

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

**PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**USO DE BIOMARCADORES EN PECES COMO HERRAMIENTA PARA EVALUAR
LA EXPOSICIÓN Y EFECTO DE CONTAMINANTES AMBIENTALES EN CUERPOS
DE AGUA**

PRESENTA:

HUGO MEDINA GARZA

DIRECTOR DE TESIS:

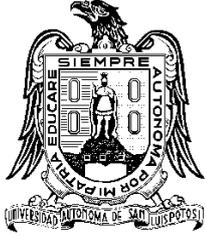
DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA

ASESORES:

DR. GUILLERMO ESPINOSA REYES

DRA. MA. CATALINA ALFARO DE LA TORRE

Diciembre de 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**USO DE BIOMARCADORES EN PECES COMO HERRAMIENTA PARA EVALUAR
LA EXPOSICIÓN Y EFECTO DE CONTAMINANTES AMBIENTALES EN CUERPOS
DE AGUA**

PRESENTA:

HUGO MEDINA GARZA

COMITÉ TUTELAR:

DIRECTOR: DR. JOSÉ DE JESÚS MEJÍA SAAVEDRA _____

ASESOR: DR. GUILLERMO ESPINOSA REYES _____

ASESOR: DRA. MA. CATALINA ALFARO DE LA TORRE _____

SINODALES:

PRESIDENTE: DRA. MA. CATALINA ALFARO DE LA TORRE _____

SECRETARIO: DR. GUILLERMO ESPINOSA REYES _____

VOCAL: DR. CÉSAR ILIZALITURRI HERNÁNDEZ _____

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN:

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA AMBIENTAL DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.**

Y

CIACYT-MEDICINA

CON FINANCIAMIENTO DE:

CONACYT-SEMARNAT

A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:

**PECES DIABLO: DISTRIBUCIÓN ACTUAL, POTENCIAL DE DISPERSIÓN E IMPACTOS EN LOS
ECOSISTEMAS ACUÁTICOS MEXICANOS**

CONVENIO: 108334

AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS

Becario No. 247898

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

DEDICATORIA

A mis Padres

Ella, mujer incansable, fuerte y que siempre logra lo que se propone, tan llena de amor para cada uno de sus hijos y sacrificándose siempre por ellos. Tuviste, junto con mi papá, una de las tareas más difíciles que cualquiera pueda tener: hacer de tres chicos tan diferentes entre sí, en una época y un lugar tan complicado, hombres de bien, y sabes algo, **LO LOGRARON!!!**

El, un hombre justo, recto, amante de la lectura y que es capaz de pelear las batallas de los más débiles, un hombre que siempre está allí cuando lo necesitan, un hombre que nunca se deja vencer, un hombre que no educa con palabras, sino con el ejemplo, un hombre como el que quiero llegar a ser.

A mis Hermanos

A ti, **Dr. Francisco Javier**, por nunca rendirte, por no dejarte vencer por las limitaciones, por no tomar el camino corto, por luchar por tu sueño y cumplirlo. Siempre has sido un ejemplo a seguir.

A ti, futuro Ing. **José Alfredo**, por seguir adelante, porque a pesar de los tropiezos sigues en pie, sabes que el camino no es fácil, y te garantizo algo: en ocasiones se pondrá peor, y nunca termina, pero el secreto está en saber disfrutar cada uno de tus pasos.

A Bety

Compañera de vida. Por permitirme compartir contigo la, hasta hoy, mejor etapa de mi vida, por compartir mis sueños, mis logros, mis alegrías, mis tristezas; por tolerar mis malos ratos, mis enojos, mis frustraciones; por tu amor, tus consejos, tu paciencia y apoyo incondicional; por no dejarme caer, y por levantarme cuando caía, por darme esas "sacudidas" dolorosas, pero necesarias, porque sin tu ayuda esto no hubiera sido posible. ¡¡LO LOGRAMOS AMOR!! Vamos por lo que sigue.

Hugo Medina Garza.

AGRADECIMIENTOS

A los Programas Multidisciplinarios de Posgrado en Ciencias Ambientales, por permitirme realizar mis estudios de maestría, en especial a los profesores que compartieron su experiencia a través de las clases.

A la Facultad de Medicina y el Laboratorio de Toxicología Ambiental, lugar donde realicé el análisis de muestras.

A mi Director de Tesis, Dr. Jesús Mejía, por su guía, dirección, apoyo y confianza a lo largo de estos dos años cuatro meses.

A mis asesores, Dr. Guillermo Espinosa y Dra. Ma Catalina Alfaro, por sus aportaciones y consejos para hacer de esto un buen trabajo y contribuir en mi formación.

Al Dr. César Ilizaliturri, por aceptar participar como sinodal y por las valiosas aportaciones realizadas a este trabajo, además del apoyo brindado en los muestreos.

A Bety, compañera de aventuras, por tu amor, paciencia (mucho paciencia) y apoyo, gracias por no dejarme caer y por levantarme las veces en que lo hice. Sin ti esto no hubiera sido posible.

A mis padres y hermanos, por su apoyo y estar ahí siempre que los necesito, por la confianza brindada.

Al M.C. Darío Gaytán, por su disposición y paciencia en las asesorías en la parte estadística.

A los Lic. En Bioquímica Ángel Montes y Néstor Ríos, por el apoyo brindado tanto en los muestreos como en el análisis de las muestras.

A mis compañeros de generación del PMPCA, con quienes compartimos más momentos frustrantes que alegrías: Alejandra, Mariana, Lili, Flor, Amaranta, Joab, Ricardo.

A Lorena, Laura y Farah, de la Agenda Ambiental, por su ayuda en los trámites realizados tanto en la Agenda como ante CONACYT, chicas, no sé que hubiéramos hecho los alumnos sin su valiosísimo apoyo. GRACIAS

A todos aquellos que omití, sin intención claro, y que contribuyeron de manera importante para lograr este resultado.

GRACIAS.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE DE CUADROS	2
INDICE DE FIGURAS	2
RESUMEN	4
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 La Pesca y la Acuicultura en México	5
1.2 Ecosistemas acuáticos.....	6
1.3 Contaminantes Disruptores Endocrinos.....	9
1.4 Contaminantes Genotóxicos	11
1.5 Bioindicadores	13
1.5.1 <i>Biología del Género Oreochromis</i>	15
1.6 Biomarcadores	17
1.6.1 <i>Vitelogenina</i>	20
1.6.2 <i>Micronúcleos</i>	25
1.6.3 <i>Ensayo cometa</i>	27
CAPITULO 2. ANTECEDENTES DE LOS SITIOS DE ESTUDIO.....	28
2.1 Los Ríos Santiago y Verde	28
2.2 Presas Miguel Hidalgo y Aguamilpa – Solidaridad.....	30
CAPITULO 3. JUSTIFICACIÓN	33
CAPITULO 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
4.1 HIPOTESIS.....	33
4.2 OBJETIVO GENERAL.....	34
4.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS	34
CAPITULO 5. METODOLOGÍA.....	34
5.1 Área de estudio	34
5.2 Biomarcadores de efecto.....	37
5.2.1 <i>Vitelogenina</i>	37
5.2.2 <i>Micronúcleos</i>	38
5.2.3 <i>Ensayo cometa</i>	38
5.3 Análisis estadístico	39
CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
6.1 Vitelogenina.....	40
6.2 Micronúcleos	43
6.3 Ensayo cometa	46
CAPITULO 7. CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	68

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Algunos constituyentes de las aguas residuales procedentes del alcantarillado de una ciudad.....	8
Cuadro 2. Ventajas y limitaciones de los biomarcadores.....	19
Cuadro 3. Índice de Calidad del Agua (ICA) de los afluentes de la cuenca del Río Verde.....	30
Cuadro 4. Contenido de As en Peces de la Presa Aguamilpa - Solidaridad.	32
Cuadro 5. Concentraciones de vitelogenina en plasma de peces de los sitios de estudio. Los valores representan medias \pm Desviación Estándar.....	41
Cuadro 6. Frecuencia de MN en peces de los sitios de estudio. Los valores representan medias \pm Desviación estándar.	45
Cuadro 7. OTM, TL y As en agua y sedimento de los sitios de los sitios de estudio. Los valores de OTM y TL representan medias \pm SD. Los valores de As representan medias \pm Desviación estándar.....	47
Cuadro 8. Valores de As encontrados en los sitios de estudio.....	52
Cuadro 9. Porcentaje de organismos categorizados según el tipo de daño (MN).....	52
Cuadro 10. Porcentaje de organismos categorizados según el tipo de daño (Ensayo cometa, TL).....	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Entrada de contaminantes en ambientes acuáticos enfatizando la acumulación en peces.	14
Figura 2. Vitelogénesis en peces. La línea continua indica la inducción normal de vitelogenina en hembras. Estrógeno endógeno es producido en el ovario bajo el estímulo de FSH/LH; entra a la circulación e induce la síntesis de vitelogenina. Las líneas punteadas muestran las vías de exposición a estrógenos exógenos.....	21
Figura 3. Esquema de la inducción normal de vitelogenina en hembras de peces. Una vez sintetizada en el hígado en respuesta a estrógenos endógenos, la vitelogenina es transportada al ovario donde es incorporada dentro de los ovocitos. Fuente: Wheeler <i>et al</i> , 2005.	22
Figura 4. Sitios de estudio. La elección de estos sitios responde a diferentes características de cada uno de ellos: la Presa Miguel Hidalgo recibe escorrentía agrícola, la Presa Aguamilpa es depósito del Río Santiago, y los Ríos Santiago y Verde reciben descargas industriales y domésticas.	35
Figura 5. Sitios de muestreo en los Ríos Santiago y Verde. El sitio de Arcediano y El Salto pertenecen al Río Santiago, Purgatorio pertenece al Río Verde.....	36
Figura 6. Presa Miguel Hidalgo, Estado de Sinaloa. Este embalse es receptor de escorrentía agrícola.	36
Figura 7. Presa Aguamilpa - Solidaridad, Estado de Nayarit. Este embalse es receptor del Río Santiago y Río Huaynamota.	37
Figura 8. Valores de vitelogenina en peces de los sitios de estudio. Las cajas representan la mediana y los percentiles 25 y 75. Las barras representan valores mínimos y máximos El análisis estadístico muestra diferencia significativa ($p < 0.05$).	42
Figura 9. Frecuencia de MN en peces de cada sitio estudiado. A pesar de no haber diferencia significativa entre los sitios, la Presa M. Hidalgo presenta los valores máximos de frecuencia de MN. Las cajas representan la mediana y los percentiles 25 y 75. Las barras representan	

valores mínimos y máximos El análisis estadístico no muestra diferencia significativa ($p>0.05$).46

Figura 10. Longitud de la cola del cometa (TL) de los peces de los sitios de estudio. La mediana y los valores máximos de la Presa Miguel Hidalgo son mayores al resto de los sitios, lo que nos indica mayor cantidad de contaminantes genotóxicos en ese embalse. Las cajas representan la mediana y los percentiles 25 y 75. Las barras representan valores mínimos y máximos El análisis estadístico muestra diferencia significativa.48

Figura 11. OTM de los peces de los sitios de estudio. La mediana y los valores máximos de la Presa Miguel Hidalgo son mayores al resto de los sitios, lo que nos indica mayor cantidad de contaminantes genotóxicos en ese embalse. Las cajas representan la mediana y los percentiles 25 y 75. Las barras representan valores mínimos y máximos El análisis estadístico muestra diferencia significativa ($p<0.05$).49

Figura 12. Relación entre As en agua y MN. El análisis de χ^2 no muestra asociación entre estas dos variables ($p>0.05$). Las barras representan media \pm Desviación estándar de cada sitio.53

Figura 13. Relación entre As en agua y Longitud de la cola (TL) y el momento (OTM) del cometa. El análisis de χ^2 muestra asociación entre estas dos variables ($p<0.05$). Las barras representan media \pm Desviación estándar de cada sitio.55

RESUMEN

Los ecosistemas acuáticos son altamente vulnerables por su tendencia a acumular concentraciones altas de contaminantes provenientes de los ecosistemas terrestres a su alrededor. En la naturaleza, el agua puede encontrarse en distintos reservorios. En este estudio nos centraremos en dos: los ríos y las presas. El Río Santiago es el colector principal de la cuenca Lerma-Chapala-Santiago desde el Lago de Chapala hasta su desembocadura en el Océano Pacífico. El Río Verde es de los principales afluentes del Río Santiago, nace en el estado de Zacatecas, atraviesa Aguascalientes y algunas localidades de Jalisco hasta su confluencia con el Río Santiago. La Presa Miguel Hidalgo (El Mahone) se encuentra ubicada en el Municipio de El Fuerte, en el Estado de Sinaloa, y el uso que se le da es para la generación de energía eléctrica y la irrigación. La Presa Aguamilpa - Solidaridad se encuentra 305 km aguas abajo de la ciudad de Guadalajara. Este depósito es parte del sistema hidrológico Santiago-Aguamilpa y Huaynamota y ocupa aproximadamente 60 km a lo largo del Río Santiago y 25 km a lo largo del Río Huaynamota. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de contaminantes ambientales en peces (*Tilapia: Oreochromis* sp) mediante el uso de biomarcadores en los Ríos Santiago y Verde y las Presas Miguel Hidalgo y Aguamilpa - Solidaridad. Los biomarcadores evaluados fueron: fragmentación del material genético mediante el ensayo cometa y micronúcleos en sangre periférica para evaluar la exposición a agentes genotóxicos, y Vitelogenina medida como fósforo en plasma para evaluar la exposición a disruptores endocrinos. Todos los datos fueron analizados con el software STATISTICA 8.0. Los resultados de vitelogenina y ensayo cometa muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) entre cada sitio, no así los micronúcleos ($p > 0.05$). Adicionalmente se realizó una prueba de independencia de Chi cuadrado (X^2) para asociar las variables de Arsénico, con los biomarcadores de micronúcleos y ensayo cometa, ya que este elemento es caracterizado por su potencial genotóxico. Dicho análisis muestra una asociación entre este elemento y los biomarcadores de daño genético ($p < 0.05$). No es posible asociar a un solo agente químico en los sitios evaluados que cause alteración endocrina o daño al ADN. Sin embargo es bien reconocido que una combinación de efectos sinérgicos puede causar este tipo de daños. Este estudio puede ser la base para que estudios posteriores puedan desarrollar una batería de biomarcadores que permitan evaluar efectos subletales de exposición a mezclas complejas de contaminantes en cuerpos de agua.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 La Pesca y la Acuicultura en México

La pesca y la acuicultura realizan contribuciones importantes al bienestar y la prosperidad mundiales. En los últimos 50 años, el suministro mundial de productos pesqueros destinados al consumo humano ha superado el crecimiento de la población mundial; actualmente, el pescado constituye una fuente esencial de alimentos nutritivos y proteínas animales para gran parte de la población mundial. Además, el sector proporciona medios de vida e ingresos, tanto directa como indirectamente, a una parte considerable de la población mundial.

El pescado y los productos pesqueros se encuentran entre los productos alimenticios más comercializados a nivel mundial, con un volumen de comercio por un valor que alcanzó nuevos máximos en 2011, y se espera que siga una tendencia alcista en que los países en desarrollo sigan representando la mayor parte de las exportaciones mundiales. Si bien la producción de la pesca de captura se mantiene estable, la producción acuícola sigue creciendo.

Cada vez se comprende y aprecia más la importancia de la pesca en pequeña escala para la seguridad alimentaria y la reducción y prevención de la pobreza en el mundo en desarrollo. Sin embargo, la falta de capacidad institucional y la no inclusión del sector en las políticas nacionales y regionales de desarrollo siguen obstaculizando las posibles contribuciones de la pesca artesanal al crecimiento económico, la reducción de la pobreza y el desarrollo rural. Según las últimas cifras, los medios de vida de unos 357 millones de personas dependen directamente de la pesca en pequeña escala, que da empleo a más del 90 % de los pescadores de captura del mundo.

La pesca en México constituye una fuente importante de alimentos no sólo a nivel nacional sino también a nivel mundial, así como el apoyo en la generación de empleos, recreación, comercio y bienestar económico para el país, tomando en cuenta que ha sido una actividad muy productiva en el pasado, con un adecuado ordenamiento y legislación siendo útil para generaciones presentes y con los principios de sostenibilidad pensando en las generaciones futuras.

Durante muchos años en México, la pesca se consideró una actividad casi de autoconsumo y la que se comercializaba tenía como su principal destino el mercado de Estados Unidos. A partir de 1970 la actividad comenzó a diversificarse y su desarrollo logró ser notable encontrando un mercado más amplio e inclusive comercializándose dentro del mismo territorio nacional.

A nivel nacional, por su volumen de producción, la mojarra se encuentra posicionada en el lugar número 5 (CONAPESCA, 2011). La población registrada en captura y acuicultura en el 2011 fue de 271,369 personas. Esta especie ha sido la fuente más importante de recursos económicos, sobrepasando las ganancias de las actividades en algunas regiones. Sin embargo, un manejo inadecuado (incluyendo la pesca de individuos juveniles antes de que alcancen su madurez reproductiva y la sobrepesca), así como la contaminación, han conducido a un descenso gradual en la pesquería; un aspecto que agravó esta situación fue la presencia de los plecos (Mendoza *et al.*, 2007). Antes se consideraba que la riqueza de los recursos acuáticos era un don ilimitado de la naturaleza. Sin embargo, el desarrollo de los conocimientos y la evolución dinámica de las pesquerías después de la Segunda Guerra Mundial, han hecho desvanecer este mito para constatar que los recursos acuáticos, aun siendo renovables, son limitados y tienen que someterse a una ordenación adecuada si se desea que su contribución al bienestar nutricional, económico y social de la creciente población mundial sea sostenible (FAO).

1.2 Ecosistemas acuáticos

Los ecosistemas acuáticos son de suma importancia para el desarrollo de la vida, pues proporcionan el hábitat para la fauna y flora acuática, además de que son fuente de alimento y agua. Sin embargo, son altamente vulnerables por su tendencia a acumular contaminantes provenientes de los ecosistemas terrestres a su alrededor, así como de las entradas directas (descargas), por lo que, independientemente de la fuente de la que provengan los contaminantes, los sistemas acuáticos son a menudo depósitos para una gran variedad de contaminantes (Ahmed *et al.*, 2011). La contaminación de estos ambientes puede tener efectos negativos sobre la vida acuática por ejemplo la alteración de la reproducción de estos organismos y la disminución en las poblaciones de las especies, lo que amenaza la seguridad alimentaria y afecta directa o indirectamente a la salud humana. El rápido crecimiento

poblacional aunado a un desarrollo industrial acelerado así como, a los cambios en los estilos de vida, han incrementado la presión sobre los ambientes acuáticos

En México, para la gestión de recursos hídricos, así como para la realización de estudios hidrológicos y de calidad del agua, el país se encuentra dividido en 37 regiones hidrológicas. Una región hidrológica es un área del territorio cuya finalidad es el agrupamiento y sistematización de la información, análisis, diagnósticos, programas y acciones en relación con la ocurrencia del agua en cantidad y calidad, así como su explotación, uso y aprovechamiento. Estas regiones agrupan a las cuencas hidrológicas, definidas como el territorio donde las aguas fluyen hacia el mar a través de una red de cauces (ríos o arroyos) que convergen en un cauce principal, o bien, el territorio donde las aguas forman una unidad autónoma diferenciada de otras, éstas son las unidades mínimas del manejo del agua (CONAGUA, 2011).

En el País el agua es un recurso concesionado, es decir que el gobierno otorga permisos para poder hacer uso de ella, destinando aproximadamente el 76 % de esta a la agricultura, el 14 % al abastecimiento público y el 4 % a la industria autoabastecida, siguiendo este patrón en todas las Regiones Hidrológicas del país (CONAGUA, 2011).

Sin embargo estas mismas actividades pueden ser fuentes de contaminación de los cuerpos de agua, afectando a organismos acuáticos o al ser humano. Las fuentes de contaminación se agrupan en dos tipos: puntuales y no puntuales. En el primer grupo se encuentran aquellas que pueden ser identificables como descargas directas provenientes de industrias, drenajes, plantas de tratamiento, etc., y las no puntuales o difusas que son aquellas que no son identificables como la escorrentía agrícola o urbana (Björklund *et al.*, 2009). Hace algunos años, el foco principal de atención en relación con la contaminación de cursos de agua era la contaminación directa o puntual; sin embargo, en la actualidad existe una creciente preocupación por la contaminación difusa, principalmente desde parcelas agrícolas y escurrimientos urbanos (Cotler, 2010). Aunque se conocen las posibles fuentes de contaminación, la información acerca de esta y la calidad del agua es deficiente en muchos países incluido México, por un inadecuado sistema de monitoreo (Björklund *et al.*, 2009).

En lo que respecta a aguas residuales se generaron en 2008 en México 7.44 km³ de aguas residuales municipales, es decir, las que son manejadas en los sistemas de alcantarillado municipales urbanos y rurales, de las cuales solo se trataron el 35%; mientras que las aguas residuales industriales, que son aquellas descargadas directamente a los cuerpos receptores de propiedad nacional, como es el caso de la industria autoabastecida, se generaron en el mismo año 6.01 km³, tratándose solamente el 18% (CONAGUA, 2011; SEMARNAT, 2010).

Las aguas residuales reciben entre otros contaminantes, compuestos farmacéuticos y sus productos de degradación parcial, a consecuencia del uso humano y al ser desechados cuando caducan. Las cantidades de estas sustancias en las aguas residuales en los países desarrollados pueden alcanzar del orden de 100 toneladas métricas por año (Manahan, 2007). En el Cuadro 1 se presentan los constituyentes primarios de las aguas residuales de una ciudad.

Cuadro 1. Algunos constituyentes de las aguas residuales procedentes del alcantarillado de una ciudad.

Constituyente	Fuentes potenciales	Efectos en el agua
Sustancias que demandan oxígeno	Mayormente materiales orgánicos, particularmente heces humanas	Eutrofización
Compuestos orgánicos refractarios	Desechos industriales, productos domésticos	Tóxicos para la vida acuática
Virus	Desechos humanos	Causan enfermedades
Detergentes	Detergentes domésticos	Estética. Impiden la remoción de grasas y aceites. Tóxicos para la vida acuática
Fosfatos	Detergentes	Nutrientes
Grasas y aceites	Cocina, procesado o procesamiento de alimentos, desechos industriales	Contaminación visual, dañinos para algunas formas de vida acuática
Sales	Desechos humanos, ablandadores de agua, desechos industriales	Incrementan la salinidad del agua
Metales pesados	Desechos industriales, laboratorios químicos	Tóxicos para la vida acuática
Agentes quelantes	Algunos detergentes, desechos industriales	Solubilización y transporte de metales pesados
Sólidos	Todas las fuentes	Contaminación visual, dañinos para la vida acuática

Fuente: Manahan, 2007.

