

Ecotoxicología

Patricia Ramírez Romero

Guadalupe Barrera Escorcía

Xóchitl Gúzman García

Héctor Barrera Villa Zevallos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Dr. Eduardo Abel Peñalosa Castro
Rector General

Dr. José Antonio De Los Reyes Heredia
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. Rodrigo Díaz Cruz
Rector

M. en B. E. Arturo Leopoldo Preciado López
Secretario

Dra. Sara Lucía Camargo Ricalde
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Mtro. Federico Bañuelos Bárcenas
Coordinador de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Ecotoxicología
Primera edición 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Michoacán y La Purísima
Iztapalapa, 09340. México, D. F.

Impreso y hecho en México/Printed in Mexico

Índice

Prefacio	5
Introducción	7
Objetivo general	9
Consideraciones bioéticas	11
Prácticas	13
Limpieza de cristalería para su uso en bioensayos	15
Preparación de agua marina artificial y agua reconstituida	17
Fotosíntesis y lluvia ácida	19
Determinación de concentración letal media (CL50)	23
Análisis morfofisiológico de los órganos destino (blanco): branquia, tracto digestivo e hígado	27
Efecto sinérgico de la luz UV sobre la toxicidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	31
Anexo: eclosión de <i>Artemia</i> sp.	35
Efecto de los tóxicos en la respiración y la excreción nitrogenada	37
La histopatología como biomarcador de efecto de contaminantes	43
Caracterización de células sanguíneas de peces	49
Biomarcadores: estabilidad lisosomal	55
Análisis de los cambios tisulares por exposición a cadmio en moluscos bivalvos	59
Identificación de vegetales modificados por ingeniería genética	65
Ejercicios	69
La bioética en la ecotoxicología.....	71
Buenas prácticas de laboratorio	73
Determinación del estrés metabólico asociado a la exposición a tóxicos: la relación O:N	83
Evaluación de riesgo ecológico.....	87
Cuestionarios de videos y artículos	89

Carcinogénesis por consumo de OGM	91
Inmunotoxicidad en organismos acuáticos	93
Efectos neurotóxicos del mercurio	95
Excreción de contaminantes a través de la leche	97
Disrupcion endócrina	99
Efectos teratogénicos	101
El bebe intoxicado	103
Deshidratación e inclusión de la muestra	105
Análisis tisular de organismos acuáticos y experimentales	107
Agradecimientos	109

Prefacio

El presente material apoya la Unidad de Enseñanza Aprendizaje (UEA) Ecotoxicología, asignatura optativa de la Licenciatura en Hidrobiología, la cual se imparte en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM Iztapalapa, así como la UEA optativa Ecotoxicología I del Posgrado en Energía y Medio Ambiente.

Este documento integra instructivos para el desarrollo de prácticas de laboratorio así como ejercicios y cuestionarios relacionados con videos y artículos que abordan temas de Ecotoxicología. Las diferentes opciones que se presentan, pretenden que el profesor a cargo, pueda seleccionar a su criterio los materiales que le sirvan de mayor apoyo para el desarrollo de la UEA.

El contenido de esta obra está enfocado a que los estudiantes adquieran habilidades en el manejo de material de laboratorio, se familiaricen con algunas técnicas utilizadas para evaluar los efectos de tóxicos en los organismos acuáticos, así como para determinar los riesgos asociados a la presencia de éstos en el ambiente. Asimismo, orienta a los alumnos para que lleven a cabo un control adecuado de los datos generados en las prácticas, y para que realicen un manejo correcto de la información en el análisis de sus resultados y su interpretación, de manera que esto les permita generar el reporte adecuado.

Adicionalmente, se presentan dos secciones de actividades consistentes en ejercicios y cuestionarios, los cuales tienen la intención de que el estudiante se apropie del conocimiento y realice así un aprendizaje significativo, incluso fuera de las instalaciones de la universidad, para que redondee sus conocimientos y pueda llevar a cabo la interpretación de datos que, debido a lo caído del tiempo, no es posible obtener durante el curso. Del mismo modo los alumnos pueden aprovechar el material disponible en diferentes fuentes de información como el internet e interpretarla con fines didácticos. El análisis de este tipo de información permitirá que los estudiantes desarrollen un criterio para emitir una opinión informada acerca de los diferentes problemas derivados de la presencia de tóxicos en el ambiente.

Los autores

Introducción

La ecotoxicología es una ciencia relativamente nueva. El término fue acuñado por Rene Truhaut para tratar de reconocer el destino y los efectos de los químicos en los ecosistemas. En cierto momento fue reconocida como una subdisciplina de la toxicología médica, hasta que llegó un momento en que tuvo que reconocerse que los efectos de los químicos o la radiación afectan a todos los componentes de los ecosistemas. Esta ciencia ha tenido una evolución que parte de estudios de tipo ambientalista en la década de los sesenta, seguidos de un incremento extraordinario en la generación de legislación dirigida a proteger el ambiente. De hecho, se han reestructurado políticas ambientales en países desarrollados (Europa y Norteamérica) apoyados en este tipo de información científica. El esfuerzo aplicado en este tipo de países ha avanzado de manera significativa la investigación ecotoxicológica, si bien aún se tienen retos muy importantes (Baird *et al.*, 1996).

La experiencia en México en este campo ha sido menor. Se ha desarrollado a partir de la década de los ochenta, cuando se reconoció la necesidad de conocer los efectos de la contaminación en los ecosistemas. Estos intentos inicialmente fueron aislados, pero paulatinamente algunas iniciativas derivaron en el desarrollo de técnicas estandarizadas que pretenden unificar la evaluación sustentada en una base legal (Ramírez y Mendoza, 2008). El acercamiento ecotoxicológico por tanto ha sido paulatino, pero es imprescindible debido a que la investigación sobre la contaminación en México se ha enfocado casi exclusivamente a la determinación de las concentraciones de los tóxicos en el agua, el sedimento y los organismos. Algunos autores plantean que la capacidad para resolver los problemas de contaminación está limitada por la escasez en el conocimiento de las propiedades básicas, la estructura y la función de los ecosistemas, así como de los efectos de los contaminantes (Servos, 2000).

Lo anterior hace evidente la necesidad de que los estudiantes de Hidrobiología conozcan las bases de la ecotoxicología, de manera que se formen como profesionales que más adelante sean capaces de plantear soluciones a los problemas generados por los contaminantes en el ambiente, a través de un análisis integral que involucre la evaluación de sus efectos y sus repercusiones en el ecosistema.

Objetivo general

Que el estudiante adquiera habilidades específicas en el manejo de técnicas de análisis relacionados con la evaluación de efectos derivados de la exposición a tóxicos que pueden estar presentes en ambientes acuáticos; habilidades asociadas a la generación de datos, registro y análisis correcto de la información derivada de las prácticas, elaboración de reportes concluyentes y desarrollo de su capacidad analítica en la interpretación de información proveniente de fuentes electrónicas y medios masivos de comunicación.

Evaluación de las actividades

Será indispensable la asistencia puntual del estudiante por lo menos al 80% de las sesiones. Deberá participar activamente en las mismas, elaborar los reportes de las prácticas de laboratorio, así como de los ejercicios, actividades y cuestionarios que el profesor indique. Los reportes deberán ser entregados una semana después de concluida la actividad correspondiente.

Los reportes de prácticas deberán incluir las siguientes partes:

Carátula con título y autores

Introducción y Objetivo

Material y Método

Resultados

Discusión y conclusiones

Cuestionario

Bibliografía (Esta deberá estar ligada al texto y citada correctamente)

Copia de las bitácoras de cada uno de los miembros del equipo

La calidad de la presentación se tomará en cuenta

Cada estudiante llevará una bitácora para el registro de sus actividades a lo largo del curso. Esta consistirá en una libreta de preferencia que no sea de argollas, con las hojas numeradas. En ella se registrarán con pluma, las actividades, los resultados y cualquier eventualidad surgida durante el desarrollo de las prácticas. Una copia de las bitácoras de cada uno de los miembros del equipo deberá ser anexada al reporte de cada práctica.




Algunos aspectos de seguridad e higiene a seguir en el laboratorio

Este manual se ajusta al Instructivo del Funcionamiento Interno y Operativo para Regular el Uso de los Servicios e Instalaciones de los Laboratorios de Docencia aprobado por el Consejo Académico en la Sesión número 314 del 9 de noviembre de 2009.

Será por lo tanto obligatorio el uso de bata en el laboratorio. No podrán introducirse, ni podrán consumirse alimentos o bebidas en el laboratorio. No se deberá pipetear oralmente ningún tipo de reactivo o solución; para ello se utilizarán propipetas. Con el fin de evitar accidentes, los estudiantes deberán estar familiarizados con la ubicación de extintores, botiquín y salidas de emergencia.

Previo a la elaboración de cada práctica y al terminar la misma, se lavará el material con Extran (detergente libre de fosfatos), se enjuagará con abundante agua de la llave para terminar con un enjuague con agua destilada. Al concluir cada práctica, los materiales de desecho deberán colocarse en los recipientes adecuados para ello. Los equipos utilizados en las prácticas deberán ser entregados perfectamente limpios. Cualquier irregularidad deberá ser reportada al profesor.

