluyendo edemas pericárdicos, desarrollo anormal de la espina dorsal y mandíbula y desarrollo embrionario más lento en comparación del grupo control. Mientras que en las larvas la incubación disminuyó con el incremento de la concentración presentando una mortalidad del 100% en todas las repeticiones, así como corazones grandes y desarrollo anormal de la mandíbula y curvatura espinal.

En cuanto a los efectos que provoca el petróleo en embriones y larvas de especies tropicales de agua dulce, la mayoría de los estudios se han centrado en el pez cebra, donde se ha demostrado que en etapas tempranas del *Danio rerio* se observan alteraciones en la función cardíaca como arritmias graves, defectos vasculares, cambios en la forma del corazón y bucle cardíaco, así como hemorragia intracraneal, adicionalmente mostraron efectos morfológicos en los que se encuentran: distorsión del eje corporal, curvatura de la aleta dorsal, reducción de la estructura de la cabeza, disminución del cerebro y ojos y reducción del rendimiento de natación como consecuencia de los edemas en el saco vitelino o en el pericardio (Hicken et al., 2011; de Soysa et al., 2012; Incardona et al., 2004, 2013).

Para la familia Lepisosteidae existen pocos estudios sobre las afectaciones por la exposición al petróleo tales como el de Omar-Ali (2015), quien demostró que en juveniles del catán (*Atractosteus spatula*) después de una exposición de 48 h al petróleo crudo, causa una disminución en el número de linfocitos y cambios celulares



en el hígado, el bazo y el riñón. Sin embargo, después de siete días de recuperación en agua sin aceite los cambios histopatológicos fueron menos severos.

En el pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) se han realizado estudios en aspectos reproductivos como la descripción de la gónada y los elementos germinales y somáticos durante la ovogénesis, así como el estudio germinal y somático de los testículos con el fin de caracterizar el ciclo reproductivo, lograr desoves controlados y la obtención de larvas (Alemán y Contreras, 1987; Reséndez y Salvadores, 1983; Méndez-Marin et al., 2012; 2016), al igual que la descripción morfológica del desarrollo para su buen manejo en los cultivos y el efecto de la densidad de la población en el crecimiento y supervivencia (Aguilera et al., 2002; Martínez-Cardenas et al., 2020).

En cuanto a su cultivo, se ha realizado estudios nutricionales y alimenticios para determinar la presa óptima para la cría del pejelagarto utilizando diferentes tipos de alimento vivo durante el estadio larvario, así como el diseño de diferentes dietas con base en la fisiología digestiva y la actividad de las enzimas digestivas del pejelagarto, que permitan mejorar el crecimiento, la supervivencia, respuesta metabólica y disminuir el canibalismo (Frías-Quintana et al., 2010, 2016, 2017; Aguilera et al., 2012; Escalera-Vázquez et al., 2018; Huerta-Ortíz et al., 2018; Sáenz de Rodríguez et al., 2018; Guerrero-Zarate et al., 2019; Palma-Cancino et al., 2019; Jiménez-Martinez et al., 2020). De la misma forma, se ha realizado la caracterización parcial de proteasas acidas y alcalinas y la evaluación de prebióticos y probióticos en su alimentación (Guerrero-Zárate et al., 2014; Najera-Arzuela et al., 2018; Nieves-Rodríguez et al., 2018; Sepúlveda-Quiroz et al., 2020).

Por otro lado, existen estudios de variación cromosómica y genética, al igual que la expresión de los genes implicados en el metabolismo de los lípidos y el gen tripsina en diferentes tejidos como: el cerebro, hígado, músculo, tejido adiposo mesentérico, riñón, testículos, branquias y corazón (Arias-Rodríguez et al., 2008; Barrientos-



Villalobos y Espinosa de los Monteros, 2008; Jesús-de la Cruz et al., 2019; Jiménez-Martínez et al., 2018).

En cuanto a su fisiología cardiorrespiratoria se ha descrito que diferentes factores pueden modificar sus tasas de ventilación branquial y área, así como su frecuencia cardíaca, tales como los cambios agudos en temperatura, hipoxia y después de someterse a actividad forzada (Burggren et al., 2016). Sin embargo, el efecto de los HAPs en las respuestas fisiológicas y morfológicas de embriones y larvas de *A. tropicus* no han sido estudiado, siendo de suma importancia ya que en el estado se encuentran distribuidos en los cuerpos de agua aledaños a los pozos de extracción petrolera, oleoductos, baterías de separación, secciones de válvulas, centrales de almacenamiento y bombeo, así como refinería.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



6. Justificación

Debido a la actividad antropogénica, el cambio climático y la contaminación, los ecosistemas se han modificado provocando fragmentación del hábitat, reducción en el tamaño de las poblaciones y cambios en los diferentes procesos fisiológicos y morfológicos de los organismos acuáticos (Comte et al., 2013; Mantyka-Pringle et al., 2014). Es por ello, que el conocimiento generado con esta investigación será útil para determinar biomarcadores tempranos de los factores que puedan afectar la homeostasis de los organismos. En ese aspecto, después de los grandes derrames de petróleo en el Golfo de México, la exposición a los hidrocarburos ha sido extensamente estudiada, debido a los diferentes cambios que promueven en los peces. Sin embargo, son pocos los estudios sobre el efecto de estos compuestos en especies tropicales que habitan en ambientes de agua dulce.

Debido a que el estado de Tabasco es una región rica en yacimientos de hidrocarburos y cuencas fluviales, es necesario el conocimiento de los procesos fisiológicos y morfológicos, así como las alteraciones provocadas por la presencia de hidrocarburos en el medio en los organismos dulceacuícolas de la región. Una de las especies que puede aportar información sobre el efecto de los hidrocarburos en organismos tropicales de agua dulce es el pejelagarto (*A. tropicus*), ya que se encuentra ampliamente distribuido en los cuerpos de agua del estado, es una especie de importancia ecológica, un pez ancestral y de fácil manejo. A pesar de que se conocen algunos aspectos sobre su biología y su fisiología, no se ha estudiado el efecto de los hidrocarburos sobre el organismo, especialmente en sus etapas tempranas de vida, las cuales son de las más sensibles y susceptibles a los cambios en el ambiente (Burgreen et al., 2016). De esta forma, este trabajo aportará información importante sobre la respuesta fisiológica de esta especie al exponerlo a diferentes concentraciones de hidrocarburos en el agua y se dará la pauta para investigaciones futuras sobre este tema.



7. Objetivos

7.1 General

Evaluar las alteraciones morfológicas y cardiorrespiratorias de la exposición al petróleo durante las primeras etapas de vida del pejelagarto *Atractosteus tropicus*.

7.2 Específicos

- ❖ Determinar las afectaciones cardiorrespiratorias en embriones y eleutero-embriones de *A. tropicus* expuestos al petróleo durante 48 h.
- ❖ Calcular la masa y la longitud de embriones y eleutero-embriones de *A. tropicus* expuestas al petróleo durante 48 h.
- ❖ Caracterizar el tamaño de los edemas en eleutero-embriones de *A. tropicus* en función de la exposición al petróleo con base en el Factor de condiciones de Fulton.



8. Materiales y Métodos

8.1. Obtención y cuidado de los organismos.

Los huevos de pejelagarto se obtuvieron mediante un desove inducido artificialmente en el Laboratorio de Acuicultura Tropical de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México. La hembra fue previamente anestesiada con aceite de clavo e inyectada con 1 ml Kg⁻¹ de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, marca Sanfer). Seguidamente los reproductores se mantuvieron en tanques circulares de 2000 L en proporción de tres machos por hembra, con sustrato artificial en el fondo (tiras de rafia y tubos de PVC con contrapeso) para la adherencia de los huevos (Márquez et al., 2013). Al momento de la fertilización, 300 huevos se extrajeron y el resto se mantuvo en el tanque a una temperatura ambiente de 28 °C, con un fotoperiodo de 12 h luz - 12 h oscuridad, en agua libre de cloro y con aireación constante. Al eclosionar el resto de las larvas se tomaron 300 para la segunda parte del estudio. Las larvas no se alimentaron debido a la presencia del saco vitelino que provee alimentación endógena.

8.2. Preparación de las fracciones acomodadas de agua de alta energía (HEWAF)

El petróleo se obtuvo del Campo Samaria en Villahermosa, Tabasco, México, a través del Laboratorio de Biorremediación de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Las fracciones acomodadas de agua de alta energía (HEWAF) se prepararon de acuerdo a los protocolos previamente descritos por Hantlen et al. (2010) e Incardona et al. (2013), mezclando un 1 g de petróleo por cada litro de agua. En este estudio se mezclaron los componentes en una licuadora comercial Turmix PD18 a ~15,000 rpm por 30 segundos. Seguidamente se dejó reposar la mezcla en un embudo de separación por una hora. Para los ensayos se utilizaron los primeros 900 mL del embudo para evitar la capa de hidrocarburos en la



superficie. Esta solución se consideró como solución stock 100% HEWAF (Figura 1).

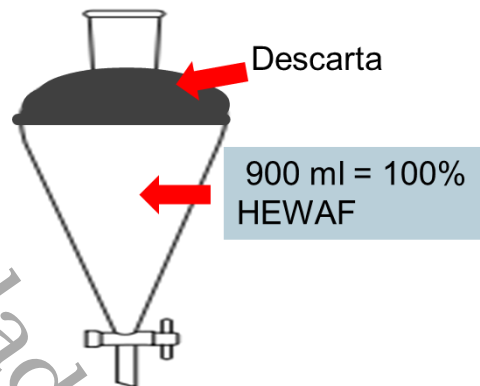


Figura 1. Separación de las fracciones acomodadas de agua de alta energía (HEWAF). Los primeros 900 ml fueron utilizados para las exposiciones considerándolo 100% HEWAF

8.3. Diseño experimental.

Los huevos fertilizados se colocaron al azar en 15 peceras de vidrio de 5 litros (60 organismos por tratamiento, 20 por replica). Estas mismas peceras se utilizaron para el experimento con larvas con el mismo número de organismos. La exposición al petróleo se llevó a cabo durante 48 horas en cada grupo y a diferentes concentraciones de HEWAF a partir de la dilución de la solución stock. Los tratamientos utilizados fueron: 0%, 5%, 10%, 15% y 20% HEWAF (Figura 2).

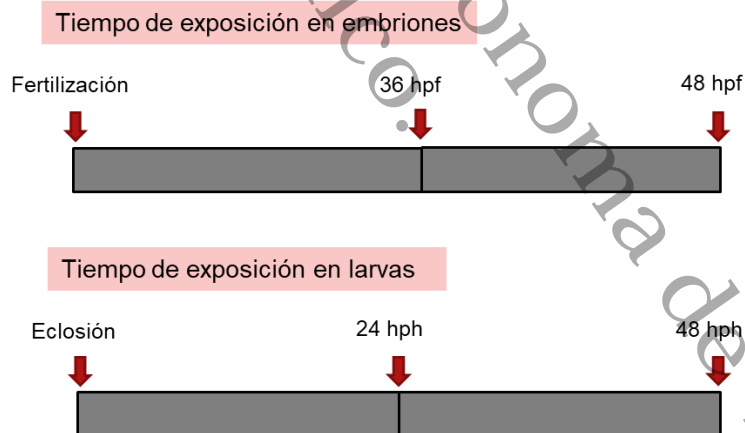


Figura 2. Tiempo de exposición de embriones y eleutero-embryones del pejelagarto a 0%, 5%, 10%, 15% y 20% HEWAF.

8.4. Evaluación de la función cardíaca.

La función cardíaca consta de tres variables, el ritmo cardíaco, el volumen sistólico y el gasto cardíaco. En este estudio se evaluó solo en embriones debido a que la



pigmentación de las larvas impidió delimitar el corazón para realizar los cálculos correspondientes. En estas últimas solo se midió el ritmo cardiaco.

8.4.1. Ritmo cardiaco.

Para determinar la frecuencia de los latidos cardiacos (f_H), los organismos fueron colocados en cámaras de acrílico con un diámetro de ~2 cm y ~2 cm de profundidad. El ritmo cardiaco se calculó observando los movimientos del corazón a través de la pared del cuerpo con ayuda de un microscopio estereoscópico (Stemi 305 lab). La frecuencia cardiaca se midió en dos periodos de 15 segundos, seguidamente se calculó el promedio de los dos valores y multiplico por 4 para obtener los latidos*min⁻¹ (Burggren et al., 2016).

8.4.2. Volumen sistólico.

Para determinar el volumen sistólico se utilizó el modelo esferoide alargado descrito por Perrichon et al., (2017), en el cual, a partir de secuencias de video, el volumen del ventrículo se determinó al final de los eventos sistólico y diastólico (3-5 eventos por individuo). Para calcular el volumen del ventrículo se utilizó la fórmula $V_s = (\pi/6)(ab^2)$, donde V_s es el volumen sistólico, a representa el eje mayor, b es el eje menor del esferoide. Una vez obtenido el volumen de cada evento, el volumen sistólico se calculó mediante la fórmula $VS = V_1 - V_2$, donde VS es el volumen sistólico, V_1 el volumen del evento diastólico y V_2 el volumen del evento sistólico. De esta manera se obtiene el volumen sistólico en $\mu\text{L latido}^{-1}$ (Figura 3).

Volumen sistólico: Volumen diastólico – Volumen sistólico = $\mu\text{L latido}^{-1}$

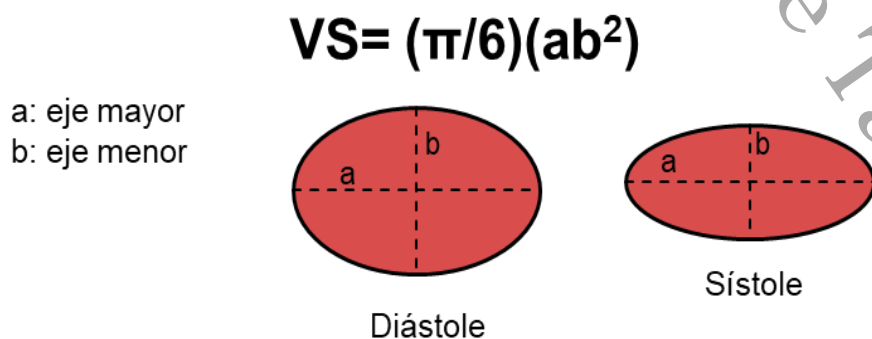


Figura 3. Variables utilizadas para calcular el volumen del ventrículo al finalizar un evento diastólico y sistólico: V_s : volumen sistólico, a : eje mayor, b : eje menor.



8.4.3. Gasto cardiaco.

El gasto cardiaco se calcula en $\mu\text{L min}^{-1}$ y se obtiene multiplicando $fH \times V_s$ (Perrichon et al., 2017).

8.5. Diferencias en masa y longitud.

La masa de los organismos se determinó mediante una balanza analítica. Para calcular la longitud (en milímetros) de los embriones y los eleutero-embriones se tomó una serie de fotografías de alta definición de los organismos de forma lateral y utilizando una regla para controlar la escala. Seguidamente cada fotografía se procesó en el software Image J versión 1.5 midiendo desde la cabeza y hasta la punta de la cola.

8.6. Factor de condición de Fulton para clasificar el tamaño de los edemas.

El tamaño de los edemas se clasificó utilizando los datos del factor de condición de Fulton, ya que relaciona la longitud de los organismos y su masa con base en la ley del cubo (Froese, 2006), a partir de la fórmula $K = (W/L^3) \times 100$, donde W es el peso, L es la longitud y 100 una constante para mostrar porcentajes.

Para ello, se utilizó la estadística descriptiva del conjunto de datos con el objeto de determinar el ancho de los intervalos que definirán la clasificación de los edemas. Para calcular el ancho de clase se utilizó el rango del conjunto de datos dividido entre la raíz cuadrada del número total de organismos.

8.7. Análisis estadísticos.

Para evaluar el efecto del petróleo crudo en la masa, longitud, ritmo cardiaco y Factor de condición de Fulton se realizó una ANOVA de dos vías, seguida de una prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak para denotar diferencias entre los tratamientos. En cuanto a la ventilación branquial se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Del mismo modo, a partir de la caracterización de los edemas se realizaron dos regresiones simples para determinar la relación del factor de condición con la masa y la longitud. Todos los análisis se realizaron con un valor de significancia de $\alpha=0.05$. Los análisis llevaron a cabo en el software SigmaPlot 11.0.



9. Resultados

9.1. Función cardíaca

Los embriones expuestos al petróleo mostraron diferencias significativas con respecto al tiempo en el ritmo cardíaco (fH), volumen sistólico (SV) y gasto cardíaco (CO). La frecuencia cardíaca aumenta significativamente a las 48 hpf ($\sim 129 \pm 1.91$ latidos min^{-1}) (Figura 4A). El volumen sistólico en embriones exhibió un aumento leve pero significativo ($P < 0.001$) de 24 a 36 hpf en todos los tratamientos HEWAF, pero en 48 hpf no se observaron diferencias en comparación con los valores iniciales (Figura 4B). Similar a la fH, el gasto cardíaco mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo para todos los tratamientos ($P < 0.001$) pero no entre diferentes exposiciones HEWAF (Figura 4C).

