



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – AGUA

**EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LA CARBAMAZEPINA Y LOS
NONILFENOLES EN AGUA**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN INGENIERÍA

P R E S E N T A:
I.A. ASTRID YOHANA QUINTERO VARGAS

TUTOR PRINCIPAL
DRA. ALMA CONCEPCIÓN CHÁVEZ MEJÍA, INSTITUTO DE INGENIERÍA
COMITÉ TUTORAL
DRA. GABRIELA ELEONORA MOELLER CHÁVEZ, U. POLITÉCNICA MORELOS
DRA. MARÍA ANTONIETA GÓMEZ BALANDRA, IMTA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., enero 2017

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Gómez Balandra María Antonieta
Secretario: Dra. Orta Ledesma María Teresa
Vocal: Dr. Garzón Cortés Víctor Daniel L.
1er. Suplente: Dra. Moeller Chávez Gabriela Eleonora
2do: Suplente: Dra. Chávez Mejía Alma Concepción

Lugar donde se realizó la tesis:
Laboratorio de Ingeniería Ambiental, Instituto de Ingeniería, UNAM.

TUTOR DE TESIS

Dra. Alma Concepción Chávez Mejía

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

- A México por la oportunidad para que los estudiantes extranjeros podamos continuar nuestra formación profesional en posgrados con los apoyos económicos que nos facilitan alcanzar la meta.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para llevar a cabo mis estudios de maestría y la estancia de investigación.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por darme la oportunidad de complementar mi formación profesional.
- Al Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme todas las herramientas para realizar la tesis.
- Al Grupo de Tratamiento y Reúso del Instituto de Ingeniería de la UNAM, los investigadores y estudiantes, por el espacio tan agradable, las herramientas, el apoyo y la amistad brindada.
- Al Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM, por brindarme todas las herramientas y conocimientos necesarios para llevar a cabo la experimentación de la tesis.
- Al Bioterio y Laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas por todo el apoyo brindado, sus enseñanzas y herramientas para concluir parte de la experimentación de la tesis.
- Al Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Barcelona España, por haberme dado la oportunidad de realizar la estancia académica, por las enseñanzas y las herramientas brindadas para complementar la investigación de esta tesis.
- Al Biólogo Isaac Ramos, por el apoyo, las enseñanzas, la paciencia y la dedicación en el trabajo para hacer posible esta tesis.
- A mi tutora la Dra. Alma Concepción Chávez Mejía por el apoyo, los consejos y la asesoría para la realización de esta tesis.
- A las Dras. Gabriela Eleonora Moeller Chávez y María Antonieta Gómez Balandra por la permanente orientación en el Comité Tutoral y sus valiosos aportes para mejorar el trabajo realizado en la tesis.

- Al Dr. Daniel Garzón Cortés por la paciencia en sus enseñanzas, por aportar sus amplios conocimientos y su valioso tiempo para complementar la tesis.
- A la Dra. María Teresa Orta Ledesma, por el apoyo y los aportes realizados a esta tesis.
- A la maestra Cristina Aráoz Trejo, por la paciencia para orientarnos en los temas administrativos durante todo el proceso y por su buena disposición y energía.
- A la Dra. Julieth Marcela Díaz Masmela, del Laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por el apoyo, los conocimientos y las herramientas brindadas para realizar una parte de la experimentación de esta tesis.
- Al Dr. Guillermo Aquino Jarquín, de la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, por todo el apoyo brindado para realizar una parte de la experimentación de esta tesis.
- Al Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra, y a la Maestra María Manuela Nájera Martínez, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, por todo el apoyo brindado para culminar una parte de la experimentación de esta tesis.
- Al Dr. Benjamín Piña i Capó, del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Barcelona España, por haberme dado la oportunidad de realizar la estancia de investigación en su grupo de trabajo, de aprender y aplicar los conocimientos en las instalaciones de sus laboratorios, y por su sincera amistad.
- A la Dra. Marta Casado Belloso, del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Barcelona España, por tanto apoyo para el análisis de los resultados obtenidos durante la estancia de investigación, infinitas gracias por la dedicación y el cariño.
- A la Dra. Laia Navarro Martín, del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Barcelona España, por todo su apoyo y sus enseñanzas durante la estancia de investigación, y por su bonita amistad.
- A mis grandes amigas de la maestría Paloma Zaragoza, Roxana Martínez y Zulma Otálora, por haberme acompañado en todo el proceso, por el apoyo incondicional, la confianza, los bellos momentos compartidos y por su bonita amistad.
- A esos amigos que se convirtieron en una familia para mí, Rayner, Yadira, Iván, Dimitriv, Álvaro y Creagh, por su sincera amistad, su buena energía y actitud en todo momento.

- A todos mis amigos y compañeros de la maestría y de la estancia de investigación, especialmente a Jorge, Ulises, Nere, Maya, José Luís, Carolina, Liz, Martín, Fidel, Osiel, Emilio, Paola, Erick, Javier y Aurora, gracias por tantos buenos momentos compartidos, por los bellos recuerdos, las risas, la amistad que ojalá perdure en el tiempo y la distancia.
- A mi bella amiga Vicky, por el apoyo y la confianza, por su constante motivación para que continuara adelante con este proyecto de vida, y especialmente por su incondicional amistad.

DEDICATORIA

- ❖ A mi esposo Eder Fernando Gómez Aguilar, por su permanente apoyo, sus palabras de motivación, su paciencia y su dedicación para ayudarme a crecer personal y profesionalmente, su confianza y empeño para cumplir este sueño mutuo y seguir alcanzando las metas que nos fortalecen y nos impulsan a continuar el camino que juntos emprendimos.
- ❖ A mi madre Gloria Vargas y mi padre Arnoldo Quintero, por darme la vida, por confiar en mí y creer en mis capacidades, por su motivación y el amor que me brindan, porque son la base fundamental de mi proyecto de vida.
- ❖ A mis hermanitos Willian y Preyler, por sus palabras de aliento, su motivación, la confianza y la comprensión, y por el gran amor que nos tenemos.
- ❖ A mi sobrinita Wendy, que es mi alegría, mis sueños y mi motivación, porque me inspira y me llena de felicidad.
- ❖ A mi maestro de vida Iván Escobar R., quien me enseñó a ver el mundo de otra manera, a quien evoco para retomar fuerzas y volver a creer en el mundo en que vivimos, y encontrar lo más maravilloso en lo más simple.
- ❖ A mis padres adoptivos catalanes, Carmen Manich y Ramón Ferrerons, por recibirme en su casa como parte de su familia, por tanta confianza y tanto amor que me brindaron.

- ❖ A toda mi familia, mis tías, tíos, primas y primos, por la confianza que me tienen, por el amor incondicional.
- ❖ A mis grandes amigas, Catalina Guerra, Yurany Villada, Adriana Gómez, Paola Londoño y Aleida Cárdenas, que a pesar del tiempo y la distancia siempre están ahí apoyándome y creyendo firmemente en mí, gracias por tan linda amistad.

EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LA CARBAMAZEPINA Y LOS NONILFENOLES EN AGUA

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Objetivos	14
1.2. Justificación	15
1.3. Metas	16
1.4. Hipótesis	17
1.5. Alcances	17
CAPÍTULO 2	18
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1. Generalidades de la contaminación ambiental	18
2.2. Contaminantes emergentes	22
2.3. Disrupción endócrina	24
2.4. Disruptores endocrinos	25
2.5. Nonilfenoles	29
2.6. Carbamazepina	33
2.7. Ecotoxicidad	35
2.7.1. <i>Ecotoxicidad por evaluación de VTG en pez cebra - OCDE 230</i>	38
2.8. Biología y características específicas del pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	40
2.9. El pez cebra como organismo modelo en el estudio de la actividad endocrina	44
2.10. El pez cebra como biosensor de los efectos de EDC	45
2.10.1. <i>Biomarcadores específicos</i>	47
2.11. Ensayo de ELISA	48
2.12. Vitelogenina (VTG)	51
2.12.1. <i>Metabolismo de la VTG en el pez cebra</i>	52
2.13. Pruebas de comportamiento en larvas de pez cebra	53
2.14. PCR en tiempo real para evaluación ecotoxicológica	55

2.15.	Antecedentes y la importancia de este estudio	61
3.	METODOLOGÍA	63
3.1.	Evaluación ecotoxicológica de la CBZ y los NP con pruebas de ELISA – OCDE 230	63
3.1.1.	<i>Adquisición de peces y aclimatación</i>	66
3.1.2.	<i>Preparación y composición de matrices: agua sintética, agua de manantial y pozo</i>	68
3.1.2.1.	<i>Preparación agua sintética semidura dopada con CBZ, NP y 17 β - Estradiol</i>	69
3.1.2.2.	<i>Toma de muestras de agua de manantial y de pozo profundo</i>	72
3.1.3.	<i>Montaje experimental: sistema de flujo continuo, sistema de iluminación, control de temperatura y suministro de oxígeno</i>	74
3.1.4.	<i>Distribución de peces por tratamiento</i>	76
3.1.5.	<i>Operación del sistema experimental y parámetros de control</i>	77
3.1.6.	<i>Necropsia de peces y toma de muestras</i>	79
3.1.7.	<i>Pruebas de ELISA</i>	80
3.2.	Evaluación de comportamiento y PCR, en embriones de pez Cebra (Estudios realizados en estancia).....	83
3.2.1.	<i>Apareamiento de peces y puesta de huevos</i>	86
3.2.2.	<i>Pruebas de comportamiento en embriones de pez cebra</i>	87
3.2.3.	<i>PCR RT</i>	93
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96
4.1.	Evaluación ecotoxicológica de la CBZ y los NP con pruebas de ELISA – OCDE 230	96
4.1.1.	<i>Calidad fisicoquímica del agua</i>	96
4.1.2.	<i>Cuantificación de VTG mediante ELISAS</i>	102
4.1.3.	<i>Determinación de VTG con ELISA</i>	103
4.1.4.	<i>Expresión de genes con PCR en tiempo real</i>	111
4.1.5.	<i>Pruebas de comportamiento de peces expuestos</i>	116
CAPÍTULO 5 – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		126
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	126
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		129

Índice de Tablas

Tabla 1. Listado de algunos disruptores endocrinos definidos por la Comisión Europea.....	28
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del nonilfenol (García, 2010)	30
Tabla 3. Ventajas y desventajas de pruebas para evaluar Ecotoxicidad	36
Tabla 4. Ventajas y desventajas de guías de la OCDE para ecotoxicidad. (OCDE, 2012)	37
Tabla 5. Directrices de pruebas (TG) para evaluación de toxicidad. (OCDE, 2012)	39
Tabla 6. Características fisicoquímicas del hábitat preferido por el pez cebra	41
Tabla 7. Tratamiento taxonómico del género Danio (Lozada et al., 2012)	43
Tabla 8. Criterios para aceptar o rechazar el lote de peces según la mortalidad.....	68
Tabla 9. Composición de agua sintética semidura.....	69
Tabla 10. Concentraciones de CBZ y NP en diferentes matrices	70
Tabla 11. Información ecológica de la CBZ.....	70
Tabla 12. Información ecológica de los NP	71
Tabla 13. Toxicidad de peces expuestos a nonilfenol (EPA, 2010)	71
Tabla 14. Tratamientos con las concentraciones de CBZ y NP a evaluar	72
Tabla 15. Número de peceras y tratamientos correspondientes a cada una	77
Tabla 16. Configuración de los experimentos y concentraciones usadas.....	85
Tabla 17. Análisis fisicoquímicos del agua de salida (inicial).....	97
Tabla 18. Resultados de dureza para agua de salida (inicial).....	97
Tabla 19. Análisis fisicoquímicos de muestra de agua 1 (semana 1)	98
Tabla 20. Resultados de dureza para el agua de la muestra 1 (semana 1)	99
Tabla 21. Análisis fisicoquímicos de muestra de agua 2 (semana 2)	100
Tabla 22. Análisis fisicoquímicos de muestra de agua 3 (semana 3)	100
Tabla 23. Análisis fisicoquímicos de muestra de agua 2 (semana 2)	101
Tabla 24. Análisis fisicoquímicos de muestra de agua 3 (semana 3)	101
Tabla 28. Ejemplo de datos obtenidos por larva en evaluación de comportamiento	117

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Ejemplo de la curva estándar para la placa 1	102
Gráfico 2. Niveles de VTG de machos expuestos a los tratamientos estudiados	105
Gráfico 3. Niveles de VTG de hembras expuestas a los tratamientos estudiados	108
Gráfico 4. Niveles de VTG de todos los peces expuestos a los tratamientos evaluados (cbz: carbamazepina, np: nonilfenoles)	109
Gráfico 5. Copias normalizadas GSTP2 contra 1000 copias de ELF	112
Gráfico 6. Copias normalizadas GSTP2 contra 1000 copias de PPIA.....	113
Gráfico 7. Valores promedio de copias para gstp2	113
Gráfico 8. Copias normalizadas cyp19a1b contra 1000 copias de ELF	114

Gráfico 9. Copias normalizadas cyp19a1b contra 1000 copias de PPIA.....	114
Gráfico 10. Valores promedio de copias para cyp19a1b	115
Gráfico 11. Eficiencia para GStp2. Reporta un valor muy bajo de eficiencia de 0.510	115
Gráfico 12. Distancia recorrida por larvas expuestas a CBZ.....	119
Gráfico 13. Velocidad de movimiento de larvas expuestas a CBZ	119
Gráfico 15. 1Velocidad - CBZ - Experimento 1.....	120
Gráfico 14. Distancia recorrida - CBZ - Experimento 1.....	120
Gráfico 16. Distancia recorrida - CBZ – Experimento 2	120
Gráfico 17. Velocidad - CBZ - Experimento 2.....	120
Gráfico 19. Distancia recorrida - CBZ – Experimento 3	121
Gráfico 18. Distancia recorrida - CBZ - Experimento 3.....	121
Gráfico 21. Velocidad - NP - Experimento 1	123
Gráfico 20. Distancia recorrida - NP - Experimento 1	123
Gráfico 22. Distancia recorrida - NP - Experimento 2	124
Gráfico 23. Velocidad - NP - Experimento 2	124
Gráfico 24. Distancia recorrida - NP - Experimento 3	124
Gráfico 25. Velocidad - NP - Experimento 3	124

Índice de Figuras

Figura 1. Biología y metabolismo de la VTG en los peces	44
Figura 2. Esquema de síntesis de la VTG en los peces	52
Figura 3. Ruta de hormonas para la reproducción en los peces	53
Figura 4. Cámara de observación	55
Figura 5. Placa instalada.....	55
Figura 6. Esquema general de la Guía Técnica OCDE - TG – 230 (2009)	64
Figura 7. Unidad de Producción Acuícola Miacatlán	66
Figura 8. Estanque de reproducción	66
Figura 9. Preparación de peceras para el periodo de aclimatación.....	67
Figura 10. Preparación de peceras para el periodo de aclimatación.....	67
Figura 11. Manantial Cerro Colorado, Valle de Tula. Estado de Hidalgo, México	73
Figura 12. Agua superficial del manantial Cerro Colorado.....	73
Figura 13. Toma de muestra pozo profundo.....	74
Figura 14. Pozo para agua potable comunidad de Teocalco de Tula.....	74
Figura 15. Suministro de agua a través del flujo continuo.....	75
Figura 16. Tirante de pecera: 5L, nivel de salida de agua constante	75
Figura 17. Montaje completo para Sistema experimental – ecotoxicidad con modelo <i>Danio rerio</i>	76
Figura 18. Disección de peces - Bioterio Instituto de Investigaciones Biomédicas	80
Figura 19. Extracción de hígado, cabeza y cola	80

Figura 20. Prueba de ELISA (Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas)	81
Figura 21. Sobrenadante muestras hígados.....	82
Figura 22. Lavado de pozos ELISA	82
Figura 23. Anticuerpos ELISA.....	82
Figura 24. Relleno de pozos ELISA	82
Figura 25. Lectura de placas de ELISA	83
Figura 26. Equipo Thermo Scientific	83
Figura 27. Preparación de concentraciones de CBZ y NP.....	86
Figura 28. Cámaras de cría	87
Figura 29. Huevos de pez cebra.....	87
Figura 30. Incubadoras de larvas	87
Figura 31. Placa de 6 pozos (2 filas x 3 columnas) para exposición de larvas	88
Figura 32. Placa de 48 pozos con una larva en 800µL de solución en cada pozo.....	89
Figura 33. Programación en EthoVision para pruebas de comportamiento.....	89
Figura 34. Equipo Danio Vision para pruebas de comportamiento.....	90
Figura 35. Placa instalada para prueba de comportamiento	90
Figura 36. Dosis de CBZ para pruebas de comportamiento	91
Figura 37. Placas de experimento 3, cinco réplicas de cada una.....	92
Figura 38. Malformación de larvas por altas concentraciones de NP.....	93
Figura 39. Distribución de muestras para PCR	94
Figura 41. Imagen capturada por equipo Danio Visio durante prueba de comportamiento.....	117
Figura 42. Letalidad de larvas a 1000 µg/L de NP.....	125

EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LA CARBAMAZEPINA Y LOS NONILFENOLES EN AGUA

RESUMEN

La evaluación ecotoxicológica permite identificar el efecto que puede generar la presencia de un contaminante en organismos vivos y los ecosistemas. En tal sentido, en el presente estudio se analizó el potencial de distintas concentraciones de carbamazepina (CBZ) y nonilfenol (NP) con el objetivo de conocer si son capaces de generar efectos en *Danio rerio*, mediante la determinación de una batería de biomarcadores: niveles de Vitelogenina (VTG) en hembras y machos adultos, expresión génica y movilidad en estadio larvario. Para medir los niveles de VTG se siguió la guía técnica 230 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), se realizó un estudio in vivo de un stock de peces adultos que se mantuvieron en condiciones controladas expuestos durante 21 días a tres concentraciones diferentes de los dos contaminantes evaluados en agua sintética semidura, además de agua de manantial y pozo obtenida del acuífero del valle de Tula, México. Posteriormente se cuantificó la producción de VTG en los peces a partir de pruebas ELISA la cual da certeza de si los contaminantes evaluados son disruptores endocrinos (DE). Para la expresión génica se utilizó PCR-RT para cuantificar la expresión de los genes *cyp19a1b* y *gstp2* responsables de la producción de VTG en los peces cebrá y determinar si interferían con su expresión. Por su parte, en las pruebas de comportamiento se expuso a larvas de *D. rerio* a distintas concentraciones de CBZ y NP durante cuatro horas, y durante el día 2 posterior a la fertilidad y hasta el día 5, después de transcurrido el tiempo de exposición se procedió a realizar la prueba de comportamiento en donde se hizo una programación definida con una configuración de 50 minutos de prueba, los cuales consistieron en 20 minutos de oscuridad, 10 minutos de luz y 20 minutos de oscuridad para observar si en las concentraciones usadas había efectos en la distancia y velocidad recorridas por las larvas. Los resultados concernientes a los estudios de los compuestos en agua sintética con CBZ como disruptor endocrino utilizando la producción de la proteína Vitelogenina (VTG) como biomarcador, observaron un aumento en la producción de VTG en machos bajo el tratamiento de CBZ demostrando que la CBZ a una concentración de 0.2 µg/L aumenta la producción de VTG y altera el sistema endocrino de los peces responsable de su producción lo que lo califica como un posible DE. Por su parte, se confirma, que el NP es un DE a concentraciones muy bajas 2.5 µg/L, 5 µg/L y 10 µg/L siendo el segundo tratamiento, 5 µg/L de NP, el que mostró el nivel más alto de VTG inducida en todos los tratamientos para machos con 4225 ng/mL. La expresión de genes por la presencia de carbamazepina y nonilfenoles mediante PCR en tiempo real no fue cuantificable existiendo interferencias en el procedimiento de

fluorescencia. Por lo tanto, para los tratamientos de CBZ y NP aplicados en las larvas no fue posible observar los efectos en la expresión génica. El efecto en el comportamiento de larvas de pez cebra, expuestas a diferentes dosis de carbamazepina (CBZ) altera la actividad locomotora a dosis mayores, aumentando la motricidad del pez cebra especialmente en los minutos de luminosidad. Por su parte NP inhibió la movilidad del pez cebra a 100 µg/L de concentración.

1. INTRODUCCIÓN

Muchos contaminantes afectan hoy en día al medio ambiente. En la actualidad y gracias al desarrollo de técnicas para cuantificarlos, se conoce un gran número de sustancias químicas artificiales, que vertidas al medio ambiente tienen el potencial para perturbar los sistemas de los organismos. Entre ellas, se encuentran sustancias persistentes, bioacumulativas (fungicidas, herbicidas e insecticidas), sustancias químicas industriales, productos sintéticos y metales pesados (Bridges y Bridges, 2004; Mastandrea et al., 2005). También sustancias que modifican o alteran el sistema endocrino de los organismos denominados disruptores endocrinos (DE) encontrados en el medio acuático como los esteroides estrogénicos, entre los que se encuentra el 17β-estradiol, estrona, estriol, los cuales están presentes en los drenajes en concentraciones bajas (µg/L y ng/L) (Hyndman et al., 2010). Es de especial atención poner énfasis en el estudio de su presencia y persistencia ya que en su gran mayoría no se encuentran regulados y algunos son clasificados como Contaminantes Emergentes (CE's) que engloba productos de cuidado e higiene personal, los fármacos y algunos compuestos que pueden o ya se encuentren clasificados como disruptores endócrinos (EPA, 2003).

La contaminación ambiental se define como la introducción directa o indirecta por humanos de sustancias o energía que tienen como resultado efectos nocivos en los ecosistemas y en la salud humana. A este respecto, muchos fármacos se liberan al medio ambiente, principalmente en medios acuáticos como en el agua residual que se reincorpora al ambiente lo que los convierte en agentes contaminantes, a través de excreciones humanas y animales, desechos y subproductos industriales denominándolos xenobióticos. La presencia de principios activos farmacéuticos en el medio ambiente es cada vez más preocupante. Se han observado diversos efectos nocivos de varios grupos terapéuticos tales como los agentes citotóxicos, los antibióticos, los medicamentos hormonales, los productos de cuidado y aseo personal y los antidepresivos, sobre la reproducción, fallo renal, muerte, resistencia a antibióticos y desórdenes endócrinos en diferentes especies

animales. Aunque no hay evidencia suficiente, dichos efectos nocivos pueden, sin duda, extrapolarse a la salud humana. En los últimos años, la variedad y cantidad de xenobióticos ha mostrado estar en aumento.

En este punto, es importante notar que los patrones de acumulación de los xenobióticos no son los mismos para organismos diferentes, sino que dependen del balance entre asimilación, metabolización, y tasas de eliminación. Tomando en cuenta las diferencias en la forma en la que los xenobióticos son asimilados, metabolizados, y eliminados no sólo la concentración de varios contaminantes en el tejido en organismos expuestos debería ser medida, sino también el impacto o efecto que estas sustancias inducen a nivel bioquímico y molecular. Esto a su vez lleva a la necesidad de desarrollar biomarcadores moleculares y bioquímicos para detectar efectos nocivos en tales organismos.

La toxicología ambiental permite analizar los efectos de los contaminantes como la carbamazepina y el nonilfenol, compuestos que son de particular interés en este estudio evaluando la naturaleza de estos y las dosis que afectan a los organismos vivos expuestos. Hay diferentes maneras de determinar los efectos ecotoxicológicos de los contaminantes en los organismos vivos como por ejemplo la alteración del sistema endocrino que para este estudio se evalúa mediante la medición de los niveles de vitelogenina (VTG), de igual manera el comportamiento de organismos expuestos y la expresividad génica. Se hace imperativo, por lo tanto, realizar estudios ecotoxicológicos con la finalidad de demostrar su inocuidad o daños a la salud buscando generar conocimiento sobre sus posibles efectos tóxicos, agudos y crónicos.

Por otro lado, ante la problemática de escasez de agua, el reúso de agua representa una alternativa viable al empleo de agua de primer uso en actividades cotidianas (Jiménez y Chávez, 2003), sin embargo, el principal problema que presenta usar agua residual que ha sido depurada naturalmente y por medios no convencionales como como es el caso del acuífero del valle de Tula, que se alimenta del agua residual utilizada para riego agrícola, son los contaminantes emergentes. En efecto, este acuífero es recargado artificialmente por agua residual sin tratamiento donde Chávez y colaboradores (2011) reportan la presencia de compuestos orgánicos considerados como Contaminantes Emergentes (CE's). A pesar de eso el agua se utiliza como fuente de abastecimiento local de más de 800,000 habitantes. Dentro de la zona de estudio, el manantial más importante del Valle de Tula es el denominado "Cerro Colorado" considerado como una fuente alternativa de agua, además la recarga se infiltra en el subsuelo y da origen también a pozos de los que de igual forma se extrae agua para diversos usos (urbano e industrial).

Por la anterior, el propósito de la presente investigación fue evaluar distintas concentraciones de dos contaminantes, carbamazepina (CBZ) y nonilfenol (NP) para determinar su efecto en organismos de la especie *Danio rerio* en diferentes pruebas ecotoxicológicas cuya metodología está bien determinada y especificada para generar información útil en cuanto al comportamiento de estos CE's y sus posibles efectos en matrices de agua sintética.

1.1. Objetivos

1.1.1 *Objetivo General*

Evaluar el efecto ecotoxicológico de dos contaminantes emergentes, carbamazepina y nonilfenoles, sobre los organismos en un modelo de pez (*Danio rerio*), mediante la medición de Vitelogenina (VTG).

1.1.2 *Objetivos específicos*

- Determinar la actividad de disrupción endocrina de la carbamazepina y los nonilfenoles en tres concentraciones diferentes, y de las matrices de agua de manantial y de pozo, mediante la medida de la producción de la VTG.
- Diseñar un conjunto de ensayos ecotoxicológicos que midan el daño potencial de los compuestos en estudio presentes en agua a diferentes concentraciones.
- Determinar el efecto mediado por test de comportamiento en embriones y larvas de pez cebra, expuestos a diferentes dosis de carbamazepina y nonilfenoles.
- Determinar la alteración de la expresión de genes por la presencia de carbamazepina y nonilfenoles mediante PCR en tiempo real.

1.2. Justificación

En la última década, se ha reportado la presencia de compuestos xenobióticos en agua (residual y tratada), así como en cuerpos superficiales, algunos de ellos son fármacos, hormonas y productos de uso común los cuales son llamados contaminantes emergentes, por encontrarse en concentraciones que van desde pg/L o ng/L a $\mu\text{g/L}$ y por la capacidad de algunos de afectar la fisiología de diversas especies (Barceló, 2003).

Entre estos compuestos destaca la carbamazepina, en adelante CBZ, por ser un contaminante emergente difícil de remover (Gibson et al., 2010) y los nonilfenoles, en adelante NP, por ser compuestos tóxicos que generan disrupción endocrina (Van den Belt et al., 2003). Una característica de éstos compuestos es que no necesitan tener una alta persistencia para causar efectos no deseados, debido a que su tasa de transformación/remoción es compensada por la facilidad en que reingresan al sistema, en contraparte, los datos sobre su presencia, riesgo y ecotoxicidad aún son escasos, haciendo difícil predecir sus efectos en la salud de los seres humanos y organismos acuáticos (Barceló, 2003).

La carbamazepina se reportada peligrosa para la salud humana a dosis superiores a 20 mg/L (Valencia & Legido., 2009) y los nonilfenoles se reportan peligrosos para los peces a dosis entre 17 a 3000 $\mu\text{g/L}$ (Félix, 2009). En el caso de México y para matrices líquidas se reportan concentraciones de CBZ de 412 ng/L en agua residual y de 40 ng/L en agua de manantial mientras que para el nonilfenol se reportan concentraciones de 20,802 ng/L en agua residual, 1,000 ng/L en efluentes secundarios y 163 ng/L en agua de manantial (Chávez et al., 2013).

Debido al creciente aumento en la demanda de agua de calidad para satisfacer las necesidades de la humanidad (como el riego agrícola y la recarga artificial de los mantos acuíferos), el estrés hídrico al que están sometidas las regiones que abastecen de agua a la población mundial ha aumentado en la última década (Prigent et al., 2012; Vörösmarty, et al., 2000), por lo que en la actualidad, la concepción de los diseños de potabilización debe considerar estudios ecotoxicológicos como herramienta para determinar la confiabilidad del agua en términos seguros tanto para la población como para el ambiente, (Papadopoulou et al., 2007).

Los fármacos ingeridos y metabolizados por la población y los animales domésticos son eliminados a través de la orina y las heces fecales al sistema de drenaje y alcantarillado

hasta llegar a las plantas de tratamiento, siempre y cuando se cuente con esta tecnología, en la cual, idealmente, serían removidos garantizando así agua segura para la población; sin embargo, al no ocurrir dicha remoción, se han encontrado efectos nocivos que han modificado la dosis humana de referencia (HRD por sus siglas en inglés), referido a la cantidad mínima en la cual un compuesto causa daños a la salud, y se ha encontrado que la exposición de células embrionarias a mezclas de antiinflamatorios en dosis subterapéuticas retrasa el crecimiento del embrión (Pomati et al., 2006).

Se hace necesario profundizar en los estudios y generar evidencia sobre los efectos ecotoxicológicos que pueden causar los contaminantes emergentes que no logran removerse mediante tratamientos convencionales y en muchos casos en tratamientos avanzados de agua residual (Zhang et al., 2008), como es el caso de la CBZ que presentan una alta persistencia en el agua residual (Drewes et al., 2002) y los NP que han sido estudiados en varias investigaciones por ser disruptores endocrinos (Lavado et al., 2004), encontrándose valores significativos en efluentes terciarios aún después de ser pasados por tratamientos avanzados, pues su degradación es difícil de conseguir mediante tratamientos convencionales y en el caso de los NP su uso ya ha sido regulado en algunos países en Europa debido a los efectos perjudiciales que ocasiona en los ecosistemas (Lavado et al., 2004). Por ello, al mostrar los efectos ecotoxicológicos que pueden causar estos dos contaminantes emergentes se está haciendo un aporte significativo a la ingeniería ambiental ya que conociendo el problema podrían ser incluidos en futuras regulaciones sobre su uso y los tipos de tratamiento que debe dárseles para evitar que afecten la salud humana y el ambiente.

1.3. Metas

- Determinación de los efectos ecotoxicológicos en un modelo de pez (*Danio rerio*) para generar conocimiento sobre la toxicidad de la carbamazepina y los nonilfenoles.
- Realizar un conjunto de ensayos ecotoxicológicos capaces de medir el daño potencial de los compuestos en estudio presentes en agua dopada con diferentes concentraciones de contaminantes.
- Aportar evidencias para una posible inclusión de los contaminantes emergentes en futuras regulaciones.

1.4. Hipótesis

La producción de la proteína VTG (Vitelogenina) aumenta en los peces Cebra (*Danio rerio*) expuestos a concentraciones de carbamazepina y nonilfenoles, indicando efectos de disrupción endocrina.

1.5. Alcances

- La investigación abarca únicamente a los compuestos CBZ y NP y a las metodologías empleadas para determinar toxicidad crónica de estos en peces *Danio rerio* adultos y larvas.
- La trascendencia de esta investigación radica en concientizar a los investigadores y a las instituciones a los que estos pertenecen sobre la importancia de generar metodologías específicas para realizar estudios ecotoxicológicos de los contaminantes emergentes para evaluar y brindar posibles servicios que ayuden a mejorar la calidad del agua que se consume dentro de las localidades y extrapolar ese conocimiento a distintas áreas donde se haya reportado la existencia de contaminantes emergentes dentro de matrices ambientales. Esto con el fin de sentar precedentes que clarifiquen el conocimiento sobre estos compuestos, sus daños a la salud humana y al ambiente permitiendo la formulación de una legislación adecuada.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

Para llevar a cabo la evaluación ecotoxicológica de los contaminantes emergentes es necesario conocer las bases teóricas que engloba este tema, partiendo desde aspectos generales que describan su importancia, las especies químicas que han sido identificadas como sustancias con potencial nocivo para el medio ambiente y la sociedad, las políticas y acuerdos internacionales hechos para abordar la problemática que implica la contaminación del medio ambiente.

El estudio de los efectos ocasionados por los contaminantes emergentes y los disruptores endocrinos en los organismos vivos y el medio ambiente requiere el conocimiento particular de las características propias de las sustancias químicas evaluadas, en este caso la carbamazepina y los nonilfenoles, con el fin de saber su composición química y sus propiedades en general. De igual manera es importante conocer los aspectos involucrados en el tipo de evaluación que se está realizando, como es la incidencia en la alteración de los procesos biológicos referentes al sistema endocrino del organismo estudiado (pez cebra), así como la biología y las características específicas de esta especie. Además, es necesario explicar las metodologías empleadas para determinar los efectos de las sustancias estudiadas, tales como las pruebas ELISA que permiten cuantificar vitelogenina, PCR TR para medir la síntesis de proteínas mediante la expresión de los genes, y pruebas de comportamiento en peces para evaluar el efecto de los contaminantes en embriones y larvas. Todo esto se detalla a continuación.

2.1. Generalidades de la contaminación ambiental

La contaminación ambiental que incluye el aire, el agua y el suelo, aumenta en todo el mundo agudizándose cada vez más, debido al incremento en los principales factores de riesgo que son la generación y exposición a los productos químicos, aumento de la radiación ultravioleta y el cambio climático (Vargas, 2005).

De acuerdo con el último informe publicado por la OMS sobre ambientes saludables y prevención de enfermedades, en el año 2012 murieron 12,6 millones de personas en todo el mundo debido a problemas relacionados con la contaminación ambiental, lo que equivale a casi una cuarta parte del total de muertes a nivel mundial. El aumento de

muerres por enfermedades atribuidas a la contaminación del aire con relación a un informe publicado diez años atrás fue de 8,2 millones, mientras que las muertes relacionadas con la deficiencia en el suministro de agua, saneamiento y gestión de desechos, por enfermedades infecciosas como la diarrea y el paludismo (1 700 millones de casos al año en el mundo para el 2013 según la OMS) se han reducido en gran medida debido a la mejora del acceso al agua potable y el saneamiento, la inmunización a insectos tratados con insecticidas y el uso de medicamentos básicos. (Prüss-Ustün, et al., 2016).

En el año 2006 la enfermedad con mayor contribución causal del medio ambiente fue la diarrea, la cual fue asociada en aproximadamente un 94% a factores de riesgo ambientales como el consumo de agua no potable (no segura), el saneamiento deficiente y la higiene insuficiente. La segunda enfermedad con mayor contribución causal del medio ambiente fueron las infecciones de las vías respiratorias inferiores, directamente asociada a la contaminación del aire, de las cuales el 20% de estas infecciones son atribuibles a causas ambientales en los países desarrollados, y en los países en desarrollo este porcentaje llega hasta un 42%. (Prüss-Üstün y Corvalán 2006).

La peligrosidad de algunas sustancias es definida con base en estudios rigurosos en investigaciones cuyo enfoque ha sido orientado a analizar comportamientos generalizados en personas que sufren alguna enfermedad específica y que fueron sometidas de alguna manera a una sustancia determinada. Es así como médicos, biólogos, químicos y demás profesionales de las áreas ambientales y de las ciencias naturales, han dedicado años a investigar los efectos de sustancias químicas en los organismos humanos mediante la recopilación de información histórica de clínicas, hospitales y laboratorios de investigación científica.

La presencia de compuestos o sustancias químicas consideradas peligrosas en los seres humanos y en los organismos de los animales se debe principalmente al contacto con agua y/o alimentos contaminados. Estas sustancias se caracterizan porque sus estructuras químicas y físicas presentan condiciones muy específicas que los hacen diferentes de las demás sustancias que pueden entrar al organismo y no representar daños tan severos, como la capacidad de acumulación, su difícil degradación, su grado de solubilidad en el agua, sus estructuras moleculares, su capacidad para generar cambios internos en las estructuras celulares, entre otros.

Los efectos de la contaminación ambiental en los seres humanos y demás organismos vivos se intensifican debido a dos condiciones típicas de las sustancias químicas

contaminantes: la bioacumulación y la biomagnificación. La bioacumulación ocurre dentro de un mismo nivel de la cadena trófica definiéndola como el aumento a lo largo de la vida en la concentración de una sustancia en los tejidos de un individuo debido a la ingesta de la sustancia, fundamentalmente a partir de las grasas alimentarias. La biomagnificación, en cambio, ocurre a medida que se asciende en la cadena trófica, en el nivel más alto de la cual se encuentran los seres humanos, ambos procesos provocan concentraciones corporales progresivamente elevadas (Porta et al., 2008).

Los mayores daños ambientales se deben en gran medida a que estas sustancias no son biodegradables, son persistentes y esto hace que sean difíciles de remover del agua. De igual manera una de las características principales de las sustancias o compuestos químicos peligrosos para los organismos vivos es que son insolubles en agua, y por este motivo se acumulan en los tejidos grasos de los cuerpos donde se instalan de manera permanente, (Barceló y López, 2007).

El trabajo conjunto que se ha venido realizando entre diversos grupos de investigación en relación a los efectos que las sustancias y compuestos químicos ocasionan en los organismos vivos, de la manera en que actúan y cómo llegan a las plantas, a los animales y a los humanos, ha favorecido que las entidades gubernamentales y ambientales de los países y del mundo, establezcan medidas de control para la disminución y eliminación de esos compuestos (Cartagena, 2011), gracias a ello y con el fin de disminuir la contaminación ambiental, el cambio climático por el calentamiento global, y actuando en favor del desarrollo sustentable de las comunidades y los países se han llevado a cabo tratados internacionales y convenios establecidos como medidas para abordar las problemáticas en materia ambiental que hay en el mundo.

En el caso de México, este ha firmado diversos convenios internacionales con el fin de hacer parte de las estrategias para controlar y disminuir los factores de riesgo ambiental. De los convenios internacionales que se han firmado destacan:

Convenio de Róterdam. Sobre el Consentimiento Fundamentado Previo Aplicable a Ciertos Plaguicidas y Productos Químicos Peligrosos Objeto de Comercio Internacional.

El convenio tiene por objetivo establecer un mecanismo de autorización previa a la importación y exportación de sustancias químicas peligrosas y plaguicidas comerciales, denominado Consentimiento Fundamentado Previo, PIC por sus siglas en inglés – y que frecuentemente se le conoce por este acrónimo al convenio-, con la finalidad de tener toda la información necesaria para conocer las características y los riesgos que implica el

manejo de dichas sustancias, permitiendo que los países importadores decidan que sustancias químicas desean recibir y excluir aquellas que no puedan manejar de manera segura para evitar riesgos a la salud humana y el ambiente. Así como, contribuir a su utilización ambientalmente racional, facilitando el intercambio de información acerca de sus características, estableciendo un proceso nacional de adopción de decisiones sobre su importación y exportación y difundiendo esas decisiones a las Partes. (FAO and UNEP, 2014)

El Convenio de Róterdam fue aprobado el 11 de septiembre de 1998, fecha en la que México lo suscribió. El 24 de febrero de 2004 el Convenio entró en vigor. México depositó el instrumento de adhesión el 4 de mayo de 2005 ante la Secretaría General de la ONU, y es parte del mismo a partir del 2 de agosto de 2005. (SEMARNAT, 2013a).

- Convenio de Basilea sobre el Control de los Movimientos Transfronterizos de los Desechos Peligrosos y su Eliminación. Tiene como objetivo reducir al mínimo la generación de desechos peligrosos y su movimiento transfronterizo, así como asegurar su manejo ambientalmente racional, para lo cual promueve la cooperación internacional y crea mecanismos de coordinación y seguimiento. (UNEP, 2014)

Fue adoptado por la Conferencia de Plenipotenciarios el 22 de marzo de 1989, mediante la firma de 116 países; México ratificó el convenio el 22 de febrero de 1991, siendo publicado en el Diario Oficial el 9 de agosto de ese mismo año, y las disposiciones generales fueron adoptadas el 5 de mayo de 1992, fecha de la entrada en vigor de este instrumento. (SEMARNAT, 2013b).

- Convenio de Estocolmo. Sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. Tiene por objeto proteger la salud humana y el medio ambiente frente a los contaminantes orgánicos persistentes (COP), así como promover las mejores prácticas y tecnologías disponibles para reemplazar a los COP que se utilizan actualmente, y prevenir el desarrollo de nuevos COP a través del fortalecimiento de las legislaciones nacionales y la instrumentación de planes nacionales de implementación para cumplir estos compromisos (UNEP, 2009).

Establece un fuerte régimen internacional para promover la acción global respecto a los COP que amenazan la salud y el desarrollo de los seres humanos y la vida silvestre, por lo que dispone una serie de medidas de control sobre su producción, importación, disposición, uso y eliminación (UNEP, 2009).

México firmó el convenio el 23 de mayo de 2001, en Suecia. Fue el primer país de Latinoamérica que ratificó el 10 de febrero de 2003, el cual entró en vigor el 17 de mayo de 2004. (SEMARNAT, 2013c).