Bibliografía

-  Baird, D.J., Maltby, L. Greig-Smith, P.W. & P.E.T. Douben. 1996. *Ecotoxicology: Ecological Dimensions*. SETAC, Chapman & Hall, London.
-  Ramírez, R.P. & C.A. Mendoza. 2008. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo*. La experiencia en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología, México.
-  Servos, M. 2000. Deadman Dance. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19: 2621-2622.

Consideraciones bioéticas

Debido a que el trabajo de investigación en Ecotoxicología requiere el uso de animales vivos, las prácticas propuestas en este manual consideran los principios de la bioética y se ajustan a los Lineamientos para la Conducción Ética de la Investigación, Docencia Y Difusión en la División de Ciencias Biológicas y de La Salud 2010 de la UAMI, los cuales pueden ser consultados en la siguiente liga:

http://148.206.32.94/informacion/consejo_divisional/lineamientos/LINEAMIENTOSDEETICA2012.pdf

Prácticas

Limpieza de cristalería para su uso en bioensayos

Introducción

El trabajo con organismos vivos y con contaminantes requiere que todo aquel material que tenga contacto con los mismos esté en condiciones de limpieza óptimas; es decir, que garanticen que no existirán residuos de otros materiales, grasas y a veces hasta microorganismos, que puedan alterar los resultados de las mediciones y pruebas que se piensan llevar a cabo.

En la limpieza de la cristalería son importantes: la selección del detergente, la temperatura del agua, la agitación o cepillado, el tiempo de lavado, el proceso de enjuague y el de secado.

Un buen protocolo de limpieza deberá incluir también una inspección de la cristalería para verificar si existen grietas o desportilladuras que puedan causar falla mecánica en medio del trabajo.

Objetivo

Que el alumno aprenda la manera correcta de limpiar la cristalería y otros materiales necesarios para los ensayos biológicos.

Material

20 vasos de precipitados de 100 ml

1 matraz aforado de 50 ml

2 vasos de precipitados de 500 ml

2 probetas de 100 ml

2 agitadores de cristal

2 pizetas con agua destilada

2 espátulas pequeñas

1 rollo de papel aluminio

2 palanganas

5 pipetas de 5 mL

2 pipetas de 1 ml

1 pipeta de 10 ml

Parafilm

Horno de secado

Reactivos

HNO₃

Extran

Acetona

NaOH

Agua destilada

Agua deionizada



Método

1. Revisión física de la cristalería: Una vez recibida la cristalería proceda a examinar cada pieza en busca de rayones, manchas, grietas, desportilladuras. Si es posible cambie los materiales que se encuentran en mal estado.
2. Prepare en una palangana una solución de detergente de laboratorio (Alcanox y otra marca) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y sumerja toda su cristalería por media hora (lo ideal serían 24 hrs).
3. Lave con cepillo cada pieza y enjuague 6 veces con agua de llave abundante.
4. Prepare en otra palangana una solución de NaOH 0.25N (orgánicos) o de HNO_3 (metales) y remoje la cristalería por media hora (lo ideal son 24 hrs).
5. Enjuague la cristalería 6 veces con agua deionizada.
6. Enjuague la cristalería 3 veces con Acetona.
7. Meta la cristalería a un horno a secar por media hora
8. Tape la boca de la cristalería con papel aluminio (orgánicos) o con parafilm (metales) y guarde en un lugar libre de polvo.

Cuestionario

1. ¿Cómo debe lavarse la cristalería nueva?
2. ¿Qué tipo de cepillos deben usarse para el lavado de la cristalería?
3. ¿Por qué no es conveniente remojar la cristalería por periodos largos en soluciones alcalinas fuertes?
4. ¿Cuántos tipos de Alcanox existen y para qué son usados cada uno?
5. ¿Cuándo es adecuado remojar la cristalería en solución crómica?
6. ¿Cuál es la mejor manera de quitar grasa de la cristalería?

Bibliografía

-  American Public Health Association. 2013. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22 ed. APHA, E.U.
-  Rogers, W. 2007. Suggestions for cleaning laboratory glassware. Ace Glass Incorporated. Ref 8386-IPSF-3037. http://www.aceglass.com/dpro/kb_article.php?ref=8386-IPSF-3037 Consultado el 27 de marzo de 2017.

Preparación de agua marina artificial y agua reconstituida

Introducción

El cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba requiere de que estos se encuentren en condiciones óptimas, para ello una agua de buena calidad es indispensable. Si el laboratorio cuenta con una fuente de agua de buena calidad, esta se puede utilizar después de pasarla por un filtro que permita quitarle las partículas y microorganismos que pudiera contener. Si no se cuenta con una fuente de agua apropiada, se recomienda preparar agua dulce o marina artificial, que también servirá para la preparación de las diferentes diluciones del compuesto o muestra a probar.

Un agua de dilución estándar sea agua dulce o marina asegura que los organismos se encuentren en una agua libre de contaminantes y por lo tanto no afecta su sobrevivencia, crecimiento o reproducción y también asegura la aceptabilidad de las respuestas de los organismos.

Material

Garrafón de 20 litros de agua destilada o desionizada

2 espátulas

1 vaso de precipitados de 1L

1 matraz Erlenmeyer de 1L

1 bomba de aire

1 agitador mecánico

Balanza

Reactivos

Agua dulce reconstituida

Sales de grado químico:

Sulfato de magnesio (MgSO_4)

Carbonato de calcio (NaHCO_3)

Cloruro de potasio (KCl)

Sulfato de calcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Agua marina artificial

Sal marina comercial de acuario (libre de fluor y yodo) para la preparación de agua marina (cualquier marca)

Método

Agua dulce reconstituida

Se emplea un garrafón con 19 L de agua destilada o desionizada. En un litro de agua destilada o desionizada se disuelven 2.4 g de sulfato de calcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). La dilución de esta sal toma mucho tiempo por lo que es necesario ponerla a disolver antes que las otras sales. En los 19 L de agua se agregan 2.4 g de sulfato de magnesio (MgSO_4), 3.84 g de carbonato de calcio (NaHCO_3) y 0.16 g de cloruro de potasio (KCl). Se agitan todas las sales hasta que se disuelvan. Posteriormente se incorpora al garrafón el litro de agua previamente preparado con $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ya disuelto, así se obtienen 20 litros de agua reconstituida.

Si se desea preparar agua con diferentes niveles de dureza, se deben seguir las indicaciones de la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de sales para la preparación de agua dulce reconstituida.

Tipo de agua	Sales requeridas (mg)				Calidad del agua		
	NaHCO_3	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	MgSO_4	KCl	pH	Dureza mg CaCO_3/L	Alcalinidad mg CaCO_3/L
Agua suave	12	7.5	7.5	0.5	6.4-6.8	10-13	10-13
Suave	48	30	30	2.0	7.2-7.6	40-48	30-35
Moderadamente dura	96	60	60	4.0	7.4-7.8	80-100	60-70
Dura	192	120	120	8.0	7.6-8.0	160-180	110-120
Muy dura	384	240	240	16.0	8.0-8.4	280-320	225-245



Preparación de agua marina artificial

Para preparar agua marina artificial con una salinidad de 32 ups disolver media taza de sal comercial (Kent Marine) en 3.8 L. Airear por 24 horas para asegurar que toda la sal ha quedado disuelta y checar con un refractómetro la salinidad final.

Cuestionario

1. ¿Cuándo es necesario preparar agua dulce reconstituida o agua marina artificial?
2. ¿Cuál es la dureza del agua dulce recomendada para bioensayos por las Normas Mexicanas?
3. ¿Qué marcas comerciales de sales existen para preparar agua marina?
4. Si no se contara con sales comerciales para preparar agua marina artificial, indique cual sería la fórmula (sales y sus cantidades por litro) para prepararla.
5. ¿Qué constituyentes de las sales comerciales pueden suponer una interferencia en los bioensayos y por qué?

Bibliografía

-  American Public Health Association. 2013. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22 ed. APHA, E.U.
-  Environmental Protection Agency. 2002. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. 5ª ed. EPA-821-R-02-012. Washington, D.C.

Fotosíntesis y lluvia ácida

Introducción

La productividad primaria de ambientes terrestres y acuáticos se apoya principalmente en la fotosíntesis, cuya reacción general es la siguiente:



Para que esta función se realice se requiere CO_2 , el cual está disponible en forma gaseosa en la atmósfera. Sin embargo, su solubilidad en agua es relativamente baja y la forma química en que se encuentra depende de factores diversos, como el pH o la presencia de carbonatos. En el agua el HCO_3^- es la fuente de CO_2 , pero la forma química cambia cuando el pH se modifica (Fig. 1). Esto puede tener repercusiones en la actividad fotosintética.

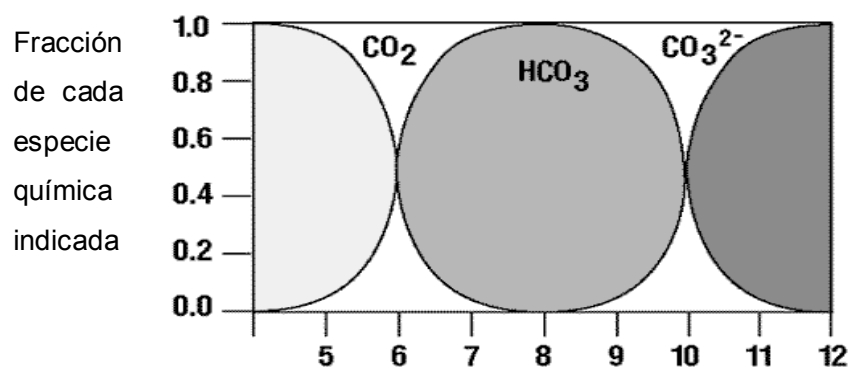


Fig. 1. Modificaciones del CO_2 en el agua dependientes del pH.

