



SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE Y  
RECURSOS NATURALES



#### PROYECTO TC0904.1

**Implementación y validación de la prueba de Toxicidad aguda con peces y desarrollo de la metodología preliminar para observar el daño genético en los peces, a través de la reacción en Cadena de las Polimerasas (PCR), así como implementación de metodologías por Cromatografía de Gases para Compuestos Orgánicos y Disruptores Endócrinos. Volumen uno.**

**M. C. Ana María Sandoval Villasana  
Biól. Homero Hernández Salgado  
Biól. Fabricio Raciél Cervantes Dacasa  
TL. Reyna Yannet Nájera Zamora**

**2009**

## INDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Contaminación del agua.....	1
1.2 Importancia de la ecotoxicología .....	1
1.2.1 Evaluación de riesgo.....	2
1.3 Bioensayos de toxicidad y de genotoxicidad .....	4
1.3.1 Toxicidad aguda .....	4
1.3.2 Toxicidad crónica.....	4
1.4 Carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis .....	5
1.5. Importancia de la temperatura en estudios de toxicidad acuática.....	7
1.6. Características fisicoquímicas del EDTA.....	7
1.7 Usos .....	8
1.8 Efectos toxicológicos.....	8
1.9. Bioindicadores, bioensayos y biomarcadores .....	9
1.10. Bioensayos con peces .....	9
1.11. Biología del pez cebrá ( <i>Danio rerio</i> Hamilton, 1822).....	10
1.11.1. Características generales .....	10
1.12. Importancia del <i>Danio rerio</i> en estudios de ecotoxicología .....	11
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>13</b>
<b>4. META</b> .....	<b>13</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>14</b>
<b>5.1 CONDICIONES DE INFRAESTRUCTURA ÓPTIMAS PARA EL DESARROLLO DEL</b> <b>    ÁREA DE PECES</b> .....	<b>14</b>
<b>5.2. CULTIVO DEL PEZ <i>Danio rerio</i> EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA SERVICIOS</b> .....	<b>16</b>
5.2.1. Aislamiento y selección de peces.....	16
5.2.2. Mantenimiento de los lotes experimentales.....	17
5.2.3. Lotes reproductivos .....	18
5.2.4. Diferentes etapas del desarrollo del pez <i>Danio rerio</i> .....	23
<b>5.3. PROCEDIMIENTO</b> .....	<b>24</b>
5.3.1 Selección de tóxicos de referencia .....	24
5.3.2. Método de prueba .....	24
5.3.2.1. Antecedentes .....	24
5.3.2.2. Objetivo.....	24

5.3.2.3. Principio.....	24
5.3.2.4. Intervalo de análisis o límite de prueba.....	24
5.3.2.5. Información necesaria sobre la sustancia química a analizar.....	25
5.3.2.6. Validez de la prueba.....	25
5.3.3. Descripción del método.....	25
5.3.3.1. Material y equipo.....	25
5.3.3.2. Agua.....	25
5.3.4 Soluciones stock.....	26
5.3.5. Selección de la especie de ensayo.....	27
5.3.6. Aclimatación.....	27
5.3.7. Edad y tamaño de los peces de prueba.....	27
5.3.8 Temperatura.....	28
5.3.9 Alimentación.....	28
5.3.10 Realización de la prueba.....	28
5.3.10.1. Duración.....	28
5.3.10.2. Controles.....	28
5.3.10.3. Introducción de los peces.....	28
5.3.10.4. Número de organismos de prueba.....	28
5.3.10.5. Réplicas.....	28
5.3.10.6. Cámaras de prueba.....	29
5.3.10.7. Luz.....	29
5.3.10.8. Temperatura.....	29
5.3.10.9. Alimentación.....	29
5.3.10.10. Perturbaciones.....	29
5.3.11. Concentraciones de prueba.....	29
5.3.12. Observaciones.....	30
5.3.13. Datos y presentación de informes.....	30
5.3.14. Informe de la prueba.....	30
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
6.1 Validación de la prueba.....	32
6.2 Curvas de toxicidad.....	32
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>36</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estudio multidisciplinario de ecotoxicología (Medicina y Encina, 2000). .....	2
Figura 2. Relación entre riesgo y toxicidad (Weil, 1975).....	3
Figura 3. Etapas en la evaluación de riesgo (Bristol <i>et al.</i> , 1984). .....	4
Figura 4. Relación entre agente químico, exposición y posibles daños (Vega 1990a y b) .....	5
Figura 5. Molécula del EDTA .....	8
Figura 6. Pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	10
Figura 7. Filtros para generar el agua requerida por los peces. ....	14
Figura 8. Vista del laboratorio de peces en el área de Toxicología Servicios. ....	15
Figura 9. Cámaras de fecundación. ....	15
Figura 10. Vista de la separación de lotes de peces reproductivos (hembras y machos).....	16
Figura 11. Dimorfismo sexual de <i>Danio rerio</i> . ....	17
Figura 12. Peceras para fecundación. ....	19
Figura 13. Vista de las canastillas con refractario en el fondo para recibir los huevecillos. ....	19
Figura 14. Los huevos viables son aquellos que muestran una transparencia completa. ....	20
Figura 15. Vaso de precipitado conteniendo los huevecillos en solución de acriflavina. ....	21
Figura 16. Vaso de precipitado conteniendo los huevecillos de <i>Danio rerio</i> . ....	21
Figura 17. Cámara adaptada especialmente para la eclosión, cuenta con termostato para mantener temperatura de $26 \pm 2$ °C.....	22
Figura 18. Vista en estereoscopio 40X del estadio alevin de <i>Danio rerio</i> . ....	22

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características toxicológicas de los carcinógenos, mutágenos y teratógenos (Vega, 1990b).....	6
Tabla 2. Empleo del pez <i>Danio rerio</i> en estudios de experimentación. ....	11
Tabla 3. Condiciones físicas y químicas recomendadas para el mantenimiento adecuado de <i>Danio rerio</i> .....	18
Tabla 4. Resultados de la mortalidad de "alevines" expuestos a la solución de EDTA. ....	32
Tabla 5. Promedio de CL <sub>50</sub> y sus límites de confianza (95%).....	33

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva dosis-respuesta con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en alevines del pez <i>Danio rerio</i> .....	33
Gráfica 2. Gráfico control .....	34

## RESUMEN

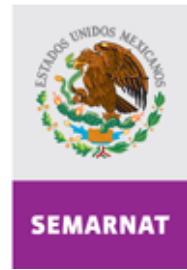
Las normas actuales para los vertidos de efluentes industriales y municipales en los cuerpos receptores se basan en el establecimiento de límites máximos de contaminantes que se consideran muy dañinos para los ecosistemas. Sin embargo, la mayor parte de los efluentes son de carácter complejo e introducen una gran cantidad y diversidad de sustancias químicas en los cuerpos receptores, muchas de ellas desconocidas, que pueden adquirir efectos sinérgicos al interactuar con otras sustancias presentes en los cuerpos de agua y causar un impacto mayor al que provocarían por sí solas. Los efectos ecotoxicológicos adversos inducidos pueden ser agudos o crónicos y pueden ocurrir en todos los niveles de organización biológica, desde el molecular hasta el de ecosistemas. Entre ellos se encuentran cambios en la cantidad de energía celular, alteraciones fisiológicas relacionadas con el estrés de inducción, reducción del crecimiento, deterioro de la reproducción y, en última instancia, los efectos sobre el ecosistema. Para comprender plenamente esta secuencia de efectos en los sistemas acuáticos, la investigación debería centrarse en la integración de diferentes aspectos ecotoxicológicos, de mecanismos moleculares de la acción tóxica sobre el proceso fisiológico y ecológico. Una estrategia para investigar los posibles efectos adversos y los modos de acción toxicológica después de una exposición y/o para evaluar la contaminación de productos químicos (metales pesados, compuestos orgánicos sintéticos y compuestos estrogénicos), es el uso de bioensayos, además de las mediciones químicas. Los métodos de toxicidad evalúan el efecto total de un efluente complejo o su impacto potencial sobre los cuerpos de agua. Debido a que los efluentes son la principal fuente de entrada directa y continua de los contaminantes a los ecosistemas acuáticos, el estudio de los efectos de la exposición de efluentes en los organismos tiene un interés ecológico (Ausley, 2000). El desarrollo y aplicación de metodologías de toxicidad es una parte importante de la ecotoxicología aplicada en los últimos años.

El laboratorio de calidad del agua del IMTA cuenta con el Área de Toxicología Servicios, en la cual se efectúan diversas pruebas con procedimientos normalizados a nivel nacional e internacional o procedimientos propios, validados en el laboratorio, generando resultados confiables de alta calidad, con la finalidad de prestar servicios cuyos resultados permitan la toma de decisiones sobre la problemática ambiental.

Las pruebas de toxicidad aguda que actualmente se realizan en el Área de Toxicología Servicios emplean bacterias bioluminiscentes (*Vibrio fischeri*) y cladóceros (*Daphnia magna*); para las pruebas de toxicidad subcrónica se emplea un alga unicelular (*Pseudokirchneriella subcapitata*) y para la prueba de genotoxicidad se utiliza *Salmonella typhimurium* (bacteria modificada por ingeniería genética). Con la implementación y validación de la prueba de toxicidad aguda utilizando el pez *Danio rerio* como indicador, el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua incrementará su capacidad de análisis.



SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE Y  
RECURSOS NATURALES



Se menciona también el procedimiento preliminar para la realización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual permitiría detectar cualquier daño genético que afecte a organismos de sangre fría, con relativa rapidez. Esta prueba tiene múltiples aplicaciones tanto para ciencia básica como aplicada, y debe considerarse que con la situación actual se requiere dar respuestas rápidas a la toma de decisiones.

En este contexto, el Área de Toxicología Servicios del IMTA puede ofrecer estas pruebas como herramientas de análisis de toxicidad en varios niveles (toxicidad aguda, crónica, genotóxica) para identificar el efecto causado por sustancias tóxicas en los cuerpos de agua, efluentes, descargas industriales, descargas municipales y de plantas de tratamiento. Las características y los efectos de los efluentes industriales son muy variables y deben ser identificadas de forma independiente. El uso de los bioensayos permite identificar a las industrias que están descargando a los cuerpos de agua agentes tóxicos, inclusive en el caso de que cumplan con los requisitos establecidos en la normatividad vigente.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Contaminación del agua

El rápido incremento de la población, la industrialización urbana y la intensificación de los cultivos, ha ocasionado un crisis mundial de este recurso haciendo responsables a las grandes ciudades como las principales fuentes contaminadoras, debido a que después de utilizarla la eliminan en forma de aguas negras, las cuales después se mezclan con las corrientes naturales hasta llegar a los océanos (GEO, 2000). En algunos casos, la introducción de contaminantes está relacionada con la lluvia, la naturaleza geológica de la cuenca y la erosión; esta última arrastra los contaminantes hasta los cuerpos de agua receptores. También suele suceder que los mantos acuíferos atraviesan zonas donde existen yacimientos de metales o sustancias sulfurosas (contaminación natural), sin embargo, la forma más común de contaminación de los mantos acuíferos ocurre por filtración, a través del suelo, de sustancias provenientes de drenajes sanitarios o por lixiviados originados en basureros los cuales, además, adicionan una elevada cantidad de materia orgánica e inorgánica (Vogel y Rivas, 1997).

Los mantos acuíferos son vulnerables a la contaminación ocasionada por microorganismos como: bacterias y protozoos (biológica), los cuales pueden causar algunas enfermedades como: tifoidea, cólera, disentería, hepatitis infecciosa o amibiasis, entre otras, haciendo que cada día mueran a nivel mundial, cerca de 25 000 personas como resultado de una pobre calidad del agua.

### 1.2 Importancia de la ecotoxicología

En los últimos años se ha desarrollado la ecotoxicología, la cual se enfoca al estudio multidisciplinario del origen, distribución y efectos de un agente contaminante sobre los organismos vivos, sus poblaciones y sus comunidades (Jorgensen, 1998 y Woolley, 2003) empleando métodos toxicológicos, químicos y ecológicos para describir la interacción entre agentes contaminantes, organismos y ecosistemas (Figura 1).