Desde su creación se han establecido las reglas de procedimiento y los órganos subsidiarios necesarios, como el Comité de Revisión de COP, que garantizan su operación. Además de promover que los países Parte integren sus Planes Nacionales de Implementación (PNI) para cumplir los compromisos que establece este instrumento. El PNI de México se integró en octubre de 2007, al ser aprobado por el Comité Nacional de Coordinación de México, de composición multisectorial, se remitió al secretariado del convenio en febrero de 2008. (SEMARNAT, 2013c).

En su 4ª Conferencia de las Partes del Convenio de Estocolmo se aprobó la inclusión de 9 sustancias nuevas en los Anexos del Convenio. Se adoptó una decisión en la que se aprobaron las recomendaciones del Grupo de Trabajo Ad hoc sobre sinergias de los Convenios de Rotterdam, Basilea y Estocolmo; se presentaron los informes regionales sobre la evaluación de la eficacia del Convenio, y se aceptaron algunas nominaciones de los Centros Regionales, entre ellas, la de México a través del CENICA. No se adoptó un mecanismo de incumplimiento por la falta de consenso (SEMARNAT, 2013c).

2.2. Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes son compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medioambiente, o las posibles consecuencias de la misma, han pasado en gran medida inadvertidas, son compuestos orgánicos presentes en muy pequeñas concentraciones (pg/L a µg/L) cuyo origen es fundamentalmente de tipo antropogénico, y aunque se encuentran en el ambiente a bajos niveles de concentración pueden ejercer efectos negativos sobre los organismos vivos y su medio, debido básicamente a su peligrosidad por tener dos características principales: persistencia en el medio y poder de acumulación a lo largo de la cadena trófica (Usma Gutiérrez et al, 2013).

Los contaminantes emergentes son sustancias que llegan al ambiente constantemente y que son producto de las necesidades de consumo de los humanos, entre estos se encuentran los fármacos, productos de belleza, fragancias, productos de uso industrial, productos de limpieza, etc. Estas sustancias se definen como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos y cuya presencia en el ambiente no es nueva, pero si

generan preocupación por sus posibles consecuencias, y están en las líneas de investigación prioritaria de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y ambiental, como la OMS (Organización Mundial para la Salud), la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos), o la Comisión Europea (Barceló y López, 2007).

La USEPA define los contaminantes emergentes como agentes exógenos que interfieren en la síntesis, secreción, transporte, acción o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo que son responsables para el mantenimiento del homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento (EPA, 2002; EPA, 2010).

Los contaminantes emergentes son compuestos de los cuales se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales, razón por la cual y a su vez consecuencia de que no hayan sido regulados, y de que la disponibilidad de métodos para su análisis sea nula o limitada (Barceló y López, 2007).

En el ambiente, los contaminantes emergentes se identifican por ser contaminantes prioritarios como plaguicidas, fármacos, compuestos orgánicos, entre otros, cuya característica común es que han sido detectados dentro de un intervalo de concentraciones entre pg/L y µg/L (Prieto, 2013).

Por otro lado, la CBZ y los NP que son las sustancias objeto de esta investigación, son compuestos orgánicos que cumplen con las características propias de los contaminantes emergentes, debido a que se han encontrado concentraciones muy bajas de ng/L y µg/L en diferentes fuentes como aguas superficiales, agua residual cruda, agua residual tratada, efluentes secundarios, aguas subterráneas (Chávez et al., 2013). Se tienen reportes de concentraciones de CBZ en aguas superficiales desde 4,5 hasta 250 ng/L, en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en diferentes países desde 5 hasta 2100 ng/L y en aguas subterráneas desde 6 hasta 900 ng/L, (Santos et al., 2010), y para NP se han reportado concentraciones en plantas de tratamiento de aguas residuales en efluente primario desde 1 hasta 43,5 µg/L, en efluente secundario de 0,3 µg/L, y en efluente final desde 0,05 hasta 63 µg/L; en agua de estuario se han reportado concentraciones desde 0,03 hasta 0,9 µg/L y en agua superficial desde 1.9 hasta 32.8 µg/L, (Soares et al; 2008).

2.3. Disrupción endócrina

Los compuestos disruptores endocrinos del sistema endocrino (DE) han sido definidos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, como agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, asociación, acción o eliminación de hormonas naturales, responsables de mantener la homeostasis, la reproducción, el desarrollo y/o comportamiento en los seres vivos (EPA, 2002; EPA, 2010).

En el European Workshop on endocrine disruptors, realizado en el Reino Unido en 1997, los disruptores endocrinos fueron definidos como sustancias ajenas al organismo que alteran el sistema hormonal provocando desde cambios morfológicos hasta alteraciones en la descendencia o en los componentes genéticos (EPA, 2002; EPA, 2010).

Un gran número de sustancias químicas artificiales y naturales que se han vertido al medio ambiente tienen potencial para perturbar el sistema endocrino de los animales incluidos los seres humanos. Entre estas se encuentran sustancias persistentes, bioacumulativas y organohalógenas que incluyen algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) y sustancias químicas industriales, otros productos sintéticos y algunos metales pesados (Van der Oost et al., 2003)

Dentro de los disruptores endocrinos se incluye cualquier agente que afecte negativamente a cualquier aspecto de todo el sistema endocrino. Por lo general los disruptores endocrinos son productos naturales o químicos sintéticos que imitan, mejoran (agonista) o inhiben (antagonista) la acción de las hormonas, en algunas circunstancias actúan como agentes hipertróficos (estimuladores) y promotores tumorales. Para evaluar los efectos adversos de un disruptor endocrino se requiere considerar la dosis, la carga corporal, el momento y la duración de la exposición en períodos críticos de la vida (Björklund et al., 2000).

Las sustancias químicas disruptoras hormonales que normalmente se encuentran a bajos afectan directamente a las hormonas, se caracterizan por entrar y suplantar los mensajeros químicos que transportan información de una célula a otra, en esta suplantación alteran la información biológica y con ello el desarrollo desde la diferenciación sexual hasta la organización del cerebro, representando un peligro significativo antes del nacimiento y en las primeras etapas de la vida de los organismos vivos (Van der Oost et al., 2003).

El sistema endocrino se ocupa fundamentalmente de los mediadores químicos (hormonas) los cuales secreta a la circulación sanguínea para que estos cumplan en su órgano o célula diana una determinada función metabólica para cual fue liberada. Los efectos del sistema tienen la particularidad de producirse en segundos en algunos casos o tomar días, incluso semanas en otros. Las numerosas interrelaciones en su mismo sistema, con el sistema nervioso e inmune lo hacen complejo, cualidad necesaria para llevar a cabo su papel de “gran regulador”. Se compone de células endocrinas aisladas, tejido endocrino y glándulas endocrinas. Las glándulas endocrinas representan, junto con el sistema nervioso, los dos grandes sistemas coordinadores del organismo. (Greenspan et al., 2003).

Las hormonas son sustancias químicas liberadas directamente en el torrente sanguíneo, varían en su composición dependiendo de su origen, se clasifican en tres tipos: hormonas esteroideas o lipídicas que se derivan del colesterol algunas de estas son el cortisol, el estrógeno y la progesterona; hormonas derivadas de aminoácidos, relacionadas con la tirosina, entre estas se encuentran la adrenalina y noradrenalina; y las hormonas proteicas o peptídicas, como las hipofisarias y las pancreáticas. (Rivas, et al 2004)

Las glándulas endócrinas liberan a las hormonas de dos maneras: solas o asociadas, cuando son liberadas solas éstas se presentan de manera biodisponibles, y cuando son liberadas de manera asociada están ligadas a ciertas proteínas lo que les permite extender su tiempo de vida y tener efectos sobre la misma célula que las sintetiza, sobre células contiguas, o en órganos o tejidos diferentes y distanciados de donde fueron sintetizadas. (Ng et al., 2014)

2.4. Disruptores endocrinos

El término disruptores endocrinos surgió de la conferencia de Wingspread (Wisconsin, USA) en julio de 1991, en la cual un grupo de científicos procedentes de diversas disciplinas se reunieron para debatir las preocupaciones en torno a la presencia de las sustancias químicas en el medio ambiente, sintetizadas por el hombre y algunas naturales, los efectos y el potencial para perturbar el sistema endócrino de los animales incluidos los seres humanos (Van der Oost et al., 2003). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (Environment Protection Agency – USEPA) definió los disruptores endocrinos como Un agente exógeno que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción, o la eliminación de hormonas naturales en el cuerpo que son

responsables del mantenimiento de la homeóstasis, la reproducción, el desarrollo y crecimiento, y/o el comportamiento de seres vivos” (EPA, 2002; EPA, 2010).

Los disruptores endocrinos son agentes exógenos que interfieren con el funcionamiento del sistema endocrino en organismos vivos debido a que causan alteraciones a distintos niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gónada; son agonistas o antagonistas que interactúan con los receptores hormonales, potenciando o atenuando su acción (Keel, 2012).

Dentro de los múltiples efectos negativos que pueden tener algunas sustancias químicas en los organismos vivos, uno de los que más relevancia tienen es la alteración de las hormonas debido a que actúan como disruptores endocrinos. Estas sustancias químicas ajenas de los cuerpos donde se depositan alteran el equilibrio hormonal generando la interrupción de algunos procesos fisiológicos que son controlados por hormonas. Considerando la importancia de las hormonas para el desarrollo de los seres vivos, sus efectos pueden ser fatales ya que los daños ocasionados pueden transmitirse de una generación a otra y pueden afectar a muchas especies hasta llevar incluso a su desaparición completa, dado que muchos de los daños causados por la alteración hormonal pueden incluso ocasionar que las especies tengan dificultades para su adaptación y su reproducción, o para su desarrollo normal, (Barceló y López, 2008).

Los disruptores endocrinos tienen la capacidad de provocar disfunciones hormonales, afectan, entre otros a la fertilidad, el crecimiento, el metabolismo, el sistema inmunitario y son cancerígenos. Plaguicidas (como el endosulfán y otros) los alquifenoles, ftalatos, bisfenol-A, dioxinas, PCBs, etc. son potentes disruptores endocrinos. (Santos, T. et al., 2011).

La liberación al entorno de sustancias químicas provoca importantes daños a la naturaleza y a la salud humana. Algunas de las sustancias más dañinas son los disruptores endocrinos y los Compuestos Tóxicos Persistentes (CTP). Los disruptores endocrinos provocan pérdida de la capacidad reproductora, mortalidad prematura, deformaciones en órganos reproductores, cáncer de diversos tipos y alteraciones del sistema inmunológico de las especies afectadas. Desde mediados del siglo XX, numerosas especies, muy diferentes entre sí y localizadas en diferentes áreas del planeta, han sufrido alteraciones de su sistema hormonal debido a la exposición a sustancias sintéticas (Santos, T. et al., 2011).

En España, entre otros efectos sobre la fauna de la exposición a disruptores endocrinos, se reporta la feminización de peces que viven agua abajo de las plantas de tratamiento de

agua residual debido a la exposición a sustancias químicas procedentes de la degradación de detergentes y plásticos, los alquilfenoles y de moluscos en la costa gallega, debido a la exposición a Tributyl-estaño (TBT) (Santos, T. et al., 2011).

Los disruptores endocrinos están incluidos en el grupo de contaminantes cuya eliminación es prioritaria en la Unión Europea. La mayoría de las sustancias químicas que alteran el sistema endocrino estarán sujetas a ser usados bajo la autorización de autoridades ambientales, ya que se ha asociado a los alteradores endocrinos los siguientes efectos graves en la salud humana: cáncer de testículo, mama y próstata, disminución de la concentración de espermatozoides y del volumen de semen, criptorquidia, hipospadias y trastornos en el desarrollo de los sistemas inmunitario y nervioso. Para la Comisión de la Comunidades Europeas cualquiera de estos efectos justifica que una sustancia se clasifique como carcinogénica o tóxica para la reproducción y quede, por tanto, sujeta a autorización. Por otra parte, se ha establecido una relación causal entre determinados COP (contaminantes orgánicos persistentes) y algunos efectos nocivos en el sistema endocrino de especies silvestres. Dichas sustancias están sujetas a autorización (CE, 2001)

Dentro de la lista de disruptores endocrinos publicada por la Comisión Europea se encuentran aproximadamente 300 sustancias químicas que son reguladas y controladas en los países donde son utilizadas ya como diferentes fines como procesos industriales, fármacos, etc. Dentro de los cuales está el 4-nonilfenol y el nonilfenol. Algunas de estas sustancias se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Listado de algunos disruptores endocrinos definidos por la Comisión Europea

LISTADO ALGUNOS DISRUPTORES ENDOCRINOS - COMISIÓN EUROPEA						
ACETOCHLOR	BROMINE	DDD	ENDRIN	IODINE-131	4-N-PROPYLPHENOL	SYNTHETIC PYRETHROIDS
ALACHLOR	2-BROMOPROPANE	DDE	EPICHLOROHYDRIN	IOXYNIL	NABAM	2,4,5-T
ALDICARB	1-BUTYLPROPANE	DDT	ESFENVALERATE	IPRODIONE	NALIDIXIC ACID	T-2 TOXIN
ALDRIN	Bisphenol F	DECAHYDRONAPHTHALENE	ETHANOL	KEROSENE	1,5-NAPHTHALENEDIAMINE	TEFLUTHRIN
ALKYLPHENOLS	C.I. DIRECT BLUE 218	DEMECLOCYCLINE	ETHIOZIN (EBUZIN/TYCOR)	Ketoconazole	NICKEL SULFATE	3-TERT-BUTYLPHENOL
ALPHA-ENDOSULFAN	CADMIUM	DI-N-HEXYLPHTHALATE	1-ETHYL-4-HYDROXYBENZENE	LEAD	NITROFEN	TETRAHYDROFURAN
AMIODARONE	CADMIUM CHLORIDE	DI-N-OCTYL PHTHALATE	ETHYLBENZENE	LINURON	NITROGEN DIOXIDE	TETRASUL
AMITROLE	CAMPHECHLOR	DI-N-PENTYL PHTHALATE	ETHYLENE THIOUREA	LITHIUM CARBONATE	NONACHLOR, CIS-	THEOBROMINE
AMOXAPINE	CARBARYL	1,2-DIBROMOETHANE	ETOPOSIDE	LORAZEPAM	NONACHLOR, TRANS-	THEOPHYLLINE
ANTHRACENE	CARBENDAZIM	DIBUTYL PHTHALATE	FENARIMOL	MALATHION	4-NONYLPHENOL	THIAZOPYR (MON 13200)
AROCLOR 1242	CARBON DISULFIDE	1,2-DICHLOROBENZENE	FENITROTHION	MANCOZEB	4-NONYLPHENOL BRANCHED	THIOCYANATE
AROCLOR 1248	CARBON TETRACHLORIDE	DICHLOROMETHANE	FENOXYCARB	MANEB	NORETHISTERONE	THIOPHANATE ETHYL
AROCLOR 1254	CHLORDECONE (KEPONE)	2,4-DICHLOROPHENOL	FENVALERATE	MERCURY	NORFLURAZON	THIOPHENE
AROCLOR 1260	CHLORMEQUAT CHLORIDE	1,2-DICHLOROPROPANE	FERBAM	MERCURY CHLORIDE (2)	Nifedipine	THIRAM
ARSENIC	1-CHLORO-2-NITROBENZENE	DICOFOL	FIPRONIL	METHAM SODIUM	O,P'-DDT	TOLBUTAMIDE
ARSINE	CHLORODIFLUOROMETHANE	DIELDRIN	FIREMASTER FF-1	METHIMAZOLE	O-CRESOL	TRANS-CHLORDANE
ATRAZINE	CHLOROFORM	DIETHYL PHTHALATE	GAMMA-LINDANE	METHOMYL	OCTACHLOROSTYRENE	TRIADIMEFON
Azadirachtin	CHLORPYRIFOS	DIETHYLSTILBESTROL	HC BLUE 1	METHOXYCHLOR	ORYZALIN	TRIADIMENOL (BAYTAN)
BENOMYL	CIS-CHLORDANE	DIFLUBENZURON	HEPTACHLOR	METHYL PARATHION	OXAZEPAM	TRIBUTYLTIN
BENZENE	CLOFENTEZINE	DIMETHOATE	HEPTACHLOR EPOXIDE	2-METHYLLACTONITRILE	OXYCHLORDANE	TRIBUTYLTIN BENZOATE
BENZETHONIUM CHLORIDE	COBALT CHLORIDE	DINITROBUTYL PHENOL	HEXACONAZOLE (ANVIL)	METHYLTHIOURACIL	OXYDEMETON METHYL	TRIBUTYLTIN COMPOUNDS
BENZO(A)PYRENE	CYANIDE COMPOUNDS	DINITROPHENOLS	HYDRAZINE	METIRAM	OXYPHENBUTAZONE	TRIBUTYLTIN FLUORIDE
BENZYL BUTYL PHTHALATE	CYCLOSPORIN A	DINOCAP	HYDROGEN CYANIDE	METRIBUZIN	P-CHLOROANILINE.HCL	TRICHLOROETHYLENE
BETA-ENDOSULFAN	CYPERMETHRIN	DIPROPYL PHTHALATE	HEXACHLORO-1,3-BUTADIENE	MIREX	P-CHLOROPHENYL ISOCYANATE	TRIFLURALIN
BETA-LINDANE	Cobalt sulfate heptahydrate	4-DODECYLPHENOL	HEXACHLOROBENZENE	MOLINATE	1-(P-HYDROXYPHENYL)OCTANE	TRIPHENYLTIN

2.5. Nonilfenoles

Los NP son compuestos orgánicos pertenecientes a la familia de los alquilfenoles, que se caracterizan por tener un anillo aromático en su estructura química lo que hace que sean muy estables, difíciles de degradar, tóxicos por sí solos. En su estructura están formados por un benceno, seis carbonos con seis electrones y 12 hidrógenos. Su toxicidad se debe específicamente a que tiene un anillo o grupo aromático en su estructura química, lo que hace que sean compuestos muy estables y altamente difíciles de degradar (Keel, 2012)).

Esta mezcla de isómeros pertenecientes a la familia de los alquilfenoles y alquilfenoles etoxilados son sustancias químicas que se producen en gran volumen a nivel mundial. Se calcula que su producción aproximada es de 650,000 toneladas por año, de las cuales aproximadamente el 80% corresponden a NP y el 20% restante a octilfenoles (Guang-Guo., et al 2003).

Los alquilfenoles polietoxilados, que hacen parte de los componentes de los surfactantes más utilizados a nivel mundial en detergentes, pesticidas y productos industriales, se descargan directamente en el ambiente o mediante las plantas de tratamiento de agua residual, su degradación primaria en el ambiente o en las plantas de tratamiento genera una cadenas más cortas de alquilfenoles etoxilados y derivados de ácidos carboxílicos como los NP, octilfenoles, y alquilfenoles, cuyas características los hacen altamente hidrofóbicos, más tóxicos y persistentes que los compuestos originales. (Keel, 2012).

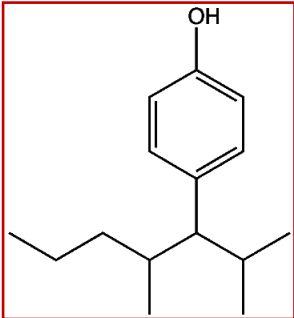
Los nonilfenoles son ampliamente utilizados para la fabricación de detergentes, plaguicidas y como agentes estabilizadores de cloruro de polivinilo (PVC) (Molina, 2008), se emplean como aditivos en aceites lubricantes y como espermaticidas en espumas anticonceptivas, entre otros de los cuales se destacan: detergentes, papel y celulosa, textiles, recubrimientos, pesticidas agrícolas, aceites combustibles, lubricantes y metales y plásticos. Pertenecen al grupo de surfactantes no iónicos que son utilizados en una gran cantidad de productos comerciales y en productos de limpieza, incluyendo detergentes, productos cosméticos y textiles, procesos industriales como la generación de pasta de papel y como aditivos de pinturas de látex y fungicidas (Guang-Guo, et al., 2003).

La presencia en el ambiente de los alquilfenoles como el nonilfenol se ha comprobado desde finales de los 1970's. Su toxicidad acuática y potencial de disruptor del sistema endocrino fueron determinadas en varias ocasiones en las últimas dos décadas, estos

compuestos pueden ocasionar desarrollo sexual precoz, contribuyen al crecimiento de la frecuencia de infertilidad y desordenes del sistema reproductivo masculino en humanos.

Por lo que se reporta como generador de respuestas estrogénicas sobre organismos acuáticos, aves y mamíferos, se clasificó como disruptor endocrino (EDC) y se encuentra listado dentro de las sustancias prioritarias en el Trabajo Marco Directivo del Agua (Stasinakisa et al., 2008). En la Tabla 2, se presentan algunas características fisicoquímicas del nonilfenol.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del nonilfenol (García, 2010)

Nombre común	Nonilfenol
Fórmula química	C ₆ H ₄ OHC ₉ H ₁₉
Peso molecular	220.35 g/mol
Solubilidad en agua	Aprox. 5.7g/l a 25 °C (77 °F) - ligeramente soluble
Número CAS	84852-15-3
Viscosidad	Aprox. 400 mm ² /s
Componente	4-Nonylphenol
Estructura química	

Los NP presentes en el agua residual solo representan el 25% de los encontrados en el ambiente, un poco más del 60% se encuentra en los sedimentos y poco más del 10% en suelos lo que indica que tienen una gran tendencia a adherirse a las fases sólidas. Se ha observado que son acumulados en el lodo de digestión de los tratamientos anaerobios, otra vía de entrada es por depositación atmosférica en los suelos.

La prohibición, restricción de uso o sustitución de compuestos químicos por otros menos peligrosos se ha aplicado con éxito en el caso, por ejemplo, de los detergentes de tipo nonilfenol etoxilado. En el pasado estos compuestos se podían utilizar tanto en el campo

doméstico como en el industrial mientras que en la actualidad en muchos países solo está permitido este último. (Barceló, 2007).

Dentro de los tratamientos fisicoquímicos para remover CE, se encuentran procesos tradicionales de tratamientos de aguas tales como la coagulación y la floculación, sin embargo, estos son incapaces de remover compuestos como el nonilfenol, estrona (E1), estradiol (E2) y muchos otros productos farmacéuticos y productos de cuidado personal, por sí solos. (Bolong, N. et al., 2009).

Diversos estudios han encontrado compuestos como los NP en los efluentes de las plantas de tratamiento que corren por muchos ríos de países como Estados Unidos o España, a veces con altas concentraciones (Barceló, 2003) o han registrado su liberación, junto con la de ftalatos, desde diversos productos utilizados en las conducciones de agua potable. De alguna manera estos contaminantes han llegado a los cuerpos de humanos a través de los alimentos, en Alemania se ha detectado nonilfenol de forma muy generalizada en decenas de alimentos de uso común, al igual que se han encontrado frecuentemente en tejidos humanos, por lo cual la Unión Europeo clasificó a los NP como tóxicos para la fertilidad y el desarrollo del ser humano (Guenther, K. et al., 2002).

El nonilfenol ya ha sido determinado como un compuesto con acción estrogénica (Kolpin et al., 2002). Un estudio sobre la toxicidad de este compuesto en sedimentos de la bahía de Tokio mostró que al administrar a peces machos de la especie *Fundulus heteroclitus* fracciones con valores de NP de 20.700 ng/g y medir la vitelogenina (Vtg) esta, después de dos semanas, fue inducida; esta potencia estrogénica podría atribuirse al contenido de NP en esta fracción. Este es el primer informe que sugiere que la alta concentración de NP en los sedimentos tiene el potencial de inducir VTG en peces silvestres. (Kurihara et al., 2007). Además, se ha determinado que es un compuesto estrogénico que actúa como el E2 (Estradiol), que causa inestabilidad genómica y efectos adversos acumulativos, la preocupación que causa para la seguridad medio ambiental ha generado la creación de biorreactores que utilizan materiales inertes para promover la formación de biopelícula en ciertas condiciones operativas. (Keel, 2012). Aun así, el uso y la producción de NP ha sido restringido en la Unión Europea y en Canadá (Lavado, et al., 2004).

El sistema endocrino es un sistema de comunicación complejo entre señales químicas y sus blancos responsables de la regulación de las funciones internas del cuerpo. Cualquier sustancia que altera la función de este sistema se denomina un disruptor endocrino. La alteración endocrina por productos químicos (Billingham et al., 2001) pueden alterar la

función endocrina por una variedad de diferentes mecanismos: imitando el esteroide hormonas sexuales estrógenos y andrógenos y la unión a sus receptores naturales o bien como agonistas o antagonistas, alterando la síntesis y degradación de hormonas naturales, y mediante la modificación de la producción y el funcionamiento de los receptores hormonales. El nonilfenol es uno de los imitadores del estrógeno más estudiados que aparecen para interactuar con el desarrollo en varios organismos. La comparación de las relaciones estructura-actividad para la estrogenicidad de DE y 17- β -estradiol (E2) han identificado tres criterios estructurales que están relacionados con actividad de xenoestrógenos y su potencia: (a) un enlace de hidrógeno con capacidad del anillo fenólico para imitar el anillo A, (b) un centro hidrofóbico similar en tamaño y forma a los anillos B y C, y (c) un donante de enlaces de hidrógeno imitando a el 17- β -estradiol con el resto del anillo hidroxilo D. Compuestos moderadamente activos, tales como NP, tienen un anillo de benceno sustituido 4-hidroxilo con un resto hidrófobo equivalentes en tamaño y forma a los anillos B- y C- de 17- β -estradiol lo que explica su potencial estrogénico.

Normatividad, legislación y regulación para los NP

En Canadá y en algunos países de Europa los NP ya han sido regulados. En España existe la Directiva Marco del Agua, la cual se enfoca en presentar una visión global y un marco de acción local que especifica las medidas a tomar para conseguir la protección integrada del agua y la calidad química y ecológica de ésta mediante la reducción progresiva de la contaminación existente, el cese y eliminación sucesiva de vertidos, emisiones y fugas (Barceló, 2003).

Dentro de las sustancias establecidas como de interés prioritario en la Directiva 2000/60/CE de España se encuentra el Nonilfenol (4-(para) Nonilfenol) identificado con Número CAS: 104-40-5, y de acuerdo a la Norma de Calidad ambiental (NCA) la media anual (MA) de esta sustancia en aguas superficiales continentales y en otras aguas superficiales es de 0.3 $\mu\text{g/L}$; y la concentración máxima admisible (CMA) para esta sustancia en aguas superficiales continentales y en otras aguas superficiales es de 2.0 $\mu\text{g/L}$ (Barceló, 2003).

2.6. Carbamazepina

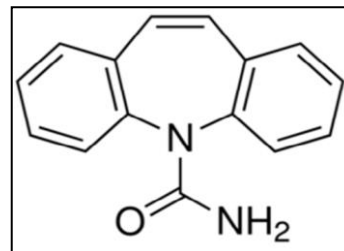
La CBZ es un fármaco anticonvulsivante, antiepiléptico, usado para tratar personas con problemas de epilepsia y algunos casos de depresión severa (Valencia & Legido., 2009).

Características generales de la CBZ (Sigma Aldrich, 2013)

Formula química: $C_{15}H_{12}N_2O$

Nombre químico: CBZ

Sinónimos: 5H-Dibenz b, fazepine-5-carboxamide



La CBZ como la mayoría de los fármacos luego de ser consumidos son excretados en altas concentraciones en orina y eliminados a través de afluentes municipales y plantas de tratamiento en las cuales la tecnología que existe no es apropiada para remover estos contaminantes, lo que implica un aumento de la su concentración en efluentes de agua residual tratada, ríos, arroyos, lagos, especialmente debido a su difícil y lenta degradación.

Un estudio sobre la toxicidad de este compuesto en animales, en el cual se administró CBZ en la dieta de ratas Sprague-Dawley durante dos años, a dosis de 25, 75 y 250 mg/kg/día, resultó en un aumento, relacionado con la dosis, de la incidencia de tumores hepatocelulares en las hembras, y adenomas benignos de las células intersticiales en los testículos de los machos. De estos estudios se concluyó que se debe considerar como carcinogénica en las ratas Sprague-Dawley. Los estudios de mutagenicidad en bacterias y mamíferos usando CBZ produjeron resultados negativos (Eghbal et al., 2013).

Los experimentos en animales han demostrado que la CBZ aumenta la mortalidad embrionaria y causa retraso en el crecimiento cuando se administra a dosis entre 10 y 25 veces superiores a la usada en los seres humanos. Asimismo, la administración de 300 mg/kg a las ratas, causó un aumento en la incidencia de abortos. Los ratones que recibieron dosis entre 40 y 240 mg/kg mostraron dilatación de los ventrículos cerebrales en 4.7% de los casos, en comparación con 1% de los controles. (Biblioteca médica digital, UNAM, 20013).

Se han realizado estudios de la CBZ considerada como un contaminante en medios acuáticos, ya que este fármaco se caracteriza por encontrarse en efluentes de plantas de

tratamiento de aguas, lo que indica que una de sus características principales es ser un contaminante persistente, difícil de degradar (Santos et al., 2010).

La principal forma de encontrar productos farmacéuticos como la CBZ en el medio ambiente es a través de la excreción humana, la eliminación de productos caducos o no utilizados y por el reúso de agua residual en las actividades agrícolas. La cantidad de productos farmacéuticos que se ha encontrado en las aguas superficiales como subterráneas ha sido asociada principalmente a la eliminación de aguas superficiales, lo que permite que los residuos farmacéuticos sean transportados en el ciclo del agua por diferentes rutas, la principal es a través de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales ya que los procesos no son suficientemente eficientes para retener estos productos (Gil, M. et al., 2012).

La CBZ al igual que otros fármacos como el ibuprofeno, el diclofenaco y el ácido clofbrico, ha sido detectada también en agua potable (Delgado, et al., 2011). De acuerdo a las propiedades físicas y químicas de los fármacos, sus metabolitos producto de la degradación, y las características de los suelos, estas sustancias pueden fácilmente llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o quedarse retenidas en el suelo y acumularse afectando así los ecosistemas y a los humanos a través de la cadena trófica (Barceló y López, 2003).

Según Nassef et al., (2010), se requiere hacer estudios de su efecto en organismos más a fondo ya que al examinar la toxicidad del farmacéutico carbamazepina (CBZ) midiendo sus efectos sobre el comportamiento de la alimentación y velocidad de natación del pez medaka japonés adulto (*Oryzias latipes*) expuestos a 6,15 mg/L durante 9 días, demostró que el comportamiento alimenticio se vio afectado por la CBZ. En general, los resultados sugieren que los cambios pueden proporcionar un indicador sensible para evaluar la toxicidad de este fármaco en los organismos acuáticos.

En este tipo de productos farmacéuticos sus metabolitos y productos de transformación en el medio ambiente se usan con mayor frecuencia en la medicina humana y veterinaria y se liberan continuamente en los ecosistemas. La carbamazepina se metaboliza en 10, 11-epóxido-carbamazepina, el cual tiene también efecto anticonvulsivante, y en CBZ diol, elimina por la orina en un 70% y por las heces en un 28%. ha sido detectada en agua subterránea en concentraciones de hasta 610 ng/L. (Drewes et al., 2002).

La concentración de carbamazepina en un efluente terciario en (Scottsdale Water Campus, Arizona EEUU) fue superior a 445 ng/L. En el estudio no se detectaron concentraciones de carbamazepina en el efluente secundario, pero en pozos de monitoreo de aguas subterráneas se detectaron concentraciones de 610 ng/L y de 455 ng/L, esto se podría deber a una liberación discontinua de carbamazepina (Drewes et al., 2002). En Alemania, se observaron concentraciones máximas de carbamazepina de 6,300 ng/L y un percentil 90 de 3,700 ng/L en los efluentes para aguas superficiales bajo la influencia de la descarga de efluentes (Drewes et al., 2002)

Se detectaron concentraciones en pozos de agua subterránea recargados con efluentes terciarios entre 155 y 235 ng/L, no se evidenció una eliminación significativa de carbamazepina durante la recarga de las aguas subterráneas. El agua subterránea representaba transporte en el suelo de más de 6 años, la eliminación de carbamazepina no se dio durante los viajes de más de 6 años en el subsuelo. Los fármacos antiepilépticos persisten durante la recarga de las aguas subterráneas (Drewes et al., 2002). Mientras que en Alemania la carbamazepina persistió durante la filtración en el río Rin, con concentraciones entre 20 y 550 ng/L (Kuehn y Mueller, 2000; y (Drewes et al., 2002)

2.7. Ecotoxicidad

La ecotoxicología permite estudiar los efectos que tienen los compuestos químicos tóxicos sobre organismos vivos y sus ecosistemas, en base a estudios en poblaciones, comunidades e individuos, integrando la toxicología la ecología y la química ambiental. Para medir el efecto ecotoxicológico de las sustancias en los organismos vivos se usan las siguientes unidades (USEPA, 2002):

Concentración Efectiva (CE) corresponde a una estimación puntual de la concentración de tóxico que podría causar un efecto adverso observable en un cuántica, "todo o nada", la respuesta (como la muerte, la inmovilización, o incapacitación grave) en un porcentaje dado de los organismos. (USEPA, 2002).

La NOEC (*No observed effect concentration*) corresponde a la mayor concentración de sustancia tóxica a la que están expuestos los organismos en un ciclo de vida completo o prueba parcial del ciclo de vida (a corto plazo) que no causa efectos adversos observables en el organismos de prueba, es decir que no causa efecto estadísticamente significativo como podrían ser mortalidad, alteraciones de la reproducción, cambios

comportamentales, etc., en la población estudiada al ser comparada con un control. (USEPA, 2002).

La LOEC (Lowest observed effect concentration) es la concentración más baja de sustancia tóxica a la que los organismos están expuestos en un ciclo de vida o prueba parcial del ciclo de vida (a corto plazo), que provoca efectos adversos en los organismos de prueba, es decir que los valores de las respuestas observadas son estadísticamente significativos diferentes de los controles (Warne y VanDam 2008).

Para hacer evaluaciones ecotoxicológicas existen diferentes tipos de pruebas o ensayos basados en organismos vivos que son sometidos a tratamientos específicos para valorar los efectos que puede causar una determinada sustancia sobre su desarrollo y metabolismo, comparando siempre con un control o blanco que permite verificar los cambios y transformaciones que se dan en los organismos. En la **Tabla 3** se presentan las ventajas y desventajas que tiene usar determinados tipos de pruebas para evaluación de ecotoxicidad.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de pruebas para evaluar Ecotoxicidad

PRUEBA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Mutagenicidad (prueba de Ames)	<p>Simplicidad y confiabilidad.</p> <p>Económico.</p> <p>Se han añadido más cepas a las utilizadas inicialmente, aumentando la posibilidad de detectar mutágenos.</p>	<p>Numerosos los factores que pueden ser responsables de un falso negativo.</p> <p>El pH ácido aumenta la actividad mutagénica de las aguas desinfectadas con cloro.</p> <p>Disminuye la sensibilidad del test el hecho de que se han identificado en el agua de consumo más de 1000 compuestos inferiores a 1 microgramo/litro.</p>
Bioacumulación en peces: exposición acuosa y alimenticia	<p>El método deja libertad suficiente para la adaptación del diseño experimental a las condiciones específicas de cada laboratorio.</p> <p>Puede facilitarse el análisis de las muestras de agua y de peces con ayuda de sustancias de ensayo radiomarcadas.</p>	<p>No existe recomendación alguna de sustancia específica para su utilización como compuesto de referencia con un potencial de bioconcentración conocido.</p>

PRUEBA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces <i>Danio rerio</i>	Organismos vertebrados, son considerados como buenos representantes de organismos de mayor complejidad y por lo tanto los efectos tóxicos observados en ellos son fáciles de comprender e interpretar. La prueba es adecuada para la evaluación de los efectos tóxicos agudos (letales) de efluentes con o sin tratamiento.	La sensibilidad del test se ve afectada debido a que se han identificado muchos compuestos presentes en el agua renovada.
Letalidad de <i>Daphnia spp</i> en 24 horas.	Corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías. Utilizada extensivamente en pruebas de toxicidad.	Concentración final de oxígeno disuelto debe ser mayor de 2 mg/L. Interpretación requiere de conjuntar otras variables acordes a los objetivos de cada proyecto.

Por su parte, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) cuenta con una serie de guías metodológicas para aplicar pruebas de ecotoxicidad que han sido eficientemente utilizadas en diversas investigaciones internacionales, por lo cual se realizó un análisis de las técnicas que más se podrían ajustar a la evaluación que se requiere hacer en esta investigación. En la Tabla 4 se presentan algunas de las técnicas analizadas y sus ventajas y desventajas.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de guías de la OCDE para ecotoxicidad. (OCDE, 2012)

Técnica / Guía	Título	Ventajas	Desventajas
206	Función reproductiva en aves	Indica actividad de disrupción endócrina por efectos negativos en el desarrollo y la reproducción	Requiere 20 semanas en exposición al compuesto y 14 días de observación. Mayores cuidados en instalaciones apropiadas
210 (1992) C14 para UE	Prueba de toxicidad en etapas iniciales en peces	Se puede aplicar a diferentes tipos de sustancias. Permite pruebas a largo plazo. Evalúa el impacto de las sustancias en etapas específicas.	Susceptible a variaciones leves en el ambiente. Dificil maniobra por tamaños pequeños.

Técnica / Guía	Título	Ventajas	Desventajas
212 (1998)	<i>Fish</i> , Pruebas de toxicidad a corto plazo en embriones y alevines	Se puede aplicar a cualquiera de los tipos de sustancias suponiendo que la propiedades fisicoquímicas del producto de ensayo permiten la exposición de las larvas	Los huevos pueden ser resistentes a la absorción de algunas sustancias tóxicas y pueden no ser sensibles a algunas sustancias que tienen la capacidad de interferir con el desarrollo embrionario.
215 (2000)	<i>Fish</i> , Pruebas crecimiento juvenil	Se puede aplicar a diferentes tipos de sustancias.	La prueba no cubre todas las etapas de la vida (desarrollo sexual / maduración, o la fase reproductiva)
230 (2009)	Peces, Pruebas de detección a corto plazo, estudio 21-días	Permite detectar disrupción endócrina mediante la medición de la VTG y las características sexuales secundarias.	Este ensayo no es adecuado para evaluar productos químicos muy volátiles.

Con base en lo antes mencionado, para realizar la evaluación de la ecotoxicidad de la CBZ y los NP en agua, después de haber revisado varias metodologías, se decidió aplicar una técnica de evaluación de ecotoxicidad.

Esta metodología se hará con base en el tipo de prueba: Bioacumulación en peces: exposición acuosa y alimenticia, dado que sus ventajas convienen para las condiciones y recursos con que se cuenta en el laboratorio, esta prueba se realizará en base a la guía 230 de la OCDE, ya que se consideró la más apropiada de acuerdo al análisis realizado de varias técnicas, por los alcances que se pueden lograr y que se cuenta con las condiciones que requiere dicha técnica, que se explica con mayor detalle en la metodología.

2.7.1. Ecotoxicidad por evaluación de VTG en pez cebra - OCDE 230

Existen diversas técnicas y pruebas para detectar los efectos ecotoxicológicos de las sustancias o sus metabolitos en organismos vivos, muchas de estas pruebas están basadas en la evaluación de la reproducción, el crecimiento, desarrollo y capacidad reproductiva de las descendencias; también es posible mediante la evaluación de la actividad de disrupción endócrina para la cual hay diversos elementos que permiten medir los efectos

dado que el sistema endocrino incluye un conjunto de glándulas como tiroides y gónadas adrenales; y hormonas que son producidas y secretadas al torrente circulatorio como las hormonas tiroideas, estrógenos, testosterona, etc. (Repetto, 2005).

Entidades como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), la Environmental Protection Agency (EPA – US, por sus siglas en inglés), la Unión Europea, la American Society for Testing and Materials (ASTM, , por sus siglas en inglés), la Food and Drug Administration (FDA-US, por sus siglas en inglés), la International Conference on Harmonisation (ICH) y la Japanese ministry of Agruculture, Forestry and Fisheries (JMAFF, por sus siglas en inglés), han adoptado diversas técnicas, procedimientos y protocolos específicos para evaluar los efectos ecotoxicológicos de una gran cantidad de sustancias mediante el uso de organismos vivos generalmente (Huet, 2000).

De las entidades o instituciones que han propuesto técnicas o guías las de la OCDE han sido muy bien aceptadas y usadas para estudios de ecotoxicología. En la **Tabla 5** se presentan algunas de las técnicas o protocolos planteados por dicha organización para la evaluación de ecotoxicidad mediante el uso de peces.