9.2. Ritmo cardíaco en eleutero-embriones.

La frecuencia cardíaca (fH) en los eleutero-embriones de control se mantuvo similar en la eclosión y 24 hpf, pero luego aumentó significativamente a las 48 h ($P < 0,001$; Figura 5). Por el contrario, después de 24 h de exposición, la fH comenzó a disminuir en los eleutero-embriones expuestos durante 48 h de 10%, 15% y 20% HEWAF ($P < 0,001$; Figura 5). En 48 hpf, los eleutero-embriones de 5% y 10% HEWAF mostraron un aumento en fH en comparación con la eclosión y 24 hpf. Sin embargo, a las 24 h la fH fue menor que la del grupo control. Los tratamientos que muestran mayor efecto a la exposición son 15 y 20 % HEWAF disminuyendo significativamente de ~ 126 a ~ 106 latidos min^{-1} y de ~ 127 a ~ 103 latidos min^{-1} .



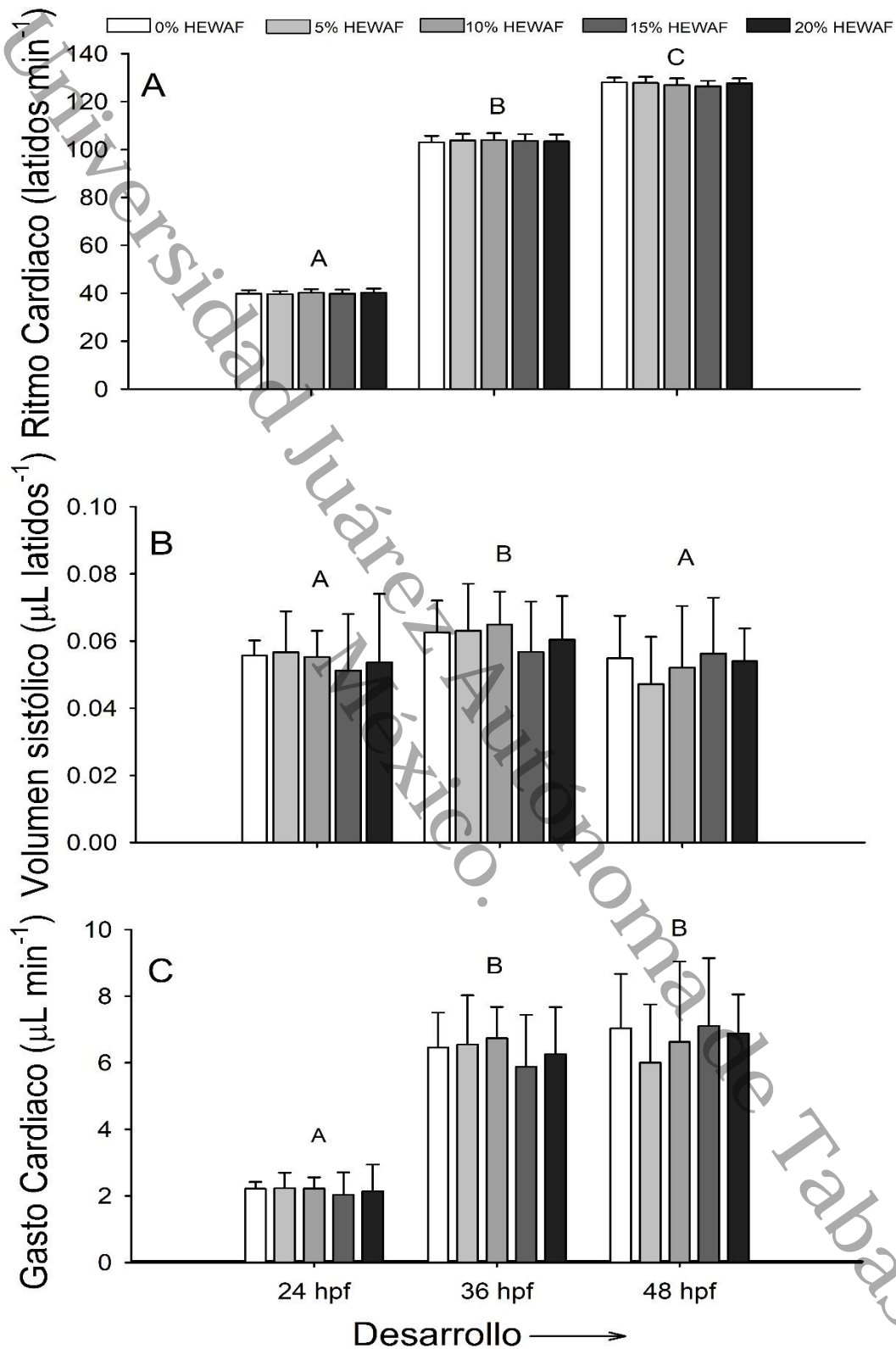


Figura 4. Función cardíaca en embriones de *A. tropicus* desde la fertilización hasta 48 hpf. A) frecuencia cardíaca, B) volumen sistólico, C) gasto cardíaco. Se grafican los valores medios \pm error estándar. $n = 20$ embriones por tratamiento. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas en el desarrollo ($P < 0.001$).



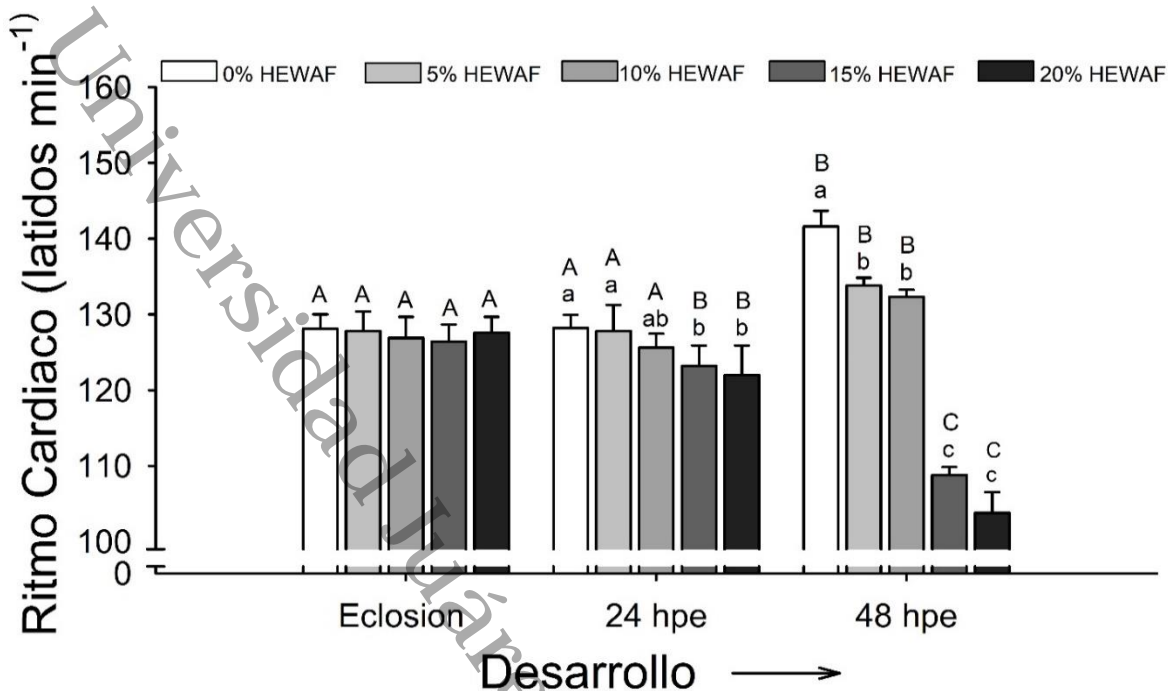


Figura 5. Ritmo cardíaco en eleutero-embriones de *A. tropicus* desde la eclosión hasta las 48 horas post eclosión (hpe): Letras mayúsculas denotan diferencias significativas con respecto al tiempo, con un valor de $P < 0.001$. Las letras minúsculas denotan diferencias entre los tratamientos con un valor de $P < 0.001$.

9.3. Masa

La masa corporal de los embriones aumentó a lo largo del desarrollo para el tratamiento control y para todas las exposiciones de HEWAF ($P < 0,001$, Figura 6A). En eleutero-embriones, se produjeron diferencias significativas en diferentes etapas ($P < 0,001$). Teniendo en cuenta el tratamiento HEWAF, solo los eleutero-embriones expuestos a HEWAF al 20% exhibieron una masa corporal más alta que los otros tratamientos a las 48 h ($P < 0,001$; Figura 6B).

9.4. Longitud

La longitud estándar de los embriones aumentó a lo largo del desarrollo ($P < 0,001$) pero no hubo diferencias entre los tratamientos ($P > 0,05$; Figura 7A). En cuanto a la longitud de los organismos después de la eclosión, la longitud aumentó a lo largo del desarrollo para todos los tratamientos ($P < 0.001$) y solo en 48 horas ocurrieron diferencias entre tratamientos, los eleutero-embriones de 5% y 10% HEWAF mostraron una longitud menor que el tratamiento control, mientras que en los



tratamientos de 15% y 20% HEWAF mostraron una longitud más baja en comparación de los demás tratamientos ($P < 0,001$; Figura 7B)

9.5. Factor de Fulton para caracterizar el tamaño de los edemas.

El factor de condición de Fulton (K) en eleutero-embriónes varió a lo largo del desarrollo ($P < 0,001$) mostrando una mayor variación entre la eclosión y 48 horas pos eclosión (hpe). Las diferencias entre los tratamientos ocurrieron a 48 hpe ($P < 0,001$) donde los eleutero-embriónes expuestos a HEWAF al 20% tenían un K más alto (Figura 8). La regresión múltiple mostró que la longitud total de los eleutero-embriónes tiene una mayor correlación con K que con la masa corporal. La regresión múltiple mostró que la longitud total de los eleutero-embriónes tiene una mayor correlación con K que con la masa corporal ($R = 0.890$, $R^2 = 0.790$, $F = 1122.25$, $P < 0.001$; $R = 0.100$, $R^2 = 0.010$, $F = 3.059$, $DF = 1$, $P = 0.081$, respectivamente) donde los eleutero-embriónes con valores de longitud total más bajos mostraron valores de K más altos y edemas severos, como se muestra en la figura 9.

El tamaño de los edemas se caracterizó obteniendo los intervalos a partir de la estadística descriptiva del conjunto de datos. Estos se clasificaron como: no edema, edema moderado y edema severo. Para los organismos que no tenían edema, el límite inferior se encontró en aquellos que tenían un factor de Fulton (K) de 0.149 y el límite superior $K = 0.298$. En cuanto al edema moderado su límite inferior se encontró en $K = 0.298$ y el límite superior $0.389K$ y los de edema severo se encontraron dentro del límite inferior $K = 0.398$ y el límite superior $K = 0.547$. Los organismos que no presentaron edema se encontraron en el tratamiento control, mientras que en los tratamientos 10 y 20% HEWAF fueron en los que se encontraron organismos con más edema moderado y fue para el tratamiento de 20% HEWAF donde se obtuvo el mayor número de peces con edema severo, respecto de los edemas tratamientos (Figura 10).



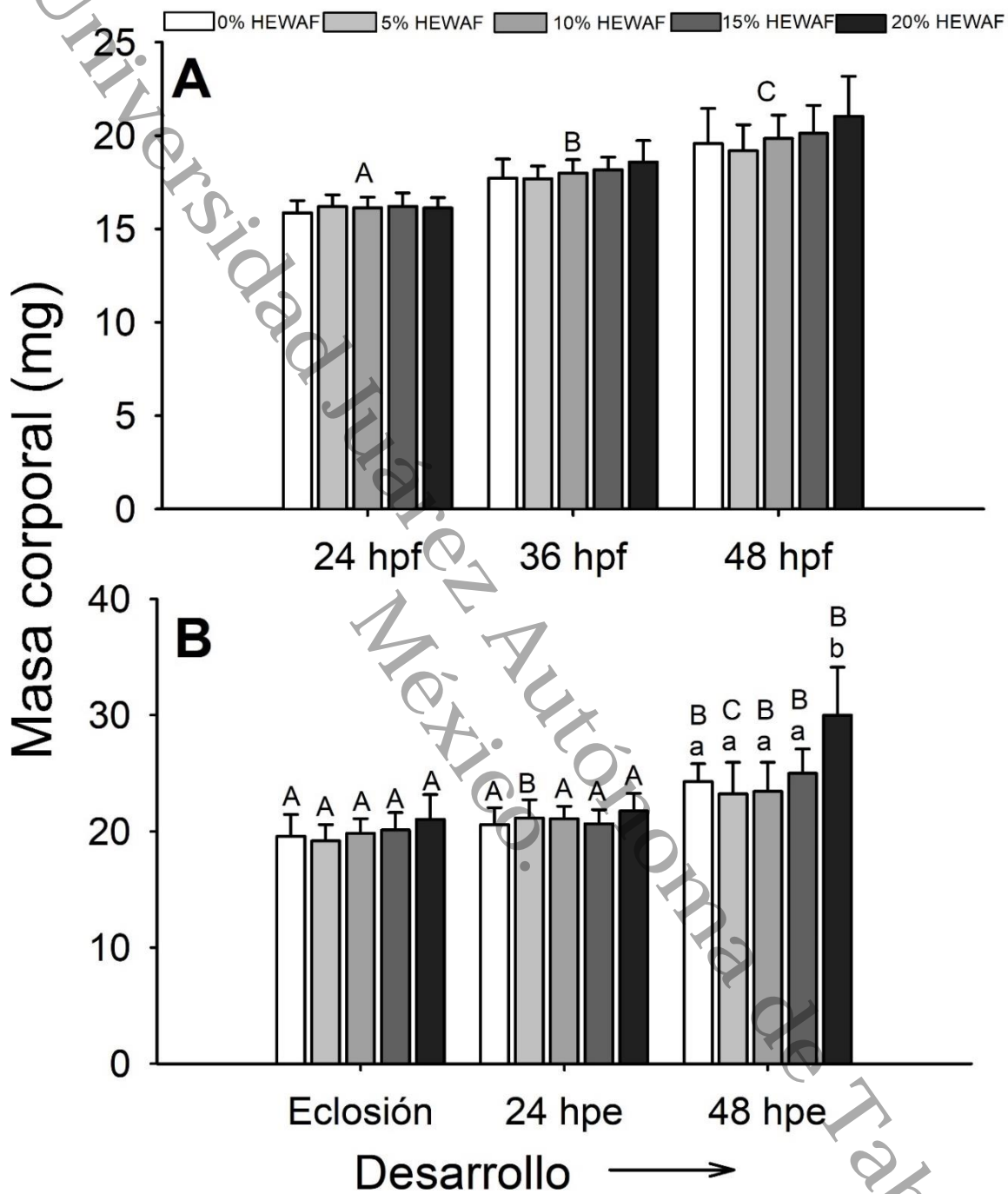


Figura 6. A) Masa corporal de embriones de *A. tropicus* desde la fertilización hasta las 48 horas post fertilización. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas con respecto al tiempo en cada tratamiento ($P < 0.001$). **B)** Masa corporal de los eleuthero-embryos de *A. tropicus* desde la eclosión hasta las 48 hpe.: Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas con respecto al tiempo en cada tratamiento ($P < 0.001$). Las letras minúsculas denotan diferencias significativas dentro de los tratamientos con relación al tiempo, con un valor de $P < 0.001$.