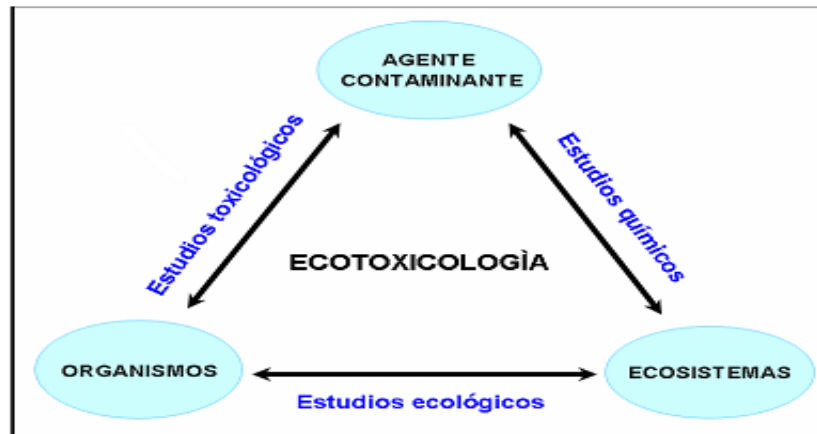


Figura 1. Estudio multidisciplinario de ecotoxicología (Medicina y Encina, 2000).

En la ecotoxicología se caracteriza el agente contaminante, se identifica su origen, su concentración, su cinética y sus consecuencias, tanto a nivel individual como ecológico (Vera *et al.*, 2001).

### 1.2.1 Evaluación de riesgo

Para evitar una crisis del ambiente es necesario establecer metodologías que permitan evaluar el riesgo que conlleva el empleo de agentes contaminantes, con la finalidad de impedir que se produzcan nuevos cambios que puedan dañar los ecosistemas (Martínez, 1996).

En 1978 la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió “riesgo” como un concepto estadístico, diciendo que es la frecuencia esperada de un efecto nocivo producido por la disposición a un agente. Rodrick *et al.* en 1992 definen “evaluación de riesgo” como el proceso mediante el cual son identificadas y evaluadas las propiedades tóxicas de una sustancia; considerando que la toxicidad de una sustancia está relacionada con la vía de introducción al organismo, sus propiedades individuales y la dosis (Figura 2), por consiguiente, el riesgo depende de cómo se usa, manipula y fabrica una sustancia (Weil, 1975).

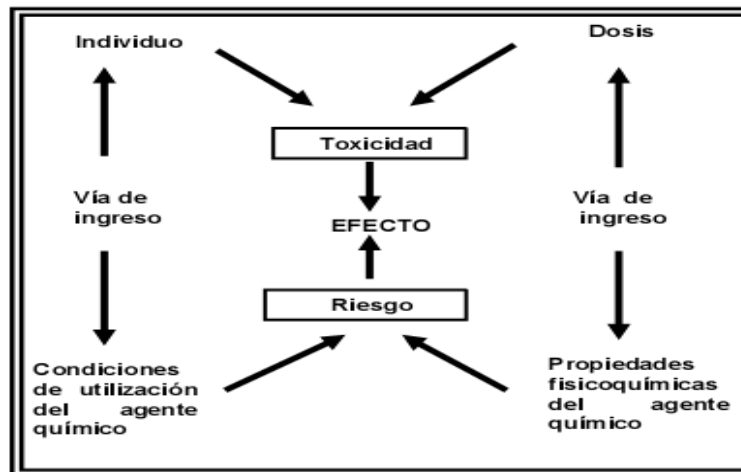


Figura 2. Relación entre riesgo y toxicidad (Weil, 1975).

La evaluación de riesgo, considera hechos verdaderos, los cuales definen los efectos ocasionados en la salud de los organismos o materiales expuestos a situaciones o sustancias peligrosas. Los siguientes pasos tratan de identificar las relaciones existentes entre agentes peligrosos, individuos o poblaciones expuestas, dosis, concentración, tiempo, biodisponibilidad, susceptibilidad biológica y daño biológico:

#### 1.- Identificación del peligro

Es el proceso en el cual se determina si la exposición a un agente puede producir un aumento en la incidencia de un efecto, el principal objetivo es demostrar que el agente induce un efecto adverso en la salud.

#### 2.- Evaluación dosis-respuesta

En ella se caracteriza la relación entre la dosis administrada de un agente químico y la incidencia de efecto adverso en la población expuesta, considerando la intensidad de la exposición, la época de la exposición, sexo, estilo de vida, metabolismo y otros factores que pueden afectar la respuesta.

#### 3.- Evaluación de la exposición

Es el proceso de medida o estimación de la intensidad, frecuencia y duración de la exposición a un agente presente en el medio ambiente.

#### 4.- Identificación del riesgo

Proceso para estimar la incidencia de los efectos sobre la salud bajo varias condiciones de exposición (NCR, 1983). La evaluación de riesgo requiere del conocimiento de las distintas fases del estudio toxicológico, el cual se divide en: identificación y cuantificación de la exposición, toxicocinética del compuesto y toxicodinámica (Bristol *et al.*, 1984) (Figura 3).

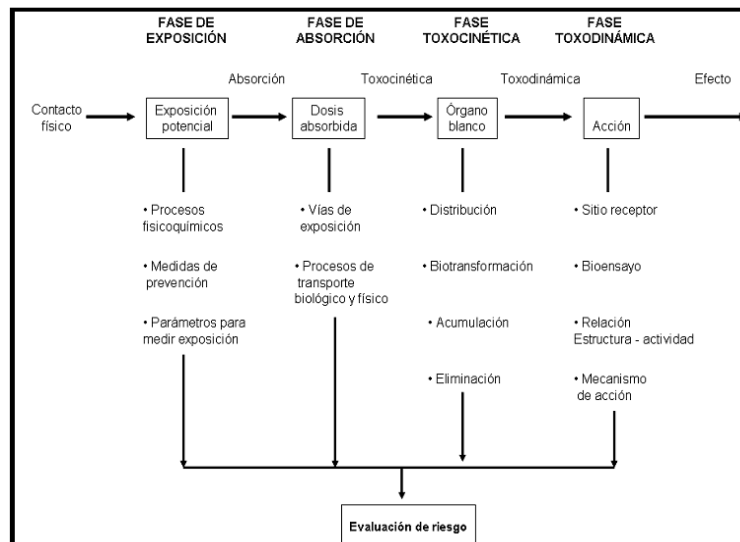


Figura 3. Etapas en la evaluación de riesgo (Bristol *et al.*, 1984).

### 1.3 Bioensayos de toxicidad y de genotoxicidad

#### 1.3.1 Toxicidad aguda

Son pruebas de uso frecuente, debido a su respuesta en corto tiempo. Son bioensayos que miden la capacidad de una sustancia de ejercer un efecto tóxico en un sistema biológico y se miden a través de mortandad (Vega, 1990b), sustentando estudios de exposiciones repetidas o accidentales (crónicas) que permiten identificar las manifestaciones clínicas y patológicas asociadas, así como la concentración letal cincuenta (CL<sub>50</sub>), empleada para estudios crónicos o subcrónicos posteriores (PNUMA y OMS, 1980; Vettorazzi, 1992 y Moreira, 1995).

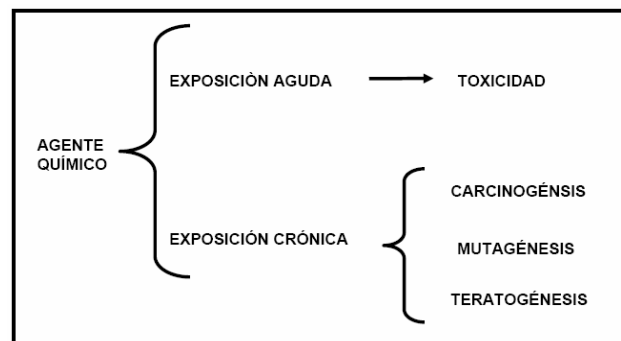
#### 1.3.2 Toxicidad crónica

Son estudios de larga duración que permiten evaluar efectos carcinogénicos y teratogénicos en lapsos de tiempo que van de meses hasta años, según el bioensayo empleado, y se llevan a cabo principalmente *in vivo* (Medina y Encina, 2003). Permiten la localización y caracterización de los efectos tóxicos que se manifiestan después de una exposición prolongada, incluyendo aquellas irreversibles y progresivos, determinan órganos con mayor susceptibilidad (órganos-blanco) o con mayor afinidad (órgano-afín) así como la relación dosis-respuesta según el bioensayo empleado (Vega, 1990b). La prueba toxicidad crónica permite obtener resultados de

efectos desde un nivel individual hasta el poblacional, como es el caso de sustancias químicas que tienden a persistir o concentrarse en el organismo o en el ambiente (PNUMA y OMS, 1980 y Vettorazzi, 1992).

#### 1.4 Carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis

Se han identificado suficientes evidencias epidemiológicas que permiten vincular el aumento en la frecuencia de enfermedades y malformaciones congénitas debido a la exposición a diferentes factores ambientales (Figura 4), incluyendo sustancias con capacidad carcinogénica mutagénica y/o teratogénica, además de aquellas que tiene un efecto tóxico (Vega, 1990a y b y Albert, 1998).



**Figura 4.** Relación entre agente químico, exposición y posibles daños (Vega 1990a y b)

Estudios experimentales de carcinogénesis confirman el efecto directo de algunas sustancias químicas en los cambios celulares; sin embargo, no existe una correlación directa entre toxicidad aguda y carcinogenicidad; una sustancia química de alta toxicidad puede no ser potencialmente carcinogénica o presentar una actividad muy reducida; mientras que una sustancia química que produce un efecto tóxico muy pequeño o no evidente en experimentos de toxicidad agudos, puede ser un carcinógeno muy potente (PNUMA y OMS, 1980).

Existe evidencia experimental que vincula la actividad carcinogénica de diversas sustancias químicas con la capacidad de ejercer un efecto mutagénico, lo que ha llevado a postular la relación entre carcinogénesis y mutagénesis (Cortinas, 1985; Albert, 1998 y Cortinas 1998), entendiendo esta última como cualquier mutación o cambio en el material genético. Estos cambios pueden afectar a las generaciones siguientes, siempre y cuando la mutación se presente en el material genético transmitido a los descendientes (Kamrim, 1990); dicha relación hasta ahora se ha limitado a cambios del genotipo que aparecen como consecuencia de cambios estructurales de los ácidos nucleicos. No se ha demostrado que todos los mutágenos químicos sean carcinógenos, sin embargo, se ha comprobado que muchos carcinogénicos, varios de los cuales producen cáncer en el hombre, son mutágenos (PNUMA y OMS, 1980). Por ejemplo; las mutaciones ionizantes son capaces de producir rupturas en la hélice del ADN

asociándolas con procesos cancerígenos en diversos órganos; o los rayos ultravioleta que forman dímeros de timina y se asocian con procesos cancerígenos en piel (Albert, 1980).

Kamrin (1990) señala que un evento mutagénico puede afectar moléculas que son necesarias para la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario e interferir en el correcto desarrollo del producto, ocasionando efectos teratogénicos (defectos de nacimiento: malformaciones estructurales, alteraciones fisiológicas, entre otras), a menudo como resultado de la exposición a un tóxico durante el embarazo. Estas anomalías pueden pasar por una serie de pasos consecutivos que generalmente culmina con alteraciones en el desarrollo celular y comúnmente con la muerte del embrión o feto.

La teratogénesis se clasifica como un efecto crónico, aun cuando el tóxico aparezca durante periodos relativamente cortos e irrelevantes, comparados con el ciclo de vida del organismo. Sin embargo, los agentes teratogénicos son específicos, a tal grado, que un tipo particular de defecto de nacimiento está relacionado a la exposición particular de un químico; por otro lado, los defectos de nacimiento pueden ser heredables y aparecer en generaciones futuras (Kamrin, 1990).

En la Tabla 1 se muestran las principales células blanco de los distintos procesos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos, estableciendo sus principales diferencias en el periodo de susceptibilidad y el tiempo de exposición, lo cual permite establecer las diferencias entre cada uno de estos procesos y por lo tanto entre los agentes potencialmente peligrosos.

**Tabla 1.** Características toxicológicas de los carcinógenos, mutágenos y teratógenos (Vega, 1990b).

Agente	Células blanco	Periodo susceptible a la exposición	Duración de la exposición y dosis
Carcinógeno	Somáticas	Todos los estadios del ciclo celular	Crónica, todas las dosis
Mutágenos	Germinales	Todos los estados de la gametogénesis	Aguda o crónica, todas las dosis
Teratógeno	Tejidos inmaduros	Organogénesis	Aguda, todas las dosis

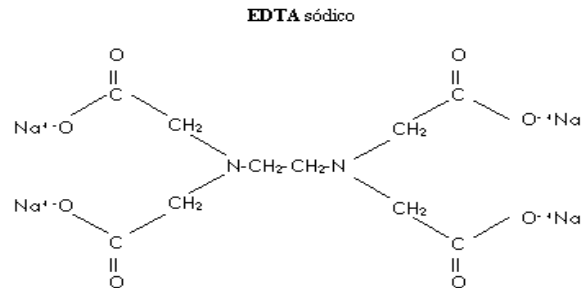
### 1.5. Importancia de la temperatura en estudios de toxicidad acuática.