En general los contaminantes son la principal causa de degradación de la calidad del agua alrededor del mundo (Björklund *et al.*, 2009). De toda la lista de estas sustancias, la mayor preocupación se centra en la presencia de contaminantes químicos procedentes de fuentes industriales, agrícolas y de la escorrentía urbana (Manahan, 2007). Dentro de los

contaminantes químicos existen dos grupos que son de especial interés: los Disruptores endocrinos y los Genotóxicos, los primeros por tener la capacidad de alterar el sistema endocrino de los organismos y los segundos por su capacidad para interactuar con el ADN de las células; con todas las implicaciones ecológicas que esto representa (como alteraciones reproductivas y disminución de las poblaciones).

1.3 Contaminantes Disruptores Endocrinos

Son compuestos químicos con actividad hormonal que son capaces de alterar la homeostasis del sistema endocrino de los organismos, dando lugar a efectos adversos sobre la salud, crecimiento, desarrollo y reproducción de los individuos, de su progenie o de las poblaciones que constituyen ejerciendo su efecto sobre el sistema endocrino (Ankley *et al.*, 1998; Rivas *et al.*, 2004; Oropesa, 2008).

Se clasifican en distintos grupos atendiendo a sus mecanismos de acción (Gillesby y Zacharewski, 1997; Navas, 2004; Wheeler *et al.*, 2005):

- Disruptores endocrinos que mimetizan la acción de las hormonas esteroideas, pudiendo causar dos tipos de efectos:
 - a) Efecto estrogénico: originado por sustancias que activan el receptor de estrógenos induciendo la expresión de genes dependientes de estrógenos. En el caso de los peces y las aves uno de estos genes es el de la vitelogenina.
 - b) Efecto androgénico: producido por sustancias que imitan la acción de los andrógenos en sus células diana, uniéndose al receptor de andrógenos y activándolo.

- Disruptores endocrinos que antagonizan la acción de las hormonas esteroideas, pudiendo causar dos tipos de efectos:
 - a) Efecto antiestrogénico: ejercido por sustancias que se unen al receptor de estrógenos bloqueándolo, de modo que los compuestos estrogénicos no pueden llegar a unirse a dicho receptor y no lo activan.
 - b) Efecto antiandrogénico: motivado por tóxicos que se unen al receptor de andrógenos impidiendo que los andrógenos naturales lo activen.

- Disruptores endocrinos que interactúan con la acción de las hormonas tiroideas a través de dos mecanismos distintos:

a) Bloqueo directo de los receptores implicados en la acción de esas hormonas.

b) Inhibición competitiva de la transtiretina, proteína implicada en el transporte de las hormonas tiroideas.

La problemática ambiental que ocasionan estos compuestos radica en que ejercen sus efectos a concentraciones del orden de ng/l que son más bajas que las concentraciones a las que se suelen detectar empleando equipos analíticos sofisticados y dotados de gran sensibilidad (Oropesa, 2008).

El grupo de compuestos disruptores endocrinos de origen humano es más amplio y variado englobando desde compuestos estrogénicos sintéticos hasta plaguicidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas y molusquicidas) de uso doméstico o agrícola y sustancias de origen industrial (Oropesa, 2008), así como sustancias que se encuentran de manera natural en los alimentos (Rivas *et al.*, 2004).

La exposición a químicos con capacidad de alterar el sistema endocrino ha sido asociada con alteraciones del estado endocrino en numerosas especies de peces (Jobling *et al.*, 1993; Folmar *et al.*, 1996; Folmar *et al.*, 2000; Folmar *et al.*, 2001; Jobling *et al.*, 2002).

La exposición a disruptores endocrinos en el ambiente ha mostrado que altera el desarrollo fenotípico normal y reduce el éxito de fertilización en peces. La exposición a potentes esteroides sexuales antes de la diferenciación sexual puede causar reversión sexual. Además de la reversión de género causada por la exposición a 17 α etinilestradiol (EE2), efectos deleteros en la reproducción pueden ocurrir si peces sexualmente maduros son expuestos a EE2. Estudios en pez cebra y trucha arcoíris han demostrado un decremento en la fertilidad de esas especies expuestas por corto tiempo a concentraciones de 5 ng/L (Schultz, 2002). La exposición a Bifenilos policlorados puede alterar la relación de sexos y causar graves anomalías gonadales en hembras juveniles de Trucha arcoíris (Baker *et al.*, 1997) lo que puede traer como consecuencia una disminución en la población y, en caso extremo, la desaparición de la especie.

Estas sustancias pueden contaminar los cursos de agua por diferentes rutas (Oropesa, 2008):

a) Descarga directa de efluentes procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales que contienen productos farmacéuticos y químicos utilizados a nivel doméstico, agrícola o industrial. Estos efluentes constituyen la fuente más importante de contaminación por estrógenos de los ambientes acuáticos.

b) Descarga indirecta a través de aguas de escorrentía o lixiviación que transportan compuestos disruptores endocrinos procedentes de lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales que fueron aplicados a suelos agrícolas como fertilizantes.

1.4 Contaminantes Genotóxicos

Son cualquier agente que actúe directa o indirectamente sobre el ADN y que produzca efectos detectables, como alteraciones genéticas que puedan llevar a mutaciones, a concentraciones subtóxicas (Van Ngan *et al.*, 2007). Es decir, un compuesto es considerado genotóxico si induce daño genético a concentraciones que no son tóxicas o que están asociadas con un bajo grado de toxicidad. Bajo este término se incluyen los agentes que interactúan directa o indirectamente con el ADN provocando el aumento de mutaciones (mutagénesis), también los que interfieren en algunos procesos enzimáticos así como en la reparación o en la génesis del material proteico involucrado en la segregación cromosómica. Es importante señalar que los compuestos genotóxicos afectan con mayor frecuencia a las células normales que proliferan rápidamente como son las células epiteliales y de médula ósea, por lo tanto, existe un gran número de células susceptibles a estos efectos dañinos (Rodríguez Arnaiz, 2003).

Se han valorado alrededor de 10,000 sustancias químicas y los resultados indican que cerca de 1,000 son genotóxicas, entre los que se incluyen a los plaguicidas, metales, los aditivos de los alimentos y los derivados de la combustión incompleta de productos energéticos, como el carbón y las gasolinas (Rodríguez Arnaiz, 2003). Estos contaminantes son de gran preocupación para el humano ya que la exposición del hombre a los agentes mutagénicos pueden causar el incremento en el grado de mutación de las células germinales (óvulos, espermatozoides y sus precursores) lo que puede provocar el aumento de la incidencia

de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Además de que, existe una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades crónico-degenerativas. Tercero, el origen ambiental del cáncer (Arencibia y Rosario, 2009).

Los plaguicidas organoclorados y organofosforados pueden provocar algún tipo de modificación en la información genética y se ha establecido una correlación positiva entre los individuos expuestos a éstos ya sea de forma ocupacional, o accidental y el incremento del riesgo de padecer cáncer (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007).

Dentro de los metales el cromo hexavalente (Cr VI) proveniente de emisiones industriales (López *et al.*, 2001) como la industria de cromados, manufactura de pigmentos, colorantes, curtido de pieles, en la preparación de antisépticos, en la limpieza de material de vidrio de laboratorio, como agente valorante, entre otros (Prieto *et al.*, 2008).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés) derivados poliméricos de benceno son contaminantes tóxicos ampliamente distribuidos en el ambiente. Dependiendo de la estructura química y el nivel de exposición, los PAHs y sus metabolitos pueden causar efectos tóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos en peces y otros vertebrados, incluyendo el ser humano (Reis-Henriques *et al.*, 2009). Estos compuestos se forman durante la combustión incompleta del petróleo y sus derivados (Albers, 1995). Las principales fuentes de estos contaminantes son automóviles, aviones, barcos, plantas de generación de energía eléctrica, incineradoras de residuos, calefacciones de edificios, humo del tabaco, etc. (Environmental Health Criteria, 1998). Algunos estrógenos como el 17 β -estradiol también pueden causar daño genotóxico (Sponchiado *et al.*, 2011)

Evaluar el impacto de la contaminación de origen humano en una población puede ser difícil por diferencias en la biodisponibilidad de contaminantes y las diferentes interacciones bioquímicas y toxicológicas que pueden existir entre ellos (Fasulo *et al.*, 2010). Por lo que los organismos de vida silvestre pueden ser usados para revelar la presencia de contaminación ambiental y representan un buen modelo para realizar estudios de exposición y efecto a diferentes contaminantes o a mezclas de ellos, ya que las mezclas de tóxicos generan respuestas a cada uno de los grupos de contaminantes presentes en ellas (McKim y Lien,

2001); y nos pueden dar una idea del riesgo en que se encuentran los organismos en su hábitat natural o en sitios potencialmente contaminados (Espinosa-Reyes, 2009).

1.5 Bioindicadores

Un bioindicador es un organismo o poblaciones de organismos que pueden responder a la contaminación ambiental mediante alteraciones en su fisiología o a través de su capacidad para acumular contaminantes, estos pueden ofrecer información sobre los riesgos para otros organismos, ecosistemas y el hombre (Pignata, 2003).

Para la biota dado el gran número de especies susceptibles al riesgo la selección de la especie crítica es un punto clave, por lo que se deben seleccionar de acuerdo a los siguientes criterios: fácil captura y manipulación, biología conocida, amplia distribución geográfica, ciclo de vida corto y conocido, posición en la red trófica, estatus de conservación y carisma (Bozo *et al.*, 2007).

Los peces son comúnmente utilizados para el biomonitoreo de contaminantes en ecosistemas acuáticos, ya que son los vertebrados acuáticos que bioacumulan sustancias tóxicas, a través de la ingesta de sedimentos o alimentos contaminados (Reis-Henriques *et al.*, 2009), tienen una amplia distribución, aunado a la diversidad e importancia que tienen en estos ambientes, ocupan diferentes niveles tróficos y están en contacto directo con los contaminantes (Osman *et al.*, 2012). Se ha visto que responden con gran sensibilidad a cambios en el ambiente acuático y a bajas concentraciones de contaminantes ambientales (Hafez, 2009). Son especialmente sensibles a estrógenos exógenos (Wheeler *et al.*, 2005).

Estos organismos constituyen parte de la dieta de mamíferos acuáticos y aves, al igual que proporcionan una importante fuente de proteínas en la dieta humana (Oropesa, 2008). La toxicidad de los peces es la culminación de una serie de eventos relacionados con diversos procesos físicos, químicos y biológicos. Como se mencionó en párrafos anteriores los productos químicos que entran al ecosistema acuático provienen de diversas fuentes: efluentes industriales, deposición atmosférica, escorrentía; estos se distribuyen a lo largo de la columna de agua y sedimento, contaminando el alimento de los peces y a ellos mismos a través del contacto con el agua y el sedimento (Figura 1) (Mount y Henry, 2008).

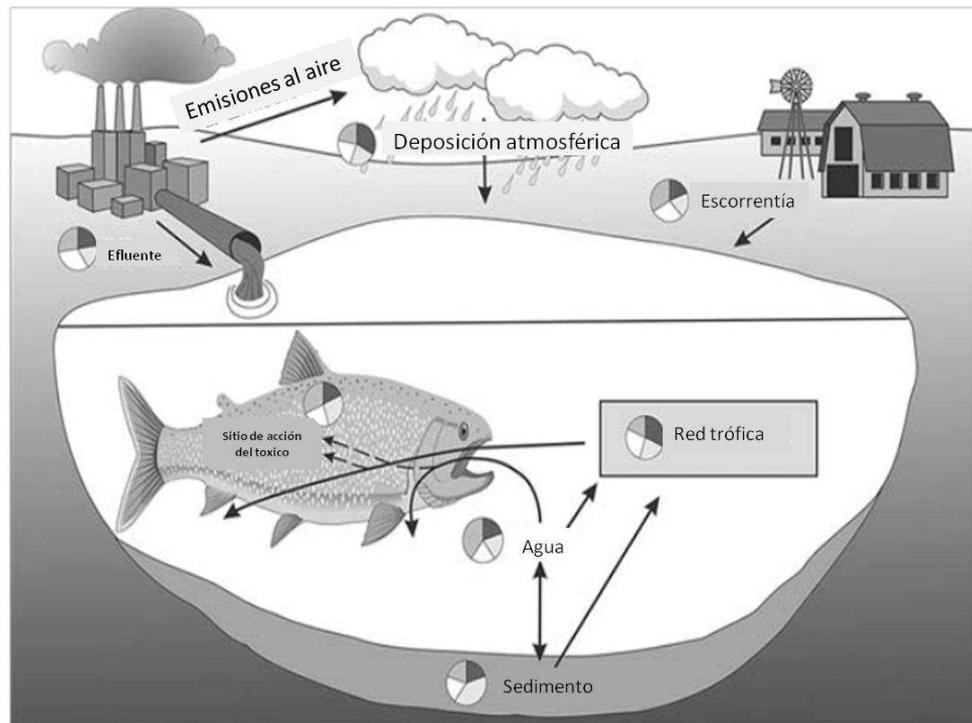


Figura 1. Entrada de contaminantes en ambientes acuáticos enfatizando la acumulación en peces.
Fuente: Erickson *et al.*, 2007

Específicamente la Tilapia (*Oreochromis sp*) es una especie de amplia distribución geográfica, posee una gran capacidad de adaptación, lo que le ha permitido colonizar hábitats muy diversos, en México es de alta importancia comercial, son de ambiente bentopelágico, tolerantes a bajas temperaturas y amplio rango de salinidad, omnívoro (se alimenta generalmente de zooplankton y fitoplancton) (González-Mille, 2010). Se encuentra en la mayoría de los cuerpos de agua dulce y sirve como alimento para el humano, además por sus hábitos alimenticios puede estar en contacto con diversos tipos de contaminantes provenientes de su alimentación y su posición en la red trófica varía de depredador y presa, por lo que es un eslabón importante dentro del ecosistema acuático. Todas estas características hacen a ésta especie idónea para el biomonitoreo, por lo que se utilizó como bioindicador.

La relevancia de los resultados radica en dos aspectos: primera, la Tilapia tiene una amplia distribución geográfica, se encuentra en la mayoría de los cuerpos de agua, lo que nos permitiría comparar distintos sitios mediante la evaluación de este organismo; es una especie de importancia comercial, representando en los sitios de estudio un importante ingreso económico, por lo que una disminución en su población puede traer consecuencias

económicas y alimenticias adversas, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria; representa una fuente de proteínas para el humano y otros organismos, por lo que independientemente de poner en riesgo la seguridad alimentaria al disminuir sus poblaciones, podría representar un riesgo en su consumo para organismos superiores; al ser un organismo tolerante a estrés ambiental, un efecto observable en esta especie nos indicaría que especies más sensibles se verían más afectados, pudiendo estar en riesgo todo el ecosistema acuático.

1.5.1 Biología del Género Oreochromis

Las tilapias son organismos tropicales dulceacuícolas, originarios de África y, debido a su facilidad de adaptación se encuentran actualmente distribuidos en la mayoría de los países tropicales y subtropicales con fines de cultivo (Vega-Villasante et al 2010).

MORFOLOGIA EXTERNA

Presentan cuerpo comprimido; la profundidad del pedúnculo caudal es igual a su longitud. Escamas cicloideas. Protuberancia ausente en la superficie dorsal del hocico. La longitud de la quijada superior no demuestra dimorfismo sexual. El primer arco branquial tiene entre 27 y 33 filamentos branquiales. La línea lateral se interrumpe. Espinas rígidas y blandas continuas en aleta dorsal. Aleta dorsal con 16 o 17 espinas y entre 11 y 15 rayos. La aleta anal tiene 3 espinas y 10 u 11 rayos. Aleta caudal trunca.

Presenta un solo orificio nasal a cada lado de la cabeza, que sirve simultáneamente como entrada y salida de la cavidad nasal. El cuerpo es generalmente comprimido y discoidal, raramente alargado. La boca es generalmente ancha, a menudo bordeada por labios gruesos; las mandíbulas presentan dientes cónicos y en algunas ocasiones incisivos.

Para su locomoción presentan aletas pares e impares. Las aletas pares las constituyen las pectorales y las ventrales; las impares están constituidas por las aletas dorsales, la caudal y la anal. La parte anterior de la aleta dorsal y anal es corta, consta de varias espinas y la parte terminal de radios suaves, disponiendo sus aletas dorsales en forma de cresta.

La aleta caudal es redonda, trunca y raramente cortada, como en todos los peces, esta aleta le sirve para mantener el equilibrio del cuerpo durante la natación y al lanzarse en el agua.

CARACTERES SEXUALES

La diferenciación externa de los sexos se basa en que el macho presenta dos orificios bajo el vientre: el ano y el orificio urogenital, mientras que la hembra posee tres: el ano, el poro genital y el orificio urinario. El ano está siempre bien visible; es un agujero redondo. El orificio urogenital del macho es un pequeño punto. El orificio urinario de la hembra es microscópico, apenas visible a simple vista, mientras que el poro genital se encuentra en una hendidura perpendicular al eje del cuerpo.

HÁBITOS REPRODUCTIVOS DEL GÉNERO *Oreochromis*

Maduran de 2 a 3 meses en estanque y de 6 a 9 meses en ambientes naturales.

Es una especie muy prolífera, a edad temprana y tamaño pequeño. Se reproduce entre 20-25°C. El huevo de mayor tamaño es más eficiente para la eclosión y fecundidad. La madurez sexual se da a los 2 o 3 meses. La luz también influye en la reproducción, el aumento de la iluminación o disminución de 8 horas dificultan la reproducción. Antes de la eclosión los huevos son incubados de 3 a 5 días dentro de la boca de la hembra. Las hembras no se alimentan durante los periodos de incubación y cuidado de las larvas. Las larvas jóvenes (con saco vitelino) permanecen con su madre por un periodo adicional de 5 a 7 días.

HÁBITOS ALIMENTICIOS

El género *Oreochromis* se clasifica como omnívoro, por presentar mayor diversidad en los alimentos que ingiere, variando desde vegetación macroscópica hasta algas unicelulares y bacterias, tendiendo hacia el consumo de zooplancton.

Las tilapias son peces provistos de branqui-espinas con los cuales pueden filtrar el agua para obtener su alimentación. Los alimentos ingeridos pasan a la faringe donde son mecánicamente desintegrados por los dientes faríngeos. Esto ayuda en el proceso de absorción en el intestino, el cual mide de a 10 veces más que la longitud del cuerpo del pez.

REQUERIMIENTOS AMBIENTALES

Los rangos óptimos de temperatura oscilan entre 20 y 30°C, pueden soportar temperaturas menores. A temperaturas menores de 15°C no crecen. Los límites superiores de tolerancia oscilan entre 37-42°C.

Soporta bajas concentraciones de oxígeno disuelto, de aproximadamente 3 mg/L. A niveles inferiores a 1.5 mg/L de oxígeno disuelto dejan de alimentarse.

Los valores óptimos de pH son entre 7 y 8. No pueden tolerar valores menores de 5, pero si resistir valores alcalinos de 11.

Aun cuando se hace uso de especies bioindicadoras, no siempre es posible apreciar el efecto de sustancias tóxicas en los organismos, ya que algunos de estos contaminantes causan daño, como ya se mencionó anteriormente, a nivel genético y endocrino, lo cual no se puede apreciar a simple vista en la especie utilizada. Por tal motivo el uso de biomarcadores es de suma importancia.

1.6 Biomarcadores

Un biomarcador es una respuesta biológica a un químico o químicos que da una medida de la exposición, y algunas veces también del efecto tóxico (Handy *et al.*, 2003).

Los biomarcadores son los cambios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos medibles que se producen en un sistema biológico y se interpretan como reflejo o marcador de la exposición a un agente tóxico (Handy *et al.*, 2003; Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007). El monitoreo ambiental a través de los parámetros de evaluación de biomarcadores en diferentes especies es una herramienta útil. Tiene la ventaja de proporcionar una respuesta cuantitativa, así como valiosa información de relevancia ecológica sobre los efectos crónicos adversos causados por la contaminación del agua (De la Torre *et al.*, 2007).

Las dos características más importantes de los biomarcadores son la identificación de las interacciones entre el contaminante y el organismo, y la medición de efectos sub-letales. Por análisis químico solo puede medirse una fracción de los contaminantes presentes sin

evidenciar los efectos adversos. Los biomarcadores, por su parte, indican la presencia de contaminantes tanto conocidos como no identificados (Bozo *et al.*, 2007).

Aunque algunos de los biomarcadores pueden ser difíciles de clasificar, suelen separarse en biomarcadores de exposición, biomarcadores de efecto y biomarcadores de susceptibilidad (Silverberg, 2001):

Un biomarcador de la exposición puede ser un compuesto exógeno que se introduce en el cuerpo, un producto interactivo entre el compuesto y un componente endógeno, o cualquier otro hecho relacionado con la exposición. Lo más habitual es que los biomarcadores de exposición a compuestos estables, como los metales, comprendan mediciones de las concentraciones del metal en muestras apropiadas, como la sangre, el suero o la orina. En el caso de las sustancias volátiles puede evaluarse su concentración en el aire espirado (tras la inhalación de aire libre de contaminación). Si el compuesto se metaboliza en el cuerpo, pueden elegirse uno o varios metabolitos como biomarcadores de la exposición; los metabolitos suelen determinarse en muestras de orina.

Los biomarcadores de efecto pueden ser componentes endógenos o medidas de la capacidad funcional, o cualquier otro indicador del estado o equilibrio del cuerpo o de un sistema orgánico afectado por la exposición. Suelen utilizarse como indicadores preclínicos de anomalías. Los biomarcadores de efecto pueden ser específicos o no específicos. Los específicos son útiles porque indican un efecto biológico de una exposición concreta, por lo que aportan datos que pueden ser valiosos de cara a la prevención. Los biomarcadores no específicos no indican una causa individual del efecto, pero pueden reflejar el efecto total integrado debido a una exposición combinada. No hay una distinción clara entre biomarcadores de exposición y de efecto. Por ejemplo, podría decirse que la formación de aductos refleja más un efecto que la exposición. No obstante, los biomarcadores de efecto suelen indicar cambios en las funciones de las células, de los tejidos o del cuerpo en su conjunto.

Un biomarcador de susceptibilidad, sea heredada o inducida, es un indicador de que el individuo es especialmente sensible al efecto de un compuesto o a los efectos de un grupo de compuestos. Se ha hecho hincapié sobre todo en la susceptibilidad genética, aunque hay otros

factores que pueden tener al menos la misma importancia. La hipersusceptibilidad puede deberse a un rasgo heredado, a la constitución del individuo o a factores ambientales.

Los usos potenciales de los biomarcadores en estudios de campo son (Schlenk *et al.*, 2008):

- Para evaluar el efecto de un químico desconocido o una mezcla de productos químicos
- Para demostrar biodisponibilidad o ausencia
- Para demostrar el curso temporal de la absorción
- Proporcionar oportunidades *in vitro* de comprensión de mecanismos
- Para priorizar sitios, contaminantes o muestras que requieran futuros análisis
- Para evaluar el curso temporal o éxito de remediación
- Para llevar a cabo vigilancia

Las ventajas y limitaciones de los biomarcadores frente a los análisis químicos convencionales se presentan en el Cuadro 2 (Bozo *et al.*, 2007):

Cuadro 2. Ventajas y limitaciones de los biomarcadores

Ventajas	Limitaciones
Proveen una medida integrada de la biodisponibilidad de los contaminantes en el tiempo.	Imposibilidad de controlar cambios en las variables ambientales.
Son el reflejo de la exposición a contaminantes ambientales.	En algunos casos baja especificidad del biomarcador.
Ayudan a establecer la importancia de diferentes rutas de exposición.	Muchas veces no está claramente establecida la relación dosis-respuesta.
Permiten detectar la exposición a tóxicos y metabolitos rápidamente metabolizables y eliminados.	En algunos casos no hay comprensión del mecanismo involucrado.
Permiten la integración de interacciones de mezclas de contaminantes para rendir una expresión del efecto acumulativo a nivel molecular, celular o tisular.	Es necesario contar con experiencia técnica y equipos adecuados para obtener e interpretar los resultados.
El potencial de integración en los diferentes niveles de organización biológica puede predecir, a corto plazo, los efectos ecológicos que se producirán a largo plazo.	