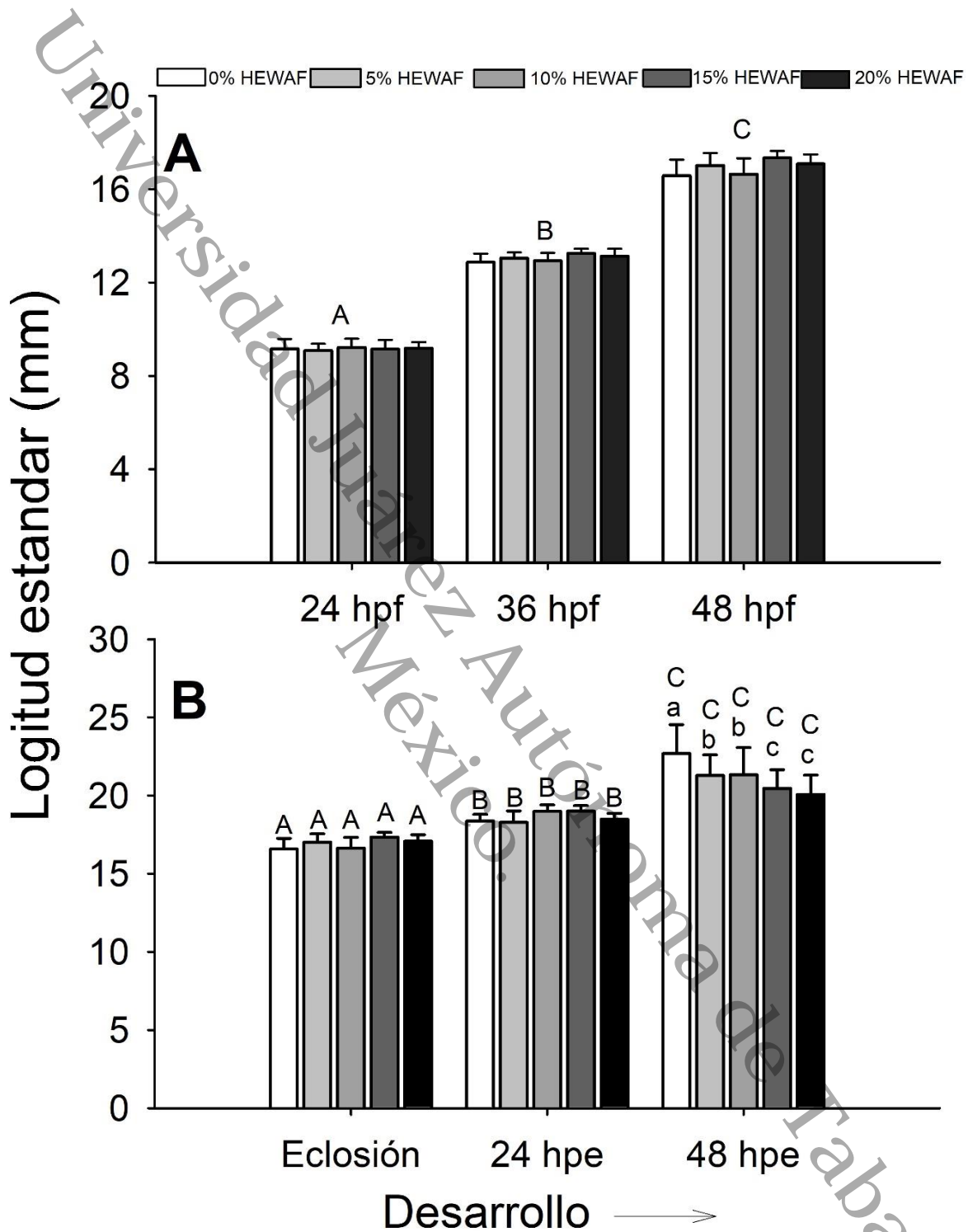


Figura 7. A) Longitud corporal de embriones de *A. tropicus* desde la fertilización hasta las 48 horas post fertilización: Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas con respecto al tiempo en cada tratamiento, con un valor de $P < 0.001$. **B)** Longitud corporal de eluetero-embryones de *A. tropicus* desde la eclosión hasta las 48 hpe. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas con respecto al tiempo en cada tratamiento, con un valor de $P < 0.001$. Las letras minúsculas denotan diferencias significativas dentro de los tratamientos con relación al tiempo, con un valor de $P < 0.001$



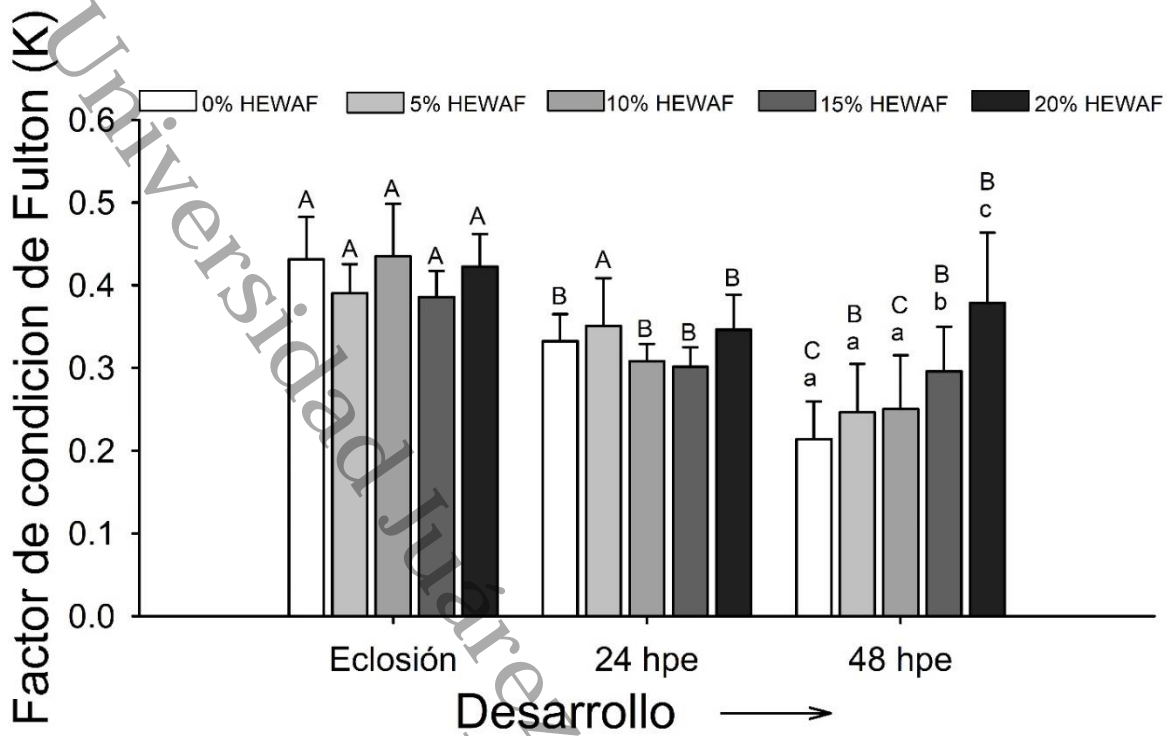


Figura 8. Factor de condición de Fulton en eleutero-embryones de *A. tropicus* desde la eclosión hasta las 48 horas post eclosión: Las letras en mayúsculas denotan diferencias significativas con respecto al tiempo ($P < 0.001$). Las letras minúsculas denotan diferencias significativas dentro de los tratamientos con relación al tiempo ($P < 0.001$).



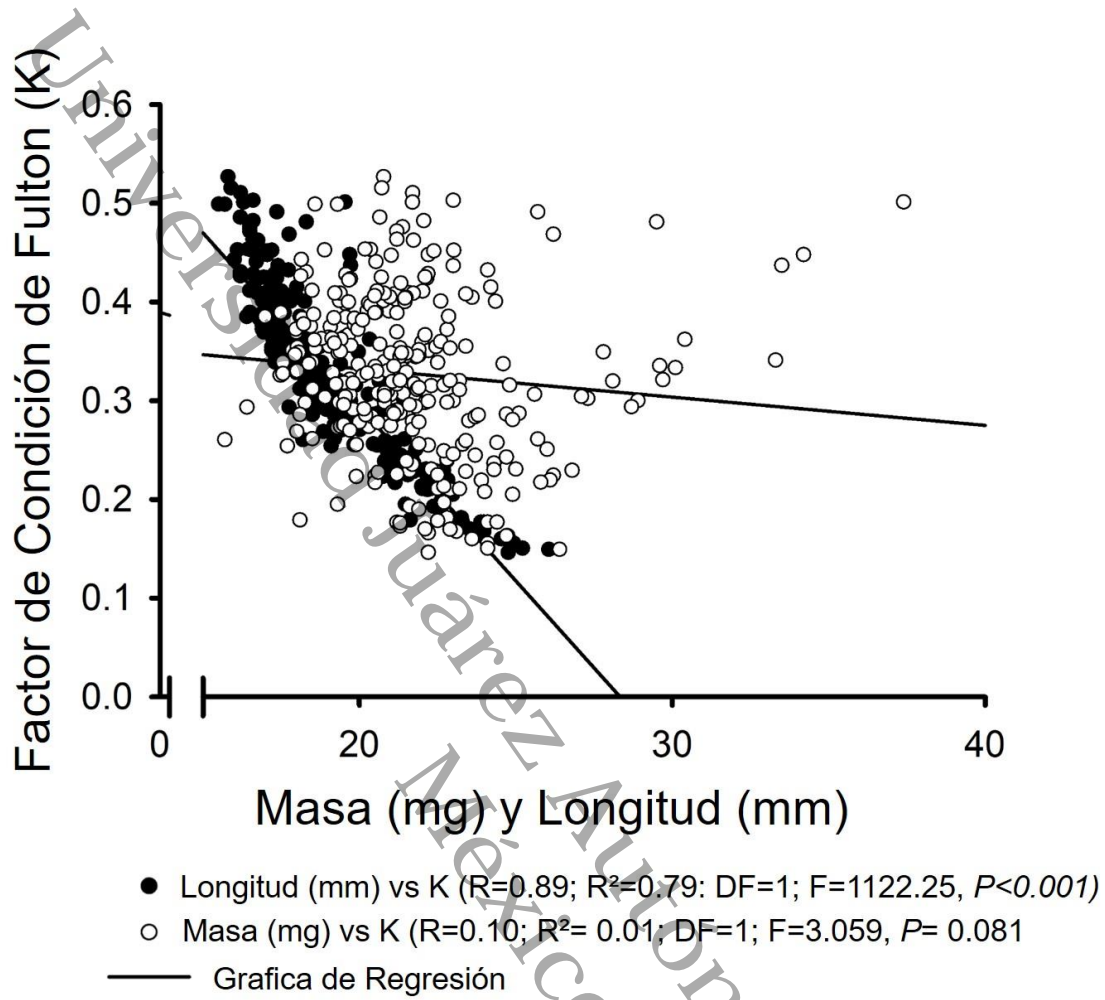


Figura 9. Regresión lineal, para determinar la relación entre el tamaño de los edemas con: A Masa y factor de condición de Fulton. B: Longitud y Factor de condición de Fulton.



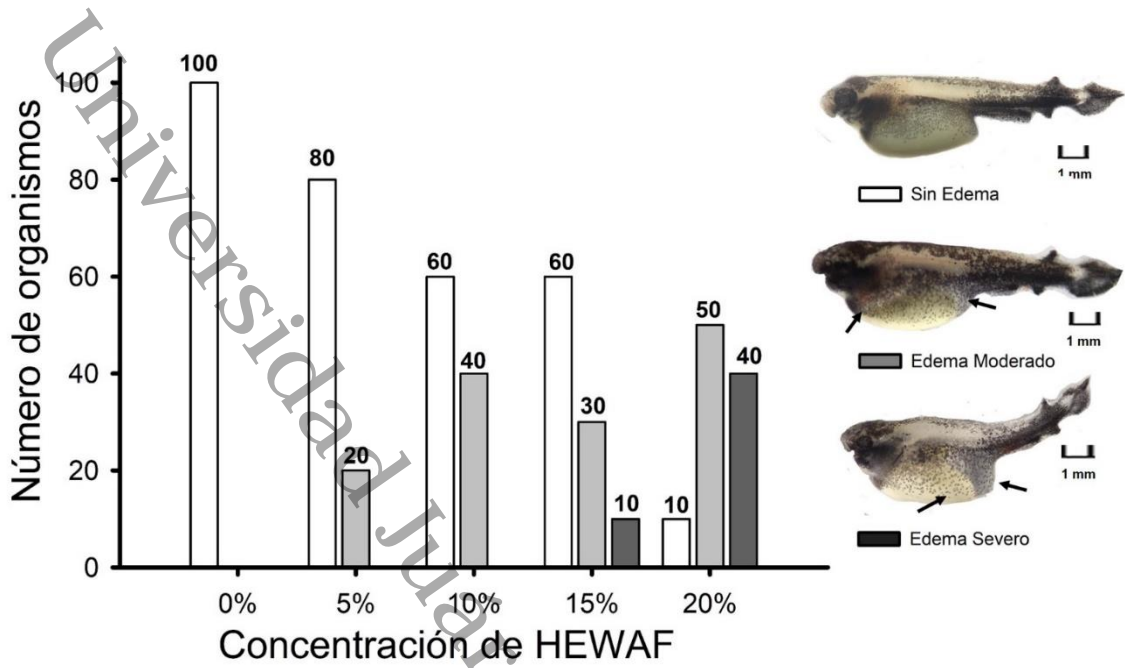


Figura 10. Determinación del tamaño de los edemas en eleutero-embrión a 48 hph. Se muestra la cantidad de organismos que no presentan edema, edema moderado y severo para cada uno de los tratamientos y el grupo control.



10. Discusión

Se ha demostrado que un indicador de la sensibilidad de los peces en desarrollo a las exposiciones de petróleo, son las alteraciones en el sistema cardiovascular. En consecuencia, la forma y función del corazón se ven afectadas. Estas alteraciones se manifiestan como corazones tubulares, reducción en el gasto cardiaco, formación edemas severos en el pericardio y saco vitelino ocasionando algunas veces alteraciones en el sistema esquelético (Anderson et al., 2009; Incardona et al., 2013; Raimondo et al., 2014; Khursigara et al., 2017). En este estudio, los embriones de pejelagarto expuestos a las concentraciones más altas (20% HEWAF) mostraron una de las anomalías típicas de la cardiotoxicidad del petróleo crudo descritas para otras especies de peces: como la presencia de pequeños edemas que causan una reducción ligera en el volumen sistólico a las 48 hpf. Nuestros datos indican que los embriones de pejelagarto muestran una respuesta toxica leve posiblemente por la presencia de microgotas de aceite adheridas al corion. La primera observación de atracción de microgotas de aceite se observaron a las 2 h de exposición. Las microgotas de aceite se distribuyeron al redor de todo el huevo, pero parecieron fusionarse en una mancha más grande en los embriones del grupo de dosis alta. Estudios previos sugieren que las gotas de aceite en el corion conduce muy probablemente una vía de exposición dual, en el cual se crea una mayor concentración de PAH disueltos en el huevo, potenciando a una transferencia de compuestos de petróleo crudo a través del corion, lo que facilita la captación de PAH disueltos en los embriones provocando mayor gravedad en la deformación y cardiotoxicidad (Sørhus et al., 2015; Sørensen et al., 2017). Además, se ha sugerido que la composición química de la membrana y la morfología del huevo pueden influir en la adherencia de las gotas de aceite en diferentes especies de peces (Hansen et al., 2018). Es por ello que se requieren futuras investigaciones que deberán centrarse en comprender la morfología y composición del huevo del pejelagarto y su importancia durante la etapa embrionaria, ya que el conocimiento generado puede ser útil para realizar evaluaciones de riesgo por los factores externos que puedan afectar las zonas de desoves.



Para evaluar el impacto del petróleo en la función cardíaca en los eleutoroembriones de pejelagarto, desde el momento de la eclosión hasta las 48 hph, se midió el ritmo cardíaco y la presencia de los edemas. Esta investigación ha demostrado que las eleutero-embriones de *A. tropicus* son más sensibles que los embriones a la exposición del petróleo. Los resultados demostraron que las larvas del pejelagarto presentaron edemas después de 48 h de exposición en las concentraciones más altas, en el que la presencia de los edemas es responsable de las afectaciones cardíacas. Los defectos cardiovasculares observados en éste estudio, incluyeron una disminución en el ritmo cardíaco y estancamiento de la circulación principalmente en las concentraciones de 15 y 20% HEWAF. Estudios recientes han documentado que la exposición al petróleo durante las etapas tempranas de desarrollo de los peces, causa una interrupción en el funcionamiento cardíaco como bradicardia y reducción de la contractilidad, lo cual está relacionada con la acumulación de líquido cardiogénico (edema) (Incardona et al., 2012, 2013, 2014; Edmunds et al., 2015; Perrichon et al., 2016). Un estudio realizado por Brette et al. (2014), demostró que los compuestos del petróleo crudo producen un mecanismo cardiotoxico de respuesta que produce alteraciones en los canales iónicos involucrados en el acoplamiento de excitación-contracción y la contractibilidad de los cardiomiocitos. Si bien las lesiones cardíacas en peces recién eclosionados de pejelagarto son un indicador de sensibilidad al petróleo, una evaluación en etapas posteriores podría proveer información sobre si los cambios en la forma y función de corazón son permanentes o transitorios, así como su relación con los mecanismos de excreción de estas sustancias y procesos respiratorios del pejelagarto.