La variación actual en la temperatura ambiental puede influir en la permanencia y movilidad de un agente químico, así como en el deterioro de la salud y/o en una mayor susceptibilidad y resistencia a infecciones; además de variación en las respuestas fisiológicas por la acción de sustancias químicas tóxicas. Por lo tanto la absorción, distribución, transformación metabólica, excreción y reactividad con sitios receptores dependen de diversas reacciones termodependientes, por lo que cabría esperar que la toxicidad, teratogenicidad, carcinogenicidad y genotoxicidad de algunas sustancias se vean fácilmente influidas por los cambios de temperatura (PNUMA y OMS, 1980).

En los ensayos de toxicidad acuática realizados a temperaturas superiores a 30 °C, la temperatura puede tener efectos semejantes a los producidos por agentes físicos o químicos, por lo que es importante su control en procesos experimentales en sistemas acuáticos. En los sistemas vivos, los límites de funcionalidad y tolerancia son estrechos, por lo tanto, la temperatura debe mantenerse constante, debido a que ligeras variaciones en la misma pueden provocar que se presenten cambios funcionales y estructurales, lo que podría atribuirse erróneamente a la acción de algún otro agente (Muñoz, 1996). Por otra parte, la temperatura también puede favorecer efectos sinérgicos o inhibitorios (antagónicos) de los efectos propios de agentes físicos y químicos, afectando su potencial tóxico, teratogénico, carcinogénico y/o genotóxico, así como su absorción, metabolismo y excreción, por lo que la combinación de múltiples variables puede dar lugar a una amplia gama de respuestas biológicas (PNUMA y OMS, 1980).

### 1.6. Características fisicoquímicas del EDTA

El EDTA es compuesto químico denominado ácido etilendiaminotetraacético, con la fórmula  $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$  (Figura 5). Es incoloro, soluble en agua. Su utilidad se debe a que como agente quelante, tiene la capacidad de "secuestrar" los iones metálicos, tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ . Después de ser secuestrados por el EDTA, los iones metálicos permanecen en solución, pero presentan disminución de la reactividad. El EDTA se produce como varias sales, en particular, EDTA disódico y calcio disódico EDTA.



**Figura 5.** Molécula del EDTA

### 1.7 Usos

En la industria, el EDTA se utiliza principalmente para retener los iones metálicos en solución acuosa. En la industria textil, impide que las impurezas de iones de metal modifiquen los colores de los productos de teñido. En la industria del papel, el EDTA inhibe la capacidad de los iones metálicos, especialmente de  $Mn^{2+}$ , de la catálisis de la oxidación de peróxido de hidrógeno, que se utiliza en el "blanqueo libre de cloro". El EDTA se agrega a algunos alimentos como conservante o estabilizante para evitar la oxidación, la cual es catalizada por los iones metálicos. En los productos de cuidado personal, se añade a los cosméticos para mejorar su estabilidad. En Bebidas sin alcohol que contienen el ácido ascórbico y el benzoato de sodio, EDTA reduce la formación de benceno (un cancerígeno).

La reducción de la dureza del agua en las aplicaciones de lavandería y la disolución de escala en las calderas de ambas se basan en EDTA y complejantes relacionados para secuestrar los iones de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , así como otros iones metálicos. Una vez unidos al EDTA, no hay tendencia a formar precipitados.

La solubilidad de los iones de hierro se consigue con EDTA. Esta propiedad es útil en la agricultura, así como en la hidroponía, especialmente en suelos calcáreos. De lo contrario, el hierro (III) forma sales insolubles, que son menos biodisponibles.

### 1.8 Efectos toxicológicos

Su degradación conlleva a la conversión de ácido etilendiaminetriacético. El EDTA presenta baja toxicidad aguda con  $DL_{50}$  (rata) de 2,0 a 2,2 g/kg. Causa citotoxicidad y es débilmente genotóxico en animales de laboratorio.

En condiciones ambientales siempre existirá un exceso estequiométrico de iones calcio, de tal manera que el EDTA no ejercerá una acción tóxica que afecte el balance de calcio para organismos acuáticos. Las concentraciones reales de EDTA en aguas superficiales son inferiores a aquellas que podrían ejercer algún efecto adverso sobre la vida acuática. Es poco

probable que un compuesto polar, soluble en agua como el EDTA, se bioacumule en el componente lipídico de organismos acuáticos.

### 1.9. Bioindicadores, bioensayos y biomarcadores

Los ecosistemas actuales están expuestos a una gran cantidad de estresores ambientales, lo cual ha llevado a una calidad ambiental cada vez más pobre. Mediante el empleo de bioindicadores se puede medir y/o cuantificar la presencia de diversos tóxicos en un ambiente específico. Su empleo en diferentes países está enfocado no sólo a medir la salud de un ecosistema característico, sino también a determinar el impacto en el ámbito de la salud humana; por lo tanto, un indicador es un organismo seleccionado por el grado de sensibilidad o tolerancia a diversos tipos de contaminantes y sus efectos (Fernícola, 1992 y de la Lanza, 2000).

El uso de organismos en condiciones controladas —in vivo o in vitro— (bioensayos) ofrece múltiples ventajas; por ejemplo: pueden manifestar efectos adversos de una droga o sus metabolitos, en varios sistemas biológicos; dar respuestas moleculares, bioquímicas y fisiológicas que produce la presencia de un agente contaminante presente en un organismo determinado; y los resultados de pruebas efectuadas podrían extrapolarse al humano (Moreira, 1995 y Martínez, 1996). Estos organismos van desde los más simples hasta los más cercanos en la escala evolutiva al ser humano (Gaytán, 1993). En el caso de bioensayos con organismos acuáticos, éstos ofrecen la única forma de determinar el grado de toxicidad de efluentes y agentes químicos aislados (Olvera, 1998).

Mediante el uso de más y mejores bioensayos se pueden proponer nuevos biomarcadores; entre los más empleados se encuentran los ácidos nucleicos, proteínas (enzimas), organelos, células, tejidos y órganos (Medina y Encina, 2003). Butterworth (1995) indica al respecto que los biomarcadores, para ser eficaces, deben cumplir con varias características: ser altamente sensibles, poco costosos, capaces de evaluar mezclas complejas, así como diferentes ambientes (agua, suelo y aire), además de dar resultados en corto tiempo.

### 1.10. Bioensayos con peces

La prueba de toxicidad aguda utilizando peces es el paso inicial en la prueba de sustancias químicas. Por lo general, la toxicidad aguda de sustancias químicas se determina como  $CL_{50}$  (96h), es decir, como la concentración de la sustancia que resulta en 50% de mortalidad de los peces experimentales, durante un periodo de 96 horas. Diferentes especies de peces pueden variar en órdenes de magnitud con respecto a su sensibilidad a los contaminantes ambientales. Generalmente, los salmónidos son más susceptibles que los Cypriniformes o Cyprinodontiformes. La muerte como un punto final en la investigación toxicológica representa un parámetro inequívoco para el individuo. Sin embargo, la importancia medioambiental de la muerte de los individuos después de la exposición a corto plazo a altas concentraciones, es

cuestionable. Con mayor frecuencia, los efectos crónicos derivados de la exposición a largo plazo a bajas concentraciones son importantes y deberían ser investigados.

### 1.11. Biología del pez cebra (*Danio rerio* Hamilton, 1822)

#### 1.11.1. Características generales

El pez cebra *Danio rerio* es un pequeño ciprínido, originario de los afluentes y ramales del río Ganges, en Asia Sudoriental. Esta especie mide de 3-5 cm en la edad adulta y se desarrolla en aguas blandas y duras. A los 26 °C, el pez cebra crece con rapidez y alcanza la madurez en tres meses. Esta especie es fácil de obtener, fácil de mantener y, en condiciones adecuadas, proporciona un gran número de huevos no adherentes y transparentes. Una hembra pone alrededor de 50-200 huevos por día. El desarrollo embrionario se ha descrito en numerosos estudios (Kimmel *et al.*, 1995) y es la base para la interpretación de los efectos causados por los contaminantes ambientales.

Su morfología es fusiforme y alargada, su cuerpo es dorado o plateado presentando de cinco a nueve bandas de color azul oscuro, las cuales corren longitudinalmente sobre los costados de su cuerpo; su dimorfismo sexual permite distinguir claramente a machos y hembras.



Figura 6. Pez cebra (*Danio rerio*).

**Tabla 2.** Empleo del pez *Danio rerio* en estudios de experimentación.

Nombre común	Genero y especie	Uso
Pez Cebra	<i>Danio rerio</i>	Biología del desarrollo Enfermedades genéticas Cáncer Toxicología en agua Peces transgénicos Inmunología comparada Fisiología comparada

#### 1.12. Importancia del *Danio rerio* en estudios de ecotoxicología

Kimmel *et al.* (1994 y 1995) menciona la importancia de la temperatura en la incubación de huevos del *Danio rerio*, debido a que las fluctuaciones de esta variable pueden ocasionar cambios en el desarrollo embrionario de este organismo, lo cual fue evidenciado al someter los huevos a diferentes intervalos de temperatura, estableciendo como temperatura mínima 25 °C y 33 °C como la temperatura máxima. Señala que la incubación de huevos del pez a una temperatura superior a 33 °C puede provocar embriones con anormalidades; además, indica que la incubación a diferentes intervalos de temperatura puede producir diferencias en las distintas fases del desarrollo embrionario, así como modificar el tiempo de embriogénesis.

Desde el enfoque toxicológico, uno de los primeros trabajos reportados es el de Dietrich (1998), quien utilizó al *Danio rerio* para evaluar daño embriotóxico y teratogénico de muestras de agua a través de la prueba denominada DRETA (*Danio rerio* Embriotoxicity and Teratogenicity Assay) evaluando el daño inducido a nivel de corazón en estos organismos. Por otra parte, Oberemm (2000) sugiere el uso de embriones del *Danio rerio* como un buen bioensayo en la evaluación de elementos tóxicos presentes en el agua; describe las principales características del desarrollo embrionario de este organismo, así como las ventajas que presenta el empleo de los embriones de éste en la evaluación de efectos causados por compuestos químicos de interés toxicológico; además, sugiere el uso de embriones en estado juvenil, debido a que son más sensibles que los organismos adultos.

Nagel (2002) utilizó embriones del *Danio rerio* para evaluar el efecto letal, subletal y teratogénico de una lista de 34 compuestos tóxicos, a través de una metodología llamada DarT (*Danio rerio* Toxicology Assay), mediante la cual expuso embriones del pez durante todo su desarrollo embrionario a diferentes concentraciones de distintos compuestos; los resultados

mostraron que después de 48 horas de exposición los embriones mostraron algún tipo de daño. Entre los más sobresalientes, se encuentran anomalías en el corazón, ojos, cabeza, aleta caudal, pigmentación y circulación sanguínea.

Estudios recientes efectuados en el laboratorio de Genética Evolutiva y Ambiental de la UAEH (González, 2004) indican que la etapa de alevín es la más sensible a la acción teratogénica del  $\text{HgCl}_2$ . Posteriormente, Rivera (2006) sugiere la columna vertebral del *Danio rerio* como el biomarcador más sensible a la acción teratogénica del mismo compuesto. Báez (2004) empleó células branquiales del *Danio rerio* para evaluar el efecto genotóxico del arsénico presente en el agua del municipio de Zimapán, Hidalgo, encontrando una relación positiva entre la exposición de embriones y el efecto genotóxico generado en las células branquiales del pez, lo cual sugiere a esta estructura como un biomarcador eficaz.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El laboratorio de Calidad del Agua cuenta con un área de Toxicología Servicios en la cual se realizan diversas pruebas orientadas al área ambiental bajo procedimientos normalizados a nivel nacional e internacional o propios, validados en el laboratorio, generando resultados confiables con alta calidad, con la finalidad de presentar resultados que permitan la toma de decisiones en la problemática ambiental.

Una vez que se tenga implementada y validada la prueba de toxicidad con peces, se partirá de este organismo para la realización de la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la cual permitiría detectar cualquier daño genético de cualquier organismo de sangre fría, con relativa rapidez. Esta prueba tiene múltiples aplicaciones tanto para ciencia básica como aplicada, y debe considerarse que con la situación actual se requiere dar respuestas rápidas a la toma de decisiones.

