

**VALORACIÓN DE LA POTENCIA BIOLÓGICA DE
MEZCLAS DE ESTRÓGENOS AMBIENTALES
UTILIZANDO LAS VITELOGENINAS COMO
BIOMARCADORES MOLECULARES INDUCIDAS EN EL
PEZ *Danio rerio***

TC 1321.1

**DRA. ANA MARÍA SANDOVAL VILLASANA
DR. JESÚS HERNÁNDEZ ROMANO**

DICIEMBRE DE 2013

**VALORACIÓN DE LA POTENCIA BIOLÓGICA DE
MEZCLAS DE ESTRÓGENOS AMBIENTALES
UTILIZANDO LAS VITELOGENINAS COMO
BIOMARCADORES MOLECULARES INDUCIDAS EN EL
PEZ *Danio rerio***

TC 1321.1

DRA. ANA MARÍA SANDOVAL VILLASANA

DR. JESÚS HERNÁNDEZ ROMANO

DICIEMBRE DE 2013

INDICE GENERAL

	Pág.
INDICE GENERAL	iii
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS	vii
I. RESUMEN EJECUTIVO	viii
II. INTRODUCCIÓN	1
II.1 Mecanismos de acción endócrina.	1
II.2 Efectos sobre la salud humana.	3
II.3 Exposición.	4
II.4 Relación dosis-respuesta.	5
II.5 Compuestos Disruptores Endócrinos (CDE) en el ambiente acuático.	7
II.6 Estrógenos en efluentes complejos: efectos en poblaciones de peces.	8
II.7. El pez <i>Danio rerio</i>: organismo modelo.	9
II.8 Bioacumulación.	10
II.8.1 Biomarcadores genómicos de exposición.	10
II.8.2 Vitelogenina.....	11
II.8.2.1 Vitelogenina en hembras.....	12
II.8.2.2 Vitelogenina en machos.....	12
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. OBJETIVOS	14
V. RESULTADOS ESPERADOS	14
VI. ESTUDIOS REALIZADOS CON PECES EXPUESTOS A HORMONAS	15
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	22
VII.1 Selección de genes.....	22
VII.2 Diseño de los genes.....	23
VII.3 Esquemas de los genes control y de estudio.....	24
VII.4 Organismo de prueba.....	28
VII.5 Sustancias químicas.....	28

VII.6 Exposición del pez.....	29
VII.7 Extracción de ARN.....	33
VII.8 Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN total.....	36
VII.9 Integridad del ARN.....	38
VII.10 Retrotranscripción del ARN a ADNc.....	40
VII.11 Análisis de los niveles de expresión genética por PCR tiempo real a las muestras de ADNc.....	43
VIII. RESULTADOS	50
VIII.1 Evaluación de la mortalidad y cambios de conducta en los peces expuestos a 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol y la mezcla 17 α -etinilestradiol—atrazina.....	50
VIII.2 Niveles de expresión general del gen endógeno (housekeeping).....	52
VIII.3 Niveles de expresión de los genes <i>vtg1</i> a <i>vtg7</i> con respecto al gen endógeno <i>β-actina</i> debido a exposición a 17 β -estradiol.....	52
VIII.4 Niveles de expresión de los genes <i>vtg1</i> a <i>vtg7</i> con respecto al gen endógeno <i>β-actina</i> debido a exposición a 17 α -etinilestradiol.....	53
VIII.5 Niveles de expresión de los genes <i>vtg1</i> a <i>vtg7</i> con respecto al gen endógeno <i>β-actina</i> debido a exposición a la atrazina.....	54
VIII.5 Niveles de expresión de los genes <i>vtg1</i> a <i>vtg7</i> con respecto al gen endógeno <i>β-actina</i> debido a exposición a la atrazina.....	55
IX. DISCUSIÓN	64
X. CONCLUSIONES	66
XI. BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXO 1	71

INDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Exposición del pez cebra a 625 ng L ⁻¹ de 17β-estradiol.....	30
Figura 2. Exposición del pez cebra a 1.6 ng L ⁻¹ de 17α-etinilestradiol	30
Figura 3. Lote del blanco del pez cebra en el experimento de 17α-etinilestradiol.	31
Figura 4. Lote de organismos expuestos al solvente DMSO empleado en la disolución de atrazina.	31
Figura 5. Organismos expuestos a 4 x10 ⁵ ng L ⁻¹ de atrazina.....	32
Figura 6. Peces sacrificados con nitrógeno líquido	33
Figura 7. Trituración de organismos con nitrógeno líquido.....	34
Figura 8. Disruptor de tejidos	35
Figura 9. Equipo Epoch® BioTek	36
Figura 10. Fuente de poder y cámara de electroforesis	37
Figura 11. Transiluminador.....	38
Figura 12. Integridad del ARN de las muestras 17β-estradiol	39
Figura 13. Integridad del ARN de las muestras de la mezcla 17α-etinilestradiol-atrazina	40
Figura 14. Retrotranscripción del RNA a cDNA.....	42
Figura 15. Incubación de muestras de cDNA	43
Figura 16. Equipo 7500 Applied Biosystems	45
Figura 17. Curva de amplificación de los genes <i>vtg1</i> al <i>vtg7</i> de peces expuestos a 17β-estradiol (1er. experimento)	46
Figura 18. Curva de amplificación de los genes <i>vtg1</i> al <i>vtg7</i> de peces expuestos a 17β-estradiol (2do. experimento).....	46
Figura 19. Curva de amplificación de los genes <i>vtg1</i> al <i>vtg7</i> de peces expuestos a 17α-etinilestradiol (1er. experimento)	47
Figura 20. Curva de amplificación de los genes <i>vtg1</i> al <i>vtg7</i> de peces expuestos a 17α-etinilestradiol (2do. experimento)	47
Figura 21. Curva de amplificación de los genes <i>vtg1</i> al <i>vtg7</i> de peces expuestos a atrazina (1er. experimento)	48
Figura 22. Curva de amplificación de los genes <i>vtg1</i> al <i>vtg7</i> de peces expuestos a atrazina (1er. experimento)	48
Figura 23. Curva de amplificación de los genes <i>vtg1</i> al <i>vtg7</i> de peces expuestos a atrazina (1er. experimento)	49
Figura 24. Curva de amplificación de los genes <i>vtg1</i> al <i>vtg7</i> de peces expuestos a 17α-etinilestradiol-atrazina (2do. experimento).	49
Figura 25. Pez expuesto a 80 ng L ⁻¹ de 17α-etinilestradiol con formación de petequias a los 21 días de exposición.....	51

- Figura 26. Pez expuesto a la mezcla de 17α -etinilestradiol-atrazina a los 17 días de exposición, muestra petequias en todo el cuerpo y vientre prominente. 51
- Figura 27. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de 17β -estradiol (1er. experimento)..... 56
- Figura 28. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de 17β -estradiol (2do. experimento)..... 57
- Figura 29. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de 17α -etinilestradiol (1er. experimento) 58
- Figura 30. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de 17α -etinilestradiol (2do. experimento). 59
- Figura 31. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de atrazina (1er. experimento)..... 60
- Figura 32. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de atrazina (2do. experimento)..... 61
- Figura 33. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de 17α -etinilestradiol-atrazina (1er. experimento). 62
- Figura 34. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de 17α -etinilestradiol-atrazina (2do. experimento)..... 63

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Listado y función de genes seleccionados en <i>Danio rerio</i>	22
Tabla 2. Reactivos utilizados para la realización de retrotranscripción.	41
Tabla 3. Componentes de reacción para PCR.....	44



I. RESUMEN EJECUTIVO

Este trabajo de investigación se enfocó en evaluar la respuesta genómica del pez cebra (*Danio rerio*) macho adulto expuesto a la hormona natural 17β -estradiol (E2), a la hormona sintética 17α -etinilestradiol (EE2), así como a la mezcla de la hormona 17α -etinilestradiol (EE2) — atrazina (herbicida, posible xenoestrógeno). El propósito de esta investigación fue la evaluación de los efectos de esteroides en organismos acuáticos, dado que en las últimas décadas se ha producido una gran cantidad de xenobióticos que han sido introducidos en elevadas concentraciones en el ambiente acuático como resultado de actividades antropogénicas, lo que está llamando la atención de los investigadores debido a la necesidad de evaluar los efectos endócrinos potenciales que causan en los organismos acuáticos, tales como características hermafroditas en peces y anfibios, inhibición de crecimiento testicular, inhibición de espermatogénesis, disminución de la capacidad de fertilización de los huevos, y cambios en el comportamiento reproductivo. Se ha reportado que en concentraciones de 10 ng L^{-1} las hormonas en el medio ambiente acuático podrían estar causando dichos efectos en los organismos. Con esta investigación se busca evaluar el riesgo para la salud humana y poblaciones de la fauna por la presencia de dichos esteroides en los ecosistemas, mediante la evaluación de la expresión genética en el pez cebra empleando la técnica de PCR. Consideramos que los resultados de esta investigación tendrán implicaciones importantes en la evaluación de riesgos y contribuirán a una mejor comprensión de los efectos de estrógenos en niveles superiores de complejidad biológica, como el humano.

El estudio presente se desarrolló a través de las siguientes etapas: (i) el diseño de siete sondas y siete primers de vitelogenina mediante software bioinformático, (ii) la realización de la síntesis de las mismas, (iii) la validación de los siete genes de la vitelogenina en el equipo de PCR, (iv) la exposición de los peces a las dos

hormonas y a la mezcla hormona-herbicida, (v) la ejecución de la prueba de PCR, y (vi) el tratamiento de los resultados obtenidos.

Los genes analizados fueron *vtg1*, *vtg2*, *vtg3*, *vtg4*, *vtg5*, *vtg6* y *vtg7*. El gen *vtg4* se expresó con 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, y la mezcla 17α -etinilestradiol—atrazina. Los genes *vtg1*, *vtg6* y *vtg7* se expresaron con 17β -estradiol y la mezcla 17α -etinilestradiol—atrazina. Los genes *vtg2* y *vtg3* se expresaron con 17β -estradiol y 17α -etinilestradiol. El gen *vtg5* se expresó sólo con 17β -estradiol.

Con base en los resultados anteriores, consideramos que los genes *vtg1*, *vtg4*, *vtg6* y *vt7* muestran ser biomarcadores idóneos de exposición a hormonas de naturaleza estrogénica y a herbicida de naturaleza xenoestrógena.

Durante el proceso de exposición a los compuestos ya mencionados se valoró la mortalidad y los efectos en la reproducción de la menor a la mayor concentración con respecto a un lote blanco: para 17β -estradiol la mortalidad fue de 0 al 10% y 4% de disminución en la reproducción; para 17α -etinilestradiol la mortalidad fue de 0 al 20% y 12% de disminución en la reproducción; para la mezcla 17α -etinilestradiol—atrazina la mortalidad fue de 0 al 22% y 80% de disminución en la reproducción. Respecto a los cambios fenotípicos observados, con 17β -estradiol los peces mostraron ligero aumento en la porción ventral, con 17α -etinilestradiol mostraron aumento en la porción ventral y presencia de leves Petequias en todo el cuerpo, mientras que con la mezcla 17α -etinilestradiol—atrazina mostraron comportamiento nervioso, abultamiento en la porción ventral y presencia de Petequias en todo el cuerpo.

En esta etapa de investigación se presentó la ponencia oral “Evaluación de la expresión relativa por PCR-RT en embriones del pez cebra causada por 17α -etinilestradiol” en el XII Congreso Internacional y XVIII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, en Ciudad Juárez, Chihuahua.

II. INTRODUCCIÓN

La contaminación puede ser definida como la introducción directa o indirecta por humanos de sustancias o energía que tienen como resultado efectos nocivos en los ecosistemas y en la salud humana. En los últimos años, la variedad y cantidad de xenobióticos ha mostrado estar en aumento. En este punto, es importante notar que los patrones de acumulación de los xenobióticos no son los mismos para organismos diferentes, sino que dependen del balance entre asimilación, metabolización, y tasas de eliminación.

Tomando en cuenta las diferencias en la forma la que los xenobióticos son asimilados, metabolizados, y eliminados no sólo la concentración de varios contaminantes en el tejido en organismos expuestos debería ser medida, sino también el impacto o efecto que estas sustancias inducen a nivel bioquímico y molecular. Esto a su vez lleva a la necesidad de desarrollar biomarcadores moleculares y bioquímicos para detectar efectos nocivos en tales organismos. Los biomarcadores son definidos como cualquier alteración bioquímica, fisiológica, o conductual (u otra) que puede modificar la calidad de vida de un organismo.

II.1 Mecanismos de acción endócrina

La prueba que se emplee para demostrar el riesgo que plantean las sustancias estrogénicas debe contar con amplia solidez científica, ya que la población expuesta a estas sustancias muestra signos de enfermedades y los ecosistemas también están siendo dañados. El sistema endócrino está formado por glándulas que producen hormonas que controlan desarrollo, crecimiento, reproducción y el comportamiento de personas y animales. Los disruptores endocrinos pueden interferir en este sistema bloqueando o neutralizando acciones hormonales. Entre las sustancias químicas disruptoras endócrinas figuran: (i) las hormonas, algunos estrógenos

estrógenos sintéticos como el etinilestradiol, que es ampliamente usado como anticonceptivo en todo el mundo, es excretado por mujeres preferentemente en formas conjugadas, que son consideradas biológicamente inactivas, (ii) las dioxinas y furanos, que se generan en la producción de cloro y compuestos clorados, como el cloruro de polivinilo (PVC) o los plaguicidas organoclorados, el blanqueo con cloro de la pasta de papel y la incineración de residuos; (iii) los pentaclorobencenos (PCB), actualmente prohibidos, cuyas concentraciones en tejido humano han permanecido constantes en los últimos años. Aun cuando la mayoría de los países industrializados pusieron fin a la producción de PCB hace más de una década, dos tercios de los PCB producidos en todas las épocas continúan en uso en transformadores u otros equipos eléctricos y, por consiguiente, pueden ser objeto de liberación accidental. A medida que va ascendiendo en la cadena alimentaria, la concentración de PCB en los tejidos animales puede aumentar hasta 25 millones de veces; (iv) numerosos plaguicidas, algunos prohibidos y otros no, como el DDT y sus productos de degradación, el lindano, el metoxicloro, piretroides sintéticos, herbicidas de triazina, kepona, dieldrín, vinclozolina, dicofol y clordano, entre otros; (v) el plaguicida endosulfán, de amplio uso en la agricultura española, a pesar de estar prohibido en numerosos países; (vi) el hexaclorobenceno (HCB), empleado en síntesis orgánicas, como fungicida para el tratamiento de semillas y como preservador de la madera; (vii) los ftalatos, utilizados en la fabricación de PVC. El 95 por ciento del DEHP (di (2etilhexil) ftalato) se emplea en la fabricación del PVC; y (viii) los alquilfenoles, antioxidantes presentes en el poliestireno modificado y en el PVC, y como productos de la degradación de los detergentes.

II.2 Efectos sobre la salud humana

En este contexto, existe preocupación a nivel mundial sobre los efectos adversos que podrían resultar de la exposición a sustancias químicas que presentan capacidad de interferir con el sistema endocrino. Causa gran preocupación la creciente frecuencia de anomalías genitales en los niños, como testículos no descendidos (criptorquidia), penes sumamente pequeños e hipospadias.

La defensa contra los disruptores endocrinos requiere de una vigilancia de años e incluso décadas, porque las dosis que llegan al feto dependen no sólo de lo que ingiere la madre durante el embarazo, sino también de los contaminantes persistentes acumulados en la grasa corporal hasta ese momento de su vida. Las mujeres transfieren esta reserva química acumulada durante décadas a sus hijos durante la gestación y durante la lactancia.

Algunos compuestos actúan imitando y bloqueando las hormonas mientras que otros alteran la producción, el funcionamiento y la degradación de las hormonas naturales y sus proteínas receptoras (son los alteradores medioambientales). Y para complicar aún más las cosas, muchos productos causan efectos que varían de unos órganos a otros y de unas especies a otras.

Los productos químicos sintéticos se comportan igual que las hormonas naturales y provocan trastornos en la salud humana. En varones, la calidad del semen se reduce o disminuye (bajo recuento de espermatozoides, bajo volumen de eyaculación, proporción elevada de espermatozoides anormales, proporción reducida de espermatozoides móviles); cáncer de testículo; órganos sexuales deformes. En mujeres, cáncer de mama y en los órganos de reproducción; enfermedad fibroquística de la mama; síndrome del ovario poliquístico; endometriosis; miomas uterinos; y enfermedad inflamatoria de la pelvis. Los fetos y los embriones, cuyo desarrollo está controlado en gran medida por el sistema endocrino, parecen particularmente sensibles a la exposición a disruptores endocrinos. Las hembras transmiten las sustancias químicas a su descendencia

antes del parto y después, al amamantar. Como consecuencia de la exposición, los individuos sufren durante el resto de su vida trastornos de la salud y cambios en su capacidad reproductiva.

Algunas sustancias químicas hormonalmente activas parecen plantear riesgos de cáncer. La exposición de los seres vivos a los disruptores endocrinos es generalizada, ya que se encuentran repartidos por todo el mundo como consecuencia de un empleo generalizado, debido a su baja degradabilidad y además de que son transportados a otros sitios por el aire, el agua y la bioacumulación en la cadena trófica.

II.3 Exposición

Los efectos de los disruptores endocrinos varían de una especie a otra y de una sustancia a otra; no obstante, pueden manifestarse cuatro enunciados generales: (i) las sustancias químicas que preocupan pueden tener efectos totalmente distintos en el embrión, el feto o el organismo perinatal que en el adulto; (ii) los efectos se manifiestan con mayor frecuencia en las crías, no en el progenitor expuesto; (iii) el momento de la exposición en el organismo en desarrollo es decisivo para determinar su carácter y su potencial futuro; y (iv) aunque la exposición crítica tiene lugar durante el desarrollo embrionario, las manifestaciones pueden no producirse hasta la madurez.

Una política adecuada para reducir la amenaza de las sustancias químicas que alteran el sistema hormonal requiere la prohibición inmediata de plaguicidas como el endosulfán y el metoxicloro, fungicidas como la vinclozolina, herbicidas como la atrazina, los alquilfenoles, los ftalatos y el bisfenol-A. Para evitar la generación de dioxinas se requiere la eliminación progresiva del PVC, el percloroetileno, todos los plaguicidas clorados, el blanqueo de la pasta de papel con cloro y la incineración de residuos.

El p-nonilfenol pertenece a la familia de sustancias químicas sintéticas llamadas alquilfenoles. Los fabricantes añaden nonilfenoles al poliestireno y al PVC como antioxidante para que estos plásticos sean más estables y menos frágiles. Un estudio descubrió que la industria de procesamiento y envasado de alimentos utilizaba PVC que contenía alquilfenoles. Otro informaba del hallazgo de contaminación por nonilfenol en agua que había pasado por cañerías de PVC.

II.4 Relación dosis-respuesta

La evaluación de riesgo asume que a mayor dosis de exposición mayor riesgo, suponiendo una respuesta tóxica en forma de curva monótonica (sin puntos de inflexión) y que hay un límite por debajo del cual no existe riesgo. Los disruptores endocrinos tienen la particularidad de que ocasionan efectos a niveles extremadamente bajos, en el límite de la capacidad del análisis, como es el caso de los análisis cromatográficos. Así, los límites de exposición laboral a agentes químicos se miden en ppm (partes por millón), sin embargo, las hormonas y los disruptores endocrinos pueden ocasionar efectos a dosis un millón de veces inferiores, de ppb (partes por billón). La medición de estos niveles requiere equipos de análisis sofisticados, lo que imposibilita en la práctica un control efectivo de niveles en los lugares de trabajo. Por otra parte, las concentraciones corporales de algunos de estos tóxicos superan en poblaciones industrializadas las ppm.

Los disruptores endocrinos, sin embargo, pueden no tener límites sin efecto y además, pueden presentar curvas de toxicidad cuadráticas, es decir, que produzcan efectos a dosis bajas y altas, y no los produzcan a dosis más altas, y viceversa. Interfieren en el funcionamiento del sistema hormonal mediante alguno de estos tres mecanismos: suplantando a las hormonas naturales, bloqueando su acción o aumentando o disminuyendo sus niveles. Las sustancias químicas

disruptoras endocrinas siguen pautas diferentes. La industria química elige pensar que, puesto que ya existen en la naturaleza tantos estrógenos naturales, como la soja, no hay por qué preocuparse por los compuestos químicos sintéticos que interfieren con las hormonas. Sin embargo, es importante tener en cuenta las diferencias que existen entre las hormonales naturales y las sintéticas. Las hormonales artificiales suponen un peligro mayor que los compuestos naturales porque pueden persistir en el cuerpo durante años, mientras que los estrógenos vegetales se pueden eliminar en un día.

Se ha descubierto que cantidades insignificantes de estrógeno libre (tan insignificantes como una décima parte por billón) pueden alterar el curso del desarrollo en el útero. Las sustancias químicas disruptoras endocrinas pueden actuar juntas y en cantidades pequeñas, aparentemente insignificantes, de sustancias químicas individuales, y pueden tener un importante efecto acumulativo. El descubrimiento de que puede haber sustancias químicas que alteran el sistema hormonal en lugares inesperados, incluidos algunos productos que se consideraban biológicamente inertes como los plásticos, ha puesto en entredicho las ideas tradicionales sobre la exposición a estas sustancias.

Las interferencias con el sistema endocrino no siempre son atribuibles a compuestos químicos determinados, ya que la alteración puede deberse a varias causas, entre ellas, la forma de vida actual (tabaco, estrés, etc.). Es necesario determinar cuál es el impacto real de las sustancias químicas sintéticas teniendo en cuenta los problemas de determinación del momento de la exposición, la duración, la dosis, y los efectos de una combinación de compuestos químicos y efectos sinérgicos.

II.5 Compuestos Disruptores Endócrinos (CDE) en el ambiente acuático

Los disruptores endócrinos también interfieren en las funciones reproductivas e imitan o antagonizan los efectos de hormonas endógenas, tales como los estrógenos. Se ha identificado que un número creciente de los llamados xenoestrógenos, presentes en la comida o en el ambiente, pone en peligro las capacidades reproductivas de varios mamíferos, incluyendo a los humanos. En este grupo se incluyen sustancias naturales, como fitoestrógenos y micoestrógenos (ejemplo, zeranól favorece la aparición de glándulas mamarias en machos). Se reporta que más de 60,000 sustancias hechas por el hombre son de uso irregular y es probable que otras sustancias o grupos de sustancias resultarán ser estrogénicas (Sumpter, 1995).

Con 100,000 sustancias químicas sintéticas en el mercado en todo el mundo y 1,000 nuevas sustancias más cada año, hay poca esperanza de descubrir su trayecto en los ecosistemas o sus efectos para los seres humanos y otros seres vivos hasta que el daño esté hecho. Es necesario reducir el número de sustancias químicas que se usan en un producto determinado y fabricar y comercializar sólo las sustancias químicas que puedan detectarse fácilmente con la tecnología actual y cuya degradación en el medio ambiente sea conocida.

La evaluación del riesgo y los valores límite de exposición a agentes químicos que de ella se derivan no son un método adecuado para proteger la salud y el medio ambiente en el caso de los disruptores endócrinos. Al igual que los agentes cancerígenos, debemos comprender que la presencia de un disruptor endocrino en el lugar de trabajo implica riesgo de contaminación, y por tanto, no es aceptable ningún límite de exposición.