Con respecto a las alteraciones en la masa de los organismos en función de la exposición al petróleo se ha descrito muy poco. En este estudio se observó que el peso de embriones y larvas incrementa con el paso del tiempo, encontrando diferencias entre los tratamientos a las 48 hph en las larvas expuestas a 20% HEWAF. Sin embargo se ha descrito que la masa en los primeros días de desarrollo del pejelagarto tiende a mantenerse relativamente constante debido a una transferencia del vitelo a los tejidos del cuerpo en desarrollo (Burggren et al., 2016).



Por lo cual, se infiere que el aumento en la masa de embriones y larvas de pejelagarto puede relacionarse con la presencia y tamaño de los edemas.

Por otro lado, en este estudio se demostró que la longitud de las larvas de pejelagarto se ve afectada por las diferentes concentraciones de HEWAF en comparación a grupo control, siendo en las concentraciones de 15 y 20% HEWAF a las 48 hph las que muestra una mayor disminución en la longitud. Similar a nuestros resultados, se observó una reducción en la longitud estándar de diferentes especies de peces en desarrollo, expuestas al petróleo (Søurs et al., 2015; Raimondo et al., 2016; Bosker et al., 2017). Sin embargo la longitud en los embriones incrementó con el paso del tiempo debido al desarrollo del embrión.

En este estudio se empleó el factor de condición de Fulton (K) para la caracterización en el tamaño de los edemas, ya que relaciona la longitud de los organismos con su masa. Por su parte, el factor de condición K se basa en que los organismos de una misma talla, con mayor peso presentan mejor condición (Froese, 2006). Con base en este postulado, se sugiere que si el factor de condición K incrementa en un tiempo determinado, se debe a la presencia de los edemas en los peces, ya que en este estudio el factor de condición K incrementó a medida que las larvas a las 48 hph presentaban mayor tamaño de edema. Por lo cual caracterizar el tamaño de los edemas mediante este método puede ayudar a correlacionar las alteraciones en el sistema cardiovascular, ya que se ha reportado que un edema con menos líquido solo afecta el saco vitelino, mientras que un aumento de líquido afecta la cavidad pericárdica y los espacios ventriculares (Carls et al., 1999).



11. Conclusiones

El presente estudio demostró que la exposición corta de petróleo tiene un efecto sobre la morfología y la fisiología cardiovascular de embriones y eleute-roembriones de pejelagarto y que el tamaño de los edemas correlaciona la importancia en el desempeño cardíaco de los organismos. De igual manera este estudio genera información sobre la importancia de considerar los factores ambientales y el riesgo de los contaminantes antropogénicos en la fisiología y morfología de los organismos acuáticos de la región. Sin embargo se sugieren estudios futuros para determinar la composición química y morfología del corion, la importancia en la protección de los embriones y su relación con el intercambio del petróleo al embrión, así como la evaluación de los efectos del petróleo en etapas posteriores y diagnosticas si los efectos cardíacos en los eleutero-embriones son permanentes o transitorios.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



12. Referencias

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107-123. DOI: 10.1016/j.ejpe.2015.03.011
- Aguilera, C., Mendoza, R., Rodríguez, G., & Márquez, G. (2002). Morphological description of alligator gar and tropical gar larvae, with an emphasis on growth indicators. *Transactions of the American Fisheries Society*, 131(5), 899-909, DOI: 10.1577 / 1548-8659 (2002) 131 <0899: MDOAGA> 2.0.CO; 2
- Aguilera, C., Mendoza, R., Iracheta, I., & Marquez, G. (2012). Digestive enzymatic activity on Tropical gar (*Atractosteus tropicus*) larvae fed different diets. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(3), 679-691, DOI: 10.1007 / s10695-011-9550-8
- Anderson, B. S., Arenella-Parkerson, D., Phillips, B. M., Tjeerdema, R. S., & Crane, D. (2009). Preliminary investigation of the effects of dispersed Prudhoe Bay Crude Oil on developing topsmelt embryos, *Atherinops affinis*. *Environmental Pollution*, 157(3), 1058-1061, DOI: 10.1016 / j.envpol.2008.10.013
- Arias-Rodríguez, L., Páramo-Delgadillo, S., Contreras-Sánchez, W. M., & Álvarez-González, C. A. (2009). Cariotipo del pejelagarto tropical *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae) y variación cromosómica en sus larvas y adultos. *Revista de Biología Tropical*, 57(3), 529-539, https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442009000300007
- Bakkers, J. (2011). Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovascular Research*, 91(2), 279-288, DOI: doi.org/10.1093/cvr/cvr098
- Barrientos-Villalobos, J., & Espinosa de los Monteros, A. (2008). Genetic variation and recent population history of the tropical gar *Atractosteus tropicus* Gill



- (Pisces: Lepisosteidae). *Journal of Fish Biology*, 73(8), 1919-1936, DOI: doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01993.x
- Bosker, T., van Balen, L., Walsh, B., Sepúlveda, M. S., De Guise, S., Perkins, C., & Griffitt, R. J. (2017). The combined effect of Macondo oil and corexit on sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) during early development. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(9), 477-484. DOI: 10.1080/15287394.2017.1340208
- Brette, F., Machado, B., Cros, C., Incardona, J. P., Scholz, N. L., & Block, B. A. (2014). Crude oil impairs cardiac excitation-contraction coupling in fish. *Science*, 343(6172), 772-776. DOI: 10.1126 / science.1242747
- Burggren, W. W. (2013). Cardiovascular development and angiogenesis in the early vertebrate embryo. *Cardiovascular Engineering and Technology*, 4(3), 234-245, DOI: 10.1007/s13239-013-0118-x
- Burggren, W. W., Bautista, G. M., Coop, S. C., Couturier, G. M., Delgadillo, S. P., García, R. M., & González, C. A. A. (2016). Developmental cardiorespiratory physiology of the air-breathing tropical gar, *Atractosteus tropicus*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 311(4), R689-R701. .DOI: 10.1152/ajpregu.00022.2016
- Burggren, W. W., Dubansky, B., & Bautista, N. M. (2017). Cardiovascular development in embryonic and larval fishes. In *Fish Physiology*. 36,107-184). Academic Press.
- Carls, M. G., Rice, S. D., & Hose, J. E. (1999). Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(3), 481-493. DOI: 10.1002/etc.5620180317



- Cherr, G. N., Fairbairn, E., & Whitehead, A. (2017). Impacts of petroleum-derived pollutants on fish development. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5, 185-203. DOI: 10.1146/annurev-animal-022516-022928
- Comte, L., Buisson, L., Daufresne, M., & Grenouillet, G. (2013). Climate-induced changes in the distribution of freshwater fish: observed and predicted trends. *Freshwater Biology*, 58(4), 625-639, DOI: doi.org/10.1111/fwb.12081
- De Soysa, T. Y., Ulrich, A., Friedrich, T., Pite, D., Compton, S. L., Ok, D. & Lagdameo, M. C. (2012). Macondo crude oil from the Deepwater Horizon oil spill disrupts specific developmental processes during zebrafish embryogenesis. *BMC Biology*, 10(1), 1-25. DOI: 10.1186/1741-7007-10-40
- Eddy F.B., Handy R.D. (2012) *Ecological and Environmental ecology of fishes*, 1st Edition Oxford University Press. United Kingdom. 264 pp
- Edmunds, R. C., Gill, J. A., Baldwin, D. H., Linbo, T. L., French, B. L., Brown, T. L. & Benetti, D. (2015). Corresponding morphological and molecular indicators of crude oil toxicity to the developing hearts of mahi mahi. *Scientific Reports*, 5, 17326. DOI: 10.1038/srep17326
- Escalera-Vázquez, L. H., Domínguez-Domínguez, O., Molina-Domínguez, E., Sarma, S. S. S. & Nandini, S. (2018). Determination of optimal prey for rearing the Tropical Gar *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae). *Revista de Biología Tropical*, 66(3), 1018-1033, DOI: 10.15517 / RBT.V66I3.30670
- Faria, M., Bedrossiantz, J., Prats, E., Garcia, X. R., Gómez-Canela, C., Piña, B., & Raldúa, D. (2019). Deciphering the mode of action of pollutants impairing the fish larvae escape response with the vibrational startle response assay. *Science of the Total Environment*, 672, 121-128. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.469
- Finn, R. N., & Kapoor, B. G. (2008). *Fish larval physiology*. Enfield, NH: Science Publishers.



- Frías-Quintana, C. A., Álvarez-González, C. A., & Márquez-Couturier, G. Design of microdiets for the larviculture of tropical gar *Atractosteus tropicus*, Gill 1863. *Universidad y Ciencia*, 26(3), 265-282, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792010000300006
- Frías-Quintana, C. A., Domínguez-Lorenzo, J., Álvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., & Martínez-García, R. (2016). Using cornstarch in microparticulate diets for larvicultured tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2), 517-528, DOI: 10.1007/s10695-015-0156-4
- Frías-Quintana, C. A., Álvarez-González, C. A., Tovar-Ramírez, D., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Peña, E., & Galaviz, M. A. (2017). Use of potato starch in diets of tropical gar (*Atractosteus tropicus*, Gill 1863) larvae. *Fishes*, 2(1), 3, DOI: 10.3390 / peces2010003
- Froese, R. (2006). Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(4), 241-253. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x
- Guerrero-Zárate, R., Álvarez-González, C. A., Olvera-Novoa, M. A., Perales-García, N., Frías-Quintana, C. A., Martínez-García, R., & Contreras-Sánchez, W. M. (2014). Partial characterization of digestive proteases in tropical gar *Atractosteus tropicus* juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(4), 1021-1029, DOI: 10.1007 / s10695-013-9902-7
- Guerrero-Zárate, R., Álvarez-González, C. A., Jesus-Contreras, R., Peña-Marín, E. S., Martínez-García, R., Galaviz, M. A., & Llera-Herrera, R. (2019). Evaluation of carbohydrate/lipid ratios on growth and metabolic response in tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juvenile. *Aquaculture Research*, 50(7), 1812-1823, DOI: doi.org/10.1111/are.14060



- Hansen, B. H., Sørensen, L., Carvalho, P. A., Meier, S., Booth, A. M., Altin, D., & Nordtug, T. (2018). Adhesion of mechanically and chemically dispersed crude oil droplets to eggs of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Science of the Total Environment*, 640-641, 138-143. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.207
- Hatlen, K., Sloan, C. A., Burrows, D. G., Collier, T. K., Scholz, N. L., & Incardona, J. P. (2010). Natural sunlight and residual fuel oils are an acutely lethal combination for fish embryos. *Aquatic Toxicology*, 99(1), 56-64, DOI: doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.002
- Hicken, C. E., Linbo, T. L., Baldwin, D. H., Willis, M. L., Myers, M. S., Holland, L., & Incardona, J. P. (2011). Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17), 7086–7090. DOI: 10.1073/pnas.1019031108
- Hodson, P. V. (2017). The toxicity to fish embryos of PAH in crude and refined oils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(1), 12-18. DOI: 10.1007/s00244-016-0357-6
- Huerta-Ortiz, M., Álvarez-González, C. A., Civera-Cerecedo, R., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Goytortúa-Bores, E., & Pérez-Morales, A. (2018). Optimum level of dietary lipids for growth, chemical composition and apparent digestibility of lipids for *Atractosteus tropicus*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46(5), 1073-1082, DOI: dx.doi.org/10.3856/vol46-issue5-fulltext-19
- Icardo, M., & Colvee, E. (2011). The atrioventricular region of the teleost heart. A distinct heart segment. *The Anatomical Record*, 294(2), 236–242, DOI: 10.1002 / ar.21320
- Incardona, J. P., Collier, T. K., & Scholz, N. L. (2004). Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic



- aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196(2), 191–205. DOI: 10.1016/j.taap.2003.11.026
- Incardona, J. P., Vines, C. A., Anulacion, B. F., Baldwin, D. H., Day, H. L., French, B. L., & Sloan, C. A. (2012). Unexpectedly high mortality in Pacific herring embryos exposed to the 2007 Cosco Busan oil spill in San Francisco Bay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2), E51-E58. DOI: 10.1073/pnas.1108884109
- Incardona, J. P., Swarts, T. L., Edmunds, R. C., Linbo, T. L., Aquilina-Beck, A., Sloan, C. A., & Scholz, N. L. (2013). Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. *Aquatic Toxicology*, 142–143, 303–316. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.08.011
- Incardona, J. P., Gardner, L. D., Linbo, T. L., Brown, T. L., Esbaugh, A. J., Mager, E. M., & Tagal, M. (2014). Deepwater Horizon crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(15), E1510-E1518, DOI: 10.1073 / pnas.1320950111
- Incardona, J. P., & Scholz, N. L. (2016). The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. *Aquatic Toxicology*, 177, 515–525, DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.06.016
- Jesús-De la Cruz, K.d.M., Ávila-Fernández, Á., & Peña-Marín. Trypsin gene expression in adults and larvae of tropical gar *Atractosteus tropicus*. *Fish Physiol Biochem* 46, 145–155, DOI:doi.org/10.1007/s10695-019-00704-8
- Jiménez-Martínez, L. D., Álvarez-González, C. A., De la Cruz-Hernández, E., Tovar-Ramírez, D., Galaviz, M. A., Camarillo-Coop, S., & Peña, E. (2019). Partial sequence characterization and ontogenetic expression of genes involved in lipid metabolism in the tropical gar (*Atractosteus tropicus*). *Aquaculture Research*, 50(1), 162-172, DOI: doi.org/10.1111/are.14603
- Jiménez-Martínez, L. D., Tovar-Ramírez, D., Álvarez-González, C. A., Peña-Marín, E., Camarillo-Coop, S., Martínez-García, R., & Concha-Frías, B. (2020).



- Assessment of dietary lipid sources in tropical gar, *Atractosteus tropicus* larvae: Growth parameters and intermediary lipogenic gene expression. *Aquaculture Research*, 51(7), 2629-2640, DOI: doi.org/10.1111/are.14603
- Khursigara, A. J., Perrichon, P., Martinez Bautista, N., Burggren, W. W., & Esbaugh, A. J. (2017). Cardiac function and survival are affected by crude oil in larval red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Science of the Total Environment*. 579, 797-804 DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.11.026
- Li, X., Ding, G., Xiong, Y., Ma, X., Fan, Y., & Xiong, D. (2018). Toxicity of water-accommodated fractions (WAF), chemically enhanced WAF (CEWAF) of Oman crude oil and dispersant to early-life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 101(3), 314-319. DOI: 10.1007/s00128-018-2413-6
- Mantyka-Pringle, C. S., Martin, T. G., Moffatt, D. B., Linke, S., & Rhodes, J. R. (2014). Understanding and predicting the combined effects of climate change and land-use change on freshwater macroinvertebrates and fish. *Journal of Applied Ecology*, 51(3), 572-581, DOI: doi.org/10.1111/1365-2664.12236
- Márquez-Couturier, G., Vazquez-Navarrete, C. J., Contreras-Sanchez, W. M., & Álvarez González, C. A. (2013). *Acuicultura Tropical Sustentable: Una estrategia para la producción y conservación del pejelagarto (Atractosteus tropicus) en Tabasco, México*. Universidad Juárez Autónoma de tabasco, Villahermosa, Tabasco.
- Martínez-Cárdenas, L., Hernández-Cortez, M. I., Espinosa-Chaurand, D., Castañeda-Chavez, M. R., León-Fernández, A. E., Valdez Hernández, E. F., & Álvarez-González, C. A. (2020). Effect of stocking density on growth, survival and condition factor in tropical gar (*Atractosteus tropicus* Gill, 1863) juveniles. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 48(4), 570-577, DOI: doi.org/10.3856/vol48-issue4-fulltext-2452



- Meador, J. P., Yeh, A., & Gallagher, E. P. (2018). Adverse metabolic effects in fish exposed to contaminants of emerging concern in the field and laboratory. *Environmental Pollution*, 236, 850-861, DOI: doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.007
- Meador, J. P., & Nahrgang, J. (2019). Characterizing crude oil toxicity to early-life stage fish based on a complex mixture: are we making unsupported assumptions. *Environmental Science and Technology*, 53(19), 11080-11092. DOI: 10.1021/acs.est.9b02889
- Méndez-Marin, O., Hernández Franyutti, A. A., Álvarez-González, C. A., Contreras-Sánchez, W. M., & Uribe Aranzábal, M. C. (2012). Histología del ciclo reproductor de hembras del pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae) en Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical*, 60(4), 1857-1871, DOI 10.15517/RBT.V60I4.2186
- Méndez-Marin, O., Franyutti, A. A. H., Álvarez-González, C. A., Uribe, M. C., & Contreras-Sánchez, W. M. (2016). Permanent germinal epithelium and reproductive cycle of *Atractosteus tropicus* (Lepisosteiformes: Lepisosteidae) males, Tabasco, Mexico. *Revista de biología tropical*, 64(4), 1597-1609, DOI:10.15517 / RBT.V64I4.21123
- Miller, R. R., Minckley, W. L., Norris, S. M., & Schmitter Soto, J. J. (2009). Peces dulceacuícolas de México. Retrieved from <http://www.biodiversidad.gob.mx/pdf/libros/paguadulceA.pdf> <http://www.biodiversidad.gob.mx/pdf/libros/paguadulceB.pdf> <http://www.biodiversidad.gob.mx/pdf/libros/paguadulceC.pdf> <http://www.biodiversidad.gob.mx/pdf/libros/PaguadulceD.pdf>
- Mora-Jamett, M., Cabrera-Peña, J., & Galeano, G. (1997). Reproducción y alimentación del gaspar *Atractosteus tropicus* (Pisces: Lepisosteidae) en el refugio nacional de vida Silvestre Caño Negro, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 45(2), 861-866.