La prueba de toxicidad aguda, crónica y daño teratogénico mediante el uso de *Danio rerio* es uno de los ensayos más utilizados, debido a que este organismo presenta múltiples ventajas al evaluar contaminantes presentes en agua y suelo, entre las que destacan: resultados en corto tiempo (96 h), ejemplares de tamaño pequeño (5 cm de largo, lo que permite tener grandes poblaciones en espacios pequeños), bajo costo de su mantenimiento; además, la ovoposición puede ser inducida con 24 horas de anticipación, lo cual permite programar el análisis de muestras en grandes cantidades.

## 3. OBJETIVO

Establecer la prueba de toxicidad con peces, así como la metodología preliminar por PCR, para la valoración de la toxicidad en organismos acuáticos como daño genético

## 4. META

Implementación y validación de un procedimiento eficiente de toxicidad aguda con peces que permita la detección de compuestos tóxicos en muestras líquidas.

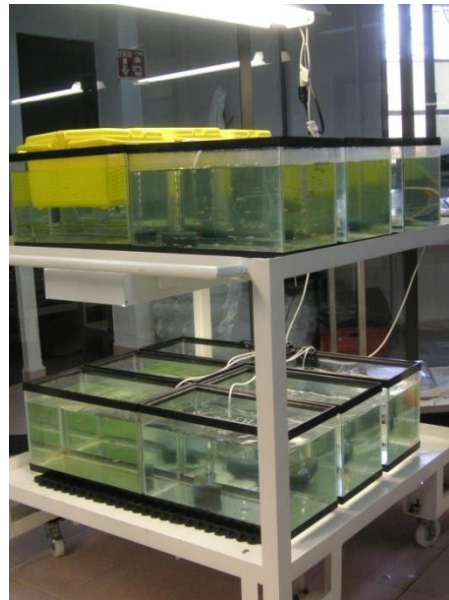
## 5. RESULTADOS

### 5.1 CONDICIONES DE INFRAESTRUCTURA ÓPTIMAS PARA EL DESARROLLO DEL ÁREA DE PECES

En un área de 29 m<sup>2</sup>, se acondiciono la infraestructura física necesaria para desarrollar el área de peces: aire acondicionado, lámparas de luz blanca que proporcionen 1000 luxes, mesas de trabajo centrales para la colocación de peceras donde se desarrollarían los diferentes estadios del pez *Danio rerio*; un equipo para generar agua con la calidad que se requiere para mantener un cultivo masivo de peces, lo que implicó un constante monitoreo de las condiciones físicas y químicas del agua para mantener condiciones favorables de sobrevivencia y reproducción. El área de Toxicología Servicios cuenta con 35 peceras de 40 L cada una y con aireadores de oxígeno (Figura 7).

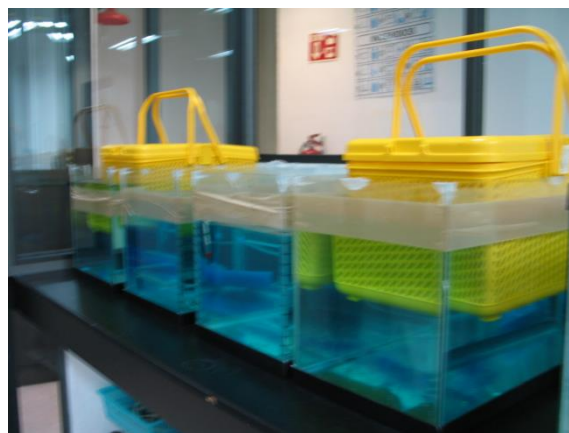


**Figura 7.** Filtros para generar el agua requerida por los peces.



**Figura 8.** Vista del laboratorio de peces en el área de Toxicología Servicios.

Se cuenta con cámaras de fecundación que permiten la reproducción del pez *Danio rerio*.



**Figura 9.** Cámaras de fecundación.

Se cuenta con peceras donde están separados por peces hembra y peces macho.



**Figura 10.** Vista de la separación de lotes de peces reproductivos (hembras y machos).

## 5.2. CULTIVO DEL PEZ *Danio rerio* EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA SERVICIOS

### 5.2.1. Aislamiento y selección de peces

Los peces adquiridos de granjas piscícolas deben ser aislados inicialmente durante un periodo de dos semanas en una pecera de 40 litros de capacidad, con agua previamente aireada por 24 h (con la finalidad de eliminar el cloro presente en el agua). Cabe señalar que el agua que se utiliza para el cultivo de peces proviene de un sistema de purificación agua constituido por filtros de arena, carbón activado y lámparas de luz ultravioleta. Dicho sistema se encuentra dentro del área de Toxicología Servicios.

Después de transcurrido el periodo de aislamiento, se eliminan los peces que no presenten un buen estado de salud, la edad adecuada y las características específicas de la especie y variedad seleccionada.

Se divide en distintos lotes a los organismos separando machos y hembras (Fig. 10), en peceras de 40 litros, con una densidad poblacional de no más de 20 peces en cada una (teniendo una dureza de 80 a 100 mg/L como  $\text{CaCO}_3$ ) y equipadas con una bomba de aire, asegurando de esta manera las condiciones óptimas para el desarrollo de los peces.

Para iniciar el proceso de fecundación se requiere seleccionar organismos machos y hembras sexualmente maduros, de entre 4 y 5 cm de longitud, sin alguna alteración fisiológica o morfológica aparente, asegurándose de que en los lotes exista una mayor posibilidad de fecundación y, por ende, un mayor número de huevos ovopositados (Fig. 11).



**Figura 11.** Dimorfismo sexual de *Danio rerio*.

### 5.2.2. Mantenimiento de los lotes experimentales

Antes de iniciar la fase reproductiva, es necesario establecer en cada uno de los lotes de hembras y machos las condiciones fisicoquímicas que aseguren su viabilidad “Lote de mantenimiento” (Tabla 3). Además, es necesario monitorear de manera continua y sistemática la temperatura, el pH, la salinidad, la cantidad de oxígeno disuelto y su fotoperiodo para asegurar que no varíen estas condiciones, debido a que pueden influenciar directamente los hábitos conductuales, alimenticios y reproductivos de los peces y, por ende, su desarrollo y su reproducción (Báez, 2005).

En cada uno de los lotes de mantenimiento los peces se deben alimentar tres veces al día con alimento seco en hojuelas (Wardley) o del que resulte más conveniente para su nutrición, con una proporción de 0,3 g/20 organismos.

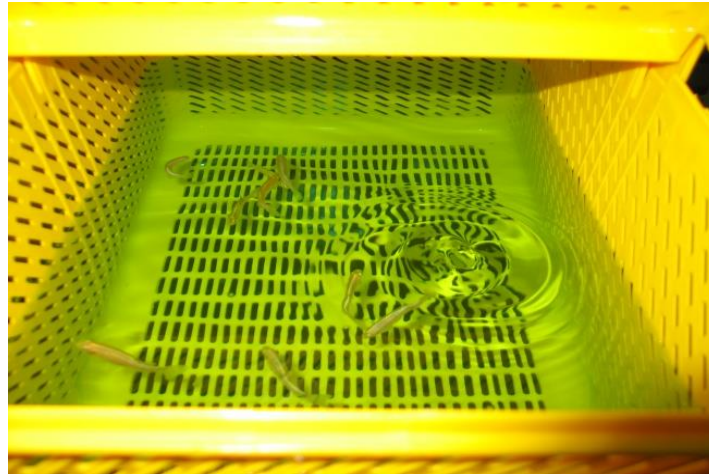
Se debe hacer limpieza de los acuarios todos los días; al término de la limpieza se deberá recuperar el volumen de agua de cada pecera, adicionando agua del sistema previamente aireada.

**Tabla 3.** Condiciones físicas y químicas recomendadas para el mantenimiento adecuado de *Danio rerio*

Variable	Condiciones recomendadas
Luz solar	No se recomienda de manera directa al acuario
Temperatura	27 °C ± 1 °C
pH	7
Corrientes de aire	Ventanas cerradas
Instalaciones	Mantenimiento de equipo
Espacio	Suficiente para que se pueda manipular con mayor facilidad las peceras

### 5.2.3. Lotes reproductivos

Los “Lotes reproductivos” consisten en peceras de 40 litros donde se lleva a cabo la reproducción de los peces; la pecera tiene que estar completamente limpia y recién lavada; el aireador que proporciona oxigenación continua y el refractario donde se reciben los huevos deben estar desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio (cloro comercial, al 10%) y enjuagado todo el material con agua del sistema. Se seleccionan organismos de talla grande y sexualmente maduros en una proporción de dos machos por una hembra; en cada cámara de fecundación se colocan 3 juegos de los anteriores (3 hembras y 6 machos), y se colocan los organismos dentro de las canastillas en las peceras (Figura 12).



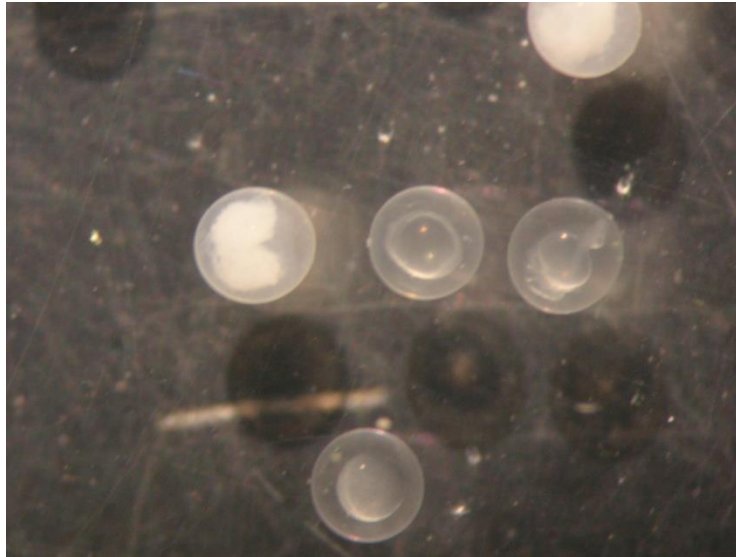
**Figura 12.** Peceras para fecundación.

Este proceso provoca la expulsión de gametos masculinos y femeninos y permite la fecundación externa, los huevos fecundados atraviesan la canastilla y de esta forma se evita que al ovopositar, los adultos ingieran sus propios huevos. El refractario que se coloca en el fondo de la pecera es para recolectar los huevos y que no caigan a la pecera; los huevos son retirados del fondo de las peceras sacando el refractario. Una vez fuera el refractario de la pecera, los huevos se recogen por sifoneo (Figura 13).



**Figura 13.** Vista de las canastillas con refractario en el fondo para recibir los huevecillos.

Posteriormente, se separan los huevos no viables de los viables; estos últimos también se separan de los desechos orgánicos para evitar contaminación por hongos y protozoarios (Figura 14).