II.6 Estrógenos en efluentes complejos: Efectos en poblaciones de peces

Purdom *et al.* (1994) es citado frecuentemente como uno de los primeros estudios que muestran que los efluentes pueden ser estrogénicos para los peces por inducción de la síntesis de vitelogenina (VTG). Ahora muchos estudios reportan que varias especies de peces responden a concentraciones de nanogramo por litro (ng/L) de EE2 por la síntesis de VTG. Algunos estrógenos sintéticos, particularmente etinilestradiol, pueden contaminar el ambiente acuático debido a que es usado ampliamente como anticonceptivo en todo el mundo. Sin embargo, es excretado por mujeres principalmente en formas conjugadas, que son consideradas biológicamente inactivas; ambas, etinilestradiolglucorinide y sulfato, son inactivos como estrógenos en truchas. El pez es el único taxa en toxicología acuática que tiene receptores de estrógenos, mientras que no está claro si los invertebrados poseen un receptor de estrógeno funcional. Estudios en varias especies de moluscos han sugerido que este grupo posee un receptor de estrógeno (Caldwell *et al.*, 2008)

Cuando se pretende valorar el impacto de la contaminación del ambiente acuático por sustancias químicas estrogénicas, es necesario considerar las potencias estrogénicas de estas sustancias y sus concentraciones en el ambiente. Es imposible proporcionar un cálculo real de la concentración de alguna sustancia química estrogénica en el ambiente acuático porque los valores reportados (cuando se dispone de ellos) varían mucho. Esta variabilidad es entendible, dado que han sido usadas técnicas diferentes y muestras diferentes (como influente, efluente, agua de río, agua subterránea, etc.) y han sido analizadas en distintas áreas del mundo (Sumpter, 1995). Por lo tanto, especificar exactamente a qué concentración está expuesto un pez es imposible e incluso puede no ser particularmente significativo, porque lo importante es la concentración en el pez (Sumpter, 1995).

II.7. El pez *Danio rerio*: organismo modelo

En esta investigación hemos usado el pez cebra (*Danio rerio*) macho adulto para el análisis de su nivel de expresión de genes. Su genoma ha sido secuenciado totalmente (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/index.html), lo que permite evaluar alteraciones en la expresión de sus genes y proteínas. Esto ha permitido el desarrollo de diversos métodos moleculares y genéticos con este pez (Hill *et al.*, 2005, Muncke *et al.*, 2006a). Se está empleando como modelo animal para estudios moleculares ecotoxicogenómicos, para trabajos exploratorios o generadores de hipótesis enfocados sobre los efectos de CDEs con diferente respuesta de genes y proteínas (Hoffmann *et al.*, 2008).

La realización de varios programas analizando diversos CDEs incluye pruebas en peces, debido a los impactos adversos de CDEs sobre las poblaciones de peces en los ecosistemas (WHO, 2002). Los estudios de mecanismo con compuestos químicos como los CDE que se han realizado con este pez se deben a la facilidad de disponer de los organismos en etapas de vida adecuadas, a su dinámica de exposición a sustancias químicas, a su flexibilidad biológica, así como al tamaño pequeño del pez, que se adapta a cualquier tipo de estudio a realizar debido a su ciclo de vida, donde incluso respuestas a bajas dosis que no causan trastornos visibles pueden causar una variedad de otros efectos y respuestas que pueden detectarse por medio de análisis molecular (Ankley *et al.*, 2009; Bresh, 1991; Sawle, 2010). Existen algunos aspectos únicos en la endocrinología reproductiva del pez, como la estructura básica y función del eje hormonal hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG), que en los vertebrados está bien conservada. Así, con su alta fecundidad y herramientas experimentales bien establecidas, en combinación con vastos recursos genómicos en esta especie, el pez cebra es un modelo ideal para la caracterización de genes relacionados con la reproducción, como los genes *vtg*.

Por consiguiente, los resultados de los estudios en pez con CDEs pueden servir potencialmente como base de extrapolación de efectos potenciales entre especies.

II.8 Bioacumulación

Las sustancias químicas estrogénicas son de características lipofílicas e hidrofóbicas y, por consiguiente, tienen una fuerte tendencia a bioconcentrarse y bioacumularse en organismos acuáticos (plantas y animales) (Sumpter, 1995).

Organismos diferentes bioconcentrarán sustancias químicas estrogénicas diferentes, en grados diferentes. Incluso en un solo organismo, el compuesto bioconcentrado no está diseminado por igual en todos los tejidos; probablemente esté concentrado preferentemente en unos pocos tejidos, como la grasa. Lo que pase con estos compuestos una vez bioconcentrados en un organismo, es esencialmente desconocido; pueden estar fisiológicamente inactivos mientras están conservados en tejido adiposo, pero cuando esta grasa es movilizada (lo que ocurre frecuentemente durante la reproducción), el compuesto puede ser liberado para actuar en cualquier parte o puede ser metabolizado en otros compuestos que pueden o no ser activos como estrógenos (Sumpter, 1995).

II.8.1 Biomarcadores genómicos de exposición

Un marcador es cualquier respuesta biológica frente a un químico ambiental a nivel sub-individual, es decir, manifiesta el efecto producido por un tóxico; sin embargo, no proporciona información acerca de la magnitud que ese efecto tendrá a niveles de organización superiores. El uso de biomarcadores a nivel subcelular constituye una herramienta para diagnosticar el estrés ecotoxicológico al que están sometidos los organismos en el escenario ambiental planteado. Para la identificación de biomarcadores, se ha sugerido que el perfil de expresión génica

puede predecir la exposición a contaminantes en el ambiente (Ankley *et al.*, 2009). Estudios recientes en diversos organismos han sido efectuados para probar que sustancias diferentes producen diferentes perfiles de expresión génica, incluyendo algunos estudios investigando contaminantes emergentes (Poynton, 2009).

Los perfiles de expresión génica son útiles para determinar el agente causal en un efluente complejo. Sin embargo, permanece la cuestión sobre cómo es influenciada la firma de expresión génica por la presencia de otras sustancias. Se sabe que las sustancias químicas pueden interactuar en mezclas, causando consecuencias inesperadas para la sobrevivencia y la reproducción (Walker *et al.*, 2006). Es posible que combinaciones de sustancias tengan efectos diferentes a los de sustancias individuales sobre la expresión génica de organismos. Sustancias que causan una respuesta aditiva en bioensayos agudos o crónicos pueden tener también un perfil de expresión aditivo. Sustancias que muestran efectos antagónicos o sinérgicos en bioensayos estándar, pueden tener perfiles de expresión distintos, no parecidos a los perfiles de expresión de las sustancias solas.

II.8.2 Vitelogenina

En vertebrados ovíparos, la yema es crítica para el desarrollo del embrión ya que es una rica fuente de nutrientes, incluyendo ácidos amino, fosfato, carbohidratos, lípidos, y vitaminas. Estudios pioneros sobre la composición de la yema revelaron dos clases de proteínas de yema de huevo: la fosvitinaglicosilada rica-en-fosfoserina y la lipovitelina unida a lípidos. Ambas clases de proteína son derivadas de proteínas precursoras comunes denominadas vitelogeninas (vtg), las cuales son codificadas por una familia multigen en esencialmente todas las especies ovíparas, como el pez *Danio rerio*.

II.8.2.1 Vitelogenina en hembras

Los principales reguladores endógenos de expresión de genes *vtg* son los esteroides gonadales como 17β -estradiol (E2); sin embargo, una amplia gama de productos químicos con actividad estrogénica permiten la producción de *vtg* tanto *in vivo* como *in vitro*. Los niveles de *vtg* en hembras normalmente no son considerados un biomarcador útil de influencia de alteración endocrina debido a que el papel fundamental desempeñado por *vtg* en el proceso reproductivo de la hembra significa que a través de su ciclo de vida, los niveles circulantes de *vtg* se extienden a través de un rango de concentración extrema y muestran una considerable variabilidad inter-individual, enmascarando potencialmente los efectos de los moduladores endocrinos exógenos, motivo por el cual en esta investigación únicamente se pusieron en exposición peces macho.

II.8.2.2 Vitelogenina en machos

En machos, el gen está presente y el gen de *vtg* es inducido por estrógenos; sin embargo, los niveles de estrógeno en los machos son normalmente bajos y hay poca circulación de *vtg*. La exposición de peces machos a sustancias estrogénicas exógenas trae como respuesta la síntesis de *vtg*. Así, los niveles elevados de *vtg* circulante en peces machos lo han convertido en el biomarcador biológico predeterminado para contaminantes ambientales acuáticos con actividad estrogénica (Hansen *et al.*, 1998). El hígado de teleósteos en el macho es plenamente competente para sintetizar *vtg* bajo la influencia estrogénica, pero normalmente los niveles circulantes de *vtg* son muy bajos debido a los niveles insignificantes de estrógeno endógeno presente en el macho. La elevación de *vtg* en machos se deriva de la exposición a sustancias químicas de origen exógeno y se detecta fácilmente, en contraste con el de la línea de base.

III. JUSTIFICACIÓN

Esta investigación surge como una respuesta para evaluar los efectos de hormonas naturales, sintéticas, y compuestos xenoestrógenicos, dado que en las últimas décadas se ha producido una gran cantidad de daños como resultado de la actividad humana.



IV. OBJETIVOS

- 1) Diseño y síntesis de sondas y oligonucleótidos de vitelogeninas. Los peces *Danio rerio* serán expuestos a diferentes concentraciones de cuatro sustancias químicas estrogénicas, cada uno evaluado por separado.
- 2) Evaluación de la inducción de vitelogeninas mediante PCR en tiempo real, la fecundidad, características fisiológicas, la toxicidad aguda.
- 3) Simulación de la situación que se presenta en efluentes contaminados, con diferentes mezclas de hormonas a bajas concentraciones mediante la exposición de peces con la verificación por Cromatografía de Gases-Masas de las concentraciones de los estrógenos en ellas.

V. RESULTADOS ESPERADOS

- 1) Evaluación de cuatro sustancias químicas estrogénicas en el pez *Danio rerio*, aplicando la metodología de PCR tiempo real.
- 2) Evaluación de los efectos causados por mezclas de hormonas en el pez *Danio rerio* aplicando la metodología de PCR tiempo real.
- 3) Evaluación de las concentraciones de los estrógenos por cromatografía de Gases-Masas.
- 4) Artículo enviado a revista arbitrada

VI. ESTUDIOS REALIZADOS CON PECES EXPUESTOS A HORMONAS

Las siguientes son definiciones necesarias para la comprensión correcta de los artículos revisados aquí:

La NOEC es la concentración más alta de tóxico (de las empleadas en un bioensayo) que no causa efecto observado (mortalidad, alteraciones de la reproducción, cambios en el comportamiento, etc.) en la población estudiada para una exposición determinada (=tiempo) al ser comparado su efecto con el control.

La LOEC es la concentración más baja de tóxico (de las empleadas en un bioensayo) que causa efecto observado (mortalidad, alteraciones de la reproducción, cambios en el comportamiento, etc.) en la población estudiada para una exposición determinada (=tiempo) al ser comparado su efecto con el control.

Los siguientes son estudios realizados en peces en diferentes etapas de su ciclo completo de vida (CCV) y que son especialmente críticos; la mayoría de ellos, muestran aspectos clave y hallazgos en peces expuestos a hormonas, todos ellos fueron realizados con metodologías tradicionales, en algunos de estos estudios se evaluó la vitelogenina (VTG) midiéndola enzimáticamente y no como se evaluó en el presente estudio, mediante la expresión diferencial de genes *vgt* empleando métodos moleculares.

Lange *et al.* (2001) diseñaron un estudio de ciclo completo de vida (CCV) de dos generaciones con pascardo (*Pimephales promelas*), realizándolo con un protocolo basado en “Procedimiento de Evaluación Estándar de CCV en pez” de la USEPA. Lange *et al.* expusieron huevos recién fertilizados a cinco concentraciones de EE2 (0.2, 1, 4, 16, y 64 ng L⁻¹) en condiciones de flujo continuo, por 305 días. Las exposiciones de concentración fueron verificadas por radioquímica C₁₄-EE2 y apoyadas por radioinmunoensayo, y los valores medios medidos fueron >70% del teórico. Para los F₀ adultos expuestos hasta 301 días post eclosión (pdh), las NOEC (concentración efectiva no observada) para crecimiento, sobrevivencia, y reproducción (medida como producción de huevo) fueron todas >1 ng L⁻¹. El pez macho expuesto a 4 ng L⁻¹ por 56 dph no logró desarrollar características sexuales

secundarias normales, mientras hembras expuestas a este nivel de EE2 fueron capaces de procrear cuando se aparearon con machos no expuestos. La evaluación histológica control, 0.2 ng L^{-1} , y 4 ng L^{-1} pez expuesto a 56 dph indicó una proporción aproximada hembra-a-macho (F:M) de 50:50, mientras pez expuesto a 4 ng L^{-1} tuvo una proporción sexual F:M de 84:5. No se observaron ovatestes en el pez control, pero fueron observadas ovatestes en 11% de pez expuesto a 4 ng L^{-1} . Después de 172 dph, no se observó tejido testicular en algún pez expuesto a EE2 a 4 ng L^{-1} . La NOEC para inducción de VTG fue 4 ng L^{-1} . Los autores concluyeron que la NOEC de reproducción general fue 1 ng L^{-1}

Parront and Blunt (2005) dirigieron un estudio CCV de exposición a EE2 en piscardo (*Pimephales promelas*). Huevos fertilizados (48 h post fertilización) fueron expuestos a 0.32 , 0.96 , 3.5 , 9.6 , y 23 ng L^{-1} de EE2 por 150 dph en condiciones de flujo continuo. Los peces fueron observados durante las etapas larva, juvenil, y adulta. Excepto a la más alta concentración, hubo efectos mínimos en crecimiento juvenil durante 60 dph. A 60 dph, un incremento en el índice ovopositor (una característica sexual secundaria de las hembras) fue observado en pez hembra expuesto a concentraciones de EE2 de 3.5 ng L^{-1} y más grandes. Hubo disminuciones significativas en características sexuales secundarias en machos expuestos a concentración nominal de 0.96 ng L^{-1} y arriba de 150 dph. El éxito en fertilización (definido como el porcentaje de huevos fertilizados puestos por pez expuesto por el ciclo completo de vida) disminuyó en forma relacionada con la dosis (81% en controles, 63% a 0.32 ng L^{-1} , 36% a 0.96 ng L^{-1} , 0% a 3.5 ng L^{-1} y arriba). Pez expuesto a 0.32 y 0.96 ng L^{-1} produjo más huevos en total que pez control durante el periodo de procreación; los expuestos a $>3.5 \text{ ng L}^{-1}$ EE2 no pusieron huevos, y todos los peces fueron externamente hembras. Los autores reportan que 0.32 ng L^{-1} fue la NOEC basada en características sexuales secundarias en pez macho, pero una LOEC para efectos sobre fertilización. Desde el punto de vista del éxito reproductivo general, 0.32 ng L^{-1} puede ser visto más fácilmente como una NOEC que una LOEC, a pesar de la disminución en

por ciento de fertilización. El éxito reproductivo fundamental es determinado por el número de huevos producido por cada hembra. Cuando el número de huevos por hembra es combinado con éxito en por ciento de fertilización, resulta que hembras expuestas 0.32 ng L^{-1} produjeron más huevos fertilizados (130 por hembra) que hembras control expuestas a sólo agua (64 huevos por hembra) o agua y etanol (92 huevos por hembra). El laboratorio no fue capaz de medir VTG.

Nash *et al.* (2004) para investigar impactos sobre éxito reproductivo y mecanismos de desorganización expusieron poblaciones reproductoras de pez cebra (*Danio rerio*) a EE2 por generaciones múltiples en condiciones de flujo continuo. Las concentraciones medias medidas estuvieron entre 90 y 100% de las nominales. Después de 10 días de exposición hubo completo fracaso reproductivo (no producción de huevo) y mortalidad alta (85%) en el grupo F_0 expuesto a 50 ng L^{-1} . No hubo efectos sobre producción de huevo después de 40 días de exposición a 0.5 o 5 ng L^{-1} , y la exposición de la generación paterna F_0 a 5 ng L^{-1} no tuvo impacto sobre éxito reproductivo. La NOEC para inducción de VTG fue 0.5 ng L^{-1} . Los autores consideran 5 ng L^{-1} como la NOEC para el grupo F_0 . Inversamente, la exposición a lo largo de la vida del grupo F_1 a 5 ng L^{-1} resultó en un completo fracaso reproductivo en la generación F_1 , sin huevos viables en casi 12 000 depositados. La producción de huevo también fue reducida en el grupo F_1 (~42-45% de controles). La infertilidad en la generación F_1 después de exposición de toda la vida a 0.5 ng L^{-1} de EE2 se debió a diferenciación sexual perturbada, con los machos teniendo testículos no funcionales y gónadas no diferenciadas. Estos machos F_1 también mostraron una reducida respuesta a vitelogenina cuando fueron comparados con machos F_0 (NOEC para inducción de VGT de 5 ng L^{-1}), indicando una aclimatación a la exposición a EE2. Estudios de depuración sólo encontraron una recuperación parcial en la capacidad reproductiva después de 5 meses. Significativamente, aunque los machos carecían de testículos funcionales, mostraron patrón macho de conducta reproductiva, inducido por el acto de desove y compitieron con machos sanos para interrumpir la fertilización. Aunque no

explícitamente establecida por los autores, la NOEC para la generación F1, inferida de los datos presentados, fue 0.5 ng L^{-1} .

Schaefers *et al.* (2007) realizaron estudios parcial y CCV en pez cebra en condiciones de flujo continuo, con concentraciones de 0.05, 0.28, 1.7, y 10 ng L^{-1} de EE2. Las concentraciones medidas variaron entre 80% y 120% de las concentraciones nominales (0.05, 0.28, y 10 ng L^{-1}), excepto para el grupo de tratamiento 1.7, en el cual fue encontrado 66% de la concentración nominal, Fecundidad y fertilidad fueron evaluadas durante la exposición ciclo-de-vida parcial de pez paterno (F1) expuesto desde fertilización a 75 dpf. No hubo efectos en las dos concentraciones más bajas (medidas $0.05, 0.31 \text{ ng L}^{-1}$). Hubo desove retardado y una reducción en éxito reproductivo en 41% de controles en concentraciones de exposición medidas de 1.1 y 9.3 ng L^{-1} (los dos grupos de exposición más altos). No hubo efecto sobre fecundidad (número de huevos/hembra/día) en ninguna concentración. Por tanto, 0.31 ng L^{-1} fue la NOEC, y 1.1 ng L^{-1} la LOEC. La exposición CCV de pez paterno (F1) desde fertilización a 177 dpf resultó en las mismas NOEC y LOEC. Sin embargo, la fecundidad fue ligera pero significativamente disminuida a 1.1 ng L^{-1} , acompañada por una disminución en fertilidad a 52%. Fue observada una falta de conducta de apareamiento, y no ocurrió desove en pez expuesto a 9.3 ng L^{-1} . Después de depuración en agua limpia, pez expuesto previamente a 9.3 ng L^{-1} recuperó desove después de casi 2.5 meses y fueron observados hasta 285 dpf. El número de huevo promedio/día/hembra fue 21 (comparable al grupo 1.1 ng L^{-1}); sin embargo, el éxito de fertilización de los huevos estuvo abajo de 3%. El examen histológico indicó que todos los peces en el grupo 9.3 ng L^{-1} mostraron gónadas con morfología ovárica a 177 dpf. Además, no fueron encontrados ovarios maduros a 177 dpf, mientras después de la depuración todos los ovarios aparecieron maduros y, del mismo modo, los testículos fueron maduros. Los testículos aparecieron normales en todos los ejemplares, pero en 7 de 20 peces con ovarios fueron encontrados cambios patológicos en las gónadas, incluyendo

mayor atresia folicular, fibrosis, infiltración macrófagos (se trata de una respuesta inespecífica frente a las agresiones del medio). Cambios patológicos similares fueron encontrados en ambos puntos de tiempo, al final de la exposición (177 dpf) y después de la depuración (285 dpf). La exposición de ciclo de vida de la generación F2 fue continuada a 0.09, 0.36, y 2 ng L⁻¹ (concentraciones medidas) por 162 dpf. Las dos concentraciones más bajas no tuvieron efecto significativo sobre el tiempo de desove, producción de huevo, o éxito reproductivo. El primer desove ocurrió más pronto en la generación F1, y el número promedio de huevos por día por hembra fue más del doble que en pez paterno. A 2 ng L⁻¹, los tres parámetros reproductivos fueron dañados. La NOEC para la generación F2 a 162 dpf fue 0.36 ng L⁻¹, y la LOEC fue 2 ng L⁻¹.

Fenske *et al.* (2005) en un experimento de una sola concentración expusieron pez cebra a 3 ng L⁻¹ de EE2 en condiciones de flujo continuo, desde fertilización hasta la etapa de desarrollo de completo de las gonadas (p.e., 42 días posteriores a la fertilización [dpf] o desde fertilización hasta la etapa reproductiva [comienzo 75 dpf] para un total de 118 días dpf). La concentración de exposición fue confirmada analíticamente. Aunque el diseño del estudio no permite la tradicional determinación concentración-respuesta, ya que sólo una concentración de exposición fue analizada, este estudio posteriormente mejoró la relación concentración-tiempo para completa feminización del pez expuesto. Exposición de vida temprana a 42 dpf condujo a una inducción duradera de plasma VTG en hembras adultas pero no alteró ni la proporción sexual ni las capacidades reproductivas. Exposición CCV a 3 ng L⁻¹ por 75 días o 118 días resultó en elevadas concentraciones de VTG y causó feminización gonadal en 100% de pez expuesto. Efectos de exposición CCV fueron al menos parcialmente reversibles, y 26% de pez de la población desarrollaron testículos completamente diferenciados después de 2 meses de depuración (176 dpf). Estos resultados sugieren que la exposición continua a EE2 detuvo la transición de desarrollo de las gónadas de machos genéticos desde la etapa del ovario hasta los testículos funcionales.

Debido a que sólo una concentración de exposición fue usada, 3 ng L^{-1} fue la NOEC para el estudio Etapa de Vida Temprana (42 días), pero sin límites para la LOEC para el estudio CCV (75 y 118 días).

Balch *et al.* (2004) en un estudio CCV, pez medaka macho y hembra (*Oryzias latipes*) fue expuesto a concentraciones nominales de 0.2, 2, o 10 ng L^{-1} de EE2 en condiciones estáticas-renovación por 120-180 días y luego apareados con pez no expuesto del sexo opuesto. No hubo efectos sobre conducta reproductiva o apareamiento en los grupos 0.2 o 2 ng L^{-1} . Testículos ováricos fueron observados en 20% de machos a 2 ng/L , y 68% de machos a 10 ng L^{-1} ; sin embargo, estos machos intersexo fueron capaces de fertilizar los huevos de las hembras. Los 19 machos expuestos a 10 ng L^{-1} EE2 luego fueron colocados con hembras no expuestas, 16 no copularon, y el éxito reproductivo fue muy bajo. Ninguna de las hembras expuestas a 10 ng L^{-1} participó en conducta reproductiva con machos no expuestos. Después de la depuración por 120 d, hubo 75% de recuperación a 2 ng L^{-1} , y 30% a 10 ng L^{-1} . La NOEC fue 2 ng L^{-1} . No fue medida la vitelogenina.