https://tropicalstudies.org/rbt/attachments/volumes/vol452/11_Mora_Atractosteus_tropicus.pdf

- Morris, J. M., Gielazyn, M., Krasnec, M. O., Takeshita, R., Forth, H. P., Labenia, J. S., & Scholz, N. L. (2018). Crude oil cardiotoxicity to red drum embryos is independent of oil dispersion energy. *Chemosphere*, 213, 205-214. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.015
- Nájera-Arzola, I. C., Álvarez-González, C. A., Frías-Quintana, C. A., Peña, E., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., & Gisbert, E. (2018). Evaluación de oligosacáridos de manano (MOS) en dietas balanceadas para juveniles de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). *Hidrobiológica*, 28(3), 239-246, DOI: doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2018v28n3/Pena
- Nelson, D., Stieglitz, J. D., Cox, G. K., Heuer, R. M., Benetti, D. D., Grosell, M., & Crossley II, D. A. (2017). Cardio-respiratory function during exercise in the cobia, *Rachycentron canadum*: The impact of crude oil exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 201, 58-65, DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.08.006
- Nieves-Rodríguez, K. N., Álvarez-González, C. A., Peña-Marín, E. S., Vega-Villasante, F., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., & Gisbert, E. (2018). Effect of β -glucans in diets on growth, survival, digestive enzyme activity, and immune system and intestinal barrier gene expression for tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juveniles. *Fishes*, 3(3), 27, DOI: doi.org/10.3390/fishes3030027
- Omar-Ali, A., Hohn, C., Allen, P. J., Rodriguez, J., & Petrie-Hanson, L. (2015). Tissue PAH, blood cell and tissue changes following exposure to water accommodated fractions of crude oil in alligator gar, *Atractosteus spatula*. *Marine Environmental Research*, 108, 33-44, DOI: doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.04.011



- O'Shaughnessy, K. A., Forth, H., Takeshita, R., & Chesney, E. J. (2018). Toxicity of weathered Deepwater Horizon oil to bay anchovy (*Anchoa mitchilli*) embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 473-479, DOI: doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.052
- Palma-Cancino, D. J., Martínez-García, R., Álvarez-González, C. A., Camarillo-Coop, S., & Peña-Ma, E. S. (2019). Evaluation of feeding strategies in tropical gar (*Atractosteus tropicus* Gill) larvae: growth, survival and cannibalism. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6(17), 273-281, DOI: doi.org/10.19136/era.a6n17.2092 .
- Pasparakis, C., Mager, E. M., Stieglitz, J. D., Benetti, D., & Grosell, M. (2016). Effects of Deepwater Horizon crude oil exposure, temperature and developmental stage on oxygen consumption of embryonic and larval mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *Aquatic Toxicology*, 181, 113–123. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.10.022
- Perrichon, P., Le Menach, K., Akcha, F., Cachot, J., Budzinski, H., & Bustamante, P. (2016). Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel approach. *Science of the Total Environment*, 568, 952-966. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.186
- Perrichon, P., Grosell, M., & Burggren, W. W. (2017). Heart Performance Determination by Visualization in Larval Fishes: Influence of Alternative Models for Heart Shape and Volume. *Frontiers in Physiology*, 8, 1–10. DOI: 10.3389/fphys.2017.00464
- Pollino, C. A., & Holdway, D. A. (2002). Toxicity testing of crude oil and related compounds using early life stages of the crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52(3), 180-189, DOI: 10.1006 / eesa.2002.2190



- Raimondo, S., Jackson, C. R., Krzykwa, J., Hemmer, B. L., Awkerman, J. A., & Barron, M. G. (2014). Developmental toxicity of Louisiana crude oil-spiked sediment to zebrafish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108, 265-272. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.07.020
- Raimondo, S., Hemmer, B. L., Lilavois, C. R., Krzykwa, J., Almario, A., Awkerman, J. A., & Barron, M. G. (2016). Effects of Louisiana crude oil on the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) during a life-cycle exposure to laboratory oiled sediment. *Environmental Toxicology*, 31(11), 1627-1639. DOI: 10.1002/tox.22167
- Resendez Medina, A. (1981). Estudio de los peces de la Laguna de Términos, Campeche, México. II. Última parte. Biótica.
- Reséndez-Medina, A., & Salvadores, M. L. (1983). Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto *Atractosteus tropicus* (Gill) y la tenguayaca *Petenia splendida* Günther, del estado de Tabasco.
- Rodgers, M. L., Jones, E. R., Klinkhamer, C., Mahapatra, C. T., Serafin, J., Bosker, T., & Sepúlveda, M. S. (2018). Combined effects of Deepwater Horizon crude oil and environmental stressors on *Fundulus grandis* embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(7), 1916-1925. DOI: 10.1002/etc.4153
- Rudneva, I. (2013). Biomarkers for stress in fish embryos and larvae. CRC Press.
- Saenz de Rodrigáñez, M., Aguilar-Tellez, F. V., Alarcón-López, F. J., Pedrosa-Islas, R., Peña-Marín, E. S., Martínez-García, R., & Álvarez-González, C. A. (2018). Alimentos microencapsulados para el cultivo de larvas de pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). *Revista de Biología Tropical*, 66(3), 1298-1313, DOI: dx.doi.org/10.15517/rbt.v66i3.31727
- Sepúlveda-Quiroz, C. A., Peña-Marín, E. S., Pérez-Morales, A., Martínez-García, R., Alvarez-Villagomez, C. S., Maytorena-Verdugo, C. I., & Galaviz, M. Fructooligosaccharide supplementation in diets for tropical gar (*Atractosteus*



tropicus) juvenile: Effects on morphophysiology and intestinal barrier function. Aquaculture Research. DOI: doi.org/10.1111/are.14867

Scott, G. R., & Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, 68(4), 369-392. DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.03.016

Sørhus, E., Edvardsen, R. B., Karlsen, Ø., Nordtug, T., van der Meeren, T., Thorsen, A., & Meier, S. (2015). Unexpected interaction with dispersed crude oil droplets drives severe toxicity in atlantic haddock embryos. *PloS One*, 10(4), e0124376. DOI: 10.1371/journal.pone.0124376

Sørensen, L., Sørhus, E., Nordtug, T., Incardona, J. P., Linbo, T. L., Giovanetti, L., & Meier, S. (2017). Oil droplet fouling and differential toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in embryos of *Atlantic haddock* and cod. *PloS One*, 12(7), e0180048, DOI: 10.1371 / journal.pone.0180048

Tuomisto, J. T., Asikainen, A., Meriläinen, P., & Haapasaari, P. (2020). Health effects of nutrients and environmental pollutants in Baltic herring and salmon: a quantitative benefit-risk assessment. *BMC Public Health*, 20(1), 64. DOI: 10.1186/s12889-019-8094-1



13. Artículo científico

Cardiotoxicity and edema formation from crude oil exposure in the embryonic period of the tropical gar (*Atractosteus tropicus*)

Simrith E. Córdova-de la Cruz¹, Gil Martínez-Bautista¹, Emyr S. Peña-Marín¹³, Rafael Martínez-García¹, Gabriel Núñez-Nogueira¹, Randy H. Adams¹, Warren W. Burggren², Carlos Alfonso Alvarez-González^{1*}

¹División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, Mexico.

²Developmental Integrative Biology Group, Department of Biology, University of North Texas, Denton, Texas, USA.

¹³Cátedra CONACYT-UJAT, CDMX, México.

*Corresponding author: alvarez_alfonso@hotmail.com



Abstract

During their early development, fish species go through different physiological and morphological processes that promote organogenesis, growth, and survival. Environmental pollutants such as crude oil (anthropogenic or natural sources), causing alterations especially in cardiac function and morphology can affect fish development. Most such studies have focused on saltwater species, whereas studies in freshwater fishes are scant. The objective of the current study was to evaluate the effects of 48 h of crude oil exposure (as 0, 5, 10, 15, or 20% high-energy water accommodated fractions, HEWAF) on cardiac function and edema formation during the embryonic period of a tropical freshwater ancient fish, the tropical gar (*Atractosteus tropicus*). Embryos presented minor edemas after exposure, and no alterations in cardiac function were observed. In contrast, eleuteroembryos showed a positive relationship between increasing crude oil concentration and cardiac dysfunctions. Eleuteroembryos exhibited moderate to severe edemas, cardiac dysmorphia (tubular hearts), and decreased heart rate at high concentrations of HEWAF. This study indicates differential responses to HEWAF exposure in the early life stages on *A. tropicus*, with the eleuteroembryos being more sensitive to the exposure, having more damage to the cardiac function, and a high edema formation in the earliest embryonic stages.

Keywords: embryos, eleuteroembryos, *Atractosteus tropicus*, crude oil, HEWAF, cardiac function, edema.

Declarations

Ethics approval and consent to participate. Animals were handled in compliance with the Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 from Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, the Mexican standards for good welfare practices of laboratory animals.

Consent for publication. Not applicable.

Availability of data and materials. Not applicable.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests

Funding: No project funding.



Authors' Contributions: All authors contributed to the conception and design of this research. Material preparation, data collection and analysis were performed by SECC and GMB. SECC performed the experiments, analyzed data, interpreted results of experiments, prepared figures and tables, and drafted this manuscript. All authors edited previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements: To the National Council of Science and Technology in Mexico for the scholarship for the master's degree of Simrith Elizabeth Córdova de la Cruz. To the Remediation Laboratory of the Universidad Juárez Autónoma de Tabasco for providing the crude oil for this research. To the PII-SNI UJAT Program support to G N-N.

Introduction

Essential physiological and morphological processes for organogenesis, growth, and survival (Finn and Kapoor 2008) characterize early life stages of fish. During these periods, fish are susceptible to extrinsic or intrinsic factors, and survival depends on their biological performance and adaptation to the environment (Eddy and Handy 2012; Rudneva 2013). Environmental pollutants such as pesticides, herbicides, heavy metals, crude oil, among others, represent some of the factors that challenge fish as larvae (Scott and Sloman 2004; Burggren and Dubansky, 2018; Faria et al. 2019; Tuomisto et al. 2020). Crude oil has been extensively investigated in recent years due to its complex chemical composition and high impact on natural fish populations (Incardona et al. 2012; Hodson 2017; Rodgers et al. 2018; Meador and Nahrgang 2019). Among its components, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are toxic, mutagenic, and carcinogenic compounds (Abdel-Shafy and Mansour 2016) that have been listed as priority pollutants by the US Environmental Protection Agency (US-EPA). PAHs induce changes in the physiology and morphology of developing fish (Pasparakis et al. 2016; Cherr et al. 2017; Pasparakis et al. 2019), including alterations in the cardiovascular system (Incardona et al. 2004, 2013; Incardona and Scholz 2016; Li et al. 2018; Morris et al. 2018; Perrichon et al. 2018). For example, PAHs can block potassium channels, preventing cardiac repolarization, interruption of intracellular calcium in cardiomyocytes and, consequently, produce several deficiencies in cardiac function (decreased heartbeat frequency, stroke volume and cardiac output) as well as the fluid accumulation (edema) in the pericardium and yolk sac (Brette et al. 2014).



Embryos and larvae of the zebrafish (*Danio rerio*) exposed to crude oil extracts show alterations in cardiac function, such as severe arrhythmias, bradycardia, peripheral edema, vascular defects, changes in the shape of the heart and cardiac loop, spine deformation and intracranial hemorrhage (Hicken et al. 2011; De Soysa et al. 2012; Incardona et al. 2013; Bautista and Burggren, 2019; Johann et al. 2020). Embryos and larvae of the red drum (*Sciaenops ocellatus*) exposed to different concentrations of crude oil showed decreased cardiac function. High concentrations promoted strokes, a reduction in cardiac output by up to 70%, deformations of the skull and spine (lordosis and scoliosis) and formation of edemas (Khursigara et al. 2017). In larval cobia (*Rachycentron canadum*), heart rate increased 15%, and the stroke volume decreased by 35% compared to unexposed fish (Nelson et al. 2017). Additionally, Incardona et al. (2016) showed that embryos of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*), yellowfin tuna (*T. albacares*), yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*), and mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) exposed to oil exhibited defects in heart function, such as arrhythmias, pericardial edema, and secondary malformations.

Most studies of crude oil effects have been studied on either commercially important marine fishes (e.g. mahi mahi, red drum) or models such as the zebrafish. Unknown are the effects of crude oil on ancient freshwater fishes. Lepisosteids represent an order of ancient fishes with rapid embryonic and larval development, which makes them tractable models to study the early stages of air-breathing fishes (Burggren et al. 2016). The tropical gar (*Atractosteus tropicus*) is one of the seven extant species of Lepisosteids that occurs from southeast Mexico to Costa Rica (Miller et al. 2009). This species is capable of surviving in low oxygen and high temperature environments (Mora-Jamett et al. 1997). *Atractosteus tropicus* inhabits rivers, streams, lakes, and swamps with abundant vegetation and warm temperatures between 28° and 32°C (Aguilera et al. 2002). Additionally, this fish has ecological importance because it is a controlling organism of fish and amphibian populations (Reséndez 1981). Finally, *A. tropicus* has great commercial and cultural importance in the Southeast of Mexico as a food source due to its high nutritional values (Reséndez-Medina and Salvadores 1983), and recently, several aquaculture programs have been developed (Márquez-Couturier et al. 2015). However, this species also occurs in environments nearby crude oil extraction wells, pipelines, refineries and petrochemical processing plants, and the toxic effects of the environmental contamination have not been evaluated. For this reason,



the objective of this study was to determine the cardiotoxicity in embryos and eleuteroembryos of *A. tropicus* exposed to different concentrations of crude oil.

Material and methods

The embryos and eleuteroembryos of *A. tropicus* were obtained from an induced spawning at the Tropical Aquaculture Laboratory of the Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, Mexico. One female (3.5 Kg) was first anesthetized with clove oil and then injected with 1 mL Kg⁻¹ of gonadotropin-releasing hormone (GnRH, Sanfer). Subsequently, this female was kept in a 2000 L circular tank together with three adult males. Artificial grass was provided at the bottom of the tank for an egg laying substrate (Márquez et al. 2013). Immediately after fertilization, 300 eggs were collected for crude oil exposure. The remainder of the eggs were kept in the tank at 28°C, with a photoperiod of 12 h light - 12 h darkness and with constant aeration until hatching. Upon hatching, 300 eleuteroembryos were collected and exposed to different concentrations of high-energy water accommodated fractions (HEWAF) of heavy crude oil.

Preparation of High Energy Water Accommodation Fractions (HEWAF).

Heavy crude oil (17.5 °API, specific gravity at 60 °F = 0.95 g/ml) was obtained from well No. 851, in the Samaria Oil Field, Cunduacán Municipality, Tabasco, Mexico through the Remediation Laboratory of the Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. This crude oil was from a non-marine origin reservoir. High energy water accommodated fractions (HEWAF) were prepared according to the protocols described by Hatlen et al. (2010) and Incardona et al. (2013). Briefly, HEWAF preparation consisted of a mixture of 1 g of petroleum per litre of water, mixed in a commercial Turmix PD18 blender (fitted with a stainless-steel beaker and stirring blades) at ~ 15,000 rpm for 30 seconds. The mixture was then allowed to stand in a separatory funnel for one hour. For the experimental dilutions, the bottom 900 mL of the aqueous mixture in the funnel were used. This preparation was considered the stock solution (100% HEWAF) from which dilutions for the bioassays were immediately made.



Experimental design

Fortyeight hour HEWAF exposure for both embryos and eleuteroembryos was carried out in four dilutions of 5, 10, 15, and 20% from the stock HEWAF solution and a HEWAF-free treatment as control. Measurements were carried out in triplicate in 15- liter glass tanks (3 tanks per treatment) containing the appropriate HEWAF, concentrations and 20 individuals per replicate were utilized.

Assessment of cardiac function

Cardiac function (heart rate, stroke volume and cardiac output) was evaluated only in embryos of *Atractosteus tropicus* because increasing amounts of pigmentation in hatchlings limited clear heart visualization through the skin. Thus, only heart rate was calculated in eleuteroembryos.