Tabla 5. Directrices de pruebas (TG) para evaluación de toxicidad. (OCDE, 2012)

Técnica	Título
OECD TG 203 (1992)	Peces, Prueba de toxicidad aguda
OECD TG 204 (1984)	Peces, Prueba de toxicidad prolongada, estudio 14-días
OECD TG 210 (1992)	Peces, Prueba de toxicidad en etapas iniciales
OECD TG 212 (1998)	Peces, Pruebas de toxicidad a corto plazo en embriones y alevines
OECD TG 215 (2000)	Peces, Pruebas de crecimiento juvenil
OECD TG 229 (2009)	Peces, Pruebas de reproducción a corto plazo
OECD TG 230 (2009)	Peces, Pruebas de detección a corto plazo, estudio 21-días
OECD TG 234 (2011)	Peces, Prueba de desarrollo sexual
OECD TG 305 (1996)	Pruebas de peces, bioconcentración a flujo continuo
AFSS	Androgenised Female Stickleback Screen
ZFET (2009)	Pruebas de toxicidad en embriones de pez cebra
MMT	Prueba multigeneracional del pez Medaka Japonés

En base a lo que establece la OCDE TG 230 (2009), se adaptó un protocolo para realizar el ensayo y evaluar la ecotoxicidad de la CBZ y los NP en el agua. El principio del estudio con el protocolo propuesto consistió en exponer peces cebra (*Danio rerio*), machos y hembras, en estado reproductivo en peceras de 10L a diferentes concentraciones de dos contaminantes emergentes: CBZ y NP durante un periodo de 21 días, con el fin de determinar el efecto de disrupción endocrina sobre la producción de VTG en los peces después de la exposición a los contaminantes.

2.8. Biología y características específicas del pez cebra (*Danio rerio*)

En muchos estudios el pez cebra *Danio rerio* ha sido considerado como un sistema de alerta temprana biológico eficaz para la detección de la contaminación del agua por ser una especie poco exigente que reacciona rápidamente a la presencia de contaminantes en su entorno (Nüber et al., 2016).

Esta especie de pez se utiliza a menudo en el desarrollo de nuevos modelos transgénicos e inactivación genética (knockout), el descubrimiento de fármacos, la farmacología conductual y farmacología de seguridad. Tiene muchas ventajas sobre los modelos de roedores, como la reproducción rápida y facilidad de manipulación genética, el pez cebra también comparten muchos genes con los humanos y el modelo de la biología humana de cerca. Las larvas se usan con frecuencia en la investigación de los cambios de comportamiento inducidos por fármacos novedosos, toxinas u otras sustancias (Rojas et al, 2007).

En la investigación científica ambiental ha sido muy común el uso de embriones y larvas de pez cebra *Danio rerio* debido a que éstos absorben fácilmente compuestos del agua circundante, y son usadas a menudo para determinar los efectos de ciertos medicamentos u otras sustancias. El seguimiento de sus patrones de actividad y movimiento puede revelar, por ejemplo, estereotipados comportamientos epilépticos y ritmicidad cardiaca. (Noldus, 2016).

El pez cebra *Danio rerio* es un ciprínido tropical dulceacuicola, es decir, son peces de la familia de las carpas que viven en aguas dulces y medianamente salobres (Rivera et al., 2006), el pez cebra es nativo del sureste asiático y su rango de distribución natural incluye las cuencas del Ganges y el Brahmaputra y las aguas dulces tropicales de las regiones

monzónicas de la India, Bangladesh, Nepal, Pakistán, Bután, Tailandia y el norte de Myanmar (Díaz, 2006).

Por lo general el pez cebra *Danio rerio* habita en sistemas naturales donde se encuentran cuerpos de agua con abundante vegetación; en ríos, canales, acequias, estanques y cuerpos lentos o agua estancada incluso se le puede encontrar en tierras que se inundan temporalmente o algunos plantíos que requieren inundación como los campos de cultivo de arroz (Lozada, et al 2012). En la Tabla 6 se presentan algunas características propias del hábitat de esta especie.

Tabla 6. Características fisicoquímicas del hábitat preferido por el pez cebra (Avdesh *et al*, 2012)

pH	~ 8.0
Dureza	100 mg CaCO ₃ /L
Salinidad	0.4 – 0.6 ppm
Transparencia	~ > 35 cm
Profundidad	> 35 cm
Temperatura del agua	16.5 a 33 °C
Corriente	Inmóvil a 0.1 m s ⁻¹
Sustrato	Barro, lodo, grava

Estos peces son organismos que toleran cambios drásticos del medio ambiente, llegando incluso a cambiar tanto las condiciones físico-químicas como la disponibilidad de recursos en el agua, por lo que están adaptados a sobrevivir en ambientes variables en los cuales los factores de salinidad, pH o temperatura no son estables. Probablemente eso explica su amplio rango de tolerancia ante distintos factores y la importancia que ello conlleva para facilitar su mantenimiento en cautividad (Harper and Lawrence, 2011).

El pez cebra lleva este nombre por las cinco rayas horizontales uniformes, pigmentadas y azules en cada lado del cuerpo, que aparentan las rayas de una cebra, y que se extienden hasta el extremo de la aleta caudal. Su forma es fusiforme y comprimida lateralmente, con la boca dirigida hacia arriba. El macho tiene forma de torpedo, con franjas de tonalidad oro entre las rayas azules, la hembra tiene un vientre blanquecino grande y rayas

tonalidad plata en lugar de oro. Las hembras adultas exhiben una pequeña papila genital en frente del origen de la aleta anal (Díaz, 2006).

Estos peces pueden crecer hasta 6,4 cm de largo, a pesar de que rara vez se hace más grande de 4 cm en cautiverio. Su periodo de vida en cautiverio es de alrededor de dos a tres años, aunque en condiciones ideales, esto puede extenderse a cinco años (Lozada, et al., 2012).

Los peces cebra viven en pequeños bancos que van desde cinco a veinte individuos; se reproducen y desovan de manera asincrónica; sobre el sustrato depositan sus huevos, que no son cuidados después del desove de las hembras, estos caen al fondo y una parte se la comen los adultos. Como otros peces de regiones monzónicas, la época de lluvias marca el inicio de la estación de reproducción, aunque se han observado hembras con hueva madura durante la época de sequía, lo que permite suponer que la reproducción está más correlacionada con la disponibilidad de alimento, que se ve intensificada con las lluvias. La fecundación es externa y los huevos, dependiendo de las condiciones ambientales, liberan larvas que nadan libremente después de cuatro a siete días de ser fecundados. Los machos son territoriales sobre los posibles sitios de desove y adoptan tácticas para perseguir a las hembras. De su ciclo de vida solo se tienen datos de laboratorio, donde llegan a vivir hasta cinco años (Díaz, 2006).

Respecto a su dieta, estos peces son generalistas, es decir, consumen una amplia variedad de crustáceos del fondo marino, además de gusanos y larvas de insectos, si bien muestran una marcada preferencia por las larvas de los dípteros, por lo que se ha propuesto su uso para el control de mosquitos (Lozada et al., 2012).

El pez *Danio rerio* pertenece a la misma familia a la que también pertenecen peces muy populares en la acuarofilia, como el pez dorado, los koi y la carpa común. En la Tabla 7 se presentan las características principales del género *Danio* y las especies más comunes.

Tabla 7. Tratamiento taxonómico del género *Danio* (Lozada et al., 2012)

Características del género <i>Danio</i>		Especies
Reino	Animal	<i>Danio albolineatus</i>
Phylum	Chordata	<i>Danio choprai</i>
Subphylum	Vertebrata	<i>Danio dangila</i>
Superclase	Osteichthyes	<i>Danio feegradei</i>
Clase	Actinopterygii	<i>Danio quangbinhensis</i>
Subclase	Neopterygii	<i>Danio kerri</i>
Infraclase	Teleostei	<i>Danio kyathit</i>
Superorden	Ostariophysi	<i>Danio margaritatus</i>
Orden	Cypriniformes	<i>Danio nigrofasciatus</i>
Superfamilia	Cyprinoidea	<i>Danio pulcher</i>
Familia	Cyprinidae	<i>Danio rerio</i>
Género	<i>Danio</i>	<i>Danio roseus</i>
		<i>Danio tweediei</i>

En la especie de peces cebra *Danio rerio* los machos y las hembras se diferencian con facilidad debido a la forma del cuerpo. Las hembras crecen más que los machos y cuando se encuentran en edad fértil las hembras presentan abultamiento en el abdomen y el lomo levantado y los machos normalmente permanecen con una estructura uniforme y relativamente plana.

Las hembras de pez cebra pueden depositar más de 200 huevos por semana. Los embriones se desarrollan fuera de la madre y se encuentran protegidos por una membrana llamada Corion, son transparentes y su organogénesis se da en 24 horas. Los embriones eclosionan al tercer día posterior a la fecundación. Al mes se consideran en edad juvenil y a los tres meses ya pueden empezar a reproducirse de manera continua manteniéndose fértiles durante más de 18 meses, permiten asegurar un suministro constante de embriones con pocos individuos. Estos peces tienen un periodo de vida entre dos y tres años y medio (Spence et al., 2008).

Una característica importante de los peces cebra es que ya ha sido posible el desarrollo de herramientas como la secuenciación completa de su genoma y el estudio global de los patrones de expresión genética.

El pez cebra por ser una especie muy utilizada en investigaciones científicas ha permitido el desarrollo de otras herramientas que permiten ampliar su uso en la investigación de comportamientos y reacciones ante su exposición a sustancias químicas para hacer evaluaciones ecotoxicológicas, tal es el caso de la posibilidad de evaluar contaminantes mediante la medición de la VTG como respuesta a efectos de disrupción endócrina causados por la presencia de compuestos con características disruptoras, para lo cual existen kits específicos para esta especie. En la Figura 1 se presenta el metabolismo de la VTG en el organismo de estos peces (Gerlai *et al*, 2000).

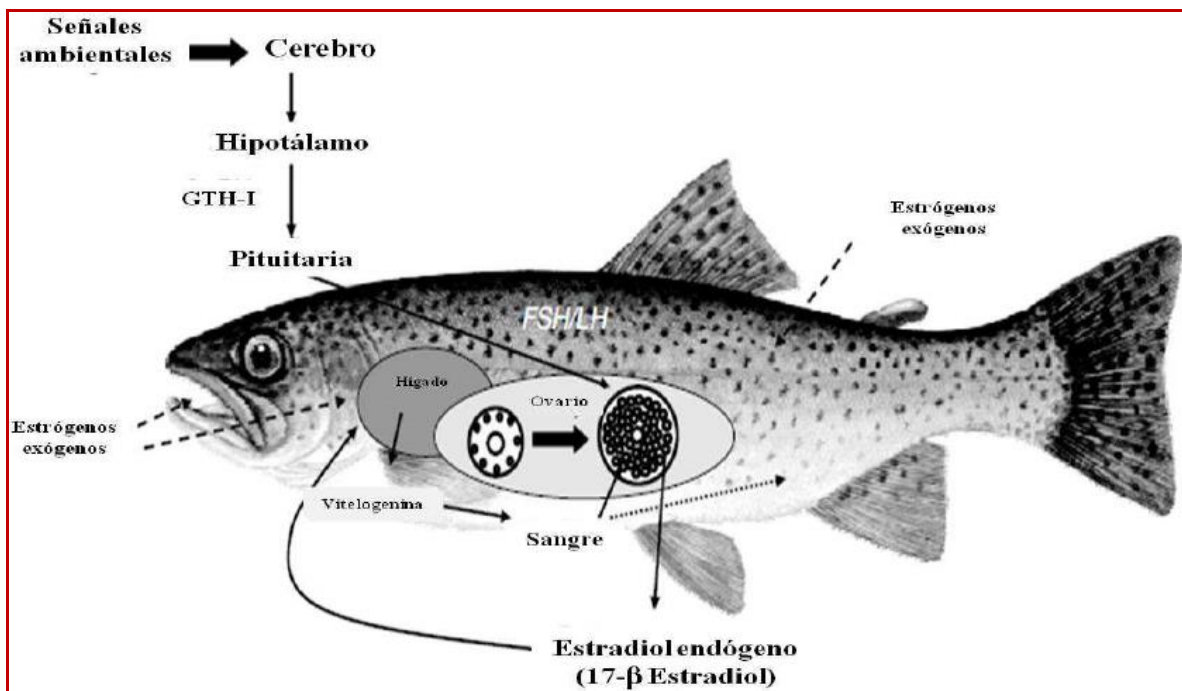


Figura 1. Biología y metabolismo de la VTG en los peces

Fuente: Tyler et al., 2008.

2.9. El pez cebra como organismo modelo en el estudio de la actividad endocrina

El objetivo de un ensayo de detección es indicar el potencial de una sustancia química para ser activo endocrinamente, como las pruebas de Elisa para detectar niveles de vitelogenina. La mayoría de los estudios de detección con el pez cebra han utilizado formas juvenil (pre-madura) o adulto (Maduras) (por ejemplo, Fenske et al., 2001, Holbech et al., 2001; Brion et al., 2002; Andersen et al., 2006; Örn et al., 2006), en los ensayos de detección de EDC, a menudo se seleccionan biomarcadores que son capaces de indicar específicamente las actividades endocrinas de los agentes de ensayo.

Uno de los marcadores más comúnmente medidos en el pez cebra es la inducción de vitelogenina (VTG), que como ya se detalló anteriormente es un precursor de yema de huevo y es una proteína que se sintetiza en el hígado de peces hembras bajo el control de estrógenos. Mientras que la síntesis de VTG en las hembras es un fenómeno fisiológico, la síntesis de VTG puede inducirse en el hígado de los machos si estos se tratan con compuestos activos con potencial estrogénico, es decir, sustancias que se unen y activan los receptores de estrógenos. Por lo tanto, la inducción de la VTG en los machos sirve como indicador específico de la exposición estrogénica en los peces (Arukwe y Goksoyr, 2003).

Entre las ventajas de utilizar en pruebas de algunos químicos la detección de VTG como biomarcador de la actividad estrogénica en los peces cebra, se incluyen su especificidad, su sensibilidad y la magnitud de la respuesta inducible (Hutchinson et al., 2006). Además, la VTG es inducida rápidamente, por ejemplo, Rose et al. (2002) demostraron que en machos los cambios cuantificables del pez cebra para la proteína VTG se ven dentro de 24 h después del inicio de la exposición al 17β -estradiol (E2).

Con respecto a la sensibilidad, la inducción de VTG en el pez cebra parece ser relativamente sensible como en otras especies de peces (Hutchinson et al., 2006). Para cuantificarla, están disponibles tanto técnicas de ELISA como de PCR-RT (Fenske et al., 2001; Holbech et al., 2001; Brion et al., 2002; Islinger et al., 2003; Nilsen et al., 2004). Un problema en la aplicación de test ELISA es el tamaño del cuerpo tan pequeño del pez cebra lo que hace que el muestreo de sangre sea difícil, incluso en peces adultos. Para medir los niveles de proteína VTG en pez cebra, usualmente se usaron homogenizados de cuerpo entero o cabeza/cola (OCDE, 2009)

2.10. El pez cebra como biosensor de los efectos de EDC

El pez cebra, junto con fathead Minnow, *Pimephales promelas*, y medaka, *Oryzias latipes*, se han estado evaluando como modelo biológico para pruebas reglamentarias en la evaluación del riesgo de los EDCs (Ankley y Johnson, 2004). Dado que los EDCs pueden conducir a alteraciones del desarrollo y la reproducción, el corto ciclo de vida de estos peces de laboratorio, representa una ventaja de estas especies como animales experimentales (Spitsbergen & Kent, 2003).

Existen pruebas completas del ciclo de vida de los peces. Es decir, exposición desde la fecundación hasta la edad madura, es la estrategia más completa para detectar efectos de los EDC sobre los peces, ya que estas pruebas detectan las consecuencias reproductivas y de desarrollo temprano de la exposición a EDC (Ankley y Johnson, 2004). Hasta la fecha, sin embargo, los datos del ciclo de vida del pez cebra han sido publicados sólo para EDC's con estrógenos activos, y sólo para algunos compuestos como el etinilestradiol (EE2) (Nash et al., 2004, Fenske et al., 2005; Schäfers et al., 2007), bisfenol A y 4-terc-octilfenol (Segner et al., 2003) y fitosteroles (Nakari y Erkomaa, 2003).

Nash et al., 2004 y Fenske et al., 2005, utilizaron sólo EE2 a una concentración de 5 y 3 ng/L, respectivamente, Schäfers et al., 2007, probaron una curva concentración-respuesta (de 0,05 a 10 ng/L). Los Puntos finales evaluados incluyeron inducción y niveles de VTG, crecimiento, diferenciación sexual, proporción sexual y producción de huevos y éxito de la fertilización. Los resultados muestran que la exposición crónica al estrógeno en el pez cebra indujo la síntesis de VTG, un crecimiento dispar en los individuos, inicio tardío de la maduración, alteración de la diferenciación sexual y proporción sexual y fertilización reducida.

Para EE2, los umbrales de efecto fueron alrededor de 1,1 ng/L, y concentraciones de 3-5 ng/L condujeron a una inhibición del éxito de la fertilización y, por lo tanto, al fracaso del reclutamiento poblacional (Nash et al., 2004, Fenske et al., 2005, Schäfers et al., 2007). Xu et al., (2008) aportaron pruebas de que el efecto EE2 en la reproducción del pez cebra se debe a los impedimentos de rendimiento tanto masculino como femenino. Las concentraciones de efecto EE2 observadas en el ciclo de vida de las pruebas con pez cebra son comparables a las obtenidas para el fathead Minnow (Länge et al., 2001) y medaka (Balch et al., 2004).

Según la teoría existe una reversibilidad del efecto estrogénico crónico sobre las funciones reproductivas del pez cebra, en el estudio realizado el octilfenol y el bisfenol fueron de cuatro a seis órdenes de magnitud menos potentes que EE2 en cuanto a dañar la reproducción del pez cebra se refiere (Segner et al., 2003a, b). Un hecho interesante con respecto a la evaluación de riesgos fue que cuando los peces cebra fueron trasladados después de la exposición crónica a estrógenos a agua limpia, la reproducción se recuperó parcialmente (Nash et al., 2004, Fenske et al., 2005).

2.10.1. Biomarcadores específicos

La presencia de una o varias sustancias tóxicas en el ambiente implica un riesgo potencial para los organismos vivos y para la salud humana, no obstante, es importante la detección de la sustancia tóxica en el organismo para saber si el daño puede atribuirse a este, y para que exista una intoxicación debe aparecer una sintomatología o alteraciones clínicas. Sin embargo, la relación entre el nivel de la sustancia tóxica presente en el organismo y la respuesta tóxica es algo complejo y difícilmente predecible. Un método de cuantificar la exposición y su posible impacto sobre la especie humana es el uso de procedimientos de monitorización biológica por medio de biomarcadores (Gil & Pla., 2001).

Un marcador biológico se define como la presencia de un xenobiótico (posible tóxico) en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra (Gil & Pla., 2001).

Un biomarcador hace referencia a la respuesta biológica del organismo frente a la agresión de un xenobiótico (Pastor et al., 2003) y no a la presencia de éste o algún metabolito de él en el organismo, aunque la medida del xenobiótico en un sistema biológico o muestra es un indicador biológico de exposición y por tanto debería ser considerado bajo este concepto. La ventaja principal del empleo de biomarcadores radica en que considera las diferencias en la absorción, biodisponibilidad, excreción o en los mecanismos reparadores del ADN e incluso, como consecuencia de una alteración fisiopatológica concreta en un período de tiempo determinado. Lo cual conlleva a una evaluación de la exposición individualizada (Zahir et al., 2005).

En general existen tres tipos de biomarcadores: Biomarcadores de exposición, Biomarcadores de susceptibilidad y Biomarcadores de respuesta.

Un biomarcador de exposición se relaciona con un compuesto exógeno dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (González, 2006) y en caso de tratarse de tóxicos acumulativos, la dosis interna puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales como los órganos. Estos biomarcadores de exposición se dividen en selectivos y no selectivos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección. Los biomarcadores de exposición selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos, por ejemplo, el plomo en sangre, y los no

selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (Gil, 2000). Por ejemplo, la VTG como biomarcador de disrupción endocrina de un agente xenobiótico.

Los biomarcadores de susceptibilidad sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción (RFLPs), clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas (Martínez & Gómez, 2007).

El biomarcador de respuesta o efecto es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobiótico. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos contra un xenobiótico y autoanticuerpos (Gil, 2000).

En este estudio se utilizó a la Vitelogenina (VTG) como biomarcador de exposición. La VTG se encuentra en vertebrados ovíparos hembras, esta proteína es un precursor de la yema, crítica para el desarrollo del embrión ya que es una rica fuente de nutrientes, incluyendo ácidos amino, fosfato, carbohidratos, lípidos, y vitaminas. En machos, los niveles de estrógeno son normalmente bajos y hay poca circulación de VTG. La exposición de peces machos a sustancias estrogénicas exógenas trae como respuesta la síntesis de VTG. Así, los niveles elevados de esta proteína circulante en peces machos lo han convertido en el biomarcador biológico predeterminado para contaminantes ambientales acuáticos con actividad estrogénica (Gagné et al, 2001). El hígado es plenamente competente para sintetizarla bajo la influencia estrogénica y se detecta fácilmente con ayuda de estudios de expresión génica y/o pruebas ELISA para cuantificarla.

2.11. Ensayo de ELISA

Los ensayos de inmunomarcaje son procedimientos en los cuales se utilizan anticuerpos como agentes o reactivos enlazantes de forma específica teniendo una aplicación universal para la determinación o cuantificación de fármacos, sustancias biológicas, sustancias infecciosas o anticuerpos de respuesta del huésped. (Guzmán-Vázquez, 2004).

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ELISA utiliza una enzima como marcador para medir la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Existen diversas variaciones al método de ELISA para detectar y cuantificar ligando por su peso molecular, el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario (Guzmán, 2004).

La mayoría de las pruebas ELISA son ensayos en fase sólida en los cuales se adsorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido que suelen ser microplacas con múltiples pocillos que se utilizan como pequeños tubos de ensayo donde se llevan a cabo los enlaces (Liu et al., 2007).

La prueba ELISA se basa en el supuesto de que el antígeno y el anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica, también en la capacidad que tienen las enzimas de convertir una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del ligando al orden de los ng/ml, debido a la ventaja que supone que las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar. Además, la actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento sin que esto afecte o altere lecturas del ensayo posteriores (Guzman, 2004).

Para determinar antígenos, haptenos o anticuerpos se utiliza un tipo de prueba de ELISA denominada ensayo de enlace competitivo en fase sólida. Aquí el ligando no marcado compite con un ligando conjugado con enzima por un número limitado de sitios de enlace con el anticuerpo inmovilizado, y siguiendo el protocolo se retira el ligando no reactante, para así poder relacionar inversamente la cantidad de producto que se forma con la concentración del ligando no marcado en la muestra problema. Los ensayos de enlace no competitivo por su parte son denominados también, técnicas del emparedado o ELISA Sándwich y son los métodos más utilizados para determinar antígenos que por lo menos tienen dos determinantes antigénicos (Guzmán, 2004).

Un anticuerpo se define como una inmunoglobulina (Ig) capaz de una combinación específica con el antígeno que ha causado su producción en un animal susceptible. Ellos son producidos en respuesta a la invasión de moléculas foráneas en el cuerpo. Los anticuerpos pueden ser divididos en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, basado en el número de unidades y en el tipo de cadena pesada. Las cadenas pesadas de IgG, IgM, IgA,

IgD e IgE, son conocidas como gamma, mu, alpha, delta y épsilon (γ , μ , α , δ y ϵ , respectivamente). Las cadenas ligeras de cualquier anticuerpo pueden ser clasificadas como tipo kappa (K) o lambda (λ), basadas en pequeñas diferencias estructurales polipeptídicas; sin embargo, las cadenas pesadas determinan la subclase de cada anticuerpo (Rodkey y Nisonoff, 2001).

El principio básico de cualquier técnica inmunoquímica es el de que un anticuerpo específico se unirá con un antígeno específico para dar un complejo anticuerpo-antígeno exclusivo. La definición clásica de antígeno es cualquier sustancia foránea que elicit (traspasa información) una respuesta inmune cuando es introducida dentro de tejidos de animales susceptibles y que son capaces de combinar con los anticuerpos específicos formados (Roitt y Delves, 2003).

Los antígenos son generalmente de alto peso molecular y comúnmente son proteínas o polisacáridos, aunque polipéptidos, lípidos, ácidos nucleicos y otras moléculas pueden también funcionar como antígenos. La respuesta inmune puede también ser generada contra sustancias pequeñas, llamadas haptenos, si se encuentran acoplados a una proteína acarreadora, como la albúmina de suero bovino (BSA) u otras matrices sintéticas.

Una variedad de moléculas como drogas, azúcares simples, aminoácidos, pequeños péptidos, fosfolípidos o triglicéridos pueden funcionar como haptenos. Así, dándole suficiente tiempo, cualquier sustancia foránea será identificada por el sistema inmune y evocaría la producción de un anticuerpo específico. Sin embargo, esta respuesta inmune específica es altamente variable y depende mucho en parte del tamaño, estructura y composición de los antígenos. Los antígenos que elicitan una fuerte respuesta inmune se dice que son altamente inmunogénicos (Roitt y Delves, 2003).

La asociación se da cuando antígenos y anticuerpos interactúan por complementariedad espacial y no por uniones covalentes. La asociación específica del antígeno y el anticuerpo es dependiente de los puentes de hidrogeno, las interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y las fuerzas de van der Waals; por lo general solo son efectivas en distancias cortas reconociéndose y uniéndose si existe afinidad (Price, 2001).

2.12. Vitelogenina (VTG)

La VTG es una proteína precursora de la formación del vitelo en las hembras de peces, es común hallarla antes de la época de reproducción; es la proteína responsable de producir las yemas de los huevos en los peces hembra, en la sangre de los peces machos se encuentra en muy pocas cantidades (Van der Oost, 2003).

En los animales ovíparos los embriones dependen de las reservas presentes en los huevos. El crecimiento del ovario de muchas especies de peces se incrementa un 20 % en la madurez sexual en relación al peso corporal original que es de 1 %. Esta ganancia de peso tiene lugar a lo largo de los meses anteriores a la puesta, debido al acumulo de vitelo que asegura la alimentación de la larva en las primeras fases de su desarrollo, siendo la VTG la clave de este proceso que está regulado por gonadotrofinas y esteroides gonadales. La VTG es inducida por 17- β -Estradiol y su producción se relaciona directamente con la dosis, respuesta y temperatura. Es de origen hepático en peces como en otros vertebrados ovíparos (Zanuy et al., 1987).

La vitelogénesis es un proceso clave en la reproducción de las hembras de los peces, en el cual se involucra la síntesis y acumulación por parte del oocito de proteínas del huevo o vitelo, esenciales para el desarrollo del embrión. El mayor componente de ese material nutritivo está dado por las proteínas denominadas vitelinas (Vn), derivadas de su precursor VTG (Huberman, 2000).

En los machos la VTG puede actuar como un signo delator que responde al estrógeno mediante la fabricación de una proteína vitelina especial que normalmente sólo producen las hembras. En las hembras el hígado produce la VTG como respuesta a una señal estrogénica de los ovarios. Una vez sintetizada por el hígado, la sangre transporta de nuevo la VTG a los ovarios, donde se asimila y se incorpora a los huevos cuando la hembra se prepara para la reproducción.

Aunque los machos no producen huevos, sus hígados producen VTG si están expuestos a niveles elevados de estrógenos. Dado que esta respuesta depende en grado sumo de los estrógenos, los niveles de VTG encontrado en los peces machos ofrecen un buen indicio de la exposición a estrógenos (Van der Oost, 2003).

2.12.1. Metabolismo de la VTG en el pez cebra

La VTG se deriva gracias a los esteroides que juegan un rol autorregulador en el proceso de desarrollo gonadal ya sea regulando la síntesis de otras hormonas o proteínas, como la de sus propios receptores celulares en función de las concentraciones circulantes en sangre (Devlin et al., 2002; IPCS, 2002; Argemini et al., 2005).

En lo que refiere a la síntesis de esteroides, el primer paso es el clivaje enzimático del colesterol dando lugar a la producción de pregnenolona. Esta luego de una serie de transformaciones y genera la producción de la hormona testosterona (andrógeno), la cual a nivel del ovario es transformada en estradiol mediante la acción de la enzima CYP19 Aromatasa (Cheshenko et al., 2008).

Posteriormente el estradiol es movilizado por el torrente sanguíneo y a nivel del hígado desencadena la síntesis de la proteína VTG, la que vía plasmática retorna a la gónada para la formación del vitelo huevo. Figura 2.

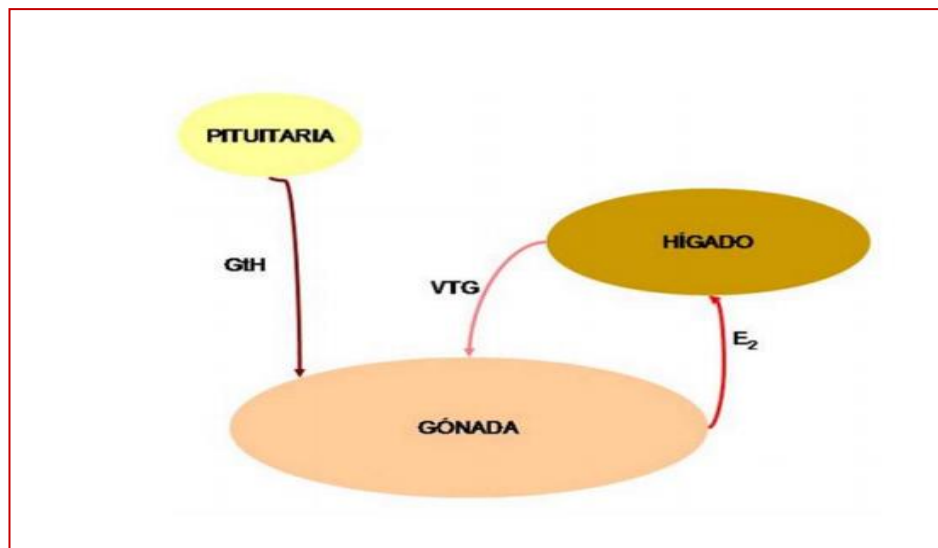


Figura 2. Esquema de síntesis de la VTG en los peces

El estradiol posee una fuerte capacidad de inducción de la síntesis de VTG, razón por la que se han detectado concentraciones variables de esta proteína en testículos tratados con estrógenos (Devlin et al., 2002; IPCS, 2002; Argemini et al., 2005; Cheshenko et al., 2008).

En la Figura 3 se muestra la ruta de retroalimentación en la cual la proteína VTG es precursora de la formación de la yema de los huevos en los peces cebra *Danio rerio*, desde la glándula pituitaria hasta el ovocito pasando por las células del folículo ovárico y los receptores hepáticos de estrógenos. (Tyler et al., 2008.)

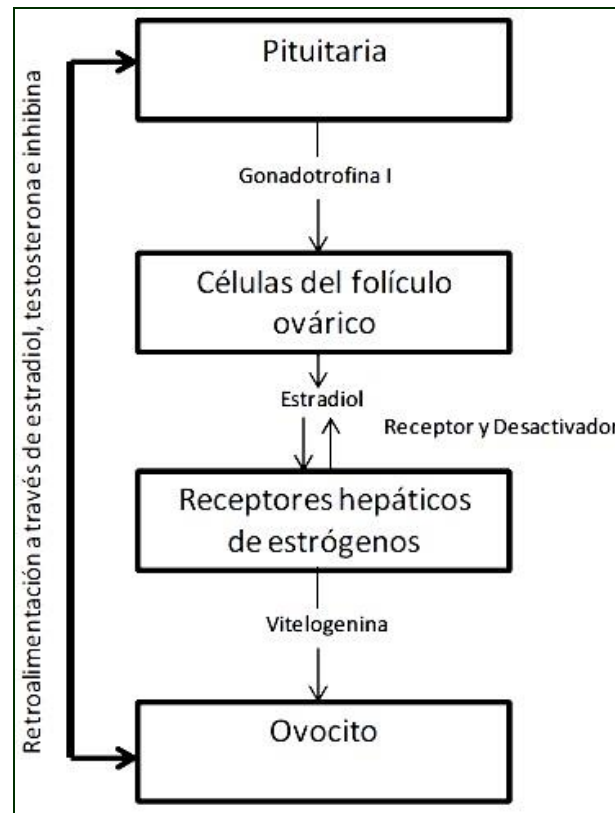


Figura 3. Ruta de hormonas para la reproducción en los peces
Fuente: Wheeler et al., 2005

2.13. Pruebas de comportamiento en larvas de pez cebra

Los embriones y larvas de pez cebra *Danio rerio* son buenos indicadores de la toxicidad de contaminantes presentes en el agua, para ello hay diversas maneras de evaluar su reacción o alteración por la presencia de sustancias tóxicas, como el análisis de su morfología, evaluación genética mediante PCR, pruebas de comportamiento, entre otras.

Existen diferentes softwares de seguimiento de video para rastrear y analizar el comportamiento, el movimiento y la actividad de algunas especies de animales mediante técnicas de imagen. Las técnicas de imagen desarrolladas se pueden usar en pantallas de

gran escala para identificar los genes, productos farmacéuticos y sustancias tóxicas ambientales que influyen en los comportamientos complejos (Creton, R., 2009).

Uno de los sistemas de seguimiento de video más utilizados para rastrear y analizar el comportamiento, el movimiento y la actividad de cualquier animal ha sido el *Ethovision XT* en cuyas aplicaciones se encuentra la monitorización de la actividad de las larvas de pez cebra *Danio rerio*, mediante el uso de una cámara de observación *DanioVision* como un entorno controlado. En este sistema se usan placas de múltiples pocillos que facilitan las pruebas de alto rendimiento en larvas gracias a su pequeño tamaño. El sistema *DanioVision* permite probar de manera efectiva, entre otros, los efectos sobre la actividad locomotora de larvas de pez cebra en respuesta a ciertos compuestos (Noldus, 2016).

La evaluación de comportamiento en pez cebra permite estudiar la locomoción en larvas de este pez de manera individual, a partir de los primeros días después de la fecundación, mediante el uso de sistemas de seguimiento de video usando placas de múltiples pocillos que facilitan la valoración de cada individuo puesto que se dispone de una larva por pozo en la placa.

Los movimientos que realizan las larvas para desplazarse de un lugar a otro dentro del pozo se miden a través de un sistema de seguimiento que indica la velocidad y la distancia recorrida por cada individuo en un determinado intervalo de tiempo y bajo unas condiciones ambientales definidas como tiempos de exposición, periodos de luz y oscuridad, temperatura, etc., y minimizando cualquier estimulación no deseada causada por la transferencia de las placas a la plataforma de grabación.

La detección y el monitoreo del movimiento de las larvas en una prueba de comportamiento se logra mediante el uso de un sistema conformado por una cámara de observación que cuenta con una lámpara de luz infrarroja y luz blanca, una cámara sensible IR, y tiene un diseño óptico para evitar la distorsión, Figura 4. En la parte interior está acondicionada para colocar una placa de múltiples pocillos que puede ser desde 48 hasta de 96, variando la cantidad de pocillos dependiendo del tamaño de estos Figura 5. Normalmente se pone una larva en cada pocillo. El sistema permite manipular las condiciones internas de la cámara, como la temperatura, los periodos de luz y oscuridad, y el tiempo de la prueba.



Figura 4. Cámara de observación



Figura 5. Placa instalada

2.14. PCR en tiempo real para evaluación ecotoxicológica

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, (PCR por sus siglas en inglés), es un método para obtener millones de copias de un segmento de ADN contenido en una molécula mucho más grande, basado en una reacción en cadena que tiene una gran sensibilidad, especificidad y versatilidad. La PCR es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Consiste en la amplificación in vitro de múltiples copias de un fragmento de DNA o RNA específico. Se basa en la actividad de la enzima DNA polimerasa termorresistente (Taq polimerasa) que es capaz de sintetizar una cadena de DNA complementaria a otra ya existente.

Para amplificar DNA se requieren dos oligonucleótidos iniciadores, también conocidos como cebadores homólogos, pues su secuencia es complementaria a una región iniciadora específica del DNA (Costa, 2004). El proceso consta de tres etapas: desnaturalización por calor del DNA en presencia de los cebadores, unión de éstos con el DNA, y síntesis de nuevas cadenas por la DNA polimerasa. El ciclo puede repetirse de nuevo, empleando esta vez las nuevas hebras como molde. De este modo se da lugar a un incremento exponencial del número de copias del fragmento de DNA amplificado, que puede detectarse más tarde, en un proceso de separación de moléculas por aplicación de una diferencia de potencial eléctrico conocido como electroforesis en gel de agarosa.

A pesar de las ventajas que ofrece la PCR de punto final, presenta inconvenientes como la posibilidad de obtener falsos resultados negativos en muestras ambientales por la presencia de ácidos húmicos, fúlvicos y metales que actúan como inhibidores. Por lo cual la muestra debe ser finamente procesada para extraer DNA o RNA y así la contaminación por estos factores es muy poco probable. La desventaja real es que el resultado no es cuantificable ni comparable y a concentraciones muy bajas de muestra pueden ser falsos negativos.

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) ha surgido como una metodología robusta y ampliamente utilizada en investigación biológica ya que puede detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas de ácidos nucleicos. Como herramienta de investigación, la principal aplicación de esta tecnología es la rápida y precisa amplificación de secuencias de DNA o/y RNA que permitirán cuantificar la cantidad de la secuencia blanco de la muestra para su posterior valoración y comparación entre condiciones.

Este método puede ser aplicado a sistemas modelo para medir respuesta a estímulos de tipo experimental y para adentrarse en los cambios potenciales en la expresión génica. De este modo, la fisiología puede ser correlacionada con eventos moleculares para tener un mejor entendimiento de los procesos biológicos (Rodríguez y Rodríguez, 2006). También conocida como Real Time PCR (RT-PCR) muestra la capacidad de monitorear el progreso de la reacción de PCR a medida que esta ocurre.

Este método revolucionó la forma en que se usaba la técnica de PCR para cuantificación de ADN y ARN. El RT-PCR usa moléculas de un reportero fluorescente para monitorear la amplificación de productos durante cada ciclo de reacción. Esta técnica combina los pasos de amplificación de ADN y la detección en un único ensayo y evita tener que preparar geles de electroforesis para detectar los productos amplificados.

Un análisis apropiado de los datos y/o de la química también permite eliminar la necesidad de realizar pruebas de Southern Blot o secuenciación de ADN para identificación de los amplicones. Su simplicidad, especificidad y sensibilidad junto con su potencial como técnica en aplicaciones futuras y la evolución hacia nuevos conocimientos de la química, además de la confiabilidad en la instrumentación y protocolos mejorados, han hecho del RT-PCT una tecnología altamente competitiva para la detección de ADN y ARN.

Mediante la técnica de PCR es posible amplificar un segmento de ADN de manera exponencial, ya que después de cada ciclo se duplica la cantidad de ADN que existe si la reacción ocurre con máxima eficiencia (Bustin et al., 2000). La principal meta del RT-PCR es distinguir y cuantificar de manera específica una secuencia de ácido nucleico en una muestra incluso cuando ésta se presenta en pequeñas cantidades.

Otra de las ventajas de la técnica de PCR en tiempo real es la cuantificación de ARN. Esto es posible gracias al uso de las reverso transcriptasas, enzimas que generan ADN complementario (ADNc) a partir de un templado de ARN. Bajo condiciones apropiadas, la cantidad de ADNc generado por reversotranscripción es proporcional al número de moléculas de ARN presente en una muestra dada (Cortázar y Rincón, 2004).

Este ADNc puede ser el templado para una reacción de PCR en tiempo real, utilizando su sensibilidad y precisión para determinar cambios en la expresión de genes. Esta técnica es conocida como RTPCR en tiempo real y se ha convertido en el método más popular para la cuantificación de los niveles de ARN mensajero (Bustin et al., 2000). Además, permite monitorizar en cada ciclo la aparición del ADN producto de la reacción mediante el uso de fluoróforos.

Cada vez que se realiza una copia del ADN molde se libera fluorescencia, por lo que ésta es proporcional a la cantidad de ADN generado. Además, el sistema de PCR a tiempo real proporciona mayor sensibilidad y robustez, con la posibilidad añadida de cuantificar la cantidad inicial de ADN diana presente en la muestra.

Agentes intercalantes

Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y, además, es más barato que las sondas específicas (Bustin et al., 2000).

El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la especificidad se deben emplear

condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

Es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (hot-start PCR), lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Para ello se pueden usar polimerasas recombinantes modificadas que sólo funcionan después de ser activadas a temperaturas elevadas o anticuerpos que bloquean el centro activo de la polimerasa hasta que la reacción alcanza temperaturas altas en las que el anticuerpo se desnaturaliza liberando la polimerasa y permitiendo su actividad (Cortázar y Rincón, 2004).

La mayoría de los equipos para PCR a tiempo real tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (T_m = temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR. Por otra parte, los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos en la secuencia diana.