Cuando existen condiciones que favorecen la fotosíntesis, se produce oxígeno gaseoso, el cual se disuelve en el agua antes de alcanzar su nivel de saturación, por lo que su formación resultará en un aumento del volumen de la solución. Observando el cambio en el volumen de la solución, podremos medir la cantidad de O_2 producido durante el proceso de fotosíntesis en plantas acuáticas. La velocidad de la fotosíntesis puede medirse calculando la velocidad de producción de oxígeno.

La fotosíntesis es una función que puede verse afectada por algunos tóxicos capaces de detenerla o disminuirla. Asimismo existen condiciones ambientales que pueden afectarla, como la acidez o alcalinidad del agua. La excesiva producción de compuestos oxidados, que se forman durante la quema de combustibles fósiles, producen compuestos ácidos, que son luego arrastrados por la lluvia a cuerpos acuáticos. Este fenómeno es conocido como lluvia ácida y modifica el pH de la atmósfera, del suelo y del agua. La fotosíntesis requiere determinado pH para realizarse adecuadamente.

Objetivo

Determinar el efecto de la lluvia ácida sobre la fotosíntesis en plantas acuáticas.

Reactivos

H_2SO_4 1N

Material

3 vasos de precipitado de 500 mL de capacidad

12 jeringas de plástico de 20 mL

12 pipetas graduadas de 1 mL

8 cajas Petri de 10 cm de diámetro

2 probetas de 100 mL

1 agitador de vidrio

1 charola

Manguera de latex

Tijeras

Masking tape

Papel aluminio

Potenciómetro

Balanza de plato

Hojas de Elodea

Método

Separar 200 mL de agua de la llave en un vaso de precipitado y medir el pH.

Preparar 100 mL de solución con pH 6 utilizando el ácido y un potenciómetro.

Preparar 100 mL de solución con pH 4 utilizando el ácido y un potenciómetro.

Etiquetar y tapar.

Numerar las jeringas del 1 al 12. Llenar cada jeringa con las soluciones indicadas a continuación hasta los 20 mL: jeringas 1 a 6 con agua, jeringas 7 a 9 con solución pH 6, y jeringas 10 a 12 con solución pH 4. Registrar los pesos. Regresar el agua al vaso correspondiente.

Colocar una sección de Elodea de aproximadamente un gramo en una caja de Petri y registrar el peso. Quitar el émbolo de cada jeringa, introducir la sección a la jeringa, empujar cuidadosamente el émbolo, llenar con la solución correspondiente hasta los 20 mL cuidando de que no queden burbujas y pesar nuevamente. Obtener el peso del tejido por la diferencia con el peso inicial.

Colocar un trozo de manguera de latex de 6 cm de largo en la punta de cada jeringa y conectar a la punta de una pipeta de 1 mL. Empujar el líquido hasta la medida 0.7 mL (Fig. 2), esperar 5 minutos.

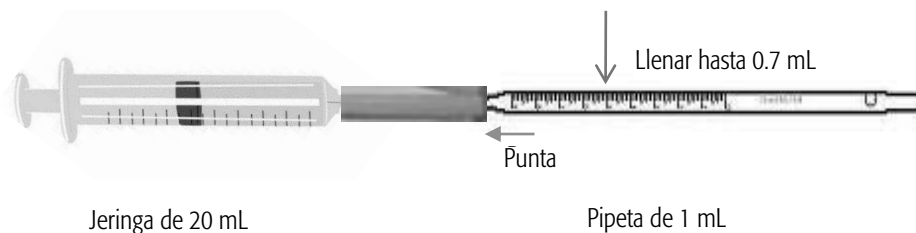


Fig. 2. Dispositivo experimental para plantas acuáticas.

Cubrir con papel aluminio las jeringas 1 a 3 (control en oscuridad). Cubrir la charola con aluminio y colocar encima todas las jeringas cuidando que la pipeta quede perfectamente horizontal, no inclinada. Colocar bajo una fuente de luz (luz solar de preferencia). Si la temperatura ambiental es alta, colocar agua en las cajas de petri y colocarlas sobre 3 jeringas para evitar que se calienten.

Medir el desplazamiento del líquido (mL) dentro de la pipeta cada 10 minutos. Tomar en consideración que la escala está al revés ya que la punta se dirige hacia la jeringa. Registrar los valores en la tabla 1.

Tabla 1. Registro del volumen desplazado por producción de oxígeno en las pipetas (mL).

t (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0												
10												
20												
30												
40												
50												
60												

Análisis de resultados

El desplazamiento en las jeringas 1 a 3 representa la respiración, obtener el promedio. Restar este desplazamiento al volumen desplazado en cada jeringa.


Calcular el volumen de oxígeno producido por gramo de tejido de Elodea. Comparar la producción en relación con el pH del agua.

Cuestionario

1. ¿Cómo afecta la lluvia ácida a la fotosíntesis?
2. ¿Qué pH se ha registrado en lluvia en México?

3. ¿Qué pH se registra en cuerpos acuáticos mexicanos afectados por la lluvia ácida? Dé un ejemplo.
4. ¿Por qué se coloca un control en oscuridad?

Bibliografía

-  Vizuete, R., Lau, L. & F.M. González. 2011. Laboratorio de Biología. Licenciatura en Farmacia. Universidad Latina de Panamá. <http://farmaciulat.blogspot.mx/p/fotosintesis.html> Consultado el 30 de marzo de 2017.

Determinación de concentración letal media (CL₅₀)

Introducción

La determinación de concentraciones de contaminantes y tóxicos no indica los efectos de su presencia en el ambiente. Por este motivo los efectos se evalúan a través de pruebas de toxicidad. Estas pueden ser de tipo agudo (letal), en las que se observa la mortalidad, utilizándose como parámetro comparativo la concentración letal media (CL₅₀), que es aquella en la que muere la mitad de los organismos sometidos a la prueba. Otras son de tipo crónico (subletal), y en ellas se evalúan respuestas fisiológicas e incluso moleculares, a través de biomarcadores. Las pruebas se realizan con tóxicos aislados o con muestras ambientales, utilizando especies de cultivos controlados o nativas del sitio. Son comunes los estudios en invertebrados (*Daphnia magna*, *Moina macrocopa*, *Artemia salina*), vertebrados (peces, ratas), especies vegetales (*Lemna gibba*), e incluso bacterias (*Salmonella typhimurium* y *Phytobacterium phosphoreum*). Algunos bioensayos están normados y se usan para la determinación de condiciones especiales de descarga, tal es el caso de la Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010, siguiendo un protocolo semejante al que se aplicará en esta práctica.

Objetivo

Que el alumno realice una prueba de toxicidad aguda con un tóxico de prueba específico y calcule la CL₅₀.

Reactivos

Solución estándar de sulfato de cobre (1g/L)

Agua sintética madurada de una semana preparada por el profesor de acuerdo a las instrucciones de la marca comercial.

Material

1 vaso de precipitado de 1000 mL

1 vaso de precipitado de 500 mL

1 probeta de 100 mL

12 vasos de precipitado de 50 o 100 mL

3 pipetas Pasteur con bulbo

3 cajas de Petri de 5cm

2 pipetas de 5 mL

2 matraces aforados de 100 mL

1 termómetro

1 potenciómetro

1 oxímetro

Manguera de hule

Organismos de prueba. Neonatos de *Daphnia magna* de 48 horas de edad.

* El lavado de todo el material con extrán es de suma importancia.

Método

I. Aclimatación

1. Colocar 1 L de agua sintética en el vaso de precipitados. Burbujear aire por 10 min.
2. Colocar 200 mL del agua sintética aireada en un vaso de precipitados de 500 mL y agregar 120 organismos, dejar aclimatar a los animales por 30 min.

II. Preparación de las diluciones para la prueba

- 1) Utilizando la solución estándar del tóxico de prueba, se elaborarán 100 mL de las soluciones indicadas en la tabla 1.

Tabla 1. Soluciones de prueba.

mL de solución estándar del tóxico	mL de agua sintética	Concentración final de tóxico
BLANCO	100	
1	99	
2	98	
3	97	
4	96	
5	95	

- 2) Calcular la concentración final del tóxico. En cada vaso se medirán temperatura, pH, y oxígeno disuelto.
- 3) Colocar 50 mL de cada solución en dos vasos de precipitado, ya que se trabajará por duplicado (total 12 vasos). Etiquetar.

III. Prueba de toxicidad

- 1) Colocar 10 organismos en cada vaso. Tapar los vasos con cajas de Petri.
- 2) Registrar en la tabla 2 los organismos sobrevivientes a los 0, 15, 30, 60 y 120 min.

Tabla 2. Registro de la mortalidad durante el bioensayo.