1.6.1 Vitelogenina

Uno de los biomarcadores utilizados en peces para observar los daños ocasionados por compuestos que causan disrupción endocrina, es la vitelogenina. La vitelogenina ha sido químicamente definida como una proteína específica de hembras ovíparas en estado reproductivo similar a las de otros vertebrados. Esta molécula posee un alto peso molecular debido a su asociación con lípidos, residuos de carbohidratos, fósforo, calcio y hierro. Estos componentes químicos varían dependiendo de las especies y de la etapa de maduración en la que se encuentren. Se sintetiza en el hígado, bajo la estimulación de estrógenos producidos en el ovario, posteriormente es secretada a la circulación y transportada al ovario, en donde es incorporada dentro de los ovocitos por un proceso de micropinocitosis mediado por receptores (Hashimoto *et al.*, 2000; Tyler *et al.*, 2008).

Los peces macho también contienen el gen de la vitelogenina, y la exposición a estrógenos puede provocar su expresión, resultando en concentraciones detectables de la proteína en el plasma sanguíneo (Brasfield *et al.*, 2001; Tyler *et al.*, 2008). Por ello, la inducción de la síntesis de vitelogenina en machos es considerada un biomarcador de exposición a compuestos estrogénicos (Jobling *et al.*, 2002; Van Den Belt *et al.*, 2002; Verslycke *et al.*, 2002; Arukwe y Goksøyr, 2003; Nilsen *et al.*, 2004; Pawlowski *et al.*, 2004; Wheeler *et al.*, 2005; Hiramatsu *et al.*, 2006; Hutchinson *et al.*, 2006; Liney *et al.*, 2006; Schultz *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 2008; Oropesa, 2008). Diversos estudios han demostrado, usando vitelogenina, la presencia de químicos estrogénicos en los ecosistemas acuáticos (Kime *et al.*, 1999).

Esta proteína es importante porque permite la formación del vitelo durante la Vitelogénesis que es el proceso de formación del material de reserva (vitelo) del huevo en peces y anfibios y se inicia por la glándula pituitaria en respuesta a las señales ambientales (Figura 2).

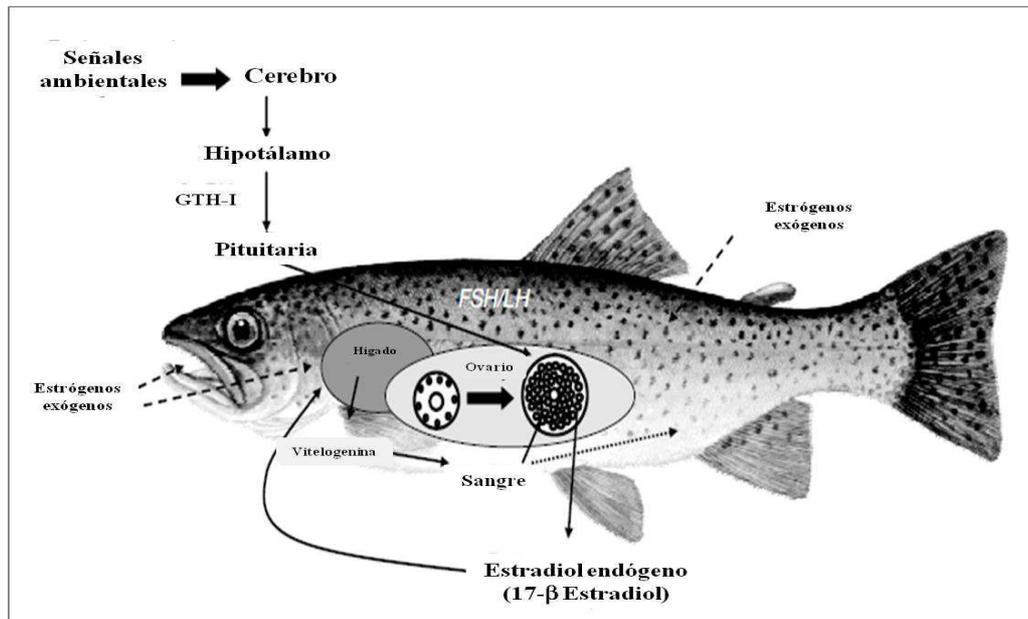


Figura 2. Vitelogenénesis en peces. La línea continua indica la inducción normal de vitelogenina en hembras. Estrógeno endógeno es producido en el ovario bajo el estímulo de FSH/LH; entra a la circulación e induce la síntesis de vitelogenina. Las líneas punteadas muestran las vías de exposición a estrógenos exógenos.

Fuente: Tyler *et al.*, 2008.

La hipófisis responde a la estimulación del hipotálamo mediante la secreción de gonadotropina I (GTH-I), una hormona peptídica que regula la función ovárica y promueve la maduración meiótica. GTH-I circula en el plasma sanguíneo y, al llegar a los ovarios estimula las células del folículo para sintetizar estradiol, que es liberado en el suero. El estradiol se difunde libremente a través de la membrana de las células del hígado y se une a los receptores de estrógenos, por lo que inicia la transcripción y la traducción de vitelogenina. Al llegar a los ovarios se pasa a través de las células del folículo capilar a lo largo de una red para llegar a la superficie de los ovocitos (Figura 3) (Wheeler *et al.*, 2005).

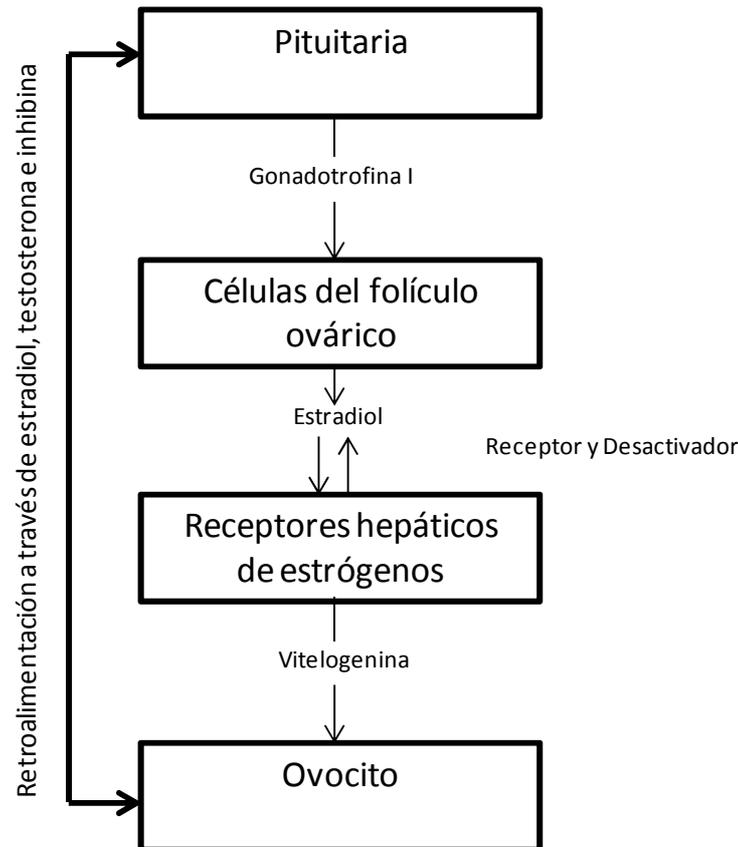


Figura 3. Esquema de la inducción normal de vitelogenina en hembras de peces. Una vez sintetizada en el hígado en respuesta a estrógenos endógenos, la vitelogenina es transportada al ovario donde es incorporada dentro de los ovocitos. Fuente: Wheeler *et al.*, 2005.

Los químicos ambientales que inducen la síntesis de vitelogenina en peces incluyen estrógenos, constituyentes de píldoras anticonceptivas, alquil fenoles, ftalatos y algunos plaguicidas Organoclorados y bifenilos policlorados (Canales *et al.*, 2003; Kime *et al.*, 1999). Estudios *in vivo* muestran que químicos estrogénicos en combinación pueden inducir efectos aditivos en peces (Tyler *et al.*, 2008).

Medición de VTG por técnicas químicas

Un número de diferentes técnicas han sido usadas para detectar indirectamente niveles de vitelogenina en sangre. Estas incluyen fosfoproteínas, contenido de proteína total, determinación de calcio y fósforo lábil en medio alcalino en plasma. Este último implica una cuantificación de la lipofosfoproteína. Otros métodos se basan en la inmunoaglutinación, la densitometría después de la electroforesis, la inmunodifusión radial y el radioinmunoensayo.

Recientemente diferentes inmunoensayos se han desarrollado para la medición de Vitelogenina en diferentes especies teleosteos. Aunque estos ensayos son muy sensibles, su uso se limita principalmente a una especie debido a la complejidad de la molécula de vitelogenina. Por otra parte, estos ensayos son costosos y limitados en su uso debido a la falta de anticuerpos específicos de especies (Verslycke *et al.*, 2002). Ninguna de estas técnicas, con excepción del fósforo lábil en medio alcalino ha recibido mucha atención. El inconveniente de estos métodos químicos y electroforéticos es que son indirectos, dependen de la concentración de fósforo o la carga eléctrica, por lo que falta la especificidad directa de los anticuerpos (Verslycke *et al.*, 2002; Rotchell y Ostrander, 2003; Pottinger *et al.*, 2005; Wheeler *et al.*, 2005; Hallgren *et al.*, 2009).

Técnicas inmunológicas

Todas las técnicas inmunológicas se basan en anticuerpos que se unen específicamente a la proteína de interés. Los anticuerpos son producidos en modelos animales que responden a la proteína. En muestras de sangre o hígado la vitelogenina será selectiva y reversiblemente unida al anticuerpo acoplado a un ligando marcado (trazador radiactivo, enzima o molécula fluorescente), el ligando es utilizado para la cuantificación del la vitelogenina. A pesar de la estructura conservada de la vitelogenina a través de las especies de peces, e incluso en otros vertebrados ovíparos, los anticuerpos de la vitelogenina deben plantearse para cada especie específica. Esto puede ocasionar que la generación de anticuerpos sea costosa, requiriendo la caracterización y aislamiento de cada proteína de vitelogenina para cada especie ensayada.

El Radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) se encuentra entre las primeras formas de inmunodetección. Esta prueba se basa en la competencia entre un antígeno no marcado (del pez de ensayo) y una cantidad finita de antígeno radiomarcado para un número limitado de sitios de unión. A pesar de que esta prueba es muy sensible, la eliminación de residuos radiológicos y los costos de los equipos han desalentado su utilización.

La técnica de Western blotting consiste en separar la muestra por electroforesis en gel de poliacrilamida, seguida por la transferencia a una membrana. Las proteínas se unen y se inmovilizan en la matriz de la membrana. La membrana se lava en una solución que contiene el anticuerpo específico de la vitelogenina. Los anticuerpos se unen a la membrana y se

detectan generalmente mediante tratamiento con un anticuerpo secundario, principalmente por una detección quimioluminiscente con un sustrato de fosfatasa alcalina (que genera un producto luminiscente) y la exposición posterior a la película fotográfica.

El método ELISA se basa en que el anticuerpo se une a una superficie, usualmente una placa de microtitulación de múltiples pocillos. La inhibición de la unión a la superficie se calcula por diluciones seriadas de antígeno mezclado con el anticuerpo antes de la aplicación en la superficie. La unión del anticuerpo a la superficie se mide por una segunda enzima marcada con el anticuerpo, usualmente una fosfatasa alcalina o peroxidasa, que es determinada por espectrofotometría.

Técnicas químicas

La medición de fósforo lábil en medio alcalino se basa en el hecho de que la vitelogenina es la única proteína del plasma del pez que contiene fósforo. En consecuencia, a diferencia de las técnicas inmunológicas, este método requiere extraer la proteína del plasma (usando éter) y liberar el fósforo de la vitelogenina (usando NaOH). Una vez que el ión fosfato es liberado la acidificación con molibdato de amonio causa la formación de fosfomolibdato de amonio (ecuación 1). La reducción de este compuesto produce un complejo de color azul de fosfomolibdeno (ecuación 2), que puede ser determinada por espectrofotometría (Wheeler *et al.*, 2005).

Fosfato + molibdato de amonio + pH ácido → fosfomolibdato de amonio Ec 1

Fosfomolibdato de amonio + Ácido amininaftasulfónico → Fosfomolibdeno (azul) Ec 2

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

RT-PCR (por sus siglas en inglés) es una herramienta poderosa para medir la expresión genética. Todo el ARN extraído se transcribe de forma inversa en su ADN usando una enzima (transcriptasa inversa). *Primers* específicos diseñados contra la secuencia de vitelogenina se utilizan para amplificar el mensaje en la forma de una copia de ADN (ADNc). Las

intensidades de la señal son comparadas con las de los genes control, detectando así cambios relativos en los niveles de expresión. Análisis en gel, tinción con bromuro de etidio y densitometría son usados habitualmente para cuantificar la intensidad de la señal. Esta actualmente es una técnica estándar que es fácilmente empleada en la mayoría de los laboratorios. Los costos de instrumentación han restringido el uso de este método.

Análisis Northern

Mensajero específico de ARN se ha detectado de forma rutinaria con el análisis Northern directamente por comparación relativa de la abundancia del mensajero. Para esta técnica el ARN es separado en un gel de agarosa, transferido a una membrana y luego hibridada con una sonda específica marcada para detección y cuantificación. Esta técnica es particularmente susceptible a la degradación del ARN, lo que puede ser un problema en ciertos tipos de tejidos tales como el hígado.

Ensayo de protección de ribonucleasa (RPA)

En el ensayo de protección de ribonucleasa (RPA por sus siglas en inglés) la expresión del gen (ARNm) se cuantifica por su capacidad para proteger una sonda complementaria marcada de digestión nucleasa. Se ha convertido en una poderosa alternativa al análisis Northern. El tejido es simultáneamente solubilizado y las ribonucleasas desnaturalizadas. La sonda marcada se añade al lisado y las condiciones del tampón garantizan una efectiva hibridación de la sonda con la secuencia diana de ARNm. Después de la hibridación, las ribonucleasas se añaden para digerir todos los ácidos nucleicos de cadena simple, incluyendo en exceso de sonda, pero no la ahora doble cadena (protegidos) del complejo sonda ARNm. Este complejo puede ser separado por un gel de poliacrilamida y visualizarse por autoradiografía o detección no isotópica.

1.6.2 Micronúcleos

De los biomarcadores más utilizados para detectar daño al ADN se encuentra los micronúcleos (MN) y el ensayo cometa, la primera prueba, los micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica en peces es ampliamente utilizado y recomendado para estudios de

exposición crónica a diferentes tipos de contaminantes ambientales con propiedades clastogénicas y aneugénicas (Ahmed *et al.*, 2011).

Este ensayo ha probado ser un indicador sensible de daño cromosómico. La presencia de células micronucleadas ha ganado uso generalizado para detectar los efectos genotóxicos de los productos químicos y la radiación. (Quirós *et al.*, 2008; Bolognesi y Hayashi, 2011). Los micronúcleos son formados en el proceso de la división celular y su expresión puede ocurrir en diferentes tiempos después del daño al ADN, dependiendo de la fase del ciclo celular y el mecanismo de inducción (Bolognesi and Hayashi, 2011). Los micronúcleos son la expresión en interfase de los fragmentos acéntricos, que al no tener centrómero no se incluirán en los núcleos hijos durante la división celular, ya que no interactúan con las fibras del huso mitótico en anafase; estos fragmentos se rodean de membrana nuclear y aparecen como pequeños núcleos en interfase. Mientras que cuando el daño se da en el centrómero, alterando el cinetocoro o bien las fibras del huso acromático, se produce un desequilibrio en la distribución de los cromosomas, provocando que queden fuera de la cinética normal de la anafase y se rodeen de envoltura nuclear, como ocurre con los fragmentos acéntricos, originando también micronúcleos aunque de mayor tamaño (Martínez-Valenzuela and Gómez-Arroyo, 2007; Quirós *et al.*, 2008).

En algunos peces esta prueba ha resultado ser una técnica *in vivo* útil para ensayos de genotoxicidad y para el potencial monitoreo *in situ* de la calidad del agua (Quirós *et al.*, 2008; Reis-Henriques *et al.*, 2009; Hafez, 2009; Bolognesi y Hayashi, 2011). Los daños genotóxicos en peces pueden ser inducidos por descargas urbanas o industriales contaminadas por diferentes compuestos tales como productos petroquímicos (Hoshina *et al.*, 2009; Bolognesi y Hayashi, 2011), metales pesados (Galindo *et al.*, 2010; Monte *et al.*, 2010; Omar *et al.*, 2012) y plaguicidas (Ventura *et al.*, 2007; Bony *et al.*, 2009; Cavas, 2011).

Las frecuencias basales de micronúcleos en peces reportadas por distintos autores muestran una alta variabilidad interespecies (0-13 por 1000 células), aunque la mayoría de los artículos reportan rangos de 0-1. Esta variabilidad puede estar relacionada con una diferencia entre especies en competencia del metabolismo y mecanismos de reparación del ADN, así como la proliferación de células en el órgano diana que afectan la expresión de micronúcleos (Bolognesi y Hayashi, 2011).

1.6.3 Ensayo cometa

El ensayo cometa es una prueba ampliamente utilizada para detectar el daño *in vitro* o *in vivo* causado al ADN en células individuales (Kumaravel *et al.*, 2009; Fasulo *et al.*, 2010) por agentes genotóxicos, entre los que se incluyen hidrocarburos (Fasulo *et al.*, 2010), metales (Monteiro *et al.*, 2011; Omar *et al.*, 2012), metaloides (Ahmed *et al.*, 2011), plaguicidas (Ventura *et al.*, 2007; Bony *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011; Cavas, 2011), bacterias (Bagdonas y Lazutka, 2007; Da Silva *et al.*, 2011) y mezclas de contaminantes (Yang *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2008; Srut *et al.*, 2009). Se caracteriza por ser un método sensible, rápido, sencillo, de bajo costo y aplicable a varios tipos de células eucariontes (Olive y Banáth, 2006). Esta técnica permite analizar la migración del ADN debido a rupturas simples en la hebra del ADN y a sitios álcali-lábiles con el enfoque típico de una sola célula de los ensayos citogenéticos (Kumaravel *et al.*, 2009). Consiste básicamente en analizar células individuales que son lisadas y sometidas a una electroforesis. Durante la electroforesis los fragmentos de ADN migran fuera del núcleo celular hacia el ánodo y forman una cola, que al ser observada al microscopio de fluorescencia, tiene la apariencia de un cometa. Existen varios parámetros para medir la magnitud del daño, sin embargo, muchos de ellos no son de uso frecuente. Los de mayor uso en la literatura son la longitud de la cola del cometa (TL) y el momento de la cola del cometa (OTM), éste último es particularmente útil para describir la heterogeneidad dentro de la población de células, ya que el OTM puede detectar variaciones en la distribución del ADN dentro de la cola (Kumaravel *et al.*, 2009).

Esta técnica requiere un pequeño número de células, detecta daño genotóxico a nivel celular y permite una evaluación de respuesta temprana en la biota (Srut *et al.*, 2009).

Kumaravel *et al.*, (2009) reporta que las principales ventajas del ensayo cometa incluyen:

- La colección de datos a nivel de células individuales, permitiendo más robustez en el análisis estadístico.
- La necesidad de un pequeño número de células por muestra.
- Sensibilidad para detectar daño al ADN

CAPITULO 2. ANTECEDENTES DE LOS SITIOS DE ESTUDIO

La selección de los sitios se realizó de acuerdo a los siguientes criterios: antecedentes en la literatura sobre la presencia de contaminantes en matrices ambientales; identificación de alguna posible fuente de contaminación; acceso al sitio y presencia de organismos.

De la gran cantidad de cuerpos de agua presentes en el país, se eligieron para este estudio el Río Santiago y el Río Verde en el Estado de Jalisco, la Presa Aguamilpa-Solidaridad en Nayarit y la Presa Miguel Hidalgo, en El Fuerte, Sinaloa. La elección de estos sitios responde a las diferentes características de cada uno de ellos. El Río Santiago presenta considerable contaminación en la parte inicial debido a las industrias y poblaciones localizadas en sus márgenes, y es contaminado por las aguas residuales municipales e industriales descargadas de la Zona Metropolitana de Guadalajara (ZMG), por lo que este Río presenta baja calidad del agua en casi toda su trayectoria. Dentro del límite del estado de Jalisco recibe contaminación de aguas residuales de las poblaciones de Amatitán, Tequila, Arenal y Magdalena, además de los desechos de la industria tequilera y de otras fábricas (Guzmán *et al.*, 2009). El Río Verde, es el más importante de los afluentes por la margen derecha, en dirección al flujo de la corriente principal, del Río Santiago; recibe descargas urbanas e industriales provenientes de los Estados de Zacatecas y Jalisco. La Presa Aguamilpa – Solidaridad es depósito de parte del sistema hidrológico Santiago-Aguamilpa y Huaynamota, ocupa aproximadamente 60 km a lo largo del Río Santiago y 25 km a lo largo del Río Huaynamota (Aranguré *et al.*, 2011). La Presa Miguel Hidalgo, al igual que la Presa Aguamilpa – Solidaridad, está considerada como una de las 100 Presas más grandes del país y se usa principalmente para la generación de energía eléctrica e irrigación, lo cual es de vital importancia, ya que el Estado de Sinaloa es el de mayor vocación agrícola en el país (SAGARPA, 2011). En resumen, los sitios presentan descargas y escorrentía de fuentes domésticas, agrícolas e industriales.

2.1 Los Ríos Santiago y Verde

El Río Santiago inicia su escurrimiento en la parte noreste del Lago de Chapala, a unos 4 km del suroeste de Ocotlan, Jalisco y fluye 475 km hasta su desembocadura en el Océano Pacífico, cerca de San Blas, Nayarit. En su tramo hasta El Salto, recibe diversas descargas de

aguas residuales sin tratamiento, tanto industriales como municipales (McCulligh *et al.*, 2007).