Heart rate (fH). Embryos and eleuteroembryos were placed 148 in clear acrylic chambers (~2 cm diameter and ~ 2 cm depth) containing aerated water at 25 °C. Heart rate was calculated by observing cardiac movements through the body wall using a stereomicroscope (Stemi 305lab). Rate was measured in two periods of 15 sec, averaged, and multiplied by 4 to obtain heart rate in beats/min (after Burggren et al. 2016).

Stroke volume (SV). Stroke volume was calculated based on the prolate spheroid model described by Perrichon et al. (2017), where the volume of the ventricle at the end of systolic and diastolic events (3-5 events per individual) was determined from video sequences. To calculate the volume of the ventricle in each event, the formula $VS = (\pi / 6) (ab^2)$ was applied, where VS is the stroke volume, "a" represents the major axis, and "b" is the minor axis of the spheroid. Once the volume of each systolic and diastolic event was obtained, stroke volume ($\mu\text{L beat}^{-1}$) was calculated by subtracting systolic volume from diastolic volume.

Cardiac output (CO). Cardiac output (CO in $\mu\text{L min}^{-1}$) represents the total volume of blood pumped by the heart per minute, determined by multiplying fH x SV (Perrichon et al. 2017).



Morphological variables

Body mass (BM). Body mass was determined to the closest milligram using an analytical balance at the end of the bioassays.

Total length (LT). Total length of embryos and eleutheroembryos was calculated by a series of high definition photographs of the individuals in lateral position using a ruler as scale. LT was measured from the head to the tip of the notochord using software Image J version 1.5.

Fulton's condition factor (K). Fulton condition factor was calculated only for eleutheroembryos as $K = (W / L^3)$ (Froese 2006), where "W" is the weight, "L" is the total or notochordal length. Data were expressed as percent change. These data were utilized to classify edemas size in eleutheroembryos after 48 h of exposure to different HEWAF concentrations. The descriptive statistics of the data sets (obtained from a Microsoft Excel worksheet) allowed the determination of the number and width of intervals to classify the each eleutheroembryo as "no edema", "moderate edema" or "severe edema".

Statistical analysis

To evaluate the effect of crude oil on cardiac function, BM, LT, and K, a two-way ANOVA was performed for each variable, with age and HEWAF concentrations as factors. A Holm-Sidak multiple comparison test was then performed to denote differences between treatments. A multiple regression was carried out to determine the relationship of the condition factor with the mass and length of the fish and to evaluate whether edema size is correlated with BM or LT. All analyzes were performed in the software SigmaPlot 11.0 with a significance level $\alpha = 0.05$.

Results

Cardiac function

Embryonic heart rate increased significantly ($P < 0.001$) as a function of development in all HEWAF treatments, but there was no statistical difference ($P > 0.05$) between HEWAF treatments at a given time (Figure 1A). Stroke volume in embryos exhibited a slight but significant ($P < 0.001$) increase from 24 to 36 hpf in all HEWAF treatments, but by 48 hpf no differences were observed compared to the initial values (Figure 1B). Similar to fH, cardiac



output showed significant differences across development for all the treatments ($P < 0.001$) but not between different HEWAF exposures ($P > 0.05$; Figure 1C).

Heart rate in control eleutheroembryos remained similar at hatching and 24 hpf, but then significantly increased by 48 h ($P < 0.001$; Figure 2). In contrast, after 24 h of exposure, fH began decreasing in eleutheroembryos exposed for 48 h of 10%, 15% and 20% HEWAF ($P < 0.001$; Figure 2). By 48 hpf, eleutheroembryos from 5% and 10% HEWAF showed an increase in fH compared at hatching and 24 hpf. However, at 24 h fH was lower than the control group. The rest of the treatments exposed to HEWAF showed greater decreases ($P < 0.001$; Figure 2).

Morphological variables

Body mass (BM) increased across development for controls and for all HEWAF treatments ($P < 0.001$, Figure 3A). In eleutheroembryos, significant differences occurred at different stages ($P < 0.001$). Considering HEWAF treatment, only eleutheroembryos exposed to 20% HEWAF exhibited higher BM than the other treatments by 48 h ($P < 0.001$; Figure 3B).

Total length (LT) of embryos increased across development ($P < 0.001$) but there were no differences between treatments ($P > 0.05$; Figure 4A). In eleutheroembryos, LT increased across development for all the treatments ($P < 0.001$) and only by 48 hours did differences occur between treatments, where eleutheroembryos from 5% and 10% HEWAF showed lower LT than controls, with 15% and 20% HEWAF exhibiting the lowest LT ($P < 0.001$; Figure 4B).

Fulton condition factor (K) in eleutheroembryos varied across development ($P < 0.001$), showing greater variation between hatching and 48 hpf. Differences between treatments occurred at 48 hpf ($P < 0.001$), where eleutheroembryos exposed to 20% HEWAF had a higher K (Figure 5). Multiple regression showed that LT of the eleutheroembryos has a higher correlation with K than BM ($R = 0.837$, $R^2 = 0.700$, $\text{Adj } R^2 = 0.694$, $F = 112.166$, $DF = 1$, $P < 0.001$; $R = 0.678$, $R^2 = 0.460$, $\text{Adj } R^2 = 0.449$, $F = 40.925$, $DF = 1$, $P < 0.001$, respectively) where eleutheroembryos with lower LT values showed higher K values and severe edemas (Figure 6).



Based on the above calculations and the descriptive statistics of the data sets, K values from 48 hph were used to classify edema size (Figure 7) as follows: *no edema* (K= 0.149-0.298), *moderate edema* (K= 0.298-0.389), and *severe edema* (K= 0.389-0.547). Eleuteroembryos from the control treatment showed no edema, eleuteroembryos from 5% and 10% HEWAF exhibited no edema to moderate edema. The treatment with a greater number of edemas (either moderate or severe) were those exposed to 20% HEWAF (Figure 7).

Finally, morphological alterations occurred in eleuteroembryos exposed to the highest HEWAF concentration, characterized by body curvature and tubular hearts (Figure 7).

Discussion

Crude oil exposure during early development in fish alters their cardiovascular system, especially cardiac shape and function. These alterations manifest as tubular hearts, reduced cardiac output, and severe edema formation in the pericardium and yolk sac (Anderson et al. 2009; Incardona et al. 2013; Raimondo, et al. 2014; Khursigara et al. 2017; Perrichon et al., 2018; Johann et al. 2020). In the present study, embryos of *A. tropicus* did not show cardiotoxic effects after 48 h of exposure to HEWAF. The presence of small edemas in fish embryos has been related to the existence of oil drops adhering to the chorion covering the embryo. Previous studies suggest that the morphology and chemical composition of chorion controls oil droplet adhesion in fish eggs, creating a physical connection between the oil and the embryo (Sørhus et al. 2015; Hansen et al. 2018). However, more analyses are needed to understand the effects of crude oil on the morphology and composition of the eggs of *A. tropicus* and its role with the effects in the embryos, especially since hatchlings showed more significant impacts than embryos.

Eleuteroembryos of *A. tropicus* showed a decrease in fH when exposed to concentrations of the higher [HEWAF] (15%, 20%). This bradycardia was correlated with pericardial edema, as also described by Edmunds et al. (2015) and Perrichon et al. (2016), where the presence of fluid within the pericardium apparently causes organ dysfunction. Moreover, the resulting limitations of heart movement can lead to ischemia, loss of contractility, hematoma, ascites and gross morphology alterations such as the tubular heart (Weis and Weis 1974, 1997; Carney et al. 2006; Yang et al. 2009). While cardiac lesions in



A. tropicus eleutheroembryos serves as an indicator of their sensitivity to oil, its effects may be either permanent or transitory depending on the exposure time and dose.

There are few observations of alterations in body mass, length and growth in the very early developmental stages of fishes exposed to crude oil. Some of these alterations were observed in the Arctic cod *Boreogadus saiga*, such as decreased growth when exposed during embryonic development (Bender et al. 2018). However, some studies have focused on older stages of the same species, observing a reduction in growth during the first week post exposure in juvenile organisms (Laurel et al. 2019) and with dietary exposure of adults (Nahrgang et al. 2019). Moreover, some of these alterations are transitory rather than permanent.

In the current study, embryos and eleutheroembryos of *A. tropicus* showed a slight increase in BM across development. In tropical gar embryos, BM remains relatively constant due to the transfer of yolk to the developing tissues and organs (Burggren et al. 2016). However, in the present study differences in BM occurred after 48 h of exposure to high concentrations of HEWAF and those increases were related to the presence of edemas, especially in the eleutheroembryos. Additionally, our 271 study showed that eleutheroembryos exposed to high concentrations of HEWAF exhibited lower LT values at 48 hph, and this assumption can be related to morphological alterations promoted by the presence of edemas. Similar results were observed in eleutheroembryos of several marine fish species when exposed to oil (Søurs et al. 2015; Raimondo et al. 2016; Bosker et al. 2017).

The characterization of the size of the pericardial edemas using the Fulton condition factor (K) provides a key for understanding the organismal alterations (either morphological or cardiovascular) promoted by crude oil exposure and the relative body fluid accumulation. Embryos presented few edemas and showed no significant alterations in cardiac function or morphology. However, more extended periods of exposure or higher HEWAF concentrations can lead to alterations in embryonic survival and delayed/prevented hatching (Carls et al. 1999). In contrast, eleutheroembryos exposed to 10%-20% HEWAF showed moderate to severe edemas affecting the pericardial cavity and ventricular spaces. This apparently promoted alterations in cardiovascular morphology and function, consistent with previous studies (Froese 2006).



Although detailed morphological alterations were not directly evaluated in the present study, tubular hearts and curvature of the spine were observed in eleuteroembryos exposed to the highest 20% HEWAF concentration. Several studies have demonstrated that accumulation of body fluid in the organisms can cause jaw, head bone and spine deformation (Dzul-Caamal et al. 2016; Incardona et al. 2004; Jung et al. 2013). However, further studies are needed to understand the precise deformation mechanisms, its relationship with the mineralization processes and if these alterations are temporary or permanent.

The experimental results in the current study provide guidelines for studying unexplored processes in tropical freshwater fishes such as mechanisms of excretion of crude oil, its implications in respiratory responses and the recovery of cardiac function after exposure.

In conclusion, embryos of *A. tropicus* were relatively resistant, at least in the short term, to HEWAF exposure. Further studies are needed to understand the role of the chorion for protecting the embryos. However, eleuteroembryos of *A. tropicus* were relatively sensitive to all concentrations of HEWAF tested in this study, which damaged the cardiovascular system as promoted by the presence of moderate and severe edemas. This study shows that crude oil has a highly toxic effect on *A. tropicus* eleuteroembryos, 301 which could impact wild populations, particularly in the initial stages of development.

Acknowledgments

We thank the National Council of Science and Technology in Mexico for the scholarship for Simrith Elizabeth Córdova de la Cruz and the Remediation Laboratory of the Universidad Juárez Autónoma de Tabasco for providing the crude oil samples for this study. We also thank Programa Institucional para la Incorporación al Sistema Nacional de Investigadores UJAT Program support to Gabriel Núñez-Nogueira.

References

Abdel-Shafy HI, Mansour MS (2016) A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egypt J Pet 25(1): 107-123. Doi. 10.1016/j.ejpe.2015.03.011.



- Bender ML, Fratzen M, Camus L, Le Floch S, Palerud J, Nahrgang J. (2018) Effects of acute exposure to dispersed oil and burned oil residue on long-term survival, growth, and reproductive development in polar cod (*Boreogadus saida*). *Mar Environ Res* 148: 468-477. Doi. 10.1016/j.marenvres.2018.09.005.
- Aguilera C, Mendoza R, Rodríguez G, Márquez G (2002) Morphological description of alligator gar and tropical gar larvae, with an emphasis on growth indicators. *Trans Am Fish Soc* 131(5): 899-909. Doi. 10.1577/1548-8659(2002)131<0899:MDOAGA>2.0.CO;2.
- Anderson BS, Arenella-Parkerson D, Phillips BM, Tjeerdema RS, Crane D (2009) Preliminary investigation of the effects of dispersed Prudhoe Bay Crude Oil on developing top smelt embryos, *Atherinops affinis*. *Environ Pollut* 157(3): 1058-1061. Doi. 10.1016/j.envpol.2008.10.013.
- Bautista NM, Burggren WW. (2019) Parental stressor exposure simultaneously conveys both adaptive and maladaptive larval phenotypes through epigenetic inheritance in the zebrafish (*Danio rerio*). *J Exp Biol.* 222(17):jeb208918. Doi. 10.1242/jeb.208918
- Bosker T, van Balen L, Walsh B, Sepúlveda MS, DeGuise S, Perkins C, Griffitt RJ (2017) The combined effect of Macondo oil and corexit on sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) during early development. *J Toxicol Environ Health Part A* 80(9): 477-484. Doi. 10.1080/15287394.2017.1340208
- Brette F, Machado B, Cros C, Incardona JP, Scholz NL, Block BA (2014) Crude oil impairs cardiac excitation-contraction coupling in fish. *Science* 343(6172): 772-776. Doi.10.1126/science.1242747.
- Burggren WW, Bautista GM, Coop SC, Couturier GM, Delgadillo SP, García RM, González CAA (2016) Developmental cardiorespiratory physiology of the air-breathing tropical gar, *Atractosteus tropicus*. *Am J Physiol-Reg I* 311(4): R689-R701. Doi.10.1152/ajpregu.00022.2016.
- Burggren WW, Dubansky, B. (2018) *Development and Environment*. Springer, Cham, Switzerland. Carls MG, Rice SD, Hose JE (1999) Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Environ Toxicol Chem* 18(3): 481-493. Doi. 10.1002/etc.5620180317.



- Carney SA, Prash AL, Heideman W, Peterson RE (2006) Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish model. *Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol* 76: 7-18. Doi. 10.1002/BDRA.20216
- Cherr GN, Fairbairn E, Whitehead A (2017) Impacts of petroleum-derived pollutants on fish development. *Annu Rev Anim Biosci* 5: 185-203. Doi.10.1146/annurev-animal-022516-022928.
- De Soysa TY, Ulrich A, Friedrich T, Pite D, Compton SL, Ok D, Lagdameo MC (2012) Macondo crude oil from the Deepwater Horizon oil spill disrupts specific developmental processes during zebrafish embryogenesis. *BMC Biol* 10(1): 1-25. Doi. 10.1186/1741-7007-10-40.
- Dzul-Caamal R, Salazar-Coria L, Olivares-Rubio HF, Rocha-Gómez MA, Girón-Pérez MI, Vega-López A (2016) Oxidative stress response in the skin mucus layer of *Goodea gracilis* (Hubbs and Turner, 1939) exposed to crude oil: A non-invasive approach. *Comp Biochem Physiol A* 200: 9–20. Doi. 10.1016/j.cbpa.2016.05.008.
- Eddy FB, Handy RD (2012) *Ecological and environmental physiology of fishes*. 1st Edition Oxford University Press. United Kingdom. 264 pp. Doi. 10.1111/jfb.12106
- Edmunds RC, Gill JA, Baldwin DH, Linbo TL, French BL, 363 Brown TL, Benetti D (2015) Corresponding morphological and molecular indicators of crude oil toxicity to the developing hearts of *mahi mahi*. *Sci Rep* 5: 17326. Doi. 10.1038/srep17326.
- Faria M, Bedrossiantz J, Prats E, Garcia XR, Gómez-Canela C, Piña B, Raldúa D (2019). Deciphering the mode of action of pollutants impairing the fish larvae escape response with the vibrational startle response assay. *Sci Total Environ* 672: 121-128. Doi.10.1016/j.scitotenv.2019.03.469.
- Finn RN, Kapoor BG (2008) *Fish larval physiology*. Enfield, NH: Science Publishers. Doi.10.1086/650279.
- Froese R (2006) Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta analysis and recommendations. *J Appl Ichthyol* 22(4): 241-253. Doi. 10.1111/j.1439-0426.2006.00805.x.
- Hansen BH, Sørensen L, Carvalho PA, Meier S, Booth AM, Altin D, Nordtug T (2018) Adhesion of mechanically and chemically dispersed crude oil droplets to eggs of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *Sci Total Environ* 640: 138-143. Doi. 10.1016/j.scitotenv.2018.05.207.