Caldwell *et al.* (2008) en un estudio conducido por la U.K. Environment Agency, los efectos de feminización de EE2 sobre el pez *Rutilus rutilus* fueron investigados por un periodo de 2 años (exposición de huevos fertilizados hasta 720 dpf). Las concentraciones nominales de EE2 fueron 0.1, 1 ng L^{-1} (medido 0.3 ng L^{-1}), y 10 ng L^{-1} (4 ng L^{-1} medido). Los peces fueron muestreados en los días 56, 84, 112, 250, 518, y 720 de la exposición y analizados su desarrollo sexual gonadal e inducción de VTG. El pez expuesto a concentración nominal de 4 ng L^{-1} desarrolló una morfología gonadal similar a la de la hembra, determinada por una forma característica de la gónada y la presencia de dos puntos de unión de la gónada a la pared del peritoneo, formando una cavidad ovárica. En etapas de vida tardía, se mostró que 4 ng L^{-1} resulta definitivamente en una población todas-hembras (valorado por histología gonádica), y las etapas de desarrollo ovárico variaron más ampliamente comparadas con las hembras de control. Esto refleja probablemente la presencia de ambos, hembras y machos de sexo invertido, en este grupo de

tratamiento. En todas las etapas de vida, VTG fue significativamente elevada en pez expuesto a 4 ng L^{-1} comparado con los controles. En concentraciones de exposición a EE2 más bajas, pareció haber una proporción más alta de hembras en el grupo 0.3 ng L^{-1} comparada con los controles, pero esto no fue estadísticamente significativo. Dos machos de un total de 52 peces machos confirmados histológicamente muestreados a 720 dpf fueron intersexo, uno expuesto a 0.3 ng L^{-1} y el otro expuesto a niveles no detectables de EE2 (p.e., el grupo de exposición nominal 0.1 ng L^{-1}). La significación de este descubrimiento es desconocida, ya que hay una ocurrencia de esta condición en una proporción muy pequeña de la población normal de *R. rutilus*. Las gónadas del otro pez de los dos grupos de exposición más baja no difirieron de los controles en términos de la etapa de desarrollo sexual (para machos o hembras). En general, el estudio mostró una LOEC de largo plazo de 4 ng L^{-1} , la cual indujo reversión sexual gonadal completa en *R. rutilus*, resultando en una población todas-hembras. La NOEC correspondiente fue 0.3 ng/L basada en concentraciones medidas. Aunque no es un estudio de reproducción *per se*, la NOEC y LOEC para feminización de pez macho es consistente con los otros estudios de reproducción en pez.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación de la expresión relativa de la familia de genes de vitelogenina en el Pez *Danio rerio* expuesto a muestras de agua sintética de la hormona natural 17 β -estradiol (E2), de la hormona sintética 17 α -etinilestradiol (EE2), así como a la mezcla de la hormona 17 α -etinilestradiol (EE2) y el herbicida atrazina (xenoestrógeno) se analizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR).

VII.1 Selección de genes

Mediante una amplia revisión de la literatura científica se seleccionó como gen blanco la familia de vitelogeninas (*vtg1*, *vtg2*, *vtg3*, *vtg4*, *vtg5*, *vtg6* y *vtg7*) debido a que muestra un rol en el desarrollo embrionario (Wang, *et al.*, 2005; Muncke *et al.*, 2006; Muncke *et al.*, 2007; Kausch *et al.*, 2008; Liedke *et al.*, 2008; McCurley *et al.*; 2008; Weil *et al.*, 2009), además de que se ha identificado su expresión diferencial en respuesta a una exposición particular, pudiendo representar una firma de expresión génica para esa condición de exposición (Tabla 1).

Tabla 1. Listado y función de genes seleccionados en *Danio rerio*.

GEN	FUNCIÓN
<i>β-actina</i>	Organización del citoesqueleto celular
<i>vtg1 a vtg7</i>	Vitelogeninas, participan como fuente de nutrientes en el desarrollo embrionario

VII.2 Diseño de los genes.

GEN HOUSEKEEPING O ENDÓGENO:

β-actina (control) (ENSDART00000054987) (FAM)

PRIMER GRUPO:

vtg1 (ENSDART00000078276) FAM
vtg2 (ENSDART00000061007) TAMRA
vtg3 (ENSDART00000014979) QUASAR 670

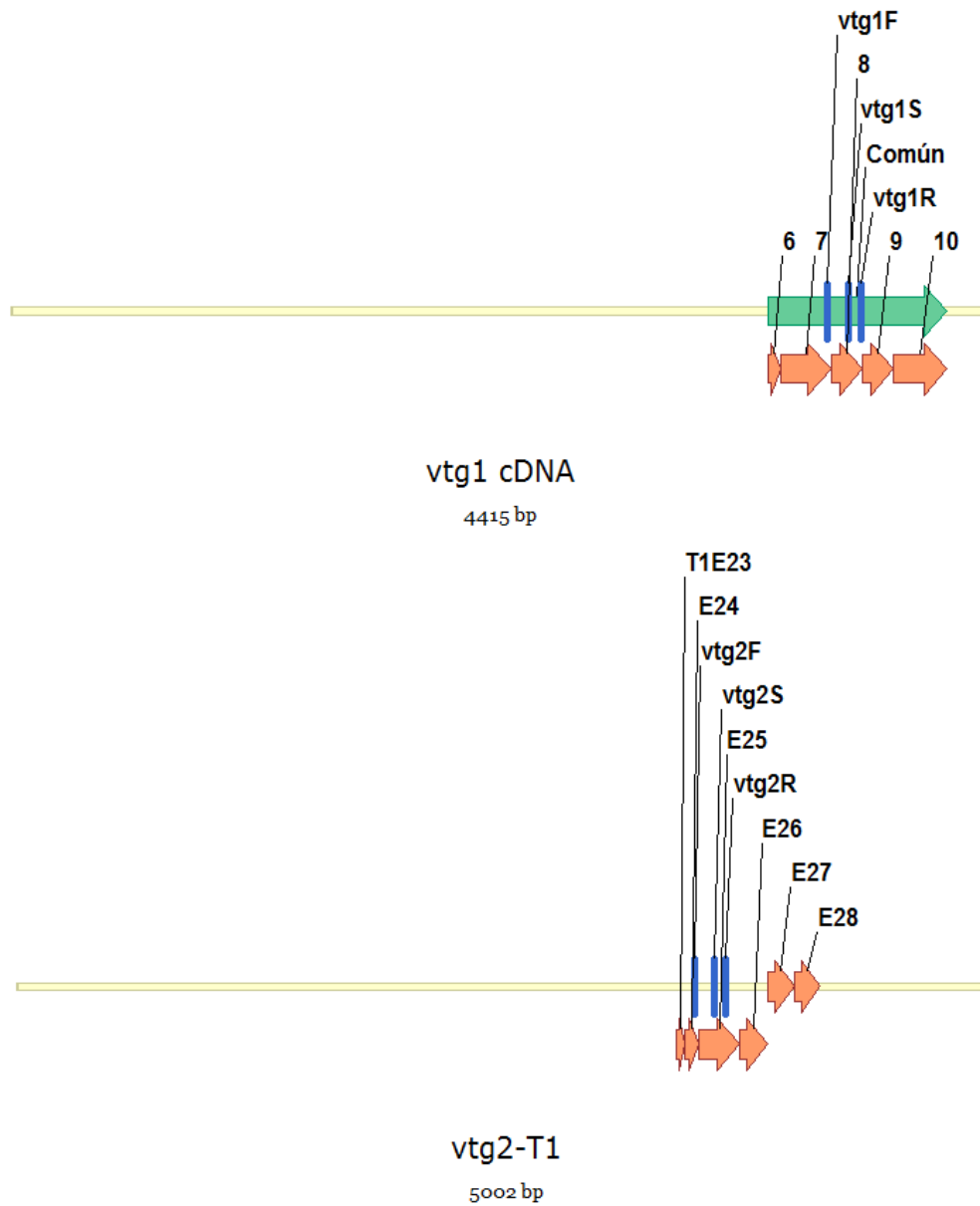
SEGUNDO GRUPO:

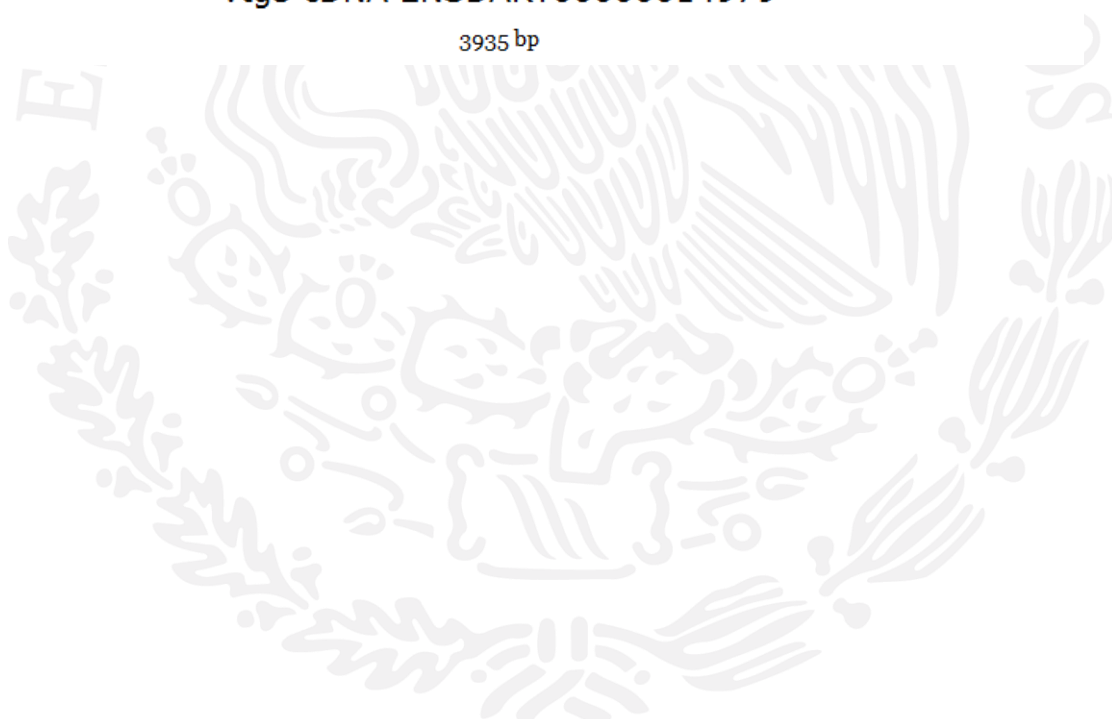
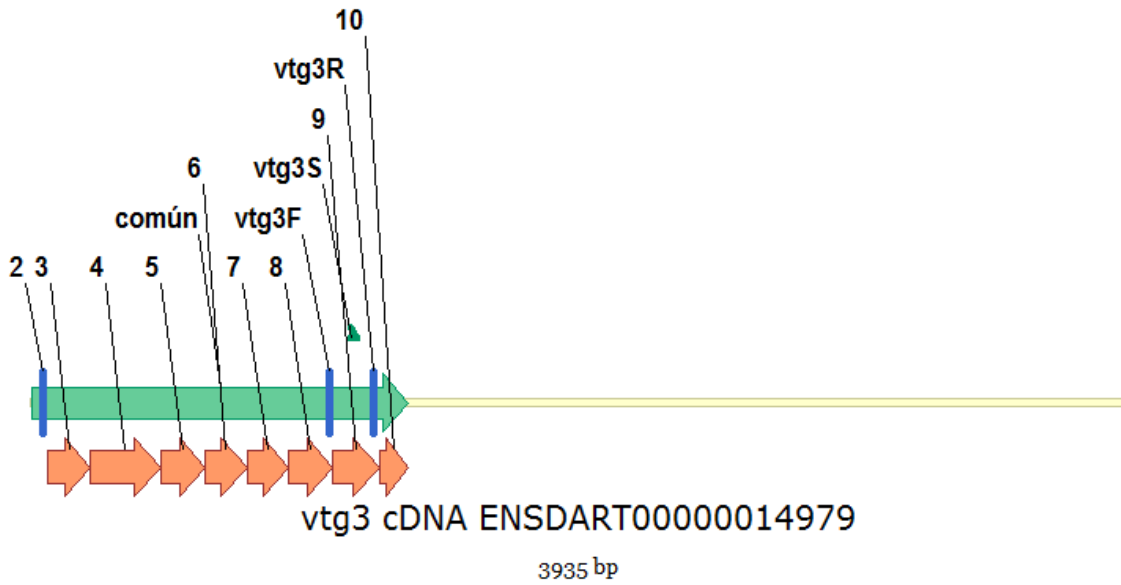
vtg4 (ENSDART0000105237) FAM
vtg5 (ENSDART00000078225) TAMRA

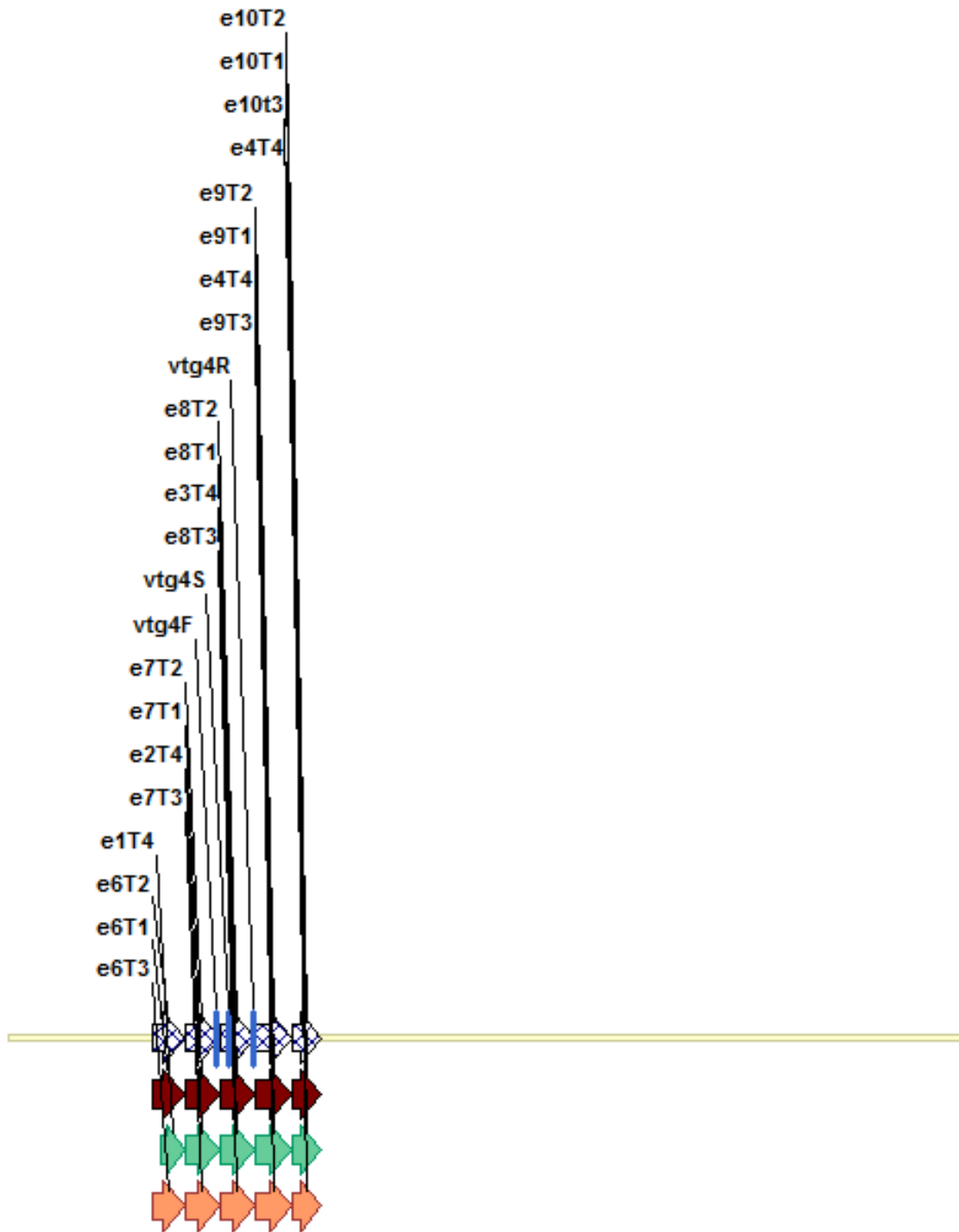
TERCER GRUPO:

vtg6 (ENSDART00000078276) QUASAR 670
vtg7 (ENSDART00000078216) FAM

VII.3 Esquemas de los genes control y de estudio

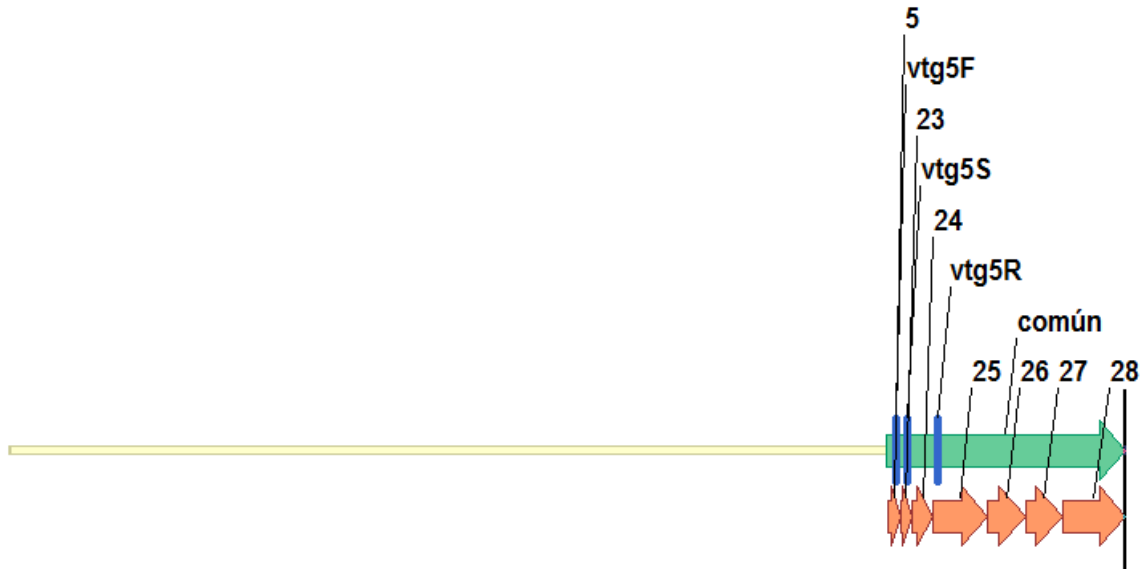






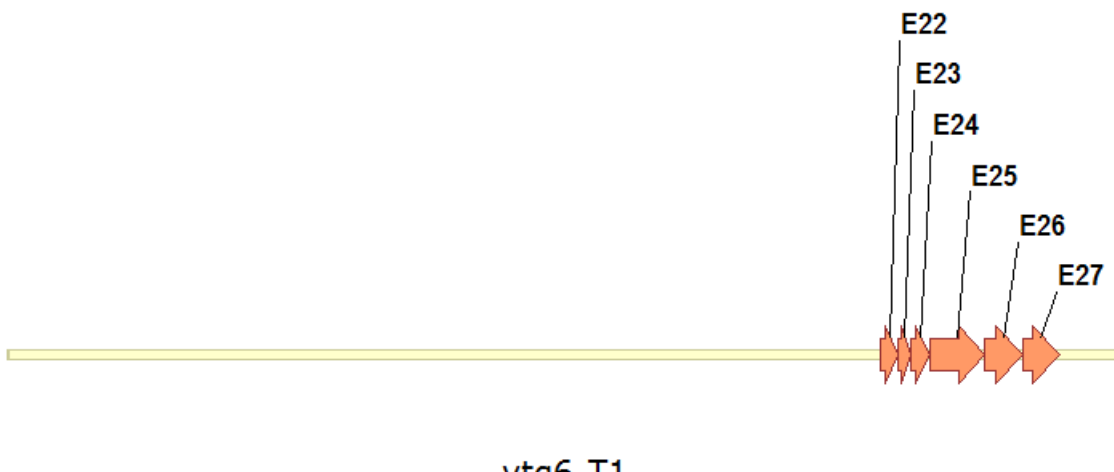
vtg4 cDNA ENSDART00000105237

4206 bp



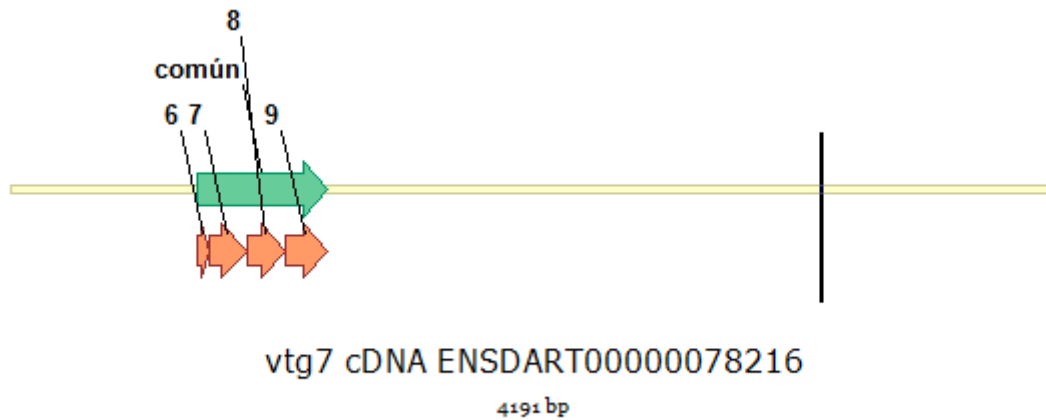
vtg5 cDNA ENSDART00000078225

4210 bp



vtg6-T1

4225 bp



VII.4 Organismo de prueba

El organismo utilizado para las pruebas se obtuvo a partir de cultivos controlados del pez cebra en el laboratorio. El cultivo del pez cebra se mantuvo en acuarios de 40 L utilizando agua con una dureza entre 80 y 100 mg/L como CaCO₃, con una temperatura de 25 ± 2 °C y un fotoperíodo de 16h luz / 8h oscuridad bajo una intensidad luminosa de 1000 luxes. Los organismos utilizados fueron peces adultos macho de 8 a 12 meses de edad, seleccionados cuidando que no mostraran problemas de salud o malformaciones.

VII.5 Sustancias químicas

En el presente estudio fueron investigados los efectos de la hormona natural 17β-estradiol (E2), la hormona sintética 17α-etinilestradiol (EE2) (Sigma-Aldrich) y de la mezcla de la hormona sintética 17α-etinilestradiol (EE2) y la atrazina (Chem Service), también se analizaron con respecto al blanco y al solvente de dilución etanol (-Merck-, utilizado como solvente de dilución de las hormonas) y DMSO (-Aldrich-, utilizado como solvente de dilución del herbicida), en el pez cebra macho adulto y sobre la expresión de los genes seleccionados. La expresión de

cada gen blanco fue comparada con la del gen endógeno a las diferentes concentraciones de los compuestos.

Las exposiciones con 17β -etinilestradiol (E2) se efectuaron a 625, 125, 25 y 5 ng L^{-1} . Las exposiciones con 17α -etinilestradiol (EE2) fueron a 80, 8, 1.6, y 0.32 ng L^{-1} . Se empleó un factor de separación de 5 en las concentraciones de E2 y EE2, se incluyó un blanco y metanol como solvente de dilución. Las exposiciones con la mezcla 17α -etinilestradiol (EE2)—atrazina fueron realizadas a 80 ng L^{-1} 17α / 10 mg L^{-1} Atr; 8 ng L^{-1} 17α / 2 mg L^{-1} Atr; 1.6 ng L^{-1} / 0.4 mg L^{-1} Atr, 0.32 ng L^{-1} / 0.08 mg L^{-1} Atr; 0.64 ng L^{-1} 17α / 0.0016 mg L^{-1} Atr; 0.0128 ng L^{-1} 17α / 0.00032 mg L^{-1} Atr; 0.00256 ng L^{-1} 17α / 0.000064 mg L^{-1} Atr y con un factor de separación de 5, respectivamente. Se incluyó un blanco y etanol/DMSO como solventes de dilución. Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces, en experimentos independientes. Las concentraciones se seleccionaron de acuerdo con estudios publicados previamente.