Sondas de hibridación específicas

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas moleculares beacons y las sondas FRET, (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

Sondas de hidrólisis

Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' (cinco prima). Tanto 5' como 3' son los carbonos que forman la cadena de ADN. Hay que recordar que las cadenas de ADN están formadas por nucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina) y cada nucleótido está formado por una pentosa en forma de anillo y cada carbono de este anillo tiene un número 1', 2', 3', 4' y 5' más un fosfato, refiere el sentido y antisentido de las dos hebras, mientras en una se une el carbono 5' de un nucleótido con

el carbono 3' del otro, la otra se une al 3' con 5' esto es importante porque la enzima involucrada en la multiplicación del ADN la ADNpolimerasa sigue el sentido 3'-5' para reproducir la hebra nueva y es al seguir esta secuencia que la sonda emite fluorescencia al ser excitada y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector, (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

Molecular beacons

Son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN diana la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero, (Mackay et al., 2004).

Sondas FRET

El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo. En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento

en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el SYBR Green y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil, (Dieffenbach y Dveksler, 2003).

La tecnología de la PCR fluorescente (PCR en “tiempo real”) basada en sondas, ha llevado al desarrollo del ensayo de forma cuantitativa. En la PCR, el producto que se genera se marca con un fluorocromo “reporter”, y la cantidad de luz fluorescente que se libera durante la amplificación será directamente proporcional a la cantidad del producto sintetizado, estimándose el número inicial de copias a partir de la acumulación del producto en la fase exponencial, lo que le otorga una elevada precisión y exactitud en la cuantificación.

Los fluorocromos o fluoróforos con los que se marca el producto de PCR, son componentes de una molécula que hacen que esta sea fluorescente. Es un grupo funcional de la molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica y conducirá al fluoróforo a un estado excitado. Al volver de este estado al fundamental, se emitirá una luz a una energía más baja (mayor longitud de onda) que a la que fue captada.

Existen compuestos fluorescentes como el SYBR Green (Rodríguez y Rodríguez, 2006) que se intercalan en el DNA de doble cadena sintetizado. Son muy sensibles, pero su señal no es dependiente del amplicón, por lo que dímeros de cebadores y otros artefactos de PCR pueden conducir a falsos resultados positivos. Para hacer frente a este problema, se utilizan métodos más específicos de detección por PCR en “tiempo real” (qPCR), como las sondas complementarias a las reacciones que se hibridan con el amplicón de una forma dependiente de la secuencia. (VanGuilder et al., 2008; Mackay et al., 2004). Estas sondas de DNA están marcadas comúnmente por dos fluorocromos, uno de alta energía (Reporter) en 3', y otro de baja energía (Quencher) en 5', como por ejemplo en las sondas TaqMan. De esta manera, durante los ciclos de PCR, la cantidad de fluorescencia se irá acumulando e indicará la concentración de DNA obtenido (Hanami et al., 2013).

El resultado de una PCR a tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación. En él se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas. De esta forma, la curva de amplificación consta de una fase inicial donde la producción de fluorescencia (ADN producto) está por debajo del nivel de detección del termociclador, una segunda fase en la que se da un incremento de la fluorescencia, el cual es en forma exponencial en su inicio, y una tercera

fase (plateau) donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia. El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina Ct (Threshold Cycle). Este punto indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral. Cuanto más ADN inicial tenga la muestra se alcanza antes este valor, pues será menor el número de ciclos necesarios (Ct menor) para ello. Si la eficiencia de la reacción es óptima, cada vez que se diluye una muestra 10 veces el valor de Ct aumenta aproximadamente 3,3 ciclos.

2.15. Antecedentes y la importancia de este estudio

En el mundo cada vez más se está adquiriendo mayor conciencia sobre los problemas ocasionados por la contaminación ambiental y es por ello que diversas organizaciones como la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Comisión Europea (CE), centros e institutos de investigación científica, universidades, entre otros, se han enfocado en la búsqueda de alternativas de mitigación, solución y prevención. Estos esfuerzos han permitido el estudio y diseño de técnicas experimentales para la determinación de las sustancias químicas que ocasionan daños en el medio ambiente, el efecto que estas tienen en los organismos vivos, en la salud humana y en los ecosistemas, las diferentes tecnologías para la remediación y la prevención, etc.

Se han realizado múltiples investigaciones de todos los factores involucrados en el tema de la contaminación ambiental desde el estudio de cientos de contaminantes, su origen, sus características fisicoquímicas, los efectos nocivos y las probables formas de remediación en diferentes matrices, aire, agua y suelo, hasta la posibilidad de sustituirlos por otras sustancias o materiales ecológicos que no impacten el medio ambiente.

Como ejemplo está la Comisión Europea que ha presentado varios listados de más de 300 sustancias entre fármacos y productos químicos para la industria que son reguladas y controladas por presentar características como disruptores endocrinos, dentro de estas sustancias se encuentra el 4-nonilfenol y el nonilfenol que es uno de los contaminantes de interés en esta investigación. Para la obtención de dichos listados han sido necesarias las evaluaciones ecotoxicológicas que hacen parte de los temas investigados con frecuencia ya que permiten definir el grado de afectación de los contaminantes y así tomar medidas para el control y la regulación de su uso.

De los dos contaminantes emergentes estudiados en esta tesis los nonilfenoles han sido mayormente tema de investigaciones debido a que son más usados a nivel mundial por ser un ingrediente común en muchos productos industriales como los detergentes, productos de cuidado personal, y productos de uso agrícola, además ya han sido definidos como disruptores endócrinos; éstos se han evaluado en diferentes matrices especialmente en agua y suelo, y a través de diferentes organismos vertebrados como ratas, sapos y peces, especialmente en estudios de toxicidad crónica. A diferencia de este, la carbamazepina ha sido analizada por ser un fármaco de difícil degradación, y los estudios han estado enfocados específicamente en la depuración en plantas de tratamiento de aguas residuales, y en la detección en cuerpos de agua y suelos, especialmente en efluentes secundarios y terciarios de las PTARs mediante el uso de técnicas cromatográficas. En la revisión bibliográfica realizada no se encontró ninguna investigación que haya definido la carbamazepina como disruptor endócrino.

CAPÍTULO 3 – METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

La experimentación se dividió en dos etapas: a) evaluación ecotoxicológica de la CBZ y los NP mediante pruebas de ELISA; y b) expresión génica (PCR RT) y de comportamiento de larvas de pez cebra expuestos a CBZ y NP.

La primera etapa, corresponde al trabajo realizado en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería con el apoyo del Bioterio y del Laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, ambos ubicados en C.U. UNAM, en esta etapa se llevó a cabo la evaluación ecotoxicológica de la CBZ y los NP en agua a través de la cuantificación de la VTG mediante pruebas ELISA en peces cebra *Danio rerio*.

La segunda etapa fue realizada como complemento de la investigación en una estancia en el Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) en Barcelona España. Se llevó a cabo un trabajo de aplicación de técnicas de experimentación, evaluación de comportamiento y parámetros de toxicidad en embriones de pez cebra *Danio rerio* sometidos a dosis de NP y CBZ, para ello se realizaron varias pruebas experimentales que permitieron determinar su toxicidad en periodos cortos de exposición de las larvas, y mediante diferentes factores de análisis, como pruebas de comportamiento, y extracción y análisis de RNA para PCR cuantitativa en tiempo real.

3.1. Evaluación ecotoxicológica de la CBZ y los NP con pruebas de ELISA – OCDE 230

La metodología general para esta primera etapa de la investigación estuvo basada en el diseño y la instalación de un sistema experimental operado de acuerdo a la técnica estandarizada propuesta por la guía OCDE 230 (OCDE, 2009). La prueba experimental sugerida aplicada en este trabajo para determinar el grado ecotoxicológico de la CBZ y los NP, consiste en la evaluación de la actividad de disrupción endócrina en peces cebra *Danio rerio* expuestos durante un periodo de 21 días a diferentes concentraciones de los contaminantes en estudio.

Para ello se realizó un estudio in vivo de un stock de peces que se mantuvieron en condiciones controladas expuestos durante 21 días a tres concentraciones diferentes de

cada uno de los contaminantes evaluados en agua sintética semidura elaborada en el laboratorio y en agua de manantial y de pozo obtenida en una zona de México. Posteriormente se cuantificó la producción de Vitelogenina (VTG exógena) en los peces a partir de pruebas ELISA y se realizaron los análisis estadísticos de los resultados obtenidos.

En la Figura 6 se presenta un esquema general de los pasos llevados a cabo para esta la experimentación.

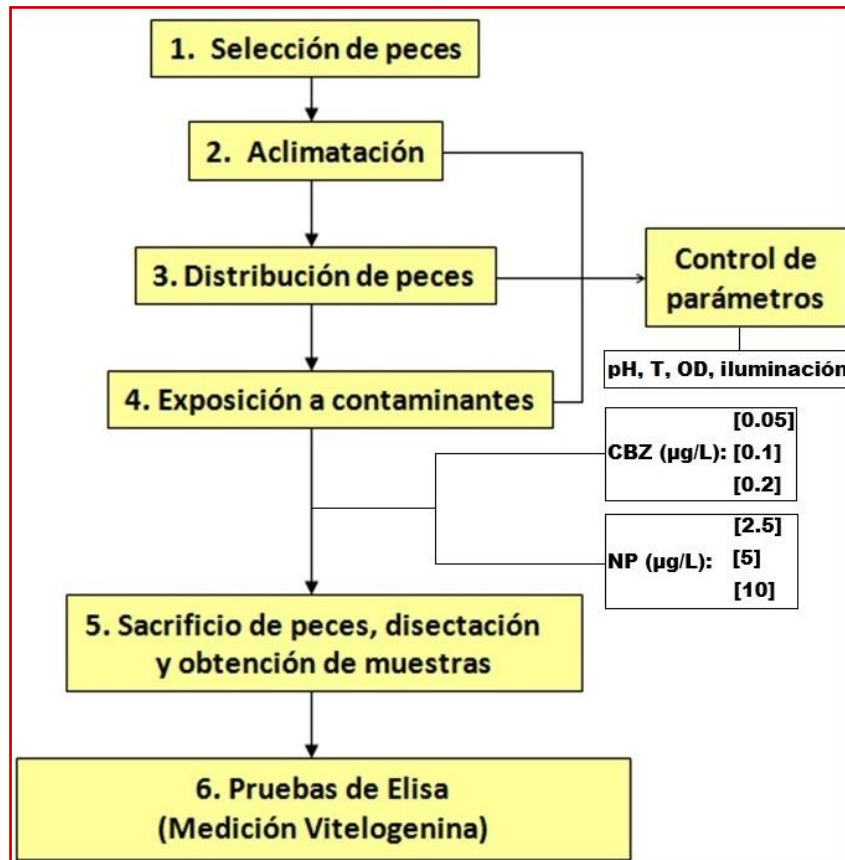


Figura 6. Esquema general de la Guía Técnica OCDE - TG – 230 (2009)

El procedimiento general que se siguió en la experimentación aplicando la Guía Técnica OCDE-230 fue el siguiente:

- ✓ Selección de los peces
- ✓ Preparación de las matrices
- ✓ Pre-exposición o aclimatación de los peces
- ✓ Preparación de soluciones: CBZ y NP y control positivo (17β Estradiol)

- ✓ Distribución de peces en las peceras
- ✓ Exposición de peces a contaminantes por 21 días
- ✓ Alimentación y cuidado diario de los peces
- ✓ Control de luz, temperatura, pH, OD
- ✓ Limpieza y recambio de agua en cada pecera
- ✓ Análisis fisicoquímicos de agua, 4 veces durante la prueba
- ✓ Necropsia de peces y toma de muestras
- ✓ Determinación de VTG mediante el método ELISA
- ✓ Captura de resultados y análisis estadísticos

Al finalizar este experimento los análisis se realizaron con el fin de determinar las diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas de los tratamientos en los cuales los peces estuvieron expuestos a las concentraciones de CBZ, NP, agua de manantial y de pozo, y los tratamientos de control positivo y negativo.

Materiales y reactivos:

Materiales

- ✓ Peces cebra (*Danio rerio*) vivos
- ✓ 2 peceras de 60 a 70 L cada una, para el periodo de aclimatación
- ✓ 20 Pecera de vidrio de 7L cada una
- ✓ Pipetas Pasteur de vidrio con filtro de algodón (40 unidades)
- ✓ Mangueras para pecera
- ✓ Sistema para suministro continuo de aire
- ✓ Redes de tela
- ✓ Sistemas de iluminación
- ✓ Agua destilada
- ✓ Concentraciones estimadas de CBZ
- ✓ Concentraciones estimadas de NP
- ✓ Concentración estimada de 17β - Estradiol
- ✓ Jeringas

Reactivos

- ✓ Estándar de CBZ (referencia C4024 marca Sigma-Aldrich, con No. CAS 298-46-4)
- ✓ Estándar de Nonilfenol (referencia 290858 marca Sigma-Aldrich, con No. CAS 84852-15-3)

- ✓ Metanol grado HPLC (J.T. BAKER) al 99.97%.
- ✓ Control positivo (17 β - estradiol)
- ✓ Sustrato para identificación de Elisa y VGT (VTG)
- ✓ Tricaína (Tricaína metanosulfonato, metacaína, MS-222, CAS.886-86-2)
- ✓ NaHCO₃ (bicarbonato de sodio, CAS.144-55-8)
- ✓ CaSO₄ (Sulfato de calcio)
- ✓ MgSO₄ (Sulfato de Magnesio)
- ✓ KCl (Cloruro de Potasio)
- ✓ Agua destilada Tipo II.

3.1.1. Adquisición de peces y aclimatación

Se adquirieron 220 peces cebra *Danio rerio*, 110 machos y 110 hembras, en La Unidad de Producción Acuícola Miacatlán, certificada por el Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Morelos. En una granja del municipio de Miacatlán en el Estado de Morelos Figura 7 y Figura 8. Éstos fueron transportados hasta las instalaciones del laboratorio del Instituto de Ingeniería de la UNAM. Durante el transporte los peces permanecieron en neveras para garantizarles una temperatura aproximada de 26°C de acuerdo a las recomendaciones para esta especie (Avdesh et al, 2012).



Figura 7. Unidad de Producción Acuícola Miacatlán



Figura 8. Estanque de reproducción

Los peces se seleccionaron de una sola población con una edad de 14 semanas, y permanecieron durante dos semanas en el periodo de aclimatación. Antes del inicio de la

aclimatación se pesó una submuestra de la población de peces, los pesos individuales para los machos y hembras se mantuvo dentro de $\pm 20\%$ de la media aritmética del peso del mismo sexo, que para el caso de las hembras fue de 0.6 g y para machos de 0.4 g.

La aclimatación consistió en poner los peces durante dos semanas separados entre machos y hembras en dos peceras de 63L y 72L, respectivamente, bajo condiciones fisicoquímicas óptimas de temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad, fotoperiodo, calidad de agua y alimentación, similares a las condiciones en que estarían después de hacer la clasificación y redistribución de los peces para iniciar la exposición a los contaminantes en estudio, de acuerdo a lo que establece la Guía Técnica OCDE 230. Figura 9 y Figura 10.

Durante el periodo de aclimatación los peces estuvieron a una temperatura de $26 (\pm 2) ^\circ\text{C}$, Oxígeno Disuelto mayor al 60% de la saturación, pH entre 6.5 y 8.5, un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, la iluminación se proporcionó con lámparas fluorescentes de amplio espectro, la alimentación fue a saciedad con alimento comercial Tetramin dos veces al día, una en las horas de la mañana entre las 10:00 y 11:00 hrs y la otra en la tarde entre las 17:00 y 18:00 hrs.



Figura 9. Preparación de peceras para el periodo de aclimatación



Figura 10. Preparación de peceras para el periodo de aclimatación

A partir de las siguientes 48 horas de iniciado el periodo de aclimatación se registró la mortalidad y durante este periodo solo se obtuvo un pez muerto del grupo de los machos, este individuo fue retirado de la pecera. Se logró una supervivencia del 99,5% de la población adquirida lo que permitió la aceptación del lote para el experimento de acuerdo a los criterios para aceptar o rechazar el lote presentados en la Tabla 8.

Tabla 8. Criterios para aceptar o rechazar el lote de peces según la mortalidad

Comportamiento	Criterio
Mortalidad superior al 10% de la población en siete días	Rechazar todo el lote
Mortalidad entre el 5% y el 10% de la población, durante los siguientes siete días adicionales de aclimatación	Rechazar todo el lote
Mortalidad menor al 5% de la población durante los primeros 7 días de aclimatación	Aceptar el lote

Fuente: (OCDE, 2009).

3.1.2. Preparación y composición de matrices: agua sintética, agua de manantial y pozo

El experimento se realizó con base a 10 tratamientos diferentes compuestos por: 3 tratamientos con concentraciones de CBZ (0.05, 0.1 y 0.2 $\mu\text{g/L}$), 3 tratamientos con concentraciones de NP (2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/L}$), 1 tratamiento como control positivo con una concentración de 17β – Estradiol (0.05 $\mu\text{g/L}$), 1 tratamiento como control negativo con agua sintética semidura sin ninguna sustancia contaminante, 1 tratamiento con agua tomada de un manantial, y 1 tratamiento con agua subterránea tomada de un pozo profundo.

Las matrices de los tratamientos para la evaluación de la CBZ, los NP, el control positivo y el control negativo, se componen de agua sintética semidura preparada en el laboratorio con agua destilada tipo II, sales minerales y dopada con las concentraciones definidas para cada contaminante. Y en los tratamientos con agua de manantial y agua de pozo no se hizo adición de ningún tipo de sustancia o contaminante. A continuación, se describe el procedimiento para la preparación de las matrices con agua sintética semidura y obtención de las matrices de agua de manantial y de pozo.

3.1.2.1. Preparación agua sintética semidura dopada con CBZ, NP y 17 β - Estradiol

Durante todo el experimento se preparó agua sintética semidura para proporcionar a los peces condiciones similares a las del agua de mar, así garantizar la supervivencia y el crecimiento adecuado de los peces y que no hubiera interferencia de otras sustancias contaminantes diferentes a las de estudio. El agua sintética semidura fue la matriz utilizada para la evaluación de las concentraciones de CBZ, de NP, el control positivo y el control negativo.

El agua sintética semidura se preparó en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental con agua destilada tipo II y la adición de cuatro sales recomendadas por la APHA: Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3), Sulfato de Calcio (CaSO_4), Sulfato de Magnesio (MgSO_4) y Cloruro de Potasio (KCl), y según los volúmenes de agua requeridos de acuerdo a los tamaños de las peceras se aplicaron las cantidades presentadas en la Tabla 9.

Tabla 9. Composición de agua sintética semidura

Volumen (L)	Cantidad de sales (g)			
	NaHCO_3	CaSO_4	MgSO_4	KCl
1	0.096	0.06	0.06	0.004
5	0.48	0.3	0.3	0.02
3	0.288	0.18	0.18	0.012
10	0.96	0.6	0.6	0.04
20	1.92	1.2	1.2	0.08
72	6.912	4.32	4.32	0.288
63	6.048	3.78	3.78	0.252

Las concentraciones de CBZ y NP evaluadas fueron determinadas con base a los siguientes criterios:

1. Concentraciones que reporta la literatura para cuerpos de agua y acuíferos en México y otros países. Tabla 10.
2. Información ecológica de la CBZ y de los NP. Tabla 11, Tabla 12 y Tabla 13.

Para considerar el primer criterio se seleccionó información referente a valores de CBZ y de NP encontrados en diferentes medios como agua residual, agua superficial y agua subterránea, en México y en otros países, estos se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Concentraciones de CBZ y NP en diferentes matrices

Concentraciones encontradas en diferentes matrices			
Compuesto	Matriz	Concentración (µg/L)	Autor
CBZ	Agua residual	0.29	Stumpf et al., 1999
	Agua superficial	0.04	Tixier et al., 2003
	Agua subterránea (reinyectada)	0.53	Kreuzinger et al., 2004
	Agua residual (otro países _ Canadá)	1.86	Lishman, 2006
	Agua residual Cerro de la Estrella (México)	2.47	Jiménez et al., 2006
	Agua residual (Emisor Central Ciudad de México)	0.41	Jiménez et al., 2008
	Suelo regado con agua residual	0.0009	Kinney et al., 2006
	Escorrentía de campos agrícolas regados con agua residual	0.44	Pedersen et al., 2005
	Canales de agua residual	0.37	Jiménez et al., 2008
NP	Agua residual (Ciudad de México)	20.80	Jiménez et al., 2006
	Agua residual (Emisor Central Ciudad de México)	13.88	Jiménez et al., 2008
	Agua residual (otros países)	1.14	Bendz 2005; Suecia
	Agua residual Cerro de la Estrella (México)	8.81	Jiménez et al., 2008

El segundo criterio se consideró a partir de las hojas de seguridad de los dos contaminantes analizados, en estas se obtuvo la información referente a la toxicidad ecológica que se usó como guía para decidir las concentraciones de evaluación. En la Tabla 11 y Tabla 12 la se encuentran los datos de toxicidad ecológica para la CBZ y para los NP, respectivamente.

Tabla 11. Información ecológica de la CBZ

Información ecológica - Toxicidad de la CBZ: C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O		
Concentraciones	Especies	Exposición
Toxicidad Aguda		
EC50 - 49.4 mg/L Agua fresca	Algas - <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	96 horas
EC50 - 74 mg/l Agua fresca	Algas - <i>Desmodesmus subspicatus</i>	3 días
EC50 - 77700 µg/l Agua fresca	Crustáceos - <i>Ceriodaphnia dubia</i>	48 horas
EC50 - 13800 µg/l Agua fresca	<i>Dafnia</i> - <i>Daphnia magna</i>	48 horas
CL50 - 19.9 mg/l Agua fresca	Pescado - <i>Oncorhynchus mykiss</i> - Juvenil (Nuevo, Cría, Destetado)	96 horas

Información ecológica - Toxicidad de la CBZ: C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O		
Concentraciones	Especies	Exposición
Toxicidad Crónica		
NOEC - 0.5 mg/L Agua fresca	Algas - <i>Scenedesmus acutus</i> var. <i>Acutus</i>	72 horas
NOEC - 0.00089 mg/l Agua fresca	Peces - <i>Oncorhynchus mykiss</i>	42 días

Fuente: Agilent Technologies Manufacturing GmbH & Co. KG. Ficha de datos de seguridad - CBZ (2013)

Tabla 12. Información ecológica de los NP

Información ecológica - Toxicidad del nonilfenol:		
Concentraciones	Especies	Exposición
Toxicidad Aguda		
CL50 - 0.209 mg/L	Peces <i>Lepomis macrochirus</i>	96 horas
CE50 - 0.0844mg/L	<i>Daphnia magna</i> (Pulga de mar grande) y otros invertebrados acuáticos	48 horas
CE50 - 0.33 mg/L	Algas verdes - <i>Selenastrum capricornutum</i>	72 horas

Fuente: Sigma – Aldrich. Ficha de datos de seguridad – Nonilfenol, 2015.

Adicionalmente se encontró información proporcionada por la EPA sobre la toxicidad de los NP para peces e invertebrados acuáticos, Tabla 13.

Tabla 13. Toxicidad de peces expuestos a nonilfenol (EPA, 2010)

Organismos acuáticos	NOEC (mg/L)	LOEC (mg/L)	Días
Peces	0.005 – 0.07	0.12 – 0.19	28
Peces	0.007	0.014	33
Invertebrados acuáticos	0.10 – 0.24		21

Las concentraciones de ensayo máximas se fijaron en base a las concentraciones máximas toleradas (MTC) de acuerdo a datos de toxicidad aguda para organismos acuáticos. La MTC se define como la más alta concentración de una sustancia química que ocasiona una mortalidad inferior al 10%.

Considerando los criterios ya mencionados se definieron las concentraciones de evaluación de la CBZ y los NP. En la Tabla 14 se presentan los tratamientos, las siglas de identificación y la concentración definida para cada tratamiento.

Tabla 14. Tratamientos con las concentraciones de CBZ y NP a evaluar

Tratamientos			Concentración (µg/L)
1	C1 CBZ	Agua sintética semidura + (dosis 1 de CBZ)	0.05
2	C2 CBZ	Agua sintética semidura + (dosis 2 de CBZ)	0.1
3	C3 CBZ	Agua sintética semidura + (dosis 3 de CBZ)	0.2
4	C1 NP	Agua sintética semidura + (dosis 1 de NP)	2.5
5	C2 NP	Agua sintética semidura + (dosis 2 de NP)	5
6	C3 NP	Agua sintética semidura + (dosis 3 de NP)	10
7	Ctr (+)	Control positivo: Agua + (dosis de 17 β - E)	0.05
8	Ctr (-)	Control negativo: Agua sintética semidura	----
9	AM	Agua del manantial Cerro colorado *	CBZ: 0.00772 4-NP: 0.016
10	AP	Agua de pozo (acuífero profundo en México)**	----

La concentración para el control positivo (0.05 ug/L de 17 β – Estradiol) viene establecida en la Guía Técnica OCDE – 230 como un valor estándar independientemente de los contaminantes y valores de concentración que se están evaluando. Las soluciones de las concentraciones para los dos compuestos de análisis se prepararon por dilución de una solución madre.

Los valores de concentración de CBZ y NP para el agua de manantial y de pozo se asumieron hipotéticamente tomados de investigaciones realizadas con anterioridad en estos sitios para determinar la calidad del agua.

3.1.2.2. Toma de muestras de agua de manantial y de pozo profundo

Se realizó una salida de campo para la toma de muestras del agua de manantial y de pozo profundo que hicieron parte de los tratamientos aplicados a los peces durante la

exposición. Los tratamientos 9 y 10 del experimento se realizaron con el agua de manantial y del pozo, respectivamente, con el fin de evaluar los efectos adversos como la supervivencia, el desarrollo y el crecimiento de los peces y al final cuantificar sus niveles de VTG.



Figura 11. Manantial Cerro Colorado, Valle de Tula. Estado de Hidalgo, México



Figura 12. Agua superficial del manantial Cerro Colorado

La matriz del tratamiento 9 se obtuvo del Manantial Cerro Colorado ubicado en el Valle de Tula en el estado de Hidalgo, a 40 km al norte de la Ciudad de México. Figura 11 y Figura 12. El agua de esta zona ha sido fuente de varias investigaciones enfocadas específicamente en la calidad y sistemas para su tratamiento, ya que una parte es destinada para consumo humano y para el riego de cultivos en las zonas aledañas, y se ha detectado la presencia de contaminantes como la CBZ y los NP. (Chávez et al., 2015).

El agua subterránea se obtuvo de un pozo profundo que abastece el acueducto de la comunidad de Teocalco de Tula en el Estado de Hidalgo, Figura 13 y Figura 14. Se tomaron aproximadamente 100L de agua de cada sitio con el fin de garantizar el abastecimiento para el flujo continuo en las peceras durante la exposición de los peces en la experimentación, y poder de evaluar los efectos ecotoxicológicos en los peces por la posible presencia de los dos contaminantes en estudio.



Figura 13. Toma de muestra pozo profundo



Figura 14. Pozo para agua potable comunidad de Teocalco de Tula.

3.1.3. Montaje experimental: sistema de flujo continuo, sistema de iluminación, control de temperatura y suministro de oxígeno

El montaje experimental se basó en la instalación de las peceras para la aplicación de los diez tratamientos ya mencionados cada una con su respectiva réplica, así se tuvo un total de 20 peceras con suministro de agua mediante un sistema de flujo continuo, suministro de oxígeno, iluminación controlada con un timer, y temperatura controlada con termostatos para cada pecera, y cada una contó con un nivel de salida de agua constante.

Para la exposición de los peces a los contaminantes se usaron peceras redondas con capacidad para 7L de agua, y para el experimento se usaron 5L de agua en cada pecera de los cuales diariamente circularon 2L mediante la instalación de un sistema de flujo continuo.

El flujo continuo se logró gracias al diseño de un sistema de alimentación por goteo a través de válvulas de venoclisis adaptadas a botellas de vidrio color ámbar con una capacidad de 4L que se situaron boca abajo en un área elevada a una determinada altura por encima de la ubicación de las peceras, como se muestra en la Figura 15, se instaló una botella por cada pecera. La manguera de salida de cada válvula de venoclisis se unió a una micropipeta pasteur que iba sumergida dentro de la pecera y así se garantizó el ingreso

del agua a las peceras por la parte inferior, logrando el desplazamiento del agua dentro de la pecera desde abajo hacia arriba ya que la salida del flujo se realizó en la parte superior de las peceras a una altura de 5L, de este modo el nivel de agua en cada pecera se mantuvo constante y al tiempo que entraban 2L por la parte inferior salían 2L por la parte superior manteniéndose así un flujo continuo y la concentración de cada tratamiento.

Se instaló una botella por pecera y cada dos días las botellas se vaciaban al cumplir con el suministro de los 4L, inmediatamente se rellenaban nuevamente con las matrices correspondientes a cada tratamiento. El suministro de 2L de agua diaria de forma continua se hizo programando las válvulas de venoclisis para que saliera una gota cada 5 segundos, esto se hizo calibrando cada una de las válvulas usando un cronómetro para medir el tiempo y el volumen de agua acumulado por minuto, así se determinó un volumen promedio de 1.38mL por minuto, equivalentes a 82mL en una hora, para finalmente obtener 2L en 24h.

La salida del agua en las peceras se logró a través de una perforación hecha a cada pecera a una altura de 5L, en la cual se conectó una manguera para conducir el flujo de salida a un canal que recolectó toda el agua evacuada de las peceras, Figura 16, con este sistema los niveles de agua no sobrepasaron los 5L durante todo el periodo del ensayo.



Figura 15. Suministro de agua a través del flujo continuo



Figura 16. Tirante de pecera: 5L, nivel de salida de agua constante

En la parte superior de la ubicación de las peceras se instalaron 6 lámparas fluorescentes de amplio espectro, de 800 lux, (ambiente niveles de laboratorio), controladas con un timer que durante todo el experimento garantizó 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, éstas fueron programadas para encenderse todos los días a las 7:00 am y apagarse a las 7:00 pm.

A cada pecera se le instaló un termostato, todos éstos fueron programados para mantener la temperatura del agua a 26°C de manera constante durante el tiempo de aclimatación y durante los 21 días de exposición a los contaminantes. También se hizo la instalación de micropipetas pasteur conectadas a través de mangueras a los sistemas de aire con que cuenta el Laboratorio de Ingeniería Ambiental para realizar el suministro de oxígeno en las peceras.

Para el día 1 de exposición se tuvo el montaje experimental completo que se presenta en la Figura 17.



Figura 17. Montaje completo para Sistema experimental – ecotoxicidad con modelo *Danio rerio*

3.1.4. Distribución de peces por tratamiento

Después de varios ensayos en la instalación del sistema para estandarizar el suministro de agua en las peceras, el control de la temperatura, el suministro de oxígeno y la iluminación, se procedió al traslado y la distribución de los peces desde las peceras

grandes de aclimatación, donde se encontraban separados por sexo, a las peceras pequeñas ya preparadas con la cantidad de agua requerida, 5 L por pecera, cada una con la concentración del tratamiento correspondiente para iniciar la exposición de 21 días.

Se instalaron 10 peceras cada una con su respectiva repetición, dos peceras por cada tratamiento, para un total de 20 peceras. En la Tabla 15 se muestra el número de peceras con sus siglas de identificación, el tipo de tratamiento que llevaron las peceras y la concentración aplicada.

Se hizo una distribución en grupos de 10 peces por pecera, 5 machos y 5 hembras, para la fecha de inicio de la exposición éstos tenían 16 semanas de vida.

Tabla 15. Número de peceras y tratamientos correspondientes a cada una

# pecera Tratamiento		# pecera Réplica		Tratamiento en cada pecera	Concentración del CE $\mu\text{g/L}$
1	C1 CBZ	11	R C1 CBZ	5L de agua semidura + 0.25 μg de CBZ	0.05
2	C2 CBZ	12	R C2 CBZ	5L agua semidura + 0.5 μg de CBZ	0.1
3	C3 CBZ	13	R C3 CBZ	5L agua semidura + 1 μg de CBZ	0.2
4	C1 NP	14	R C1 NP	5L agua semidura + 12.5 μg de NP	2.5
5	C2 NP	15	R C2 NP	5L agua semidura + 25 μg de NP	5
6	C3 NP	16	R C3 NP	5L agua semidura + 50 μg de NP	10
7	Ctr (+)	17	R Ctr (+)	Ctr (+) agua semidura + 0.25 μg de 17 β -Estradiol	0.05
8	Ctr (-)	18	R Ctr (-)	Ctr (-): agua sintética semidura	—
9	AM	19	R AM	agua del manantial sin ninguna adición	—
10	AP	20	R AP	agua de pozo sin ninguna adición	—

3.1.5. Operación del sistema experimental y parámetros de control

Alimentación de los peces

Durante los 21 días del ensayo los peces fueron alimentados dos veces al día (ad libitum) hasta saciedad, con alimento comercial (Tetramin) y los últimos diez días se complementó

el alimento con nauplios de Artemia salina, la alimentación se les suministró una en la mañana entre las 10:00 y 11:00 h y otra en la tarde entre las 17:00 y 18:00 h.

Registro de mortalidad

Durante los 21 días de exposición de los peces a los tratamientos, se evaluó de manera general su comportamiento y se verificó que no hubiera peces muertos, en este periodo se tuvo una mortandad de 4 peces los cuales fueron retirados del tratamiento y no fueron reemplazados de acuerdo a lo que indica la Guía OCDE- 230. Los 4 peces fueron de diferentes peceras y en tiempos diferentes y no fue posible determinar la razón de la muerte.

Control de luz, temperatura y suministro de oxígeno

Para mantener la temperatura indicada, $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, diariamente se hizo la revisión uno a uno de todos los termostatos, y se verificó que estuvieran programados en 26°C , la revisión se hizo en la mañana y en la tarde para verificar que la temperatura no variara.

La iluminación se mantuvo controlada con la instalación del timer que se tuvo programado durante los 21 días para un fotoperiodo de 12h luz y 12h oscuridad, bajo las mismas condiciones que en la aclimatación las lámparas se encendieron a las 7:00h y se apagaron a las 19:00h.

Diariamente se revisó el suministro de oxígeno en cada pecera dos veces al día, en la mañana y en la tarde, el cual se mantuvo continuo durante todo el experimento procurando proporcionar la misma cantidad en todas las peceras graduando las válvulas de paso en la misma medida, para tener un oxígeno disuelto mayor al 60% de la saturación.

Día por medio se realizó la medición del pH en cada pecera y se verificó que se mantuvo en el rango de valores entre 6.5 y 8.6.

Los parámetros que se mantuvieron controlados fueron los siguientes:

- ✓ Temperatura: $24^{\circ}\text{C} < T < 28^{\circ}\text{C}$
- ✓ Oxígeno Disuelto: $\geq 60\%$ de la saturación
- ✓ Iluminación: 12 h luz / 12 h oscuridad
- ✓ pH: 6.5 - 8.5

Limpieza de las peceras

Las peceras se limpiaron diariamente succionando del fondo de cada una los restos de alimento que no fue consumido y las heces fecales de los peces, para esto se utilizó una manquera de succión.

Evaluación de la calidad del agua

Se tomaron cuatro muestras de agua de todas las peceras, una muestra del agua inicial en el día 1, y luego cada semana se tomó muestra durante las tres semanas de duración del ensayo, con el fin de evaluar la calidad del agua mediante análisis fisicoquímicos que permitieron determinar las condiciones del agua y los cambios que fueron surgiendo durante la exposición a los contaminantes. Las muestras se obtuvieron del agua de salida de las peceras, cada muestra fue de 2L.

Los resultados obtenidos en los análisis fisicoquímicos de las muestras del agua se presentan al final en el apartado de resultados y discusión.

3.1.6. Necropsia de peces y toma de muestras

Una vez transcurridos los 21 días, los peces fueron sacrificados usando la metodología de sacrificio indicada en la Guía OCDE-230. Para ello se usó una concentración de 200 mg/L de Tricaína metanosulfonato, metacaína, MS-222 (CAS.886-86-2), tamponada con 300 mg/L de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio, CAS.144-55-8), con el fin de reducir la irritación de la membrana mucosa.

El sacrificio se realizó con el apoyo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, quienes realizaron la capacitación en la sala de cirugía del Bioterio, Figura 18, para extraer de los peces el tejido necesario para las muestras requeridas en la medición de VTG.

Los peces fueron disectados siguiendo las medidas de higiene y sanidad establecidas en el bioterio y en la Guía OCDE-230. Se tomó muestra del hígado de cada pez y a parte se separó la cabeza y cola, siendo estos órganos indicados para medir la VTG, Figura 199.



Figura 18. Disección de peces - Bioterio
Instituto de Investigaciones Biomédicas

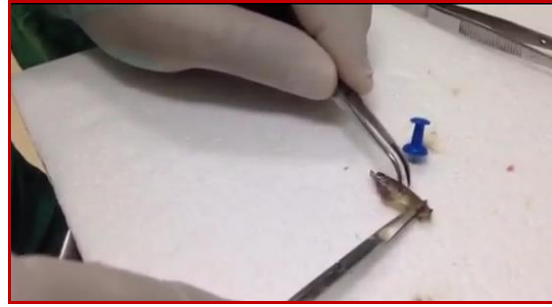


Figura 19. Extracción de hígado, cabeza y cola

3.1.7. Pruebas de ELISA

Para realizar las pruebas de ELISA que permiten medir la producción de VTG en los peces durante el periodo de desarrollo que estuvieron expuestos a los dos contaminantes emergentes, CBZ y NP, a los controles, y a las matrices de agua de manantial y de pozo, se requirió hacer una preparación previa de las muestras con el objetivo de lisar las células para romper los tejidos y obtener la proteína VTG.

Un esquema general para llevar a cabo las pruebas ELISAs que permiten la determinación de los niveles de VTG en los peces se presenta en la Figura 20.

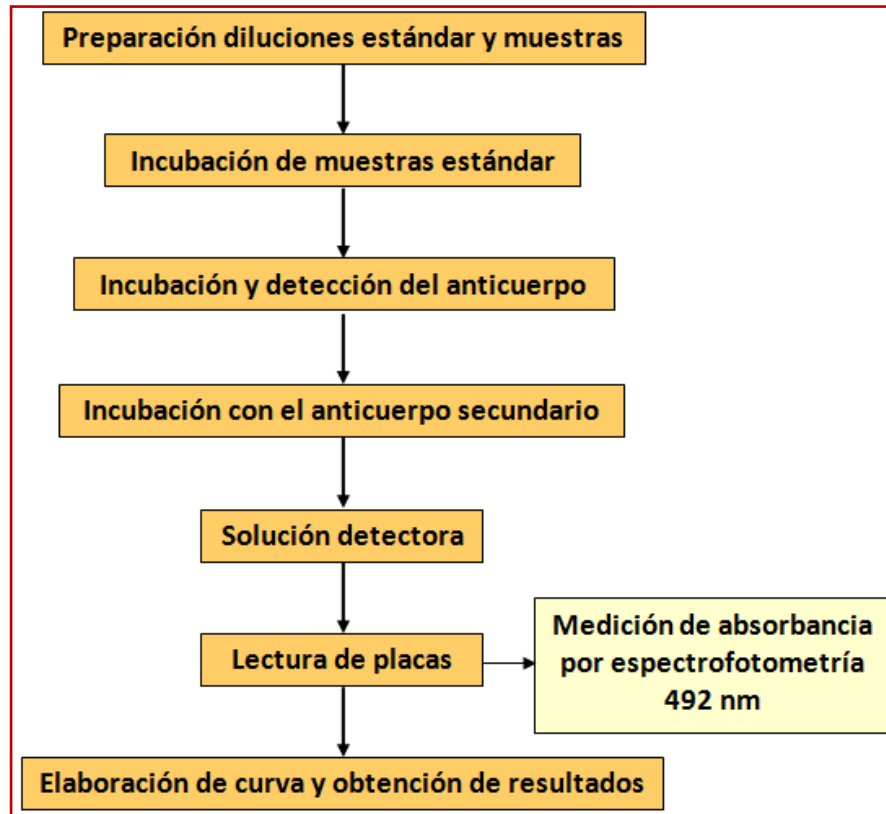


Figura 20. Prueba de ELISA (Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas)

Para realizar las pruebas de ELISA se contó con el apoyo del Laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y el procedimiento que se siguió fue el siguiente:

- ✓ Dilución de muestras en solución buffer
- ✓ Aplicación de un inhibidor de proteasa y buffer RIPA
- ✓ Lisar (ruptura) de células con nitrógeno líquido y calentamiento en baño maría en combinación con sonicador de punta
- ✓ Centrifugación para obtención de sobrenadante (14.000 rpm – 30 min)

Posterior a la centrifugación el sobrenadante se separó de los sólidos aplicando en el primero el Buffer RIPA¹ y el Inhibidor de Proteasas *Figura 21*.