Concentración del tóxico	0 h		15 min		30 min		60 min		120 min	
Control										

- 3) Anotar las modificaciones apreciables en la conducta de los organismos (nado errático, lento o acelerado). El criterio de muerte es la inmovilidad. Los parámetros fisicoquímicos se medirán al final de la prueba.
- 4) Al término de la prueba el agua utilizada deberá diluirse 1:10 con agua de la llave y será desechada a través de la tarja para emitir niveles aceptables de acuerdo a la NOM-001-SEMARNAT-1996. Los organismos constituirán desechos biológicos irreconocibles de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y serán dispuestos como residuos biológicos no peligrosos.

IV. Interpretación de los resultados

- 1) Si los duplicados dieron igual respuesta, los datos de ambos vasos se sumarán para la interpretación. En caso de no ser así, deberá eliminarse un duplicado, o toda la concentración.
- 2) Graficar en papel Probit (Fig. 1) el porcentaje de mortalidad vs dilución, para los plazos de 60 y 120 min. Determinar la concentración letal media (CL_{50}) por interpolación.

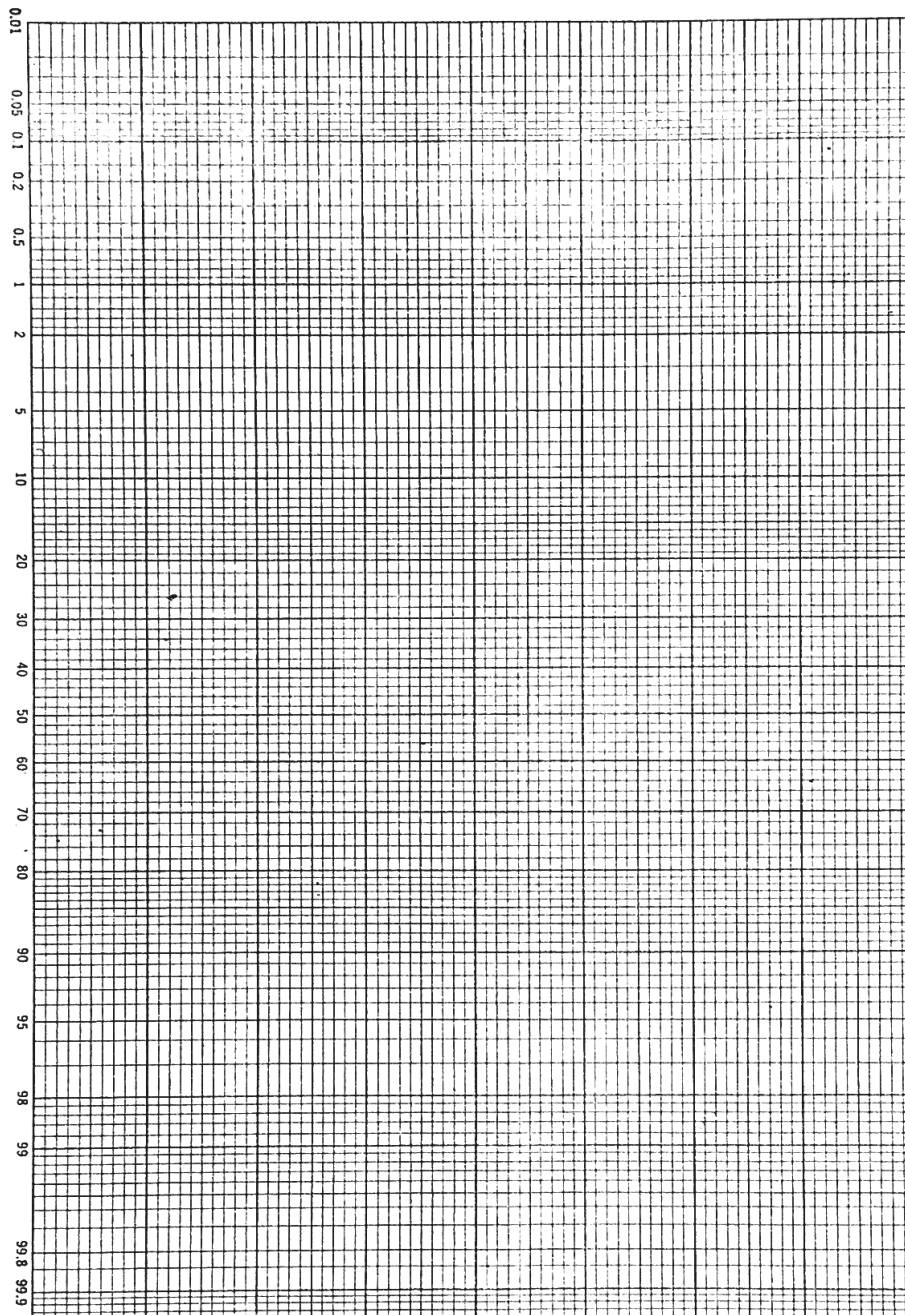


Figura 1. Papel Probit.






- 3) Graficar también la mortalidad vs el tiempo, para la obtención del tiempo letal medio (TL_{50}) por interpolación. Este se obtendrá para una sola concentración.
- 4) Se incluirá el promedio de los valores de los parámetros fisicoquímicos para discutir el control de la prueba. Se espera que estos se comporten de manera semejante en todas las diluciones y duplicados. Esto puede corroborarse por ANOVA.

Nota: para que la prueba se considere adecuada, deberán sobrevivir al menos el 90% de los organismos control.

Cuestionario

1. ¿Qué criterios se aplican para seleccionar una especie para bioensayos?
2. ¿Cuál es la importancia de los grupos control en los bioensayos?
3. ¿Qué es la concentración efectiva media ó CE_{50} ?
4. ¿Los resultados de los bioensayos permiten interpretar directamente el efecto de los tóxicos evaluados en el ambiente?
5. Si el tóxico de prueba es $K_2Cr_2O_7$, ¿cómo prepararía una solución estándar de 0.25 ppm de Cr?

Bibliografía

-  Diario Oficial de la Federación. 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los Límites Máximos Permisibles de contaminantes en las Descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. DOF, México.
-  Diario Oficial de la Federación. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. DOF, México.
-  Diario Oficial de la Federación. 2010. Norma Mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010. *Análisis de agua - Evaluación de toxicidad aguda con Daphnia magna, Straus (Crustacea - Cladocera) - Método de prueba*. DOF, México.
-  Moreno, D.F. 2003. *Toxicología Ambiental*. Mc Graw Hill, México.
-  Ramírez, R.P. & C.A. Mendoza. 2008. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología, México.

Análisis morfofisiológico de los órganos destino (blanco): branquia, tracto digestivo e hígado

Introducción

Los sistemas acuáticos son altamente vulnerables a los contaminantes y se han convertido en depósito de una gran variedad de sustancias químicas (Di Giulio y Hinton, 2008). Los organismos acuáticos, como los moluscos, crustáceos y peces, están expuestos a los contaminantes presentes en el agua, sedimento y alimento. Los agentes xenobioticos, se incorporan en los organismos a través de diferentes vías de exposición, como la ingestión, la respiración y la absorción dérmica, afectando a diferentes órganos llamados destino o blancos. La branquia, tracto digestivo (intestino) e hígado llevan a cabo importantes funciones y constituyen órganos destino o blancos, por lo que son los primeros en alcanzar concentraciones críticas de contaminantes, provocando cambios funcionales, reversibles o irreversibles. El estudio de las respuestas biológicas así como los cambios en los tejidos de los órganos, constituye una herramienta ideal para evaluar a través de biomarcadores el efecto de la contaminación.

Objetivo

Reconocer la morfofisiología de las branquias, canal alimentario e hígado de organismos acuáticos.

Materiales y equipo

1 charola de disección

1 estuche de disección

1 pez comercial

1 par de Guantes

1 lctiometro

1 pizeta de agua destilada

Material biológico (branquias, canal alimentario, hígado)

Método

Se realizará la disección de peces comerciales para obtener las branquias, canal alimentario e hígado (se puede adecuar el método con muestras de crustáceos o moluscos principalmente).

Coloque el pez en una charola de disección y obsérvelo para identificar las partes de la anatomía externa. Obtenga los datos morfométricos (longitud, peso, así como de los órganos disectados) para estimar el índice de condición del organismo.

Realice un corte rectangular, iniciando en el orificio anal hasta el opérculo. Posteriormente realice una incisión vertical con el bisturi hasta la aleta dorsal, en ambos extremos del primer corte y levante el tejido muscular (Fig. 1). Observe e identifique las vísceras del pez (Fig. 2). En el caso, que los peces tengan un cuerpo deprimido dorsoventralmente como los bagres, solo realice el corte del orificio anal hasta el opérculo.

Proceda a extraer el canal alimentario e hígado. Observe y analice la forma, tamaño, textura y color. Posteriormente corte el opérculo y extraiga ambas branquias.