VII.6 Exposición del pez

- Se instalaron peceras para E2, EE2 y la mezcla EE2 – atrazina, todas ellas equipadas con termostato y aireación. También se instalaron peceras con el solvente etanol y una mezcla de los solventes etanol/DMSO.
- Se instaló una pecera de control negativo con agua deionizada, equipada también con termostato y aireación,
- Se seleccionaron los organismos asegurándose del buen estado de salud de los peces macho, colocando 15 peces en cada pecera (Figuras 1 a 5).
- El tiempo de exposición de los organismos fue de 21 días, durante los cuales se supervisó diariamente el buen funcionamiento tanto de los termostatos como de los aireadores, se observó el comportamiento de los

peces y se extrajeron los peces muertos para evitar contaminación por descomposición.



Figura 1. Exposición del pez cebra a 625 ng L^{-1} de 17β -estradiol.



Figura 2. Exposición del pez cebra a 1.6 ng L^{-1} de 17α -etinilestradiol.

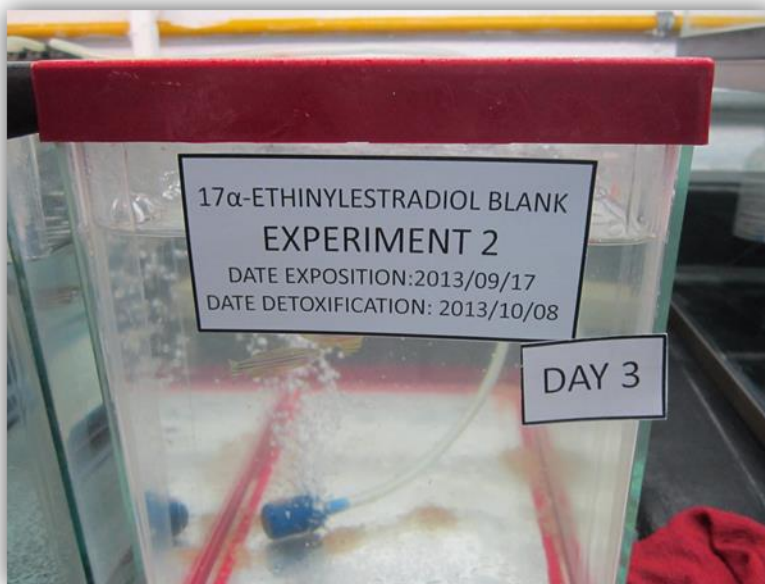


Figura 3. Lote del blanco del pez cebrá en el experimento de 17 α -etinilestradiol.



Figura 4. Lote de organismos expuestos al solvente DMSO empleado en la disolución de la atrazina



Figura 5. Organismos expuestos a 4×10^5 ng L⁻¹ de atrazina

- Durante el tiempo de la prueba, los organismos fueron alimentados con gránulos dos veces al día, a placer.
- Concluido el tiempo de exposición, los peces sobrevivientes fueron extraídos y sacrificados en una atmosfera de nitrógeno líquido.



Figura 6. Peces sacrificados con nitrógeno líquido

VII.7 Extracción de ARN

El ARN total fue aislado por medio del método de extracción fenólica con TRIZOL (Reagent® Invitrogen TM Life Technologies). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica), seguido de la extracción y precipitación del ARN total con cloroformo e isopropanol, respectivamente, a partir de la fase acuosa.

Se trituraron de 7 a 12 organismos por muestra con nitrógeno líquido en un mortero de cerámica hasta obtener un polvo fino (Figuras 6 y 7). De la pulverización realizada se pesaron 0.2 ± 0.05 g en un tubo de 1.5 mL con perlas de cerámica. Se adiciono 1.0 mL de TRIZOL® (fenol-sales de guanidina), homogenizándose el tejido con un disruptor (Scientific Industries® Disruptor Genie) por 5 min. (Figura 8). Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante

10 min a 4°C. Se adicionaron 200 μ L de cloroformo frío. Se agitó vigorosamente durante 15 s y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos.



Figura 7. Trituración de organismos con nitrógeno líquido.



Figura 8. Disruptor de tejidos

Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. En este paso se forman dos fases por diferencia de densidad; la fase fenólica orgánica, que contiene al ADN y restos de proteínas desnaturalizadas, y la fase superior acuosa que contiene el ARN en cloroformo. La fase superior se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL al cual se le adicionaron 500 μ L de isopropanol, que precipita al ARN formando una pastilla en el fondo del tubo.

La pastilla se lavó con etanol al 75% y se centrifugó durante 5 minutos a 7,500 rpm y 4°C. El etanol se eliminó y la pastilla del ARN se resuspendió en 50 μ L de agua DEPC estéril.

VII.8 Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN total

Para conocer la concentración del ARN total, la muestra se midió en un espectrofotómetro (Epoch® BioTek) con lámpara UV (Figura 9). Una vez que se obtuvieron los valores de absorbancia del ARN, se tomó en cuenta la relación de absorbancias a 260/280, donde se indica la pureza del ARN. Se considera que las relaciones cercanas a 2.0 unidades de densidad óptica (260 nm) son las óptimas.



Figura 9. Equipo Epoch® BioTek

Para determinar la integridad del ARN total extraído, se sometió una muestra del mismo a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). La técnica de electroforesis se basa en el desplazamiento, en este caso del ARN, a través de una matriz porosa formada por la agarosa

polimerizada, siendo el tamaño del poro determinado por la concentración de ésta en una solución de sales. Al aplicarse una corriente eléctrica a través del gel, los ácidos nucleicos que poseen una carga negativa conferida por los grupos fosfato, migran hacia el ánodo en condiciones de pH neutro.

Se preparó el gel de agarosa en un molde de 10.0 x 6.0 cm con un espesor de 7.0 mm, utilizando peines para dejar los espacios para la muestra. Se mezcló 1.0 μ L de la muestra de ARN con 1.0 μ L de colorante azul de bromofenol (2X RNA loading dye, Fermentas), inyectando las mezclas a los espacios formados por el peine en la agarosa.

La electroforesis se llevó a cabo a 100 voltios durante 60 minutos (Figura 10) y el ARN se observó en un transiluminador con luz ultravioleta a 260 nm (Figura 11). La radiación UV es absorbida por el ARN y emitida al bromuro de etidio que, a su vez, re-emite la radiación a 590 nm en la región rojo-naranja del espectro visible.



Figura 10. Fuente de poder y cámara de electroforesis



Figura 11. Transiluminador.

VII.9 Integridad del ARN

Una de las etapas cruciales de los procedimientos analíticos basados en PCR es la extracción y purificación del ARN, ya que la detección depende de la calidad e integridad del ARN extraído (García-Cañas *et al*, 2004). Son varios los factores que pueden afectar a la integridad del ARN durante el proceso de extracción, tales como variaciones del pH y temperatura, actividades nucleasas, etc., que pueden dar lugar a una escisión de los fragmentos del ARN. Por otro lado, los contaminantes procedentes del propio proceso de extracción o de la matriz pueden inhibir las reacciones de PCR (Hughes S. & Moody A., 2007).

La integridad del ARN total utilizado para este estudio se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa, comprobándose por la presencia de las bandas

18S y 28S del ARN ribosomal la ausencia de degradación del mismo (Figuras 12 y 13).

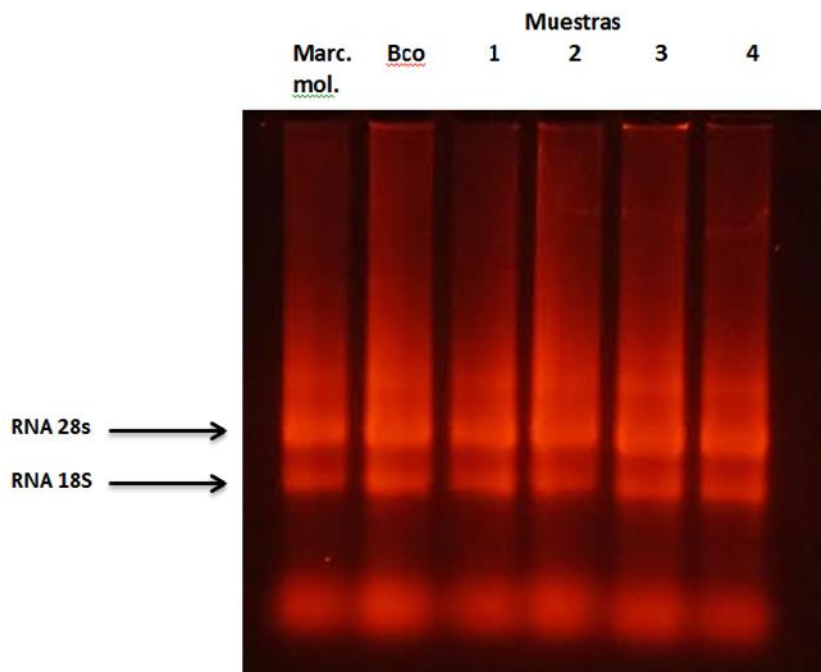


Figura 12. Integridad del ARN de las muestras de 17 β -estradiol, donde (1) corresponde a 625, (2) 125, (3) 25 y (4) 5 ng/L.

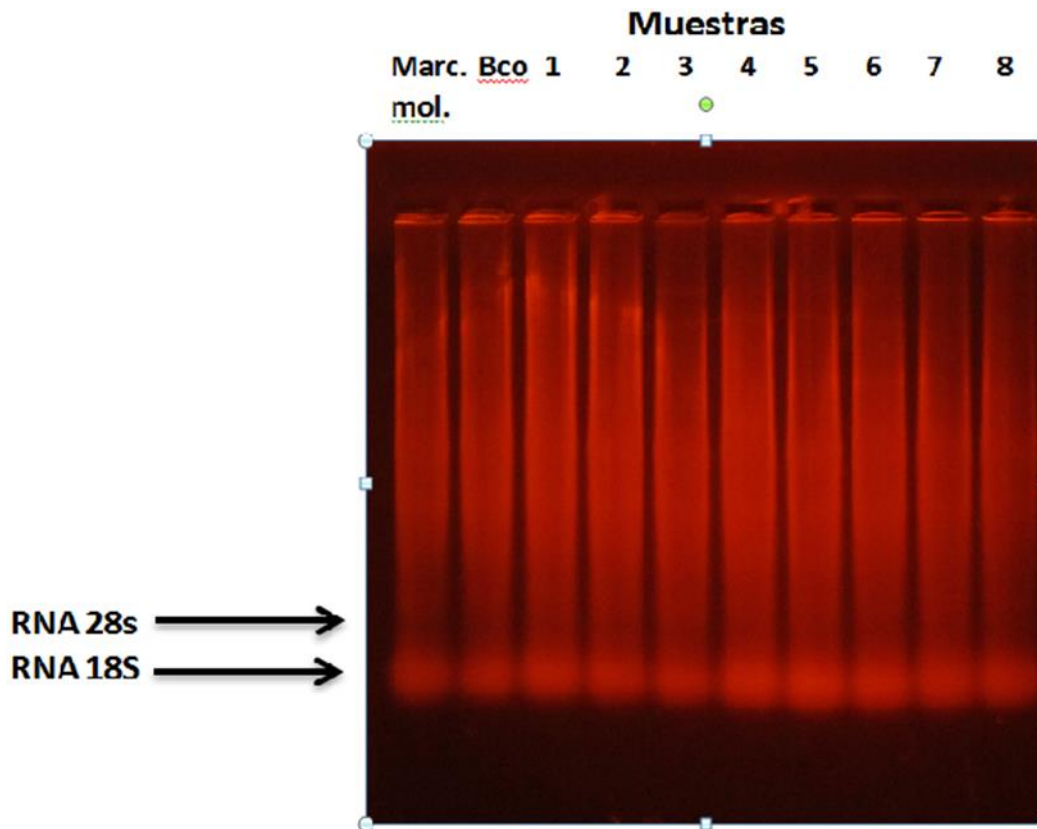


Figura 13. Integridad del ARN de las muestras de la mezcla 17 α -etinilestradiol-atrazina, donde (1) corresponde 80/10; (2) 8/2; (3) 1.6/0.4, (4) 0.32/0.08; (5) 0.64/0.0016; (6) 0.0128/0.00032; (7) 0.00256/0.000064 ng L⁻¹ de 17 α / μ g L⁻¹ de atrazina y (8) blanco de etanol/DMSO.

VII.10 Retrotranscripción del ARN a ADNc

La retrotranscripción del ARN obtenido a ADNc se realizó usando el equipo “Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR” de Thermo Scientific.

Se prepararon tres baños, uno a 25°C, uno a 50°C y el último a 85°C.

Después de la descongelación de los componentes del equipo, éstos se mezclan y centrifugan brevemente y se almacenan en hielo. Las soluciones estériles se mezclan en un tubo libre de RNasa (Figura 14) colocado dentro de hielo en el orden indicado a continuación:

Tabla 2. Reactivos utilizados para la realización de retrotranscripción

5X Reaction Mix	4 μ L
Maxima Enzyme Mix	2 μ L
Template RNA	1 pg - 5 μ g
Water, nuclease-free	to 20 μ L
Volumen total	20 L



Figura 14. Retrotranscripción del RNA a cDNA

Enseguida se mezcló suavemente y se centrifugó, posteriormente se incubaron durante 10 min a 25 °C, después 15 min a 50 °C y se terminó la reacción por calentamiento a 85 °C durante 5 min. El producto de la síntesis de ADNc se utilizó directamente en qPCR.



Figura 15. Incubación de muestras de cDNA

VII.11 Análisis de los niveles de expresión genética por PCR tiempo real de las muestras de ADNc

Para el análisis de expresión genética por PCR tiempo real se usó como molde el ADNc obtenido según el procedimiento anterior. Por cada gen se deben tener dos oligonucleótidos, una sonda marcada con un fluorocromo y un apagador (Quencher).

Las reacciones de PCR tiempo real se realizaron en una placa de 96 pozos clara usando el termociclador Applied Biosystems. En cada pozo se trabajó en formato múltiplex (tres genes por tubo de reacción). Para ello, las tres sondas incluidas en cada tubo de reacción cuentan con un marcador fluorescente diferente (FAM, TAMRA y Cy5). La metodología fue la siguiente:

Se descongelaron y mezclaron perfectamente todas las soluciones Master mix 2x, Oligo Forward #1, Oligo Reverse #1, Oligo Forward #2, Oligo Reverse #2, Oligo

Forward #3, Oligo Reverse #3, ADNc, Agua libre de nucleasas antes de utilizarlas.

La reacción se preparó adicionando a cada tubo los siguientes componentes:

Tabla 3. Componentes de reacción para PCR

Master mix 2x	12.5 μ L
Oligo Forward #1	0.3 μ M
Oligo Reverse #1	0.3 μ M
Oligo Forward #2	0.3 μ M
Oligo Reverse #2	0.3 μ M
Oligo Forward #3	0.3 μ M
Oligo Reverse #3	0.3 μ M
ADNc	\leq 1000 ng
Agua libre de nucleasas	25 μ L

- Se mezcló suavemente el contenido de cada tubo sin crear burbujas, ya que podrían interferir con la detección de la fluorescencia.
- Posteriormente se centrifugó brevemente.
- La microplaca conteniendo las mezclas anteriormente mencionadas es colocada en el equipo Applied Biosystems 7500, un equipo de tercera generación que permite de detectar secuencias por PCR en tiempo real (Figura 16).



Figura 16. Equipo 7500 Applied Biosystems.

- El programa para la amplificación de oligonucleótidos consistió en 40 ciclos, un primer segmento de 10 min a 95 °C para la desnaturalización, un segundo segmento para una desnaturalización a 95 °C por 15 segundos y un tercer segmento de amplificación a 60° C por 1 minuto.

La pantalla gráfica muestra la amplificación de todas las muestras en los pozos seleccionados. Es la ΔR_n vs Ciclo - ΔR_n siendo la magnitud de la fluorescencia normalizada generada por el reportero en cada ciclo durante la amplificación por PCR. En las Figuras 17 a 24 se muestra el ΔR_n obtenido en función del número de ciclo.

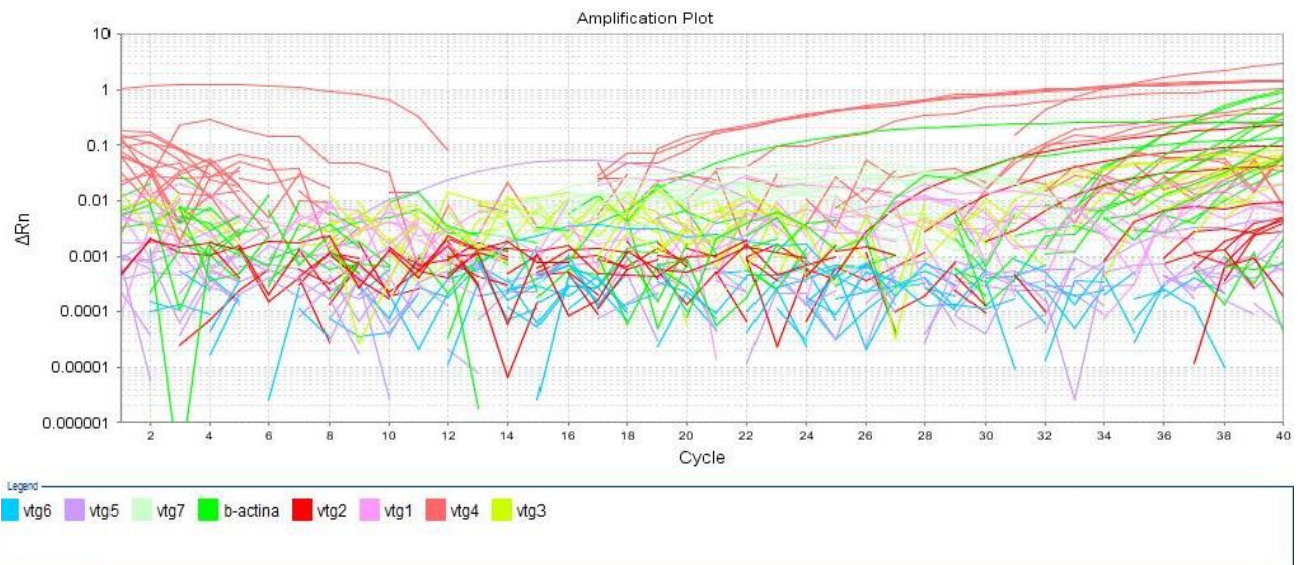


Figura 17. Curva de amplificación de los genes *vtg1* al *vtg7* de peces expuestos a 17β -estradiol (1er. experimento).

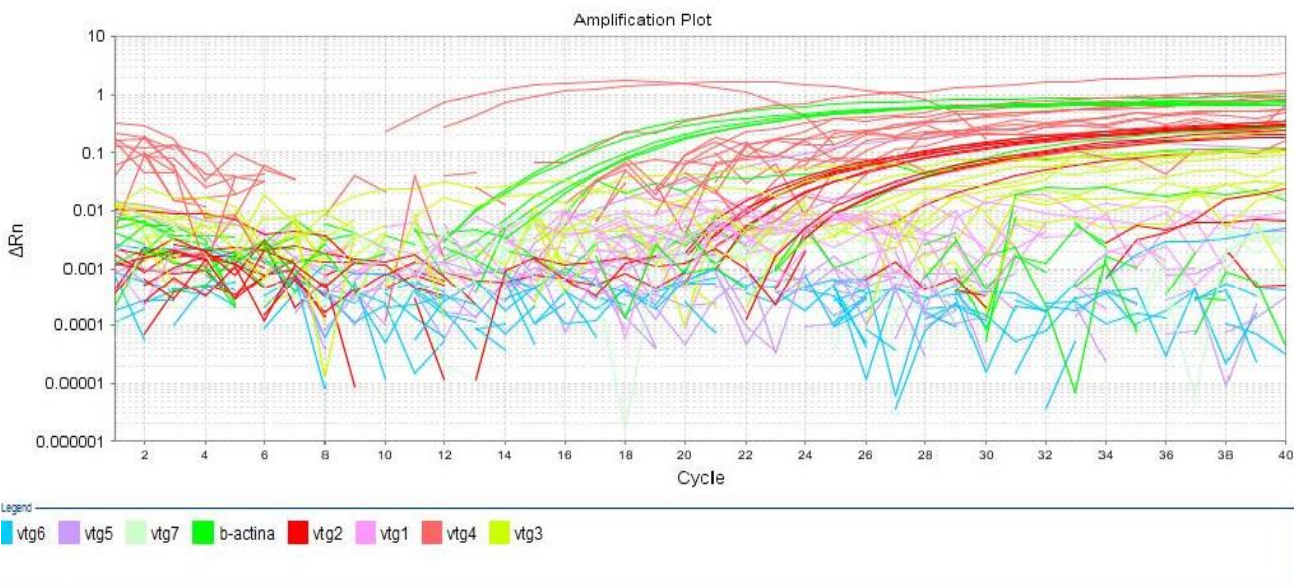


Figura 18. Curva de amplificación de los genes *vtg1* al *vtg7* en peces expuestos a muestras de 17β -estradiol (2do. experimento).

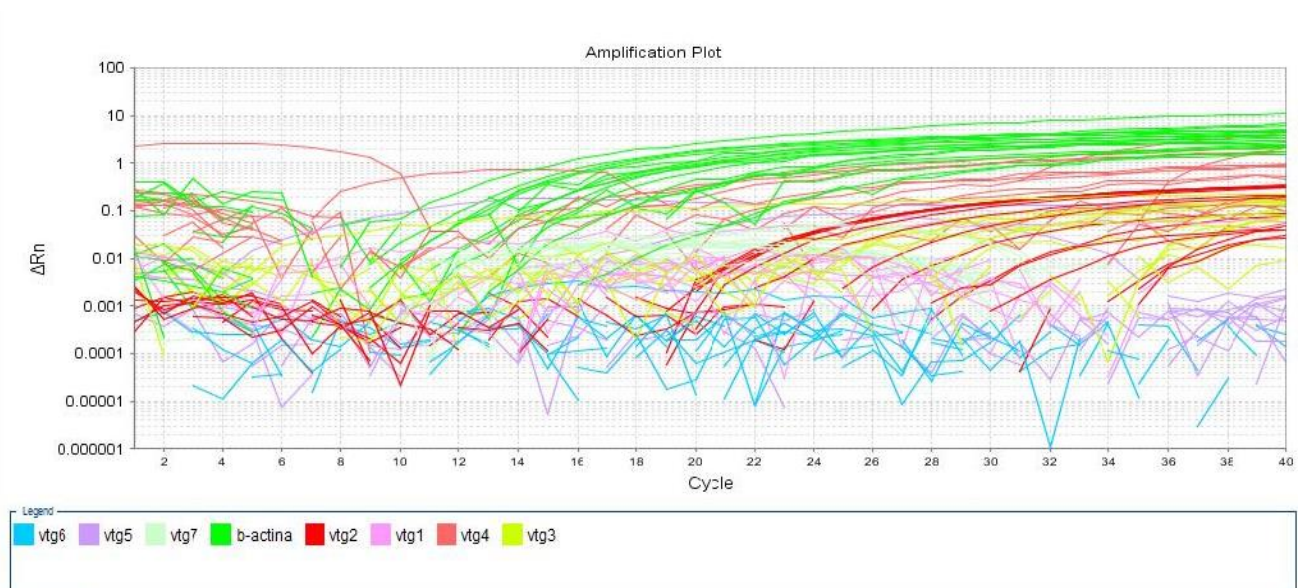


Figura 19. Curva de amplificación de los genes vtg1 al vtg7 de peces expuestos a 17 α -etinilestradiol (1er. experimento).