- Hatlen K, Sloan CA, Burrows DG, Collier TK, Sholtz NL, Incadona JP (2010) Natural sunlight and residual fuel oils are an acutely lethal combination for fish embryos. *Aquat Toxicol* 99(1):56–64. Doi. 10.1016/j.aquatox.2010.04.002.
- Hicken CE, Linbo TL, Baldwin DH, Willis ML, Myers MS, Holland L, Incardona JP (2011) Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. *PNAS* 108(17): 7086–7090. Doi. 10.1073/pnas.1019031108.
- Hodson PV (2017) The toxicity to fish embryos of PAH in crude and refined oils. *Arch Environ Contam Toxicol* 73(1): 12-18. Doi. 10.1007/s00244-016-0357-6. Incardona JP, Collier TK, Scholz NL (2004) Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharm* 196(2): 191–205. Doi. 10.1016/j.taap.2003.11.026. Incardona JP, Vines CA, Anulacion BF, Baldwin DH, Day HL, French BL., Sloan CA (2012) Unexpectedly high mortality in Pacific herring embryos exposed to the 2007 Cosco Busan oil spill in San Francisco Bay. *PNAS* 109(2): E51-E58. Doi. 10.1073/pnas.1108884109.
- Incardona JP, Swarts TL, Edmunds RC, Linbo TL, Aquilina-394 Beck A, Sloan CA, Scholz NL (2013) Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. *Aquat Toxicol* 142–143, 303–316. Doi.10.1016/j.aquatox.2013.08.011.
- Incardona JP, Scholz NL (2016) The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. *Aquat Toxicol* 177: 515–525. Doi. 10.1016/j.aquatox.2016.06.016.
- Johann S, Nüßer L, Goßen M, Hollert H, Seiler TB (2020) Differences in biomarker and behavioral responses to native and chemically dispersed crude and refined fossil oils in zebrafish early life stages. *Sci Total Environ* 709: 136174. DOI: Doi.10.1016/j.scitotenv.2019.136174.
- Jung JH, Hicken CE, Boyd D, Anulacion BF, Carls MG, Shim WJ, Incardona JP (2013) Geologically distinct crude oils cause a common cardiotoxicity syndrome in developing zebrafish. *Chemosphere* 91(8): 1146–1155. Doi. 10.1016/j.chemosphere.2013.01.019. Khursigara AJ, Perrichon P, Martinez-Bautista



- N, Burggren WW, Esbaugh AJ (2017) Cardiac function and survival are affected by crude oil in larval red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Sci Total Environ* 579: 797-804. Doi. 10.1016/j.scitotenv.2016.11.026.
- Laurel BJ, Copeman LA, Iseri P, Spencer ML, Hutchinson G, Nordtug T, Donald CE, Meier S, Allan SE, Boyd DT, Ylitalo GM, Cameron JR, French BL, Linbo TL, Scholz NL, Incardona P. (2019). Embryonic crude oil exposure impairs growth and lipid allocation in a keystone Arctic forage fish. *iScience* 19: 1101-1113. Doi. 10.1016/j.isci.2019.08.051. Li X, Ding G, Xiong Y, Ma X, Fan Y, Xiong D (2018) Toxicity of water-accommodated fractions (WAF), chemically enhanced WAF (CEWAF) of Oman crude oil and dispersant to early-life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *B Environ Contam Toxicol* 101(3): 314-319. Doi. 10.1007/s00128-018-2413-6.
- Márquez-Couturier G, Vazquez-Navarrete CJ, Contreras-Sanchez WM, Álvarez-González CA (2013) Acuicultura Tropical Sustentable: Una estrategia para la producción y conservación del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*) en Tabasco, México. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco.
- Meador JP, Nahrgang J (2019) Characterizing crude oil toxicity to 423 early-life stage fish based on a complex mixture: are we making unsupported assumptions? *Environ Science Technol* 53(19): 11080-11092. Doi. 10.1021/acs.est.9b02889.
- Miller RR, Minckley WL, Norris SM, Schmitter Soto JJ (2009) Freshwater fishes of Mexico. Chicago: University of Chicago Press. Doi. 10.1086/509452?journalCode=qrb.
- Mora-Jamett M, Cabrera-Peña J, Galeano G (1997) Reproducción y alimentación del Gaspar *Atractosteus tropicus* (Pisces: Lepisosteidae) en el refugio nacional de vida Silvestre Caño Negro, Costa Rica. *Rev Biol Trop* 45(2): 861-866 <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/20891>.
- Morris JM, Gielazyn M, Krasnec MO, Takeshita R, Forth HP, Labenia JS, Scholz NL (2018) Crude oil cardiotoxicity to red drum embryos is independent of oil dispersion energy. *Chemosphere* 213: 205-214. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.015. Doi.10.1016/j.chemosphere.2018.09.015.



- Nahrgang J, Bender ML, Meier S, Nechev J, Berge J, Frantzen M. (2019) Growth and metabolism of adult polar cod (*Boreogadus saida*) in response to dietary crude oil. *Ecotox Environ Safe* 180: 53-62. Doi. 10.1046/j.1467-2979.2003.00120.x.
- Nelson D, Stieglitz JD, Cox GK, Heuer RM, Benetti DD, Grosell M, Crossley II DA (2017) Cardio-respiratory function during exercise in the cobia, *Rachycentron canadum*: The impact of crude oil exposure. *Comp Biochem Phys C* 201: 58-65. Doi.10.1016/j.cbpc.2017.08.006.
- Pasparakis C, Mager EM, Stieglitz JD, Benetti D, Grosell M (2016) Effects of Deepwater Horizon crude oil exposure, temperature and developmental stage on oxygen consumption of embryonic and larval mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *Aquat Toxicol* 181: 113–123. Doi. 10.1016/j.aquatox.2016.10.022.
- Pasparakis, C., Grosell, M., Esbaugh, A., Burggren, W.W. Physiological impacts of DeepWater Horizon oil on fish. *Comparative Physiology and Biochemistry. Part C. Toxicology and Pharmacology*. 224:108558. Doi. 10.1016/j.cbpc.2019.06.002.
- Perrichon P, Le Menach K, Akcha F, Cachot J, Budzinski H, Bustamante P (2016) Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel approach. *Sci Total Environ* 568:952-966. Doi. 10.1016/j.scitotenv.2016.04.186.
- Perrichon P, Mager EM, Pasparakis C, et al. Combined 454 effects of elevated temperature and Deepwater Horizon oil exposure on the cardiac performance of larval mahi-mahi, *Coryphaena hippurus*. *PLoS One*. 2018;13(10): e0203949. Doi.10.1371/journal.pone.0203949
- Perrichon P., Grosell M, Burggren W (2017). Heart performance determination by visualization in larval fishes: Influence of alternative models for heart shape and volume. *Front Physiol* 8: 464. Doi. 10.3389/fphys.2017.00464.
- Raimondo S, Jackson CR, Krzykwa J, Hemmer BL, Awkerman JA, Barron MG (2014) Developmental toxicity of Louisiana crude oil-spiked sediment to zebrafish. *Ecotox Environ Safe* 108: 265-272. Doi. 10.1016/j.ecoenv.2014.07.020.
- Raimondo S, Hemmer BL, Lilavois CR, Krzykwa J, Almario A, Awkerman JA, Barron MG (2016) Effects of Louisiana crude oil on the sheepshead minnow (*Cyprinodon*



- variegatus*) during a life-cycle exposure to laboratory oiled sediment. *Environ Toxicol* 31(11): 1627- 1639. Doi. 10.1002/tox.22167.
- Reséndez AM (1981) Estudio de los peces de la Laguna de Términos, Campeche, México. II. Última parte. *Biótica*
- Reséndez-Medina A, Salvadores ML (1983) Contribución al conocimiento de la biología del pejelagarto *Lepisosteus tropicus* (Gill) y la tenguayaca *Petenia splendida* Günther, del estado de Tabasco. 8: 413-426. <https://eurekamag.com/research/020/774/020774436.php>. Rodgers ML, Jones ER, Klinkhamer C, Mahapatra CT, Serafin J, Bosker T, Sepúlveda MS (2018) Combined effects of Deepwater Horizon crude oil and environmental stressors on *Fundulus grandis* embryos. *Environ Toxicol Chem* 37(7): 1916-1925. Doi.10.1002/etc.4153.
- Rudneva I (2013) Biomarkers for stress in fish embryos and larvae. CRC Press. Doi.10.1201/b15378.
- Scott GR, Sloman KA (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat Toxicol* 68(4): 369-392. Doi. 10.1016/j.aquatox.2004.03.016 Sloan CA, Brown DW, Pearce RW, Boyer RH, Bolton JL, Burrows DG, Herman DP, Krahn MM (2005) Determining aromatic hydrocarbons and chlorinated hydrocarbons in sediments and tissues using accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry In. *Techniques in Aquatic Toxicology*. Ostrander GK (Ed), vol. 2, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 631-651. Doi.10.1201/9780203501597.CH35.
- Sørhus E, Edvardsen RB, Karlsen Ø, Nordtug T, van der Meeren T, Thorsen A, Meier S (2015) Unexpected interaction with dispersed crude oil droplets drives severe toxicity in Atlantic haddock embryos. *PloS One*, 10(4): e0124376. Doi.10.1371/journal.pone.0124376.
- Tuomisto JT, Asikainen A, Meriläinen P, Haapasaari P (2020) Health effects of nutrients and environmental pollutants in Baltic herring and salmon: a quantitative benefit-risk assessment. *BMC Public Health* 20(1): 64. Doi. 10.1186/s12889-019-8094-1.
- Weis P, Weis JS (1974) Cardiac-malformation and other effects due to insecticides in embryos of killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Teratology* 10: 263-267. Doi.10.1002/tera.1420100308.



Weis P, Weis JS (1977) Methylmercury teratogenesis in killifish, *Fundulus heteroclitus*.
Teratology 16: 317-325. Doi. 10.1002/tera.1420160311. Yang L, Ho NY, Alshut R,
Legradi J, Weiss C, Reischl M, Mikut R, Liebel U, Mueller F, Strahle U (2009)
Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals.
Reprod Toxicol 28: 245-253. Doi. 10.1016/j.reprotox.2009.04.013.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



Figure legends

Figure 1. Cardiac function in embryonic *A. tropicus* from fertilization to 48 hpf. A) heart rate, B) stroke volume, and C) cardiac output. Mean values \pm standard error are plotted. $n=20$ embryos per treatment. Capital letters indicate significant differences across development ($P < 0.001$).

Figure 2. Heart rate of larval *A. tropicus* at hatching, 24 and 48 hph. Mean values \pm standard error are plotted. $n=20$ eleutheroembryos per treatment. Capital letters indicate significant differences within time ($P < 0.001$). Lowercase letters show differences between treatments at a given time ($P < 0.001$).

Figure 3. Body mass (BM) of A) embryos and B) eleutheroembryos of *Atractosteus tropicus* through 48 h of exposure to HEWAF. Mean values \pm standard error are plotted. $n=20$ individuals per treatment. Capital letters exhibit significant differences within a developmental time ($P < 0.001$). Lower case letters denote significant differences within treatments at a given time ($P < 0.001$).

Figure 4. Total length (LT) of A) embryos and B) eleutheroembryos of *Atractosteus tropicus* through 48 h of exposure to HEWAF. Mean values \pm standard error are plotted. $n=20$ individuals per treatment. Capital letters indicate significant differences within a developmental time ($P < 0.001$). Lower case letters denote significant differences within treatments at a given time in development ($P < 0.001$).

Figure 5. Fulton's condition factor (K) for larval *A. tropicus* through 48 h of exposure to HEWAF. Mean values \pm standard error are plotted. $n=20$ individuals per treatment. Capital Letters denote significant differences within a developmental time ($P: < 0.001$). Lowercase letters, when present, denote significant differences within treatments at a given time in development ($P < 0.001$).

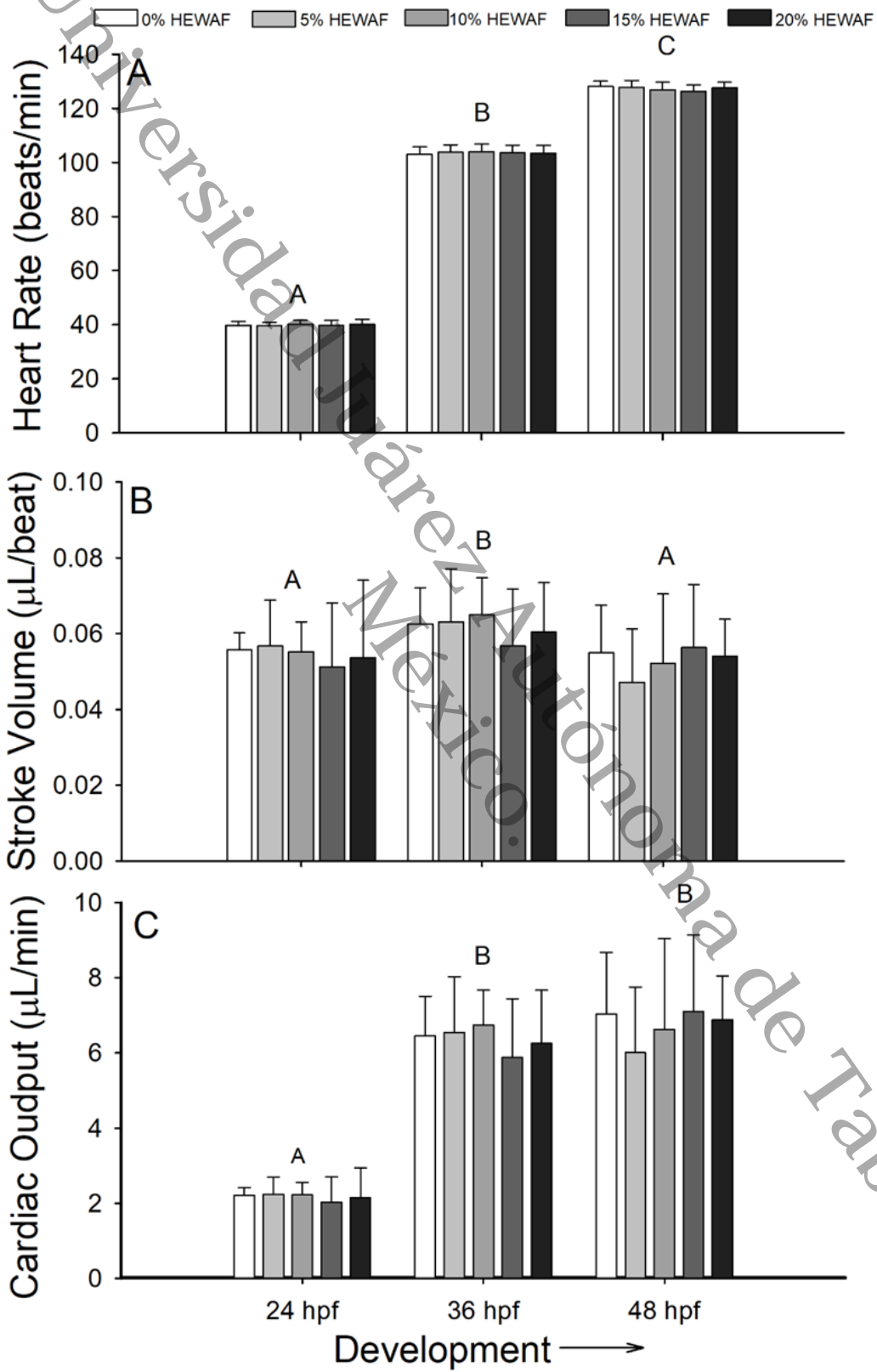


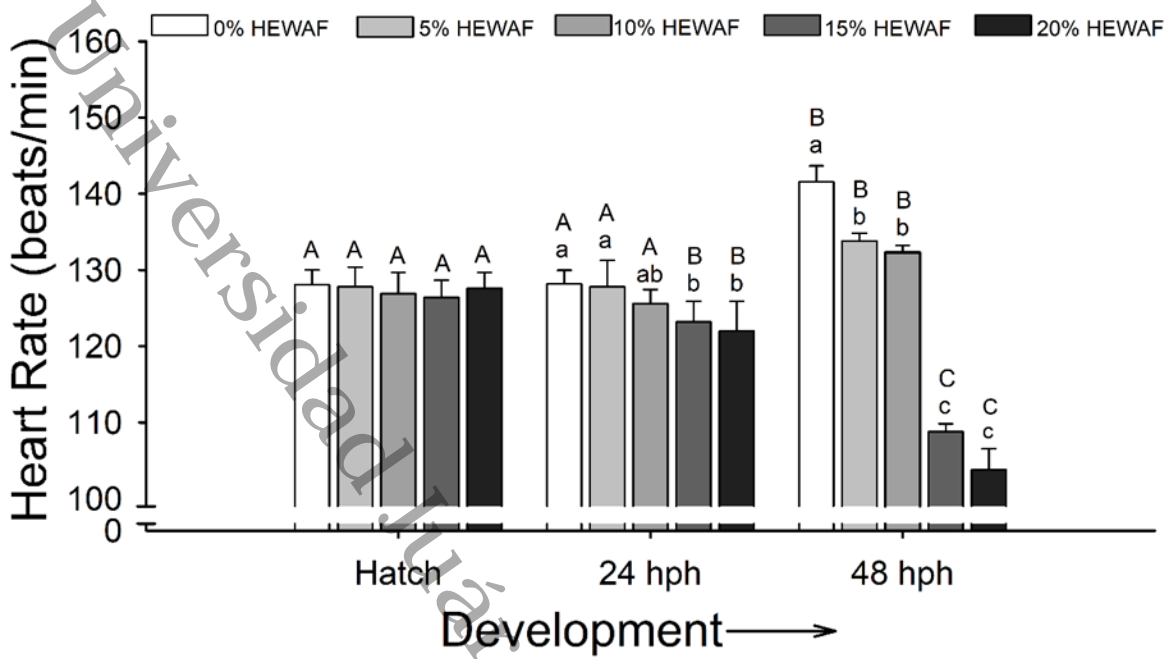
Figure 6. Multiple regression between Fulton's condition factor (K) against body mass and total length in *A. tropicus* eleutheroembryos. Note the higher correlation for total length. n= 50 individuals.