¹ El Buffer RIPA es un buffer de lisis que se usa para disgregar la membrana celular liberando las proteínas, posterior a este se aplica un inhibidor de proteasa que inactiva las proteínas para que la fracción proteica no se degrade y se conserve la muestra intacta durante el proceso de manipulación en la realización de las pruebas de ELISA.



Figura 21. Sobrenadante muestras hígados

Después de obtener los sobrenadantes de cada muestra, se realizó el procedimiento de la prueba ELISA para la obtención de la medida de VTG en cada pez, Figura 22, Figura 23 y Figura 24. Estas pruebas se llevan a cabo con el apoyo del Laboratorio de Bioquímica y Farmacia de Química Ambiental de la UNAM.

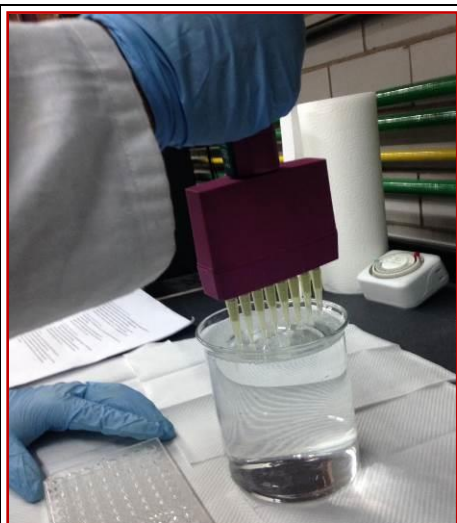


Figura 22. Lavado de pozos ELISA

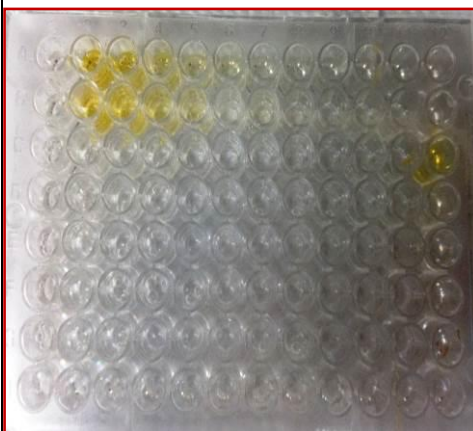


Figura 23. Anticuerpos ELISA

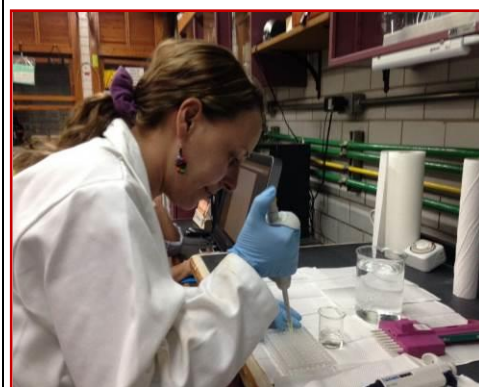


Figura 24. Relleno de pozos ELISA

Finalmente, las placas se llevaron al lector de ELISAS el cual mide la coloración a partir de espectrofotometría, permitiendo así obtener resultados para comparar y determinar el aumento de la VTG en las muestras de peces expuestos a los contaminantes CBZ y NP.

La lectura de las ELISAS se realizó en un lector de placas de microtitulación, Fotómetro para microplacas Multiskan FC - Thermo Scientific, Figura 25 y Figura 26, a una longitud de onda de 492 nm.



Figura 25. Lectura de placas de ELISA

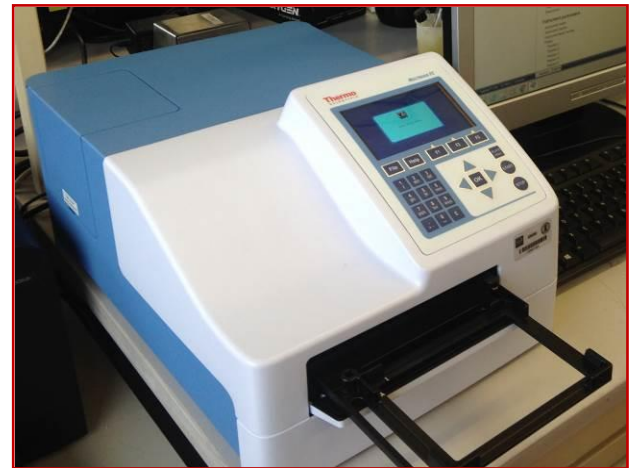


Figura 26. Equipo Thermo Scientific

Los resultados obtenidos fueron tabulados y procesados de acuerdo a las indicaciones del Kit ELISA zebrafish vitellogenini (Biosense, 2004) para cuantificar los niveles de VTG en los peces, en el apartado de resultados y discusión se presentan los valores obtenidos y los diagramas comparativos con su respectivo análisis.

3.2. Evaluación de comportamiento y PCR, en embriones de pez Cebra (Estudios realizados en estancia)

En la estancia realizada en el Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua en Barcelona España, se realizaron una serie de experimentos con el fin de evaluar los efectos ecotoxicológicos en embriones y larvas de pez cebra sometidos a diferentes dosis de los contaminantes estudiados CBZ y NP.

Se realizaron pruebas para identificar el comportamiento de las larvas después de estar sometidas a un periodo definido de exposición, y en una edad determinada dpf (días post

fertilización) contada a partir del día 0 dpf que corresponde al día de la puesta de huevos. De igual manera se tomaron muestras de larvas para realizar análisis de PCR TR y hacer comparaciones de la expresión génica de las larvas.

El total de experimentos realizados para la evaluación de comportamiento y PCR TR fueron los siguientes:

- | | |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Experimento 1: Exposición a carbamazepina 4h (6 dpf) | { Exposición Aguda |
| Experimento 2: Exposición a carbamazepina y nonilfenol (2 - 5 dpf) | { Exposición crónica |
| Experimento 3: Exposición a carbamazepina y nonilfenol (2 - 5 dpf) | { Exposición crónica |
| Experimento 4: Exposición a carbamazepina y nonilfenol (2 - 5 dpf) | { Exposición crónica |

Se diseñaron y elaboraron los 4 experimentos para exponer huevos y larvas de peces cebrá en agua sintética elaborada en el laboratorio con concentraciones de NP y CB. Las pruebas de comportamiento se realizaron con larvas de los cuatro experimentos, y los análisis de PCR TR se realizaron con larvas de los experimentos 2, 3 y 4.

- Experimento 1: se hizo una exposición de las larvas durante 4h en el 6dpf, a un control que correspondió sólo a agua sintética sin la adición de ningún contaminante, y agua sintética con cinco concentraciones de CBZ (0.05, 0.1, 0.2, 1 y 10µg/L)
- Experimento 2: se hizo una exposición de larvas desde el día 2dpf hasta el día 5dpf a un control y cinco concentraciones de CB (0.5, 1, 10, 50 y 100µg/L) y un control y cinco concentraciones de NP (10, 50, 100, 500 y 1000µg/L);
- Experimentos 3 y 4: se realizó la exposición de las larvas en la misma edad y tiempo de exposición que en el experimento 2, solo que en este caso se redujo la cantidad de concentraciones debido a que en el experimento 2 la primera concentración de CBZ no mostró resultados significativos, y en las dos concentraciones mayores de NP se mostró letalidad mayor al 50%, por lo tanto, en ambos experimentos se usaron las concentraciones de CBZ (1, 10, 50 y 100 µg/L) y NP (10, 50 y 100µg/L).

La configuración de los experimentos y las concentraciones aplicadas se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Configuración de los experimentos y concentraciones usadas

		Experimento 1	Experimento 2		Experimento 3		Experimento 4	
Edad de larvas		6 dpf	2 dpf					
Tiempo de exposición		4h	3 días (desde el 2dpf al 5 dpf)					
Contaminante		CBZ	CBZ	NP	CBZ	NP	CBZ	NP
Tratamiento / Concentraciones (µg/L)	1	Ctr*	Ctr	Ctr	Ctr	Ctr	Ctr	Ctr
	2	0,05	0,5	10	1	10	1	10
	3	0,1	1	50	10	50	10	50
	4	0,2	10	100	50	100	50	100
	5	1	50	500	100		100	
	6	10	100	1000				

*Ctr: Control correspondiente a agua sintética elaborada en el laboratorio sin la adición de ningún contaminante.

El agua utilizada para el apareamiento, la disposición de los huevos y las experimentaciones en las cuales se agregaron las dosis de contaminantes fue agua sintética elaborada en el laboratorio con la siguiente fórmula:

- 40 L de agua destilada tipo II
- 10 mL de CaSO_4
- 45 mL de Sal Instant Ocean

Las concentraciones de estudio mostradas en la Tabla 16 se prepararon con CBZ (sigma C4024 – CAS 298-46-4), y nonilfenol (sigma 290858 CAS 84852-15-3), ambos compuestos se diluyeron en soluciones con DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) para obtener la concentración madre de cada contaminante Figura 27.

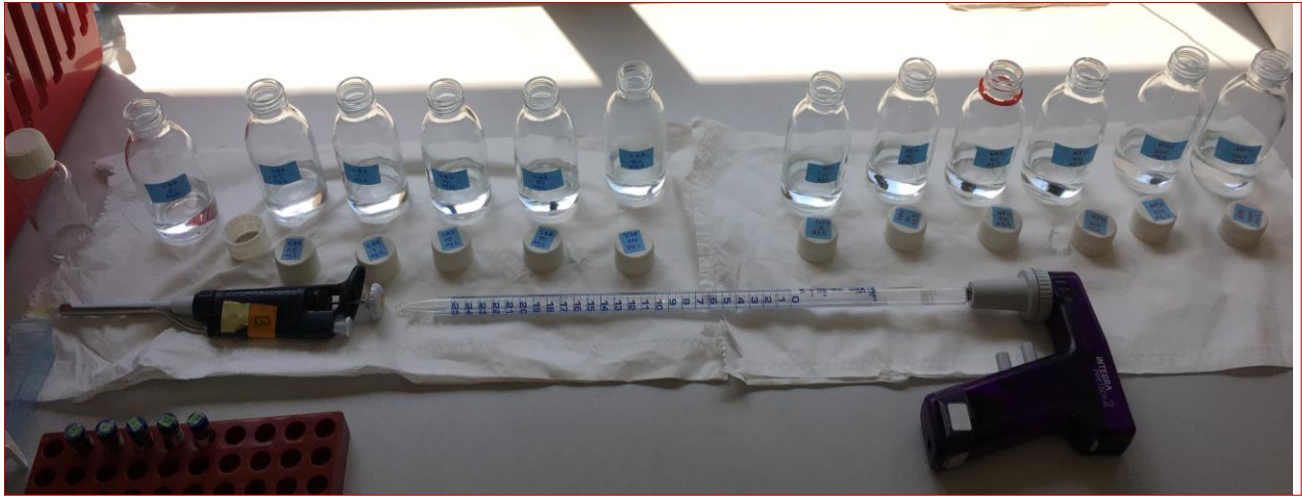


Figura 27. Preparación de concentraciones de CBZ y NP

Al inicio del experimento se realizó el apareamiento de peces (según se describe en el inciso 3.2.1) y se recogieron los huevos disponiéndolos en crisoles, posteriormente las larvas se pasaron a placas con agua sintética limpia y dependiendo del tipo de experimento se empezaron a exponer en un determinado día dpf (días post fertilización) según se definió para cada experimento.

3.2.1. Apareamiento de peces y puesta de huevos

Cada experimento se inició con el apareamiento de los peces y la puesta de huevos, de esta manera se tuvo el control del tiempo de fecundación de los embriones, todos los apareamientos se hicieron bajo las mismas condiciones en el acuario, a una temperatura de (28,5°C), en el mismo tamaño de cámaras de cría, la misma cantidad de peces, a las mismas horas, la misma calidad de agua y el mismo volumen de agua en cada cámara.

En la metodología desarrollada se realizaron cuatro puestas de huevos durante el periodo de la investigación, para cada puesta se usaron cuatro cámaras de cría de 2L, Figura 28, en cada cámara se dispusieron 3 machos y 5 hembras. En cada puesta de huevos la unión de los peces se hizo a las 5:00pm y al día siguiente, 17 horas después de iniciado el apareamiento (a las 10:00 am) se recogieron los huevos. En la primera puesta se obtuvo huevos en las cuatro cámaras, en la segunda y la cuarta se obtuvo huevos en tres de las cuatro cámaras, y en la tercera solo en dos cámaras, la cantidad de huevo obtenidos fueron suficientes para las experimentaciones programadas.

Para cada puesta se siguió el protocolo establecido por el personal del acuario que consistió en la separación de los huevos de los peces apareados, los peces machos y hembras se regresaron a sus respectivas peceras donde permanecen todo el tiempo ubicados por sexo y edades para ser usados como reproductores para los diferentes experimentos que se llevan a cabo en el Instituto. Los huevos fueron depositados en crisoles con agua sintética sin ninguna adición de contaminante, Figura 29.

Los embriones incorporados en los crisoles fueron puestos dentro de una incubadora a 28.5°C, Figura 30. Diariamente se hizo recambio de agua sintética en cada crisol, se hizo limpieza y cambio de crisol, y de acuerdo al experimento programado se fueron trasladando de los crisoles a las placas donde se realizaron las exposiciones correspondientes a cada experimento.



Figura 28. Cámaras de cría

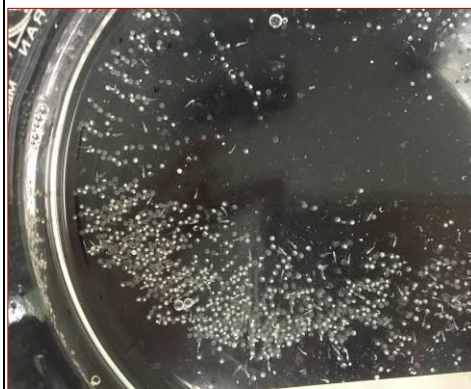


Figura 29. Huevos de pez cebra



Figura 30. Incubadoras de larvas

Durante los seis primeros días, es decir entre el 0 dpf y el 6 dpf, los huevos y larvas no fueron alimentados, ya que estos se autoalimentan consumiéndose el saco vitelino (Nagel, 2001). La alimentación se hizo a partir del 7 dpf, a base de Tetramin en polvo una vez al día, se pone una pequeña cantidad de alimento hasta saciedad.

3.2.2. Pruebas de comportamiento en embriones de pez cebra

Las larvas de los cuatro experimentos fueron usadas para hacer pruebas de comportamiento. Inicialmente se prepararon las placas donde las larvas fueron sometidas a la exposición de acuerdo al tiempo y la edad establecidos en cada experimento. Para el experimento 1 que fue solo de horas de exposición esta se hizo directamente en las placas de 48 pozos (6 filas x 8 columnas) colocando una larva por pozo e inmediatamente

terminó el tiempo de exposición definido las placas fueron llevadas al equipo para la prueba.

Para los experimentos 2, 3 y 4, dado que fueron exposiciones de varios días, primero se hizo la exposición en grupos de larvas en placas de 6 pozos (2 filas x 3 columnas) colocando 20 larvas por pozo, Figura 31, y aproximadamente 24 horas antes de finalizar el tiempo de exposición las larvas se trasladaron de una en una a placas de 48 pozos (6 filas x 8 columnas) donde fueron ubicadas una en cada pozo y al culminar el tiempo definido de exposición se llevaron al equipo para realizar la prueba.

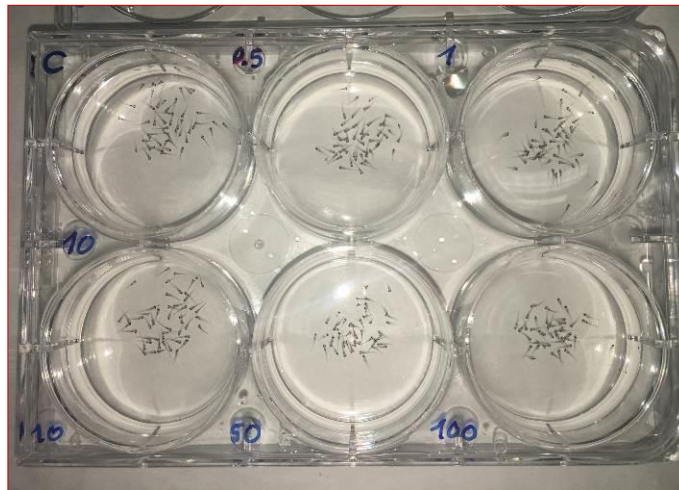


Figura 31. Placa de 6 pozos (2 filas x 3 columnas) para exposición de larvas

En las pruebas de comportamiento las larvas debían estar puestas en las placas de 48 pozos (6 filas x 8 columnas), Figura 32, una larva por pozo, con 800µL de solución de tratamiento en cada pozo, los tratamientos fueron distribuidos por filas, es decir que cada fila contenía 8 larvas con el mismo tratamiento, para un total de 6 tratamientos por placa, en una fila se ubicó el control correspondiente a agua sintética sin ningún contaminante, y en las siguientes cinco filas se distribuyeron los cinco tratamientos conformados por la solución de agua sintética más la concentración determinada del contaminante en estudio, presentadas en la Tabla 17. La ubicación de las concentraciones se varió en cada placa con el fin de evitar efecto placa, para garantizar que el resultado no estuvo influenciado por la ubicación del contaminante en la placa.



Figura 32. Placa de 48 pozos con una larva en 800 μ L de solución en cada pozo

En cada experimento después de transcurrido el tiempo de exposición se procedió a realizar la prueba de comportamiento en el equipo *Danio Vision*, mediante la programación del software *EthoVision*, en todos los experimentos se hizo una programación definida con una configuración de 50 minutos de prueba, los cuales consistieron en 20 minutos de oscuridad, 10 minutos de luz y 20 minutos de oscuridad, Figura 33.

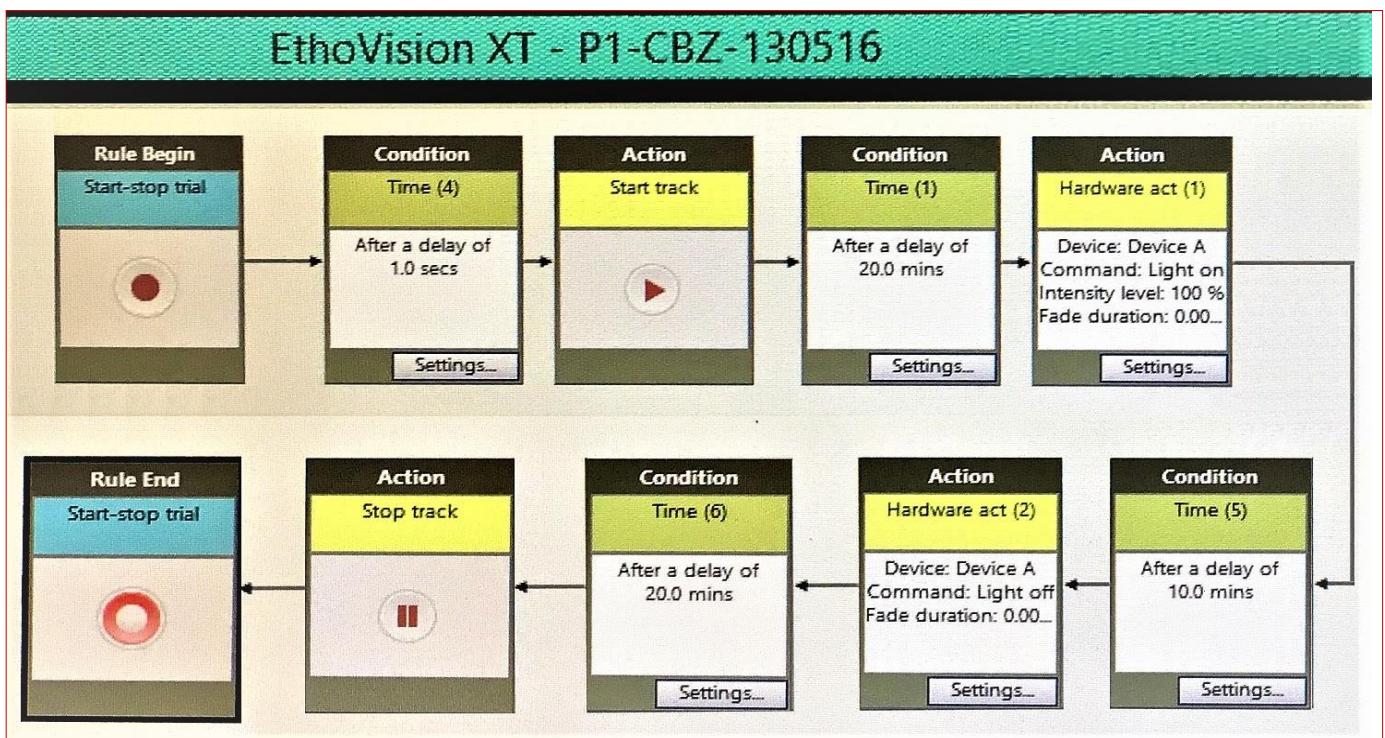


Figura 33. Programación en EthoVision para pruebas de comportamiento

Cada placa fue puesta en el quipo para la prueba de 50 minutos. Figura 34 y Figura 35 se hizo la programación y se puso a correr el programa, finalmente este arrojó una serie de datos correspondientes a la distancia recorrida por cada larva y la velocidad en intervalos de tiempo de 2 minutos. Los resultados obtenidos fueron exportados a Excel para su posterior análisis.



Figura 34. Equipo Danio Vision para pruebas de comportamiento

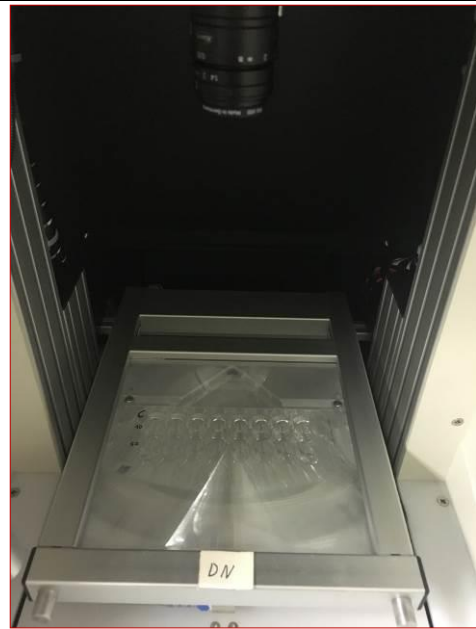


Figura 35. Placa instalada para prueba de comportamiento

Experimento 1: Exposición aguda a 4 horas en el 6 dpf

El experimento 1 se hizo como prueba piloto para aplicar y aprender las técnicas de manipulación de los embriones y las larvas de pez cebra, así mismo, sirvió para ensayo para la operación del equipo *Danio Vision* y la manipulación de las placas utilizadas.

Se hizo una exposición de 4 horas y la edad de las larvas fue de 6 dpf en esta solo se expuso a CBZ. Para esta exposición se aplicaron las mismas tres concentraciones que se usaron para la determinación de VTG a través de las pruebas de ELISA en los peces cebra *Danio rerio* desarrollada en la primera etapa de la metodología, y se adicionaron dos concentraciones más para ampliar la evaluación, las concentraciones aplicadas de CBZ fueron (0.05, 0.1, 0.2, 1 y 10µg/L). Dado que en los resultados obtenidos no se

evidenciaron efectos relevantes se optó por aumentar las concentraciones para los siguientes experimentos.

Para la exposición a 4h se hizo la siguiente configuración en una de las placas, con las cinco concentraciones de CBZ y el control, Figura 36. Se realizó una réplica en la cual se cambió el orden de los contaminantes en las filas con el fin de evitar el efecto placa, es decir que la ubicación del contaminante no influya en los resultados.

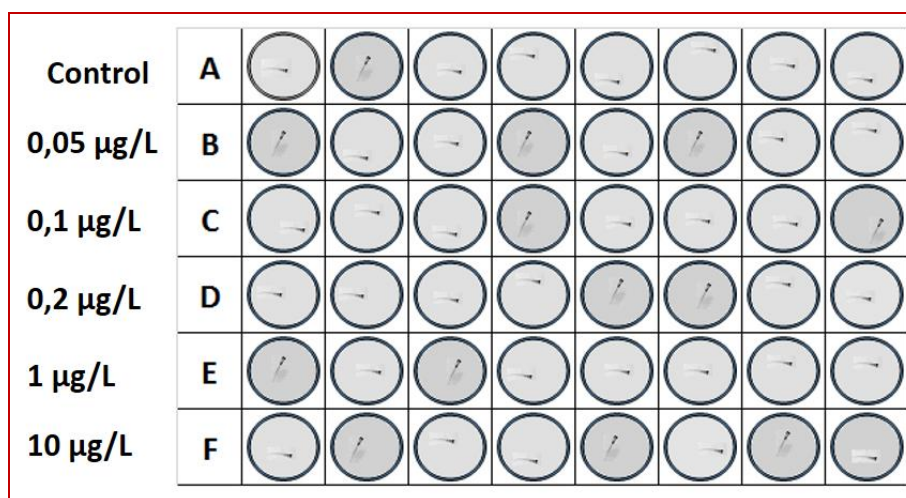


Figura 36. Dosis de CBZ para pruebas de comportamiento

Experimentos 2, 3 y 4: Exposición crónica a 3 días, desde el 2 dpf hasta el 5 dpf.

La exposición de larvas desde el 2dpf hasta el 5 dpf se realizó en las placas de 6 pozos para facilitar los recambios de agua sintética diarios y exponer mayor cantidad de larvas, se pusieron 20 larvas por pozo con 5 mL de agua sintética con su respectiva concentración de acuerdo al tratamiento, respectivamente.

Las concentraciones de exposición se prepararon diariamente y se realizó el recambio del agua sintética dopada con la concentración del contaminante en cada pozo, este recambio se realizó succionando el agua del cada uno hasta una mínima humedad con mucha precaución sin tocar las larvas y sin dejarlas morir, cuando se vació casi por completo cada pozo inmediatamente se puso el agua dopada con las concentraciones definidas, este procedimiento se realizó durante los tres días hasta terminar el periodo de la exposición (desde el 2dpf hasta el 5dpf).

El experimento 2 se diseñó para hacer análisis de comportamiento y PCR TR por lo que en esta exposición se usaron 20 placas de 6 pozos (2 filas x 3 columnas), ya que en cada prueba se realizó la exposición de una placa más cuatro réplicas, Figura 37.



Figura 37. Placas de experimento 3, cinco réplicas de cada una

Para las pruebas de comportamiento y PCR TR se pusieron 20 larvas por pozo. Se dispusieron cinco placas por cada contaminante para las pruebas de comportamiento y cinco placas por cada contaminante para PCR TR. Las larvas fueron puestas en las placas con los controles y las concentraciones de (10, 50, 100, 500 y 1000 $\mu\text{g/L}$) para NP y de (0.5, 1, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/L}$) para CBZ, diariamente al hacer el recambio de agua también se realizó la limpieza de los pozos retirando los cascarones de los huevos de las larvas que ya fueron saliendo. La distribución de concentraciones en las placas para cada contaminante se hizo de la siguiente forma:

<p>10 placas de 6 pozos: 5 para comportamiento y 5 para PCR TR</p>	<p>Dosis de CBZ ($\mu\text{g/L}$)</p> $\left(\begin{array}{ccc} 0 & 0,5 & 1 \\ 10 & 50 & 100 \end{array} \right)$
------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>10 placas de 6 pozos: 5 para comportamiento y 5 para PCR TR</p> <p>Dosis de NP ($\mu\text{g/L}$)</p>	<p>Dosis de NP ($\mu\text{g/L}$)</p> $\left(\begin{array}{ccc} 0 & 10 & 50 \\ 100 & 500 & 1000 \end{array} \right)$
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

En el experimento 2 a partir del segundo día se empezó a notar que, en los pozos correspondientes a las mayores concentraciones, 500 y 1000 $\mu\text{g/L}$ de NP, las larvas fueron presentando malformación y en la concentración de 1000 más del 50% murieron, Figura 38.

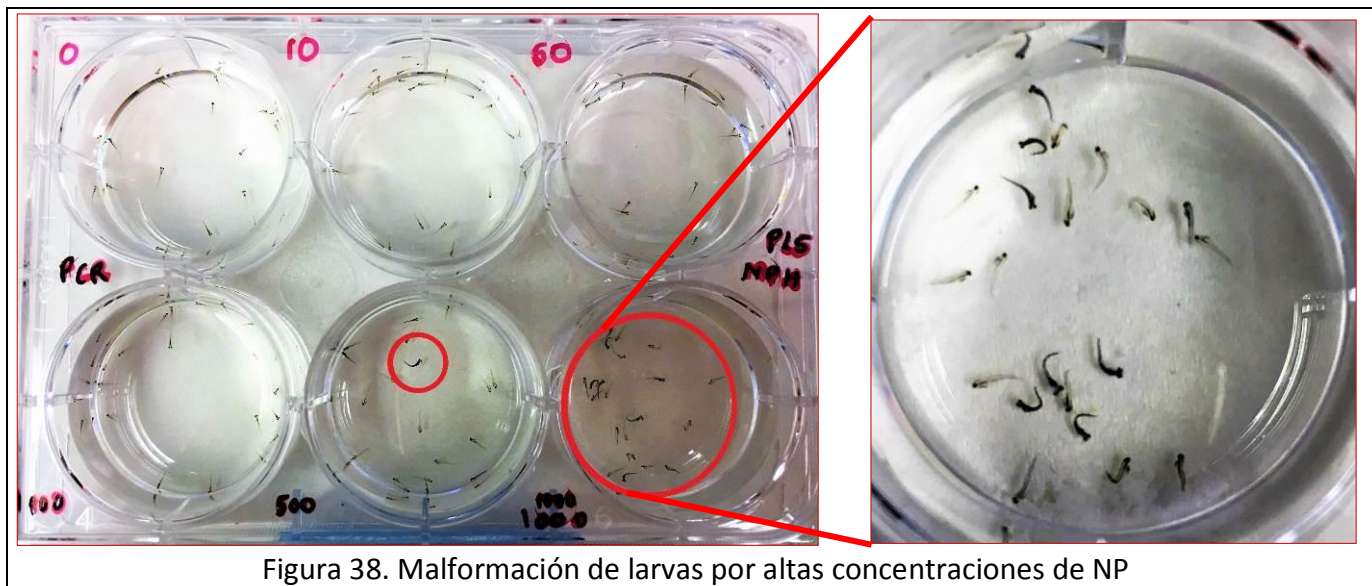


Figura 38. Malformación de larvas por altas concentraciones de NP

Las dos concentraciones que causaron letalidad y malformaciones fueron descartadas para las siguientes experimentaciones.

Después de tres días de exposición, se seleccionaron las larvas para los análisis correspondientes. Para las pruebas de comportamiento se tomaron al azar de cada pozo y de todas las placas 384 larvas que fueron pasadas por orden de concentración a placas de 48 pozos para evaluar comportamiento.

Los experimentos 3 y 4 se realizaron para pruebas de comportamiento, por lo cual solo se usaron 2 placas de 6 pozos por tratamiento cada uno con 10 larvas, y se aplicaron las concentraciones de (10, 50 y 100 $\mu\text{g/L}$) para NP y de (1, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/L}$) para CBZ.

3.2.3. PCR RT

Para PCR RT al terminar la exposición a los contaminantes se tomaron tubos eppendorf de 1,5 mL y en cada uno se depositaron 8 larvas de la misma concentración de cada placa, utilizando dos tubos por dosis, es decir, dos muestras por cada concentración en cada

placa, succionando al máximo el agua que se fue en cada tubo y luego éstas se congelaron en hielo seco y se llevaron a conservación a -80°C .

A cada una de las muestras se les realizó el procedimiento para el análisis de la expresión de genes mediante PCR TR:

- Extracción de RNA de larvas
- Tratamiento con DNASA
- Reverse Transcription
- PCR en tiempo real

En las pruebas de PCR se delimitó hacerla para las dosis de $10\ \mu\text{g}/\text{L}$ y $50\ \mu\text{g}/\text{L}$, debido a su complejidad y el tiempo requerido para cubrir todas las concentraciones del CBZ y de NP. Se tomaron dos muestras por cada concentración por cada placa, para un total de 10 muestras por concentración, Figura 39.

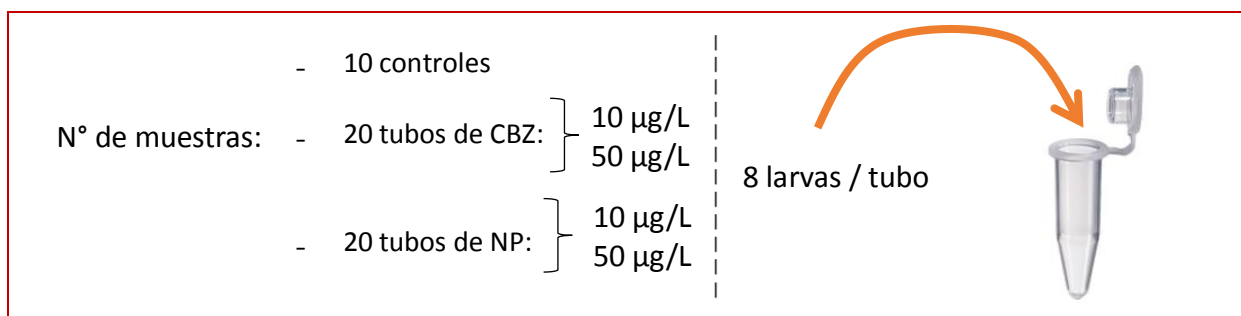


Figura 39. Distribución de muestras para PCR

- *Extracción de RNA de larvas:* Este procedimiento se basa en la extracción del RNA mediante la trituración del tejido de las larvas usando trizol, diferentes procesos de centrifugación y de separación de fases, adición de CHCl_3 e isopropanol, y con la incubación de la muestra en diferentes etapas del proceso se logra obtener un pellet blanco en el fondo del tubo eppendorf correspondiente al RNA. Posteriormente es pasado por etanol al 75% para limpiarlo. Finalmente se adiciona DEPC (Diethyl pyrocarbonate) se lleva a una última incubación para medición de RNA en el nanodrop y posterior congelamiento en hielo a -80°C .
- *Tratamiento con DNASA:* según el número de muestras se hace una preparación de un mix que contiene $5\ \mu\text{L}$ de buffer y $1\ \mu\text{L}$ de la enzima DNASA (DNase Ambion) por cada

muestra, se hace proceso de incubación y se añade EDTA, dejando la muestra preparada para la reverse Transcription.

- *Reverse Transcription*: La RT se hace normalmente sobre 1 μ g de RNA tratado con DNAsa, se prepara una solución con agua milliq y se aplica el oligo Dt, se lleva la muestra a diferentes procesos para aplicación de buffer, Dntps, RNA inh, y Transcriptor RT enzyme, intercalados con tiempos y temperaturas de incubación definidos para obtener finalmente la desactivación RT. La muestra queda preparada para realizar la PCR TR, usando los genes de referencia y los primer.

CAPITULO 4 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación ecotoxicológica de la CBZ y los NP con pruebas de ELISA – OCDE 230

En la experimentación para realizar la evaluación ecotoxicológica de la CBZ y los NP con base a la guía de la OCDE – 230, se realizó el análisis fisicoquímico del agua al inicio de la exposición de los peces a los microcontaminantes, CBZ y NP, y cada semana durante las tres semanas que duró el periodo de experimentación.

Al finalizar la exposición se realizaron las pruebas ELISAs a los peces de cada tratamiento y se obtuvieron los valores de los niveles de VTG en cada pez para analizar los efectos ecotoxicológicos de los dos contaminantes en estudio.

4.1.1. Calidad fisicoquímica del agua

Los parámetros fisicoquímicos fueron analizados para monitorear la calidad del agua a lo largo del estudio con el fin de mantener las condiciones óptimas y evitar al máximo la degradación y alteración de las sustancias analizadas, al igual para mantener el pH que ha sido reportado en los ensayos con pez cebra *Danio rerio*.

Se analizaron las muestras de agua inicial dopada con los CE de estudio, para ello, se tomaron las muestras con las mayores concentraciones CBZ y con NP, y las muestras iniciales de agua de manantial y de pozo. Los resultados obtenidos se presentan en las Tabla 17 y Tabla 18.

El oxígeno disuelto (OD) es uno de los parámetros más importantes en el mantenimiento de los peces. Mantener buenos niveles de OD en el agua fue esencial para una experimentación exitosa ya que el oxígeno (O₂) tiene una influencia directa en el consumo de alimento, resistencia a enfermedades y el metabolismo. Un nivel subóptimo es muy estresante para los peces por esto fue importante mantener el OD en niveles óptimos con un 60% de saturación regulando la salida de oxígeno en la mesa de laboratorio (Rocha et al., 2002).

Tabla 17. Análisis fisicoquímicos del agua de salida (inicial)

Tratamientos		pH	T (°C)	Turbiedad (UTN)	DQOt (mg/L)	COT (mg/L)	NO ₃ (mg/L)
3	Concentración 3 carbamazepina	7.86	25	0.168	8	1	0.2LOD
6	Concentración 3 nonilfenoles	7.95	25	0.277	15	2	0.8
9	Agua de manantial (Cerro Colorado)	7.66	25	0.530	10	65	0.3
10	Agua de pozo (acuífero profundo)	8.00	25	0.345	17	53	0.1LOD

Tabla 18. Resultados de dureza para agua de salida (inicial)

Tratamientos		Parámetros (Dureza)		
		Dureza Total	Dureza al Calcio	Dureza al Magnesio
		(mg CaCO ₃ /L)	(mg CaCO ₃ /L)	(mg MgCO ₃ /L)
3	Concentración 3 carbamazepina	30.03	20.02	10.01
6	Concentración 3 nonilfenoles	20.02	20.02	0.00
9	Agua de manantial (Cerro Colorado)	390.34	350.31	40.04
10	Agua de pozo (acuífero profundo)	430.38	410.36	20.02

Una semana después de iniciado el periodo de exposición, se tomó la muestra 1 de agua de cada tratamiento y se procedió a determinar los parámetros fisicoquímicos correspondientes a pH, temperatura, turbiedad, Demanda Química Total de Oxígeno (DQOt), Carbono Orgánico Total (COT) y Nitratos (NO₃), dureza total, dureza al calcio y dureza al magnesio, cuyos resultados se presentan en las Tabla 19 y Tabla 20.

La dureza se refiere a la concentración de calcio y magnesio en el agua. La dureza es un parámetro crucial en el mantenimiento de un buen balance en el mantenimiento ya que los valores de dureza que se muestran a lo largo de la experimentación confirman el hecho de que el pez cebra tolera condiciones distintas de calcio y magnesio como se observa en las muestras de agua de manantial y de pozo que presentan una dureza muy por encima del agua sintética preparada como semidura. Sin embargo, los peces no mostraron falta de movilidad ni comportamientos erráticos que son señales claras de estrés por el ambiente en el que están inmersos, y fueron tolerantes a las condiciones en

las que se encontraban. Por su parte, los valores máximos de DQOt y COT pertenecen a los tratamientos de agua de manantial y de pozo mostrando mayor carga orgánica, todos los tratamientos acumulan las excretas y los desperdicios de alimento, pero estos valores están por encima de los demás tratamientos debido a que son muestras de agua reales tomadas de una matriz ambiental, no preparadas en el laboratorio.

Los niveles desbalanceados de temperatura y pH pueden incrementar la toxicidad del amonio no ionizado que se genera por los desechos metabólicos de los peces. Por esto, mantener niveles balanceados de los parámetros de la calidad del agua fue fundamental para la salud de los organismos, es así que la temperatura fue constante (25°C) durante toda la experimentación y el pH se mantuvo entre 6.6 - 8.3 en los tratamientos. El pH es un parámetro que permite calcular de forma sencilla la concentración de H⁺ que hay en el agua. Para los peces, el pH del agua está relacionado con la necesidad de mantener un equilibrio ácido-base en su sangre. En este caso se mantuvo un pH de 6.6 - 8.3 lo que favoreció que el NH₃ se encontrara en forma disuelto en el agua (el cual es tóxico), reaccionara con los H para dar NH₄ que es inofensivo para los peces. Se puede ver como hay pequeñas variaciones de los valores de pH ya que el agua no es estática y tiende a variar debido a los procesos biológicos llevados a cabo por los propios organismos (Díaz, 2006) aunque se aprecia como hay una tendencia a descender en los tratamientos de agua sintética.