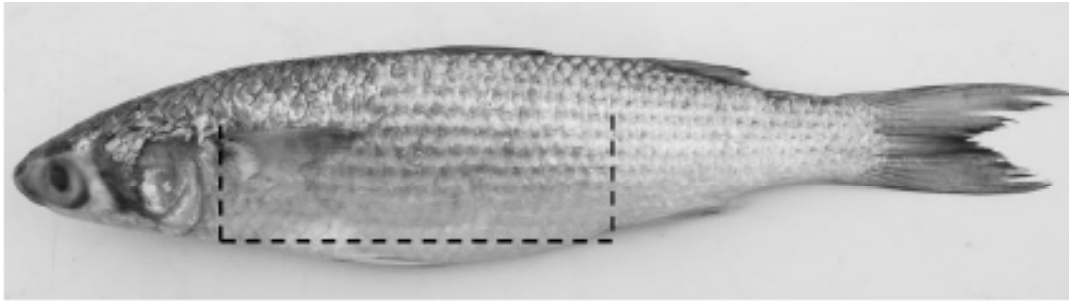


Figura 1. Sección de corte para la disección del pez (Huerta-Aguirre *et al.*, 2016).

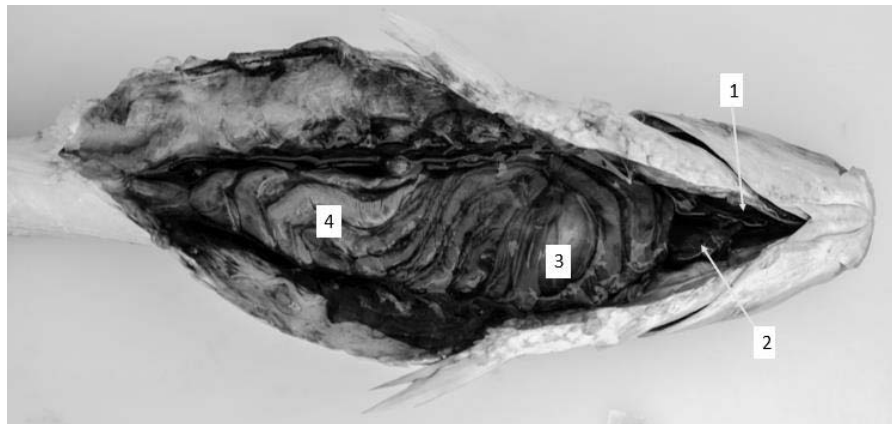


Figura 2. Vista ventral de los órganos de un pez (Mugílido): 1, branquias; 2, corazón; 3, estómago y 4, intestino (Huerta-Aguirre *et al.*, 2016).

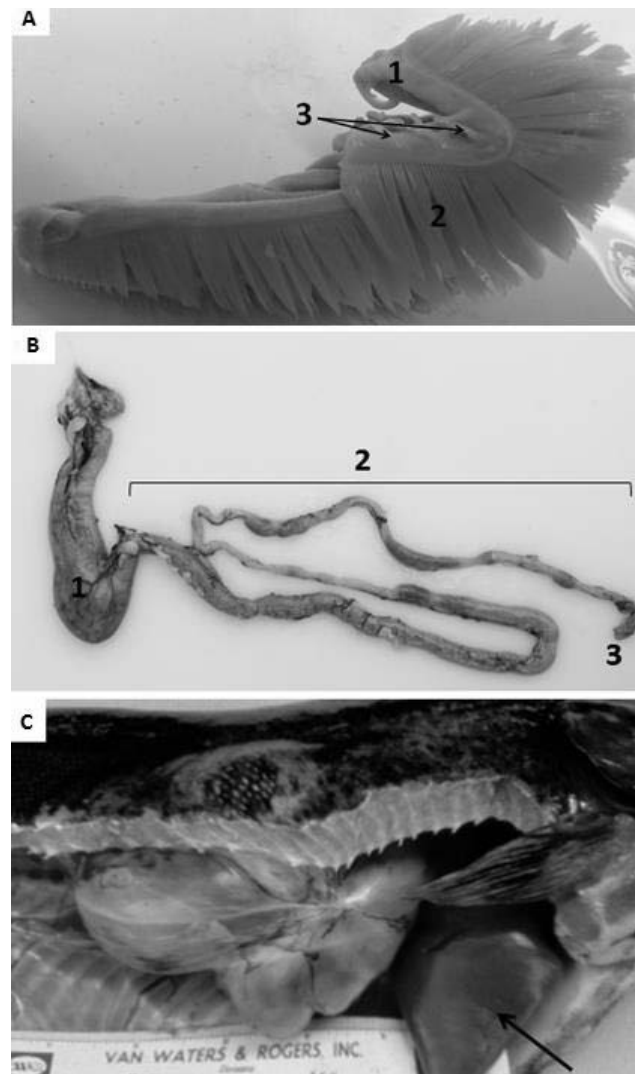


Figura 3. Aspecto General de las branquias, canal alimentario e hígado: Las branquias son el principal órgano de osmoregulación e intercambio gaseoso. Se reconoce la zona del arco branquial y la zona laminar. En A observe: 1, el arco branquial; 2, laminas branquiales; 3, espinas branquiales. En el canal alimentario se distinguen regiones especializadas en la absorción. En B: canal alimentario; 1, estómago; 2, intestino y 3, ano. El hígado se encarga de desintoxicar al organismo, produce bilis y es una reserva de carbohidratos en C: apariencia del Hígado (García-González, 2014; Paredes-Ramos *et al.*, 2016; Zepeda-Román, 2015).

Resultados

- Elabore un esquema o tome una fotografía y describa la estructura anatómica y morfológica de los órganos que extrajo.
Discuta: 1) el proceso de osmoregulación de la branquia, 2) la actividad como centro metabólico y excreción del hígado 3) mecanismos de absorción y eliminación del canal alimentario.
- Defina unidad funcional.
- Elabore una tabla con los diferentes aspectos macroscópicos observados en cada órgano.

Tabla ____ Registro de aspecto macroscópico (en organismo u órgano)						
Perforaciones	Presencia de Vermes	Ectoparásitos	Hongos y/o bacterias	Deformidades en el tejido	Lesiones aparentes	Forma, color, textura

- Explique y discuta porque esos órganos son importantes en los procesos de distribución de tóxicos.

Cuestionario

1. ¿Qué es un órgano destino u órgano blanco?
2. ¿Qué es la toxicocinética, explique brevemente el proceso?

Bibliografía

-  Di Giulio, R. & D.E. Hinton. 2008. *The toxicology of fishes*. CRC Press. U.S.A.
-  García-González, C.E. 2014. *Caracterización y análisis histológico de la branquia del bagre de Tecolutla, Veracruz*. Reporte de investigación. Fac. de Ciencias, UNAM, UAM-I, México.
-  Huerta-Aguirre, G., Calderas-Hernández, I., Jerónimo-Juárez, J. R. & X. Guzmán-García. 2016. *Caracterización histopatológica del intestino de Mugil cephalus en sitios de referencia ambiental*. VII Congreso de la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental A.C. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Unidad Zacatenco, México.
-  Paredes-Ramos, K.M., Calderas-Hernández, I., Jerónimo-Juárez, J. R. & X. Guzmán-García. 2016. *Evaluación histopatológica del intestino de Ariopsis felis en sitios de referencia ambiental*. VII Congreso de la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental A.C. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Unidad Zacatenco, México.
-  Zepeda-Román, P. 2015. *Diagnóstico de salud en el hígado de bagre proveniente de zonas de monitoreo ambiental*. Tesis de Maestría en Biología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México.

Efecto sinérgico de la luz UV sobre la toxicidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Introducción

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos orgánicos que están formados por dos o más anillos benceno fusionados, y pueden incluir heteroátomos o anillos ciclopentano. Estos compuestos se liberan en grandes cantidades al ambiente debido a actividades humanas como la quema de combustibles fósiles, incineración, derrames de petróleo y muchos procesos industriales. Los HAPs son de interés ambiental no solo porque son contaminantes ubicuos que pueden bioconcentrarse sino también porque algunos de ellos son carcinogénicos, teratogénicos, fototóxicos y pueden alterar el sistema endócrino de los organismos. Los HAPs tienen la característica de aumentar su toxicidad cuando interactúan con la fracción ultravioleta de la luz solar; a este fenómeno se le conoce como fototoxicidad y para que se presente se requiere que el organismo haya incorporado los HAPs y que la luz ultravioleta esté presente en su hábitat, además de poseer una piel lo suficientemente delgada para que la luz alcance y active las moléculas acumuladas.

Objetivo

Que el alumno desarrolle un bioensayo en el que pueda observar el efecto sinérgico de la luz ultravioleta sobre la toxicidad de un HAP.

Reactivos

Fluoranteno

Acetona

Cloro

Material

2 cajas de cultivo de tejidos de 24 pozos

1 vaso de precipitados de 500 mL

2 vasos de precipitados de 50 mL

Micropipeta de 1000 uL

Micropipeta de 200 uL

4 pipetas pasteur de vidrio con bulbo

Pipetas volumétricas de 2, 5, 10 mL

Envase de plástico de boca angosta de 600 ml

2 agitadores de plástico para café

Papel Parafilm

Garrafón de agua marina

Quistes de *Artemia franciscana*

1 tamiz pequeño con malla de 50 micras

Alimento para alevines (Wardley, small fry Premium)

1 oxímetro

1 salinómetro

1 potenciómetro

1 microscopio estereoscópico

1 aguja de disección

1 desarmador redondo

1 martillo

1 m de manguera para acuario

1 soporte Universal con pinza

Silicón

1 bomba para acuario

1 lampara de escritorio (foco 40 watts)

Método

Para determinar el efecto del fluoranteno sobre los metanauplios de *Artemia franciscana* (las instrucciones para la obtención de metanauplios se encuentran en un anexo al final de esta práctica) se llevará a cabo una prueba de toxicidad estática en presencia de radiación solar. El experimento se llevará a cabo en una placa de tejidos (Nunc multidish) de 24 pozos de 2 mL de capacidad; en cada pozo se preparan las concentraciones de exposición como se muestra en la figura 1.