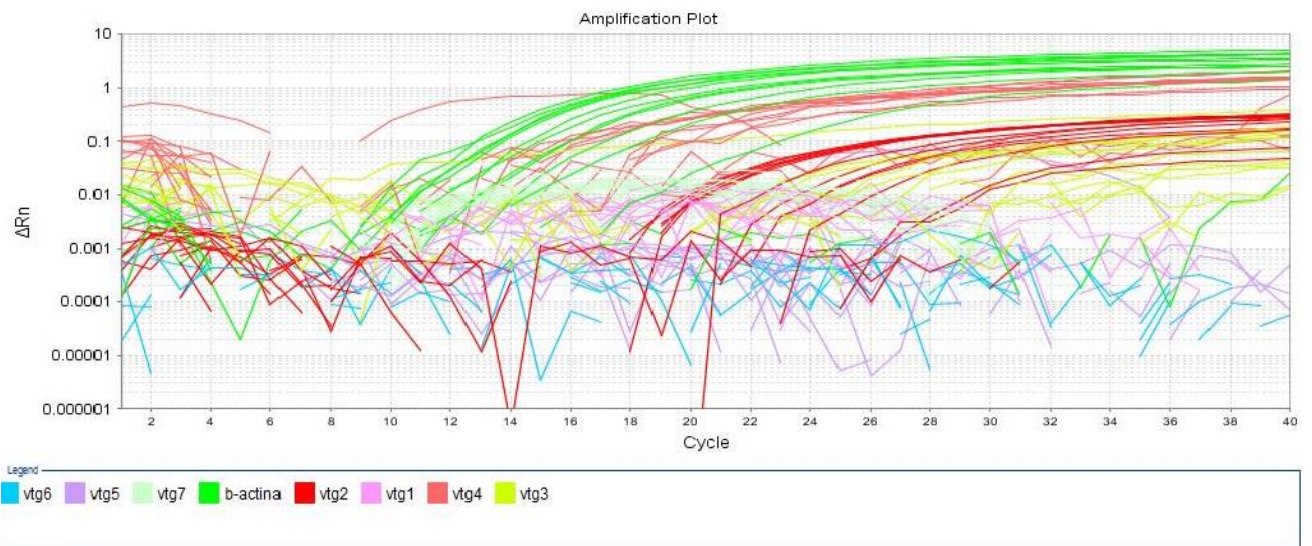


Figura 20. Curva de amplificación de los genes vtg1 al vtg7 de peces expuestos a 17 α -etinilestradiol (2do. experimento).

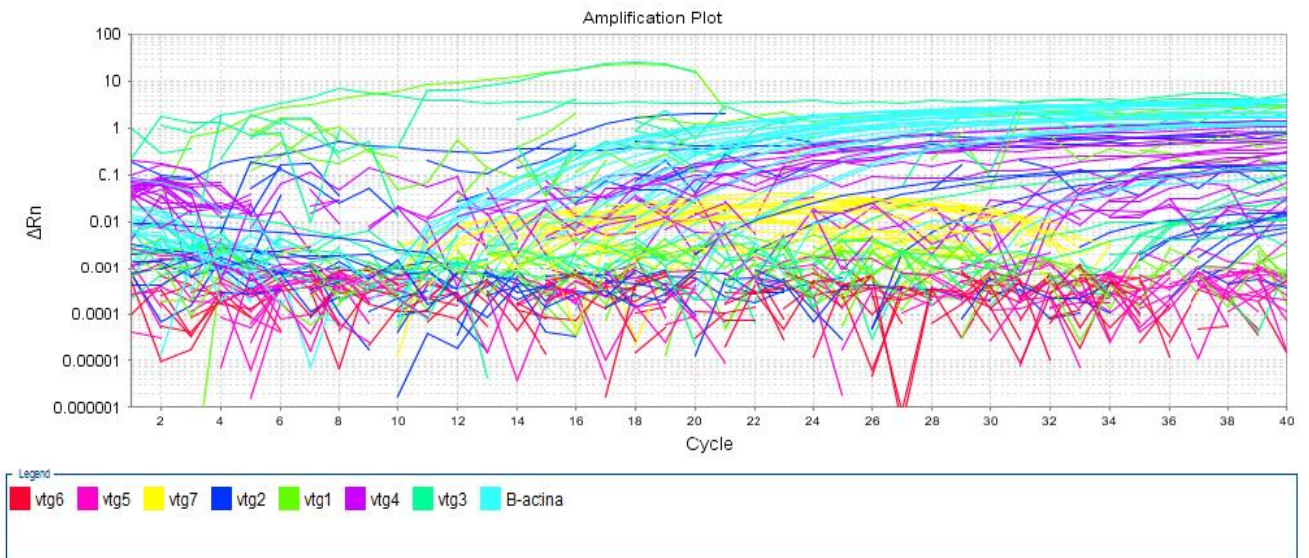


Figura 21. Curva de amplificación de los genes vtg1 al vtg7 de peces expuestos a atrazina (1er. experimento).

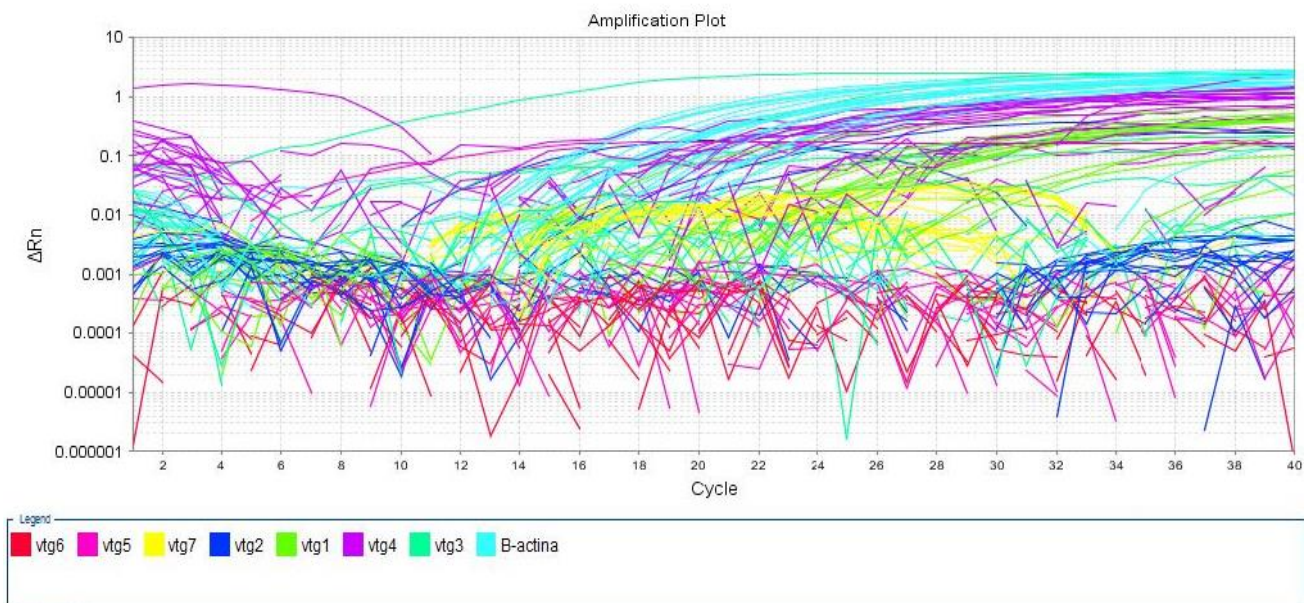


Figura 22. Curva de amplificación de los genes vtg1 al vtg7 en peces expuestos a la mezcla de atrazina (2do. experimento).

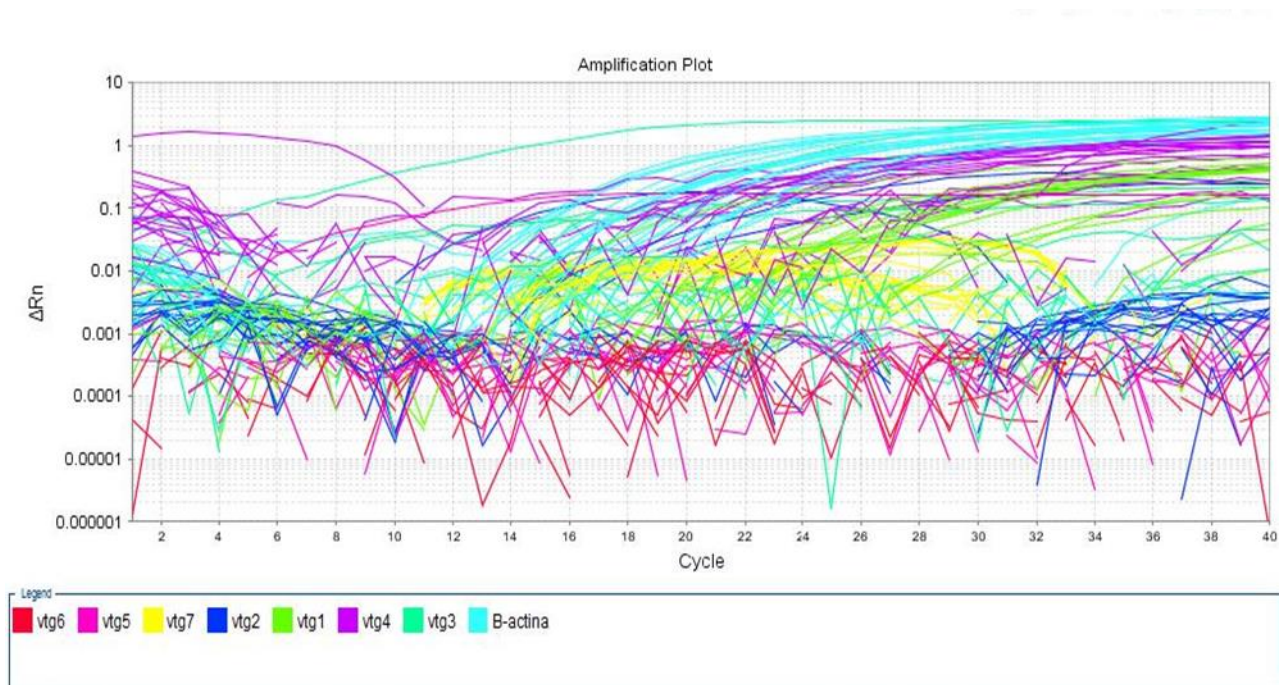


Figura 23. Curva de amplificación de los genes vtg1 al vtg7 en peces expuestos a la mezcla de 17α -etinilestradiol-atrazina (1er. experimento).

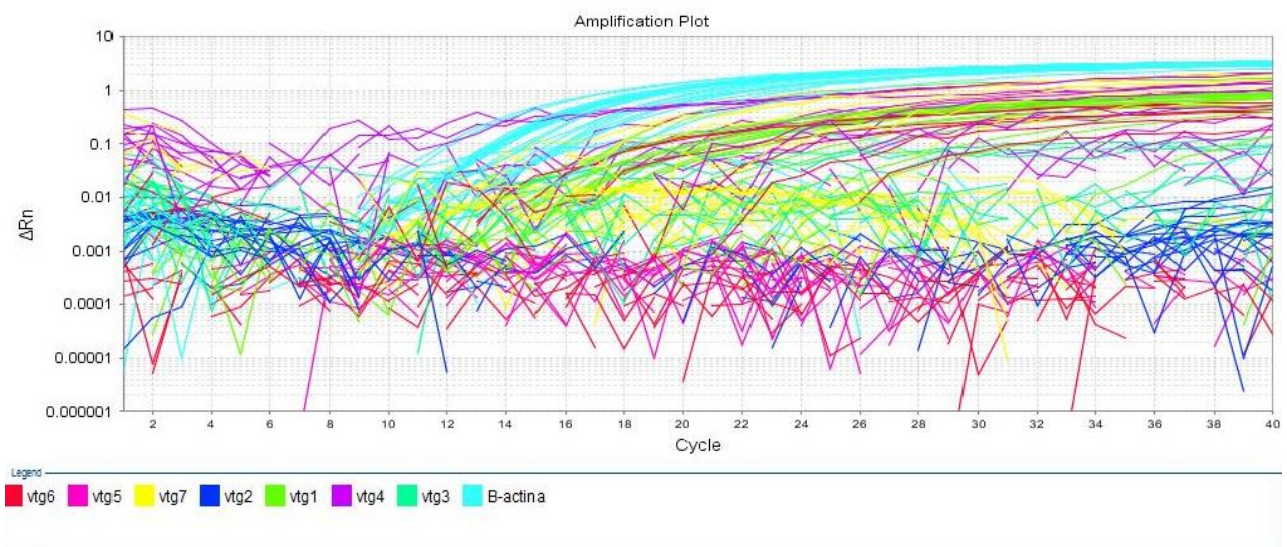


Figura 24. Curva de amplificación de los genes vtg1 al vtg7 en peces expuestos a la mezcla de 17α -etinilestradiol-atrazina (2do. experimento).

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Evaluación de la mortalidad y cambios de conducta en los peces expuestos a 17β -estradiol, atrazina y 17α -etinilestradiol y la mezcla 17α -etinilestradiol—atrazina

Fueron evaluados la mortalidad y el efecto en la reproducción de peces cebrá expuestos a tres hormonas: 17α -etinilestradiol en una serie de cuatro concentraciones, de 0.064 a 80 ng/L; de estradiol en una serie de 5 a 625 ng/L, y al herbicida atrazina en una serie de 0.64 a 80 μ g/L, durante 21 días. Los peces también fueron expuestos a una mezcla de cuatro concentraciones de 17α -etinilestradiol—atrazina. En todos los casos se incluyeron lotes de peces blanco y lotes de peces expuestos al solvente en el que se disolvió cada compuesto. La mortalidad y los efectos en la reproducción de la menor a la mayor concentración con respecto a un lote blanco, fueron como sigue: para 17α -etinilestradiol, 0 al 20% de mortalidad y 12% de disminución en la reproducción; para estradiol, 0 al 10% de mortalidad y 4% de disminución en la reproducción; para el herbicida atrazina, de 0 al 22% de mortalidad y 60% de disminución en la reproducción; para la mezcla 17α -etinilestradiol—atrazina, de 0 al 22% de mortalidad y 80% de disminución en la reproducción.

Los cambios fenotípicos observados con 17α -etinilestradiol fueron aumento en la porción ventral y presencia de leves hemorragias en todo el cuerpo (Figura 25); con estradiol, sólo ligero aumento en la porción ventral; con atrazina, comportamiento nervioso y ligero abultamiento en la porción ventral; mientras que para la mezcla 17α -etinilestradiol—atrazina comportamiento nervioso, abultamiento en la porción ventral y presencia de hemorragias en todo el cuerpo (Figura 26).



Figura 25. Pez expuesto a 80 ng L^{-1} de 17α -etinilestradiol, formación de petequias a los 21 días de exposición.



Figura 26. Pez expuesto a la mezcla de 17α -etinilestradiol-atrazina a los 17 días de exposición, muestra petequias en todo el cuerpo y vientre prominente.

VIII.2 Niveles de expresión general del gen endógeno (housekeeping)

Con base en valores promedio de ciclo umbral [Ct] de PCR tiempo real en los peces control, fueron calculados los niveles de expresión general de los genes seleccionados como endógenos (housekeeping). Filby *et. al.* (2007) reporta que niveles de expresión extremadamente altos o bajos pueden impedir la utilidad de estos genes como controles internos (Tabla 3).

La evaluación de los datos de PCR en tiempo real fue realizada usando el método qGen desarrollado por Muller (2002). Este método calcula la abundancia de ARNm basado en la eficiencia de la reacción de amplificación de PCR específicamente para cada gen, relacionándolo con el gen de referencia. La expresión de β -actina fue usada como control interno para normalización. Como parte de la muestra analizada, es compensado por la variable de procesamiento de la eficiencia de la normalización.

VIII.3 Niveles de expresión de los genes *vtg1* al *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina, debido a exposición a 17β -estradiol

En el primer experimento de exposición con la solución de 17β -estradiol en la concentración de 625 ng L^{-1} el gen *vtg1* se expresó 18.2 veces con respecto al blanco. El gen *vtg4* se expresó 5.9 veces, 0.08 veces con respecto al blanco a las concentraciones de 625 y 25 ng L^{-1} , respectivamente. Este mismo gen se reprimió a las concentraciones de 125 y 5 ng L^{-1} con valores de -14.2 y -6.65 veces respecto al gen de referencia (Figura 27).

En el segundo experimento de exposición con la solución de 17β -estradiol, el gen *vtg2* se expresó 4.5 veces, 6.1 veces y 1.49 a las concentraciones de 625, 25 y 5 ng L^{-1} con respecto al blanco. Este mismo gen se reprimió -0.26 veces a la concentración de 125 ng L^{-1} . El gen *vtg3* se expresó 12.5 veces con respecto al blanco en la concentración de 625 ng L^{-1} . Este mismo gen se reprimió en las

concentraciones de 25 y 5 ng L⁻¹ con valores de -5.6 y -8.8 veces respecto al gen de referencia. El gen *vtg4* se expresó 1.5 veces con respecto al blanco en las concentraciones de 625 y 25 ng L⁻¹, respectivamente. *vtg4*, se reprimió en las concentraciones de 125 y 5 ng L⁻¹ con valores de -2.2 y -6.8 veces respecto al gen de referencia (Figura 28).

VIII.4 Niveles de expresión de los genes *vtg1* al *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina, debido a exposición a 17 α -etinilestradiol

En el primer experimento de exposición con la solución de 17 α -etinilestradiol en las concentraciones de 80, 8 y 1.6 ng L⁻¹ el gen *vtg2* se expresó 7.4, 6.5 y 12.0 veces con respecto al blanco. Este mismo gen se reprimió en la concentración de 0.32 ng L⁻¹ -6.0 veces con respecto al blanco. El gen *vtg3* se expresó 0.02 veces, 7.4 veces y 4.3 veces con respecto al blanco en las concentraciones de 8, 1.6 y 0.32 ng L⁻¹, respectivamente. El gen *vtg4* se expresó 4.7 veces, 1.7 veces y 3.0 veces con respecto al blanco en las concentraciones de 80, 8, y 1.6 ng L⁻¹, respectivamente. Este mismo gen se reprimió en la concentración de 0.32 ng L⁻¹ con un valor de -10.6 veces respecto al gen de referencia (Figura 29).

En el segundo experimento de exposición con la solución de 17 α -etinilestradiol, el gen *vtg2* se expresó 0.48 veces, 5.8 veces y 3.2 veces en las concentraciones de 80, 1.6 y 0.32 ng L⁻¹ con respecto al blanco. Este mismo gen se reprimió -5.01 veces a la concentración de 8 ng L⁻¹. El gen *vtg3* se expresó 13.9 veces y 10.7 veces con respecto al blanco en las concentraciones de 1.6 y 0.32 ng L⁻¹. Este mismo gen se reprimió en las concentraciones de 80 y 8 ng L⁻¹ con valores de -0.29 y -2.31 veces respecto al gen de referencia. El gen *vtg4* se expresó 3.0 veces, 3.89 veces y 1.6 veces con respecto al blanco en las concentraciones de 80, 1.6 y 0.32 ng L⁻¹, respectivamente. *vtg4* se reprimió en las concentración de 8 ng L⁻¹ con un valor de -4.3 veces respecto al gen de referencia (Figura 30).

VIII.5 Niveles de expresión de los genes *vtg1* al *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina, debido a exposición a atrazina

En el primer experimento de exposición con el herbicida atrazina en las concentraciones de 10; 0.4; 0.08; 0.0016; 0.00032 y 0.000064 mg L⁻¹ Atr, el gen *vtg4* se expresó 4.1 veces, 13.7 veces, 19.4 veces, 2.8 veces, 8.3 veces y 12.7 veces respectivamente con relación al gen β -actina. Este mismo gen se reprimió -2.8 veces con el solvente DMSO donde se diluyó la atrazina y a la concentración de 2 mg L⁻¹ Atr con -1.5 veces ambos con relación al gen β -actina. (Figura 31).

En el segundo experimento de exposición con la atrazina el gen *vtg1* en las concentraciones de 2, 0.4, 0.08, 0.0016, 0.00032 y 0.000064 mg L⁻¹ Atr y con el solvente DMSO se reprimió -3.0 veces, -17.1 veces, -16.5 veces, -19.7 veces, -18.3 veces, -0.58 veces y 9.36 veces con respecto al gen β -actina. Con el gen *vtg3* en las concentraciones de 10, 2, 0.4, 0.08, 0.0016, 0.00032 y 0.000064 mg L⁻¹ Atr y con el solvente DMSO se reprimió -12.6 veces, -9.5 veces, -19.5 veces, -15.9 veces, -19.0 veces, -29.7, -7.7 y -21.9 veces, respecto al gen β -actina. El gen *vtg4* también se reprimió a las concentraciones de 10, 2, 0.4, 0.08, 0.0016, 0.00032 y 0.000064 mg L⁻¹ Atr y con el solvente DMSO, -7.2 veces, -23.2 veces, -8.8 veces, -13.9 veces, -17.3 veces, -18.2 veces, -2.1 veces y -7.2 veces con respecto al gen β -actina (Figura 32).

VIII.6 Niveles de expresión de los genes *vtg1* al *vtg7* con respecto al gen endógeno *β-actina*, debido a exposición de la mezcla 17 α -etinilestradiol—atrazina

En el primer experimento de exposición con la mezcla 17 α -etinilestradiol—atrazina en las concentraciones de 8 ng L⁻¹ 17 α / 2 mg L⁻¹ Atr; 0.32 ng L⁻¹ 17 α / 0.08 mg L⁻¹ Atr; 0.64 ng L⁻¹ 17 α / 0.0016 mg L⁻¹ Atr; 0.0128 ng L⁻¹ 17 α / 0.00032 mg L⁻¹ Atr el gen *vtg1* se expresó 9.9 veces, 8.5 veces, 9.3 veces y 2.4 veces con respecto al blanco. Este mismo gen se reprimió en las concentraciones de 80 ng L⁻¹ 17 α / 10 mg L⁻¹ Atr; 1.6 ng L⁻¹ 17 α / 0.4 mg L⁻¹ Atr con -1.1 veces y -0.64 veces con respecto al blanco. El gen *vtg4* se expresó 10.4 veces, 17.9 veces 20.7 veces, 15.9 veces, 18.91 veces y 5.8 veces con respecto al blanco en las concentraciones 80 ng L⁻¹ 17 α / 10 mg L⁻¹ Atr; 8 ng L⁻¹ 17 α / 2 mg L⁻¹ Atr; 1.6 ng L⁻¹ 17 α / 0.4 mg L⁻¹ Atr; 0.32 ng L⁻¹ 17 α / 0.08 mg L⁻¹ Atr; 0.64 ng L⁻¹ 17 α / 0.0016 mg L⁻¹ Atr; 0.0128 ng L⁻¹ 17 α / 0.00032 mg L⁻¹ Atr, respectivamente. (Figura 33).

En el segundo experimento de exposición con la mezcla 17 α -etinilestradiol—atrazina en las concentraciones de 80 ng L⁻¹ 17 α / 10 mg L⁻¹ Atr; 8 ng L⁻¹ 17 α / 2 mg L⁻¹ Atr; 1.6 ng L⁻¹ 17 α / 0.4 mg L⁻¹ Atr; 0.32 ng L⁻¹ 17 α / 0.08 mg L⁻¹ Atr; 0.64 ng L⁻¹ 17 α / 0.0016 mg L⁻¹ Atr; 0.0128 ng L⁻¹ 17 α / 0.00032 mg L⁻¹ Atr y 0.00256 ng L⁻¹ 17 α / 0.000064 mg L⁻¹ Atr el gen *vtg1* se expresó 2.6 veces, 10.1 veces, 9.8 veces, 7.4 veces, 8.1 veces, 5.4 veces y 10.8 veces con respecto al blanco. El gen *vtg4* se expresó 0.64 veces con respecto al blanco en la concentración de 0.64 ng L⁻¹ 17 α / 0.0016 mg L⁻¹ Atr. El gen *vtg6* se expresó 15.0 veces y 10.2 veces con respecto al blanco en las concentraciones de 0.64 ng L⁻¹ 17 α / 0.0016 mg L⁻¹ Atr y 0.0128 ng L⁻¹ 17 α / 0.00032 mg L⁻¹ Atr. Mientras que el gen *vtg7* se expresó 8.6 veces y 2.01 veces a las concentraciones de 0.64 ng L⁻¹ 17 α / 0.0016 mg L⁻¹ Atr y 0.0128 ng L⁻¹ 17 α / 0.00032 mg L⁻¹ Atr (Figura 34).