Tabla 19. Análisis fisicoquímicos de muestra de agua 1 (semana 1)

Tratamientos		pH	T (°C)	Turbiedad (UTN)	DQOt (mg/L)	COT (mg/L)	NO ₃ (mg/L)
1	C 1 carbamazepina	6.96	25	6	37	25	0.7
2	C 2 carbamazepina	7.14	25	4.22	58	25	0.4
3	C 3 carbamazepina	7.09	25	4.10	33	26	1.1
4	Concentración 1 nonilfenoles	7.03	25	3.78	45	25	0.2 LOD
5	Concentración 2 nonilfenoles	7.09	25	2.81	48	23	1.3
6	Concentración 3 nonilfenoles	7.06	25	4.46	89	24	0.1
7	Blanco Positivo (17-β-Estradiol)	7.02	25	3.23	39	20	0.8
8	Blanco negativo	7.07	25	2.97	46	11	0.1
9	Agua de manantial (Cerro Colorado)	8.13	25	6.40	53	64	1.3
10	Agua de pozo (acuífero profundo)	7.90	25	4.66	53	62	0.3

Tabla 20. Resultados de dureza para el agua de la muestra 1 (semana 1)

Tratamientos		Parámetros (Dureza)		
		Dureza Total	Dureza al Calcio	Dureza al Magnesio
		(mg CaCO ₃ /L)	(mg CaCO ₃ /L)	(mg MgCO ₃ /L)
1	C 1 carbamazepina	90.08	70.06	20.02
2	C 2 carbamazepina	70.06	60.05	10.01
3	C 3 carbamazepina	70.06	60.05	10.01
4	Concentración 1 nonilfenoles	70.06	60.05	10.01
5	Concentración 2 nonilfenoles	90.08	60.05	30.03
6	Concentración 3 nonilfenoles	90.08	80.07	10.01
7	Blanco Positivo (17-β-Estradiol)	110.10	100.09	10.01
8	Blanco negativo	90.08	50.04	40.04
9	Agua de manantial (Cerro Colorado)	330.29	300.26	30.03
10	Agua de pozo (acuífero profundo)	350.31	340.30	10.01

Se tomaron otras dos muestras de agua para realizar análisis fisicoquímicos en la semana 2 y la semana 3 después de iniciada la exposición de los peces a los contaminantes, y se procedió a determinar los parámetros fisicoquímicos correspondientes a pH, temperatura, dureza al calcio, dureza al magnesio, Tabla 21 y Tabla 22, turbiedad, DQO_t, COT y NO₃, Tabla 23 y Tabla 24. Hay que destacar que los valores son estables respecto a la muestra 1, esto se atribuye al exhaustivo control que se ejerció durante todo el mes sobre los diferentes parámetros y cuidados del agua.

La concentración de NO₃ en el medio fue muy baja, en torno a los 0,6 mg/L promedio en los tres muestreos llegando incluso a ser nula en algunas ocasiones. La oxidación del amonio genera nitratos y nitritos, por lo que se debió especial cuidado en sus concentraciones disueltas en agua ya que pueden ser dañinos para los tejidos de los peces en concentraciones superiores a 25 mg/L (Bopp et al., 2006). Si supera este valor se tendría que haber hecho un cambio total de agua.

Tabla 21. Análisis fisicoquímicos de muestra de agua 2 (semana 2)

No. de muestra	Tratamiento	Parámetros					
		pH	T	Dureza al Calcio(ml)	Dureza al Magnesio(ml)	DQO _T	COT
			(°C)	(mg CaCO ₃ /L)	(mg MgCO ₃ /L)		
1	C1 carbamazepina	6.99	25	90.08	70.06	47	68
2	C2 carbamazepina	6.87	25	90.08	70.06	60	53
3	C3 carbamazepina	6.79	25	90.08	90.08	58	47
4	C1 nonilfenoles	6.92	25	70.06	60.1	64	33
5	C2 nonilfenoles	6.89	25	70.06	60.1	65	39
6	C3 nonilfenoles	6.88	25	70.06	90.08	62	54
7	Blanco Positivo (17β-Estradiol)	6.71	25	70.06	60.1	49	47
8	Blanco negativo	6.73	25	70.06	60.1	34	34
9	Agua de manantial	8.21	25	590.4	410	33	112
10	Agua de Pozo	7.98	25	830	610	25	103

Tabla 22. Análisis fisicoquímicos de muestra de agua 3 (semana 3)

No. de muestra	Tratamiento	Parámetros					
		pH	T	Dureza al Calcio(ml)	Dureza al Magnesio(ml)	DQO _T	COT
			(°C)	(mg CaCO ₃ /L)	(mg MgCO ₃ /L)		
1	C1 carbamazepina	6.94	25	70.06	90.08	31	22
2	C2 carbamazepina	6.8	25	70.06	60.1	28	26
3	C3 carbamazepina	6.81	25	110	60.1	33	31
4	C1 nonilfenoles	6.9	25	150	60.1	48	21
5	C2 nonilfenoles	6.94	25	110	60.1	11	25
6	C3 nonilfenoles	6.87	25	110	50	91	39
7	Blanco Positivo (17β-Estradiol)	6.87	25	110	60.0	0.4	21
8	Blanco negativo	6.75	25	110	60.1	1	24
9	Agua de manantial	8.14	25	690	390	46	66
10	Agua de Pozo	7.68	25	850	610	10	72

Tabla 23. Análisis fisicoquímicos de muestra de agua 2 (semana 2)

Tratamientos		Turbiedad (UTN)	DQOt (mg/L)	COT (mg/L)	NO ₃ (mg/L)
1	C1 carbamazepina	7	40	25	0.9
2	C2 carbamazepina	4.32	61	25	0.5
3	C3 carbamazepina	4.58	30	24	1
4	Concentración 1 nonilfenoles	3.87	45	25	0.5
5	Concentración 2 nonilfenoles	3.1	48	26	1.3
6	Concentración 3 nonilfenoles	4.58	88	24	0.5
7	Blanco Positivo 17-β-Estradiol	3.33	40	22	0.8
8	Blanco negativo	2.99	44	11	0.7
9	Agua de manantial (Cerro Colorado)	6.87	55	62	1.3
10	Agua de pozo (acuífero profundo)	4.5	53	64	0.3

Tabla 24. Análisis fisicoquímicos de muestra de agua 3 (semana 3)

Tratamientos		Turbiedad (UTN)	DQOt (mg/L)	COT (mg/L)	NO ₃ (mg/L)
1	C1 carbamazepina	6.7	42	25	0.9
2	C2 carbamazepina	4.56	61	24	0.5
3	C3 carbamazepina	4.87	36	25	0.9
4	Concentración 1 nonilfenoles	3.78	48	25	0.8
5	Concentración 2 nonilfenoles	3.3	48	26	1.3
6	Concentración 3 nonilfenoles	4.45	88	20	0.5
7	Blanco Positivo 17-β-Estradiol	3.28	40	22	0.8
8	Blanco negativo	2.89	44	11	0.7
9	Agua de manantial (Cerro Colorado)	6.94	54	61	1.2
10	Agua de pozo (acuífero profundo)	4.65	49	66	0.5

Resumiendo, los resultados obtenidos en los análisis de los parámetros fisicoquímicos mostraron valores acordes con el tipo de experimento que se realizó y se mantuvieron en los rangos establecidos por la OCDE para garantizar la supervivencia de los peces y que no

se presentara alteración en los resultados al final del experimento en el cálculo de los niveles de VTG mediante las pruebas ELISAs.

El pez cebra es nativo del sur de Asia, habita en lagos, lagunas y charcas con abundantes plantas acuáticas, creciendo en la orilla más que en los ríos y arroyos ya que prefiere los cursos de agua remansada antes que las corrientes (Díaz, 2006). La geografía de estas regiones está caracterizada por poseer climas monzónicos con lluvias abundantes y estaciones más secas. Estas condiciones ejercen unos cambios drásticos en el medio ambiente del pez, llegando incluso a cambiar tanto las condiciones físico-químicas como la disponibilidad de recursos en el agua, por lo que está adaptado a sobrevivir en ambientes variables en los cuales los factores de salinidad, pH o temperatura no son estables. Probablemente eso explica su amplio rango de tolerancia ante distintos valores de los parámetros evaluados y la importancia que ello conlleva para facilitar su mantenimiento en cautividad (Harper y Lawrence, 2011).

4.1.2. Cuantificación de VTG mediante ELISAS

Después de haber expuestos los peces por un periodo de 21 días a las diferentes concentraciones de análisis y seguir las indicaciones conforme la guía técnica OCDE - 230, se llevó a cabo al sacrificio, disectación de los peces y el homogeneizado de cabeza y cola mediante el procedimiento indicado basado en la centrifugación y obtención de sobrenadante para realizar el cálculo de la concentración de VTG usando un kit ELISA específico para pez cebra.

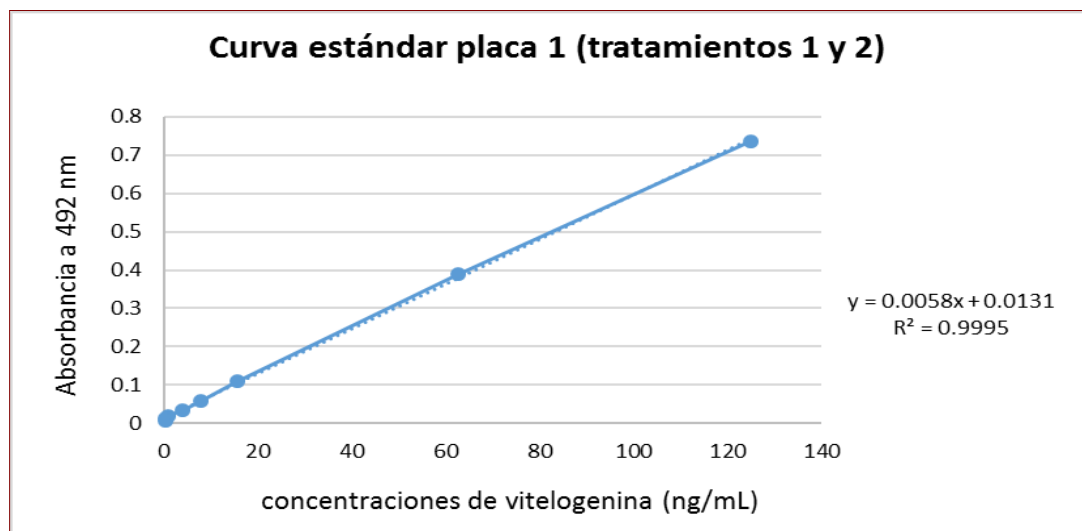


Gráfico 1. Ejemplo de la curva estándar para la placa 1

En cada placa de ELISA se determinó la curva estándar, todas las curvas de calibración obtenidas para todas las placas tuvieron coeficiente de correlación mayores a 0.99, Gráfico 1, lo cual es aceptable para este tipo de método dado que lo recomendado es coeficientes mayores a 0.99. (Nilsen et al., 2004). Cada curva se realizó a partir de las diluciones indicadas en el KIT ELISA: 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98, 0.49, 0.24 y 0.12 ng/ml, y las absorbancias obtenidas para cada dilución a 492 nm.

4.1.3. Determinación de VTG con ELISA

Los análisis estadísticos que permitieron hacer las respectivas comparaciones entre los niveles de VTG de los tratamientos a que fueron expuestos los peces cebra, con los controles, negativo y positivo (17β - Estradiol), se hicieron mediante ANOVA, prueba de rangos múltiples y test de Levene (López, 2001), debido a que los datos no tenían distribución normal y no eran normalizables.

Se tiene información que el nonilfenol se comporta como un disruptor endócrino estrogénico al aumentar la VTG en los machos y hembras, (Van den Belt, et al 2003). Para este estudio se requirió evaluar a la CBZ en ambos géneros con el fin de identificar qué tipo de alteración endócrina ocasiona, ya sea la inducción estrogénica en los machos o androgénica en las hembras.

Durante todo el período del ensayo no se produjeron muertes de individuos en ninguno de los tratamientos evaluados, lo cual valida el ensayo en referencia al registro de mortalidad.

Los resultados obtenidos en los niveles de VTG plasmática indican un marcado efecto de los tratamientos. Para este estudio se requirió evaluar a la CBZ en ambos géneros con el fin de identificar qué tipo de alteración endócrina ocasiona, ya sea la inducción estrogénica en los machos o androgénica en las hembras.

Los niveles de VTG en hembras normalmente no son considerados un biomarcador útil de influencia de alteración endócrina debido a que el papel fundamental desempeñado por VTG en el proceso reproductivo de la hembra significa que a través de su ciclo de vida, los niveles circulantes de VTG se extienden a través de un rango de concentración extrema y muestran una considerable variabilidad inter-individual, lo que complicaría el análisis

(Sandoval y Hernández, 2013), sin embargo, si la producción es equiparable con respecto al control de peces no expuestos es posible hacer ciertas conclusiones.

La concentración de VTG para los controles positivo (17β – Estradiol) y negativo en machos muestran valores medios de 2500 ng/mL y 719 ng/mL respectivamente, mostrando diferencia significativa con respecto a sus valores medios, ($p = 0.0233$). Estos valores de control concuerdan con otros estudios que se han realizado para pruebas ecotoxicológicas de disrupción endócrina y usando VTG como biomarcador. (Nielsen et al., 2004) determinó concentraciones de VTG de 1,400 ng/mL en machos no expuestos a ninguna sustancia en un estudio de validación para la cuantificación de VTG a través del uso de test ELISA's. En el Gráfico 2, se presentan las concentraciones de VTG de los machos en todos los tratamientos.

En los resultados obtenidos por tratamiento en peces machos se observa que los tratamientos de CBZ 0.05 ug/ml y 0.1 ug/ml muestran valores de sus medias de 547.3 ng/ml y 456.8 ng/ml respectivamente, significativamente diferentes comparados con el tratamiento de 0.2 ug/ml cuyo valor medio fue de 2565 ng/ml, con un nivel de significancia de $p = 0.0017$ para el tratamiento de CBZ.

En contra parte, los valores de concentración para los tratamientos de CBZ de 0.05 y 0.1 $\mu\text{g/L}$ no muestran diferencias significativas con el control negativo, lo cual podría indicar que las concentraciones utilizadas no se produjo inducción de VTG lo que es correspondiente con los niveles de individuos no expuestos en otros estudios reportados, como en un ensayo de validación para cuantificar VTG mediante test ELISA's realizado por Nielsen et al., (2004) donde reportan que la concentración de VTG de machos no expuestos fue de 1,400 ng /mL.

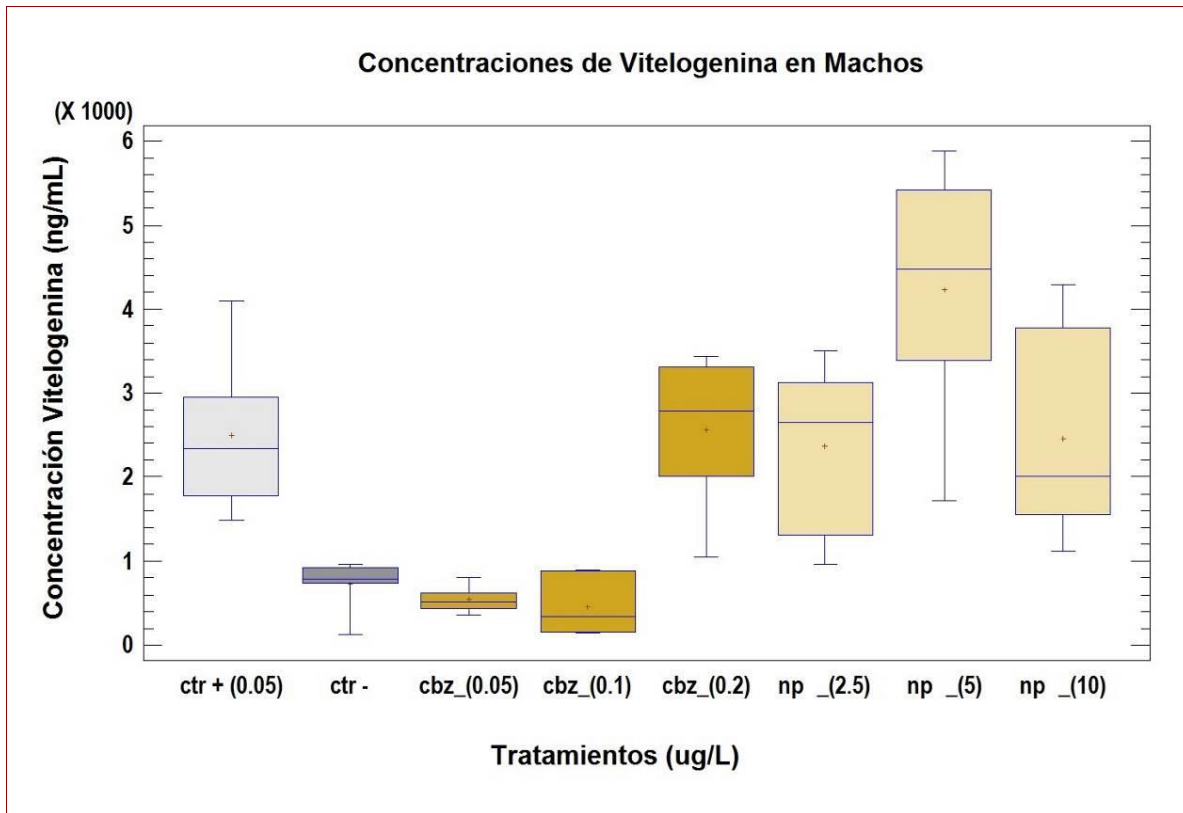


Gráfico 2. Niveles de VTG de machos expuestos a los tratamientos estudiados

Por su parte el tratamiento de CBZ de 0.2 ng/ml muestra niveles equiparables en sus valores medios de VTG con el control positivo, demostrando que los niveles de VTG para este tratamiento se incrementaron al no presentar una diferencia significativa con respecto al control positivo, pero sí para el control negativo ($p=0.02$). Este resultado demuestra que la CBZ a una concentración de 0.2 μ g/L aumentó la producción de VTG y pudo alterar el sistema endocrino de los peces responsable de su producción. Lo anterior puede deberse a que eleva el grado de lípidos oxidados, así como la actividad de la enzima Glutación peroxidasa (Gpx), lo que indica una mayor toxicidad de este compuesto anticonvulsionante (Gasca, 2015) esto confirma que si los animales tienen un receptor para la hormona que es inducida por el fármaco a la cual son sometidos, se presenta un efecto exacerbado de la hormona, provocando cambios significativos sobre el espécimen en cuestión (feminización, caracteres sexuales secundarios no acorde al género), pero si las especies no poseen receptores específicos pueden presentar efectos secundarios negativos (toxicidad aguda y cambios de conducta) (Moreno-Ortiz et al., 2013).

En machos los tratamientos CBZ 0.5 y CBZ 1.0 μ g/L muestran niveles de VTG estadísticamente no significativos con respecto al grupo control negativo, pero el nivel de VTG se incrementó (2565 ng/mL) en la concentración más alta CBZ 2.0 μ g/L. Esto puede indicar que la concentración de CBZ juega un papel determinante en los resultados del estudio. Pareciera indicar que la evaluación de riesgo asume que a mayor dosis de concentración mayor riesgo, suponiendo una respuesta tóxica en forma de curva monótonica (sin puntos de inflexión) y que hay un límite por debajo del cual no existe riesgo. Dado que los disruptores endocrinos pueden producir efectos a dosis bajas y altas, y no producirlos a dosis más altas, y viceversa (Sandoval y Hernández, 2013), es posible explicar que las concentraciones de CBZ más bajas no tuvieron efecto y si la concentración mayor y es de tomar en cuenta, también, el tiempo de exposición ya que estos contaminantes suelen bioacumularse en los tejidos adiposos permaneciendo inertes hasta que el organismo aumente su consumo energético por alguna causa y es ahí donde se observan los daños al entrar en contacto con los receptores de esteroides endógenos (Wolfand, 2007 y Keel Morgan, 2012) al ser una dosis baja el tiempo que requeriría para convertirse en una concentración acumulada que cause efectos observables podría ser mayor.

En relación a los tratamientos con dosis de Nonilfenol (NP) estos mostraron niveles de concentración de VTG de 2367 ng/ml para la dosis 2.5 μ g/L, 4225 ng/ml para la dosis de 5 μ g/L y 2461 ng/ml para la dosis de 10 μ g/L. El experimento realizado mostró que tanto el nonilfenol como el control positivo (17 β -Estradiol) indujeron una alta producción de VTG al no mostrar diferencias significativas después de realizar la prueba de intervalos múltiples ($p > 0.05$ para todos los tratamientos de nonilfenol en machos, con respecto al control positivo). Este resultado muestra que las dosis de nonilfenol evaluadas tienen un efecto similar al del 17 β -Estradiol en el sistema endocrino de los peces, aunque se ha descrito que los mecanismos de acción son diferentes, por ejemplo, Ruggeri, et al (2008), quien estudió la variación de la expresión genética después de una exposición al 17 β – Estradiol y NP en peces cebra *Danio rerio* machos concluye que tanto en NP y en E2 se indujo una fuerte expresión de Vitelogenina (VTG). Muchos genes regulados por NP y E2 están involucrados en el metabolismo energético, los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo, el metabolismo xenobiótico y el metabolismo lipídico. Se encontró un patrón diferente de expresión en los dos tratamientos para los genes implicados en el estrés oxidativo y el metabolismo xenobiótico. Un mecanismo de desintoxicación para EE2, mientras que el NP parece inhibir el mecanismo protector de la célula anulando los receptores de varias enzimas dando lugar a acciones adversas relacionadas con

contaminantes ambientales estrogénicos favoreciendo un efecto estrogénico sobre uno androgénico en machos.

El segundo tratamiento, 5 $\mu\text{g/L}$ de NP, mostró el nivel más alto de VTG en todos los tratamientos para machos, 4225 ng/ml, encontrando una diferencia significativa respecto al control negativo, y un valor medio mayor que el del control positivo. Los resultados obtenidos con las dosis de NP 5.0 y 10 $\mu\text{g/L}$, muestran que no se sigue el patrón dosis respuesta, ya que en la dosis de 5 $\mu\text{g/L}$, el nivel de VTG fue mayor que en la concentración de 10 $\mu\text{g/L}$, esto podría deberse a que los disruptores endocrinos pueden no tener límites sin efecto y además pueden presentar curvas de toxicidad cuadráticas, es decir, que produzcan efectos a dosis bajas y altas, y no los produzcan a dosis más altas, y viceversa (Sandoval y Hernández, 2013). Los disruptores endocrinos como el nonilfenol y el 17 β -Estradiol muestran un efecto diferente dependiendo de la edad, el género, la especie, la concentración y el tiempo de exposición (Van den Belt., et al 2003).

Se tiene información de que el nonilfenol se comporta como un disruptor endócrino estrogénico al aumentar la VTG en los machos y hembras, (Van den Belt, et al 2003). Además, es un compuesto estrogénico capaz de actuar como el E2, con un potencial menor *in vivo*, pero lo suficiente para causar efectos adversos acumulativos e inestabilidad genómica (Routledge y Sumpter, 1996). En su estudio Van den Belt, et al 2003 probó los compuestos 17 β Estradiol (E2), estrona (E1), 17-etinilestradiol (EE2) y el nonilfenol (NP). Encontró que todos los compuestos eran estrogénicos en ensayos *in vitro* y fueron capaces de inducir VTG *in vivo*.

Por último, el mismo autor reporta que para NP observó una reducción significativa del índice somato ovárico (OSI) a una concentración de exposición de 2.270 nM. Además del efecto *in vivo* del marcador OSI, los efectos sobre el marcador de exposición *in vivo* para la exposición estrogénica, VTG, también tuvieron un aumento significativo dependiente de la concentración en el plasma que se observó en los niveles de VTG en el pez cebra hembra tras la exposición a todos los compuestos seleccionados. Varias alteraciones endocrinas se han encontrado después de la exposición a NP en concentraciones que van desde 0,1 hasta 100 $\mu\text{g/L}$ tales como la feminización de los machos, anomalías del desarrollo, y la infertilidad (Atiezar et al., 2002).

En el Gráfico 3, se presentan los resultados obtenidos para los niveles de VTG en las hembras en todos los tratamientos.

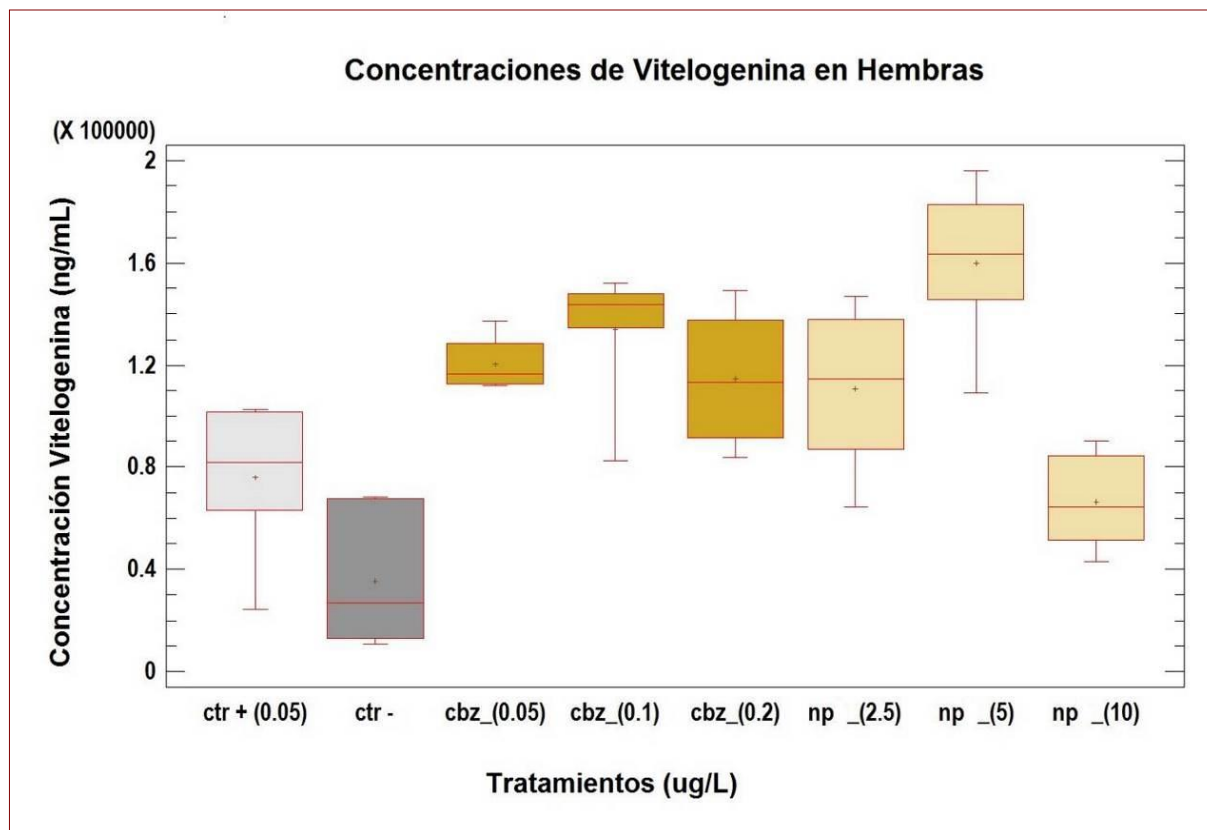


Gráfico 3. Niveles de VTG de hembras expuestas a los tratamientos estudiados

De acuerdo a la literatura (Sandoval y Hernández, 2013; Folmar et al., 2002; Spence et al., 2008), en los estudios de disrupción endócrina las hembras no son consideradas como parámetro fiable dado que sus niveles de VTG varían mucho por individuo, esto debido a las diferencias hormonales a lo largo de su ciclo reproductivo. Los niveles de VTG en hembras normalmente no son considerados un biomarcador útil de influencia de alteración endocrina debido a que el papel fundamental desempeñado por VTG en el proceso reproductivo de la hembra significa que a través de su ciclo de vida, los niveles circulantes de VTG se extienden a través de un rango de concentración extrema y muestran una considerable variabilidad inter-individual, enmascarando potencialmente los efectos de los moduladores endocrinos exógenos (Sandoval y Hernández, 2013).

En general, las mediciones de VTG deben ser consideradas positivas si hay un aumento estadísticamente significativo en VTG en los machos ($p < 0,05$), indicando que hay actividad estrogénica. Una disminución estadísticamente significativa en las hembras ($p < 0,05$) indicaría que se ha detectado actividad androgénica, aunque según la OCDE 230 el ensayo usando pez cebra no está diseñado para detectar actividad androgénica puesto que en estos no se pueden medir las características sexuales secundarias, sin embargo, se

podría determinar que hay una inhibición en la producción de VTG si los valores en hembras fueran equiparables a los obtenidos en el grupo control negativo.

En el Gráfico 4, se muestra una diferencia importante en los valores de VTG de hembras respecto a los machos en todos los tratamientos, las hembras presentan valores extremos en los niveles de VTG y los machos presentan valores significativamente diferentes con respecto al control negativo de las hembras. Esto indica que a pesar de que los niveles de VTG en machos aumenten en los tratamientos (CBZ 0.2, NP 2.5, NP 5 Y NP 10µg/L) la producción de VTG en hembras es superior por la naturaleza misma de la especie.

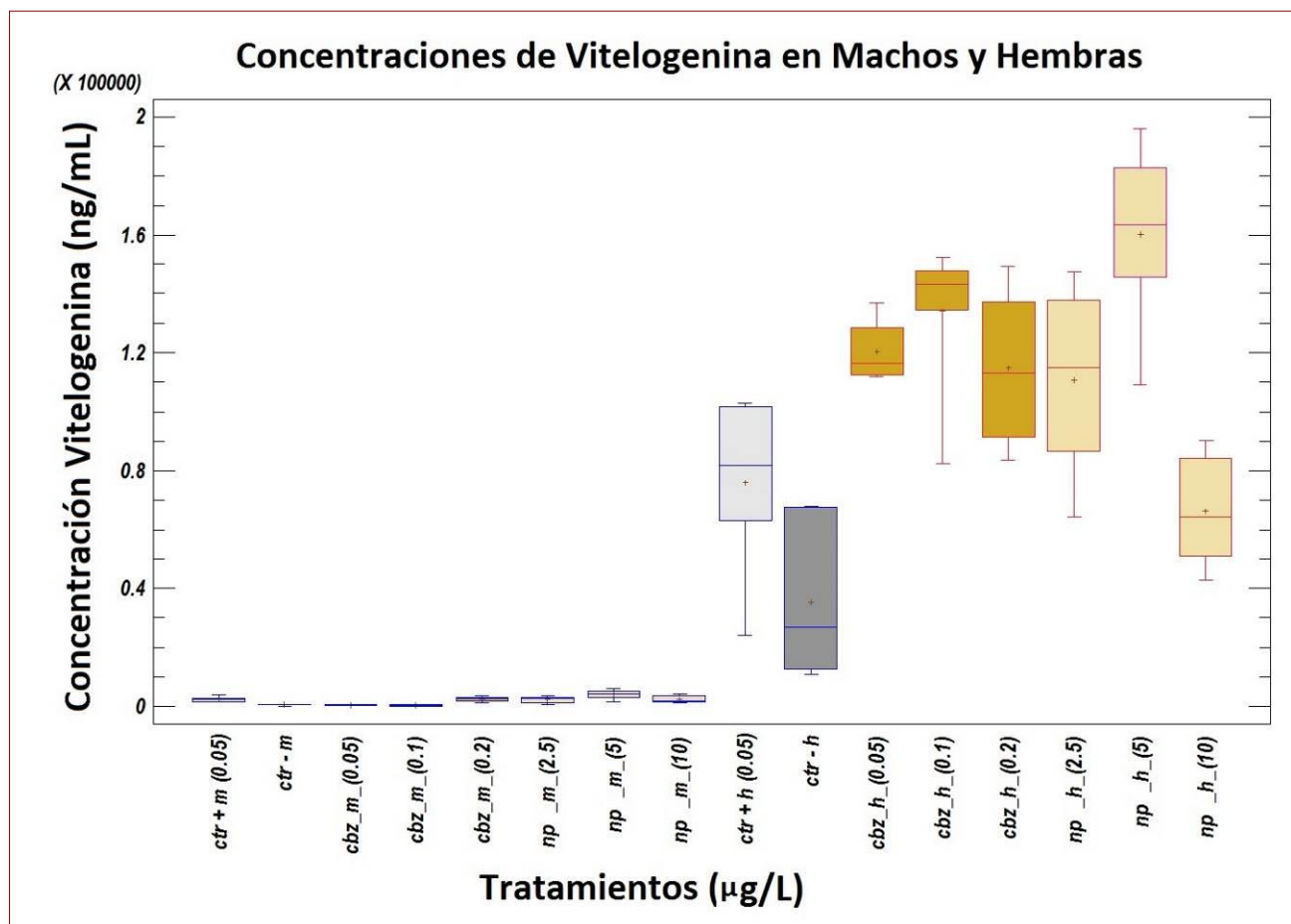


Gráfico 4. Niveles de VTG de todos los peces expuestos a los tratamientos evaluados (cbz: carbamazepina, np: nonilfenoles)

Al comparar el control negativo en machos con el de hembras se puede observar que la dispersión es mayor en las hembras, es decir que los valores de VTG fue atribuida a la variabilidad inter individual gracias al proceso reproductivo característico en las hembras.

La concentración NP5 fue la que presentó mayores niveles de VTG tanto para hembras como para machos, teniendo valores de 160,144ng/L y 4225ng/L respectivamente, mostrando diferencias significativas con los otros dos tratamientos para machos NP2.5 µg/L, ($p=0.0017$) y NP10 µg/L ($p=0.05$) pero no para hembras.

De manera general los tratamientos de CBZ en su totalidad mostraron niveles de VTG comparables a los del control positivo de E2 por lo que es posible determinar que, si hubo inducción de VTG, pero un efecto de tipo estrogénico es incierto por lo que es necesario apoyarse en los resultados de los tratamientos de CBZ en machos para vislumbrar el efecto en el ensayo.

El efecto de los compuestos estrogénicos como E2 y NP también han sido evaluados a través de una inducción de la proteína específica femenina (VTG) (Kakuno et al., 2001; Pait y Nelson, 2003), las potencias relativas a estrogénicos naturales como de E2, sintéticos y xenoestrógenos difieren según el bioensayo utilizado (Gomes et al., 2003) por lo que pueden existir diferencias con respecto a otros estudios ya generados debido a la particularidad de cada ensayo en el rango de concentraciones utilizadas, especie y tiempo de exposición.

El control positivo 0,05 µg/l de E2 indujo VTG en hembras y machos obteniendo niveles de VTG equiparables a las reportadas en larvas, juveniles y adultos de pez cebra (Brion et al., 2004). En ese mismo estudio se determinan los efectos biológicos de la exposición a bajas concentraciones de E2 (5, 25 y 100 ng E2 / L), y la sensibilidad de los diferentes peces en sus diferentes etapas vida. E2 es un disruptor endocrino comprobado con potencial estrogénico con una relación dosis-respuesta bien definida para el biomarcador VTG no solo en peces sino en multitud de estudios en organismos acuáticos (Rose et al., 2002; Matthiessen et al., 2002) y también es utilizado como control positivo en otros ensayos (Nassef et al., 2010; Han et al., 2010).

Existe abundante información disponible sobre los efectos estrogénicos de NP en varios peces, principalmente especies de agua dulce, tanto *in vivo* como *in vitro*: cinética de regulación hepática de VTG por mRNA, acumulación plasmática de VTG, y el aclaramiento de VTG se han determinado durante y después de una exposición a nonilfenol en bolines (*Cyprinodon variegatus*), *Fundulus heteroclitus*, púas (*Barbus graellsii*), medaka (*Oryzias latipes*), y en la carpa común (*Cyprinus carpio*) (Hemmer et al., 2002 y García-Reyero et al., 2004). Peces medaka macho tratados con NP, mostraron un patrón dependiente de la dosis). Cabe destacar también que se observa una diferencia en la sensibilidad para NP

entre especies de peces (Folmar et al., 2002). Sin embargo, los resultados para los tratamientos de NP a pesar de ser concentraciones bajas del contaminante no muestran un patrón dependiente de la dosis, pero si un claro incremento de VTG en machos y hembras.

La aportación de este ensayo era conocer la inducción de VTG a concentraciones del orden de 2.5 a 10 $\mu\text{g/L}$ y si la relación dosis-respuesta era cierta. Según los resultados obtenidos este patrón no se cumple ya que los niveles de VTG del tratamiento NP 10 $\mu\text{g/L}$ fue menor que NP 5.0 $\mu\text{g/L}$ en machos y hembras. Este patrón es diferente al reportado para otro disruptor endocrino estrogénico como el E₂ donde la inducción de VTG depende de la concentración de la sustancia (Thorpe y col. 2007 y Rani y col. 2009).

Finalmente, al comparar los tratamientos de machos y hembras, es posible observar que los tratamientos en hembras fueron los que generaron mayores cambios en el biomarcador estudiado observándose un incremento de las concentraciones a lo largo del gradiente longitudinal en todos los tratamientos con respecto a los controles. Además, la inducción de VTG en machos aun en los casos en los que fue positiva no es comparable con los niveles reportados para hembras. Cabe destacar que, si bien los resultados denotan una exposición a compuestos que generan disrupción endocrina, (aumento de VTG) dada la variedad de factores y mecanismos que interactúan en la regulación de procesos a diferentes niveles de organización jerárquica, los efectos a nivel de molecular no siempre se corresponden con las respuestas observadas a niveles superiores y viceversa (Rivas, 2008).

4.1.4. Expresión de genes con PCR en tiempo real

La detección de la expresión de un gen por presencia de mRNA es el objetivo de la PCR-RT, los resultados obtenidos en las PCR a tiempo real se visualizan en los gráficos de amplificación. En estos se expresa la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas y se traduce en un número cuantificable de expresión genética.

Se realizó PCR- RT para determinar la expresión de los genes *cyp19a1b* y *gstp2* a muestras de larva de pez cebra que estuvieron expuestos durante el día 2 dpf al día 5dpf a concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{g/L}$ de NP y de 10 y 50 $\mu\text{g/L}$ de CBZ. Sin embargo, existieron interferencias que no permitieron la generación de los gráficos, las cuales se conocen

como interferencias en el procedimiento de fluorescencia por la elección de fluoruros, la generación de productos no específicos y genes de poca expresividad. En este ensayo, es posible observar este comportamiento.

Una medición directa por PCR- RT durante el desarrollo generalmente se ve obstaculizada por la dificultad de encontrar los genes cuya expresión se mantiene constante durante los dos primeros días de desarrollo. Varios informes han indicado que algunos de estos genes de referencia se expresan poco (Filby y Tyler, 2007). Por lo tanto, la única forma de cuantificar la expresión es como el número de copias absoluto, tal como se determina a partir de una curva estándar utilizando los ADNc clonados. Aunque esto puede, en teoría, aumentar la variabilidad entre los diferentes ensayos, se encontró que los resultados son reproducibles, con errores estándar reducidos ($SD < 2$).

Todos los resultados cuantitativos de PCR que se muestran son, por lo tanto, expresados como el número absoluto de copias. Las copias normalizadas se obtuvieron calculando el número de copias *gstp2* contra 1000 copias de ELF y el número de copias *gstp2* contra 1000 copias de PPIA que son los genes de referencia en este ensayo, Gráfico 5 y Gráfico 6. Por su parte las copias normalizadas para el gen *cyp19* contra los genes de referencia ELF y PPIA se presentan en los gráficos 12 y 13.