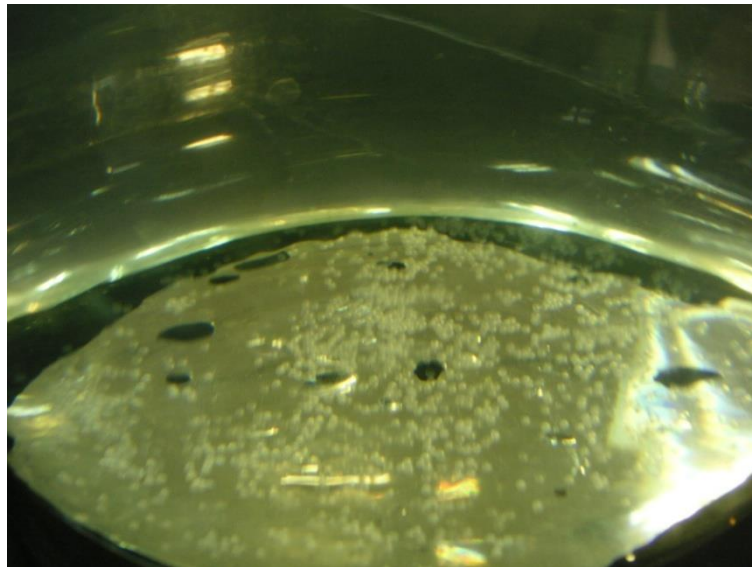


**Figura 14.** Los huevos viables son aquellos que muestran una transparencia completa.

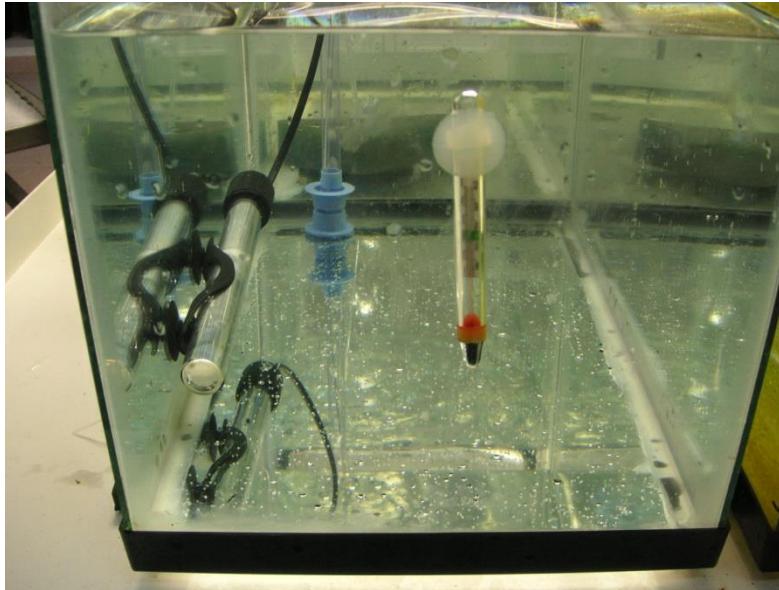
A continuación, se colocan en un vaso de 4 litros, se le adiciona una gota del desinfectante acriflavina, y se dejan una noche en la solución (Figuras 15 y 16). Al día siguiente se decanta el agua y se recupera con agua limpia del sistema y se colocan en una pecera de 40 litros adaptada especialmente para la eclosión, con un nivel inferior de aireación al de las peceras de los adultos, termostato para mantener la temperatura en  $26 \pm 2$  °C donde continuarán su desarrollo embrionario en condiciones de oxigenación y temperatura adecuadas (Figura 17).



**Figura 15.** Vaso de precipitado conteniendo los huevecillos en solución de acriflavina.

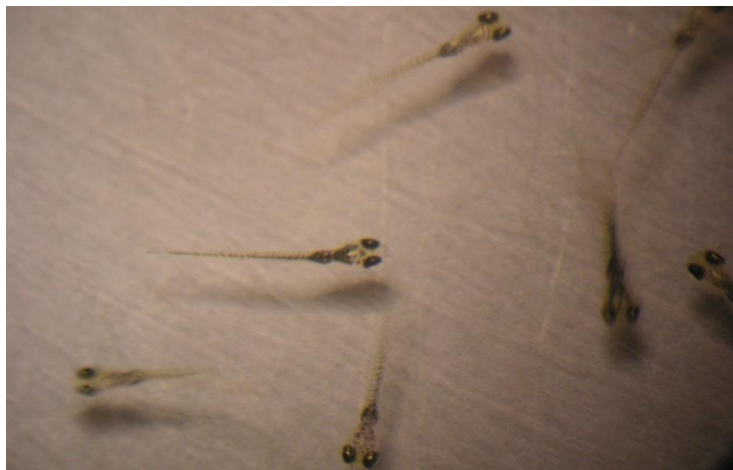


**Figura 16.** Vaso de precipitado conteniendo los huevecillos de *Danio rerio*.



**Figura 17.** Cámara adaptada especialmente para la eclosión, cuenta con termostato para mantener temperatura de  $26 \pm 2$  °C.

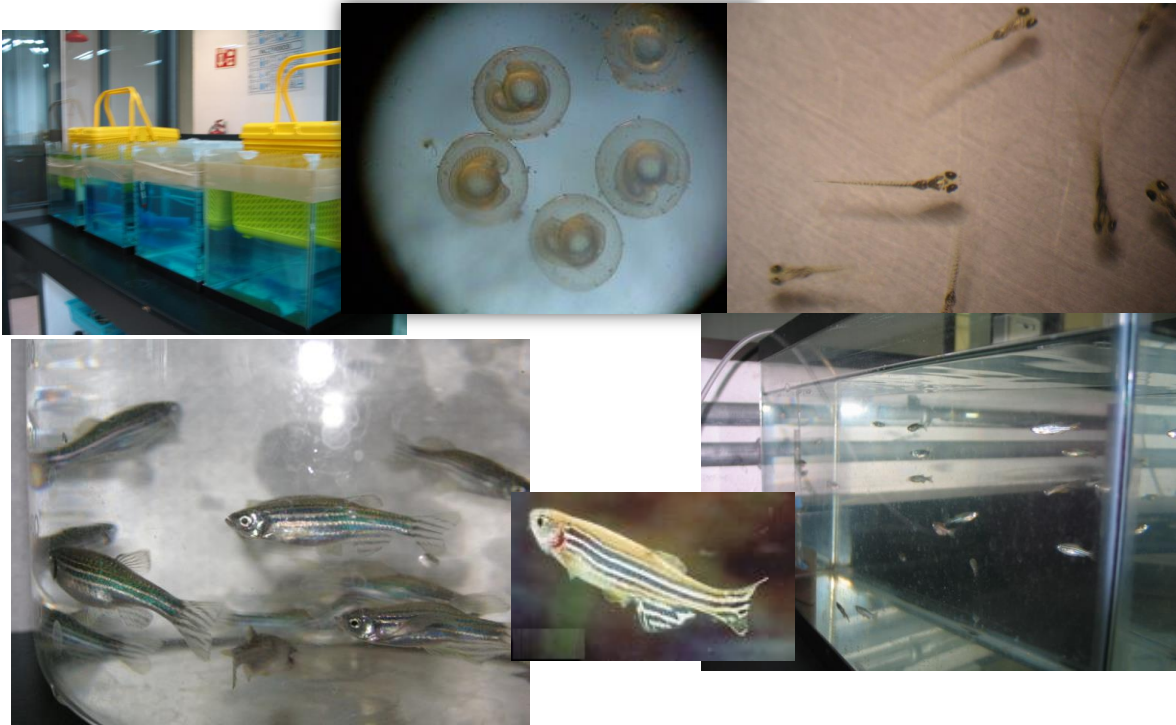
Los huevecillos eclosionan y pasan al estadio de alevines, los cuales son alimentados con pequeñas cantidades de huevo duro, al menos durante dos días (Figura 18).



**Figura 18.** Vista en estereoscopio 40X del estadio alevin de *Danio rerio*.

#### 5.2.4. Diferentes etapas del desarrollo del pez *Danio rerio*.

El Área de Toxicología Servicios cuenta con la infraestructura y el personal necesarios para el cultivo masivo de *Danio rerio*, lo que permitirá contar con existencias suficientes para la realización de pruebas de toxicidad aguda, crónica y del desarrollo a gran escala.



### 5.3. PROCEDIMIENTO

#### 5.3.1 Selección de tóxicos de referencia

Se seleccionaron tres tóxicos: dicromato de potasio, arseniato de sodio y ácido etilendiaminotetraacético. Al empezar a implementar la prueba, los dos primeros tóxicos presentaron un efecto de toxicidad aguda a concentraciones altas, por lo que se decidió no continuar probándolos, ya que ambos presentan serias dificultades para ser desechados como contaminantes del laboratorio. En cambio, con la solución del tóxico ácido etilendiaminotetraacético se obtuvo una toxicidad a una concentración menor, y fue posible reproducir el experimento sin mayor dificultad. Los resultados obtenidos se pudieron manejar estadísticamente, además de que el tóxico seleccionado se pudo manipular con las condiciones de seguridad con que cuenta el Área de Toxicología Servicios.

#### 5.3.2. Método de prueba

##### 5.3.2.1. Antecedentes

La implementación de este método se basa en el método OPPTS 850.1075 Bioensayo de toxicidad aguda en peces, para agua dulce y marina (USEPA, 1996).

##### 5.3.2.2. Objetivo

El objetivo de la prueba de toxicidad aguda con peces consiste en apoyar en la evaluación del posible riesgo para especies similares en ambientes naturales, como auxiliar en la determinación de los posibles criterios de calidad de agua, con propósitos reglamentario;, y para usarse en ensayos de correlación con otras especies con fines comparativos de toxicidad aguda.

##### 5.3.2.3. Principio.

Determinar la curvas de concentración-respuesta para la mortalidad de los peces, la  $CL_{50}$ , y los intervalos de confianza del 95 por ciento para *Danio rerio* a las 24, 48, 72 y 96 horas, en un sistema estático.

##### 5.3.2.4. Intervalo de análisis o límite de prueba.

Las pruebas definitivas pueden eliminarse, si la prueba preliminar con al menos 30 organismos muestra niveles de  $CL_{50} > 1,000$  mg/L sobre la base de 100 por ciento de la sustancia activa. Para plaguicidas, puede ponerse a prueba una concentración  $< 100$  mg de IA/L cuando se estima que las concentraciones ambientales no superen los 100 mg/L (ppm). Antes de la selección de las concentraciones de ensayo definitivas es recomendable llevar a cabo una amplia investigación de intervalos de concentración. Los resultados de cualquier prueba de intervalos de concentración y de límites deben notificarse con los resultados de la prueba definitiva.

#### 5.3.2.5. Información necesaria sobre la sustancia química a analizar.

El material de prueba debe ser de grado reactivo, a menos que la prueba esté diseñada para evaluar una formulación específica, una mezcla o efluentes. Debe registrarse el grado de pureza para las sustancias de prueba. Debe disponerse de un método analítico confiable para la cuantificación de las concentraciones de la sustancia de prueba.

#### 5.3.2.6. Validez de la prueba.

El control máximo permisible o control de mortalidad debe ser de 10 por ciento, es decir, se acepta la mortalidad de 1 pez si se usan de 7 a 10 peces en el blanco control del pez para un periodo de 96h de prueba.

Deben mantenerse condiciones constantes durante todo el período de prueba.

En las pruebas estáticas, el oxígeno disuelto (OD) en todo momento debe ser mayor de 60 por ciento de saturación.

Se requiere medir las concentraciones de la sustancia de prueba si ésta es inestable. Podrán hacerse excepciones en los casos en que los estudios de hidrólisis indiquen que la sustancia es estable (<5 por ciento de degradación) en 96h a un pH comparable al del agua de dilución usada en la prueba. En cualquier caso, debe haber evidencia de que las concentraciones de la prueba se mantengan al menos en 80 por ciento de las concentraciones nominales durante toda la prueba o que en promedio las concentraciones medidas son una representación exacta de los niveles de exposición durante todo el periodo de prueba.

#### 5.3.3. Descripción del método.

##### 5.3.3.1. Material y equipo.

Equipo para la determinación de la dureza del agua.

Termostatos

Termómetros

Peceras de material químicamente inerte y de 40 L

Alimento para peces.

Bombas de oxígeno.

Microscopios.

Pipetas.

Lámparas.

Vasos de precipitado

##### 5.3.3.2. Agua.

El agua reconstituida es aceptable como agua de dilución.

El análisis químico del agua utilizada en las pruebas deberá incluir los siguientes elementos y las limitaciones a las concentraciones máximas sobre la base de pruebas efectuadas cada dos años, como mínimo:

Sustancia	Concentración máxima
Materia particulada.....	20,0 mg/L
Demanda química de oxígeno (DQO).....	5,0 mg/L
Carbono orgánico total (COT).....	2,0 mg/L
Boro y flúor.....	<100,0 mg/L
Cloro residual.....	0,003 mg/L
Amoníaco No-ionizado.....	0,020 mg/L
Aluminio, arsénico, cromo, cobalto, cobre, hierro, plomo, níquel y zinc.....	0,001 mg/L
Cadmio, mercurio y plata.....	<0,100 mg/L
Plaguicidas organofosforados totales.....	0,050 mg/L
Plaguicidas organoclorados totales + PCBs o cloro orgánico.....	0,050 mg/L
Conductividad específica.....	<1,0 mOhms

5.3.3.3. La dureza debe estar entre 40 y 180 mg/L como CaCO<sub>3</sub>.

#### 5.3.4 Soluciones stock

Se debe utilizar agua destilada en la preparación de la solución madre del toxico de referencia. Si el volumen stock es de más del 10 por ciento del volumen de solución de prueba, debe utilizarse agua de dilución. Cuando un disolvente y/o dispersante sea absolutamente necesario para disolver la sustancia de ensayo, la cantidad no debe exceder el volumen mínimo necesario para disolver o resuspender la sustancia de prueba en el agua de dilución. Si la sustancia de prueba es una mezcla, formulación o producto comercial, ninguno de los ingredientes es considerado un solvente, a menos que una cantidad adicional se utilice para preparar la solución madre.