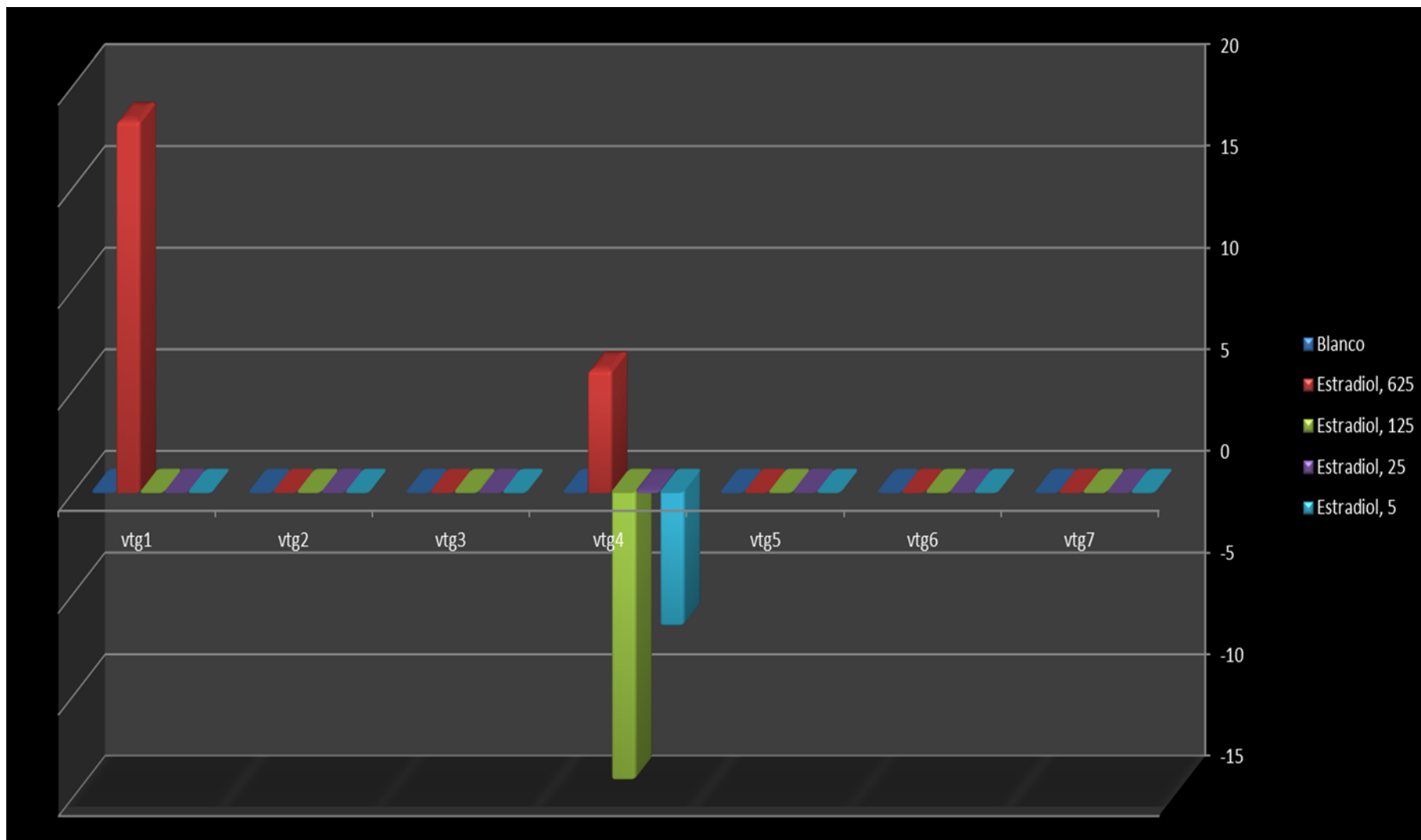


Figura 27. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de 17β -estradiol (1er. experimento).

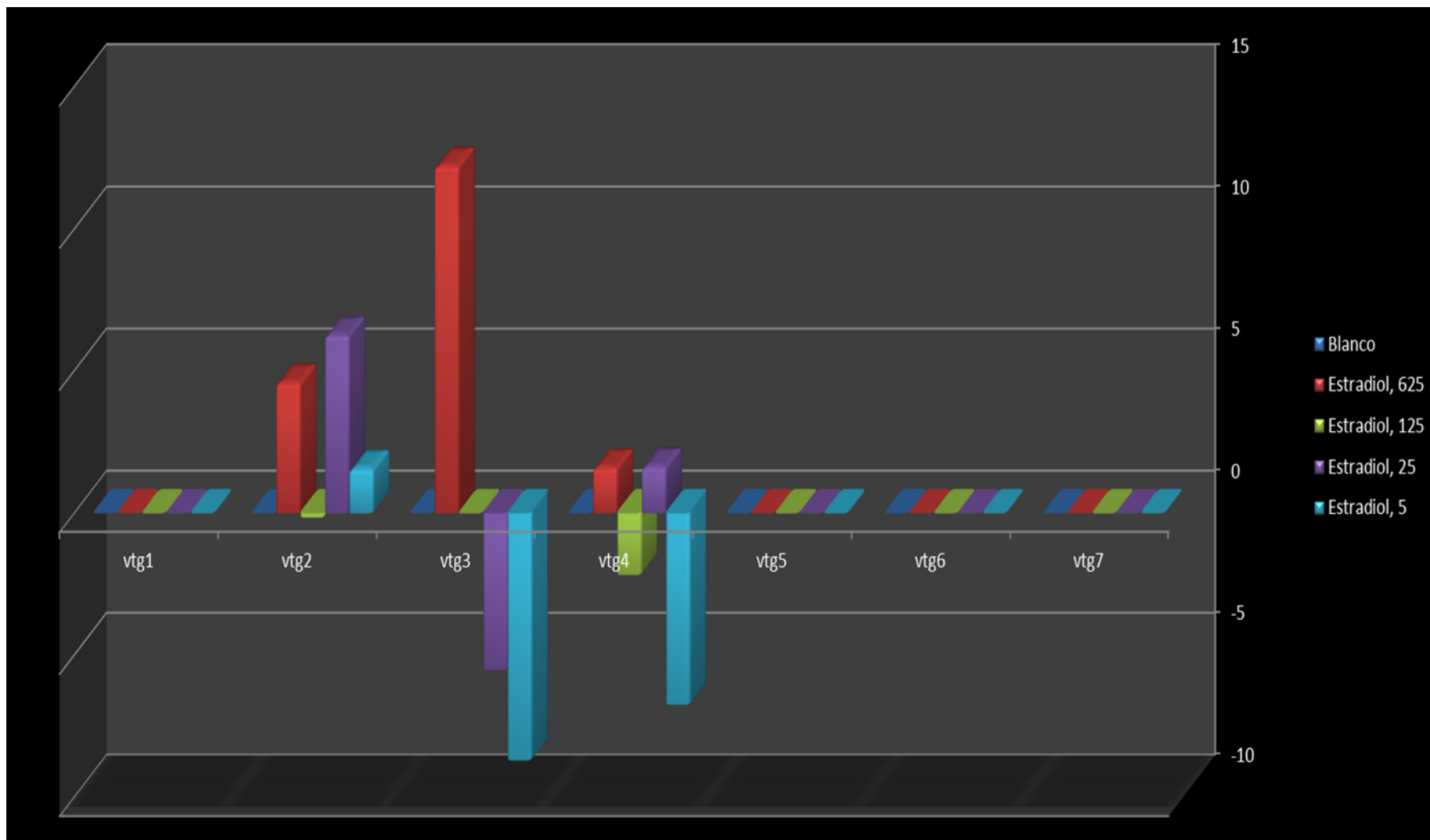


Figura 28. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de 17 β -estradiol (2do. experimento).

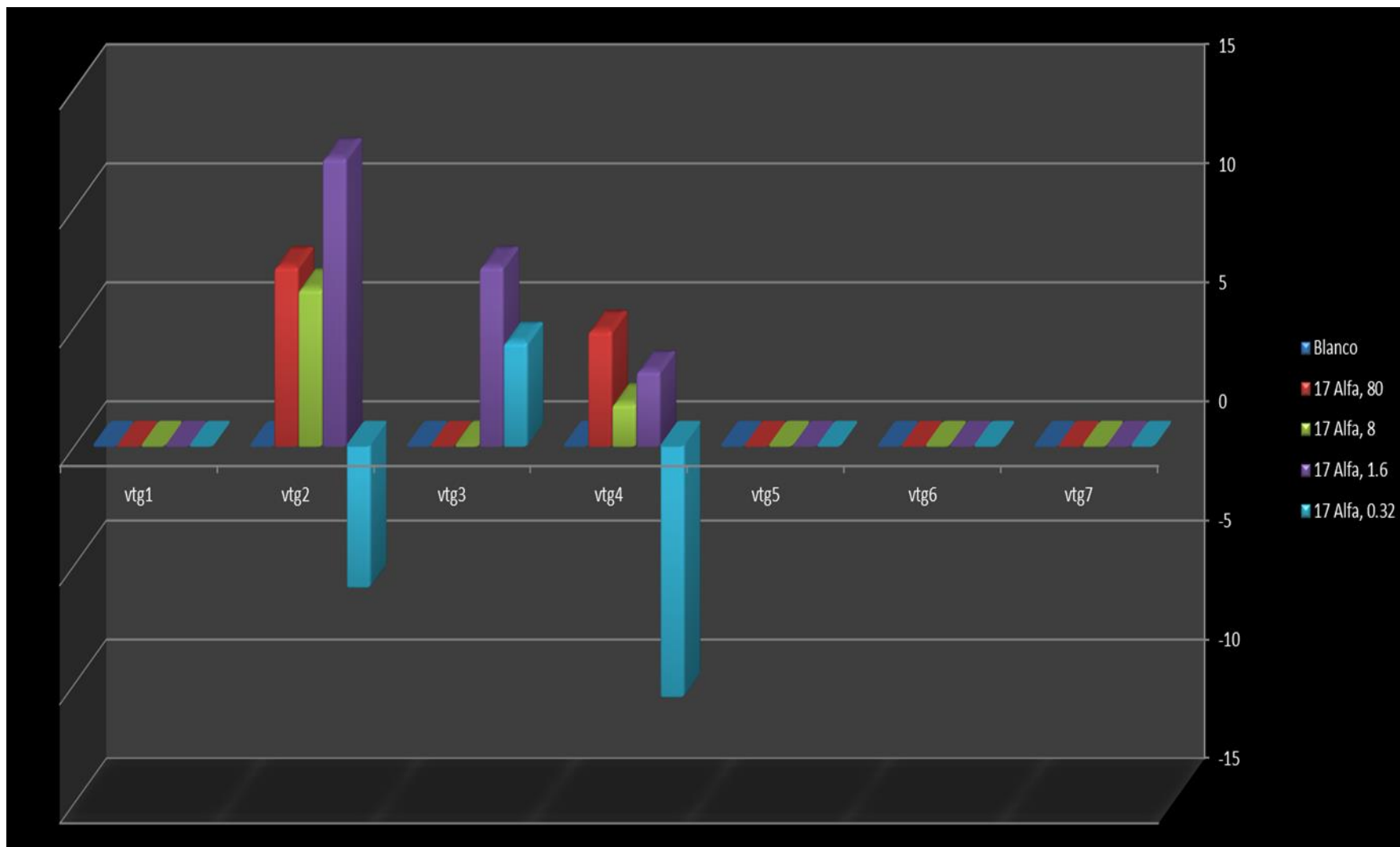


Figura 29. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de 17α -etinilestradiol (1er. experimento).

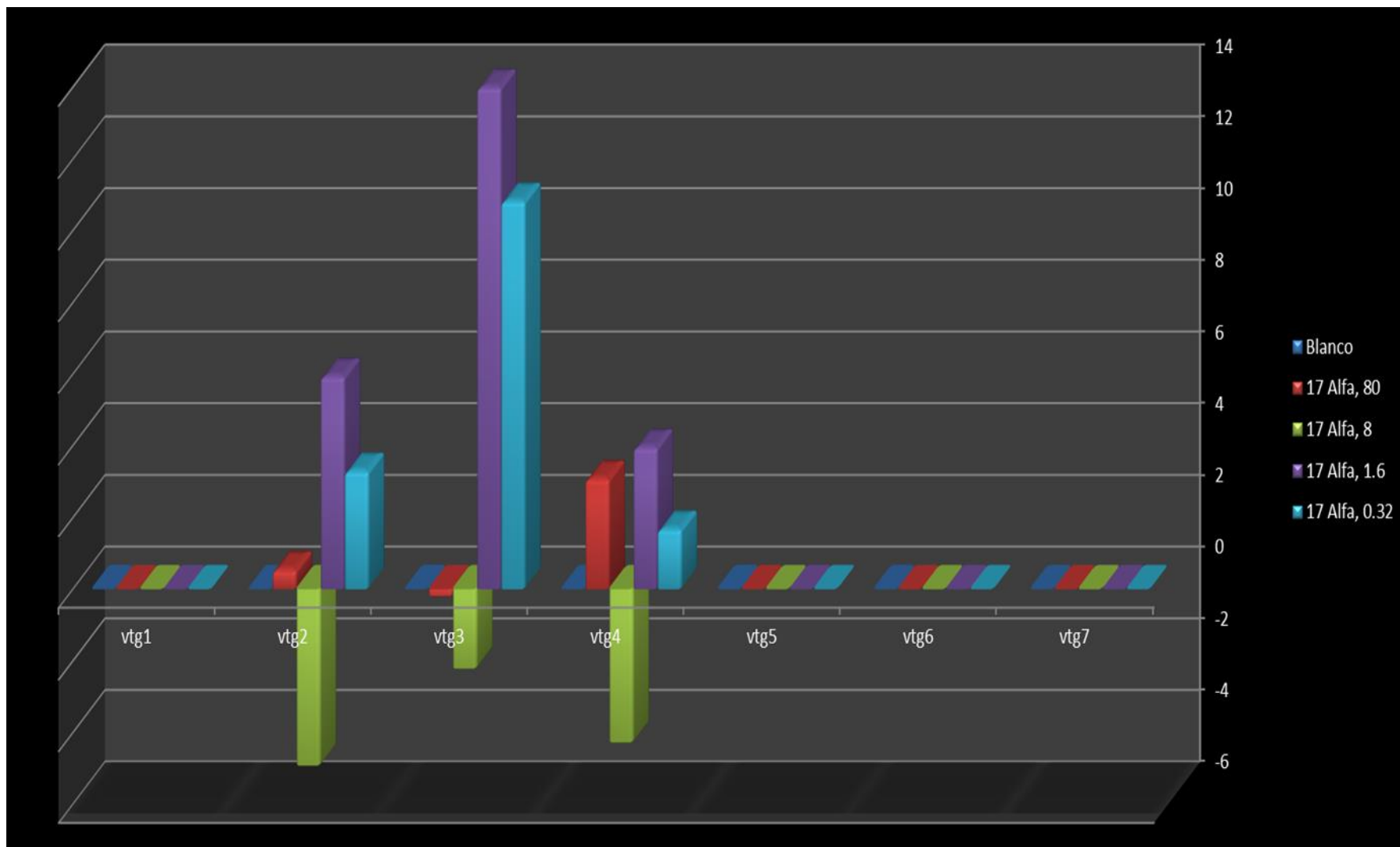


Figura 30. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de 17α -etinilestradiol (2do. experimento).

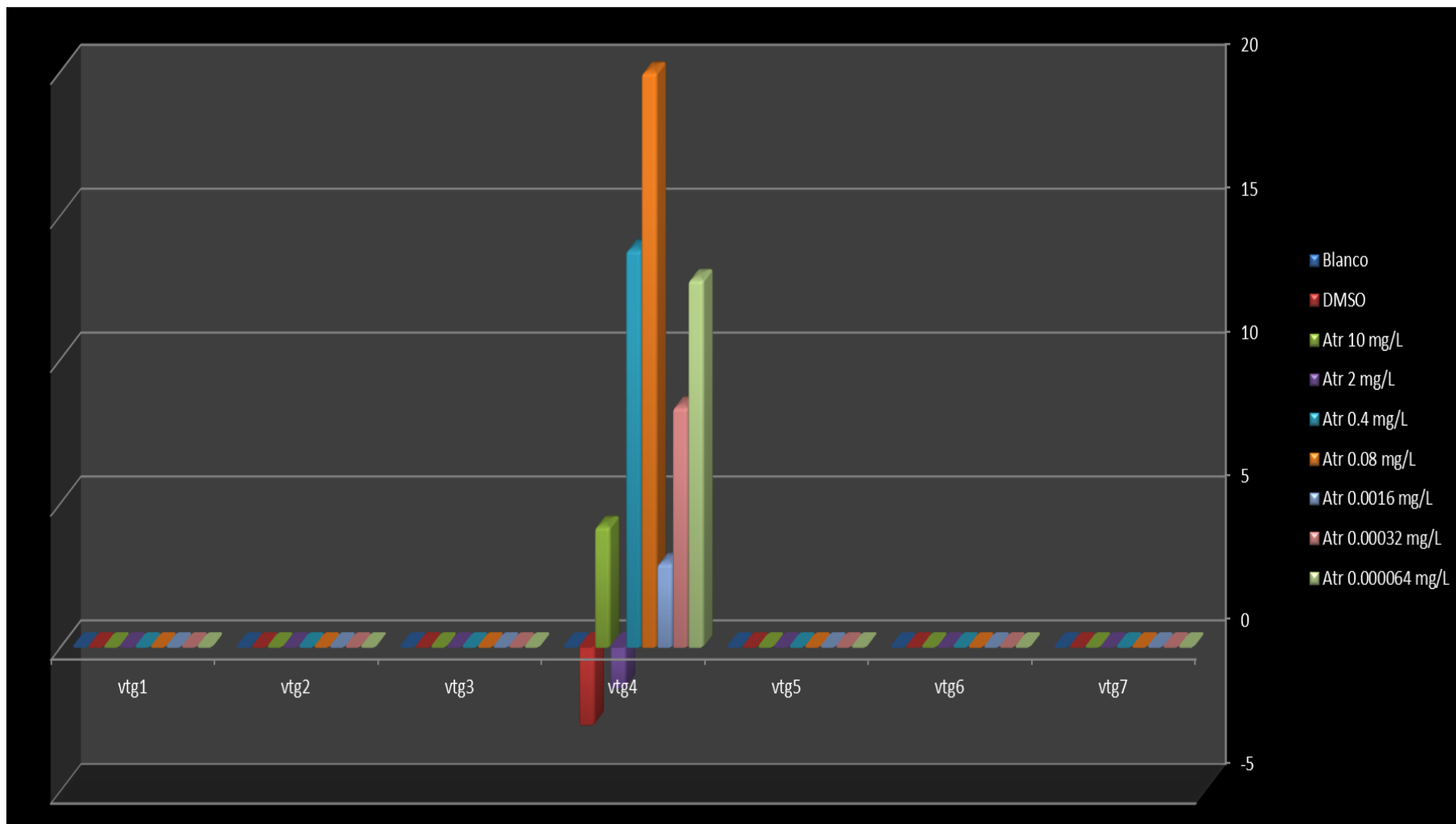


Figura 31. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de atrazina (1er. experimento).

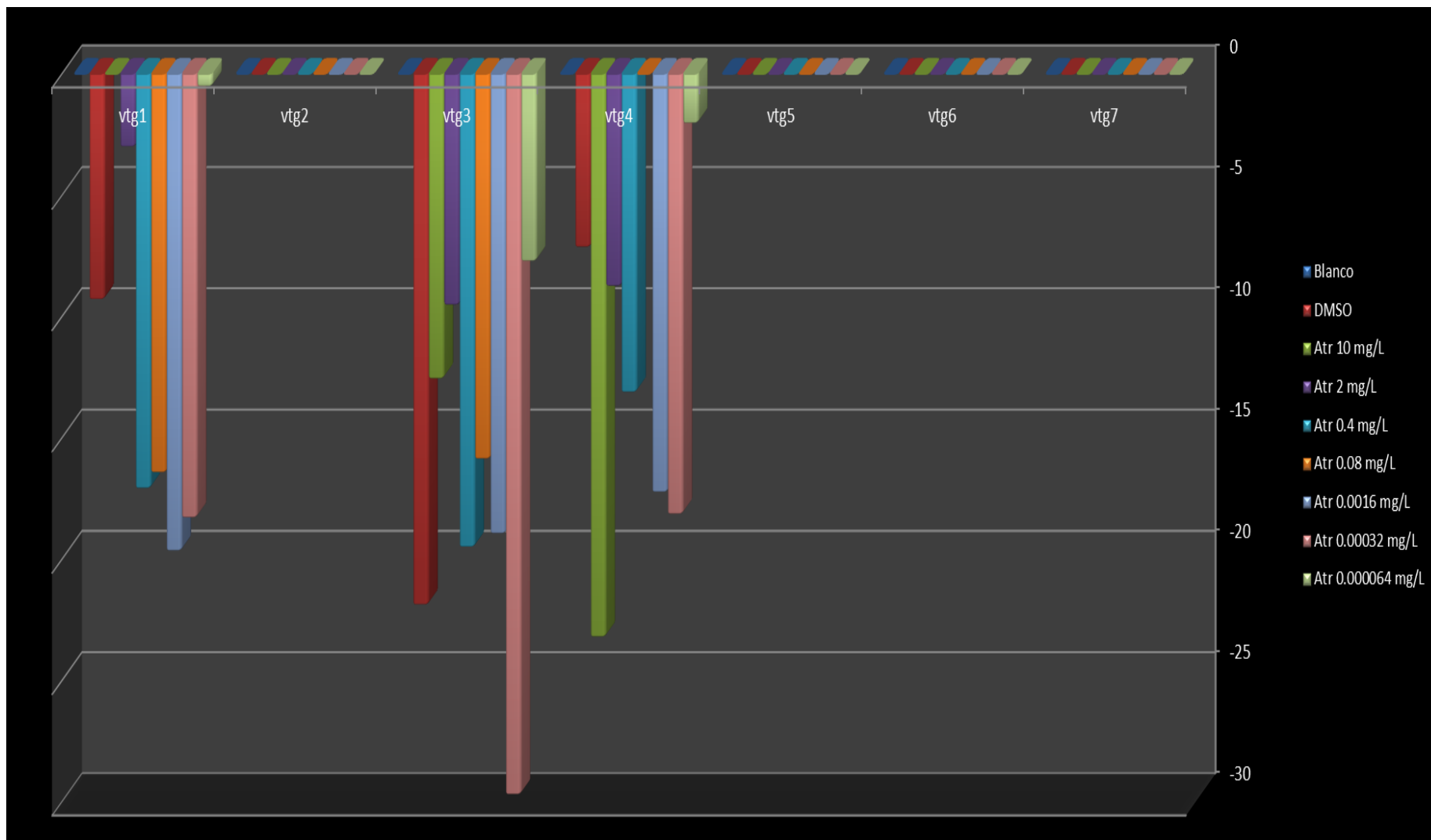


Figura 32. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de atrazina (2do. experimento).