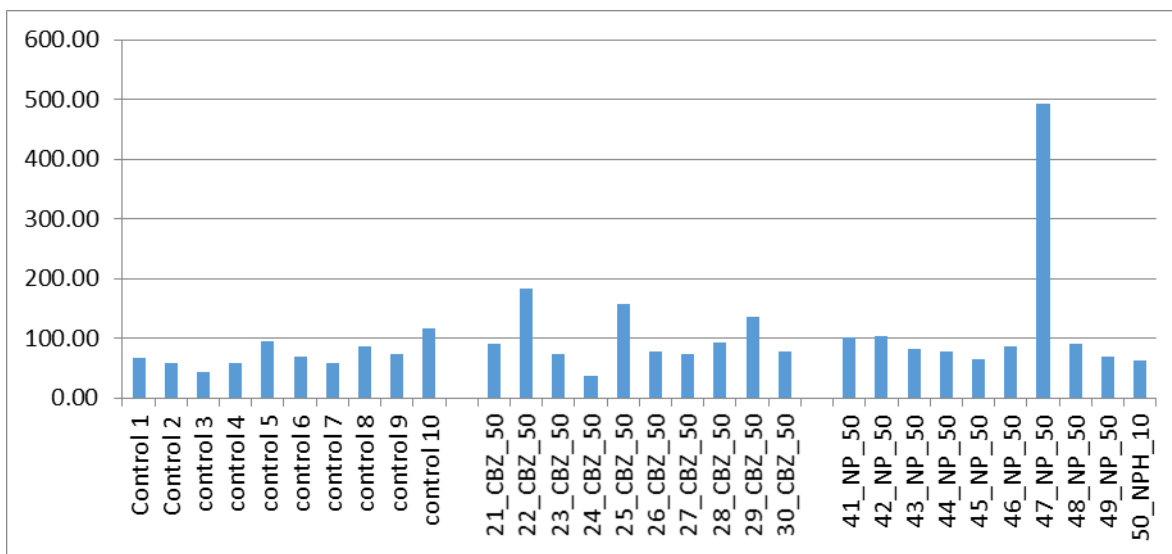


Gráfico 5. Copias normalizadas **GSTP2** contra 1000 copias de ELF

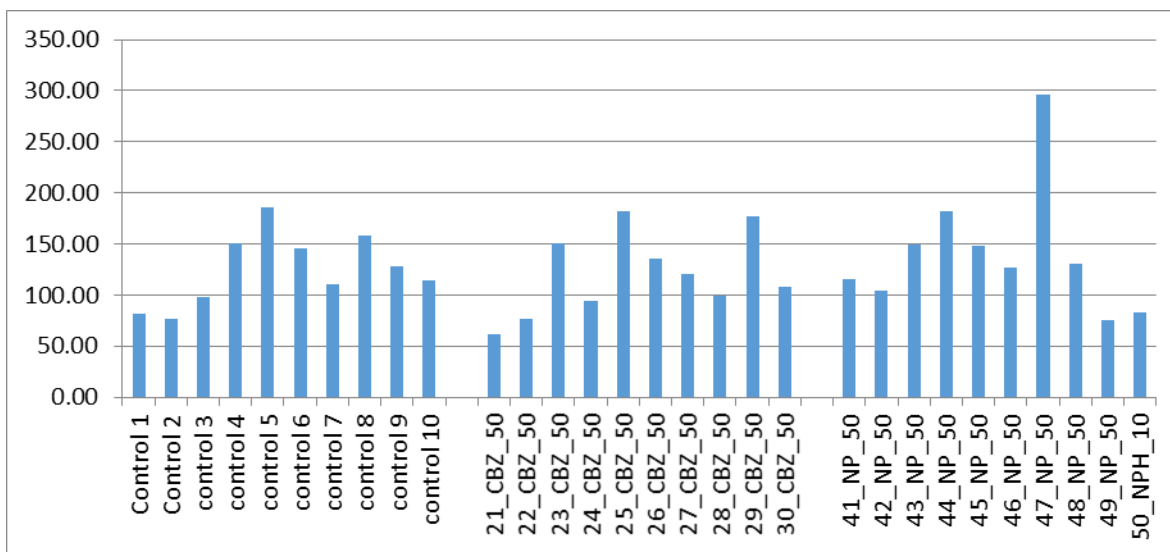


Gráfico 6. Copias normalizadas **GSTP2** contra 1000 copias de PPIA

Se observa que las copias de los controles tienen variabilidad evidente, debido a la formación de dímeros de primer, en los que se permite alguna variación aparente; en contraparte los tratamientos con NP son repetitivos y consistentes, pero no es posible aventurarse en análisis cuantitativos ya que al hacer los cálculos (copias normalizadas con genes de referencia) no se observan diferencias estadísticamente comprobables tanto para *gstp2* y *cyp19a1b*.

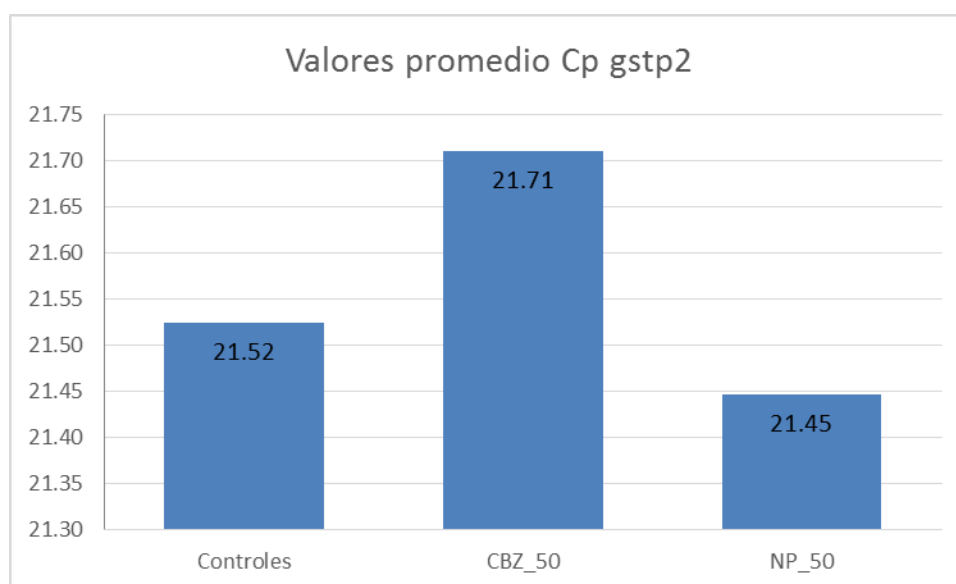


Gráfico 7. Valores promedio de copias para *gstp2*

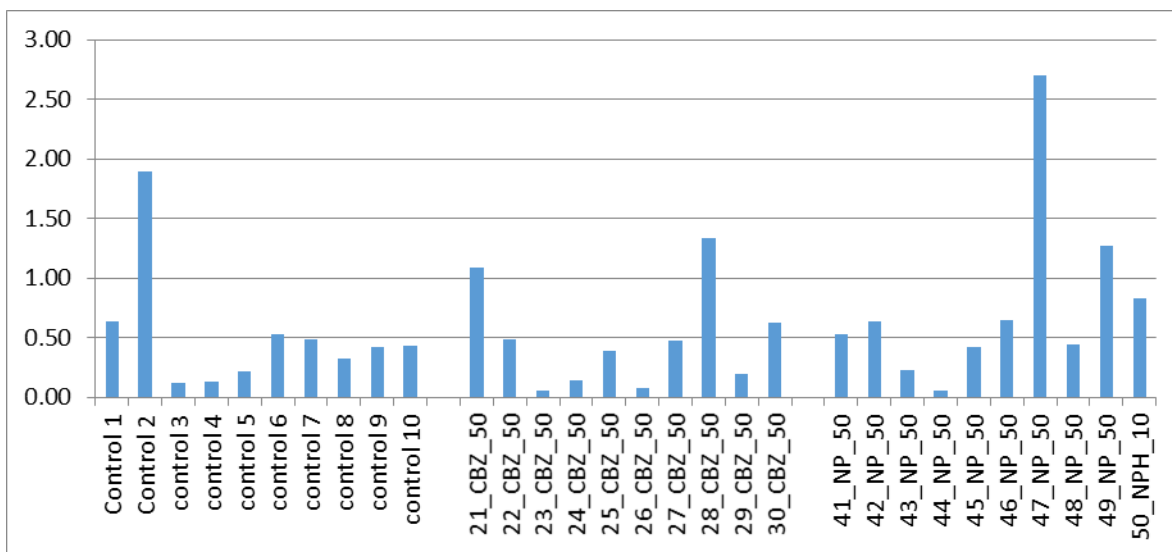


Gráfico 8. Copias normalizadas cyp19a1b contra 1000 copias de ELF

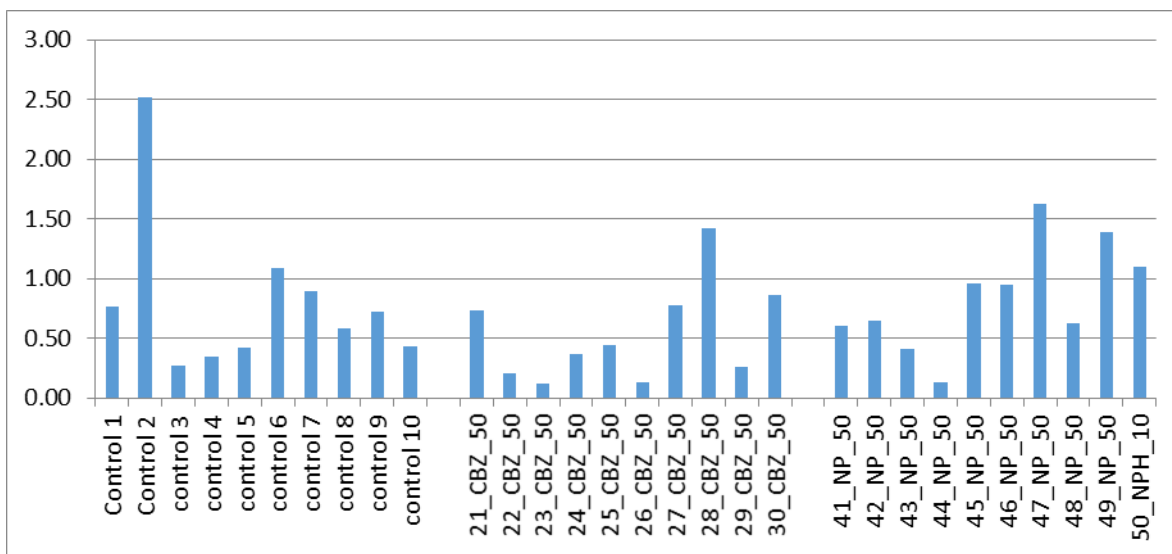


Gráfico 9. Copias normalizadas cyp19a1b contra 1000 copias de PPIA

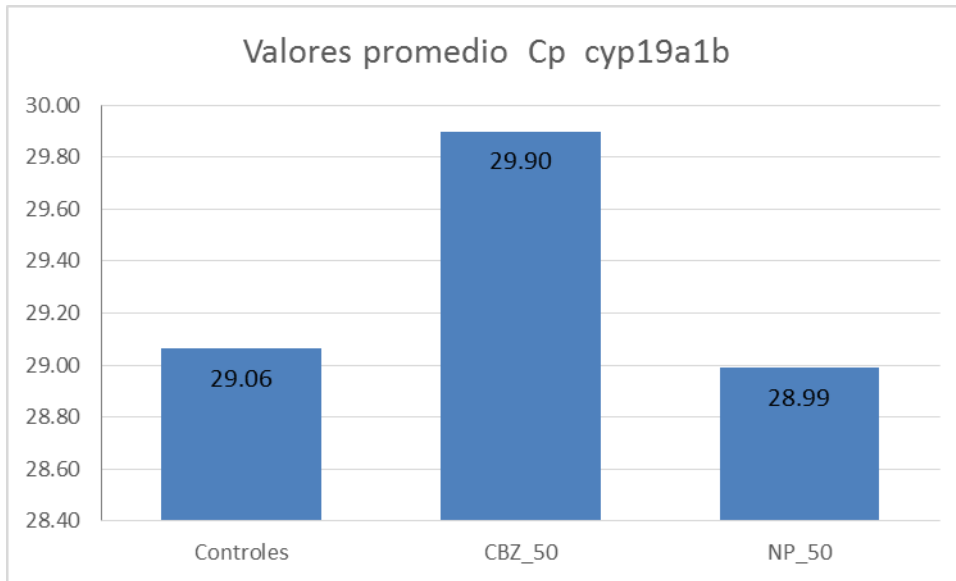
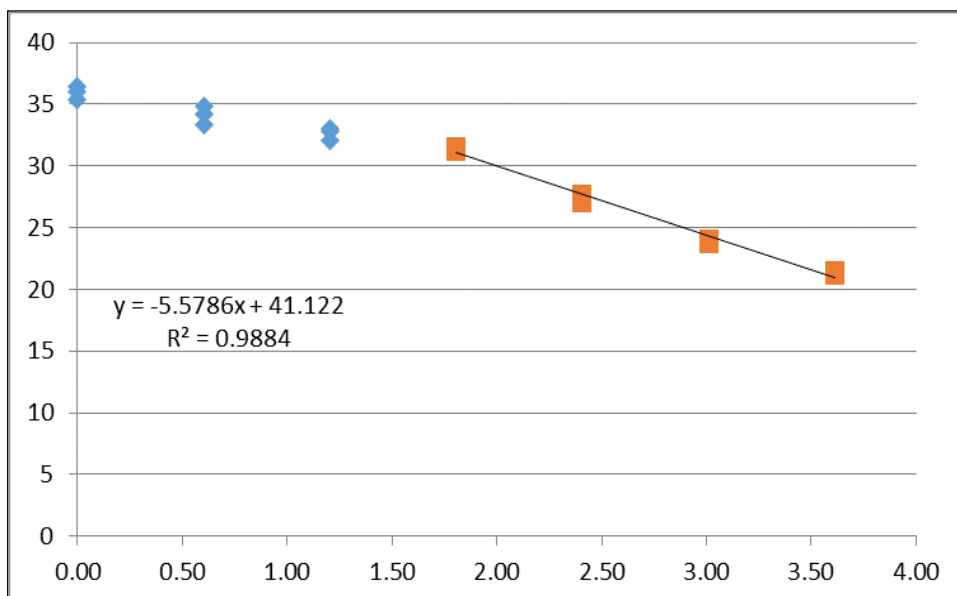


Gráfico 10. Valores promedio de copias para cyp19a1b

Existe una mayor cantidad de ARNm para los tratamientos de CBZ_50 respecto a NP_50 y los controles tomando en cuenta los valores promedio para ambos genes blanco (Gráfico 11 y 14), pero solo se observan de modo cualitativo ya que la diferencia es mínima, y es posible que esta se deba a la presencia de los dímeros de primer que interfieren en la lectura real.

Al asumir que las eficiencias son iguales y del 100% no se observan diferencias en cyp19a1b. Por su parte la eficiencia para GStp2 es muy baja probablemente las muestras sufrieron degradación, Gráfico 15.

Gráfico 11. Eficiencia para GStp2. Reporta un valor muy bajo de eficiencia de 0.510



Si bien es posible decir que la metodología de ET- PCR se aplicó técnicamente de forma correcta y que las curvas de disociación lo comprueban, los valores C_p no muestran diferencias cuantitativas claras entre control, CBZ y NP, y esto infiere que la expresión de ambos genes no arrojo resultados concluyentes y no es posible determinar si los tratamientos influyeron o no en la expresión de los genes elegidos. Se puede atribuir la falta de cuantificación a la presencia de interferencias en el procedimiento de fluorescencia, en la elección de los fluoruros, en este caso de SYBERGreen y la generación de dímeros de primer y otros productos no específicos, que interfieren con la lectura de los genes blancos, el *cyp19a1b* y el *gstp2*. Para obtener resultados es necesario cambiar el fluoruro por otros agentes intercalantes específicos que puedan diferenciar entre el gen blanco y los productos no específicos que se generan durante el termociclado y así tener mayor certeza al momento de cuantificar.

Se observa además la posibilidad de que las muestras sufrieran cierta degradación debido al congelamiento y descongelamiento al que fueron sometidas durante los procedimientos para llevar a cabo la PCR y con esto se disminuya la sensibilidad del análisis, para este caso, es necesario utilizar sondas específicas para potenciar la detección de la expresión de los genes seleccionadas en el intervalo de las concentraciones con las que se trabajó.

4.1.5. Pruebas de comportamiento de peces expuestos

El pez cebra es un animal modelo empleado en una gran cantidad y variedad de investigaciones. En concreto, es una de las especies que se utiliza más frecuentemente en los tests de toxicidad (Grush, 2004; Mikula 2006). Además, constituye una herramienta útil para establecer las bases moleculares de estudios cronobiológicos de relojes circadianos de vertebrados, en los cuales están siendo muy estudiados los ritmos de comportamiento y melatonina para caracterizar mutantes (Cahill, 2002). Por este motivo, son varios los artículos que se han publicado sobre los ritmos de locomoción en el pez cebra, donde bajo condiciones constantes se demuestra que están regulados por su reloj circadiano y que en condiciones de LD (luz-oscuridad) la mayoría muestran ritmos diurnos de actividad locomotora (López-Olmeda et al., 2006). En la evaluación del comportamiento y como ya se mencionó se midió la velocidad y la distancia recorrida de cada larva en su respectivo pozo, durante un tiempo de 50 minutos con tres estímulos consecutivos: 20 min de oscuridad, 10 min de luz y 20 min de oscuridad. Esta medición se

hizo directamente en el equipo Danio Visio haciendo la programación en el software Ethovision XT. Figura 40.

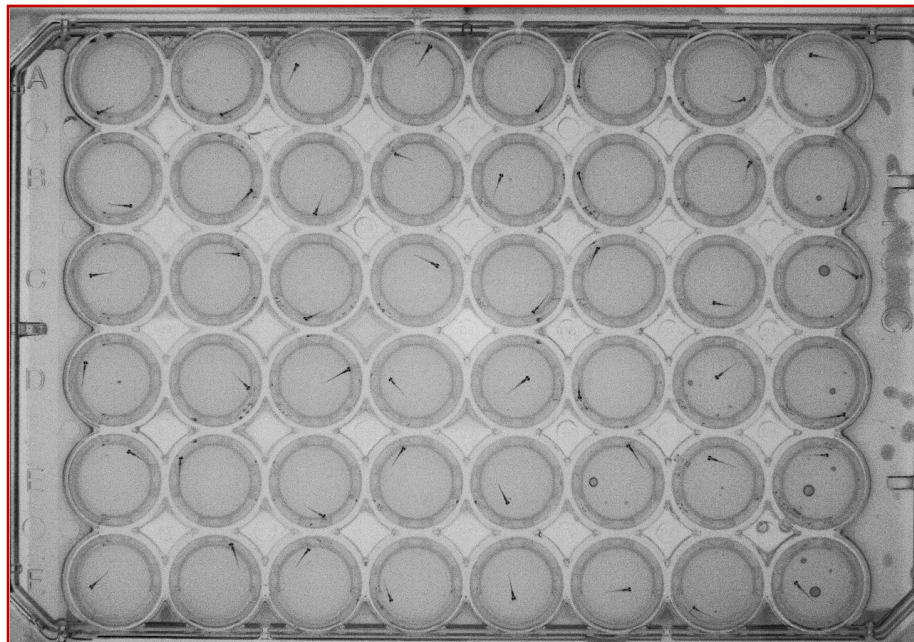


Figura 40. Imagen capturada por equipo Danio Visio durante prueba de comportamiento

Los datos arrojados por el software Ethovision XT corresponden a la distancia recorrida y la velocidad de cada larva medida cada dos minutos, para un total de 25 mediciones por cada larva durante los 50 minutos de duración de la prueba. Tabla 28.

Tabla 25. Ejemplo de datos obtenidos por larva en evaluación de comportamiento

			Distance moved	Velocity
			center-point	center-point
			Total	Mean
			mm	mm/s
Trial 1	A1	Start-0:02:00	180.331	1.50756
Trial 1	A1	0:02:00-0:04:00	170.821	1.82336
Trial 1	A1	0:04:00-0:06:00	130.123	1.09208
Trial 1	A1	0:06:00-0:08:00	135.169	1.13745
Trial 1	A1	0:08:00-0:10:00	180.026	1.58635
Trial 1	A1	0:10:00-0:12:00	79.5281	0.668669
Trial 1	A1	0:12:00-0:14:00	227.67	1.90543
Trial 1	A1	0:14:00-0:16:00	207.834	1.73699

			Distance moved	Velocity
Trial 1	A1	0:16:00-0:18:00	166.886	1.39574
Trial 1	A1	0:18:00-0:20:00	72.5081	1.0997
Trial 1	A1	0:20:00-0:22:00	158.04	1.32047
Trial 1	A1	0:22:00-0:24:00	137.873	1.22425
Trial 1	A1	0:24:00-0:26:00	169.506	1.4288
Trial 1	A1	0:26:00-0:28:00	160.58	1.41999
Trial 1	A1	0:28:00-0:30:00	105.05	0.878087
Trial 1	A1	0:30:00-0:32:00	636.183	5.39435
Trial 1	A1	0:32:00-0:34:00	493.295	4.14354
Trial 1	A1	0:34:00-0:36:00	451.85	3.80714
Trial 1	A1	0:36:00-0:38:00	400.997	3.57868
Trial 1	A1	0:38:00-0:40:00	292.542	2.5816
Trial 1	A1	0:40:00-0:42:00	372.424	3.25778
Trial 1	A1	0:42:00-0:44:00	360.39	3.09875
Trial 1	A1	0:44:00-0:46:00	323.671	2.75774
Trial 1	A1	0:46:00-0:48:00	241.643	2.06148
Trial 1	A1	0:48:00-0:50:00	251.978	2.11832
Trial 1	A1	0:50:00-0:52:00	0	0

Trial 1 corresponde a la placa 1 evaluada. A1 corresponde a la larva ubicada en el pozo A1 (pozo de primera fila y primera columna) de la placa

En este análisis las concentraciones aplicadas de CBZ fueron $<100 \mu\text{g/L}$, mientras que para NP las concentraciones usadas fueron $<500 \mu\text{g/L}$, esto debido a que concentraciones superiores a estos valores presentaron malformaciones y letalidad durante el tiempo de exposición.

Para realizar los gráficos y observar el comportamiento según el tratamiento aplicado fue necesario organizar los datos para cada tratamiento en cada placa y sacar el promedio de distancia y velocidad de las ocho larvas graficando los valores medios respecto al tiempo.

Para facilitar el análisis estadístico de la evolución de la actividad motora de los peces durante cada ensayo se llevó a cabo un análisis paramétrico de la varianza (ANOVA I), seguido de un test de Tukey ($P<0,05$).

Los resultados obtenidos se representan en gráficos que permiten comparar cada tratamiento con el control. La primera prueba que se realizó fue una exposición a CBZ de 4 h, en el 7 dpf. Los resultados obtenidos referentes a la distancia recorrida y la velocidad de las larvas según el tratamiento aplicado, se presentan en el Gráfico 12 y Gráfico 13.

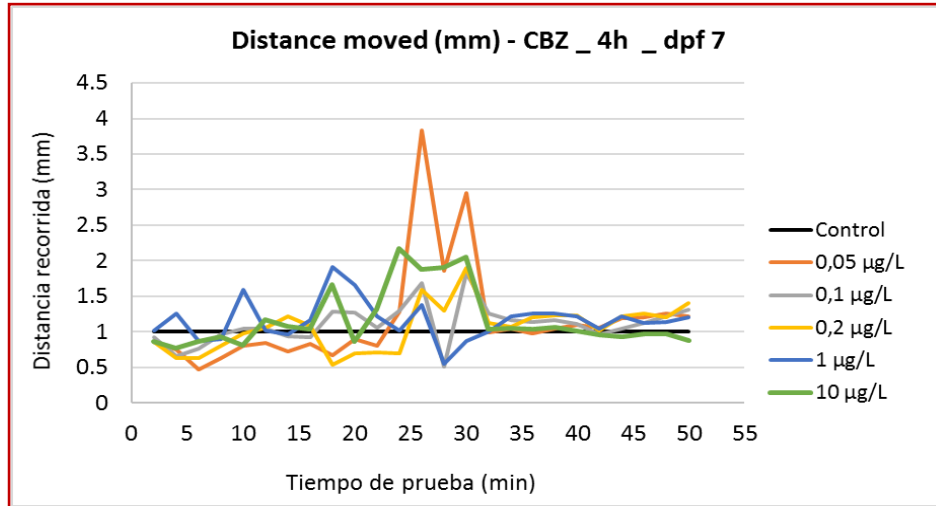


Gráfico 12. Distancia recorrida por larvas expuestas a CBZ

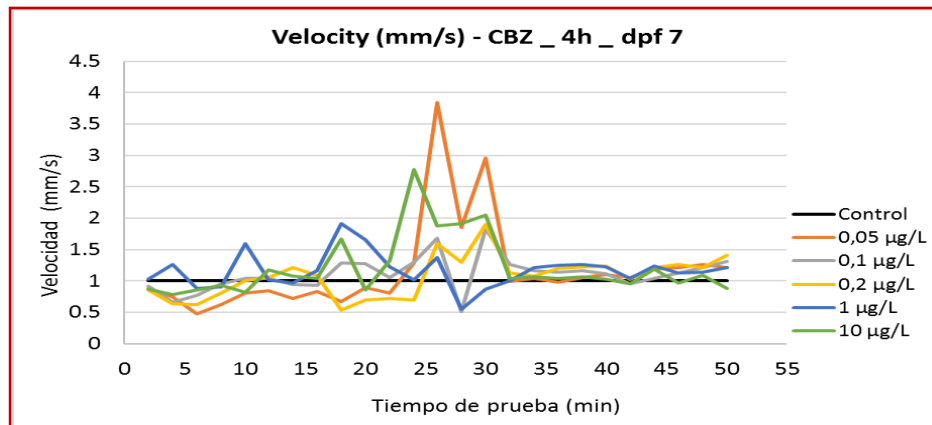


Gráfico 13. Velocidad de movimiento de larvas expuestas a CBZ

En esta prueba se observa que a partir del minuto 20 hay una tendencia a aumentar la distancia recorrida, esto ocurre cuando se enciende la luz, las larvas se ponen más activas y después del minuto 30 cuando se apaga nuevamente la luz, las larvas tienen un comportamiento uniforme y disminuye su dinamismo. Lo que indica que sí reaccionan al estímulo de luz comprobándose los niveles de actividad significativamente más elevados hasta el minuto 30 (1.76 mm) (Tukey, $P < 0,05$) siendo el minuto 26 el de mayor distancia (1.89 mm) mientras que en los minutos de oscuridad la distancia se mantuvo entre 0.9 ± 1.1 mm sin diferencias significativas (Tukey, $P < 0,05$) esto tomando en cuenta la distancia con respecto al tiempo.

En los tratamientos la actividad representada por la distancia recorrida solo fue mayor en el tratamiento de $0.05 \mu\text{g/L}$ (1.17 mm) pero no mostró diferencias significativas entre tratamientos.

En cuanto a la velocidad el tratamiento correspondiente a la mayor dosis, 10µg/L, registró valor con la velocidad media más alta (1.21 mm/s) pero ninguno de los tratamientos mostró diferencias significativas al realizar ANOVA (Tukey, $P < 0,05$).

El experimento de exposición de larvas del 2 al 5 dpf se realizó tres veces, para determinar su comportamiento a diferentes dosis de CBZ y de NP. Los tres experimentos se hicieron con tres puestas diferentes. Los resultados obtenidos la distancia recorrida en las pruebas de las larvas expuestas a CBZ en los experimentos 1, 2 y 3 se presenta en el Gráfico 16, 16 y 18, respectivamente; y la velocidad de movimiento en el Gráfico 15, 17 y 19, respectivamente.

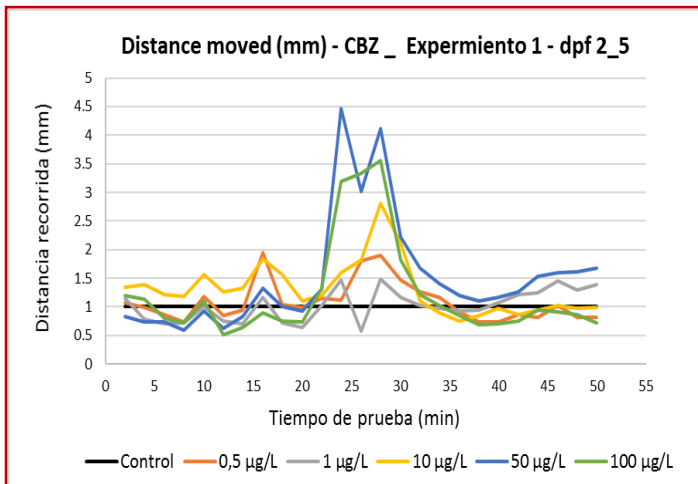


Gráfico 15. Distancia recorrida - CBZ - Experimento 1

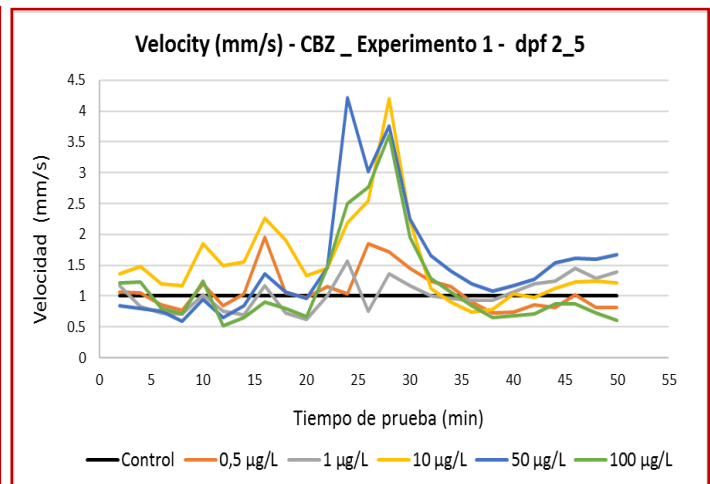


Gráfico 14. 1Velocidad - CBZ - Experimento 1

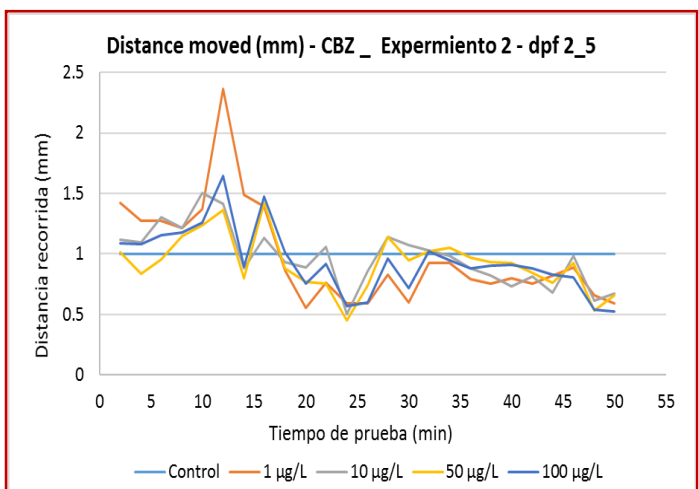


Gráfico 16. Distancia recorrida - CBZ - Experimento 2

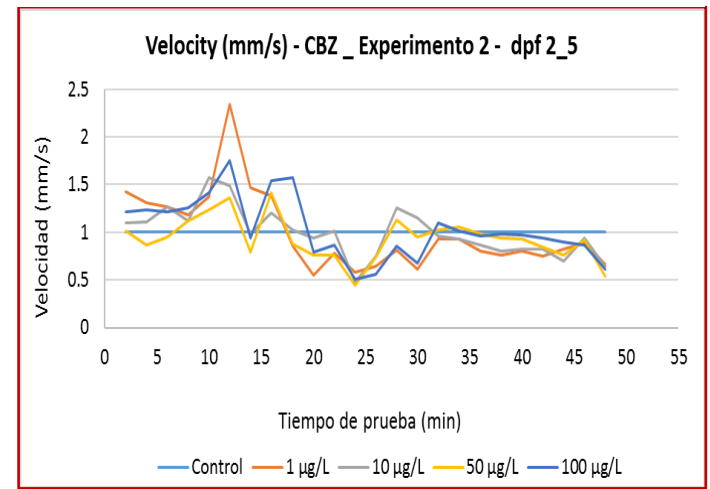


Gráfico 17. Velocidad - CBZ - Experimento 2

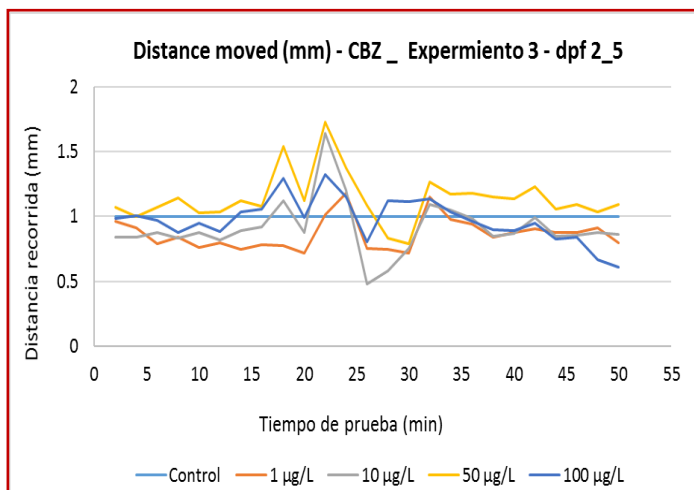


Gráfico 19. Distancia recorrida - CBZ - Experimento 3

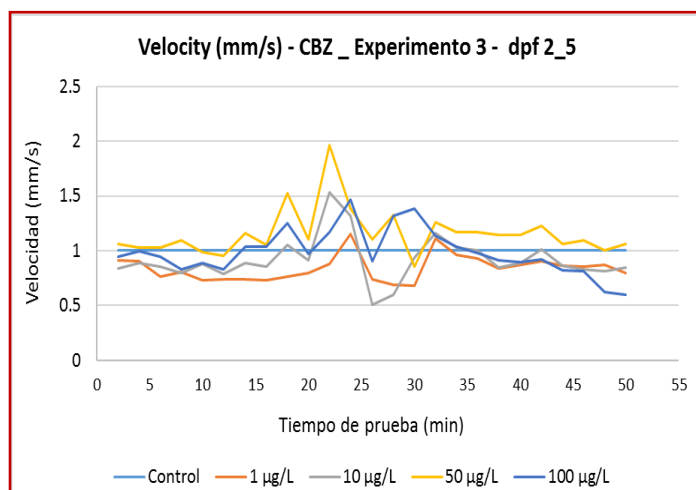


Gráfico 18. Distancia recorrida - CBZ – Experimento 3

Las larvas de pez cebra se han convertido en un sistema modelo popular para examinar factores genéticos y ambientales que afectan el comportamiento. En los gráficos 15, 16, 19 y 20, se observa que el comportamiento de las larvas expuestas a CBZ es similar al que tuvieron en la exposición de 4h, ya que en el minuto 22 (1.09 mm); 24 (2.13 mm); 26 (1.92 mm); 28 (2.47 mm) y el min 30 (1.62 mm) las larvas mostraron mayor actividad significativamente diferentes con respecto a los minutos de oscuridad (ANOVA Tukey, $P < 0,05$).

En este experimento se evidencia mayor distancia recorrida durante el estímulo de luz en las larvas que fueron expuestas a la concentración de $50 \mu\text{g/L}$ (1.51 mm) mostrando diferencias significativas con el tratamiento control (1 mm); el de $0.5 \mu\text{g/L}$ (1.08 mm) y el de $1 \mu\text{g/L}$ (1.021 mm) correspondientes a las concentraciones más bajas aplicadas.

La piel del pez es una envoltura del cuerpo que le brinda protección, constituyendo la primera barrera defensiva del organismo contra enfermedades y situaciones ambientales adversas, cumpliendo también funciones respiratorias, excretoras y osmorreguladoras (Voto, 2002). En este estudio, los resultados mostraron la existencia de un cambio en el comportamiento en los peces cebra asociados a la presencia de CBZ en el agua sobre todo a la concentración de $50 \mu\text{g/L}$.

Los peces tienen un necesario e íntimo contacto con el agua, haciéndolos vulnerables a cualquier sustancia disuelta en ella, por lo que las alteraciones de su fisiología y comportamiento pueden ser considerados como indicadores de contaminación y atribuibles al tipo de contaminante que se esté midiendo. La distancia recorrida en las

larvas de pez cebra es debido a las reservas energéticas del saco vitelino que son necesarias para el desarrollo y sobrevivencia larvaria hasta el inicio de la alimentación exógena (Mommensen y Walsh, 1988) sin embargo un aumento de la actividad locomotora implica que en las concentraciones de CBZ estudiadas existe un posible aumento en las señales eléctricas de las que depende el movimiento de la cola y están mediadas por neuronas denominadas motoneuronas, específicamente a despolarizaciones de estas como si se tratara de una bobina eléctrica.

Saint-Amant (2006), encontró que las motoneuronas primarias muestran despolarizaciones periódicas espontáneas y repetitivas. Canales de sodio y potasio son activados y han sido implicados en la generación, propagación y terminación de estas despolarizaciones periódicas respectivamente. Además, se ha demostrado que la frecuencia media de despolarización en las motoneuronas de los embriones, coincide con la frecuencia media del comportamiento de lo que se podría llamar “bobinado” aumentando la señal eléctrica y la contracción muscular traduciéndose a mayor velocidad y distancia recorrida bajo algún estímulo que lo induzca.

La velocidad de movimiento de las larvas durante el estímulo de luz se aumentó lo que es coherente con la distancia recorrida por cada larva en el pozo, siendo mayor en las concentraciones, 10 $\mu\text{g/L}$ (1.54 mm/s) y 50 $\mu\text{g/L}$ (1.50 mm/s) con respecto al control y a las concentraciones más bajas de 0.05 y 0.1 $\mu\text{g/L}$ (Tukey, $P < 0.05$).

El estímulo visual y la duración del periodo de luz diario es el factor que determina la conducta de los animales (Ortega-Cerrilla et al., 2006), regula los ritmos de vida de los organismos (Herrero-Ramón, 2007). En este sentido, fue muy importante determinar cómo los cambios en el fotoperiodo afectan al comportamiento ya que se encontraban bajo la influencia de luz artificial y bajo concentraciones de contaminantes. Los peces muestran una mayor actividad natatoria durante los periodos iluminados bajo regímenes de fotoperiodo alterado y concentraciones más altas, posiblemente como causa de una respuesta de estrés y un instinto de huida (Viso-Portabales. 2013).

Los resultados de la exposición a NP en larvas de 2 dpf hasta el 5 dpf, se presentan en los gráficos 21-26. En esta prueba de comportamiento al igual que para la exposición de CBZ, se observa que entre el minuto 20 y el 30 es dónde mayor dinamismo se presenta tanto en la distancia recorrida como en la velocidad, pero para la exposición a NP se muestra mayor reacción al estímulo de luz en las larvas que fueron expuestas a una dosis de 10 $\mu\text{g/L}$ (1.119 mm/s) seguido de la dosis de 50 $\mu\text{g/L}$ (1.116 mm/s), y las larvas expuestas a la

dosis de 100 $\mu\text{g/L}$ (1.10), siendo la mayor, presenta menor movimiento pero ninguna presenta diferencias significativas (Tukey, $P < 0,05$). La velocidad tampoco muestra diferencias significativas en ninguno de los tratamientos.

Según lo observado las concentraciones analizadas no provocan alteraciones en la actividad de las larvas del pez cebra. Al parecer la actividad del macho pez cebra reduce significativamente con valores cercanos a 100 mg/L de exposición a NP durante 60 días según los valores reportados por, Clotfelter y Rodríguez (2006) y Van Gossum et al., (2009). Se concluye que NP inhibió el comportamiento en cuanto a la movilidad del pez cebra claramente a 100 $\mu\text{g/L}$ de concentración de NP.

Es de destacar que había una tendencia a aumentar a 1 y 10 $\mu\text{g/L}$ esto concuerda con el trabajo realizado por Xia et al., (2010). El NP actúa como un disruptor endocrino estrogénico y se comporta como una hormona capaz de alterar y producir cambios severos en los peces tales como afectación del instinto de supervivencia al escapar de los depredadores y sus ciclos circadianos (Moreno-Ortiz et al., 2013) sin esto es posible que no sea capaz de percibir los cambios mediados por la luz y disminuya su locomoción demostrando que no sólo afectan la reproducción de las especies sino que también afectan a los instintos naturales básicos, provocando la inevitable disminución de individuos. La exposición de las larvas a NP en los experimentos 2 y 3 se hizo con las mismas concentraciones de la 1. Los resultados obtenidos en la prueba de comportamiento en el experimento 2 para la exposición a NP se presentan en los siguientes gráficos del 20 al 25.