Las industrias que descargan al Río Santiago antes de la cascada de Juanacatlán están ubicadas principalmente en tres zonas: la ciudad de Ocotlán, el corredor industrial que inicia en el parque industrial Guadalajara y continúa a lo largo de la carretera a El Salto y La Capilla, y el corredor instalado a lo largo del Anillo periférico sur de la ZMG. De acuerdo al inventario de descargas en el estado de Jalisco de la Gerencia Regional de la CONAGUA, existen 280 descargas identificadas, de las cuales, 266 vierten sus aguas en el Río Santiago. El 36.5 % de este flujo lo aporta la industria Químico-Farmacéutica, le siguen la industria de alimentos y bebidas con un 15 % y la textil con 12.3 %, después vienen las de celulosa (papel) y la tequilera. Solo en la cuenca El Ahogado que drena la parte sur de la ZMG, específicamente de los municipios de Tlaquepaque, Tonalá, El Salto, Tlajomulco de Zúñiga y Zapopan, existen más de diez parques y zonas industriales, de ésta misma cuenca, el Río Santiago es receptor de un aproximado de 850 l/seg de aguas municipales crudas provenientes de la zona sur de la ZMG que llegan vía los canales de El Ahogado y Arroyo Seco (McCulligh *et al.*, 2007).

Los giros más importantes de estas industrias son el Químico-Farmacéutico, alimentos y bebidas, minerales no metálicos, metalmecánica y eléctrico y electrónica. Las industrias con aportes más significativos de agua residual incluyen: Celanese Mexicana, Ciba Especialidades Químicas, IBM de México, Compañía Nestlé, Industrias Ocotlán y Harinera de Maíz de Jalisco. Una causa más de la contaminación del Río Santiago son los lodos de las plantas de tratamiento de industriales que se vierten dentro del cárcamo de bombeo del Sistema de Alcantarillado y Agua Potable de Jalisco (SIAPA) en la colonia de la Huizachera, municipio de El Salto en el afluente del canal Las Pintas/El Ahogado, que trae asimismo las aguas del drenaje de la ZMG (McCulligh *et al.*, 2007).

El Río Verde nace en el Estado de Zacatecas y cruza todo el Estado de Aguascalientes. Se origina en el estado de Zacatecas donde se desarrolla la parte más elevada de su cuenca y se le conoce como Río San Pedro, cruza Aguascalientes donde cambia su nombre por Río Aguascalientes hasta su confluencia con el Río Lagos, desde donde adquiere el nombre de Río Verde, y atraviesa parte de Jalisco hasta su confluencia con el Río Santiago. En Jalisco, presenta algunas contaminaciones puntuales provenientes de poblaciones de la zona de los

Altos, en especial de Encarnación de Díaz, Teocaltiche, Yahualica, San Miguel el Alto, San Julián y Villa Hidalgo entre otros, pero en general presenta una buena calidad de agua y pueden dársele varios usos (Guzmán *et al.*, 2009).

Actualmente no existe un registro de los índices de calidad del agua del Río Verde y sus afluentes. En el Cuadro 3 se presentan los datos hasta 1995 (SEDEUR, 2010):

Cuadro 3. Índice de Calidad del Agua (ICA) de los afluentes de la cuenca del Río Verde

Corriente	Periodo	ICA	Condición
R. Verde	80's	50-60	No apta para consumo humano
R. Lagos	90-95	45	Contaminado, sin uso agrícola
R. San Pedro	86-95	30-45	Contaminado, sin uso agrícola
R. Niágara	90-95	38-45	Contaminado, sin uso agrícola
R. Calvillo	85-95	20-50	De levemente a contaminado

La contaminación de esta corriente no solo es un problema ecológico, sino también un problema serio de abasto a la Región centro, específicamente a la ZMG, el aprovechamiento de las aguas de esta cuenca representa una de las alternativas de abastecimiento de agua potable para la ZMG (SEDEUR, 2010).

2.2 Presas Miguel Hidalgo y Aguamilpa – Solidaridad.

Sinaloa es uno de los catorce estados donde se aplica el 80% de los plaguicidas usados en el país. La Presa Miguel Hidalgo (El Mahone) se encuentra ubicada en el Municipio de El Fuerte, en dicho estado. El uso que se le da es para la generación de energía eléctrica e irrigación. Actualmente no existen en la literatura estudios o reportes sobre el estado en que se encuentra dicho embalse, aunque la CONAGUA reporta que la estación de monitoreo de calidad del agua en el municipio de Ahome, sobre el Río Fuerte, aguas abajo de la Presa Miguel Hidalgo, presenta una calidad del agua excelente según los indicadores de Sólidos Suspendidos Totales y DBO₅ para el año 2009 (CONAGUA, 2011).

Un monitoreo del Organismo de Cuenca Pacífico Norte de la CONAGUA muestra los datos del Índice de Calidad del Agua de 1994 a 2007. Durante este periodo las dos estaciones de monitoreo ubicadas en el Río Fuerte (San Miguel Zapotitlán e Higuera de Zaragoza, ambas aguas abajo de la Presa Miguel Hidalgo) presentan un ICA de 65.4 y 66.9, respectivamente, considerándose como apta para cualquier uso. Cabe mencionar que los parámetros para

calcular este índice son: Oxígeno disuelto, pH, Conductividad eléctrica, Nitratos, DBO₅, Fosfatos, Nitrógeno Amoniacal, Bacterias Coliformes Totales y Fecales, Cloruros, Dureza Total, Grasas y Aceites, Sólidos Disueltos Totales, Turbiedad, Detergentes, Alcalinidad Total, Color y Sólidos Suspendidos Totales.

Estos datos difieren de los presentados por Arias Patrón (2005), quien menciona que las cuencas de Culiacán y El Fuerte reciben el 59% de del total de descargas contaminantes de la región Pacífico Norte, y que la contaminación por plaguicidas, conducida por prácticas ineficientes de irrigación, es el principal problema de contaminación química que enfrentan las cuencas de los ríos Colorado, Yaqui, Mayo, El Fuerte, Sinaloa Culiacán y San Pedro Mezquital.

La Presa Aguamilpa - Solidaridad se encuentra 305 km aguas abajo de la ciudad de Guadalajara. Este depósito es parte del sistema hidrológico Santiago-Aguamilpa y Huaynamota y ocupa aproximadamente 60 km a lo largo del Río Santiago y 25 km a lo largo del Río Huaynamota. Esta Presa fue construida entre 1989 y 1994 principalmente para satisfacer la creciente demanda de generación de energía eléctrica y control de inundaciones, riego y adicionalmente para la pesca. En particular, los estudios relacionados con la calidad del agua de la Presa Aguamilpa – Solidaridad son recientes (Rangel-Peraza *et al.*, 2009). Asimismo se debe considerar que el Río Santiago, desagüe natural del Lago de Chapala, en el transcurso de su cauce es represado por el complejo hidroeléctrico Aguamilpa y que dicho Río es utilizado como vertedero de desechos urbanos, agrícolas, mineros e industriales provenientes principalmente de la Ciudad de Guadalajara y asentamientos ribereños del mismo, por lo que el estado de contaminación de sus aguas se puede considerar grave (Aranguré *et al.*, 2011).

En estudios realizados en la Presa Aguamilpa en el 2004, en sedimentos superficiales colectados en los periodos de secas y lluvias, se encontraron contenidos promedio de 14.12 y 13.19 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de arsénico respectivamente, superiores a 5.9 $\mu\text{g.g}^{-1}$ valor guía reportado por CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment) para sedimentos de agua dulce. En cambio el material terrígeno aledaño a la Presa, el contenido promedio fue de 14.95 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de arsénico. Registrándose en ambos casos las concentraciones más altas en las estaciones de muestreo más cercanas a la cortina. También se analizó el arsénico en los peces tilapia, lobina,

bagre, carpa y palacha ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) en músculo de dichos peces colectados en centros de acopio y jaulas de la Presa, encontrando que únicamente la tilapia de jaulas colectada en la época seca presentó un contenido superior a la norma de la FDA aplicable a animales tratados con medicamentos veterinarios (Zambrano *et al.*, 2011) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Contenido de As en Peces de la Presa Aguamilpa - Solidaridad.

Pez	Secas	Lluvias
Lobina	0.19 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0.13 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Tilapia de centros de acopio	ND	0.68 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Tilapia de jaulas	1.92 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0.43 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Carpa	0.44 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0.22 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Palacha	No colectada	0.19 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Bagre	No colectada	0.13 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

Un análisis de la calidad del agua reportado por Rangel-Peraza *et al.*, (2009) indica que la Presa tiene una productividad primaria relativamente alta y que presenta un proceso de eutrofización de acuerdo a los valores de concentración de algas verde-azules en aguas superficiales. Este proceso de eutrofización, explican los autores, puede deberse al enriquecimiento de nutrientes en el sistema, las temperaturas relativamente cálidas, intrínsecas a la región tropical donde se encuentra el embalse, baja turbulencia en las capas inferiores y los patrones de circulación estables. Resultados parecidos encontró García-Cabrera (2007) quien reporta que esta presa presenta una contaminación de tipo orgánico donde los géneros *Scenedesmus*, *Oscillatoria* y *Alaucoseira crenulata* resultaron indicadores de la calidad del agua en las condiciones fisicoquímicas imperantes durante el periodo de cinco años de monitoreo en la zona. El embalse mostró una tendencia hacia la eutrofia. La comunidad de fitoplancton no cambió sustancialmente en este periodo y el zooplancton se presentó en baja densidad.

Otro grupo de contaminantes de interés que está presente en esta Presa son los plaguicidas organoclorados, Aranguré *et al.*, (2011) reportan catorce compuestos de este tipo en sedimentos de la Presa, entre los que destacan endrín, endosulfan I, α -HCH, p,p'-DDE, aldrín, p,p'-DDD y endrín aldehído y once compuestos en peces, entre los que destacan endrín, endosulfan I, aldrín, dieldrín, endosulfan II y β -HCH, concluyendo que la presencia

de plaguicidas organoclorados y sus metabolitos pueden ser un indicador de uso extensivo de estos compuestos tóxicos y al mismo tiempo un riesgo para la salud.

CAPITULO 3. JUSTIFICACIÓN

Entre los efectos letales y no letales causados por la presencia de mezclas complejas de contaminantes en el agua, hay trastornos de la fertilidad, así como cambios celulares, metabólicos y daño al ADN. Detectar todo el universo de sustancias presentes en el agua en países como México es complicado debido a limitaciones técnicas y económicas. Estos hechos subrayan la importancia de contar con una batería de biomarcadores que permitan evaluar el estado en que se encuentran los cuerpos de agua (Villela *et al.*, 2007).

Los organismos acuáticos, como los peces, pueden absorber estos compuestos del agua a través de las branquias y mediante la ingestión de sedimentos o alimentos contaminados (Reis-Henriques *et al.*, 2009), por lo que son un biomonitor sensible para evaluar la toxicidad ambiental en ambientes acuáticos (Hafez, 2009; Ahmed *et al.*, 2011).

En años recientes las técnicas de análisis convencionales para detectar contaminantes ambientales en agua y sedimentos incluyen cromatografía líquida o de gas, espectrometría de masa y espectrometría de termo-rocido, sin embargo estos métodos son caros y tardados y requieren pretratamiento de muestras y técnicas altamente calificadas, además de que estos métodos no predicen la toxicidad de mezclas de compuestos (Cakal *et al.*, 2010; Bolognesi y Hayashi, 2011). Las herramientas convencionales para monitoreo ambiental pueden evaluar los niveles de contaminantes y el estado de salud ambiental, pero no la interrelación entre ambos, mientras que el uso de biomarcadores puede relacionar causa y efecto (Bozo *et al.*, 2007), y puede revelar respuestas tempranas a estrés ambiental (Bolognesi y Hayashi, 2011).

CAPITULO 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPOTESIS

El registro de biomarcadores de efecto en peces *Oreochromis sp* de los Ríos Verde y Santiago, así como las Presas Miguel Hidalgo y Aguamilpa - Solidaridad están alterados por la presencia de contaminantes provenientes de descargas domésticas, agrícolas e industriales.

4.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de contaminantes ambientales en peces Tilapia (*Oreochromis* sp) mediante el uso de biomarcadores en dos tipos de cuerpos de agua (Ríos y Presas): el Río Santiago y Verde en el Estado de Jalisco y las Presas Miguel Hidalgo en el Estado de Sinaloa y Aguamilpa – Solidaridad en el Estado de Nayarit.

4.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la exposición a compuestos que alteran el sistema endocrino mediante la cuantificación de vitelogenina en plasma de peces.
- Evaluar la exposición a agentes genotóxicos mediante la cuantificación de micronúcleos (MN) y fragmentación del ADN medida como ensayo cometa en eritrocitos en peces.

CAPITULO 5. METODOLOGÍA

5.1 Área de estudio

La cuenca Lerma-Chapala-Santiago tiene el desarrollo industrial y demográfico más importante del Estado de Jalisco, en ella se asientan importantes corredores industriales de los más diversos giros (McCullingh *et al.*, 2007). Las Presas Miguel Hidalgo y Aguamilpa – Solidaridad se localizan en el Estado de Sinaloa y Nayarit respectivamente. Estas presas son embalses destinados a la generación de energía eléctrica y al riego agrícola (Figura 4).

Se seleccionaron cinco sitios de estudio (Figura 4), dos de ellos en el Río Santiago (Arcediano y El Salto), uno en el Río Verde (Purgatorio), y dos Presas, la Presa Miguel Hidalgo en el Estado de Sinaloa y la Presa Aguamilpa-Solidaridad en Nayarit. Los dos primeros sitios se caracterizan por recibir descargas industriales y domésticas de la ZMG. En el sitio Purgatorio no se observaron fuentes puntuales de descarga industrial (Figura 5); y las Presas, Miguel Hidalgo (Figura 6) y Aguamilpa – Solidaridad (Figura 7) son embalses destinados a la generación de energía eléctrica e irrigación.

USO DE BIOMARCADORES EN PECES COMO HERRAMIENTA PARA EVALUAR LA EXPOSICIÓN Y EFECTO DE CONTAMINANTES AMBIENTALES EN CUERPOS DE AGUA

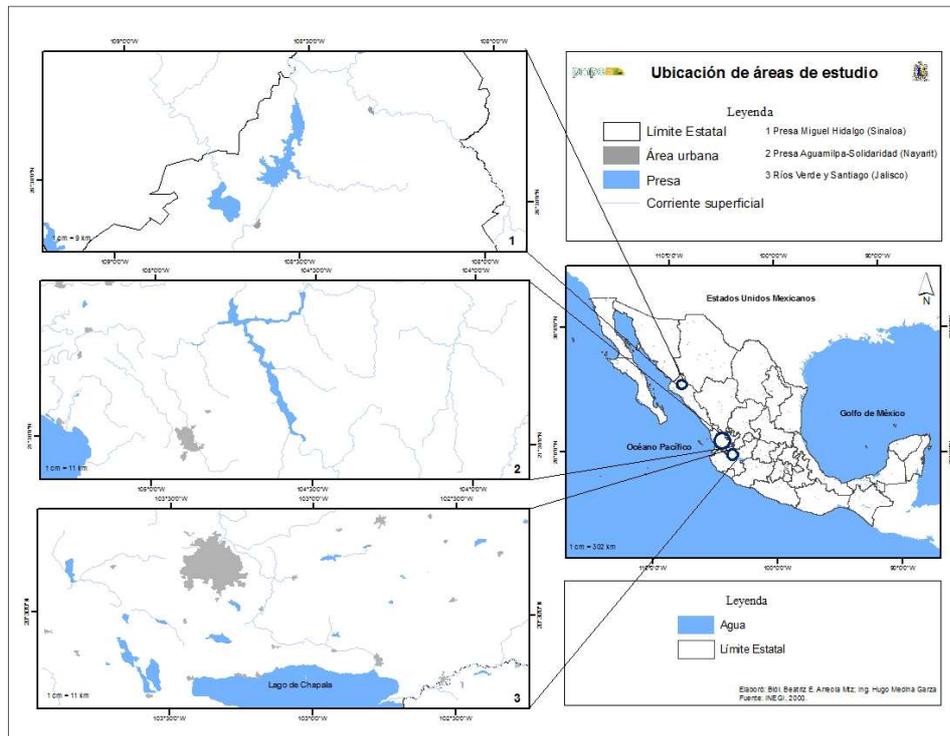


Figura 4. Sitios de estudio. La elección de estos sitios responde a diferentes características de cada uno de ellos: la Presa Miguel Hidalgo recibe escorrentía agrícola, la Presa Aguamilpa es depósito del Río Santiago, y los Ríos Santiago y Verde reciben descargas industriales y domésticas.

En la Figura 5 se muestra la ubicación de los sitios de muestreo en los Ríos Santiago y Verde y la ZMG. Los tres sitios estudiados se encuentran dentro de los límites del estado de Jalisco. En las Figuras 6 y 7 se observan además la ubicación de las Presas estudiadas.

USO DE BIOMARCADORES EN PECES COMO HERRAMIENTA PARA EVALUAR LA EXPOSICIÓN Y EFECTO DE CONTAMINANTES AMBIENTALES EN CUERPOS DE AGUA

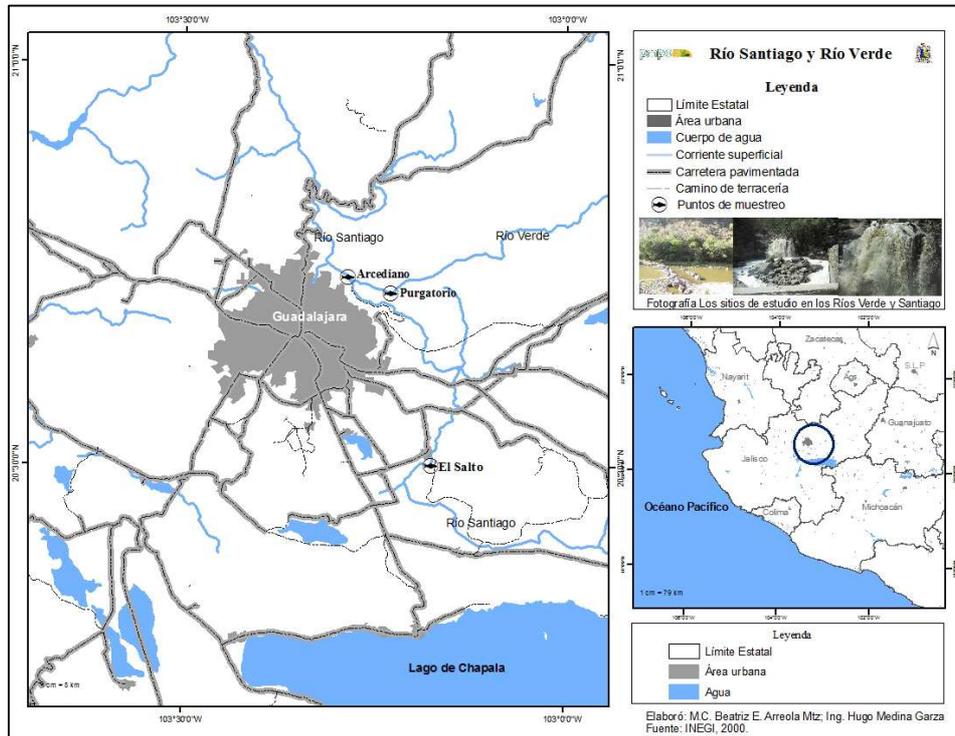


Figura 5. Sitios de muestreo en los Ríos Santiago y Verde. El sitio de Arcediano y El Salto pertenecen al Río Santiago, Purgatorio pertenece al Río Verde.

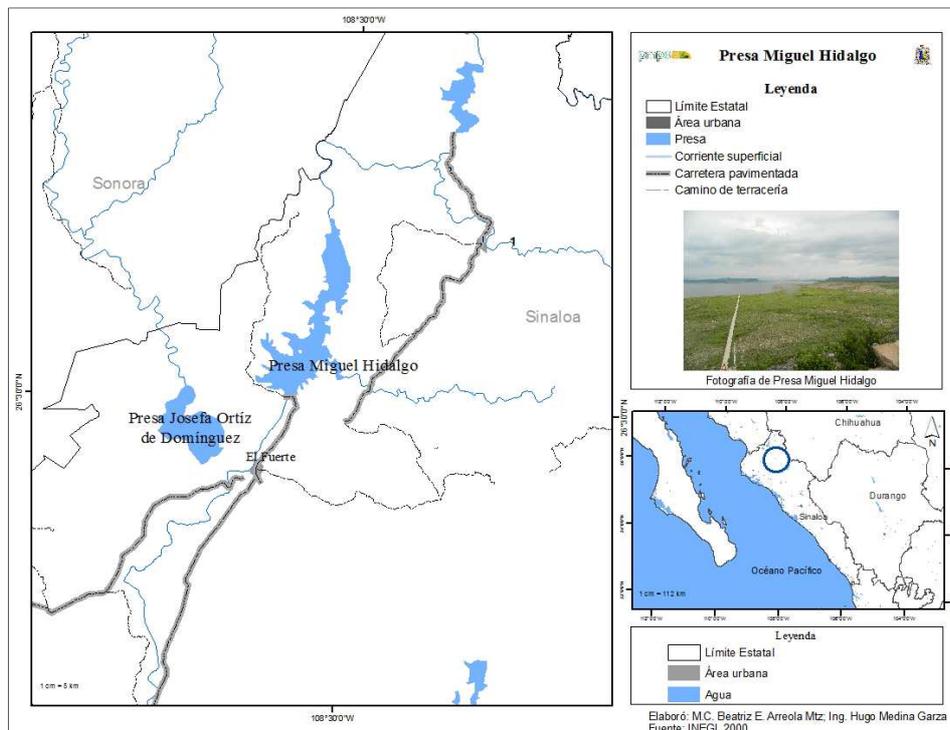


Figura 6. Presa Miguel Hidalgo, Estado de Sinaloa. Este embalse es receptor de escorrentía agrícola.

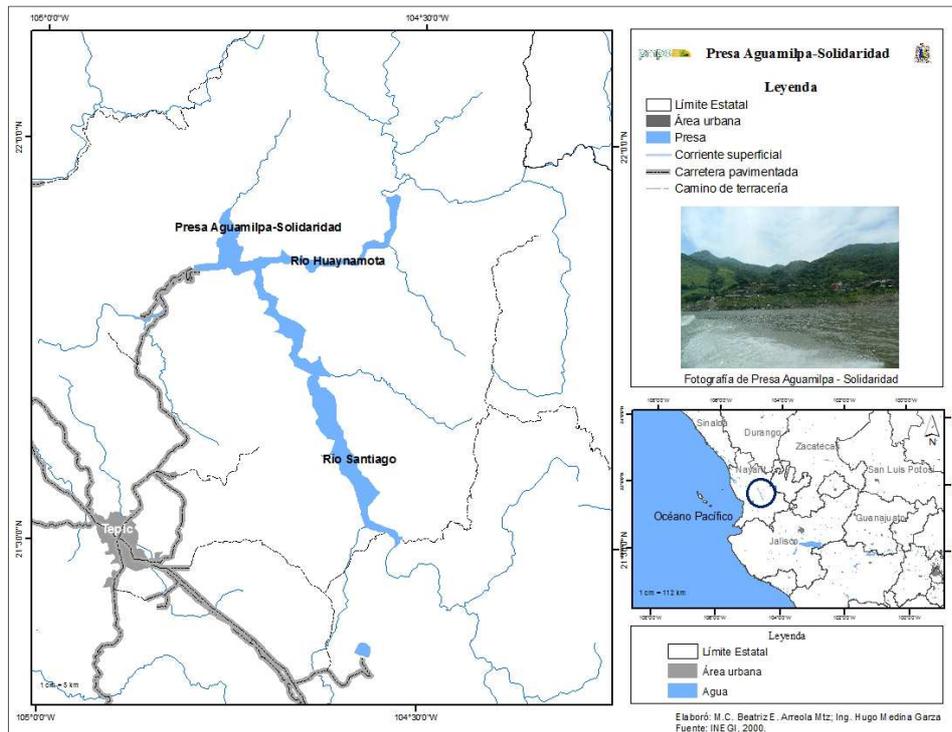


Figura 7. Presa Aguamilpa - Solidaridad, Estado de Nayarit. Este embalse es receptor del Río Santiago y Río Huaynamota.