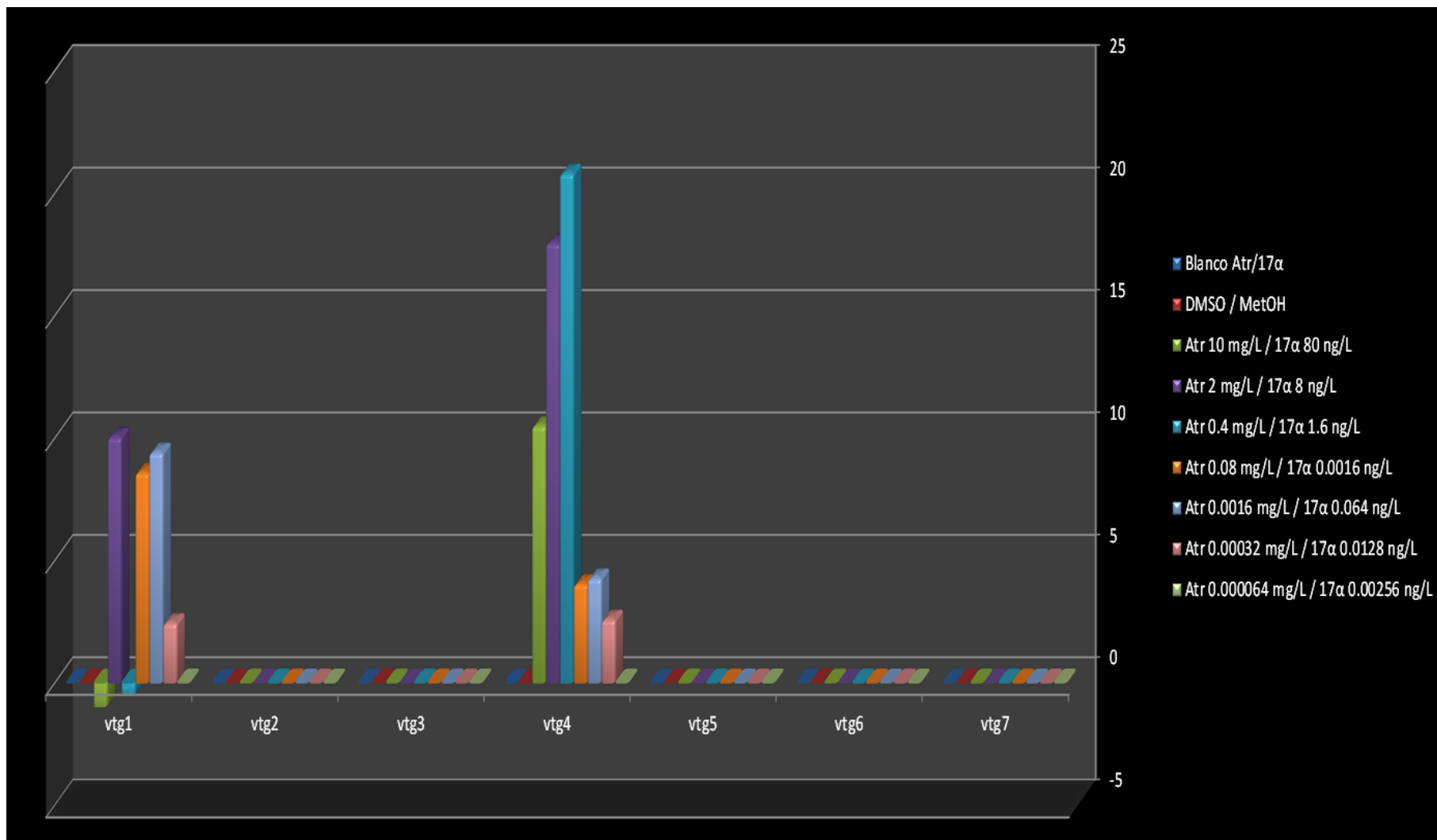


Figura 33. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de la mezcla 17 α -etinilestradiol–atrazina (1er. experimento).

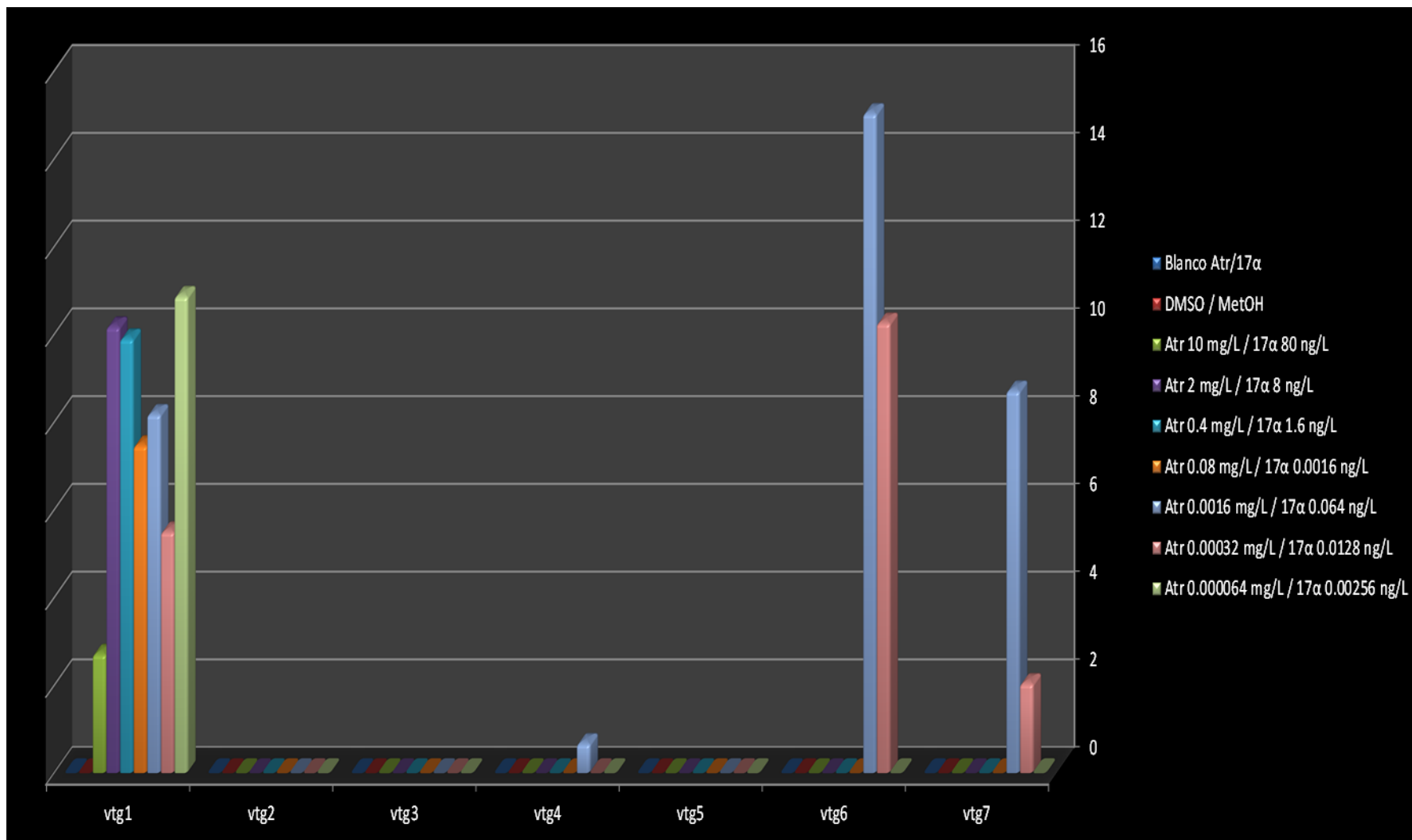


Figura 34. Niveles de expresión de los genes blanco *vtg1* a *vtg7* con respecto al gen endógeno β -actina durante 21 días de exposición a muestras sintéticas de la mezcla 17 α -etinilestradiol-atrazina (2do. experimento)

IX. DISCUSIÓN

El gen *vtg4* se expresó con 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, la atrazina y la mezcla 17 α -etinilestradiol—atrazina. Los genes *vtg1*, *vtg6* y *vtg7* se expresaron con 17 β -estradiol y la mezcla 17 α -etinilestradiol—atrazina. Los genes *vtg2* y *vtg3* se expresaron con 17 β -estradiol y 17 α -etinilestradiol. El gen *vtg5* se expresó sólo con el compuesto 17 β -estradiol. De tal forma, los genes *vtg1*, *vtg4*, *vtg6* y *vtg7* mostraron ser biomarcadores idóneos de exposición a compuestos disruptores endócrinos, tanto de naturaleza estrogénica como xenoestrógena. Los genes *vtg2* y *vtg3* se expresaron con hormonas naturales y sintéticas, mientras que *vtg5* se expresó de manera poco significativa.

Estos genes posiblemente puedan ser candidatos a biomarcadores, cuyo objetivo sea para detectar contaminantes orgánicos que despliegan actividad estrogénica y que se encuentran prevalentes en una amplia extensión en el ambiente acuático (Jobling *et al.* 1995). Estos genes permitirán detectar daños en el genoma causados por compuestos estrogénicos y xenoestrógenos, (imitadores de hormonas, por ejemplo, la atrazina), y sustancias químicas disruptivas-endócrinas. Es posible que la potencia real de tales compuestos sea baja comparada con hormonas naturales, como 17 β -estradiol, pero las concentraciones en el medio ambiente podrían ser suficientemente altas para producir efectos biológicos dañinos en el habitat.

Se ha demostrado que el pez cebra, empleado en esta investigación, tiene una amplia variedad de ventajas reproductivas entre los vertebrados, superadas sólo por invertebrados. Los procesos reproductivos, sin importar la especie, dependen de la coordinación de muchas hormonas (Janz, 2000). Los principales esteroides sexuales en el pez son estradiol y testosterona. Existen diversas vías por las cuales los disruptivos endócrinos pueden producir efectos adversos: ellos pueden (1) unirse y bloquear al receptor de estrógeno (ER) o, alternativamente, unirse e imitar una hormona; (2) desplazar una hormona de una proteína mensajera,

haciéndola no disponible para células target; (3) afectar la síntesis de hormonas; o (4) afectar varios otros receptores de hormonas en la membrana celular, tal como el receptor de andrógeno. Afortunadamente, los receptores de esteroides sexuales y enzimas de biosíntesis seleccionadas caracterizadas hasta ahora exhiben notable conservación evolutiva en secuencia, estructura, y, en algún grado, función a través de especies.



X. CONCLUSIONES

La familia de genes de vitelogeninas *vtg1*, *vtg2*, *vtg3*, *vtg4*, *vtg5*, *vtg6* y *vtg7* mostró diferentes niveles de expresión, teniendo la mejor respuesta el gen *vtg4*, seguido del gen *vtg1*. Este último gen en trabajos anteriores realizados en IMTA (Sandoval *et al.*, 2012) fue propuesto como un buen biomarcador de exposición y ahora se incluye a la lista el gen *vtg4*, que tuvo una mejor respuesta a los compuestos de exposición mostrando así su capacidad para detectar posibles compuestos disruptores endócrinos presentes en diversos cuerpos de agua.

Se sugiere continuar con el aspecto de extrapolación, donde se necesita trabajar en relación con la naturaleza predictiva de los biomarcadores. Se tienen avances en la comprensión de la capacidad predictiva de inducción de vitelogenina a través de niveles de organización biológica (Hutchinson and Pickford 2002, Matthiessen *et al.* 2002, Mills *et al.* 2003, Robinson *et al.* 2003).

Actualmente se están realizando esfuerzos para explorar la hipótesis subyacente de aditividad para CDEs estrogénicos (Charles *et al.*, 2002a, b), aunque debería hacerse esfuerzo mayor para desarrollar una base de datos con la cual podrían ser calculadas las potencias relativas. En la actualidad, dada la complejidad de los sistemas de señalización endócrinos, los múltiples resultados posibles para la salud, las diferencias en respuesta a través de especies, y la necesidad de demostrar relaciones dosis-respuesta paralelas a través de puntos finales, es una meta poco probable de alcanzar, pero no imposible. Sin embargo, será necesario abordar el tema de riesgo acumulativo para CDEs.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

Ankley T. G., Bencic C. D., Breen S. M., Collette W. T., Conolly B. R., Denslow D. N., Edwards W. S., Ekman R. D., Garcia-Reyero N., Jensen M. K., Lazorchak M. J., Martinovic D., Miller H. D., Perkins J. E., Orlando F. E., Villeneuve L. D., Rong-Lin W., Watanabe H. K. (2009). *Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action*. *Aquatic Toxicology* 92:168–178

Bresch H. (1991). *Early life-stage in zebrafish versus a growth test in rainbow trout to evaluate toxic effects*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 46:641–648

Caldwell J. D., Mastrocco F. Hutchinson H.T., Lange R., Heijerick D., Janssen C. Anderson D. P., Sumpter P.J. (2008). *Derivation of an Aquatic Predicted No-Effect Concentration for the Synthetic Hormone 17 α -Ethinyl estradiol*. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7046–7054.

Charles, G. D., Gennings, C., Zacharewski, T. R., Gollapudi, B. B., and Carney, E. W. (2002a). *An approach for assessing estrogen receptor-mediated interactions in mixtures of three chemicals: A pilot study*. *Toxicol. Sci.* 68(2), 349–360.

Charles, G. D., Gennings, C., Zacharewski, T. R., Gollapudi, B. B., and Carney, E. W. (2002b). *Assessment of interactions of diverse ternary mixtures in an estrogen receptor- α reporter assay*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 180(1), 11–21

Fenske M., Maack G., Schäfers C., Segner H. (2005). *An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 24, No. 5, pp. 1088–1098.

Filby A, Santos E., Thorpe K, Maack G., and Tyler C. (2007). *Gene Expression Profiling for Understanding Chemical Causation of Biological Effects for Complex Mixtures: A Case Study on Estrogens*. *Environ. Sci. Technol.* 41, 8187–8194

García-Cañas V., Cifuentes A. y González R. (2004). *Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques*. *Critical Reviews in Food Science*, 44 425-436.

Hansen, P.-D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M., and Blaise, C. (1998). *Vitellogenin— A biomarker for endocrine disruptors*. *Trends Anal. Chem.* 17:448–451

Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. (2005). *Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity*. Toxicol Sci. 86:6–19.

Hoffmann, J.L., Thomason, R.G., Lee, D.M., Brill, J.L., Price, B.B., Carr, G.J., Versteeg, D.J., (2008). *Hepatic gene expression profiling using GeneChips in zebrafish exposed to 17 α -methylidihydrotestosterone*. Aquat. Toxicol. 87, 69–80.

Hughes S. y Moody A. (2007). *PCR. Methods express*. Scion Publishing.UK.

Hutchinson T.H., Pickford D.B. (2002). *Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment*. Toxicology 181-182: 383-387.

Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G., and Sumpter, J. P. (1995). *A variety of environmental persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic*. Environ. Health Perspect. 503:582–587

Janz, D. M. (2000). *Endocrine system*. In *The handbook of experimental animals: The laboratory fish*. Ed. G. K. Ostrander, pp. 189–212. Orlando, FL: Academic Press.

Kausch U., Alberti M., Haindl S., Budczies J. y Hock B. (2008). *Biomarkers for Exposure to Estrogenic Compounds: Gene Expression Analysis in Zebrafish (Danio rerio)*. Environmental Toxicology DOI 10.1002/tox

Länge R, Hutchinson TH, Croudace CP, Siegmund F, Schweinfurth H, Hampe P, Panter GH, Sumpter JP. 2001. *Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (Pimephales promelas)*. Environ Toxicol Chem 20:1216-1227.

Liedtke A., Muncke J., Rüfenacht K. y Eggen R. (2008). *Molecular multi-effect screening of environmental pollutants using the MolDarT*. Environmental Toxicology 23:59-67.

Matthiessen A., Allen Y., Bamber S., Craft J. Hurst M., Hutchinson T., Feist S., Katsiadaki I., Kirby M., Robinson C., Scott S., Train J., Thomas K. (2002). *The impact of oestrogenic and androgenic contamination on marine organisms in the United Kingdom –summary of the EDMAR programme*. Marine Environmental Research Volume 54, Issues 3-5, Pag. 645-649

Mills, L. J., Gutjahr-Gobell, R. E., Horowitz, D. B., Denslow, N. D., Chow, M. C., and Zarogian, G. E. (2003). *Relationship between reproductive success and male plasma vitellogenin concentrations in the Cunner, Tautoglabrus adspereus*. Environ. Health Perspect. 111, 93–99.

McCurley A. y Callard V.G. (2008). *Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment*. BMC Molecular Biology, 9:102

Muncke J. y Eggen R.I.L. (2006). *Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarker for endocrine disruption in developing zebrafish (Danio rerio)*. Environmental Toxicology and Chemistry. 25 (10), 2734-2741.

Muncke J., Junghans M., Eggen R.I. (2007). *Testing estrogenicity of known and novel (xeno-) estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (Danio rerio)*. Environmental Toxicology 22:185-193.

Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R. Dobbie Z. (2002). *Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time RT-PCR*. BioTechniques Vol. 32. No. 6.

Nash J.P., Kime D.E., Van der Vem L.T.M., Wester P.W., Brion F., Maack G., Stahlschmidt-Allner P., Tyler C.R. (2004). *Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish*. Environmental Health Perspectives 112:1725-1733.

Parrott J., Blunt B. R. (2005). *Life-Cycle Exposure of Fathead Minnows (Pimephales promelas) to an Ethinylestradiol Concentration Below 1 ng/L Reduces Egg Fertilization Success and Demasculinizes Males*. Environ Toxicol 20: 131-14.

Poynton H. C. y Vulpe C. D. (2009). *Ecotoxicogenomics: Emerging Technologies for Emerging Contaminants*. Journal of the American Water Resources Association. 45:83-96.

Purdom, C. E.; Hardiman, P. A.; Bye, V. J.; Eno, N. C.; Tyler, C. R.; Sumpter, J. P. (1994). *Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works*. Chem. Ecol.8, 275-285.

Robinson CD, Brown E, Craft JA, Davies IM, Moffat CF, Pirie D, Robertson F, Stagg RM, Struthers S. (2003). *Effects of sewage effluent and ethinyl oestradiol upon molecular markers of oestrogenic exposure, maturation and reproductive success in the sand goby (Pomatoschistus minutus, Pallas)*. Aquat Toxicol 62:119-134.

Sandoval V. A. M., Cervantes D. F.R., Medrano B. G., Hernández R. J., y Ramírez S.N. (2012). *Aplicación de pruebas de PCR en tiempo real en cuerpos de agua que presentan alta contaminación (Río Lerma y Río Atoyac)*. Proyecto IMTA TC 1221.1

Sawle A. D., Wit E., Whale G. y Cossins, A. R. (2010). *An information-rich, alternative, chemicals testing strategy using a high definition toxicogenomics and zebrafish (Danio rerio) embryos*. Toxicological Sciences. 118:128-139.

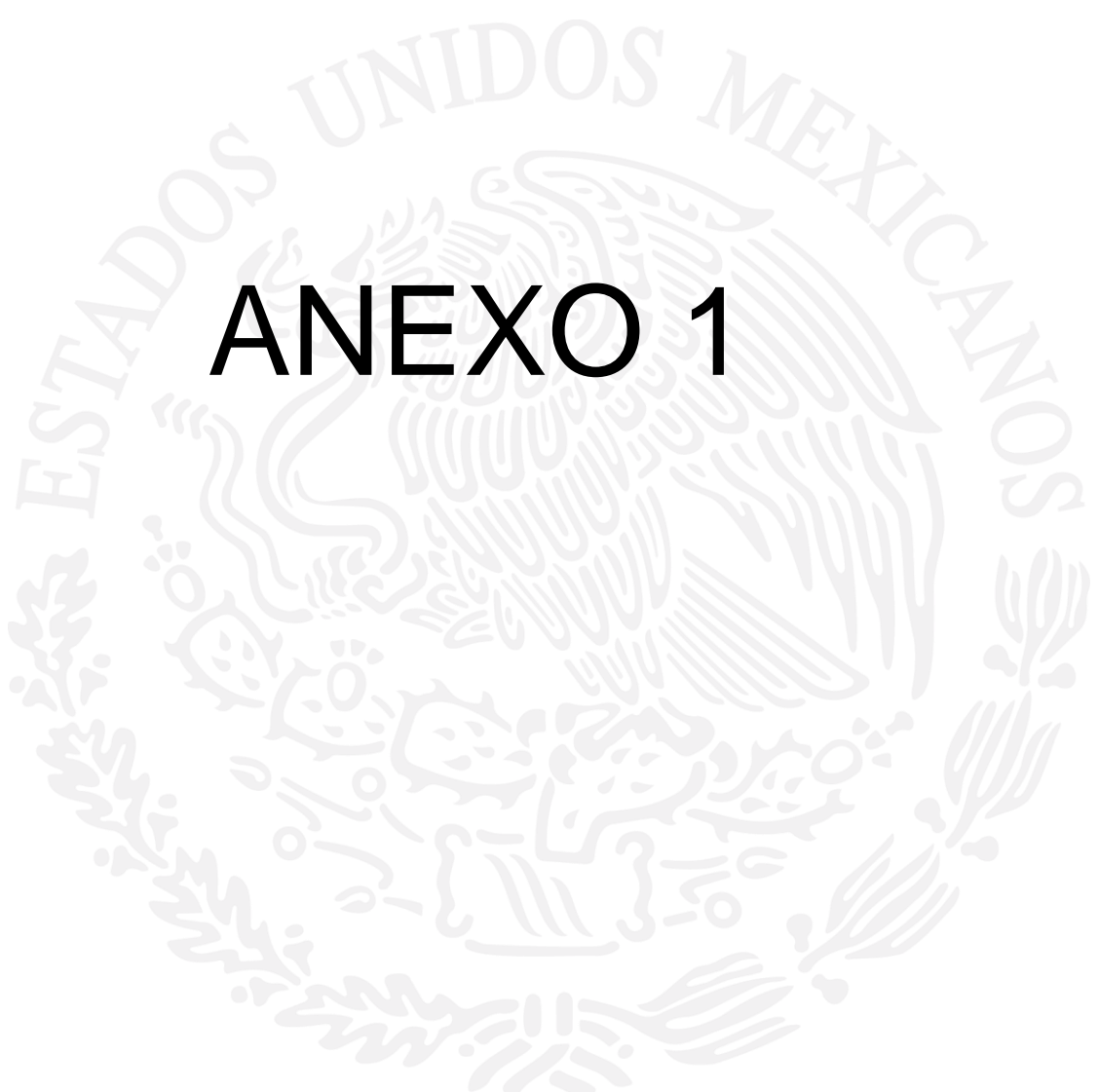
Sumpter J.P. y Jobling S. (1995). *Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment*. Environmental Health Perspectives 7:173-178.

Wang H., Tan T.T. J., Emelyanov A, Korzh V., Gong Z. (2005). *Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, Danio rerio*. Gene 356:91 – 100

Weil M., Scholz S., Zimmer M., Sacher F. y Duis K. (2009). *Gene expression analysis in zebrafish embryos: A potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test*. Environmental Toxicology and Chemistry. 28: 1970–1978.

World Health Organization (WHO), (2002). *IPCS Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*. International Programme on Chemical Safety, WHO/PCS/EDC/02.2.