Figure 7. Classification of the size of the edemas based on Fulton's condition factor in eleutheroembryos of *A. tropicus* at 48 hours of exposure to HEWAF. The percentage of individuals is shown according to the absence of edema, moderate edema, and severe edema in each treatment. Arrows show liquid accumulation. See text for details. n= 10 eleutheroembryos per treatment.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

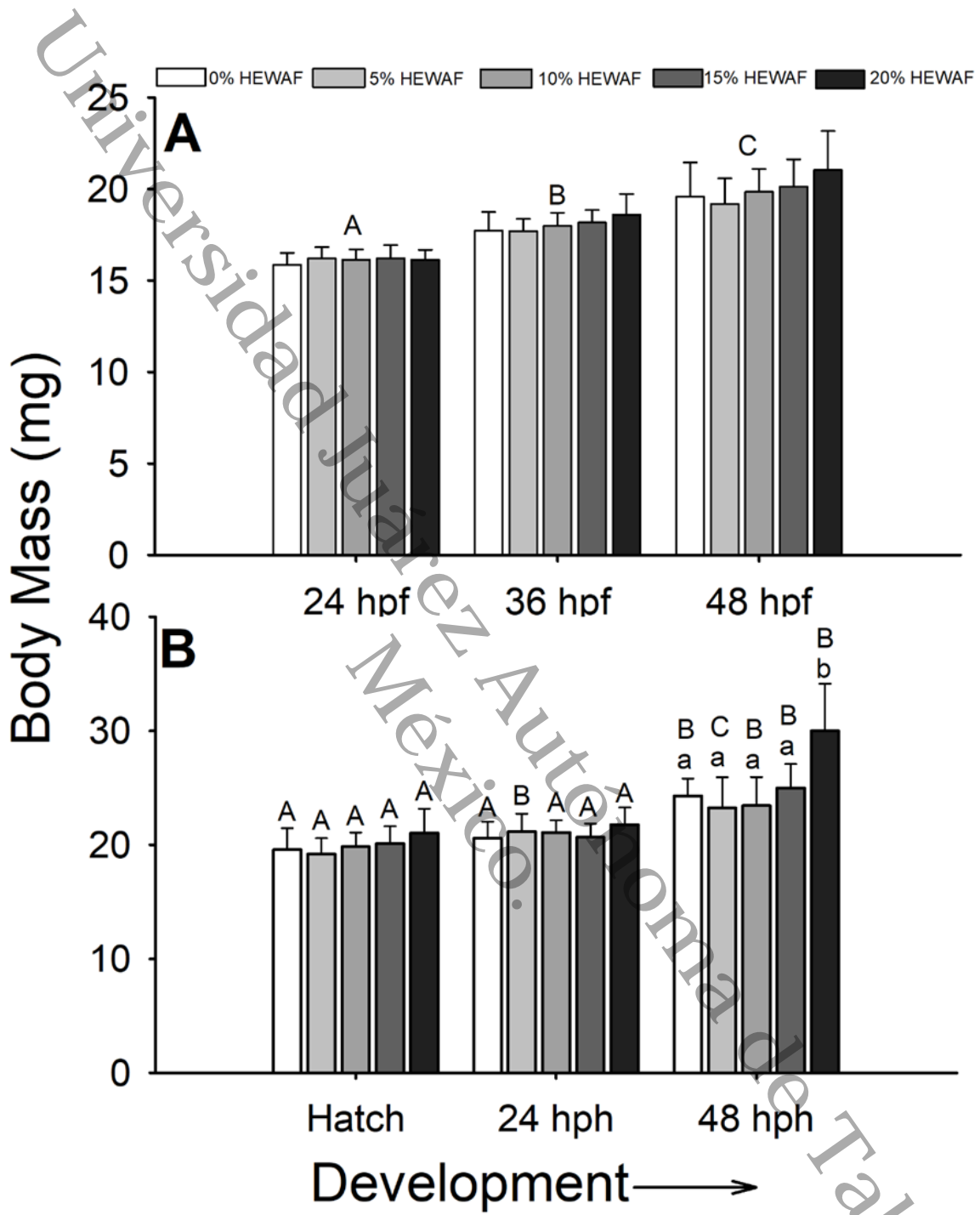




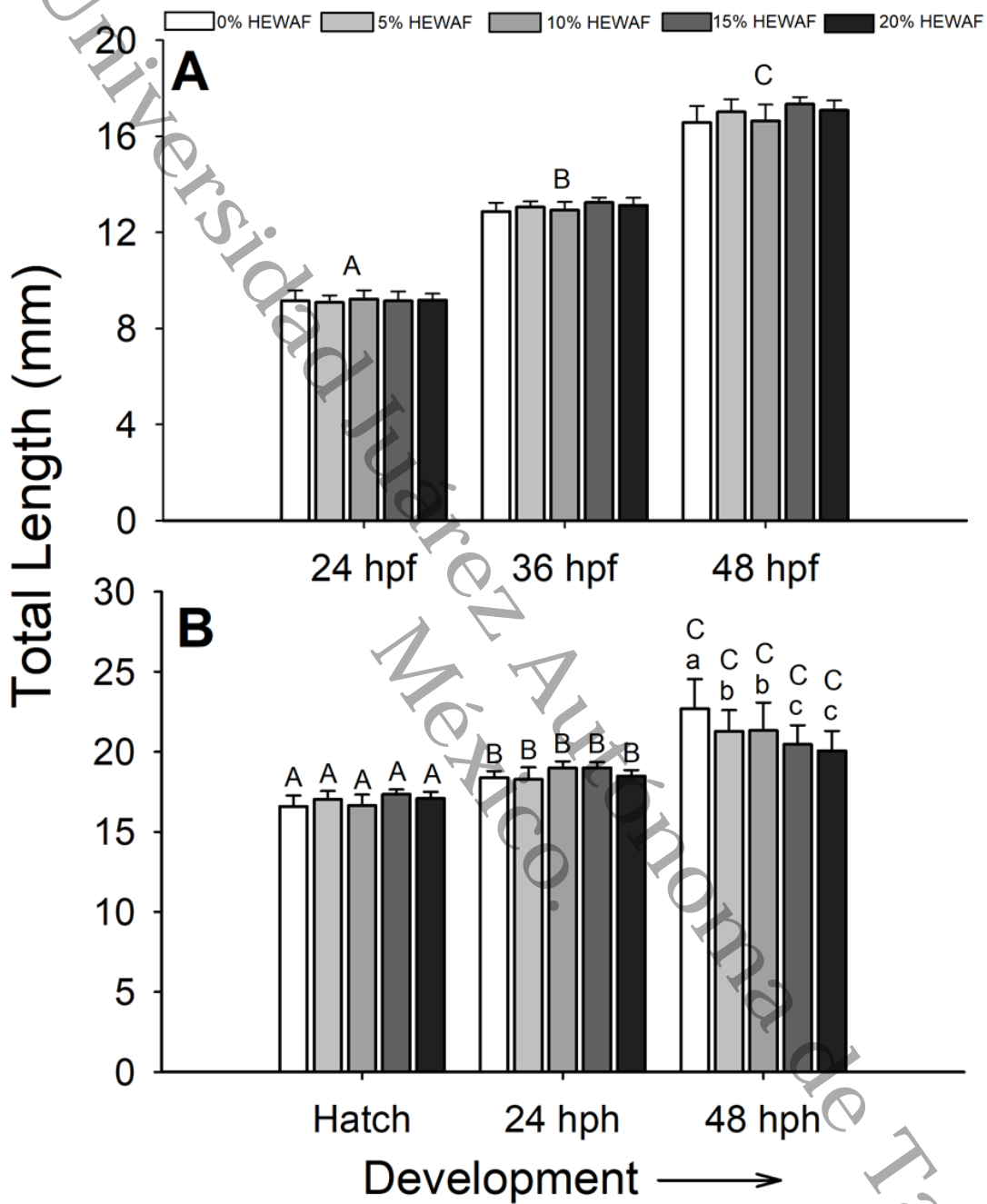


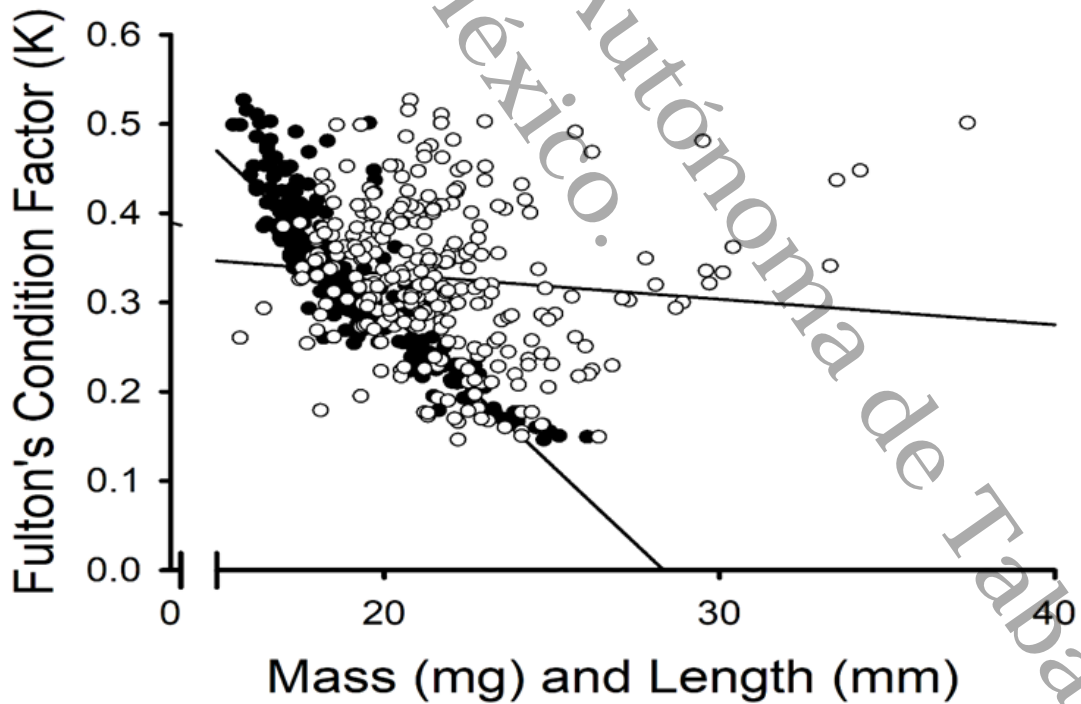
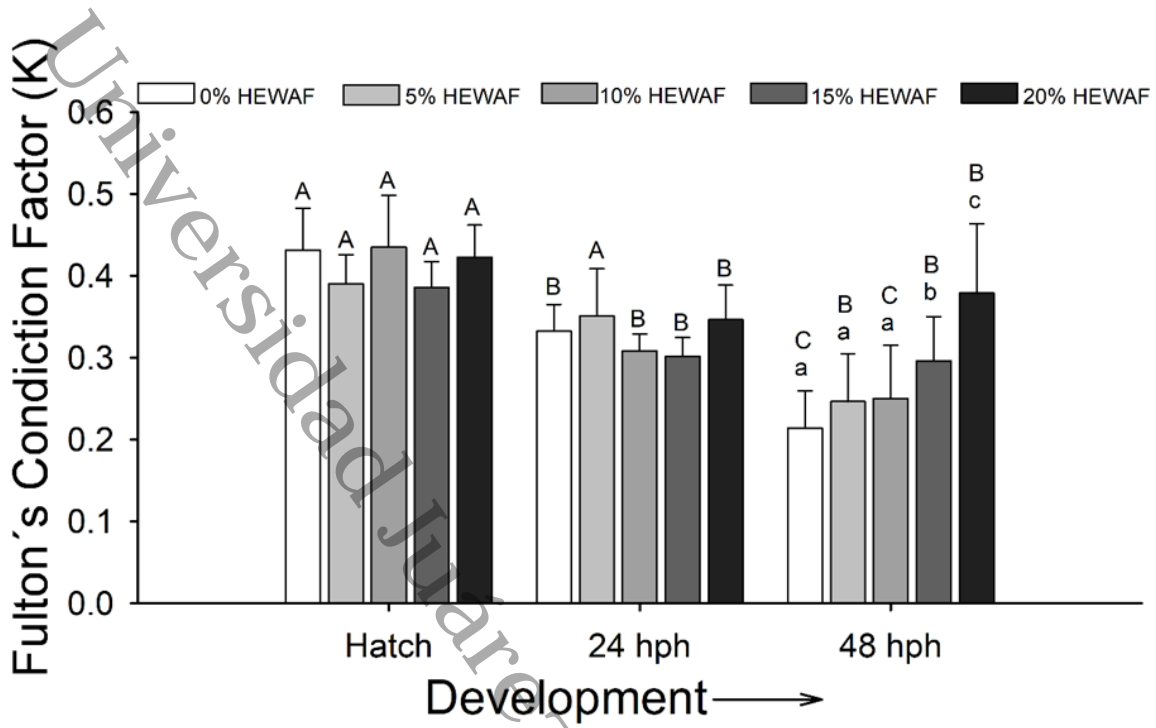
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.





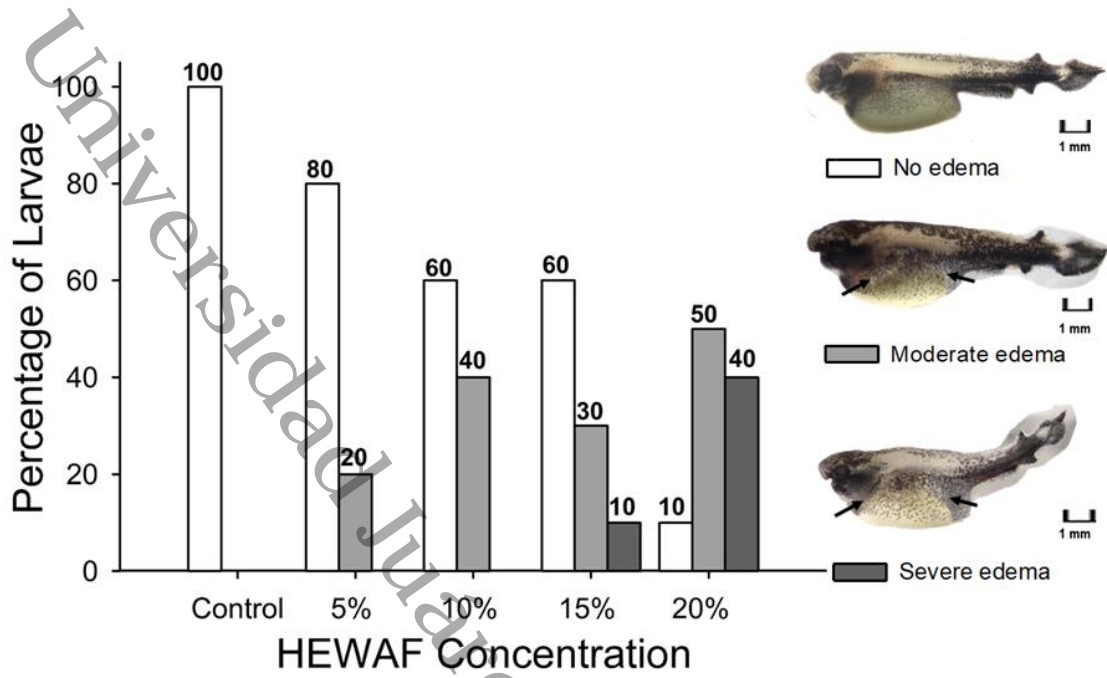
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.





- Length (mm) vs K ($R=0.89$; $R^2=0.79$; $DF=1$, $F=1122.25$, $P<0.001$)
- Mass (mg) vs K ($R=0.10$, $R^2=0.01$; $DF=1$; $F=3.059$, $P=0.081$)
- Plot Regression





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.