5.2 Biomarcadores de efecto

5.2.1 Vitelogenina

El análisis para este biomarcador se hizo en muestras de sangre las cuales se obtuvieron por punción cardíaca con jeringa heparinizada. La sangre fue transferida a un tubo heparinizado y se centrifugó a 2,000 rpm por 10 minutos para la obtención del plasma, el cual se colectó cuidadosamente con una pipeta pasteur y se transfirió a un criotubo. Las muestras de plasma se conservaron en nitrógeno líquido hasta su traslado al laboratorio.

La Vitelogenina se determinó mediante el método de Wallace y Jared (1968). Una alícuota de 10 μ L de plasma se trató con 500 μ L de Ácido Tricloroacético (TCA) al 20% para precipitar las proteínas. La mezcla se agitó usando un vortex y se centrifugó a 4500 rpm durante 7 minutos. El precipitado formado se lavó con TCA al 20% y con otros solventes en el siguiente orden: etanol (se incubó por 10 minutos a 60 °C), éter-etanol-cloroformo (2:2:1), acetona y éter. Posteriormente el precipitado fue reconstituido en 500 μ L de 2N NaOH y se incubó a 100°C por 20 minutos. Las muestras fueron neutralizadas por la adición de 500 μ L de

2N HCl. En el sobrenadante se determinó por colorimetría fósforo proteico mediante reacción con molibdato ácido y reductor de Fiske y Subba Row por 10 min. Las lecturas de absorbancia del sobrenadante se realizaron en un espectrofotómetro UV- Visible (BIOMATE 3S) a una λ de 660 nm. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

5.2.2 Micronúcleos

La prueba de MN se realizó siguiendo la metodología de Headle (1973) y Scmid (1975) con ligeras modificaciones. Una gota de sangre obtenida por punción cardíaca con jeringa heparinizada fue colocada sobre un portaobjetos previamente etiquetado, se realizó un barrido y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente se fijó con metanol durante 5 minutos, e inmediatamente después se tiñó con Giemsa por 40 minutos. Las laminillas se lavaron con agua corriente cuidando de que no le cayera agua directamente y se llevaron al microscopio. Se utilizó un microscopio óptico (Nikon Eclipse E400) y se observaron a una magnificación de 1000X, se contabilizaron un total de 3,000 células por pez y se reportaron como MN/1000.

En campo se realizó el frotis de la sangre de Tilapia (*Oreochromis* sp), y posteriormente en el laboratorio se continuó con el resto del análisis.

Para el conteo de MN se siguió el criterio descrito por Fenech (2003): el diámetro del MN debe ser menor a un tercio del núcleo principal, el MN debe estar separado o marginalmente solapado del núcleo principal siempre y cuando sea clara la identificación de la frontera nuclear, el MN debe tener una tinción similar al núcleo principal.

5.2.3 Ensayo cometa

El ensayo cometa se realizó de acuerdo a lo reportado por González-Mille *et al.*, (2010). Una alícuota de 5 μ L de sangre completa fue diluida en 240 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (37°C). Las laminillas fueron preparadas usando 15 μ L de suspensión celular y 225 μ L de agarosa bajo punto de fusión en una capa pre-elaborada de agarosa regular al 0.5%. Posteriormente las laminillas fueron incubadas en una solución de lisis [(compuesta de 10 mM Tris-HCl, 2.5 M NaCl, y 100 mM de EDTA, 0.2 M de NaOH, ajustada a pH 10) a la cual se le añadió 10 % de DMSO y 1% Tritón X-100 antes de usarse] por una semana en oscuridad a 4 a 8°C. Después de la incubación, las laminillas fueron colocadas en un buffer

alcalino (NaOH 10 N y EDTA 200 mM, ajustado a un pH>13) por 5 minutos para desenrollar el ADN. Inmediatamente se realizó una electroforesis horizontal por 10 minutos a 25 V y 300 mA, posteriormente se neutralizaron con Tris 0.4 M (pH 7.5) y se fijaron con etanol. Las laminillas se tiñeron con 20 µL de bromuro de etidio (0.05 mM) para su observación en un microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse E400) a una magnificación de 200X. Se midió el momento de la cola del cometa (olive tail moment, OTM por sus siglas en inglés) y la longitud de la cola del cometa (tail length, TL por sus siglas en inglés) de 100 células (50 de la muestra y 50 de la réplica) por individuo con un software analizador de imágenes (Komet 4.0, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK).

Esta prueba se realizó en campo hasta la parte de incubación de las laminillas en solución de lisis. Posteriormente en el laboratorio se continuó con el desenrollamiento del ADN y la electroforesis.

Se presenta el OTM y el TL debido a que han mostrado ser los parámetros más útiles para evaluar el daño al ADN (Olive and Banáth, 2006; Kumarevel, *et al.*, 2009) y para facilitar la comparación con otros estudios. Las diferencias en el daño al ADN fueron evaluadas con una prueba de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia estadística de $p < 0.05$ con el software STATISTICA 8.0.

Los peces fueron capturados con artes de pesca tradicional empleando la red conocida como atarraya, esto se realizó con ayuda de pescadores de la zona.

5.3 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. El nivel de significancia utilizado fue de 0.05 a dos colas. Todos los análisis se realizaron con el software STATISTICA 8.0.

Adicionalmente se presentan los datos de Arsénico (As) en agua y sedimento, ya que este elemento es conocido por sus efectos genotóxicos en peces, para asociarlos con los biomarcadores de MN y ensayo cometa mediante una prueba de independencia de Chi cuadrado (X^2). Los datos fueron proporcionados por el Laboratorio de Toxicología Ambiental y se generaron durante un monitoreo ambiental llevado a cabo de manera paralela a este estudio. El análisis de X^2 de independencia nos permite determinar si dos variables categóricas

están asociadas. Se realizó mediante una tabla de contingencia de 5 X 3 y 4 X 4 para MN y ensayo cometa respectivamente. Se categorizó la presencia de MN como: ausencia de MN (0 MN/1000), presencia (0.33 MN/1000) y presencia moderada (>0.66 MN/1000); y en el caso del ensayo cometa la categorización se realizó solo de la longitud de la cola de la siguiente manera: sin daño (TL 0-2 μm), daño leve (TL 3-5 μm), daño moderado (TL 6-8 μm) y daño alto (TL >9 μm). La categorización se realizó de manera arbitraria.

CAPITULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres biomarcadores analizados presentan diferente comportamiento en todos los sitios, es decir, mientras uno puede presentarse muy elevado en cierto sitio, para ese mismo sitio otro biomarcador está muy por debajo del resto, lo que puede ser explicado porque cada uno de estos responde a diferente tipo de contaminantes, lo que nos lleva a concluir que cada sitio recibe diferentes contaminantes ó diferentes cantidades de contaminantes o diferentes formas químicas de un contaminante. Pero independientemente de esto, los biomarcadores utilizados evidencian que hay daño en el organismo, causado por contaminantes presentes en los cuerpos de agua.

A continuación los resultados serán descritos para cada biomarcador.

6.1 Vitelogenina

La vitelogenina es una proteína específica de las hembras, por lo que su presencia en machos y juveniles es indicadora de exposición a agentes con capacidad de alterar el sistema endocrino. Cuando las hembras se exponen a disruptores endocrinos también aumentan los valores de vitelogenina (Munkittrick *et al.*, 1991; McMaster *et al.*, 1991; Arcand-Hoy y Benson, 1997).

En estudios para especies silvestres no es posible controlar algunas variables, una de ellas es el sexo de los organismos, por lo que para este tipo de estudios se utilizan tanto machos como hembras. Tomando en cuenta que en los sitios de estudio los peces tanto machos como hembras están expuestos a los mismos contaminantes y que las hembras igualmente ven alterada su homeostasis hormonal al exponerse a disruptores endocrinos (Munkittrick *et al.*, 1991; McMaster *et al.*, 1991; Arcand-Hoy y Benson, 1997) se decidió hacer en análisis de este biomarcador a ambos sexos.

La exposición a contaminantes ambientales con actividad estrogénica pueden inducir la producción de esta proteína específica de las hembras en peces. Diferentes técnicas han sido usadas para determinar los niveles de vitelogenina en plasma como biomarcador de exposición a compuestos con actividad estrogénica. En este estudio se utilizó la técnica indirecta de fósforo lábil en medio alcalino como una alternativa analítica tanto para detectar este tipo de compuestos en matrices ambientales, como para la medición de la proteína por medio de anticuerpos en matrices biológicas.

En el sitio de muestreo de la Presa Aguamilpa – Solidaridad, no fue posible hacer el análisis para este biomarcador, esto debido a que los peces que se colectaron y el volumen de sangre obtenido de ellos fueron insuficientes.

Para este biomarcador no se cuenta con un estándar de referencia. Para resolver esta limitación se procedió a preparar un control interno de validación del método (CDI). El control se preparó de una muestra compuesta de plasma de peces obtenidos del Lago de Chapala al que se le midió el contenido de vitelogenina (con el método descrito en la sección de metodología) por una semana, posteriormente se obtuvo una media de todas las mediciones con un valor de 199.57 mg/L y la desviación estándar de las mismas con un valor de 64.45. Con cada lote de muestras se corría un CDI, si el resultado de este era mayor o menor a la media \pm 1 desviación estándar, todo el lote de muestras analizadas se repetía.

Las concentraciones de vitelogenina por sitio se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Concentraciones de vitelogenina en plasma de peces de los sitios de estudio. Los valores representan medias \pm Desviación Estándar.

Especie	Sitio	Vitelogenina (mg/L)*
<i>Oreochromis</i> sp	Arcediano	179.611 \pm 92.83
	Purgatorio	167.90 \pm 46.90
	El Salto	343.99 \pm 21.19
	M. Hidalgo	238.50 \pm 304.54

*Valores representan medias \pm desviación estándar

En el Cuadro 5 y Figura 8 se puede observar que los valores entre Arcediano y Purgatorio son similares, esto a pesar de ser sitios pertenecientes a diferentes corrientes. Esto se le puede atribuir a la cercanía de los puntos de muestreo (Figura 5), que hace que los peces se expongan al mismo tipo y concentración de contaminantes. El Salto por otra parte,

pertenece a la corriente del Río Santiago, pero recibe una mayor cantidad de descargas industriales, las cuales, a juzgar por el valor de vitelogenina, presentan un mayor potencial de alterador endocrino.

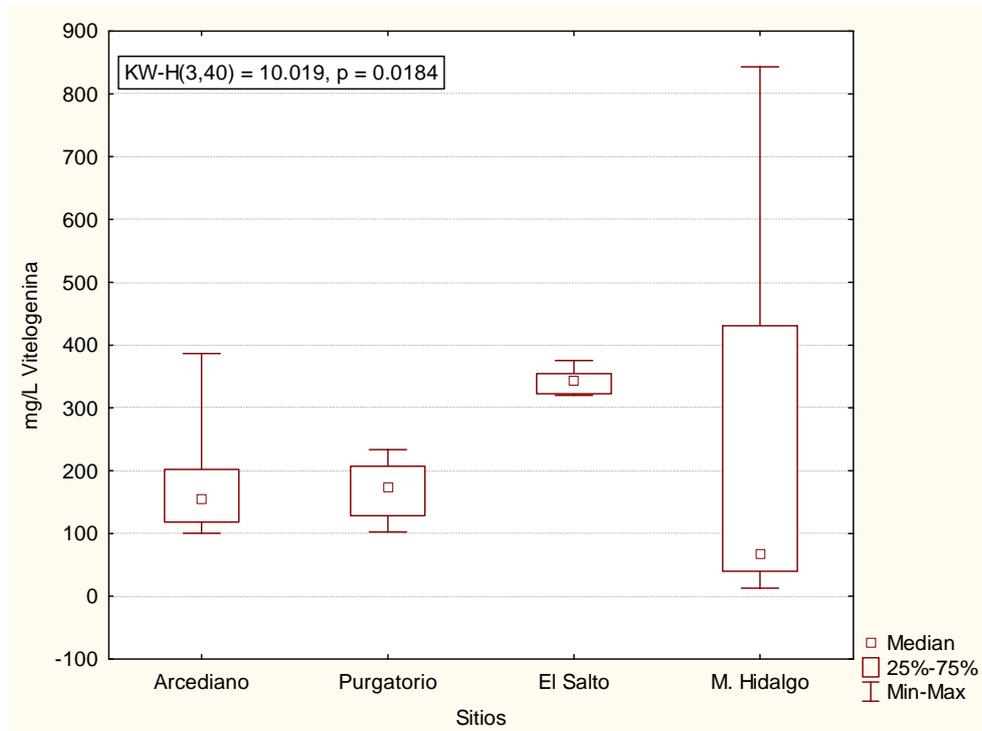


Figura 8. Valores de vitelogenina en peces de los sitios de estudio. Las cajas representan la mediana y los percentiles 25 y 75. Las barras representan valores mínimos y máximos El análisis estadístico muestra diferencia significativa ($p < 0.05$).

La Presa Miguel Hidalgo presenta valores de Vitelogenina similares a los valores medios de Arcediano y Purgatorio. En este embalse no se pudo identificar un fuente puntual de contaminantes estrogénicos como la del Río Santiago, por lo que el origen de dichos tóxicos puede provenir de escorrentía agrícola o de corrientes que alimentan dicho embalse, esto porque como se mencionó en los antecedentes del sitio se encuentra ubicada en un Estado de la Republica Mexicana en donde se aplica el 80% de los plaguicidas usados en el País, sustancias que se sabe que son disruptores endocrinos. El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre los sitios (KW-H = 10.019, $p = 0.0184$) (Figura 9).

Los resultados de Arcediano, Purgatorio y Miguel Hidalgo se encuentran dentro de los niveles reportados por Verslycke *et al* (2002) para *Oncorhynchus mykiss* expuestos a 1 y 10 ng/L de etinilestradiol (EE2) por 14 días. Con respecto de los organismos estudiados en El

Salto, los datos son similares a los observados en organismos expuestos a 100 ng/L de EE2 durante siete días reportados por los mismos autores (medidos como fósforo lábil en medio alcalino). El EE2 es el principal componente activo de las píldoras anticonceptivas, también es usado en las terapias de reemplazamiento estrogénico y en el tratamiento del cáncer de pecho, este compuesto es más resistente a la degradación que los estrógenos naturales (Verslycke *et al.*, 2002; Oropesa, 2008). Efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales de origen doméstico que descargan en ríos Británicos contienen un rango entre 0.2 y 7 ng/L EE2 (Desbrow *et al.*, 1998), mientras que en sedimentos de ríos de Cataluña (España) las concentraciones están el orden de 22.8 ng/g de peso seco (López de Alda *et al.*, 2002). Pawloski *et al.* (2004) reportan que organismos de la especie *Pimephales promelas* expuestos a 10 y 100 ng/L de EE2 muestran valores de ~100 µg/mL de vitelogenina, esta proteína fue medida directamente por la técnica de anticuerpos.

Los valores obtenidos en los organismos de los sitios de estudio muestran claramente que podrían estar expuestos a compuestos con capacidad de alterar el sistema endocrino. Las posibles fuentes de estos alteradores endocrinos para los sitios de Arcediano, Purgatorio y El Salto pueden ser las descargas directas de aguas residuales de la ZMG, ya que aunque no hay estudios al respecto, es probable que estas aguas negras contengan trazas de disruptores endocrinos procedentes del metabolismo de algunos fármacos (píldoras anticonceptivas), ó de la inadecuada disposición de los residuos por parte de las industrias. Otra fuente de contaminación son los lodos de plantas de tratamiento.

Elevadas concentraciones de vitelogenina han sido reportados en peces macho expuestos a efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y a aguas residuales (Hashimoto *et al.*, 2000; Tyler *et al.*, 2008). Los estrógenos son vitales para el desarrollo reproductivo, y una alteración en los niveles normales de circulación de hormonas podría tener serias implicaciones para futuros sucesos reproductivos (Harries, *et al.*, 1996).

6.2 Micronúcleos

Los efectos genotóxicos son a menudo los primeros signos relacionados con la contaminación del ambiente (Srut *et al.*, 2009).

El bazo es un órgano abdominal que suele ser único, aunque en ocasiones pueden encontrarse dos o más bazos menores. Está compuesto por un sistema de elipsoides esplénicos, Centros Melano Macrófagos (CMM) y tejido linfoide que en la mayoría de las especies aparece organizado formando cúmulos alrededor de los otros dos componentes (Olabuenaga, 2000).

Los elipsoides son capilares de paredes gruesas que se abren en la pulpa y que resultan de la división de las arteriolas esplénicas. En sus paredes aparecen macrófagos que participan activamente en la fagocitosis de antígenos, generalmente bajo la forma de complejos antígeno-anticuerpo o de productos metabólicos, material que puede ser retenido grandes periodos de tiempo y jugar un papel importante en el fenómeno de memoria inmune. Después de esta captación inicial, el material es transferido a los CMMs dentro de los macrófagos. Estos compartimientos son los principales filtradores del sistema vascular capaces de eliminar antígenos circulantes y células sanguíneas debilitadas (Espenes *et al.*, 1995).

Los CMM son acumulaciones de células pigmentadas que pueden encontrarse en el parénquima de órganos como el hígado, el riñón, y el bazo de peces (Fournie *et al.*, 2001). Los pigmentos que contienen son: melanina, hemosiderina y lipofuscina.

En general, los CMM permiten el almacenamiento, reciclaje y detoxicación de desechos celulares y sustancias exógenas, por lo que mantienen libre de estos compuestos a los organismos, además de que son puntos de acción del sistema inmune en contra de los microorganismos patógenos (Agius y Roberts, 2003). Debido a esto, una disminución en la densidad numérica de los eritrocitos implica una deficiencia en la respuesta inmunológica, así como una alteración de los procesos metabólicos del bazo.

Al encontrarse en el bazo la mayor cantidad de CMM, una afectación de este órgano se traduciría en un incremento de células dañadas en el torrente sanguíneo en los peces, lo que podría verse reflejado en un incremento de células micronucleadas.

Los resultados de micronúcleos muestran que los peces en todos los sitios estudiados muestran una frecuencia de MN/1000 dentro del rango de valores basales reportados en la literatura (Cuadro 6). Ciertas especies de peces pueden desarrollar una cinética de eliminación

de células o el desarrollo de mecanismos adaptativos de tolerancia a estrés químico que promueve un incremento en la tasa de reposición de células muertas o dañadas para mantener condiciones normales fisiológicas o de inhibición de la división nuclear que se requiere para la expresión de MN (Bolognesi y Hayasi, 2011), además de que algunos autores reportan que la prueba de MN tiene baja sensibilidad (Monteiro *et al.*, 2011) lo que podría estar relacionado con una baja ocurrencia de células micronucleadas en peces.

Cuadro 6. Frecuencia de MN en peces de los sitios de estudio. Los valores representan medias \pm Desviación estándar.

Especie	Sitio	Frecuencia⁺
<i>Oreochromis</i> sp	Arcediano*	0.400 \pm 0.43
	Purgatorio*	0.100 \pm 0.16
	El Salto*	0.066 \pm 0.14
	Miguel Hidalgo**	0.305 \pm 0.50
	Aguamilpa – Solidaridad***	0.083 \pm 0.16

*n=10 peces por sitio **n=12 peces ***n=4 peces
⁺Frecuencia reportada como media \pm desviación estándar

Las frecuencias de MN pueden variar de acuerdo al tipo de contaminante involucrado, a la estación y a la especie de pez (Yadav y Trivedi, 2009). El análisis estadístico no muestra diferencia significativa entre los sitios ($p=0.1765$) (Figura 9).

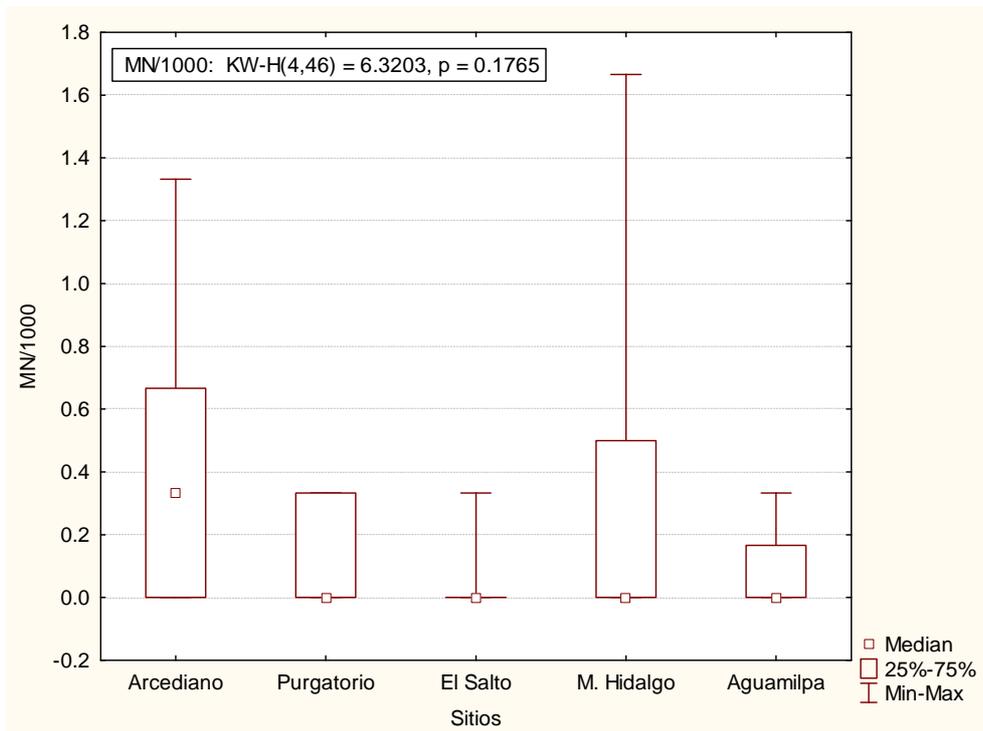


Figura 9. Frecuencia de MN en peces de cada sitio estudiado. A pesar de no haber diferencia significativa entre los sitios, la Presa M. Hidalgo presenta los valores máximos de frecuencia de MN. Las cajas representan la mediana y los percentiles 25 y 75. Las barras representan valores mínimos y máximos El análisis estadístico no muestra diferencia significativa ($p > 0.05$).

6.3 Ensayo cometa

El ensayo cometa es una técnica útil para el monitoreo de la genotoxicidad *in situ* (Osman *et al.*, 2012).