ANEXO 1



MONITOREO DE EXPOSICIÓN DE PECES A 17 β -ESTRADIOL (1er. EXPERIMENTO)

Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
15/10/2013	0	0	0	0	0
16/10/2013	0	0	0	0	0
17/10/2013	0	0	0	0	0
18/10/2013	0	0	0	0	0
19/10/2013	0	0	0	0	0
20/10/2013	1	0	0	0	0
21/10/2013	0	0	0	0	0
22/10/2013	0	0	0	0	0
23/10/2013	0	0	0	0	0
24/10/2013	0	0	0	0	0
25/10/2013	0	0	0	0	0
26/10/2013	0	0	0	0	0
27/10/2013	0	0	0	0	0
28/10/2013	1	0	0	0	0
29/10/2013	0	0	0	0	0
30/10/2013	0	0	0	0	0
31/10/2013	0	0	0	0	0
01/11/2013	0	0	0	0	0
02/11/2013	0	0	0	0	0
03/11/2013	0	0	0	0	0
04/11/2013	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	2	0	0	0	0
% de mortalidad	10	0	0	0	0

PECES SACRIFICADOS DESPUÉS DE EXPOSICIÓN A 17β-ESTRADIOL					
1er. EXPERIMENTO			Fecha: 05/11/2013		
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
Número final de peces	8	7	6	7	4

NÚMERO DE HUEVECILLOS VIABLES OBTENIDOS A PARTIR DE PECES					
EXPUESTOS A 17β-ESTRADIOL			Fecha: 07/11/2013		
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
Número de peces	0	0	212	220	221
%	0	0	96	100	100

MONITOREO DE DETOXIFICACIÓN DE PECES EXPUESTOS A 17β-ESTRADIOL (2do. EXPERIMENTO)					
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
07/11/2013	0	0	0	0	0
08/11/2013	0	0	0	0	0
09/11/2013	0	0	0	0	0
10/11/2013	0	0	0	0	0
11/11/2013	0	0	0	0	0
12/11/2013	0	0	0	0	0
13/11/2013	1	0	0	0	0
14/11/2013	0	0	0	0	0
15/11/2013	0	0	0	0	0
16/11/2013	0	0	0	0	0
17/11/2013	0	0	0	0	0
18/11/2013	0	0	0	0	0
19/11/2013	0	0	0	0	0
20/11/2013	0	0	0	0	0
21/11/2013	0	0	0	0	0
22/11/2013	0	0	0	0	0
23/11/2013	0	0	0	0	0
24/11/2013	0	0	0	0	0
25/11/2013	0	0	0	0	0
26/11/2013	0	0	0	0	0
27/11/2013	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	1	0	0	0	0
% de mortalidad	10	0	0	0	0

MONITOREO DE EXPOSICIÓN DE PECES A 17β-ESTRADIOL (2do. EXPERIMENTO)					
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
15/10/2013	0	0	0	0	0
16/10/2013	0	0	0	0	0
17/10/2013	0	0	0	0	0
18/10/2013	0	0	0	0	0
19/10/2013	0	0	0	0	0
20/10/2013	1	0	0	0	0
21/10/2013	0	0	0	0	0
22/10/2013	0	0	0	0	0
23/10/2013	0	0	0	0	0
24/10/2013	0	0	0	0	0
25/10/2013	0	0	0	0	0
26/10/2013	0	0	0	0	0
27/10/2013	0	0	0	0	0
28/10/2013	1	0	0	0	0
29/10/2013	0	0	0	0	0
30/10/2013	0	0	0	0	0
31/10/2013	0	0	0	0	0
01/11/2013	0	0	0	0	0
02/11/2013	0	0	0	0	0
03/11/2013	0	0	0	0	0
04/11/2013	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	2	0	0	0	0
% de mortalidad	10	0	0	0	0

PECES SACRIFICADOS DESPUÉS DE EXPOSICIÓN A 17β-ESTRADIOL					
2do. EXPERIMENTO			Fecha: 05/11/2013		
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
Número final de peces	8	7	6	7	4

NÚMERO DE HUEVECILLOS VIABLES OBTENIDOS A PARTIR DE PECES					
EXPUESTOS A 17β-ESTRADIOL			Fecha: 07/11/2013		
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
Número de peces	0	0	212	220	221
%	0	0	96	100	100

MONITOREO DE DETOXIFICACIÓN DE PECES EXPUESTOS A 17β-ESTRADIOL (2do. EXPERIMENTO)					
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
07/11/2013	0	0	0	0	0
08/11/2013	0	0	0	0	0
09/11/2013	0	0	0	0	0
10/11/2013	0	0	0	0	0
11/11/2013	0	0	0	0	0
12/11/2013	0	0	0	0	0
13/11/2013	1	0	0	0	0
14/11/2013	0	0	0	0	0
15/11/2013	0	0	0	0	0
16/11/2013	0	0	0	0	0
17/11/2013	0	0	0	0	0
18/11/2013	0	0	0	0	0
19/11/2013	0	0	0	0	0
20/11/2013	0	0	0	0	0
21/11/2013	0	0	0	0	0
22/11/2013	0	0	0	0	0
23/11/2013	0	0	0	0	0
24/11/2013	0	0	0	0	0
25/11/2013	0	0	0	0	0
26/11/2013	0	0	0	0	0
27/11/2013	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	1	0	0	0	0
% de mortalidad	10	0	0	0	0

MONITOREO DE EXPOSICIÓN DE PECES A 17 α -ETINILESTRADIOL (1er. EXPERIMENTO)

Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
15/10/2013	0	0	0	0	0
16/10/2013	0	0	0	0	0
17/10/2013	1	0	0	0	0
18/10/2013	0	0	0	0	0
19/10/2013	0	0	0	0	0
20/10/2013	0	0	0	0	0
21/10/2013	0	0	0	0	0
22/10/2013	0	0	0	0	0
23/10/2013	0	0	1	0	0
24/10/2013	0	0	0	0	0
25/10/2013	1	0	0	0	0
26/10/2013	0	0	0	1	0
27/10/2013	0	0	0	0	0
28/10/2013	0	1	0	0	0
29/10/2013	1	0	0	0	0
30/10/2013	0	0	0	0	0
31/10/2013	0	0	0	0	0
01/11/2013	0	0	0	0	1
02/11/2013	0	0	1	0	0
03/11/2013	1	0	0	0	0
04/11/2013	0	1	0	1	0
Núm. de peces muertos	4	2	2	2	0
% de mortalidad	20	10	10	10	0

PECES SACRIFICADOS DESPUÉS DE EXPOSICIÓN A 17α-ETINILESTRADIOL					
1er. EXPERIMENTO			Fecha: 05/11/2013		
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
Número final de peces	8	9	9	9	9

NÚMERO DE HUEVECILLOS VIABLES OBTENIDOS A PARTIR DE PECES EXPUESTOS					
A 17α-ETINILESTRADIOL			Fecha: 07/11/2013		
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
Número de embriones	37	142	239	280	313
%	12	45	76	89	100

MONITOREO DE DETOXIFICACIÓN DE PECES EXPUESTOS A 17α-ETINILESTRADIOL (1er. EXPERIMENTO)					
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
07/11/2013	0	0	0	0	0
08/11/2013	0	0	0	0	0
09/11/2013	1	0	0	0	0
10/11/2013	0	0	0	0	0
11/11/2013	0	0	0	0	0
12/11/2013	0	0	0	0	0
13/11/2013	0	0	0	0	0
14/11/2013	0	0	0	0	0
15/11/2013	0	0	0	0	0
16/11/2013	0	0	0	0	0
17/11/2013	0	0	0	0	0
18/11/2013	0	0	0	0	0
19/11/2013	0	0	0	0	0
20/11/2013	0	0	0	0	0
21/11/2013	0	0	0	0	0
22/11/2013	0	0	0	0	0
23/11/2013	0	0	0	0	0
24/11/2013	0	0	0	0	0
25/11/2013	0	0	0	0	0
26/11/2013	0	0	0	0	0
27/11/2013	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	1	0	0	0	0
% de mortalidad	10	0	0	0	0

MONITOREO DE EXPOSICIÓN DE PECES A 17α-ETINILESTRADIOL (2do. EXPERIMENTO)					
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
15/10/2013	0	0	0	0	0
16/10/2013	1	0	0	0	0
17/10/2013	0	0	0	0	0
18/10/2013	0	0	0	0	0
19/10/2013	0	0	0	0	0
20/10/2013	0	0	0	0	0
21/10/2013	0	0	0	0	0
22/10/2013	0	0	0	0	0
23/10/2013	0	0	0	0	0
24/10/2013	0	0	0	0	0
25/10/2013	1	0	0	0	0
26/10/2013	0	0	0	0	0
27/10/2013	0	0	0	0	0
28/10/2013	0	0	0	0	0
29/10/2013	0	0	0	0	0
30/10/2013	0	0	0	0	0
31/10/2013	0	0	0	0	0
01/11/2013	0	0	0	0	0
02/11/2013	0	0	0	0	0
03/11/2013	0	0	0	0	0
04/11/2013	0	0	0	0	0
05/11/2013	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	2	0	0	0	0
% de mortalidad	10	0	0	0	0

PECES SACRIFICADOS DESPUÉS DE EXPOSICIÓN A 17α-ETINILESTRADIOL					
2do. EXPERIMENTO			Fecha: 08/11/2013		
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
Número final de peces	8	7	6	7	4

NÚMERO DE HUEVECILLOS VIABLES OBTENIDOS A PARTIR DE PECES EXPUESTOS					
A 17α-ETINILESTRADIOL			Fecha: 08/11/2013		
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
Número de peces	0	0	473	326	350
%	0	0	135	93	100

MONITOREO DE DETOXIFICACIÓN DE PECES EXPUESTOS A 17α-ETINILESTRADIOL (2do. EXPERIMENTO)					
Concentraciones ng/L	80	8	1.6	0.32	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A
07/11/2013	0	0	0	0	0
08/11/2013	0	0	0	0	0
09/11/2013	1	0	0	0	0
10/11/2013	0	0	0	0	0
11/11/2013	0	0	0	0	0
12/11/2013	0	0	0	0	0
13/11/2013	0	0	0	0	0
14/11/2013	0	0	0	0	0
15/11/2013	0	0	0	0	0
16/11/2013	0	0	0	0	0
17/11/2013	0	0	0	0	0
18/11/2013	0	0	0	0	0
19/11/2013	0	0	0	0	0
20/11/2013	0	0	0	0	0
21/11/2013	0	0	0	0	0
22/11/2013	0	0	0	0	0
23/11/2013	0	0	0	0	0
24/11/2013	0	0	0	0	0
25/11/2013	0	0	0	0	0
26/11/2013	0	0	0	0	0
27/11/2013	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	1	0	0	0	0
% de mortalidad	10	0	0	0	0

MONITOREO DE EXPOSICIÓN DE PECES A ATRAZINA (1er. EXPERIMENTO)

Concentraciones	10 mg L ⁻¹ Atr	2 mg L ⁻¹ Atr	0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTE DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
05/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
06/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
07/11/2013	1	0	0	1	0	0	0	0	0
08/11/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
09/11/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
10/11/2013	1	0	2	0	0	0	1	0	0
11/11/2013	0	0	0	0	1	1	0	0	0
12/11/2013	0	1	1	0	0	0	0	0	0
13/11/2013	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15/11/2013	4	0	0	1	0	0	0	0	0
16/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17/11/2013	0	2	1	0	0	0	0	0	0
18/11/2013	0	0	0	0	1	0	0	0	0
19/11/2013	2	0	0	1	0	0	0	0	0
20/11/2013	0	1	1	0	0	1	1	0	0
21/11/2013	0	0	0	0	0	1	0	1	0
22/11/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
23/11/2013	1	0	1	0	0	0	0	1	0
24/11/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
25/11/2013	2	0	0	0	1	0	1	0	0
26/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	12	8	6	3	3	3	3	2	0
% de mortalidad	60	40	30	15	15	15	15	10	0

PECES SACRIFICADOS DESPUÉS DE EXPOSICIÓN A ATRAZINA									Fecha: 27/11/2013
1er. EXPERIMENTO									
Concentraciones	10 mg L⁻¹ Atr	2 mg L⁻¹ Atr	0.4 mg L⁻¹ Atr	0.08 mg L⁻¹ Atr	0.0016 mg L⁻¹ Atr	0.00032 mg L⁻¹ Atr	0.000064 mg L⁻¹ Atr	SOLVENTE DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
Número final de peces	5	4	6	3	3	3	1	8	0

NÚMERO DE HUEVECILLOS VIABLES OBTENIDOS A PARTIR DE PECES EXPUESTOS A ATRAZINA									
Fecha: 28/11/2013									
Concentraciones	10 mg L⁻¹ Atr	2 mg L⁻¹ Atr	0.4 mg L⁻¹ Atr	0.08 mg L⁻¹ Atr	0.0016 mg L⁻¹ Atr	0.00032 mg L⁻¹ Atr	0.000064 mg L⁻¹ Atr	SOLVENTE DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
Número de embriones	66	74	83	91	197	201	304	69	330

MONITOREO DE DETOXIFICACIÓN DE PECES EXPUESTOS A ATRAZINA

(1er. EXPERIMENTO)

Concentraciones	10 mg L ⁻¹ Atr	2 mg L ⁻¹ Atr	0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTE DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
27/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30/11/2013	1	1	0	0	1	1	0	0	0
01/12/2013	0	0	1	0	0	0	0	0	0
02/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
03/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
04/12/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
05/12/2013	0	0	1	1	0	0	0	0	0
06/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
07/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
08/12/2013	1	1	0	0	1	0	0	0	0
09/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	1	0
11/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12/12/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
13/12/2013	2	0	1	0	0	0	0	0	0
14/12/2013	0	0	0	0	2	0	0	0	0
15/12/2013	0	0	0	1	0	0	0	0	1
16/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17/12/2013	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	5	4	4	2	0	1	0	1	1
% de mortalidad	50	20	20	10	0	5	0	5	5

MONITOREO DE EXPOSICIÓN DE PECES A ATRAZINA									Fecha: 27/11/2013
(2do. EXPERIMENTO)									
Concentraciones	10 mg L ⁻¹ Atr	2 mg L ⁻¹ Atr	0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTE DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
05/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
06/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
07/11/2013	1	0	0	1	0	0	0	0	0
08/11/2013	0	1	0	0	1	0	0	0	0
09/11/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
10/11/2013	1	0	1	0	0	0	0	0	0
11/11/2013	0	0	0	1	0	1	0	0	0
12/11/2013	1	1	1	0	0	0	0	0	0
13/11/2013	0	0	0	0	0	0	1	0	0
14/11/2013	0	0	1	0	0	1	0	1	0
15/11/2013	2	0	0	0	1	0	0	0	0
16/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17/11/2013	1	0	1	0	0	1	0	0	0
18/11/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
19/11/2013	1	0	0	0	0	0	0	0	0
20/11/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
21/11/2013	0	0	0	1	0	0	0	0	0
22/11/2013	0	1	0	0	0	0	1	0	0
23/11/2013	1	1	0	0	0	0	0	1	0
24/11/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
25/11/2013	1	0	0	0	1	0	1	0	0
26/11/2013	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	9	8	5	3	3	3	3	2	0
% de mortalidad	45	40	25	15	15	15	15	10	0

PECES SACRIFICADOS DESPUÉS DE EXPOSICIÓN A ATRAZINA									Fecha: 27/11/2013
2do. EXPERIMENTO									
Concentraciones	10 mg L ⁻¹ Atr	2 mg L ⁻¹ Atr	0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTE DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
Número final de peces	5	4	6	3	3	3	1	8	0

NÚMERO DE HUEVECILLOS VIABLES OBTENIDOS A PARTIR DE PECES EXPUESTOS A ATRAZINA									
Fecha: 28/11/2013									
Concentraciones	10 mg L ⁻¹ Atr	2 mg L ⁻¹ Atr	0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTE DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
Número de embriones	78	87	93	137	197	223	332	356	470

MONITOREO DE DETOXIFICACIÓN DE PECES EXPUESTOS A ATRAZINA

(2do. EXPERIMENTO)

Concentraciones	10 mg L ⁻¹ Atr	2 mg L ⁻¹ Atr	0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTE DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
27/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30/11/2013	1	1	0	0	0	1	0	0	0
01/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
02/12/2013	0	0	1	0	0	0	0	0	0
03/12/2013	1	0	0	0	0	0	0	0	0
04/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
05/12/2013	1	0	0	0	0	0	0	0	0
06/12/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
07/12/2013	0	0	1	0	0	0	0	0	0
08/12/2013	1	0	0	1	1	0	0	0	0
09/12/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
10/12/2013	0	0	1	0	0	0	0	1	0
11/12/2013	0	0	0	0	0	1	0	0	0
12/12/2013	0	0	0	1	0	0	0	0	0
13/12/2013	1	1	1	0	0	0	0	0	0
14/12/2013	0	0	0	0	1	0	0	0	0
15/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	1
16/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17/12/2013	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	6	4	5	2	2	2	0	1	1
% de mortalidad	60	20	25	10	10	10	0	5	5

**MONITOREO DE EXPOSICIÓN DE PECES A LA MEZCLA DE 17 α -ETINILESTRADIOL / ATRAZINA
(1er. EXPERIMENTO)**

Concentraciones	80 ng L ⁻¹ 17 α 10 mg L ⁻¹ Atr	8 ng L ⁻¹ 17 α 2 mg L ⁻¹ Atr	1.6 ng L ⁻¹ 17 α 0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.32 ng L ⁻¹ 0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.64 ng L ⁻¹ 17 α 0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.0128 ng L ⁻¹ 17 α 0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.00256 ng L ⁻¹ 17 α 0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTES METOH / DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
05/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
06/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
07/11/2013	0	0	0	1	0	0	0	0	0
08/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
09/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10/11/2013	0	0	2	0	0	0	0	0	0
11/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15/11/2013	5	0	0	1	0	0	0	0	0
16/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17/11/2013	0	4	0	0	0	0	0	0	0
18/11/2013	0	0	0	0	1	0	0	0	0
19/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20/11/2013	0	0	0	0	0	1	0	0	0
21/11/2013	0	0	0	0	0	1	0	2	0
22/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23/11/2013	0	0	1	0	0	0	0	2	0
24/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25/11/2013	0	0	0	0	1	0	0	0	0
26/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	5	4	3	2	2	2	0	4	0
% de mortalidad	25	20	15	10	10	10	0	20	0

PECES SACRIFICADOS DESPUÉS DE EXPOSICIÓN A LA MEZCLA DE 17 α -ETINILESTRADIOL/ATRAZINA
1er. EXPERIMENTO
Fecha: 27/11/2013

Concentraciones	80 ng L ⁻¹ 17 α 10 mg L ⁻¹ Atr	8 ng L ⁻¹ 17 α 2 mg L ⁻¹ Atr	1.6 ng L ⁻¹ 17 α 0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.32 ng L ⁻¹ 0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.64 ng L ⁻¹ 17 α 0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.0128 ng L ⁻¹ 17 α 0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.00256 ng L ⁻¹ 17 α 0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTES METOH / DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
Número final de peces	8	8	9	9	9	9	10	8	0

NÚMERO DE HUEVECILLOS VIABLES OBTENIDOS A PARTIR DE PECES EXPUESTOS A 17 α -ETINILESTRADIOL
Fecha: 28/11/2013

Concentraciones	80 ng L ⁻¹ 17 α 10 mg L ⁻¹ Atr	8 ng L ⁻¹ 17 α 2 mg L ⁻¹ Atr	1.6 ng L ⁻¹ 17 α 0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.32 ng L ⁻¹ 0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.64 ng L ⁻¹ 17 α 0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.0128 ng L ⁻¹ 17 α 0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.00256 ng L ⁻¹ 17 α 0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTES METOH / DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
Número de embriones	110	310	230	42	0	38	60	0	0

MONITOREO DE DETOXIFICACIÓN DE PECES EXPUESTOS A LA MEZCLA DE 17 α -ETINILESTRADIOL / ATRAZINA (1er. EXPERIMENTO)

Concentraciones	80 ng L ⁻¹ 17 α 10 mg L ⁻¹ Atr	8 ng L ⁻¹ 17 α 2 mg L ⁻¹ Atr	1.6 ng L ⁻¹ 17 α 0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.32 ng L ⁻¹ 0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.64 ng L ⁻¹ 17 α 0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.0128 ng L ⁻¹ 17 α 0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.00256 ng L ⁻¹ 17 α 0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTES METOH / DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
27/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30/11/2013	2	1	0	0	1	1	0	0	0
01/12/2013	0	0	1	0	0	0	0	0	0
02/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
03/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
04/12/2013	0	2	0	0	1	0	0	0	0
05/12/2013	0	0	1	1	0	0	0	0	0
06/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
07/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
08/12/2013	0	2	0	0	0	0	0	0	0
09/12/2013	0	0	1	0	0	0	0	0	0
10/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	1	0
11/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12/12/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
13/12/2013	3	0	1	0	0	0	0	0	0
14/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15/12/2013	0	0	0	1	0	0	0	0	1
16/12/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17/12/2013	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	6	6	5	2	2	1	0	1	1
% de mortalidad	60	30	25	10	10	5	0	5	5

**MONITOREO DE EXPOSICIÓN DE PECES A LA MEZCLA DE 17 α -ETINILESTRADIOL / ATRAZINA
(2do. EXPERIMENTO)**

Concentraciones	80 ng L ⁻¹ 17 α 10 mg L ⁻¹ Atr	8 ng L ⁻¹ 17 α 2 mg L ⁻¹ Atr	1.6 ng L ⁻¹ 17 α 0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.32 ng L ⁻¹ 0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.64 ng L ⁻¹ 17 α 0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.0128 ng L ⁻¹ 17 α 0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.00256 ng L ⁻¹ 17 α 0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTES METOH / DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
05/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
06/11/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
07/11/2013	0	0	0	1	0	0	0	0	0
08/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
09/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10/11/2013	0	0	1	0	0	0	0	0	0
11/11/2013	2	0	0	0	0	0	0	0	0
12/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15/11/2013	1	0	0	1	0	0	0	0	0
16/11/2013	2	0	0	0	0	0	0	0	0
17/11/2013	0	1	0	0	0	0	0	0	0
18/11/2013	0	0	0	0	1	0	0	0	0
19/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21/11/2013	1	0	0	0	0	1	0	1	0
22/11/2013	0	2	0	0	0	0	0	0	0
23/11/2013	0	0	1	0	0	0	0	2	0
24/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25/11/2013	0	0	0	0	1	0	0	0	0
26/11/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Núm. de peces muertos	6	4	2	2	2	1	0	3	0
% de mortalidad	30	20	10	10	10	5	0	15	0

PECES SACRIFICADOS DESPUÉS DE EXPOSICIÓN A LA MEZCLA DE 17 α -ETINILESTRADIOL/ATRAZINA
2do. EXPERIMENTO
Fecha: 27/11/2013

Concentraciones	80 ng L ⁻¹ 17 α 10 mg L ⁻¹ Atr	8 ng L ⁻¹ 17 α 2 mg L ⁻¹ Atr	1.6 ng L ⁻¹ 17 α 0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.32 ng L ⁻¹ 0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.64 ng L ⁻¹ 17 α 0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.0128 ng L ⁻¹ 17 α 0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.00256 ng L ⁻¹ 17 α 0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTES METOH / DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
Número final de peces	7	8	8	9	9	9	10	8	0

NÚMERO DE HUEVECILLOS VIABLES OBTENIDOS A PARTIR DE PECES EXPUESTOS A 17 α -ETINILESTRADIOL
Fecha: 28/11/2013

Concentraciones	80 ng L ⁻¹ 17 α 10 mg L ⁻¹ Atr	8 ng L ⁻¹ 17 α 2 mg L ⁻¹ Atr	1.6 ng L ⁻¹ 17 α 0.4 mg L ⁻¹ Atr	0.32 ng L ⁻¹ 0.08 mg L ⁻¹ Atr	0.64 ng L ⁻¹ 17 α 0.0016 mg L ⁻¹ Atr	0.0128 ng L ⁻¹ 17 α 0.00032 mg L ⁻¹ Atr	0.00256 ng L ⁻¹ 17 α 0.000064 mg L ⁻¹ Atr	SOLVENTES METOH / DMSO	BLANCO
Número de acuario	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A
Número de embriones	110	310	230	42	0	38	60	0	0

SEMARNAT

SECRETARÍA DE
MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES



IMTA
INSTITUTO MEXICANO
DE TECNOLOGÍA
DEL AGUA