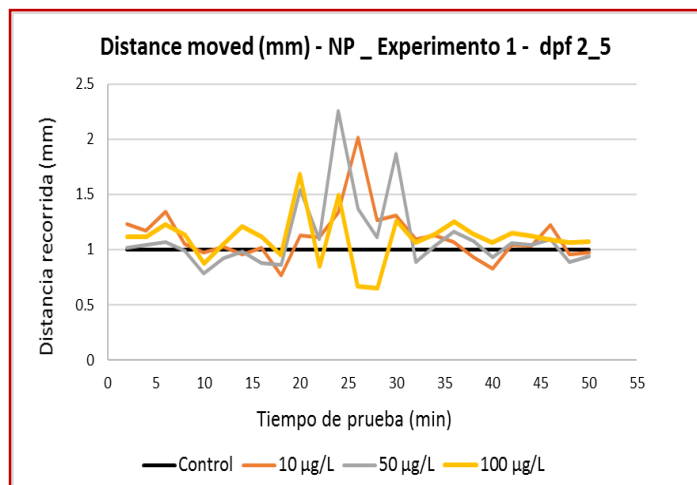


Gráfico 21. Distancia recorrida - NP - Experimento 1

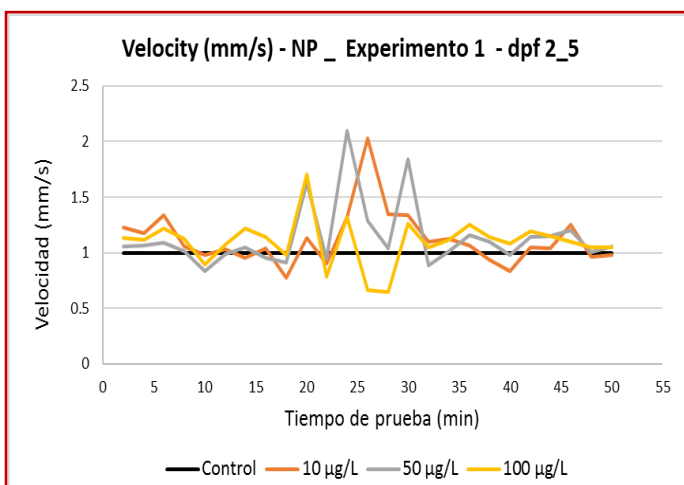


Gráfico 20. Velocidad - NP - Experimento 1

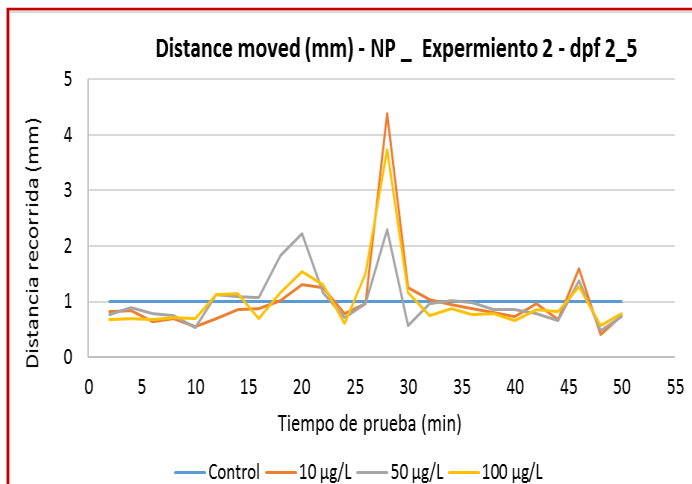


Gráfico 22. Distancia recorrida - NP - Experimento 2

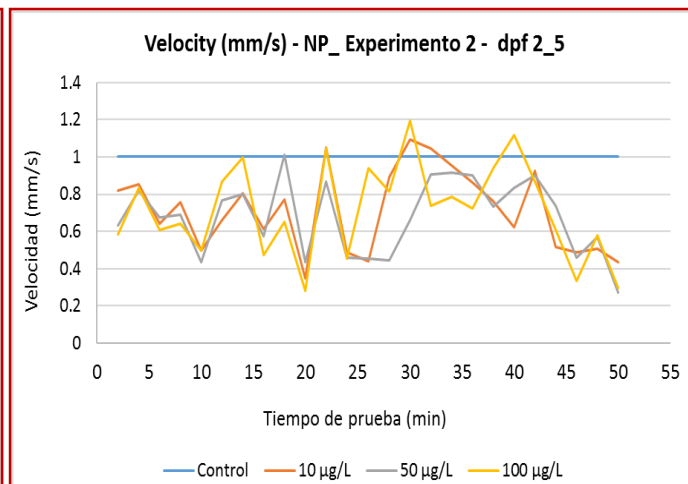


Gráfico 23. Velocidad - NP - Experimento 2

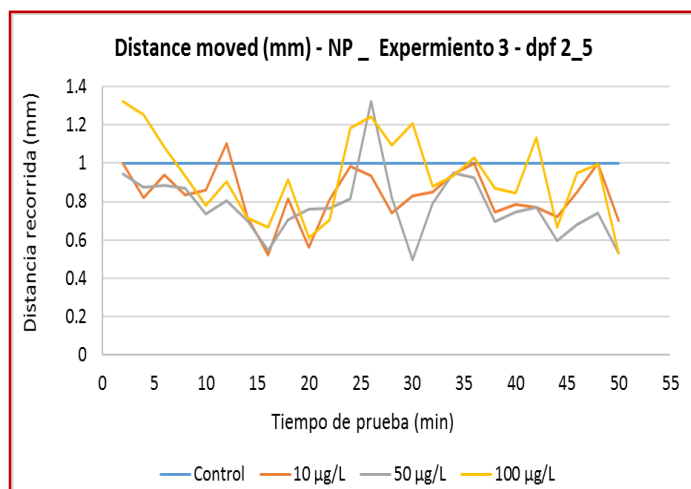


Gráfico 24. Distancia recorrida - NP - Experimento 3

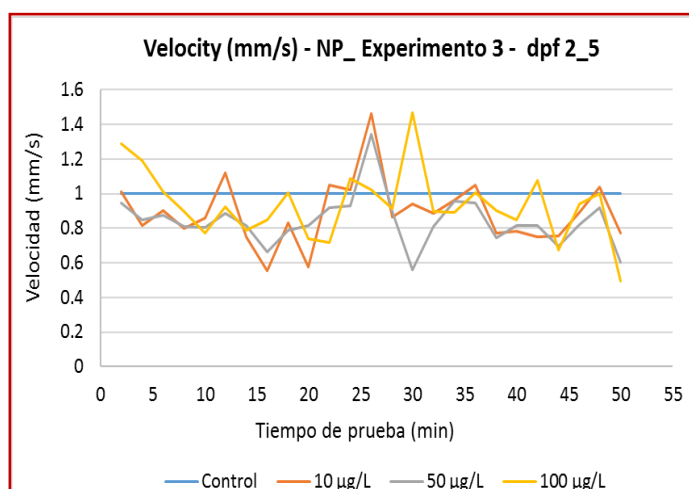


Gráfico 25. Velocidad - NP - Experimento 3

Los puntos finales para evaluar la toxicidad en embriones y larvas fueron letalidad y malformaciones y para evaluar la neurotoxicidad fue la actividad locomotora. La evaluación de la neurotoxicidad se hizo con las concentraciones que no produjeron malformaciones después de una exposición en el periodo 2 – 5 dpf.

La CBZ altera la actividad neural encargada de la actividad locomotora a dosis mayores, aumentando la motricidad del pez cebra especialmente en los minutos de luminosidad. Por su parte el NP actúa como una hormona estrogénica e inhibe los comportamientos motrices del *Danio rerio* alterando sus instintos básicos de supervivencia al inhibir su respuesta al estímulo luminoso y por consiguiente la disminución de su metabolismo que

esta mediado por el fotoperiodo y los ciclos circadianos lo que puede repercutir en una menor alimentación y problemas reproductivos potenciales por falta de energía a lo largo de su ciclo de vida.

Toxicidad manifiesta: letalidad por exposición de larvas a CBZ y NP

Las primeras dosis de exposición en los embriones de la primera puesta no presentaron mortalidad para el nonilfenol y la CBZ. La exposición en el periodo 2 – 5 dpf, a las concentraciones más altas de nonilfenol, 1000 $\mu\text{g/L}$ causó la mortalidad del 100% en el 5 dpf, la exposición a 500 $\mu\text{g/L}$ del mismo contaminante causó una letalidad del 50%. **Figura 41.** La letalidad no se indujo en las concentraciones más bajas, las demás exposiciones fueron en concentraciones subletales (NP < 500 $\mu\text{g/L}$).

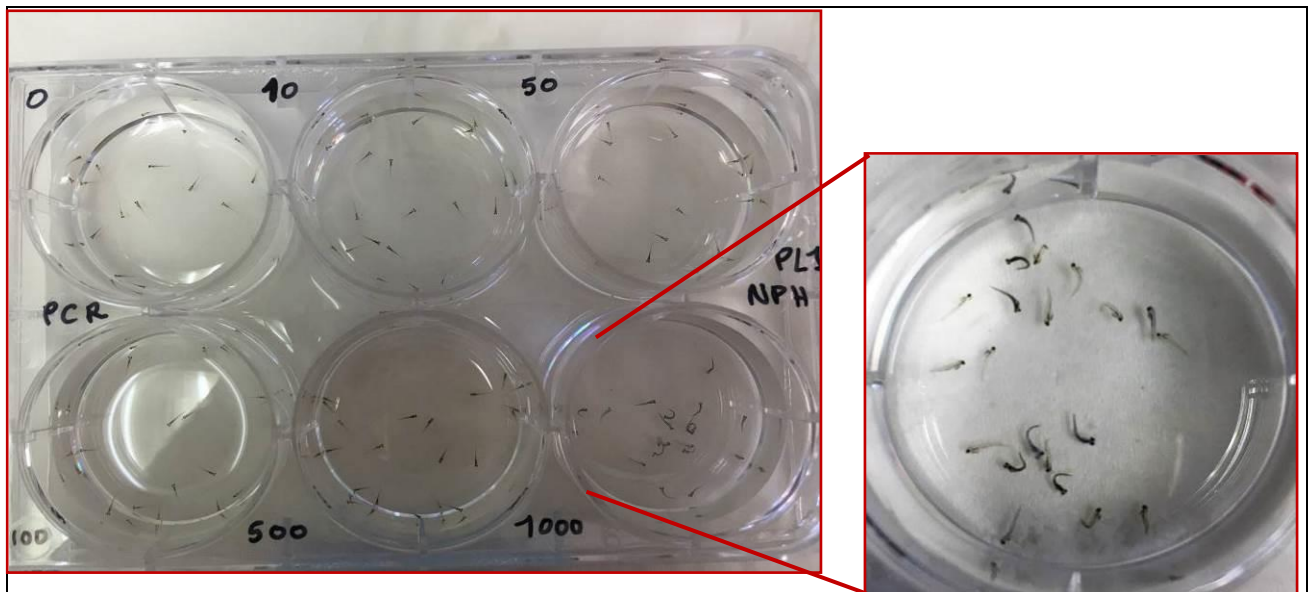


Figura 41. Letalidad de larvas a 1000 $\mu\text{g/L}$ de NP

Toxicidad manifiesta: malformaciones por exposición de larvas a CBZ y NP

El desarrollo de los embriones y larvas expuestas a las concentraciones más altas de CBZ y NP se vio afectado con malformaciones en las mayores concentraciones de ambos contaminantes como se muestra en la anterior figura.

Las malformaciones detectadas por simple observación incluyeron lordosis, retraso en el crecimiento del esqueleto en la región de la columna vertebral, retraso en el crecimiento de aletas, abdomen distendido y regiones torácica, y microencefalia.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

En lo concerniente a los estudios de los compuestos en agua dopada CBZ como disruptor endocrino utilizando la producción de la proteína vitelogenina (VTG) como biomarcador, observó un aumento en la producción de VTG en machos de peces de la especie *Danio rerio* (pez cebra) principalmente bajo el tratamiento de CBZ de 0.2 ng/ml mostrando niveles equiparables en sus valores medios de VTG con el control positivo. Este resultado demuestra que la CBZ a una concentración de 0.2 ug/ml aumenta la producción de VTG y altera el sistema endocrino de los peces responsable de su producción lo que lo califica como un posible DE. Por su parte, se confirma, que el NP es un DE a concentraciones muy bajas 2.5 µg/L, 5 µg/L y 10 µg/L siendo el segundo tratamiento, 5 µg/L de NP, el que mostró el nivel más alto de VTG inducida en todos los tratamientos para machos con 4225 ng/ml.

En la determinación de la actividad de disrupción endocrina de la CBZ y de los NP en las matrices de agua de manantial y de pozo, mediante la medida de la producción de la VTG, los resultados mostraron variaciones extremas en las concentraciones de VTG en las placas correspondientes a un mismo tratamiento, lo que impidió hacer un análisis coherente de los posibles efectos, ya que la falta reproducibilidad invalida el ensayo en términos estadísticos. Esto se debió quizás a la presencia de otros contaminantes en las matrices. Sin embargo, de esta parte de la prueba fue posible comparar el comportamiento de los peces en agua sintética vs agua de manantial y de pozo, y se evidenció que los peces presentaron resistencia a las condiciones en todos los tratamientos.

La expresión de genes por la presencia de carbamazepina y nonilfenoles mediante PCR en tiempo real no arrojó resultados concluyentes ya que los dos genes son de poca expresión, esto se puede atribuir por la presencia de interferencias en el procedimiento de fluorescencia, en la elección de los fluoruros, en este caso de SYBERGreen y la generación de dímeros de primer y otros productos no específicos, que interfieren con la lectura de los genes blanco. Por lo tanto, para los tratamientos de CBZ y NP aplicados en las larvas no fue posible observar diferencias en la expresión génica.

El efecto en el comportamiento de larvas de pez cebra, expuestas a diferentes dosis de carbamazepina (CBZ) altera la actividad neural encargada de la actividad locomotora a dosis mayores, aumentando la motricidad del pez cebra especialmente en los minutos de luminosidad. Por su parte NP inhibió la movilidad del pez cebra a 100 $\mu\text{g/L}$ de concentración, aunque presentaba una tendencia a aumentar a 1 y 10 $\mu\text{g/L}$. Al parecer, el NP actúa como una hormona estrogénica e inhibe los comportamientos motrices del *Danio rerio* alterando sus instintos básicos de sobrevivencia en la concentración más alta, al inhibir su respuesta al estímulo luminoso, esto puede repercutir en problemas reproductivos y de movilidad potenciales en su etapa adulta.

Recomendaciones

El bioensayo desarrollado es adecuado para evaluar efectos de disrupción endócrina por exposición a CBZ Y NP, validándose su aplicación como herramienta de monitoreo. Los efectos en el componente bioquímico-molecular, niveles de vitelogenina plasmática y comportamiento deben servir de antecedente para la caracterización y definición de la situación actual de los contaminantes emergentes en el país, por lo que la generación de más estudios relacionados a este tema se hace imperativo.

Los estudios ecotoxicológicos representan una herramienta muy útil para medir el grado de afectación de los CE's en la salud humana y en los ecosistemas, comprobando que, como en este estudio, la presencia de contaminantes químicos en aguas residuales o para consumo humano, causan daños como la disrupción endócrina en los peces o efectos en su comportamiento, lo cual debería ser incluido como pruebas para la regulación respecto a su uso, especialmente en la industria.

Es conveniente el diseño de técnicas y metodologías para la evaluación ecotoxicológica de los CE's y la determinación de los efectos que pueden ocasionar, de tal forma que se puedan aplicar de manera práctica y que sean económicamente viables, considerando que uno de los principales limitantes para llevar a cabo una evaluación como la que se realizó en este trabajo podrían ser los altos costos de los kits y que los reactivos no son suficientes para poder hacer una repetición de la prueba en caso de no obtenerse resultados en un primer intento.

En el caso de ensayos con PCR-RT, considerando las interferencias y la poca expresividad de los genes evaluados, es necesario realizar ensayos con marcadores de fluorescencia

distintos a SYBER Green que permitan diferenciar los picos de fluorescencia de los genes blanco y los de los dímeros de primer. Esto con la finalidad de disminuir las interferencias generadas y cuantificar de forma correcta las diferentes concentraciones de CBZ y NP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agilent Technologies Manufacturing GmbH y Co. KG. (2013). Ficha de datos de seguridad – carbamazepina.
- Andersen, L., Goto-Kazeto, R., Trant, J.M., Nash, J.P., Korsgaard, B., Bjerregard, P. 2006. Short-term Exposure to Low Concentrations of the Synthetic Androgen Methyltestosterone Affects Vitellogenin and Steroid Levels in Adult Male Zebrafish. *Aquat Toxicol.* 76, 343–352.
- Ankley, G.T., Johnson, R.D., 2004. Small Fish Models for Identifying and Assessing the Effects of Endocrine Disrupting Chemicals. *ILAR J.* 45, 469–483.
- Argemi, F.; Cianni, N. y Porta, A. 2005. Disrupción endócrina: perspectivas ambientales y salud pública. *Acta Bioquím. Clin. Lationam.* 39(3): 291 – 300.
- Arukwe, A., Goksoyr, A., 2003. Eggshell and Egg Yolk Proteins in Fish: Hepatic Proteins for the Next Generation: Oogenetic, Population, and Evolutionary Implications of Endocrine Disruption. *Comp. Hepatol.* 2, 4.
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith & Martins, R. N. (2012). Cuidado y mantenimiento regulares de un pez cebra.
- Balch, G.C., Mackenzie, C.A., Metcalfe, C.D., 2004. Alterations to Gonadal and Reproductive Success in Japanese Medaka Exposed to 17 α -ethinylestradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 782–791.
- Barceló L. D. (2003). Emerging pollutants in water analysis. *Trends in Analytical Chemistry.* 22 (10): 685-696.
- Barceló, L. D. (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Barcelona: Fundación nueva cultura del agua. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona. Pp. 27.
- Barceló, L. D. y López, M. J. (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. En: Panel Científico- Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona
- Biosense Laboratoruies. (2004). Zebrafish Vitellogenin ELISA Kit. PP:16.
- Bologna, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination* 239: 229–246.
- Bopp, S. K., Minuzzo, M., Lettieri, T. (2006). The Zebrafish (*Danio rerio*): An Emerging Model Organism in the Environmental Field. *Scientific and Technical Research series.* 24.
- Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksoyr, A., Porcher, J.M., 2002. Development and Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to Measure Vitellogenin in the Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1699–1708.

- Cahill, G. M. (2002). Clock mechanisms in zebrafish. *Cell and tissue research*, 309(1), 27-34.
- Cartagena, C. J. (2011). Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos. *Revista Lasallista de Investigación*, 8(2), 143-153.
- CE. Comisión de las Comunidades Europeas. (2001). Libro Blanco. Estrategia para la futura política en materia de sustancias y preparados químicos. Bélgica. Pp: 38.
- Chávez, A., Torner, F., Barrios, J. A., Maya, C., Lucario, E., Navarro, M. I., Jiménez, B. (2015). Membrane process for spring water treatment in the Tula Valley. Assessment of physicochemical and microbiological parameters in a non-conventional water source. *Water Science & Technology: Water Supply*. 15:(2), 294-301.
- Cheshenko, K.; Pakdel, F.; Segner, H.; Kan, O. y Eggen, R.I.L. 2008. Interferencie of endocrine disruption chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155:31-62.
- Clotfelter E D, Rodriguez A C, 2006. Behavioral changes in fish exposed to phytoestrogens. *Environmental Pollution*, 144(3): 833–839.
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(5), 299-305.
- Correia A D, Gonc,alves R, Scholze M, Ferreira M, ReisHenriques M A, 2007. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 347(1-2): 109–122
- Cortázar, A., y Rincón, E. (2004). Métodos Físico-Químicos en Biotecnología PCR. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Biotecnología. Pp. 43.
- Cowden, J., Padnos, B., Hunter, D., MacPhail, R., Jensen, K., Padilla, S. (2012). Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retino-tectal prejection area in zebrafish embryos. *Reproductive Toxicology*. 33: 165 – 173.
- Creton, R. (2009). Automated analysis of behavior in zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research*, 203: 127–136.
- Daughton C.G. (2004) Non-regulated water contaminants: Emerging research. *Environmental Impact Assessment Review*, 24: 711-732.
- Delgado, S. (2011) Evaluación de tecnologías potenciales de reducción de la contaminación de las aguas de canarias (TECNOAGUA). España.
- Devlin, R.H. y Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364

- Díaz E., (2006). El *Danio cebra* como animal de laboratorio. *Animales de laboratorio*, núm. 34: 4-39.
- Dieffenbach, C. W., y Dveksler, G. S. (2003). *PCR Primer: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Drewes, J. E., Heberer, T., Reddersen, K. (2002). Fate of pharmaceuticals during indirect potable reuse. *Water Science & Technology* 46 (3), 73-80.
- Eghbal, M. A., Taziki, S., y Sattari, M. R. (2013). Rol Protector de la Melatonina y Taurina contra la Toxicidad Inducida por la Carbamazepina en Hepatocitos de Rata Recién Aislados. *International Journal of Morphology*, 31(3), 1081-1089.
- EPA United States Environmental Protection Agency (2002). *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*.
- EPA United States Environmental Protection Agency (2010). *Nonylphenol (NP) and Nonylphenol Ethoxylates (NPEs) Action Plan*.
- Estrada, A. E. B.; Mantilla, M. G.; Mijaylova, N. P.; Ramírez, S. N.; Moeller, C. G.; Sánchez, Z. M. (2013). Presencia y tratamiento de compuestos disruptores endocrinos en aguas residuales de la Ciudad de México empleando un biorreactor con membranas sumergidas. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, volumen XIV (número 2), abril-junio 2013: 275-284
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations y UNEP, United Nations Environment Programme. 2013. *Rotterdam Convention*. Italia. Pag. 60.
- Fenske, M., Maack, G., Schäfers, C., Segner, H. 2005. An Environmentally Relevant Concentration of Ethinylestradiol Induces Arrest of Male Gonad Development in Zebrafish, *Danio rerio*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1088–1098.
- Fenske, M., Van Aerle, R., Brack, S., Tyler, C.R., Segner, H. 2001. Development and Validation of a Homologous Zebrafish Vitellogenin ELISA and its Application for Studies on Estrogenic Chemicals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 129, 217–232.
- Filby, A. L., Thorpe, K. L., Maack, G., y Tyler, C. R. (2007). Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen-and estrogen-induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology*, 81(2), 219-231.
- Gagné, F., Blaise, C., Salazar, M., Salazar, S., & Hansen, P. D. (2001). Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 128(2), 213-225.
- García, C. L. (2010). Tesis doctoral: *Nuevas Metodologías para la Determinación de Nonilfenol, sus Derivados Etoxilados y Parabenos en Muestras Medioambientales*.

Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica. Universidad Complutense de Madrid. Pp 209.

- García, L. M. (2004). Bioensayo de toxicidad por Microtox® en sedimentos. Murcia.
- Gasca, P. E. (2015). Evaluación del potencial anticonvulsivante y ensayos de toxicidad de la 5H-dibenzo (b, e) azepin-6, 11-diona y la dibenzo (b, f) (1, 4) diazocin-6, 11 (5H, 12H)-diona". Tesis doctoral. Centro de Investigaciones Cerebrales. Universidad Veracruzana.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., & Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 67(4), 773-782.
- Gil, F. (2000). El papel de los biomarcadores en Toxicología humana. *Revista de Toxicología*, 17(1), 19-26.
- Gil, F., & Pla, A. (2001). Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *Journal of applied toxicology*, 21(4), 245-255.
- Gil, M. J. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*. Vol.7, No.2: 52-73
- Greenspan, F. S. G., Holguin, F. S. G., Francisco, L., Saborio, E. G., Eduardo, J., Greenspan, T. F. S., y Gardner, D. G. (2003). *Endocrinología básica y clínica* (6ª. Edición), capítulo XIII. p. 123
- Grush, R. (2004). The Emulation Theory of Representation: Motor Control, Imagery, and Perception. *Behavioral and brain sciences*, 27(03), 377-396.
- Guang-Guo Yinga, Brian Williams, Rai Kookana. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. *Environment International*. Volume 28, Issue 3: 215–226
- Guenther, K., Heinke, V., Thiele B., Kleist, E., Prast, H. y Raecker, T. (2002). Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environmental Science and Technology*. 36 (8): 1676 – 1680.
- Guzmán, V. E. (2004). "V. Las pruebas ELISA". *Gaceta Médica Mexicana*. Vol. 140, Suplemento No. 3, 2004. p. 48-49.
- Hansen Hao, C.; Zhao, X.; Yang, P. (2007) GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal care products in environmental matrices *Trends in Analytical Chemistry* 26 (4): 569-580.
- Hanami, T., Delobel, D., Kanamori, H., Tanaka, Y., Kimura, Y., Nakasone, A., y Harbers, M. (2013). Eprobe mediated real-time PCR monitoring and melting curve analysis. *PloS one*, 8(8), e70942.
- Harper C. y Laurence C., (2011). *The laboratory ZEBRAFISH*. Taylor and Francis Group LLC. 274.

- Herrero, R. M. J. (2007). Ritmos de actividad motora, comportamiento alimentario e influencia de la melatonina exógena en peces teleósteos. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G.I., Korsgaard, B., Pedersen, K.L., Bjerregard, P. 2001. Development of an ELISA for Vitellogenin in Whole Body Homogenate of Zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 130, 119–131.
- Hurd, T., y Kuznetsov, A. (2006). Fast CDO computations in the affine Markov chain model. Department of Mathematics and Statistics. McMaster University. Pp. 26.
- Hutchinson, T., Ankley, G.T., Segner, H., Tyler, C.R., 2006. Screening and Testing for Endocrine Disruption in fish—Biomarkers as “Signposts” not “Traffic Lights” in Risk Assessment. *Environ. Health Perspect.* 114 (supplement 1), 106–114.
- Islinger, M., Willimski, D., Völkl, A., Braunbeck, T. 2003. Effects of 17 α -ethinylestradiol on the Expression of Three Estrogen-Responsive Genes and Cellular Ultrastructure of Liver and Testes in Male Zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 62, 85–103.
- Kai-Erik, U., Eivind, L., Kjell Birger, Ø., Mari, M., y Bjørnstad-Hjelle, A. (2010). Ecotoxicology goes MudPIT? *Marine Environmental Research*, S34–S36.
- Keel, M. K. (2012). Tesis: Disruptores Endocrinos. Efectos en peces *Pimephales promelas*. Universidad de la República. Argentina.
- Kurihara, R., Watanabe, E., Ueda, Y., Kakuno, A., Fujii, K., Shiraishi, F., y Hashimoto, S. (2007). Estrogenic Activity in Sediments Contaminated by Nonylphenol in Tokyo Bay (Japan) Evaluated by Vitellogenin Induction in Male Mummichogs (*Fundulus heteroclitus*). *Marine pollution bulletin*, 54(9), 1315-1320.
- Länge, R., Hutchinson, T.H., Croudace, C.P., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P., Panter, G.H., Sumpter, J.P. 2001. Effects of the Synthetic Estrogen 17 α -ethinylestradiol on the Life Cycle of the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1216–1227.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldua, D., Martin, R., y Porte, C. (2004). First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology Applied Pharmacological*, 196. 247 – 257.
- Liu, C., Du, Y., & Zhou, B. (2007). Evaluation of estrogenic activities and mechanism of action of perfluorinated chemicals determined by vitellogenin induction in primary cultured tilapia hepatocytes. *Aquatic toxicology*, 85(4), 267-277.
- López, O. J. F., Madrid, J. A., Y Sánchez, V. F. J. (2006). Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144(2), 180-187.
- López, C. P. (2001). Estadística práctica con STATGRAPHICS®. Manejo Eficiente del Tiempo, 4.

- Lozada J, Palmeros B, Ramírez M, Fernández M. (2012). El pez cebrá: una especie modelo. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*. Volumen XXV, Número 1, p.10.
- Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A., 2004. Real-time Fluorescent PCR Techniques to Study Microbial–Host Interactions. *Methods in Microbiology* 34: 255–33.
- MacPhail RC, Brooks J, Hunter DL, Padnos B, Irons TD, Padilla S. (2009). Locomotion in larval zebrafish: influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology*; 30: 52–8.
- Martínez, V. C., y Gómez, A. S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(4), 185-200.
- Mèige C., Choubert, J., Ribeiro, M. L., Eusèbe, M., y Coquery, M. (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results, *Environmental Pollution*, Volume 157, Issue 5, May 2009, p. 1721-1726.
- Mikula, P., y Svobodova, Z. (2006). Brominated Flame Retardants in the Environment: Their Sources and Effects (a review). *Acta Veterinaria Brno*, 75(4), 587-599.
- Moreno, O. V. C., Martínez, N. J. M., Kravzov, J. J., Pérez, H. L. A., Moreno, B. C., y Altagracia, M. M. (2013). Los Medicamentos de Receta de Origen Sintético y su Impacto en el Medio Ambiente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(4), 17-29.
- Mozo, D. R. (2012). Disruptores Endocrinos Nuevas respuestas para nuevos retos. Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS).
- Ng, H. W., Zhang, W., Shu, M., Luo, H., Ge, W., Perkins, R., ... & Hong, H. (2014). Competitive molecular docking approach for predicting estrogen receptor subtype α agonists and antagonists. *BMC bioinformatics*, 15(11), 1.
- Nagel, R. (2001). DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. *Altex*, 19, 38-48.
- Nakari, T., Erkomaa, K., 2003. Effects of Phytosterols on Zebrafish Reproduction in Multigeneration test. *Environ. Pollut.* 123, 267–273.
- Nash, J.P., Kime, D. E., van der Ven, L.T., Wester, P. W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmid-Allner, P., Tyler, C. R. 2004. Long-term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Zebrafish. *Environ. Health Perspect.* 112, 1725–1733.
- Nassef, M., Matsumoto, S., Seki, M., Khalil, F., Kang, I. J., Shimasaki, Y., y Honjo, T. (2010). Acute Effects of Triclosan, Diclofenac and Carbamazepine on Feeding Performance of Japanese Medaka Fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 80(9), 1095-1100.

- Nilsen, B. M., Berg, K., Eidem, J. K., Kristiansen, S. I., Brion, F., Porcher, J. M., y Goksøyr, A. (2004). Development of Quantitative Vitellogenin-ELISAs for Fish Test Species Used in Endocrine Disruptor Screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(3), 621-633.
- Nilsen, B., Berg, K., Eidem, J. K., Kristiansen, S., Brion, F., Porcher, J., Goksoyr, A. (2004). Development of Quantitative Vitellogenin-ELISAs for Fish Test Species Used in Endocrine Disruptor Screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, Issue 3: 621-633.
- Nüber, L. K., Skulovich, O., Hartmann, S., Seiler, T. B., Cofalla, C., Schuettrumpf, H., Hollert, H., Salomons, E., Ostfeld, A. (2016). A sensitive biomarker for the detection of aquatic contamination based on behavioral assays using zebrafish larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 133: 271-280.
- OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. (2012). Fish Toxicity Testing Framework. Environment directorate Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology. Series on Testing and Assessment No. 171.
- OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. (2009). Guideline for the Testing of Chemicals. 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition.
- Örn, S., Yamani, S., Norrgren, L. (2006). Comparison of Vitellogenin Induction, Sex Ratio, and Gonad Morphology Between Zebrafish and Japanese medaka After Exposure to 17 α -ethinylestradiol and 17 β -trenbolone. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 237-243.
- Ortega, C. M. E. y Gómez, D. A. A. (2006). Aplicación del Conocimiento de la Conducta Animal en la Producción Pecuaria. *Interciencia*, 3: 844-848
- Padilla, S., Hunter, D. L., Padnos, B., Frady, S., Macphail, R. C. (2011). Assessing locomotor activity in larval zebrafish: influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicology and Teratology* 33: 624 - 630.
- Papadopoulou, M., G. Karatzas y Bougioukou (2007), "Numerical Modeling of the Environmental Impact of Landfill Leachate Leakage on Groundwater Quality- A Field Application", *Environmental Modeling Assessment*, vol. 12, pp. 43-54.
- Pastor, J., Gutiérrez, M. A., y Hernández, A. J. (2003). Biomarcadores a nivel de una comunidad de pasto y de una población herbácea forrajera para suelos contaminados por cobre. In *Anales de Biología* (No. 25, pp. 103-108).
- Porta, M., Puigdomènecha, E., Ballester, F., Selva, J., Ribas-Fitó, N., Domínguez-Boadae, L., Martín-Olmedog, P., Olea, N., Llop, S., Fernández, M. (2008). Estudios realizados en España sobre concentraciones en humanos de compuestos tóxicos persistentes. *Gaceta Sanitaria*. 22(3): 248-66.
- Prieto Rodríguez Lucía del Pilar. (2013). Tesis Doctoral. Eliminación de contaminantes emergentes presentes en aguas residuales urbanas mediante combinación de

- procesos de depuración biológica y oxidación química. Universidad de Almería. Dpto. de Química y Física. España. Pp. 306.
- Prigent, C., F. Papa, F. Aires, C. Jimenez, W. B. Rossow, and E. Matthews (2012), Changes in land surface water dynamics since the 1990s and relation to population pressure, *Geophys. Res. Lett.*, 39.
- Prüss-Ustün, A., Wolf, J., Corvalán, C., Bos, R., and Neira, M. (2016). Preventing disease through healthy environments: a global assessment of the burden of disease from environmental risks. WHO World Health Organization. Geneva, Switzerland, pag. 176.
- Prüss-Üstün, A. and Corvalán, C. (2006). Ambientes saludables y prevención de enfermedades: hacia una estimación de la carga de morbilidad atribuible al medio ambiente. OMS. Organización Mundial de la Salud. Geneva, Switzerland, pag. 19.
- Repetto, J. (2005). *Toxicología Fundamental*. 4ta. Edición. Madrid. Toxicología fundamental. 4ta. Edición. 2009. Escrito por Manuel Repetto Jiménez, Guillermo Repetto Kuhn
- Rivas, A., Granada, A., Jiménez, M., Olea, F., & Olea, N. (2004). Exposición humana a disruptores endocrinos. *Revista Ecosistemas*, 13(3).
- Rivera-Milla, E., Oidtmann, B., Panagiotidis, C. H., Baier, M., Sklaviadis, T., Hoffmann, R., ... y Málaga-Trillo, E. (2006). Disparate evolution of prion protein domains and the distinct origin of Doppel-and prion-related loci revealed by fish-to-mammal comparisons. *The FASEB journal*, 20(2), 317-319.
- Rocha A., Ruiz S., Coll J.M., (2002). Método sencillo para producir huevos embrionarios de pez cebra. *Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim*, vol. 17 (1-2): 93-102.
- Rodríguez, G. M., y Rodríguez, L. W. (2006). PCR en tiempo real, Métodos fisicoquímicos en Biotecnología.
- Roitt, I. M., Delves, P. J. (2003). *Inmunología, fundamentos*, Editorial Medica Panamericana, Argentina.
- Rojas-Muñoz, A., Miana, A. B., & Belmonte, J. C. I. (2007). El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y ciencia*, (366), 62-69.
- Rose, J., Holbech, H., Lindholst, C., Norum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., Bjerregard, P. 2002. Vitellogenin Induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in Male Zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131, 531–539.
- Ruda González, A. (2006). El daño ecológico puro. La responsabilidad civil por el deterioro del medio ambiente. *Universitat de Girona*.
- Santamarta, J. (2000). Un future sin cloro. *World Watch*; p: 51 - 55
- Santos, L.H.M.L.M; Araújo, A.N.; Fachini, A.; Pena, A.; Deleure-Matos, C.; Montenegro, M.C.B.S.M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 175: 45-95.

- Santos, T., Romano, D., y Gadea. R. (2011). La Contaminación y la Salud. Centre d'Anàlisi i Programes Sanitaris (CAPS). Barcelona. Pag. 108.
- Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H. 2007. Concentration- and time-dependent effects of the Synthetic Estrogen, 17 α -Ethinylestradiol, on Reproductive Capabilities of the Zebrafish, *Danio rerio*. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 70, 768–779.
- Segner, H., Carroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M., Wenzel, A. 2003a. Identification of Endocrine Disrupting Effects in Aquatic Vertebrates and Invertebrates: Report from the European IDEA Project. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302–314.
- Segner, H., Navas, J.M., Schäfers, C., Wenzel, A. 2003b. Potencies of Estrogenic Compounds in in Vitro Screening Assays and in Life Cycle Tests with Zebrafish in vivo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 315–322.
- Sigma-Aldrich Química, S. de R. L. de C.V. (2013). Ficha de datos de seguridad - Carbamazepina. México.
- Sigma-Aldrich Química, S. de R. L. de C.V. (2015). Ficha de datos de seguridad – Nonilfenoles. México.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J. N. (2008). Nonylphenol in the Environment: A Critical Review on Occurrence, Fate, Toxicity and Treatment in Wastewaters. *Environment International* 34. 1033–1049
- Sorensen, F. F., Weeks, J. M., y Baatrup, E. (1997). Altered locomotory behaviour in woodlice (*Oniscus asellus* (L.)) collected at a polluted site. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(4): 685–690.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., y Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13-34.
- Spitsbergen, J. M., & Kent, M. L. (2003). The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research—advantages and current limitations. *Toxicologic pathology*, 31(1 suppl), 62-87.
- Stasinakisa A. S., Gatidou, G., Mamais D., Thomaidis N. S., Lekkas T. D. (2008). Occurrence and fate of endocrine disruptors in Greek sewage treatment plants. *Water Research*. 42: 1796–1804
- Stumpf, M., Ternes, T. A., Wilken, R. D., Rodrigues, S. V., & Baumann, W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of the Total Environment*, 225(1), 135-141.
- UNEP, United Nations Environment Programme. 2014. Basel Convention. Suiza. Pag. 126.
- UNEP, United Nations Environment Programme. 2009. Stockholm Convention. Suecia. Pag. 64.

- Usma Gutiérrez, J. I., Gutiérrez Flórez, O. D., Soto, A. M., & Gil Garzón, M. J. (2013). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos.
- Valencia, I., & Legido, A. (2009). Papel de la monoterapia con nuevos fármacos antiepilépticos en el tratamiento de la epilepsia infantil. *Medicina (Buenos Aires)*, 69(1/1), 101-108.
- Van Coillie R. (2005). Analyse de risques écotoxicologiques (ENV-789). Recueil de notes. Cours d'analyse de risques écotoxicologiques, Centre de formation universitaire en environnement, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, pag. 292.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Van Gossum H, Bots J, Snijkers T, Meyer J, Van Wassenbergh S, De Coen W et al., 2009. Behaviour of damselfly larvae (*Enallagma cyathigerum*) (Insecta, Odonata) after longterm exposure to PFOS. *Environmental Pollution*, 157(4): 1332–1336.
- Vanegas, H. R. (2006). Semiología básica del sistema endocrino. *Semiología médica integral*, 442.
- VanGuilder, H.D., Vrana, K.E., Freeman, W.M., 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 44: 619–626.
- Vargas, M. F. (2005). La Contaminación Ambiental como Factor Detereminante de la Salud. *Revista Española de Salud Pública* 79, 117 – 127.
- Viso, P. F. (2013). Estudio de la Influencia del Fotoperiodo en la Natación de los Guppies (*Poecilia reticulata*). *Anales Universitarios de Etología* 7, 19-25.
- Vörösmarty Charlels, Green P., Salisbury J. Lammers R. (2000): Global Water Resources: Vulnerability from Climate Change and Population Growth. *Science*, 14 July 2000: 289 (5477), 284-288.
- Warne, M. S. J., y Van Dam, R. (2008). NOEC and LOEC data should no longer be generated or used. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 14(1), 1.
- WHO/UNICEF Joint Monitoring Programme for Water Supply and Sanitation. Progress on Sanitation and Drinking-Water: 2013 Update; World Health Organization: Geneva, Switzerland, (2013).
- Xia, J., Niu, C., y Pei, X. (2010). Effects of chronic exposure to nonylphenol on locomotor activity and social behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Environmental Sciences*, 22(9), 1435-1440.
- Xu, H., Yang, J., Wang, J., Jiang, Q., Chen, H., Song, H. 2008. Exposure to 17 α -ethynylestradiol Impairs Reproductive Functions of Both Male and Female Zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 88, 1–8.

Zahir, F., Rizwi, S. J., Haq, S. K., & Khan, R. H. (2005). Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental toxicology and pharmacology*, 20(2), 351-360.

Zhang, Y., Geißen, S. U., Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, 1151–1161.

Redes internacionales de internet:

Biblioteca médica digital, UNAM, 2013. Carbamazepina. (Consulta: marzo 2015)
http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Carbamazepina.htm

SEMARNAT, 2013a. Convenio de Rotterdam. (Consulta: enero 2016)
<http://www.semarnat.gob.mx/temas/agenda-internacional/convenio-de-rotterdam>

IPCS. Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors. 2002. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. 133p. URL: http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/ (Noviembre/2006).

Noldus. Innovative solutions or behavioral research. Animal behaviour. Zebrafish (Danio rerio) larvae activity monitoring. 2016. (Consulta: junio 2016).
<http://www.noldus.com/animal-behavior-research/solutions/research-small-lab-animals/zebrafish-larvae-activity-monitoring->

Price, C.P., 2001, Immunoassay, *Encyclopedia of life sciences*, Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net

Rodkey, L.S., Nisonoff, A., 2001, Haptens, *Encyclopedia of life sciences*, Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group/www.els.net

SEMARNAT, 2013b. Convenio de Basilea. (Consulta: enero 2016)
<http://www.semarnat.gob.mx/temas/agenda-internacional/convenio-de-basilea>

SEMARNAT, 2013c. Convenio de Estocolmo. (Consulta: enero 2016)
<http://www.semarnat.gob.mx/temas/agenda-internacional/convenio-de-estocolmo>