Este biomarcador solo fue posible analizarse en cuatro de los cinco sitios de estudio (debido al volumen de sangre obtenido de los organismos muestreados y al número de organismos de la Presa Aguamilpa – Solidaridad, no fue posible obtener muestra para realizar este análisis).

En el Cuadro 7 se muestran los resultados del ensayo cometa de los sitios de estudio. Se analizaron diez peces en Arcediano, seis en Purgatorio, siete en El Salto y ocho en la Presa Miguel Hidalgo, todos especies del género *Oreochromis* sp.

Los organismos colectados en Purgatorio (Río Verde) presentan valores más altos tanto de TL como de OTM que Arcediano y El Salto (Río Santiago). La diferencia se puede deber, entre otras cosas, a la concentración de As registrada en cada uno de los sitios de estudio tanto

en agua como en sedimento, la cual fue mayor en Purgatorio que en Arcediano y El Salto (Cuadros 7 y 8), lo cual coincide con Ahmed *et al* (2011), quienes reportan potencial genotóxico del As (como NaAsO₂) midiendo daño al ADN (medido con ensayo cometa) en branquias, hígado y sangre de *Oreochromis mossambicus*.

Para el caso de la Presa Miguel Hidalgo, el TL y el OTM son mayores que en el resto de los sitios, lo que nos indica que están más expuestos a contaminantes genotóxicos.

Cuadro 7. OTM, TL y As en agua y sedimento de los sitios de los sitios de estudio. Los valores de OTM y TL representan medias \pm SD. Los valores de As representan medias \pm Desviación estándar.

Especie	Sitio	OTM***	TL***	As agua ($\mu\text{g/L}$)	As sedimento (mg/L)
<i>Oreochromis</i> sp	Arcediano*	0.780 \pm 0.313	7.181 \pm 0.986	9.9 \pm 3.0	4.3 \pm 1.163
	Purgatorio**	1.421 \pm 0.835	9.368 \pm 2.467	20.7 \pm 5.0	5.3 \pm 1.745
	El Salto ⁺	1.290 \pm 0.315	7.993 \pm 0.452	5.7 \pm 0.4	8.652 \pm 2.957
	Miguel Hidalgo ⁺⁺	3.482 \pm 2.22	13.033 \pm 3.029	-----	-----

*n = 10 peces **n = 6 peces +n = 7 peces ++n = 8 peces
 ***Los valores representan medias \pm Desviación estándar

El análisis estadístico muestra diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los sitios en el TL (Figura 10). Los valores de TL de Arcediano y El Salto son inferiores a los reportados por González-Mille *et al* (2010) para *Mugil cephalus*, *Centropomus parallelus*, *Oreochromis* sp y *Ariopolis felis* en una zona de Coatzacoalcos, caracterizada por un alto nivel de industrialización y complejos petroquímicos, además de desarrollarse actividades productivas como la agricultura; la longitud de la cola del cometa de los organismos de Purgatorio es similar a *Ariopsis felis* (9.26 μm) y *Centropomus parallelus* (9.4 μm) del mismo estudio, mientras que los peces de la Presa Miguel Hidalgo presentan valores superiores a *Mugil cephalus* y *Oreochromis* sp (11.6 μm y 11.9 μm respectivamente), especies que mostraban mayor nivel de daño. Así como por debajo de los reportados por Fasulo *et al.*, (2010) en *Coris julis* en una zona caracterizada por una fuerte industrialización, urbanización densa y tráfico de buques cisterna que transportan petróleo crudo y refinado de las refinerías localizadas en este sitio (Milazzo, Italia).

Los valores reportados por Yang *et al.*, (2006) en peces *Ameiurus nebulosus* de tres sitios contaminados en EUA (Río Cuyahoga, con sedimentos contaminados con PAHs; Río Ashtabula, que en la actualidad presenta sedimentos contaminados con PAHs, bifenilos policlorados, bencenos clorados, otros productos químicos orgánicos, metales pesados y

radionúclidos; y estanque Ashumet, contaminada con tricloroetileno y otros solventes) también superan los encontrados en este estudio.

El que los organismos de los sitios de estudio presenten menor nivel de daño que los peces evaluados por los autores citados anteriormente puede deberse a diferencias interespecíficas que presentan las especies evaluadas, ya que diferencias interespecíficas en la capacidad de metabolizar compuestos contribuye a diferencias en la respuesta tóxica entre especies (Hatch y Burton, 1999), y a que los sitios evaluados por dichos autores presentan niveles de contaminantes genotóxicos, que se mencionan en párrafos anteriores.

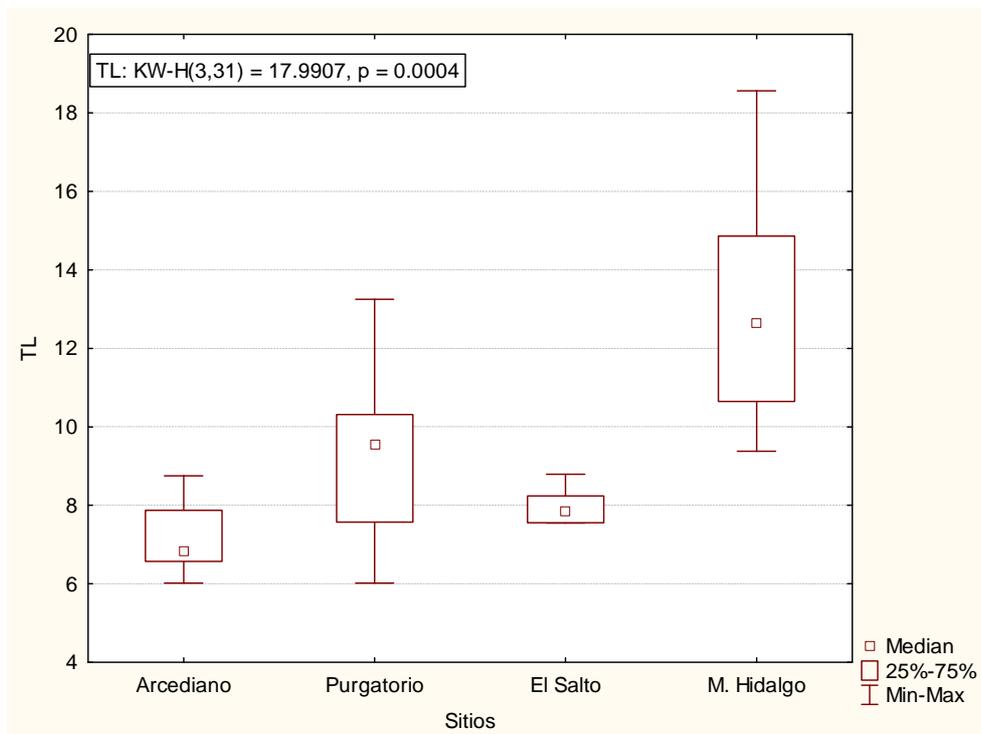


Figura 10. Longitud de la cola del cometa (TL) de los peces de los sitios de estudio. La mediana y los valores máximos de la Presa Miguel Hidalgo son mayores al resto de los sitios, lo que nos indica mayor cantidad de contaminantes genotóxicos en ese embalse. Las cajas representan la mediana y los percentiles 25 y 75. Las barras representan valores mínimos y máximos. El análisis estadístico muestra diferencia significativa.

En el caso del OTM, el análisis estadístico indica diferencia estadística significativa entre al menos un sitio ($p=0.0004$) (Figura 11).

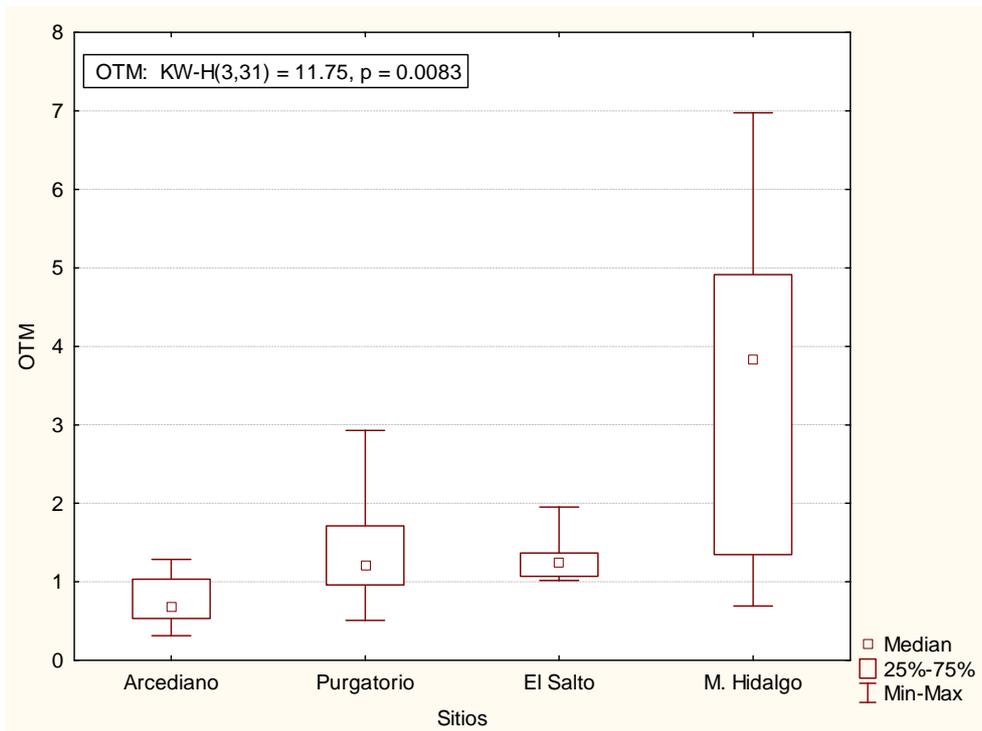


Figura 11. OTM de los peces de los sitios de estudio. La mediana y los valores máximos de la Presa Miguel Hidalgo son mayores al resto de los sitios, lo que nos indica mayor cantidad de contaminantes genotóxicos en ese embalse. Las cajas representan la mediana y los percentiles 25 y 75. Las barras representan valores mínimos y máximos. El análisis estadístico muestra diferencia significativa ($p < 0.05$).

Estos valores de OTM son menores a los reportados por Zhu *et al* (2011) en pez cebra (*Danio rerio*) expuestos a 2.5 mg/L de atrazina. También son menores a los valores reportados por Yang *et al* (2006) en la especie *Ameiurus nebulosus* de los tres sitios de referencia evaluados en su estudio. Los sitios de referencia fueron el Lago Old Women Creek ubicado en una cuenca agrícola y presenta concentraciones de PAHs en sedimentos y metabolitos biliares de PAHs en bagres, aunque menores que el Río Cuyahoga. Otro sitio de referencia fue el Río Conneaut, éste recibe tanto escorrentía agrícola como contaminantes del tráfico de buques, pero no recibe contaminantes de fuentes industriales. El tercer sitio de referencia fue Great Herring Pond, este sitio fue seleccionado porque aunque tiene tráfico de barcos, que pueden derramar combustibles contribuyendo con metales, pero no existen descargas industriales conocidas.

Los valores medios reportados por González-Mille *et al* (2010) en una zona de Coatzacoalcos, Veracruz, también superan a los de este estudio. Con respecto a este mismo

estudio, estos autores reportan para *Oreochromis* sp un OTM de 3.5 (rango de 0.2-8.1), lo cual está por encima de los valores medios encontrados en este estudio.

Al igual que en la longitud de la cola del cometa, las diferencias entre los sitios evaluados en este estudio y los citados anteriormente puede deberse a variaciones interespecíficas que presentan las especies evaluadas y a que los sitios evaluados por dichos autores presentan altos niveles de contaminantes genotóxicos. A pesar de que los peces de los sitios de estudio presentan niveles de daño inferior a los citados anteriormente, es un hecho que presentan daño, el cual puede ser atribuido, entre otros tóxicos, al As evaluado en los sitios.

Con base a los resultados obtenidos podemos afirmar que el ensayo cometa puede ser utilizado para evaluar el daño al ADN en ambientes con bajo nivel de contaminación o para evaluaciones de toxicidad aguda, ya que es lo suficientemente sensible para reflejar el daño en ambientes poco impactados.

El daño al ADN es evidencia de la exposición de los organismos a contaminantes genotóxicos, la diferencia entre el ensayo cometa y la prueba de micronúcleos radica en que el ensayo cometa mide solamente el nivel de daño al ADN, pero no los mecanismos de defensa celular de los peces, por lo que es probable que los peces tengan o estén desarrollando una cinética de eliminación de células dañadas y por esa razón la frecuencia de micronúcleos este dentro de los límites basales reportados en la literatura, esto por un lado, y por el otro que la formación de MN depende de la replicación de la célula, mientras que la fragmentación del ADN puede ser más rápidamente inducida. Lo que concuerda con Srut *et al.*, (2009) quienes reportan que a pesar de que la prueba de micronúcleos y el ensayo cometa muestran un gradiente similar de daño al ADN, el ensayo cometa es más sensible para medir el daño genotóxico, de manera similar Costa *et al.*, (2008) reportan que a pesar de que el ensayo cometa es más sensible que la prueba de micronúcleos, ambos análisis son complementarios. Osman *et al.*, (2012) reportan que el ensayo cometa es más sensible que la prueba de micronúcleos para niveles bajos de toxicidad.

6.4 Relación entre Arsénico y biomarcadores de genotoxicidad.

La selección del As se realizó considerando factores como: la comparación entre las concentraciones ambientales y los valores de referencia (normas y guías ambientales); la persistencia ambiental; las características toxicológicas; la presencia del contaminante en todos los medios (agua y sedimento), la capacidad técnica para evaluar los compuestos y el presupuesto destinado para la investigación.

El As es una de las sustancias más peligrosas liberadas en el ambiente acuático como resultado de procesos geogénicos y actividades humanas, puede ser carcinogénico dependiendo de la forma química y el tiempo de exposición. Los peces son particularmente vulnerables al As en ambientes acuáticos ya que continuamente los están tomando a través de la respiración branquial y la ingestión de alimentos contaminados (Ahmed *et al.*, 2001).

En especies acuáticas hay evidencia de que la exposición a arsenito de sodio provoca: 1) aumento en la citotoxicidad en células de peces, estrés oxidativo y disminución de la actividad de enzimas antioxidantes en poliquetos y *Clarias batrachus* expuestos al As_2O_3 (Wang *et al.*, 2004; Seok *et al.*, 2007; Ventura-Lima *et al.*, 2007; Ventura-Lima *et al.*, 2008); 2) incremento en las respuestas antioxidantes en branquias del pez cebra *Danio rerio* expuesto al arseniato por dos días (Ventura-Lima *et al.*, 2008); 3) estrés oxidativo y modulación del sistema antioxidante en hígado de *Carassius auratus* expuesto a arsenito (Bagnyukova *et al.*, 2007) y 4) alteraciones en el sistema antioxidante en diferentes tejidos de carpa común (*Cyprinus carpio*) después de la exposición al arsenito y arseniato (Ventura-Lima *et al.*, 2008).

En el Cuadro 8 se muestran los valores de As en agua y sedimento de los sitios de estudio. Los datos de los sitios Arcediano, Purgatorio y El Salto fueron proporcionados por el Departamento de Toxicología Ambiental de la Facultad de Medicina, y se generaron a la par de esta investigación, los datos de la Presa Aguamilpa se obtuvieron de revisiones bibliográficas, y de la Presa Miguel Hidalgo no se encontraron reportes en la literatura.

Cuadro 8. Valores de As encontrados en los sitios de estudio.

Sitio	Sedimento mg/Kg	Agua µg/L
Arcediano	4.30 ± 1.163	9.90 ± 3.00
Purgatorio	5.30 ± 1.745	20.07 ± 5.00
El Salto	8.652 ± 2.957	5.70 ± 0.40
P. Miguel Hidalgo	-----	-----
P. Aguamilpa – Solidaridad	13.695 [†]	-----
Valores Guía*	5.9	5

Los valores representan medias ±desviación estándar
[†]dato reportado por Zambrano *et al.*, 2011

*Valores Guía de la Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life y Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life

El análisis de X^2 entre los datos de As en los sitios y la presencia de MN no muestra una asociación entre estas dos variables ($p=0.235$) (Cuadro 9, Figura 12).

Cuadro 9. Porcentaje de organismos categorizados según el tipo de daño (MN)

		Tipo de daño			Total
		Ausencia MN	Presencia MN	P. Moderada MN	
Sitios	Arcediano	40%	20%	40%	100%
	Purgatorio	70%	30%	0	100%
	El Salto	80%	20%	0	100%
	M. Hidalgo	58%	17%	25%	100%
	Aguamilpa – Solidaridad	75%	25%	0	100%
Chi-cuadrado de Pearson = 10.454, p = 0.235					

Es necesario resaltar que esta prueba nos indica si existe o no una relación entre variables, pero no dice el grado o tipo de relación, es decir, no indica el porcentaje de influencia de una variable sobre la otra o la variable que causa la influencia (Tinoco, 2008).

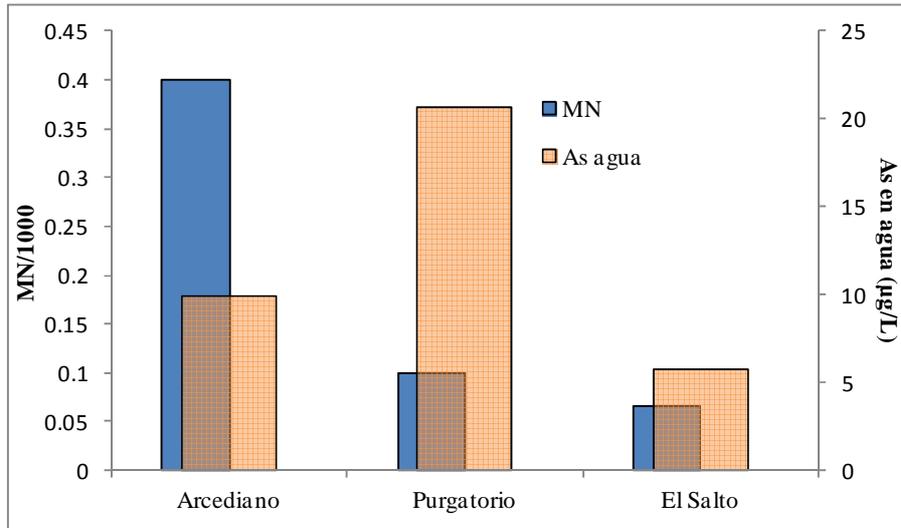


Figura 12. Relación entre As en agua y MN. El análisis de X² no muestra asociación entre estas dos variables ($p > 0.05$). Las barras representan media \pm Desviación estándar de cada sitio.

Ahmed *et al.*, (2011) encontraron una asociación entre las concentraciones de As (como NaAsO_2) y la frecuencia de MN en *Oreochromis mossambicus* expuestos por 96 y 192 horas, estos autores reportan un incremento del doble en la frecuencia de MN en los organismos expuestos a 3 ppm de NaAsO_2 a las 96 horas con respecto a los controles, y de cinco y seis veces más en los expuestos a 28 y 56 ppm respectivamente del mismo tóxico. Yadav y Trivedi (2009) reportaron inducción significativa de MN en *Channa punctata* expuestos a Mercurio (0.081 ppm de HgCl_2), As (6.9 ppm de As_2O_3) y Cobre (0.4 ppm de $\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) con respecto a los controles a las 72, 92 y 168 horas. Si bien los datos que obtuvieron los autores citados anteriormente difieren de los que se encontraron en los sitios de estudio esto se le atribuye a: i) las concentraciones a las que fueron expuestos son tres órdenes de magnitud mayores a las que estaban expuestos los peces de los sitios de estudio, ii) los organismos fueron expuestos al As en su forma más tóxica (As^{III}), mientras que en los sitios de estudio desconocemos en que forma está el As, iii) los peces fueron expuestos a una exposición aguda, y como ya se había mencionado estos organismos tienen la capacidad de generar mecanismos de defensa que les permite desechar células dañadas, por lo que es posible que los peces de los sitios de estudio ya los tengan o estén desarrollando, y iv) diferencias interespecíficas.

En el caso de la fragmentación del ADN se encontró una asociación entre la longitud de la cola del cometa y la presencia de As mediante la prueba de X^2 de independencia ($p=0.007$) (Cuadro 10, Figura 19), lo que concuerda con Ahmed *et al.*, (2011) quienes demuestran en su estudio que el As induce daño al ADN (evaluado con el ensayo cometa) en exposiciones tempranas (organismos juveniles) a este elemento.

Cabe mencionar que a pesar de que no tenemos el dato de la presencia de As en agua o sedimento en la Presa Miguel Hidalgo, por el resultado que arroja la asociación entre la fragmentación del ADN y la presencia de As, podemos suponer que este elemento ó algún otro genotóxico está presente en este embalse en concentraciones mayores al resto de los sitios. Esta asociación se puede ver claramente en la Figura 13.

Cuadro 10. Porcentaje de organismos categorizados según el tipo de daño (Ensayo cometa, TL)

		Tipo de Daño				Total
		Sin Daño	Leve	Moderado	Alto	
Sitios	Arcediano	0	0	80%	20%	100%
	Purgatorio	0	0	33%	67%	100%
	El Salto	0	0	57%	43%	100%
	M. Hidalgo	0	0	0	100%	100%
Chi-cuadrado de Pearson = 12.234, p = 0.007						

Si bien es cierto que la longitud de la cola del cometa y el As están asociados, no podemos atribuirle estos efectos solo a este tóxico, ya que los peces están expuestos a una mezcla compleja de contaminantes provenientes de descargas domésticas, agrícolas e industriales.

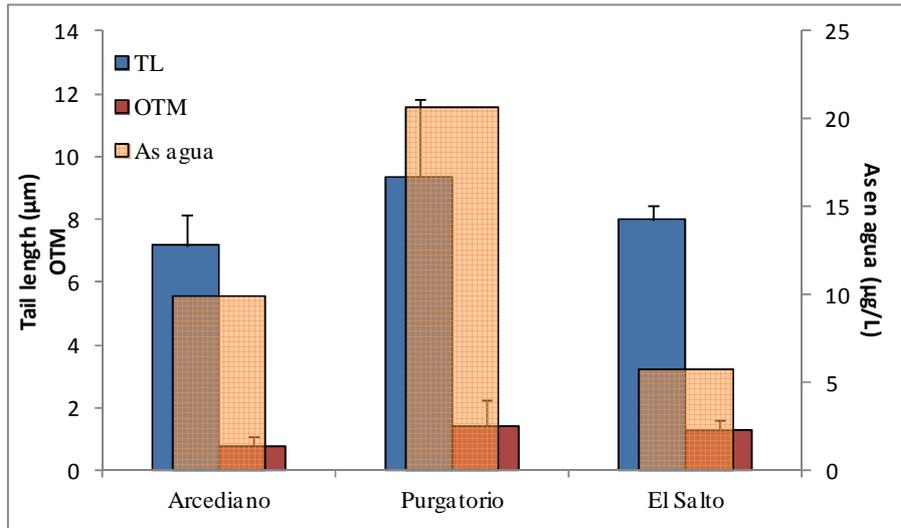


Figura 13. Relación entre As en agua y Longitud de la cola (TL) y el momento (OTM) del cometa. El análisis de X2 muestra asociación entre estas dos variables ($p < 0.05$). Las barras representan media \pm Desviación estándar de cada sitio.