La concentración de disolvente no puede exceder de 0,5 ml/L en pruebas estáticas.

Los disolventes sugeridos son dimetil formamida, trietilenglicol, metanol, acetona o etanol. Si es posible, debe evitarse el uso de disolventes.

Las concentraciones de solvente seleccionadas deben mantenerse constantes en el control con disolvente y en todas las soluciones del ensayo. La concentración de solvente en el más alto nivel del tratamiento debería ser utilizada en el control de disolvente.

El pH no debe ser ajustado después de la adición de la sustancia de prueba o de la solución madre en el agua de dilución.

El pH debe medirse al inicio de la prueba.

El pH puede ajustarse en las soluciones madre para que coincida con el pH del agua de dilución, si el cambio de pH no afecta la estabilidad del compuesto en el agua. Si se justifica se pueden utilizar HCl y NaOH para ajustar.

#### 5.3.5. Selección de la especie de ensayo.

Danio rerio (pez cebra) especie de agua dulce.

#### 5.3.6. Aclimatación.

Un periodo de aclimatación mínimo de 12 días es necesario. Se recomiendan 14 días. Se debe realizar un período de aclimatación mínimo de 7 días en el agua de dilución de la prueba.

El agua para mantener el cultivo debe provenir de la misma fuente que el agua de dilución de la prueba; si no, la aclimatación al agua de dilución debe hacerse gradualmente, durante un periodo de 48 horas.

No pueden administrarse tratamientos para la enfermedad dentro de las 48 h del inicio de prueba o durante la prueba.

No se permite la alimentación dentro de las 48 h del inicio de prueba o durante la prueba.

La prueba de mortalidad previa al ensayo debe ser <5 por ciento durante la aclimatación. Si la prueba previa de mortalidad es >10 por ciento, todo el lote debe ser rechazado y comenzar una nueva serie de aclimatación.

Cualquier cambio en la temperatura del agua no debe superar los 3 °C por día. Antes de la prueba, el pez debe mantenerse por un mínimo de 7 días a la temperatura de ensayo.

Durante las últimas 48 horas de aclimatación, los peces deben ser mantenidos en instalaciones con los colores de fondo y las intensidades de luz similares a los del área de prueba.

#### 5.3.7. Edad y tamaño de los peces de prueba.

Deben ser del estadio alevín, de tamaño, apariencia normal y de la misma edad.

Los peces deben proceder de la misma fuente y población.

Deben llevarse registros sobre el origen de las existencias iniciales y/o técnicas de cultivo.

Los peces no deben ser utilizados para una prueba si parecen estresados, o si más del 5 por ciento mueren durante las 48 horas inmediatamente previas a la prueba, o si fueron utilizados en pruebas anteriores para tratamientos o controles.

#### 5.3.8 Temperatura.

Peces cebra..... 27 ± 1.0 °C

#### 5.3.9 Alimentación.

Se sugiere la alimentación de los peces todos los días, hasta 48 horas antes de la prueba.

#### 5.3.10 Realización de la prueba.

##### 5.3.10.1. Duración

El ensayo de toxicidad aguda se debe realizar por un mínimo de 96 horas.

##### 5.3.10.2. Controles.

Cada prueba debe incluir controles convenientes en agua de reconstitución, condiciones, procedimientos, y los organismos de prueba. También son necesarios controles de solvente si se utiliza un solvente para la disolución de la sustancia analizar.

##### 5.3.10.3. Introducción de los peces.

Los peces deben añadirse a los vasos de precipitado dentro de los 30 minutos de la adición de la sustancia de prueba en el agua de dilución.

##### 5.3.10.4. Número de organismos de prueba.

Se prefiere 10 peces por réplica para obtener una representación estadísticamente más exacta de la curva dosis-respuesta, para permitir un menor margen de error en la mortalidad que pueda ocurrir, incluso si no está relacionada con efecto químico; y para evitar repeticiones innecesarias de la prueba debido a un control excesivo de la mortalidad.

##### 5.3.10.5. Réplicas.

Son preferibles tres réplicas por concentración del ensayo para evitar la repetición de la prueba debido a fallas del sistema, y para proporcionar una base estadística más fuerte.

Cada cámara de prueba (vasos de precipitado) debe contener un volumen de 150 mL de solución de prueba y 10 peces por vaso. Los recipientes de prueba deben estar físicamente separados.

#### 5.3.10.6. Cámaras de prueba.

La cristalería y equipo el equipo que está en contacto con la solución stock, de prueba o agua de dilución no deben contener sustancias que pueden ser liberadas o disueltas en soluciones acuosas en cantidades que pueden afectar los resultados.

El sistema de abastecimiento de agua debe estar completamente acondicionado antes de usarlo. Caucho, cobre, bronce, metal galvanizado, pegamentos epóxicos, plomo y tubos flexibles no deben entrar en contacto con el agua de dilución, la solución madre o solución de prueba.

Los vasos de precipitado se tapan para reducir la evaporación y reducir al mínimo la entrada de polvo y otras partículas en soluciones y para evitar la pérdida de los peces.

Aireación. Sólo en caso de que los niveles de oxígeno estén en peligro de caer por debajo del 60 por ciento de saturación se permite la aireación suave en los recipientes utilizados en sistemas de prueba estática, durante el período de exposición.

#### 5.3.10.7. Luz.

Se sugiere el fotoperiodo con periodos de transición de 16D/8N, donde D=día, y N=noche. La intensidad de la luz debe oscilar desde 30 hasta 100 lm en la superficie del agua. La intensidad seleccionada será la misma, en la mayor medida posible, en todas las réplicas.

#### 5.3.10.8. Temperatura.

Las temperaturas deben ser registradas en todas las réplicas en el comienzo de la prueba y cada 24 horas después. La temperatura debe registrarse al menos cada hora en una réplica, durante toda la prueba. La temperatura no debe variar más de 1,0 ° C en cualquier periodo de 24 horas.

#### 5.3.10.9. Alimentación.

Los peces no pueden ser alimentados durante el periodo de prueba.

#### 5.3.10.10. Perturbaciones.

Cualquier perturbación que pudiera cambiar el comportamiento de los peces del ensayo debe evitarse.

#### 5.3.11. Concentraciones de prueba.

Un mínimo de cuatro concentraciones de prueba debe emplearse.

Deben probarse cinco o más concentraciones en una serie geométrica. Las concentraciones de prueba deben ser al menos 50 por ciento mayor que la concentración de prueba inmediatamente inferior (no más de 120 por ciento). Antes de la prueba, estudios efectuados para encontrar los intervalos de concentración pueden permitir la selección más precisa de las concentraciones de ensayo.

No se permite la variación de más del 25 por ciento entre las concentraciones de prueba en el mismo tratamiento durante la prueba.

Selección de la concentración. Las concentraciones de prueba deberán seleccionarse para producir una concentración sin efecto observable (NOEC) y, preferiblemente, por lo menos dos mortalidades parciales, es decir, una mayor que la otra menos de 50 por ciento, después de 96h.

#### 5.3.12. Observaciones.

Las observaciones de mortalidad se deben registrar a las 6, 24, 48, 72 y 96 h.

Si la prueba se mantiene después de 96h, observaciones adicionales debe hacerse cada 24 horas hasta su terminación.

Además de la mortalidad, cualquier conducta anormal debe ser registrada, tales como, pero no limitado a, nado errático, pérdida de reflejos, excitabilidad incrementada, letargo, y cambios en la apariencia o la fisiología como la decoloración, producción excesiva de moco, hiperventilación, ojos opacos, columna vertebral curvada, o hemorragia.

#### 5.3.13. Datos y presentación de informes.

Tratamiento de los resultados. El porcentaje de mortalidad acumulado se ingresa al software probi para calcular la  $CL_{50}$  para el período de exposición apropiado. Los límites de confianza (IC), con  $p = 0,95$  para el valor calculado de  $CL_{50}$ , deben incluirse.

#### 5.3.14. Informe de la prueba.

El informe del ensayo debe incluir lo siguiente:

Fecha del análisis, nombre del laboratorio y del personal que lo realizó.

Identificación de la sustancia de prueba y su pureza.

Las características de calidad del agua, como se informó en los registros de laboratorio para el estudio. Estos deben incluir registros de 24h de OD, el pH y la temperatura.

Métodos de preparación de la solución madre y de las concentraciones utilizadas en las pruebas definitivas.

Todas las concentraciones de prueba, medidas durante la prueba y en la terminación.

El número de organismos de ensayo en cada réplica y/o concentración de ensayo.

Las curvas de  $CL_{50}$  de concentración-respuesta, los valores de  $CL_{50}$ , y asociados al 95 por ciento de IC deben determinarse para 24, 48, 72 y 96 h, cuando existan datos suficientes.

Una gráfica de la curva concentración-mortalidad en la terminación de la prueba. Cualquier control de la mortalidad observada durante el período de aclimatación o de estudio.

Cualquier comportamiento anormal mostrado por los peces del ensayo.

Cualquier desviación del protocolo o por otros acontecimientos que pueden haber influido en los resultados finales de la prueba.

Un método de control de calidad debe acompañar a todos los informes del estudio final.

Los datos en bruto deben estar disponibles para apoyar las conclusiones del autor del estudio y deben ser presentados con el informe del estudio.

Los métodos de análisis estadístico deben ser notificados.

Los métodos utilizados en el análisis de las concentraciones de ensayo de la sustancia de prueba deben ser descritos. La precisión del método (es decir, límite de detección y límite de cuantificación) se deben dar.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Validación de la prueba

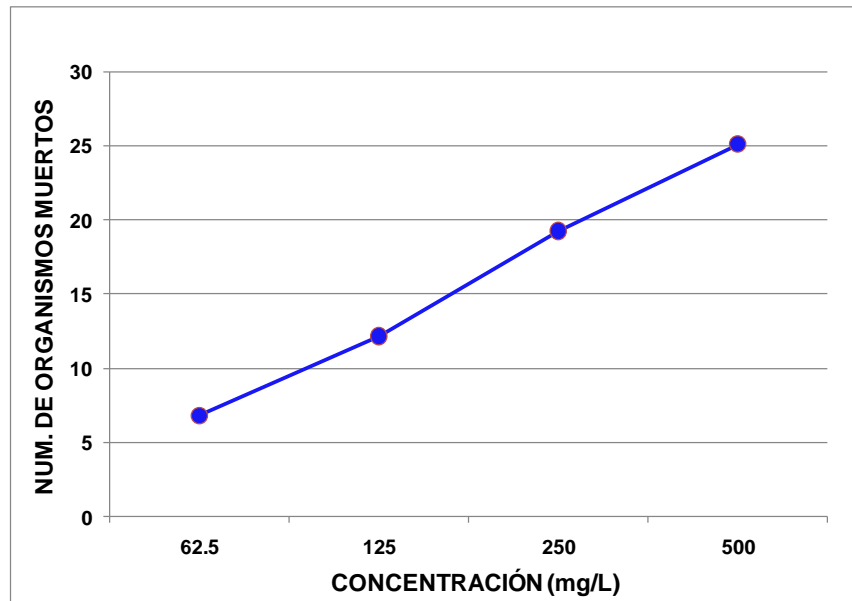
Se realizaron 23 pruebas con la solución de la sal ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Se establecieron concentraciones de 62.5, 125.0, 250.0 y 500 mg/L. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Resultados de la mortalidad de "alevines" expuestos a la solución de EDTA.

Concentración mg/L	Promedio de organismos muertos	Desviación estándar	Valor mínimo	Valor máximo
0	0	0	0	0
62.5	6.9	3.1	1	12
125	12.2	3.8	6	18
250	19.3	4.9	13	28
500	25.1	4.9	17	30

### 6.2 Curvas de toxicidad

Como parte de los resultados de este trabajo, se obtuvieron dos curvas de toxicidad. En la primera de ellas, Gráfica 1, se observa el efecto de la solución del toxico seleccionado ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sobre el número de organismos expuestos (30). A mayor concentración, la mortalidad del número de organismos expuestos es mayor; es decir, a una concentración de 62.5 mg/L el número de organismos muertos fue de 6.9, mientras que a una concentración de 500 mg/L la mortalidad fue de 25.1.



Gráfica 1. Curva dosis-respuesta con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en alevines del pez *Danio rerio*.