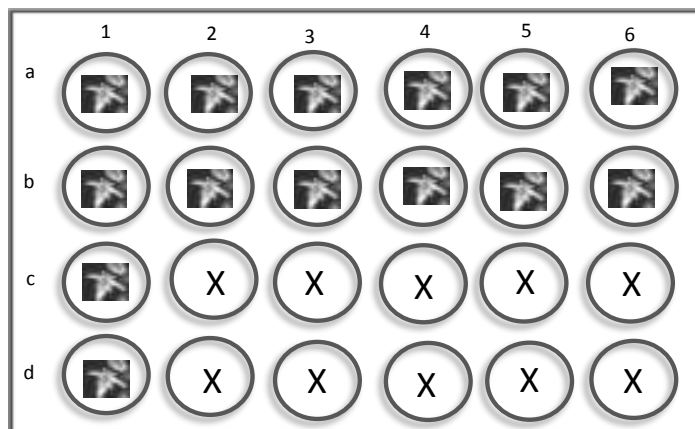


Figura 1. Disposición de las concentraciones de fluoranteno para el bioensayo.

1a y 1b = control acetona, 1c y 1d = control de manipulación, 2a y 2b = 24 µg/L, 3a y 3b = 48 µg/L, 4a y 4b = 72 µg/L, 5a y 5b = 96 µg/L, 6a y 6b = 120 µg/L

Se colocarán de 10 a 20 organismos en cada pozo procurando introducir la menor cantidad de agua posible.

Se les intoxicará con una solución madre de fluoranteno (grado HPLC) disuelto en acetona para preparar las siguientes concentraciones nominales: 24, 48, 72, 96 y 120 µg/L.

Dos pozos de la caja se emplean como grupo control con acetona (10 µL de solvente). Otros dos pozos se usan para el grupo control de manipulación, el cual solo contiene agua marina artificial.

Una vez adicionado el hidrocarburo y los organismos, las placas de cultivo se transfieren al exterior donde reciban la luz solar directamente o en su defecto a una cámara de experimentación, la cual se compone de dos lámparas de radiación blanca (Vitalite, Duro de México de amplio espectro).

El periodo de exposición al contaminante será de 2 horas si es radiación natural o 96 horas con un fotoperiodo de 12:12 (radiación:oscuridad) si el experimento se lleva a cabo en la cámara. Al término de la exposición se registrará la mortalidad con la ayuda de un microscopio estereoscópico, considerando muertos aquellos organismos que no se muevan al ser tocados con una aguja de disección; el criterio para aceptar los resultados de la prueba será que la mortalidad de los controles no exceda el 10 %.

El procedimiento anterior se repite en otra caja de tejidos, solo que este experimento se realiza sin luz solar, es decir que la caja se deja en el interior del laboratorio expuesta a luz blanca artificial.

Manejo de residuos

Aunque las concentraciones de hidrocarburos son muy bajas, el agua que las contiene deberá ser pasada por un filtro de carbón activado. Este carbón se colocará en un recipiente de plástico etiquetado siguiendo las indicaciones del programa para la disposición y eliminación adecuada de los residuos peligrosos químicos de la UAM llamado "Laboratorio Seguro" (<http://www.izt.uam.mx/residuos/>).

Los organismos constituirán desechos biológicos irreconocibles de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y serán dispuestos como residuos biológicos no peligrosos.








Análisis de resultados

Con los datos de mortalidad calcular la CL_{50} para ambos experimentos y comparar los resultados utilizando una t de Student.

Cuestionario

1. ¿Qué es la fototoxicidad?
2. ¿Cuántos tipos de fototoxicidad se reconocen? De ejemplos de cada uno.
3. ¿Por qué se hacen diferentes controles y para que nos sirven?
4. ¿Cuáles son los factores que intervienen para que se presente la fototoxicidad?
5. Además de los HAPs ¿qué otros compuestos presentan fototoxicidad?

Bibliografía

-  Ankley, G.T., Erickson, R.J., Phipps, G.L., Mattson, V.R., Kosian, P.A., Sheedy, R.G. & J.S. Cox. 1995. Effects of light intensity on the phototoxicity of fluoranthene to a benthic macroinvertebrate. *Environmental Science and Technology* 29: 2828-2833.
-  Arfsten, D.P., Schaeffer, D.J. & D.C. Mulveny. 1996. The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: a review. *Ecotoxicology Environmental Safety* 33: 1-24.
-  Bellas J., Saco-Álvarez, L., Nieto, Ó. & R. Beiras. 2008. Ecotoxicological evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons using marine invertebrate embryo-larval bioassays. *Marine Pollution Bulletin* 57: 493-502.
-  Diario Oficial de la Federación. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. DOF, México.
-  Landrum, P.F., Giesy, J.P., Oris, J.T. & P.M. Allred. 1987. Photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to aquatic organisms. In: J.H. Vandermeulen & S.E. Hrudey (Eds.). *Oil in freshwater: chemistry, biology, countermeasure technology*. Proceedings of Symposium Oil Pollution in Freshwater, Edmonton, Alberta, Canada. Pergamon Press, New York.
-  Monson, P.D., Call, D.J., Cox, D.A., Liber, K. & G.T. Ankley. 1999. Photoinduced toxicity of fluoranthene to northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 308-312.
-  Neff, J.M. 1979. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Sources, fates and biological effects*. Applied Science Publishers Ltd., London.

Anexo: Eclosión de *Artemia* sp.

Fabricación de un eclosionador de *Artemia* (con al menos 48 h de anticipación).

Cortar la base de la botella de plástico de refresco y perforar la tapa con un sacabocado o usando un desarmador y un martillo. Insertar un pedazo de manguera por el hoyo de la tapa y tapar la botella. Llenar con agua de la llave para verificar que no tenga fugas la tapa. Si se encuentran fugas, sellar con silicón.

Obtención de metanauplios

Colocar la botella en el soporte universal de manera que quede la tapa hacia abajo, llenar con 400 mL de agua marina artificial.

Hidratar 0.5 g de quistes de *Artemia* sp. por 30 minutos con agua dulce, en un vaso de precipitado de 50 mL. A continuación los quistes se remojan en una solución 1:4 de cloro comercial mientras se agitan con una palita; después se transfieren a un tamiz con una malla de 50 micras, donde se lavan con agua corriente hasta que se pierda el olor a cloro. En seguida se vacían al eclosionador con la ayuda de 100 mL de agua marina. Conectar la manguera a una bomba de acuario para aplicar aireación continua y moderada. Asimismo, se coloca junto al eclosionador una lámpara de 40 watts encendida.

Idealmente, después de 24 horas se obtiene la eclosión máxima; en este momento se le suministra alimento para alevines (Wardley, small fry Premium) a los metanauplios. En la tabla 1 se resumen las condiciones de eclosión para *A. franciscana*.

Tabla 1. Condiciones de eclosión de quistes de *Artemia*

Parámetros	Condiciones
Temperatura	27 ± 3 °C
Salinidad	34 a 36 ups
Oxígeno disuelto	No menor al 80 % de saturación
pH	8.5 ± 0.5

Basado en la NMX-AA-110-1995-SCFI. Análisis de agua- Evaluación de toxicidad aguda con *Artemia franciscana* Kellogg (crustacea-anostraca) - metodo de prueba. DOF.

Efecto de los tóxicos en la respiración y la excreción nitrogenada

Introducción

Las respuestas fisiológicas pueden ser útiles para determinar los efectos de los tóxicos en los organismos. Funciones como el consumo de oxígeno, el consumo de alimento, la excreción por heces y la excreción nitrogenada se registran dentro de ciertos intervalos cuando el organismo se encuentra en buenas condiciones. Estos intervalos pueden modificarse como resultado de la acción tóxica de xenobióticos.

Un consumo excesivo de oxígeno puede indicar que el organismo realiza mayor trabajo metabólico y gasta energía, por lo que necesita formar moléculas como el ATP para lo cual debe consumir más oxígeno. Este esfuerzo representa un intento del organismo por compensar la acción de un tóxico. En contraste, algunos tóxicos pueden inhibir la actividad respiratoria.

Por otro lado, la excreción nitrogenada es un mecanismo de desintoxicación que permite al cuerpo expulsar de manera regular los materiales de nitrógeno (que pueden ser urea, ácido úrico o amoníaco). La excreción puede modificarse porque el organismo trata de expulsar un material tóxico o los desechos derivados de su biotransformación, los cuales muchas veces implican la destrucción de proteínas o el consumo de las proteínas del animal, en ocasiones se observa un exceso de actividad excretora. En contraste, un tóxico que daña el riñón, o su equivalente en un organismo, puede asociarse a una disminución en la excreción nitrogenada.

Objetivo

Determinar si la exposición a tóxicos modifica las funciones de consumo de oxígeno y excreción nitrogenada en peces.