CAPITULO 7. CONCLUSIONES

Los valores reportados de vitelogenina y fragmentación del ADN pueden ser atribuidos a la mezcla de contaminantes presentes en los sitios de estudio ya que estos sitios son receptores de efluentes agrícolas, domésticos e industriales. De continuar expuestos a mayores cantidades de este tipo de tóxicos puede existir la posibilidad de una disminución en la población de esta especie por dos razones: primero, células germinales de estos organismos podrían verse afectadas y segundo, al existir la posibilidad de reversiones sexuales. Al ser una especie de importancia comercial y fuente de proteínas para el hombre, una disminución en sus poblaciones podría poner en riesgo la seguridad alimentaria.

Los niveles de vitelogenina observados en los organismos evaluados en los diferentes sitios nos hacen suponer que se encuentran expuestos a sustancias con capacidad de alterar el sistema endocrino.

La frecuencia de MN de los organismos de los sitios de estudio debe tomarse con reserva ya que como se explicó anteriormente los peces desarrollan mecanismos de defensa que les permiten eliminar células dañadas.

El ensayo cometa nos reveló que los organismos muestran daño al ADN. Dado los resultados del presente estudio se sugiere la utilización del ensayo cometa (debido a que es

más sensible que la prueba de MN) para la evaluación de daño al ADN en ambientes con bajo nivel de contaminación o evaluaciones de toxicidad aguda. El As está asociado al daño celular medido como ensayo cometa, sin embargo no es posible asociar este efecto solo a este contaminante, ya que es bien reconocido que una combinación de efectos sinérgicos puede causar este tipo de daños.

Si bien el uso de biomarcadores no nos permite saber exactamente a qué contaminantes están expuestos los organismos en los cuerpos de agua, si nos permite priorizar sitios que necesiten monitoreo, vigilancia e intervención. Pero se debe tener en cuenta que no todos los biomarcadores son adecuados para todos los cuerpos de agua, el uso del biomarcador apropiado depende del tipo de contaminante y la sensibilidad del biomarcador.

En base a los resultados obtenidos se propone establecer un programa de monitoreo usando a la especie *Oreochromis* sp por su amplia distribución geográfica, que incluya como biomarcadores la fragmentación del material genético mediante el ensayo cometa (por la sensibilidad mostrada) y vitelogenina, por presentar estos biomarcadores dos de los efectos más importantes que se pueden presentar en organismos expuestos a sustancias tóxicas, incluir además más biomarcadores que respondan a otro tipo de contaminantes como una alternativa al análisis químico en matrices ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

- Agius C y Roberts J.R. (2003). Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26:499-509.
- Ahmed, K., Al-Mamun, H., Hossain, A., Arif, M., Parvin, E., Akter, M.S., Khan, M.S., y Islam, M. (2011). Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere*, 84:143-149.
- Albers, P.H. (1995). En "Handbook of Ecotoxicology" (Hoffman DJ *et al.* eds.), Lewis publishers. Boca raton. Pp 330-355.
- Ankley, G., Mihaich, E., Stahl, R., Tillitt, D., Colborn, T., McMaster, S., Miller, R., Bantle, J., Campbell, P., Denslow, N., Dickerson, R., Folmar, R., Fry, M., Giesy, J., Gray, L.E., Guiney, P., Hutchinson, T., Kennedy, S., Kramer, V., LeBlanc, G., Mayes, M., Nimrod, A., Patino, R., Peterson, R., Purdy, R., Ringer, R., Thomas, P., Touart, L., Van Der Kraak, G., y Zacharewski, T. (1998). Overview of a workshop on screening methods for

- detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. Annual Review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17:68-87
- Aranguré, F.J., Zambrano, R.M., González, L., y Robledo, M.L. (2011). Evaluación de los niveles de contaminación por residuos de plaguicidas organoclorados en sedimentos y peces, de la presa Aguamilpa, Nayarit, México. *Waxapa*, 3:20-35.
- Arcand-Hoy L.D. y Benson W.H. (1997). Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. Annual Review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:49-57.
- Arencibia, D.F., y Rosario, L.A. (2009). Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *In vivo*. *Revista de Toxicología en Línea*, 24-41
- Arias Patrón, E. (2005). Plan de acción para el uso eficiente de agua dulce en el Golfo de California. Reporte técnico final para WWF. 64 p.
- Arukwe, A., y Goksøyr, A. (2003). Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology*, 1-21.
- Badgonas, E. y Lazutka, J.R. (2007). Evaluation of DNA damage by means of the comet assay and micronucleus test in erythrocytes of Prussian carp (*Carassius auratus gibelio*) infected with ulcerative disease. *BIOLOGIJA*, 53:1-5.
- Bagnyukova, T.V., Luzhna, L.I., Pogribny, I.P., y Lushchak, V.I. (2007). Oxidative stress and antioxidants defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. *Environ. Mol. Mut.*, 48:658-665.
- Baker M.M., Cairncross C., y Kocan R.M. (1997). Possible effects of polychlorinated biphenyls on sex determination in rainbow trout. Annual review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:26-26
- Brasfiel, S.M., Weber, L.P., Talent, L.G., y Janz, D.M. (2001). Dose-response and time course relationships for vitellogenin induction in male western Fence Lizards (*Sceloporus occidentalis*) exposed to ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21:1410-1416.
- Björklund, G., Burke, J., Foster, S., Rast, W., Vallée, D., y Van Der Hoek, W. (2009). Chapter 8 Impacts of water use on water systems and the environment. En P. M. Hidricos, *Informe sobre el Desarrollo de los recursos hidricos en el mundo* (págs. 127-149).
- Bolognesi, C., y Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 205-213.

- Bony, S., Gaillard, I., y Devaux, A. (2009). Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in zebrafish. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 90:421-428.
- Bozo, L., Fernández, M., López, M., Reyes, R., y Suárez, P. (2007). Biomarcadores de contaminación química en comunidades microbianas. *INTERCIENCIA*, 8-13.
- Cakal, O., Parlak, H., Katalay, S., Boyacioglu, M., Ali, M., y Guner, H. (2010). Detecting micronuclei frequency in some aquatic organisms for monitoring pollution of Izmir Bay (Western Tukey). *Environ Monit Assess*, 165:55-66.
- Cavas, T. (2011). In vivo genotoxicity evaluation of atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 49:1431-1435
- Comisión Nacional del Agua. (2011). *Estadísticas del Agua en México, edición 2011*. Cd. de México: Unidad de Comunicación Social de la Comisión Nacional del Agua.
- Costa, P.M., Lobo, J., Caeiro, S., Martins, M., Ferrerira, A.M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T., y Costa, M.H. (2008). Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 654:29-37.
- Cotler, H. (2010). *Las cuencas hidrográficas de México*. Cd de México: Instituto Nacional de Ecología.
- Da Silva, R.R.P., Pires, O.R., y Grisolia, C.K. (2011). Genotoxicity in *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) inducida by *Microcystis* spp bloom extract containing microcystins. *Toxicon*, 58:259-264.
- De la Torre, F.R. (2007). Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere*, 1582-1590.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., y Waldock, M. (1998). Identification of Estrogenic Chemicals in STW effluent. 1. Chemical Fractionation and in vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology*, 32:1549-1558.
- Dubé, M.G., Munkittrick, K.R., y Hewitt, M. (2008). Case Study: Pulp and paper Mill Impacts. En: *The toxicology of fishes* R. Di Giulio, & D. Hinton, (págs. 933-971). Taylor & Francis Group.
- Espenes A., Press C.M.L., Danneving D.H. y Landsverk T. (1995). Immune-complex trapping in the splenic ellipsoids of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res* 228:41-48.

- Espinosa-Reyes, G. (2009). *DISEÑO Y APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN DE RIESGO ECOLÓGICO PARA FAUNA TERRESTRE*. Tesis de doctorado no publicada, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
- Fasulo, S., Marino, S., Mauceri, A., Maisano, M., Giannetto, A., D'Agata, A., Parrino, V., Minutoli, R., y De Domenico, E. (2010). A multibiomarker approach in *Coris julis* living in a natural environmental. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73:1565-1573.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsh-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., y Zeiger, E. (2003). Human micronucleus project. Human project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res*, 534:65-75.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., y Guillete, L.J. (1996). Vitellogenin Induction and Reduced Serum Testosterone Concentrations in Feral Male Carp (*Cyprinus carpio*) Captured Near a Major Metropolitan Sewage Treatment Plant. *Environmental Health Perspectives*, 1096-1101.
- Folmar, L.C., Hemmer, M.R., Bowman, C., Kroll, K., y Denslow, N.D. (2000). Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an *In vivo*, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. *Aquat Toxicol*, 49:77-88.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Kroll, K., Orlando, E.F., Enblom, J., Marcino, J., Metcalfe, J.C., y Guillette, L.J., (2001). Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Arch Environ Contam Toxicol*, 40:392-398.
- Fournie, J., Summers, J., Courtney, L., Engle, V., y Blazer, V., (2001). "Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments", *Journal of aquatic animal health*, 13(2):105-116.
- Fujita, T., Fukada, H., Shimizu, M., Hiramatsu, N., y Hara, A. (2008). Monthly changes in the serum levels of two choriogenins and vitellogenin in male masu salmon *Oncorhynchus masou*. *FISHERIES SCIENCE*, 1198-1200.
- Galindo, B.A., Troilo, G. Colus, M.S., Martinez, C.B.R., y Sofia, S.H (2010). Genotoxic effects of Aluminum on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Water Air Soil Pollut*, 212:419-428.
- García-Cabrera, J. (2007). Plancton como indicador de la calidad del agua de la Presa Aguamilpa. *Tecnología y Ciencias del Agua*.

- Gillesby, B.E. y Zacharewski, T.R. (1997). Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17:3-14.
- Gómez-Ponce M.A., Granados-Flores K., Padilla C., López Hernández M., Núñez-Nogueira G. (2010). Edad y crecimiento del híbrido de Tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* (Perciformes: Cichlidae) en la represa “Zimapán” Hidalgo, México. *Rev. Biol. Trop.* 59(2): 761-770.
- González-Mille, D. J. (2010). *Aplicación de una Metodología de Evaluación de Riesgo Ecológico en fauna acuática de Coatzacoalcos, Veracruz*. Tesis de doctorado no publicada, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
- González-Mille, D.J., Ilizaliturri-Hernández, C.A., Espinosa-Reyes, G., Costilla-Salazar, R., Díaz-Barriga, F., Ize-Lema, I., y Mejía-Saavedra, J. (2010). Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, México. *Ecotoxicology*, 19:1238-1248.
- Guzmán, M., Peniche, S., López, M., y Peña, L. (2009). La calidad del agua en el Río Santiago. En: Estudios de la cuenca del Río Santiago. Un enfoque multidisciplinario. Compiladores: Salvador Peniche Camps & Manuel Guzmán Arroyo. Pp 201.
- Hafez, A.M. (2009). Mugil cephalus Genome: A Sensitive Monitor for Genotoxicity and Cytotoxicity in Aquatic Environment. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, III (3), 2176-2187.
- Hallgren, P., Martensson, L., y Mathiasson, L. (2009). Improved spectrophotometric vitellogenin determination via alkali-labile phosphate in fish plasma – a cost effective approach for assessment of endocrine disruption. *Intern. J. Environ. Anal. Chem*, 89:1023-1042.
- Handy, R.D., Galloway, T.S., y Depledge, M.H. (2003). A Proposal for the Use of Biomarkers for the Assessment of Chronic Pollution and in Regulatory Toxicology. *Ecotoxicology*, 331-343.
- Harries, J.E., Sheahan, D. A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Taylor, T., y Zaman, N. (1996). Estrogenic Activity in five United Kingdom Rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16:534-542.
- Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T., y Fujita, K. (2000). Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohame*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environmental Research*, 49:37-53.

- Hatch, A.C., y Burton, G.A. (1999). Photo-induced toxicity of PAHs to *Hyaella azteca* and *Chironomus tentans*: effects of mixtures and behavior. *Environmental Pollution*, 106:157-167.
- Hiramatsu, N., Matsubara, T., Fujita, T., Sullivan, C. V., y Hara, A. (2006). Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Marine Biology*, 35-47.
- Hoshina, M.M., de Angelis, D.F., y Marin-Morales, M.A. (2009). Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 656:44-48.
- Hutchinson, T., Ankley, G., Segner, H., y Tyler, C. (2006). Screening and Testing for Endocrine Disruption in Fish—Biomarkers As “Signposts,” Not “Traffic Lights,” in Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*, 106-114.
- Jobling, S., y Sumpter, J.P. (1993). Detergent component in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol*, 27:361-372.
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G., Sumpter, J., y Tayler, C.R. (2002). Altered Sexual Maturation and Gamete Production in Wild Roach (*Rutilus rutilus*) Living in Rivers That Receive Treated Sewage Effluents. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 272-281.
- Kime, D.E., Nash, J.P., y Scott, A.P. (1999). Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture*, 345-352.
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., y Jha, A.N. (2009). Comet assay measurements: a perspective. *Cell. Biol. Toxicol*, 25:53-64.
- Liney, K., Hagger, J., Tyler, C., Depledge, M., y Galloway, T. (2006). Health Effects in Fish of Long-Term Exposure to Effluents from Wastewater Treatment Works. *Environmental Health Perspectives*, 81-89.
- López de Alda, M.J., Gil, A., Paz, E., y Barceló, D. (2002). Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *Analyst*, 127:1299-1304.
- López, Q., Solís, B., y Gonsebatt, M.E. (2001). El ensayo de Micronúcleos (MN) en epitelio branquial de peces como un modelo experimental para determinar la presencia de cromatos genotóxicos en el ambiente acuático. *SCIENTIAE NATURAE*, 15-23.
- Manahan, S.E. (2007). *Introducción a la Química Ambiental*. (I. Mora Leyva, Trad.) Ciudad de México: Reverté S.A.

- Martínez-Valenzuela, C., y Gómez-Arroyo, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23 (4), 185-200.
- McCullingh, C., Paez, J.C. y Moya, G. (2007). Mártires del Río Santiago, Informe sobre violaciones al derecho a la salud y a un medio ambiente sano en Juanacatlán y El Salto, Jalisco, México. México: Ed. Instituto Mexicano para el desarrollo comunitario, A.C.
- McKim, J.M., y Lien, G.J. (2001). Toxic responses of the Skin. En: *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*, D. Schlenk and W. H. Benson. (págs. 151-223) Taylor and Francis group.
- McMaster M.E., Van Der Kraak G.J., Portt C.B., Munkittrick K.R., Sibley P.K., Smith I.R. y Dixon D.G. (1991). Changes in hepatic mixed-function oxidase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached kraft mill effluent. *Aquat Toxicol* 21:199–218.
- Mendoza R., Contreras S., Ramírez C., Koleff P., Álvarez P y Aguilar V. (2007). Los peces diablo: Especies invasoras de alto impacto. CONABIO. *Biodiversitas* 70:1-5
- Monte, E.L.C., dos Santos, P.E., do Amaral, V.S., de Medeiros, S.R.B., y Agnez-Lima, L.F. (2010). Use of native species *Crenicichla menezesi* (Ariidae) as a model for *in situ* evaluation of genotoxicity in surgace water. *Science of the Total Environmental*, 408:6042-6046
- Monteiro, V., Cavalcante, D.G.S.M., Viléla, M.B.F.A., Sofia, S.H., y Martinez, C.B.R. (2011). *In vivo* and *In vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology* 104:291-298.
- Mount, R.D., y Henry, T.R. (2008). Ecological Risk Assessment. En: *The toxicology of fishes*, R. T Di Giulio & D. E. Hinton, (pags 757-778). Taylor & Francis.
- Munkittrick K.R., Portt C.B., Van Der Kraak G.J., Smith I.R., Rokosh D.A. (1991). Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Can J Fish Aquat Sci* 48:1371–1380.
- Navas, J.M. (2004). Los disruptores endocrinos en la Unión Europea y la OECD. En: Curso de alto nivel sobre evaluación de riesgos ambientales. Módulo 2. Sustancias químicas, pp 3-4.
- Nilsen, B.M., Berg, K., Eidem, J.K., Kristiansen, S.I., Brion, F., Porcher, J.M., y Goksoyr, A. (2004). Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Anal Bioanal Chem*, 621–633.

- Olabuenaga S. (2000). Fish Immune System. Gayana (Concepc) [online]. 2000, vol.64, n.2 [citado 2012-11-09], pp. 205-215. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-65382000000200010&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0717-6538. doi: 10.4067/S0717-65382000000200010.
- Omar, W.A., Zaghoul, K.H., Abdel-Kahlek, A.A., y Abo-Hegab, S. (2012). Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 746:7-14
- Osman, A.G.M., Abuel-Fadl, K.Y., y Kloas, W. (2012). In situ evaluation of the genotoxic potential of the river Nile: II. Detection of DNA strand-breakage and apoptosis in *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. ARTICLE IN PRESS.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Departamento de Pesca y Acuicultura. Programa de Información de especies acuáticas. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) Disponible en línea: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es
- Oropesa, A. L. (2008). Disruptores endocrinos en el medio ambiente: Caso del 17-a-etinil-estradiol. *Obseratorio Medioambiental*, 63-76.
- Olive, P.L., y Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1:23-29.
- Pawlowski, S., van Aerle, R., Tyler, C., y Braunbeck, T. (2004). Effects of 17a-ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 330-345.
- Pignata, M.L. (2003). Curso empleo de biomonitores en estudios de contaminación atmosférica. Auspiciado por Swiss contact, Instituto de Ecología, La Paz Bolivia.
- Pottinger, T.G., Pulman, K.G.T., Carrick, T.R., y Scott, A.P. (2005). Evaluatiuon of biochemical methods for the non-destructive identification of sex in upstream migrating salmon and sea trout. *Journal of Fish Biology*, 67:1514-1533.
- Prieto, Z., León-Incio, J., Quijano-Jara, C., Fernández, R., Polo-Benites, E., Vallejo-Rodríguez, R., y Villegas-Sánchez, L. (2008). Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (TILAPIA). *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 51-58.

- Quirós, L., Ruíz, X., Sanpera, C., Jover, L., y Piña, B. (2008). Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N.E. Spain). *Environmental Pollution*, 81-87.
- Rangel-Peraza, J.G., De Anda, J., González-Farías, F.A., Erickson, D.E. (2009). Water quality assessment of Aguamilpa Reservoir, Nayarit, México. *Water Resources Management*, 125:169-183.
- Reis-Henriques, M., Ferreria, M., Coimbra, A., Silva, C.D., Costa, J., y Shailaja, M.S. (2009). Efectos del fenantreno y el nitrito en juveniles del róbalo, *Dicentrarchus labrax*, mediante el uso de enzimas hepáticas biotransformadoras, fluorescencia biliar y micronúcleos como biomarcadores. *Ciencias Marinas*, 35 (1), 29-40.
- Rivas, A., Granada, A., Jiménez, M., Olea, F., y Olea, N. (2004). Exposición humana a disruptores endócrinos. *Ecosistemas*, 7-12.
- Rodríguez Arnaiz, R. (2003). *Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos* (Cuarta edición ed.). Ciudad de México: Fondo de Cultura Económica.
- Rotchell, J.M., y Ostrander, G.K. (2003). Molecular markers of Endocrine Disruption in aquatic organism. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 6:453-495.
- Schlenk, D., Handy, R., Steinert, S., Depledge, M., y Benson, W. (2008). Biomarkers. En: *The toxicology of fishes* R. Di Giulio, & D. Hinton, (págs. 683-713). Taylor & Francis Group.
- Schultz, D.R., Perez, N., Mendez, A.J., Snodgrass, D., Serafy, J.E., Prince, E.D., Crow, W.A., y Capo, T.R. (2006). Tracking gender factors in fish surface mucus: temporal patterns in individual Koi (*Cyprinus carpio*). *J. Appl. Ichthyol*, 184-188.
- Schultz I. (2002). Environmental Estrogens: Occurrence of Ethynylestradiol and Adverse Effects on Fish Reproduction. En: *Fundamentals of Ecotoxicology* Newman M.C., y Unger M.A. Editorial Lewis Publishers Segunda Edición Pp1-458
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2011). Sinaloa. Programa agroalimentario y Pesquero 2011. ISBN en trámite.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010). *Compendio de Estadísticas ambientales 2010*. Cd de México: SEMARNAT.
- Secretaría de Desarrollo Urbano (SEDEUR) de Jalisco. (2010). Plan de Desarrollo de la Región 12 Centro. Diagnóstico Estratégico Regional.

- Seok, S.H., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Na, Y.R., Noh, K.J., Park, S.H., Lee, H.K., Lee, B.H., Ryu, D.Y., Park, J.H. (2007). Arsenite induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. *Toxicol. In vitro*, 21:870-877.
- Silberverg, E. (2001). Toxicología. Herramientas y enfoques. En O. I. Trabajo, *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo* (págs. 33.2-33.76). España: Sociedad Española para el estudio de la ansiedad y el estrés.
- Sparre, P. y Venema, S.C. (1997). Introduction to tropical fish stock assessment. Part 1. Manual. *FAO. Fisheries Technical paper*. No. 306.1, Rev 2, Rome (en prensa).
- Sponchiado, G., Lucena, E.M., de Andrade, A.C., Carvalho, E., Adam, M.L., y Ribas, C.M. (2011). Genotoxic effects in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* exposed to nanograms-per-liter concentration of 17 β -Estradiol (E2): An assessment using micronucleus test and comet assay. *Water Air Soil Pollut*, 218:356-360.
- Srut, M., Stambuk, A., Pavlika, M., y Klobucar, G. (2009). Cage exposure of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) for *in situ* assessment of pollution-related genotoxicity. *Arh Hig Rada Toksikol*, 61:29-36.
- Suter II G.W. (1993). Ecological Risk Assessment. Editorial Lewis Publishers Pp 1- 538.
- Tinoco Gómez, O. (2008). Una aplicación de la prueba chi cuadrado con SPSS. *Industrial data*, 11,73-77.
- Tyler, C.R., Routledge, E.J., y van Aerle, R. (2008). Estrogenic effects of treated sewage effluent on fish: steroids and surfactants in English Rivers. En: *The Toxicology of fishes*. Editores: Richard T. Di Giulio y David E. Hinton (págs. 971-1003). Taylor y Francis Group.
- Van Den Delt, K., Wester, P.W., Van Der Ven, L.T., Verheyen, R., y Witters, H. (2002). Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 (4), 767-775.
- Van Ngan, P., Gomes, B., Passos, M.J., Ussami, K.A., Campos, D., Rocha, A., y Pereira, B. (2007). Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz", King George Island. *Polar Biol*, 30:209-217.
- Vega-Villasante F., Cortés-Lara M.C., Zúñiga-Medina L.M., Jaime-Ceballos B., Galindo-López J., Basto-Rosales E.R., y Nolasco-Soria H. (2010). Cultivo de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) a pequeña escala ¿alternativa alimentaria para familias rurales y periurbanas de México?. *Revista electrónica de veterinaria*. 11:1-15

- Verslycke, T., Vandenberg, G. F., Versonnen, B., Arijs, K., y Janssen, C. R. (2002). Induction of vitellogenesis in 17 α -ethinylestradiol-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a method comparison. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 483-492.
- Ventura, B.C., de Angelis, D.F., Marin-Morales, M.A. (2007). Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by micronucleus test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90:42-51.
- Ventura-Lima, J., Sandrini, J.Z., Ferreira-Cravo, M., Piedras, F.R., Moraes, T.B., Fattorini, D., Notti, A., Regoli, F., Geracitano, L.A., Marins, L.F. y Monserrat, J.M. (2007). Toxicological responses in *Laeonereis acuta* (Annelida, Polychaeta) after arsenic exposure. *Environ. Int.*, 33:559-564.
- Ventura-Lima, J., Reis Bogo, M., y Monserrat, J.M. (2008). Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: a comparative biochemical approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74:211-218.
- Villela, V.I., Marques de Oliveira, I., Coelho, S.J., Ferraz, D.J., Pegas, H.J., y da Silva J. (2007). Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research*, 76-86.
- Wallace, R.A., y Jared, D.W. (1968). Studies on amphibian yolk. VII. Serum phosphoprotein synthesis by vitellogenic females and estrogen-treated males of *Xenopus laevis*. *Can J Biochem*, 46:953-959
- Wang, Y.C., Chaung, R.T., y Tung, L.C. (2004). Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines. *Aquatic Toxicology*, 6:67-69.
- Wheeler, J.R., Gimeno, S., López-Juez, E., y Morrill D. (2005). Vitellogenin: A Review of Analytical Methods to Detect (Anti) Estrogenic Activity in Fish. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 293-306.
- Yadav, K.K. y Trivedi, S.P. (2009). Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*. *Chemosphere*, 77:1495-1500.
- Yang, X., Meier, J., Chang, L., Rowan, M., y Bauman, P.C. (2006). DNA damage and external lesions in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from contaminated habitats. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11:3035-3038.
- Zambrano, R.M., González, L., Aranguré, F.J., Espinosa, M.A., y Paredes, J.C. (2011). ¿Arsénico en Nayarit? *Revista Fuente*, 3:25-30.