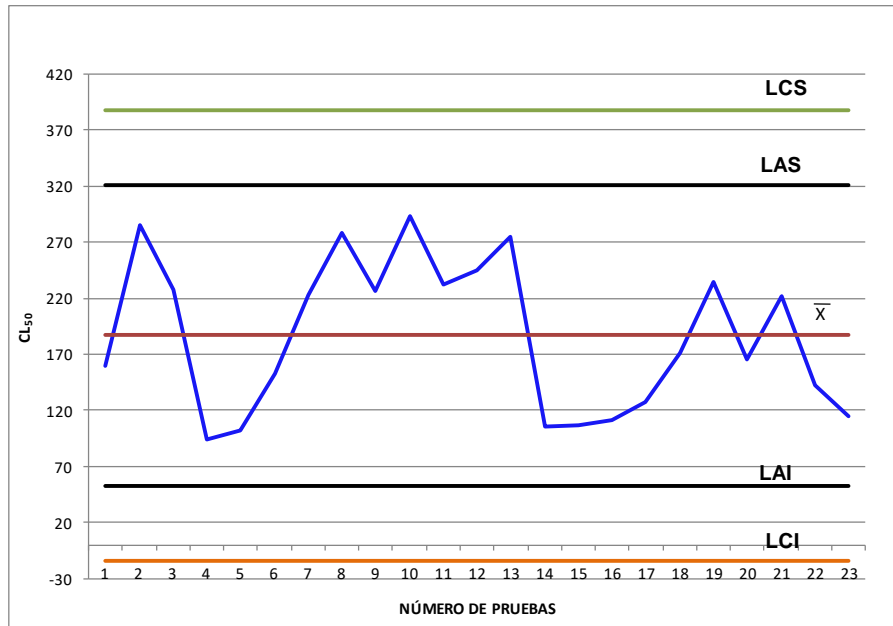
La segunda curva de toxicidad se obtuvo a partir de los datos ingresados de las 23 pruebas al programa Probit el cual calcula la  $CL_{50}$  y los límites de confianza de 95% de cada una de las pruebas. Se calculó el promedio de la  $CL_{50}$  y de los límites de confianza del 95% de las 23 pruebas (Tabla 5).

Se recomienda el uso del programa Probit, elaborado por la EPA. Dicho programa puede obtenerse en la siguiente dirección electrónica: <http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>

Tabla 5. Promedio de  $CL_{50}$  y sus límites de confianza (95%).

$CL_{50}$ mg/L	Límites de confianza al 95%	
	Inferior	Superior
186.8	123.2	271.7

En la Gráfica 2, se observa que la concentración promedio letal 50 ( $CL_{50}$ ) se encontró a 186.8 mg/L en los alevines del pez *Danio rerio*.



Gráfica 2. Gráfico control

Asimismo, en la gráfica se observa los límites de advertencia inferior y superior (LAI, LAS) y los límites de control inferior y superior (LCI, LCS).

## 7. CONCLUSIONES

Para la realización de este proyecto fue necesario establecer las condiciones físicas y químicas adecuadas para cada una de las etapas de desarrollo del pez *Danio rerio*. La implementación y validación de la prueba de toxicidad aguda implica un constante monitoreo de condiciones físicas y químicas del agua, para mantener las condiciones favorables de sobrevivencia y reproducción.

La temperatura es un factor determinante en el desarrollo y viabilidad del pez. Ésta es modificada experimentalmente de acuerdo a cada etapa de vida, en un intervalo de 26 a 28 °C; es decir, para el mantenimiento de peces adultos hembras y machos se mantienen en ese intervalo, mientras que los peces en etapa reproductiva se mantienen a 28 °C para tener una mayor ovoposición y los alevines a una temperatura de 27 a 28 °C.

En este trabajo se emplearon alevines recién eclosionados, con la ventaja de utilizarlos recién eclosionados es su mayor sensibilidad para la detección de compuestos tóxicos.

Se requiere seguir validando la prueba con el tóxico de referencia seleccionado, de manera que permita cerrar el intervalo de variación entre la Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>) con la finalidad de contar con una reproducibilidad estadísticamente significativa de la prueba, o bien con otros tóxicos, para encontrar el que dé la mejor respuesta.

Utilizar el pez *Danio rerio* como indicador trae diversas ventajas debido a que en sus estadíos de embrión y alevines recién eclosionados, en comparación con estudios previos en otros organismos, muestra mayor sensibilidad a compuestos tóxicos para determinar la toxicidad aguda y crónica. Además, estos estadíos pueden utilizarse como biomarcadores; es decir, en ellos se pueden evaluar malformaciones pequeñas, múltiples y con mayor diversidad que en otros organismos, de manera que permitan profundizar en los diferentes mecanismos de acción de agentes xenobióticos. El mantenimiento del cultivo de peces es económico; presentan una descendencia abundante, ovoposiciones inducibles y por lo tanto, se puede programar o calendarizar cada ovoposición...

Se redactó el procedimiento preliminar para la realización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la finalidad de implementarla a mediano plazo para determinar la presencia de disruptores endocrinos en muestras líquidas empleando la técnica de transcripción reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en huevos del pez *Danio rerio*.

## 8. REFERENCIAS

- Albert, L. (1998) Curso básico de toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Ed. Noriega. México. 180 pp.
- Báez-Ramírez, A. y F. Prieto-Garza. (2005) Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapán, Hidalgo, México. *Mutagenesis* 20:291-295.
- Báez-Ramírez, A., Prieto-García, F. y A. Galán-Vidal. (2004) Bioacumulación y daño genotóxico en pez cebra (*Danio rerio*) por arsénico en aguas de Zimapán, Hidalgo (México). *Ensayos en cortos plazos. AquaTic*. 21:62-70.
- Bristol, D., Mac Leond, K. y R. Lewis (1984) Evaluación de riesgo en: Toxicología prospectiva y seguridad química. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Ed. Almeida. W. y F. Reyes (ECO) México. p. 56-59.
- Butterworth F., Corkum D.L. and Rincón G. J. (1995) Introduction to Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. Ed. Plenum Press. EUA. p. 313.
- Cortinas, C. (1985) Carcinogénesis Ambiental. en: Curso básico de toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Albert, L. Ed. (Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos). México. p. 23-40
- De la Lanza, G. (2000) Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (Bioindicadores). Ed. Plaza y Valdés. México. p. 17-20.
- Dietrich, D., Prietz, A. y Kiamos, M. (1998). *Danio rerio* embryotoxicity and teratogenicity assay (DRETA) for detecting waterborne embryo-toxicants and teratogens. *Toxicologist* 42: 259-260.
- Fernícola, N. (1992) Evaluación Biológica de la Exposición Humana. en: Toxicología prospectiva y seguridad química. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Ed Reyes F. y Almeida W. (ECO) México. p. 23-34.
- Gaytán, J. (1993) Modulación del efecto genotóxico de la mitomicina C (MMC) por la vitaminas A y C en células meristemáticas de ala en *Drosophila melanogaster*. Tesis para obtener el grado de maestro en Ciencias (Biología), Universidad Autónoma Nacional de México. México. 80pp. 63
- GEO, (2000) Perspectivas y Medio Ambiente Mundial. Ed. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. España. 500 pp.
- Jorgensen, S., Sorensen, H. y Mahler H (1998) Handbook of Estimation methods in Ecotoxicology and Environmental Chemistry. Ed. Lewis Publishers. EUA. p. 105-133.
- Kamrin, M. (1990) Toxicology. Ed. Lewis Publishers. 4a. Edición. EUA. p. 33-42.

- Kimmel, C., Balla, W., Kimmel, S., Ullmann, B. y T. Schilling (1995) Stage of embryonic developmental of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. 203:253-310.
- Martínez L. (1996) Toxicología Acuática. Departamento de toxicología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas- Instituto Politécnico Nacional. México. p. 193-195.
- Medina, M. y Encina F. (2003) Incorporación de la evaluación de riesgo ecológico en el sistema de evaluación de impacto ambiental para ecosistemas acuáticos en Chile. *Ambiente y Desarrollo del Centro de Investigación y Planificación del Medio Ambiente*. 19: 3-4.
- Moreira, E. (1995) Fundamentos metodológicos de los bioensayos de toxicidad/carcinogenicidad. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. *Revista cubana de Enfermería*. 1158:1-7
- Nagel, R. (2002). DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19:38-48.
- NCR-Nacional Research Council. (1983) en: Toxicología prospectiva y seguridad química. Ed. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. México. p. 159-165.
- Oberemm, A. (2000) The use of a refined zebrafish embryo bioassay for the assessment of aquatic toxicology. *Lab. Animal*. 29 (7):32-40.
- Olvera, H. (1998) Bioensayos para toxicidad acuática. Laboratorio Acuario. Universidad Nacional Autónoma de México. México. p. 1-5
- PNUMA y OMS-Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y Organización Mundial de la Salud (1980) Criterios de salud ambiental 6, Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Parte 1. Ed. PNUMA y OMS. EUA. 269 pp.
- Rivera, I. (2006) Determinación de la frecuencia de malformaciones en columna vertebral, opérculo y aleta en *Danio rerio* Hamilton 1822, como posibles bioindicadores en la valoración de daño teratogénico. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 73pp.
- Rodricks, J. (1992) Calculated risks, The toxicity and and human health risks of chemicals in our environment. Ed. Cambridge University Press, UK 256 p.
- Vega, S. (1990a) Toxicología IV Carcinogénesis química. Ed. Limusa. México. p. 423-481.
- Vega, S. (1990b) Toxicología V Genotoxicidad y daño al sistema reproductor. Ed. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. México. p. 485-552.
- Vera, G., Tam, J., Vera, V. y E. Pinto (2001) Pruebas ecotoxicológicas con cromo y cromo usado en postlarvas del pejerrey *Odontesthes (Austromeniidia)* regia regia Hildebrand. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM. 8(2):1-9
- Vettorazzi, G. (1992) Ensayos necesarios para la valoración toxicológica de las sustancias químicas. Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas y Organización Mundial de la Salud. Suiza. p. 67-75.

- Vogel, E. y E. Rivas, (1997) Contaminación del agua en: Ciencia Ambiental y Desarrollo Sostenible. Enkerlin, E., Cano, G., Garza, R. y E. Vogel, Ed. Thomson. México. p. 401-413.
- Weil, (1975) en: Toxicología prospectiva y seguridad química. Ed. Programa internacional de seguridad de las sustancias químicas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. México. p. 55.
- Woolley, A. (2003) A Guide to practical toxicology, Evaluation, Prediction and risk. Ed. Taylor y Francis. EUA. p. 11-134.

# ANEXO 1

## METODOLOGIA PRELIMINAR PARA EVALUAR PRESENCIA DE DISRUPTORES ENDOCRINOS EN EL DESARROLLO DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*)

### 1 OBJETIVO

Determinar la presencia de disruptores endocrinos en muestras líquidas empleando la técnica de transcripción reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en huevos del pez *Danio rerio*.

### 2 CAMPO DE APLICACION

Este método es aplicable para evaluar la toxicidad de sustancias químicas puras, aguas residuales domésticas e industriales, muestras de agua tratadas o no tratadas, aguas superficiales, subterráneas, lixiviados, extractos de sólidos, suelos y/o sedimentos entre otros.

### 3 DEFINICIONES

**Danio rerio.**- Conocido también como *Brachiodanio rerio*, es un pez que puede ser encontrado en aguas tropicales. Las rayas a lo largo de su cuerpo y aletas le dan el nombre común de pez cebra. Perteneciente a la familia de los ciprínidos, el tamaño que alcanzan estos peces en su fase adulta es de 3 a 5 cm de largo.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**- La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde.

**Vitelogenina.**- La vitelogenina es una proteína precursora de la formación del huevo, en las hembras de peces tropicales es común hallarla antes de la época de reproducción. También se han hallado peces machos con altos niveles de vitelogenina, lo que ha producido peces hermafroditas con los testículos llenos de huevas. Aparentemente este efecto es producido por contaminantes depositados en los cuerpos de agua.

**Tóxico de referencia.**- sustancia química pura utilizada en ensayos de toxicidad para determinar la sensibilidad de los organismos de prueba y validar las mediciones de toxicidad.

Agua deionizada.- es el agua que a través de purificación se le han removido los iones en solución, pasando a través de columnas de resina o sistema de ósmosis inversa.

Análisis replicado: Es la prueba realizada a una muestra en dos o más ocasiones durante la misma sesión de trabajo.

Control interno.- Sistema de prueba preparado con una solución, medio de proliferación o agente biológico que permite ajustar los valores obtenidos de la lectura del objetivo contra la referencia. El análisis del control se efectúa de forma conjunta con las muestras a determinar.