Material

20 cámaras con agua dulce con capacidad de 0.3 L con tapa

15 peces cebra (aproximadamente 5 cm)

1 vaso de precipitado de 2 L

1 vaso de precipitado de 100 mL

1 probeta de 100 mL

1 oxímetro

1 sistema HACH para determinación de amonio total

15 cajas Petri

Balanza digital

Horno de secado

Reactivos

250 mL de combustible (diesel o gasolina)

esencia de clavo

Método

Se utilizará agua de calidad similar a aquella en que se encuentran los peces. Los profesores proporcionarán un litro de solución madre de fracción soluble de combustible (diésel o gasolina) en proporción 1:4 (combustible:agua) con agitación previa por 24 h. A partir de esta preparar dos litros de solución al 6% y dos litros de solución al 12 %. Airear estas soluciones.

1. Se medirá el oxígeno disuelto (mg/L) de cada solución con un oxímetro y se tomará una muestra de cada solución para determinación de nitrógeno amoniacal (mg/L) con el sistema HACH (determinaciones iniciales t_0).
2. Se llenarán las cámaras hasta el borde de la siguiente manera: 10 con agua, 5 con solución de 6% del combustible y 5 con solución 12 %.
3. Se pesarán los 15 peces. Colocar 5 en las cámaras con solución al 6%, 5 en las de 12% y 5 en las cámaras control. 5 cámaras con agua quedarán sin organismos. Las cámaras serán cerradas herméticamente.
4. Después de 6 h en cada cámara se registrará el oxígeno disuelto y se tomará una muestra para medir el nitrógeno amoniacal (determinaciones finales t_1).
5. Los peces se sacrificarán proporcionando condiciones de bienestar animal y trato humanitario, se aplicará una sobredosis de anestesia con esencia de clavo (0.045 mL/300mL) durante cinco minutos (Pérez-Riveiro *et al.*, 2010).
6. Después de muertos los organismos serán extraídos de las cámaras y serán colocados en cajas de Petri individualmente. Se pondrán a secar en horno a 60 °C hasta peso constante para obtener el peso seco.

Cálculo del consumo de oxígeno "VO"

Las concentraciones de oxígeno disuelto iniciales (t_0) y finales de la prueba (t_1) se anotarán en la tabla 1. Calcular el consumo como se indica a continuación.

1. Consumo de oxígeno en 6 h

$$t_1 - t_0 = VO \text{ (mg/L)}$$

2. Consumo en la cámara por hora

$$[VO \text{ (mg/L)} / 6 \text{ h}] * \text{Vol cámara (L)} = VO \text{ (mg/h)}$$

3. Oxígeno consumido por organismo. El valor promedio del oxígeno consumido en las cámaras vacías, será restado del consumo registrado en cada cámara con organismo.

$$VO \text{ (mg/h)} - VO \text{ promedio de las cámaras vacías (mg/h)} = VO \text{ org (mg/h)}$$

4. Consumo de oxígeno consumido estandarizado (por g de peso seco).

$$VO \text{ org (mg/h)} / \text{peso seco (g)} = VO \text{ (mg/h*gpS)}$$

Tabla 1. Registro de datos para calcular el consumo de oxígeno.

Cámara	Lectura t_0	Lectura t_1	VO (mg/L)	VO (mg/h)	VO org (mg/h)	VO (mg/h*gpS)
1						
2						
3						
4						
5						
Control 1						
Control 2						
Control 3						
Control 4						
Control 5						
Dilución 6 % 1						
Dilución 6 % 2						
Dilución 6 % 3						
Dilución 6 % 4						
Dilución 6 % 5						
Dilución 12 % 1						
Dilución 12 % 2						
Dilución 12 % 3						
Dilución 12 % 4						
Dilución 12 % 5						

Cálculo de la excreción nitrogenada como nitrógeno amoniacal total (ΔN).

Las concentraciones de nitrógeno amoniacal (t_0 y t_1) se anotarán en la tabla 2. Calcular la excreción como se indica a continuación:

1. Producción de nitrógeno amoniacal en 6 h

$$t_0 - t_1 = \Delta N \text{ (mg/L)}$$

2. Producción en la cámara por hora

$$[\Delta N \text{ (mg/L)} / 6 \text{ h}] * \text{Vol cámara (L)} = \Delta N \text{ (mg/h)}$$

3. Producción por organismo

$$\Delta N \text{ (mg/h)} - \Delta N \text{ promedio de las cámaras vacías (mg/h)} = \Delta N \text{ org (mg/h)}$$

4. Producción de nitrógeno amoniacal estandarizado (por g de peso seco)

$$\Delta N \text{ org (mg/h)} / \text{peso (g)} = \Delta N \text{ (mg/h*gpS)}$$

Tabla 2. Registro de datos para calcular la producción de nitrógeno amoniacal.

N-NH ₃	Lectura t ₀	Lectura t ₁	ΔN (mg/L)	ΔN (mg/h)	ΔN org (mg/h)	ΔN (mg/h*gpS)
1						
2						
3						
4						
5						
Control 1						
Control 2						
Control 3						
Control 4						
Control 5						
Dilución 6 % 1						
Dilución 6 % 2						
Dilución 6 % 3						
Dilución 6 % 4						
Dilución 6 % 5						
Dilución 12 % 1						
Dilución 12 % 2						
Dilución 12 % 3						
Dilución 12 % 4						
Dilución 12 % 5						

Una concentración superior a 0.1 mg/L de nitrógeno amoniacal en las cámaras control indica un nivel demasiado alto para que el bioensayo sea aceptable.

Manejo de residuos

Aunque las concentraciones de combustible son muy bajas, el agua que las contiene deberá ser pasada por un filtro de carbón activado. Este carbón se colocará en un recipiente de plástico etiquetado siguiendo las indicaciones del programa para la disposición y eliminación adecuada de los residuos peligrosos químicos de la UAM llamado "Laboratorio Seguro" (<http://www.izt.uam.mx/residuos/>).

Los organismos constituirán desechos biológicos irreconocibles de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y serán dispuestos como residuos biológicos no peligrosos.







Análisis de resultados

Comparar por ANOVA o Kruskal-Wallis los resultados obtenidos para los tres lotes experimentales (control, 6% y 12%) para determinar si el tóxico tuvo efectos en el consumo de oxígeno y en la excreción nitrogenada.

Cuestionario

1. ¿Qué efectos documentados se asocian a la exposición a la gasolina y el diésel (en atmósfera y agua)?
2. ¿Por qué se requiere más oxígeno en el organismo cuando existe demanda de ATP?
3. Indique tres tóxicos que actúen como inhibidores de la respiración y describa brevemente porque la inhiben.
4. ¿Por qué se asocia la degradación de proteínas al incremento de la excreción nitrogenada?
5. Indique tres tóxicos que dañen el riñón y describa brevemente como lo afectan.

Bibliografía

-  American Public Health Association. 2013. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22 ed. APHA, E.U.
-  Barrera-Escorcía, G. 2011. *Efectos de los metales Cr y Cd en el ostión Crassostrea virginica. Propuesta de una nueva evaluación de riesgo para la especie*. Editorial Académica Española, U.K.
-  Diario Oficial de la Federación. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. DOF, México.
-  Mayzaud, P. & R.J. Conover. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplankton metabolism. *Marine Ecology (progress series)* 45: 289-302.
-  Pérez-Riveiro P.A., Santos-Costa, L., Augusto, E.A., Vieira e Rosa, P. & L.D. Solis Murgas. 2010. Acite de clavo como anestésico para el pez pacu (*Piaractus mesopotamicus*) *Anales de Veterinaria de Murcia* 26: 69-76.
-  Solorzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanography* 14: 799-800.

La histopatología como biomarcador de efecto de contaminantes

Introducción

La histopatología ha sido propuesta en los estudios de monitoreo de la contaminación porque es un método rápido para detectar los efectos de los agentes xenobióticos y contaminantes, especialmente los crónicos, en diversos tejidos y órganos (Bernet *et al.*, 1999).

La técnica tisular permite realizar el análisis de los tejidos básicos (muscular, conectivo, nervioso y epitelial) y sus alteraciones. El procedimiento incluye una serie de pasos posteriores a la fijación. La deshidratación de órganos o piezas disectadas mediante pasos sucesivos de alcohol hasta perfundir con ayuda de xilol, la parafina. La aclaración e inclusión de las muestras es un paso consecutivo, en donde se obtiene el bloque de parafina. Los bloques de parafina permiten obtener cortes microtomicos que son teñidos con colorantes básicos y ácidos. Un ejemplo de tinción es H-E (Hematoxilina- Eosina) coloración de contraste que permite diferenciar en los tejidos el núcleo y citoplasma celular (Guzmán-García *et al.*, 2016).

El análisis tisular (caracterización de los tejidos, los cambios patológicos y la presencia de parásitos) permite evaluar lesiones reversibles e irreversibles que pueden asociarse con la exposición a contaminantes y a su vez facilitar la interpretación de la relación que guardan con su medio.

Objetivo

Que el alumno reconozca las respuestas tisulares en órganos destino así como las alteraciones relevantes, en los organismos acuáticos.

Material

Laminillas de organos blanco (almeja, camarón, ostión, bagre)

Microscopio óptico

Método

El profesor proporcionará laminillas de órganos destino o blanco preparadas previamente de acuerdo con Guzmán-García *et al.*, 2009. Se procederá a realizar la observación de los órganos y las posibles lesiones en las laminillas, con la ayuda de las microfotografías, las explicaciones que se incluyen a continuación y las proporcionadas por el profesor.