Zhu, L.U., Shao, B., Song, Y., Xie, H., Wang, J., Wang, J.H., Liu, W., y Hou, X.X. (2011). DNA damage and effects on antioxidative enzymes in zebra fish (*Danio rerio*) induced by atrazine. *Toxicology mechanisms and Methods*, 21:31-36.

ANEXOS

ANEXO 1.

Metodología para la evaluación de la exposición a Disruptores endocrinos. Extracción de la fracción proteica lábil al álcali del plasma sanguíneo

MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS NECESARIOS

Equipo

- Vortex
- Cronómetro
- Centrífuga
- Baño María
- Baño seco
- Espectrofotómetro UV visible
- Campana de extracción
- Balanza

Material

- Pipetas serológicas
- Perillas
- Micropipetas
- Puntas p/micropipetas
- Vasos de precipitado
- Papel aluminio
- Pipetas pasteur
- Chupones

- Guantes
- Recipiente para desechos
- Tubos de ensaye
- Gradillas

Reactivos

- Ácido Tricloroacetico
- Etanol
- Éter
- Cloroformo
- Acetona
- Hidróxido de Sodio
- Ácido clorhídrico
- Ácido sulfúrico
- Agua desionizada
- Molibdato de amonio
- Bisulfito de sodio
- Sulfito de sodio
- Ácido 1,2,4 aminonaftolsulfonico

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Ácido Tricloroacético (Ac TCA) al 20 %

Para un volumen de 50 ml se pesan 10 g de Ac TCA y se aforan a 50 ml con agua desionizada. Puede ayudarse a disolver con una placa y un agitador magnético.

éter-etanol-cloroformo (2-2-1)

Para 25 ml medir con pipeta serológica 10 ml de éter, 10 ml de etanol y 5 ml de cloroformo, colocarlos en vaso de precipitado y mezclar con pipeta serológica succionando y dejando caer el líquido. **Realizar esto en campana de extracción.** Preparar esta mezcla de solventes solo cuando se necesite.

Solución de Hidróxido de Sodio 2 N

Para 50 ml de NaOH 2N: pesar 4 g de NaOH y aforar a 50 ml con agua desionizada. Se puede ayudar a disolver con placa y agitador magnético Solución de Ácido clorhídrico 2 N

Para 50 ml de HCl 2N: medir 8.78 ml de HCl concentrado y aforar a 50 ml con agua desionizada. La **reacción** al mezclar ácido con agua es **fuertemente exotérmica**, por lo que se

deberá de realizar con cuidado en campana de extracción y agregar el ácido al agua poco a poco.

Reductor de Fiske y Subba Row

Para preparar 25 ml: pesar 2.7g de bisulfito de sodio, 0.6 g de sulfito de sodio y 0.05 g de ácido 1,2,4 aminonaftolsulfónico, mezclar y aforar a 25 ml con agua desionizada. La solución es **estable** por 6-8 semanas en **obscuridad y refrigeración**

Molibdato ácido

Para 10 ml: pesar 0.5 g de molibdato de amonio y disolver en 10 ml de ácido sulfúrico 2.5 N.

Solución de ácido sulfúrico 2.5 N

Para 25 ml: disolver 1.75 ml de H₂SO₄ en 25 ml de agua desionizada. La **reacción** al mezclar ácido con agua es fuertemente **exotérmica**, por lo que se deberá de realizar con cuidado en campana de extracción y agregar el ácido al agua poco a poco.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Se mezclan 10 µl de plasma y 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %.
- 2.- Se agita por 10 minutos en vortex
- 3.- Se centrifuga a 4500 rpm durante siete minutos y se desecha el sobrenadante.
- 4.- Se agregan 500 µl de TCA al precipitado y se repiten los pasos dos y tres
- 5.- Se agregan 3 ml de etanol absoluto, se repite el paso dos, se incuba en baño maría a 60°C durante 10 minutos, se repite el paso tres.
- 6.- Agregar 2 ml de una solución de etanol-éter- cloroformo (2-2-1), se repiten pasos dos y tres
- 7.- Agregar 3 ml de acetona y se repiten pasos dos y tres
- 8.- Se agregan 2 ml de éter y se repite el paso dos, se deja en la campana evaporándose de 2 a 3 horas o se deja toda la noche hasta que se haya evaporado.
- 9.- Se agregan 500 µl de NaOH 2 N se repite el paso dos, después se coloca en un baño seco a 100°C por 20 minutos.
- 12.- Pasados los 20 minutos se retira del baño y se deja enfriar, se agregan 500 µl de HCL 2N se mezclan y se centrifugan, el sobrenadante se emplea para la determinación de fósforo (ALP).

Para la lectura del fósforo:

Se colocan en la cubeta 10 µl de sobrenadante, 390 µl de agua desionizada, 100 µl de Molibdato ácido, 25 µl de Reductor, se mezclan en vortex por 5 segundos y se dejan reaccionar por 10 min, se lee a 650 nm

ANEXO 2.

Metodología para la evaluación de daño genotóxico. Micronúcleos

MATERIAL Y EQUIPO NECESARIOS

Equipo

- Microscopio óptico

Material

- Cajas de vidrio para tren de tinción
- Portalaminillas
- Portaobjetos esmerilados
- Lápiz
- Caja para laminillas

- Vacutainer heparinizados
- Jeringas
- Heparina
- Franelas
- Guantes de latex

Reactivos

- Metanol
- Giemsa

PROCEDIMIENTO

El procedimiento para realizar esta prueba en eritrocitos es el siguiente:

- 1.- Obtener muestra por punción cardiaca con jeringa heparinizada.
- 2.- Colocar en portaobjetos limpio previamente etiquetado una pequeña gota de sangre y hacer un “barrido” (hacerlo rápidamente para evitar que la sangre coagule, la muestra de sangre puede transferirse a un vacutainer heparinizado para evitar la coagulación). Dejar secar a temperatura ambiente por 24 horas.
- 3.- Fijar con metanol durante 5 minutos.
- 4.- Dejar secar el portaobjetos y teñir con giemsa durante 40 minutos (filtrar el giemsa).
- 5.- Lavar el portaobjetos con agua corriente cuidando que no le caiga agua directamente.
- 6.- Llevar al microscopio.

Contar 3 000 células por laminilla y reportar MN/1 000

ANEXO 3.

Metodología para la evaluación de daño genotóxico. Ensayo cometa

MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS NECESARIOS

Equipo

- Estufa
- Baño
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder
- Refrigerador
- Microscopio equipado con luz fluorescente y software "COMET"
- Potenciómetro
- Cuarto frío
- Lámpara de luz amarilla
- Agitador
- Báscula
- Microondas
- Vortex
- Cronómetro
- Placa con agitador
- Campana de extracción

- Papel filtro Watman
- Papel aluminio
- Papel absorbente
- Tijeras
- Gasa
- Pipetas pasteur
- Chupones
- Frascos para baño
- Vacutainer
- Guantes
- Botes para depositar puntas
- Lápiz del No. 2 y sharpening
- Masking tape
- Moscas
- Porta laminillas
- Parafilm
- Pinzas
- Cubrebocas

Materiales

- Pipetas serológicas
- Micropipetas
- Vasos de precipitado
- Probetas
- Portaobjetos esmerilados
- Cubreobjetos
- Tubos cónicos
- Puntas para micropipetas
- Tubos eppendorf
- Coplin
- Charolas

Reactivos

- Hidróxido de sodio perlas (NaOH)
- Dimethylsulfoxide (DMSO)
- EDTA
- Alcohol anhidro
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Agua desionizada
- Bromuro de etidio
- Cloruro de sodio
- Tritón X-100
- Trisma base
- Agarosa de bajo punto de fusión (LMPA)
- Agarosa regular (NMA)

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Preparación de agarosa regular al 1%.

Se pesa 0,25 g de agarosa y se disuelve en 25 ml de agua desionizada. Para ayudar a disolverse se utiliza microondas a una temperatura de 30°C por 10 ó 7 segundos y se agita; de esta manera se procede de forma repetitiva hasta que se disuelva completamente. La agarosa se vierte en un frasco y se coloca en un baño que deberá tener una temperatura de 50°C.

Para preparar la agarosa al 0,6% se pesan 0,075 g de agarosa y se disuelven 12.5 ml de agua desionizada.

El rango debe ser de 0,6-1%

Precauciones y recomendaciones

- La agarosa **no debe hervir**, si esto sucede se prepara de nuevo.
- Se debe de cuidar que la agarosa **esté bien disuelta** y que no haya residuos en suspensión por lo que deberá tener una tonalidad completamente transparente. Si esto no sucede se deberá preparar de nuevo.
- Si baja la temperatura y la agarosa se **solidifica** se deberá preparar de nuevo.
- De preferencia la agarosa **no debe almacenarse** para usarse en otros ensayos posteriores.

Preparación de la solución de lisis.

Se pesa 146,1 g de NaCl (2,5M), 1,2 g de Trisma base (10mM) 8 g de NaOH (0,2M) y 37,2 g de EDTA (100 mM) para disolverse en 890 ml de agua desionizada. En una placa se coloca un vaso de precipitado de 1 L y se agrega agua desionizada cuidando de no utilizar todo el volumen. Los reactivos se agregan en el siguiente orden: 1) NaCl, 2) Trisma base y 3) forma alternada NaOH y EDTA. Cuando los reactivos están disueltos, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 10. Con una pipeta pasteur se deberá agregar gota a gota una solución de NaOH para elevar los valores de pH; en el caso de que los valores excedan el valor de 10, se deberá agregar HCl para ajustar los valores de pH. Se le agragan 10 ml de DMSO (10%) y 10 ml de Tritón 100 X (1%). La solución se afora en un matraz de 1 L y se filtra posteriormente con papel Watman para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado. La solución deberá almacenarse en un cuarto frío a 4 °C por lo menos durante una hora antes de ser utilizada.

Precauciones y recomendaciones.

- Es importante **aplicar de forma alternada** el NaOH y el EDTA, así como el uso de mosca para facilitar disolverse
- La solución deberá **permanecer fría** para su utilización.

Preparación de soluciones para electroforesis

Se pesa 200 g de NaOH 10 N para disolverse en 500 ml de agua desionizada. La solución se deberá preparar en una campana de extracción y con la ayuda de un baño. Las perlas de NaOH se deberán agregar de forma paulatina en un vaso de precipitado con agua desionizada hasta disolverse. La solución puede prepararse con la ayuda de una placa con agitador. La solución se afora en un matraz de 500 ml y se filtra posteriormente con papel Watman para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado. La solución deberá almacenarse en el cuarto frío.

Posteriormente se pesa 3,72 g de EDTA (200mM) para disolverse en 50 ml de agua desionizada. Se deberán de agregar de forma paulatina el EDTA en un vaso de precipitado con agua desionizada hasta disolverse. La solución puede prepararse con la ayuda de una placa con agitador. Cuando el reactivo este disuelto, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 10. Con una pipeta Pasteur se deberá de agregar gota a gota una solución de hidróxido de sodio (NaOH) para elevar los valores de pH. En el caso que los valores excedan el valor de 10, se deberá de aplicar ácido clorhídrico (HCl) para ajustar los valores de pH. La solución se afora en un matraz de 50ml y se filtra posteriormente con papel Watman para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado. La solución deberá de almacenarse en el cuarto frio y protegerse de la luz.

Finalmente la **solución amortiguadora para electroforesis** se prepara con: 48 ml de hidróxido de sodio (NaOH, 10N), 8 ml de EDTA (200mM) y 1544 de agua desionizada. Posterior a la mezcla, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 13 o mayor. Con una pipeta Pasteur se deberá de agregar gota a gota una solución de hidróxido de sodio (NaOH) para elevar los valores de pH. En el caso que los valores de excedan el valor de 10, se deberá de aplicar ácido clorhídrico (HCl) para ajustar los valores de pH. La solución se afora en un vaso de precipitado de 2000 ml y se filtra posteriormente con papel Watman para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado. La solución deberá de almacenarse en el cuarto frio.

Precauciones y recomendaciones

- La solución deberá de **permanecer fría** para su utilización.
- Se puede utilizar las soluciones de hidróxido de sodio (NaOH, 10N) y de EDTA (200mM) para preparar posteriores soluciones de electroforesis.

Preparación de la Trisma

Se pesa 12.12g de Trisma base (0.4M) para disolverse en 250 ml de agua desionizada. El Trisma se deberá de agregar de forma paulatina en un vaso de precipitado con agua desionizada hasta disolverse. Posterior a la mezcla, se mide el pH, el cual deberá tener un valor de 7.5, de lo contrario se procederá al ajuste de este. La solución puede prepararse con la ayuda de una placa con agitador. La solución se afora en un matraz de 250 ml y se filtra posteriormente con papel Watman para su almacenaje en un frasco ámbar debidamente etiquetado. La solución deberá de almacenarse en el cuarto frio.

Precauciones y recomendaciones

- La solución deberá de **permanecer fría** para su utilización.

Preparación de solución de lisis en el coplin

En el coplin se agrega 50 ml de la solución de lisis previamente preparada. La solución vierte al coplin con una probeta. El coplin deberá de almacenarse en el cuarto frío por lo menos una hora antes de su uso.

Precauciones y recomendaciones

- Las laminillas deberán de permanecer **por lo menos una hora** en el coplin antes de pasar a la electroforesis.
- El tiempo de duración de las laminillas en el coplin no debe de exceder 2 semanas de almacenaje.

Preparación de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%

Se pesa un 0.125g de agarosa y se disuelve en 25 ml de agua desionizada. Para ayudar a disolverse se utiliza microondas a una temperatura de 30°C por 10 o 7 segundos y se agita; de esta manera se procede de forma repetitiva hasta que se disuelva completamente. La agarosa se vierte en un frasco y se coloca en un baño que deberá tener una temperatura de 37°C.

Para preparar la agarosa al 0.6% se pesan 0.075g de agarosa y se disuelven en 12.5ml de agua desionizada.

Precauciones y recomendaciones

- La agarosa **no debe hervir**, si esto sucede, se prepara de nuevo.
- Se debe de cuidar que la agarosa **este bien disuelta** y que no haya residuos en suspensión por lo que deberá tener una tonalidad completamente transparente. Si esto no sucede se deberá preparar de nuevo.
- Si baja la temperatura y la agarosa se **solidifica** se deberá preparar de nuevo.
- De preferencia la agarosa **no debe almacenarse** para usarse en otros ensayos posteriores.

PREPARACIÓN DE CAMAS

Se colocan las laminillas a utilizar con el esmerilado hacia arriba en un vaso de precipitado con alcohol anhidro, se tapan con parafilm y se dejan por un tiempo de 15 minutos. Mientras el tiempo transcurre se cortan trozos de gasa en forma de cuadros. Se preparan con aluminio las charolas donde se colocaran las laminillas. Las laminillas se toman con una pinza por el lado esmerilado y se limpian con la gasa. Posteriormente se colocan en la charola y se rotulan por la parte esmerilada.

A la laminilla se le colocan **150 µl** de agarosa regular. La agarosa se distribuye con la ayuda de la punta del dedo por toda la laminilla. Las laminillas con la cama de agarosa se colocan en las charolas y se secan en el horno una temperatura de 65-70°C. Una vez que estén bien secas y frías las laminillas pueden ser almacenadas en cajas portalaminillas.

Precauciones y recomendaciones

- Se deberá de **utilizar guantes** en este procedimiento.
- Se deberá de tener las **manos limpias** para la distribución de la agarosa en la laminilla.
- Se deberá de tener cuidado de **no pasar muchas veces el dedo** en la laminilla, lo que podría causar una cama irregular.
- Las laminillas se deben de **utilizar antes de 2 semanas**, de lo contrario se desechan.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ENSAYO

Se obtiene la sangre del individuo en un vacutainer y se coloca en un agitador. Se colocan los tubos eppendorf debidamente etiquetados en placas de unicel.

Se toman **5 µl** de sangre con la micropipeta y se colocan en el fondo del tubo eppendorf correspondiente, después se colocan **240 µl** de agarosa de bajo punto de fusión y se homogeniza con el vortex, de esta mezcla se toman **15 µl** y se mezclan en un tubo eppendorf nuevo con **225 µl** de agarosa de bajo punto de fusión. Finalmente de esta última mezcla, se toman **75 µl** y se colocan sobre la cama en la laminilla correspondiente, enseguida se coloca un cubreobjetos.

Las laminillas se colocan en la charola para llevarse a refrigeración por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se retira de forma delicada el cubreobjetos de la laminilla y se le agrega **75 µl** u **80 µl** de agarosa de bajo punto de fusión Se coloca un nuevo cubreobjetos y se pone en la charola para llevarse a refrigeración por 5 minutos.

Transcurrido el tiempo, se retira de forma cuidadosa el cubreobjetos y se desecha. Las laminillas se colocan en pares en el coplin con la solución de lisis.

Precauciones y recomendaciones

- La sangre tiene una **viabilidad para su uso en el ensayo de 3 horas** aproximadamente.
- Se deberá de tener cuidado al colocar mezcla de sangre con agarosa en la laminilla para **no formar burbujas**.
- Se deberá de tener cuidado al colocar mezcla de **no tocar la cama de agarosa** en la laminilla con la punta de la pipeta.
- Se deberá de tener cuidado de **colocar espalda con espalda** las laminillas para evitar el daño de las muestras.
- Las laminillas deberán de tener **por lo menos una hora en la solución de lisis** en el coplin antes de realizar la electroforesis.
- Las laminillas se deben de sacar del coplin **antes de 2 semanas**, de lo contrario se pierde la muestra.

ELECTROFORESIS

En el cuarto frío, se coloca la cámara de electroforesis, asegurándose de que esté centrada por la burbuja indicadora, de lo contrario se ajusta de las patas hasta la posición adecuada. Después, la cámara se conecta a la fuente de poder de acuerdo con el color y la polaridad de

los cables (rojo-positivo, negro-negativo). El trabajo hasta este momento se realiza en completa oscuridad y sólo con ayuda de la lámpara de luz amarilla, con la finalidad de no dañar el DNA con la luz.

Se coloca la solución de electroforesis en la cámara, hasta la plataforma por ambos lados, sin que la solución se junte. Después se colocan las laminillas en la cámara (se colocan o muestras o repeticiones) con pinzas por la parte esmerilada y asegurándose que este en la dirección correcta. Colocadas las laminillas se vierte la solución de electroforesis hasta cubrir las laminillas, asegurándose que no queden burbujas. Las laminillas se quedan en la solución de electroforesis por **5 minutos**. Mientras transcurre el tiempo se configuran los parámetros de la fuente de poder a **25 V, 300 A y 10 minutos**.

Transcurrido el tiempo de las laminillas, en la solución de electroforesis, se coloca la tapa y se prende la fuente de poder con los parámetros configurados previamente. Se observa unos segundos la formación de espuma y un valor constante de 300 A lo que indica que la electroforesis se está llevando a cabo correctamente. Si el valor de 300 A baja, se deberá de colocar mas solución de electroforesis por un costado de la cámara hasta obtener el valor deseado. Después se coloca la placa metálica que cubre la cámara. Transcurrido el tiempo el Voltaje marca E y se puede apagar la fuente, para quitar la tapa.

Las laminillas se sacan con las pinzas y se secan por debajo con papel. Las laminillas se colocan en la charola de lavados y se les pone Trisma (aproximadamente 1 pipeta Pasteur por muestra) y se dejan reposar 5 minutos; transcurrido el tiempo el procedimiento se repite. Después se escurren y se les aplica alcohol anhidro (aproximadamente 1 pipeta Pasteur por muestra) y se dejan reposar 5 minutos; transcurrido el tiempo el procedimiento se repite. Finalmente las laminillas se escurren y son colocadas en un coplin con alcohol anhidro por otros 5 minutos, terminado el tiempo se sacan y se limpian por debajo con papel, al secarse se guardan en una caja portalaminillas.

Precauciones y recomendaciones

- Se debe de asegurar de **enjuagar las pinzas** antes de tomar otra laminilla.
- Se debe de asegurar colocar por la parte posterior la laminilla, de lo contrario se perderá la muestra.
- Se deberá de tener cuidado de **colocar espalda con espalda** las laminillas para evitar el daño de las muestras.
- Se debe de asegurar la **dirección correcta** para la realización de la electroforesis.

LECTURA Y ANÁLISIS DE DATOS

Se enciende el regulador, el CPU, el monitor, la lámpara de mercurio y el microscopio. Se ajusta y se centra el microscopio. Finalizando la calibración se abre el programa Komet v4.0. Posteriormente se toma una laminilla y se le coloca 25µl de bromuro de etidio (0.05mM) y un cubreobjetos. Se enfoca con el objetivo de 20X hasta ver de forma adecuada el campo.

Después se procede a la lectura con la técnica circular o en zig-zag. En el software Komet v4.0 se pulsa “experiment” y se le asignan 2 ID (Muestras), después se pulsa “Live”. El programa contabiliza 100 células (50 muestra y 50 duplicado).