Cultivo.- Conjunto de plantas o animales que se mantienen bajo condiciones óptimas y controladas de desarrollo para promover la proliferación de organismos saludables.

Toxicidad.- Es la capacidad o potencialidad inherente de un material para causar efectos adversos en los organismos. En el caso de D. rerio el efecto es medido a través de la mortalidad que un compuesto o la mezcla de ellos pueda causar en una población controlada de organismos en cada experimento.

#### **4 FUNDAMENTO**

La prueba para evaluar la presencia de disruptores endocrinos en el desarrollo del pez cebra es un ensayo que permite determinar el daño potencial de una muestra. Cuando muestras líquidas conteniendo tóxicos biodisponibles son expuestas, el efecto ocasionado por el tóxico se refleja en la inducción de la vitelogenina 1 (vtg1) en relación a organismos no expuestos (control)

#### **5 EQUIPO**

Microcentrifuga refrigerada  
Balanza analítica de 2 kg. de capacidad y sensibilidad de  $\pm 0.1$  g.  
Campana de flujo laminar vertical con luz UV clase II.  
Homogenizador Vortex.  
Platina con termostato y agitador magnético.  
Termociclador  
Pantalla de transiluminación  
Equipo de electroforesis  
Refrigerador con congelador.  
Computadora  
Cámara fotográfica

#### **6 REACTIVOS**

6.1 Todos los reactivos utilizados deben tener grado Biología Molecular.

Para su preparación se recomienda usar agua destilada o desionizada.

Alcohol isopropílico.

Agua estéril.

Agarosa

Bromuro de etidio

Kit de extracción de RNA

Master Mix

Cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2$

Sulfato de magnesio  $\text{MgSO}_4$ .

Bicarbonato de sodio  $\text{NaHCO}_3$

Cloruro de potasio KCl

NaCl,

Azul de Metileno

La conductividad del agua deionizada no debe exceder de  $10 \mu\text{Scm}^{-1}$ .

## 7 MATERIAL

Pipetas de vidrio graduadas (de 5 mL y 10 mL)

Micropipetas de volumen variable de  $100\mu\text{L}$  con puntas desechables

Micropipetas de volumen variable de  $1000\mu\text{L}$  con puntas desechables

Probeta graduada de 50 mL

Vasos de precipitado de 200 mL

Parafilm

Espátula acanalada.

Gradillas para tubos eppendorf de diferentes tamaños.

Matraces erlenmeyer de 250 y 500 ml.

Micropipetas de volumen variable

Frascos de vidrio con tapa de rosca para autoclave

Tubos Eppendorf para centrifuga estériles de 3 mL

Tubos Eppendorf para centrifuga estériles de  $500 \mu\text{L}$

Tubos de polipropileno de 15 y de 50 mL

Puntas para micropipeta de diferentes volúmenes libres de RNasas

Material común de laboratorio

Guantes de Nitrilo libres de RNasas

### 7.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Cultivo de *D. rerio*  
Oligonucleotidos vtg1  
Oligonucleotidos  $\beta$ -actina

## 8. CONDICIONES DE LA MUESTRA

Las muestras deben mantenerse en recipientes adecuadamente lavados (Procedimiento CAHB3-04) y preservados en refrigeración o congelación, de acuerdo a las especificaciones señaladas en el procedimiento CAHB4-03.

Para determinar el tipo y volúmenes de recipientes de muestreo así como las formas convenientes de llenado consultar el procedimiento CAHB4-03.

## 9. INTERFERENCIA

9.1 Turbiedad en las muestras diluidas. Dejar sedimentar la muestra y emplear el sobrenadante

9.2 En caso de que la muestra contenga altas concentraciones de compuestos volátiles, es factible que la pérdida continua de estos agentes sean un factor de variabilidad que afecta la estabilidad de la respuesta y puede generar, en caso de análisis replicados, resultados poco consistentes. Para evitar dicha alteración se sugiere correr en paralelo a la muestra original, muestras aireadas por espacio de 1-2 h, de modo que los resultados de toxicidad que así se obtengan corresponderán a la fracción no volátil de la muestra.

## 10. PRECAUCIONES

10.1 Para el desarrollo de la prueba, el material que se haya utilizado debe ser lavado de acuerdo al procedimiento CAHB3-04 y se debe hacer énfasis en el mismo ya que pueden retenerse compuestos de difícil remoción y contaminar a la siguiente muestra generándose resultados erróneos.

## 11. PROCEDIMIENTO

Preparación del medio E3

NaCl 5mM  
KCl 0.17mM  
CaCl<sub>2</sub> 0.33mM

$\text{MgSO}_4$  0.33mM

Mezclar los compuestos y aforar a 1L de agua grado Biología Molecular

(a) Solución de Cloruro de Calcio

Disolver 11.76 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en agua deionizada; llevar a 1 litro.

(b) Solución de Cloruro de Magnesio

Disolver 4.93 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en agua deionizada; llevar a 1 litro.

(c) Solución de Bicarbonato de Sodio

Disolver 2.59 g de  $\text{NaHCO}_3$  en agua deionizada; llevar a 1 litro.

(d) Solución de Cloruro de Potasio

Disolver 0.23 g de  $\text{KCl}$  en agua deionizada; llevar a 1 litro

Todos los reactivos químicos deben ser grado analítico.

La conductividad del agua deionizada no debe exceder de  $10 \mu\text{Scm}^{-1}$ .

Se toman 25 mL de cada una de las soluciones (a-d) y se mezclan, llevar a un volumen total de 1L con agua deionizada. Airear el agua de dilución hasta lograr la saturación de oxígeno, de esta forma se podrá almacenar hasta por dos días sin una aireación intensiva antes de su uso.

Organismos de pruebas

Los organismos que se utilicen para las pruebas deberán ser obtenidos a partir de cultivos controlados de laboratorio los cuales a su vez se deberán obtener de granjas piscícolas.

El cultivo de *D. rerio* deberá mantenerse a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperíodo de 16h luz/8h oscuridad bajo una intensidad luminosa de 1000 lux.

Los peces deberán mantenerse en acuarios de 40L con una densidad poblacional de no más de 20 organismos por acuario empleando agua filtrada de la llave.

Obtención de huevos.

Se separan machos y hembras y se colocan por parejas (proporción 2:1) en el interior de una jaula incubadora, en una densidad de 9 organismos en total por cada acuario de 40L; esta operación provoca la expulsión de gametos masculinos y femeninos y permite la fecundación externa, los huevos fecundados atraviesan la jaula incubadora y se depositan en el fondo en un receptor de huevos que en este caso es un refractario de vidrio previamente desinfectados y posteriormente se sacan de los acuarios y se recogen por sifoneo. Se enjuagan con el medio E3

## Limpieza y alimentación

Se debe hacer limpieza todos los días excepto fines de semana. La alimentación se debe hacer todos los días tres veces por día con alimento en hojuelas o del que resulte más conveniente para la nutrición de los peces a una proporción de 0.3g/20 organismos

Al término de la limpieza se deberá recuperar el volumen de agua de cada acuario adicionando agua filtrada de la llave.

## Procedimiento de prueba

Los huevos se colectan inmediatamente después de la fertilización, se enjuagan con medio E3 y se colocan en las soluciones de exposición dentro de la primera hora después de la fertilización y antes del endurecimiento del corion. Los huevos y larvas se mantienen en grupos de máximo 50 organismos en 40 mL de solución en cajas de petri de vidrio con un fotoperíodo de 14:10 h luz: oscuridad y a una temperatura de 28°C. El medio de exposición se cambia diariamente a lo largo del ensayo y los huevos se transfieren a nuevas cajas petri que contienen solución fresca y previamente lavada, es muy importante retirar los coriones de huevos no fértiles y de los que han dejado las larvas, las muestras se toman después de cada 24 h hasta las 120 h. Todas las exposiciones de los ensayos se deberán hacer por triplicado.

## Aislamiento de RNA

Los huevos o larvas se toman a las 24, 48, 72, 96 y 120 h, se toman 20 de 50 organismos por grupo y se sacrifican. Se usan micro pistilos para romper los tejidos. El RNA se aísla usando 500 µL de TRIzol y 100 µL de Cloroformo. El RNA se precipita con 250 µL de isopropanol y se lava dos veces con 75% de etanol. Los pellets secos se disuelven en 15 µL de dietil pirocarbonato tratado. Se mide la densidad óptica a 260nm de las muestras de RNA y 500 ng por muestra se debe checar rutinariamente para evaluar su pureza y concentración en gel de agarosa al 1%.

## PCR tiempo real de transcripción reversa

El RNA total (1200 ng por muestra) se digiere con DNasa para mejorar la calidad de la muestra y entonces 1000 ng de la Dnasa digerida se transcribe reversamente usando ImPromII en un volumen final de reacción de 20 µL con los primers. El PCR tiempo real se usa empleando Master Mix TaqMan universal, No amperasa UNG con 50 ng de cDNA por reacción en el termociclador.

Agregar a un tubo eppendorf de 500 µl 12,5 del Master Mix, 1,0 µl del oligonucleotido vtg1 y 1,0 µl del oligonucleotido β-actina, 0,5 µl de agua libre de Dnasas, y 10 µl del RNA de la muestra.

Previamente al Termociclador se le debe insertar el programa para el corrimiento del RT-PCR. El programa es el siguiente:

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	No. de Ciclos
1	95	2 min	1
2	95	15 seg	40
	60	1 min	
3	50	10 min	1

Todas las muestras se analizan por triplicado en placas de 96 pozos con un volumen final de 25µL.

## 12. Expresión de resultados

La expresión de la media normalizada (EMN) del vtg1 se calcula con relación a la abundancia de la β-actina, de tal forma que se calcula la abundancia del mRNA sobre la base de la eficiencia de la reacción de la amplificación del PCR específicamente para cada gen y así se le relaciona con lo calculado para la abundancia del mRNA del gen de referencia. La expresión de la β-actina es usada como un control interno para la normalización. Como parte de la muestra examinada, esto compensa la variable que trata la eficacia en la normalización. La EMN es:

$$EMN_{\text{objetivo}} = \frac{(E_{\text{objetivo}})^{UC_{\text{objetivo}}}}{(E_{\text{referencia}})^{UC_{\text{referencia}}}}$$

Donde E es la eficiencia medida y UC es el umbral de ciclo medio de las reacciones de las tres replicas corridas en una placa de PCR.

## 13. MANEJO DE INFORMACIÓN Y RESULTADOS

La información obtenida se interpretara de la siguiente forma:

Debido a que en los huevos o larvas del pez cebra no debe existir la inducción del gen vtg1, en las muestras analizadas a diferentes diluciones en la que se encuentre dicha inducción con el RT-PCR, se reportará como un resultado positivo a presencia de estrógenos.

Los registros impresos generados, se archivarán por proyecto y/o control en carpetas adecuadamente identificadas y pueden ser acompañados de los reportes de resultados internos.

Los archivos impresos se archivarán ordenados por No de control y/o fecha, en carpetas electrónicas contenidas en memoria USB o bien en discos duros ya sean de la PC o externos. Esta información será resguardada en la Subcoordinación de Calidad del Agua. Para su consulta por personal no autorizado se requerirá previa aprobación del responsable de prueba.

#### 14. BIBLIOGRAFÍA

- APHA, 1995. Standard Methods for the Examination of Water, Wastewater and Sediments. 19<sup>th</sup> Ed. Washington, D.C.
- IMTA, Pruebas de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna*. CAHB6-04, Laboratorio de Calidad del Agua. Edición 2004.
- U.S. EPA. 1992. Short-Term Methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, EPA-600/4-91-022. 3th Edition. Philip Lewis A. L., Klem D.J., Lazorchak J.M.
- Organization for the Economical Cooperation and Development (OECD). 1992. Fish acute toxicity test. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 203
- Wahli W. 1988. Evolution and expression of vitellogenin genes. Trends Genet 4:227–232.
- Lazier C, MacKay M. 1993. Vitellogenin gene expression in teleost fish. In Hochachka PW, Mommsen TP, eds, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol 2—Molecular Biology Frontiers. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp 391–405.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Fish acute toxicity test, freshwater and marine. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.1075. EPA 712–C–96–118.
- Tong Y, Shan T, Poh YK, Yan T, Wang H, Lam SH, Gong Z. 2004. Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17  $\beta$ -estradiol. Gene 328:25–36.
- Sumpter J.P., Jobling S. 1995: Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives 103, 173–178.