Observación tisular de la branquia

Observa e identifica los diferentes tipos de tejidos y las estructuras celulares que conforman la branquia, especialmente la región del arco branquial y la región lamelar (García-González, 2014). El arco branquial presenta un soporte de tejido conectivo, hueso y cartilago, a lo largo del cual corren vasos sanguíneos de gran calibre, aferentes y eferentes, también se observan vasos sanguíneos de diferente calibre que irrigan las lamelas primarias (Fig.1 A y B).

La región lamelar corresponde propiamente a las lamelas primarias y lamelas secundarias. Las lamelas primarias están constituidas por un centro alargado de cartilago hialino que brinda el soporte y forma característica de estas. Las lamelas secundarias surgen como una prolongación para aumentar la superficie respiratoria (Fig.2).

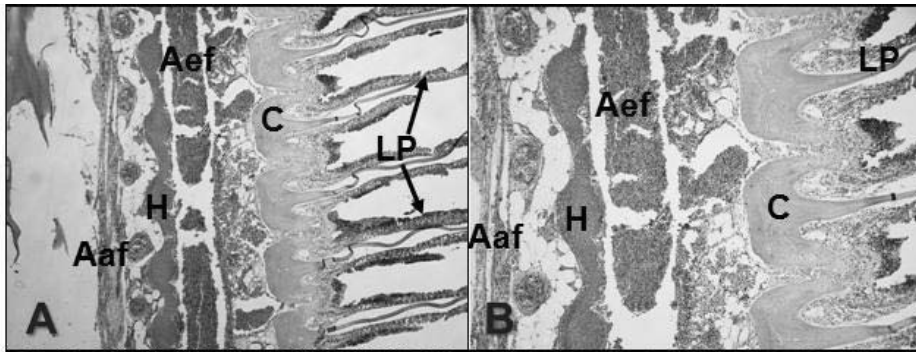


Figura 1. Región del arco branquial y lamelar. Se observan: en A, laminillas primarias (LP); cartílago (C), hueso (H), arterias aferentes (Aaf) y eferentes (Aef); en B detalles de las estructuras. A, 4X; B 10X Tinción H-E.

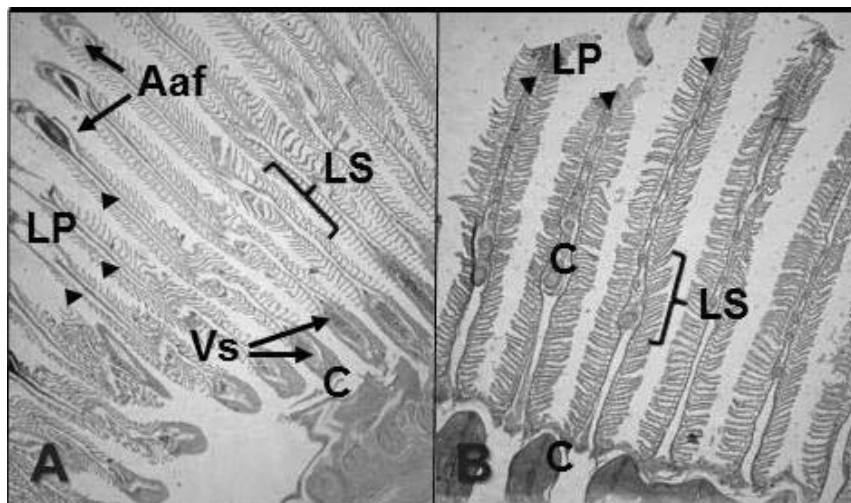


Figura 2. Aspecto de la inserción de lamelas primarias en el arco branquial. En A y B, Se denotan lamelas primarias (LP) con cabeza de flecha, lamelas secundarias (LS), cartílago (C), arterias aferentes (Aaf) y vasos sanguíneos (Vs). 4X, tinción H-E.

Las lesiones tisulares pueden incluir; alteraciones circulatorias, cambios reversibles y cambios progresivos en diferentes grados, destacando proliferación de células, hiperplasia y fusión de lamelas.

Observación tisular del canal alimentario

El canal alimentario o aparato digestivo está formado por un conducto modificado (tubo digestivo) que se extiende desde la boca hasta el ano, en algunos organismos. En los diferentes grupos de vertebrados, el aparato digestivo presenta el mismo plan estructural: un intestino anterior formado por la boca, faringe, esófago y estómago; un intestino medio o delgado, y un intestino posterior denominado grueso que termina en el recto y el ano. En el canal alimentario, específicamente en la región de absorción se distinguen 4 capas constitutivas relacionadas con el movimiento, digestión y absorción de alimentos: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Figura 3 y 4).

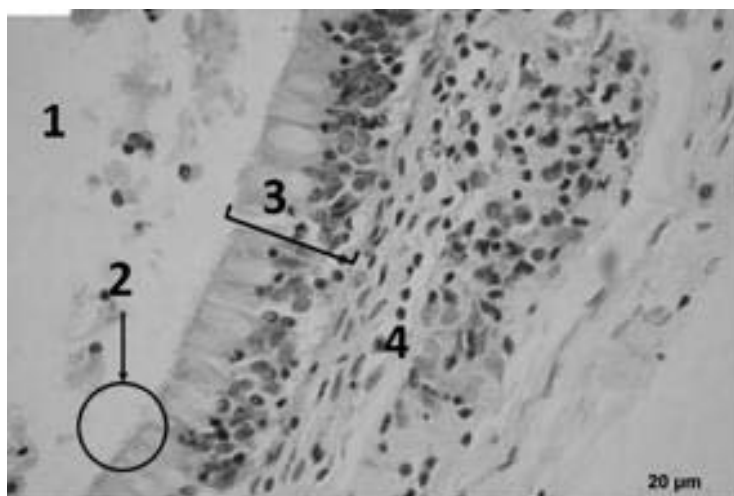


Figura 3. Capas tisulares del intestino de un pez con hábitos alimenticios carnívoros. Detalle de la capa mucosa, se observa el lumen (1), microvellosidades (2), enterocitos (3) y lamina propia (4). Tinción H-E.

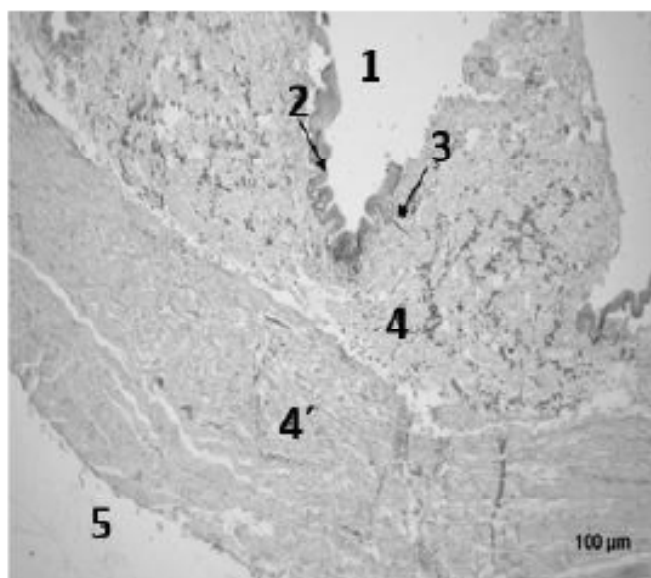


Figura 4. Aspecto del intestino medio de un pez con hábitos alimenticios detritívoros se observan las cuatro capas constitutivas (1) lumen, (2) capa mucosa, (3) capa submucosa, (4) capa muscular longitudinal (4') capa muscular circular y 5) serosa. Tinción H-E.

Las alteraciones tisulares pueden incluir; Secreciones eosinófilas, vasos congestivos, filtración sanguínea, Inflamación así como la posible presencia de parásitos (Huerta-Aguirre, 2016; Paredes-Ramos, 2016).

Observación tisular del hígado

El hígado en los peces se localiza en la región media y anterior de la cavidad abdominal. Entre otras funciones, desintoxica al organismo de agentes tóxicos, produce la bilis y es una reserva de carbohidratos. Debido al doble abastecimiento de sangre que tiene el hígado, es importante considerar las dos vías de absorción que llevan a la distribución de compuestos potencialmente tóxicos, las cuales son: la ruta de absorción intestinal y la ruta branquial. Debido a su estructura y función, el hígado de los peces

es considerado como un órgano destino para compuestos tóxicos, principalmente por la posición en la que se encuentra y su vascularización aferente y eferente; estas propiedades micro vasculares facilitan la absorción y la llegada de las toxinas, colocándolo como un órgano destino de gran interés en los estudios histopatológicos. En los bagres, el hígado está constituido, principalmente, por células poliédricas llamadas hepatocitos, arreglados en cordones hepáticos, Un conducto biliar en común con la vejiga natatoria conecta con el intestino ventral y con el esófago. El páncreas endocrino se encuentra entre el bazo y el hígado.

En el análisis de los cortes histológicos hígado de bagre (*Ariopsis felis*) se observan estructuras tisulares características como lo son: sinusoides, cordones hepáticos, parénquima hepático el cual está conformado por hepatocitos poliédricos, parénquima pancreático, túbulos biliares, venas y arterias, como se muestra en la Figura 5.

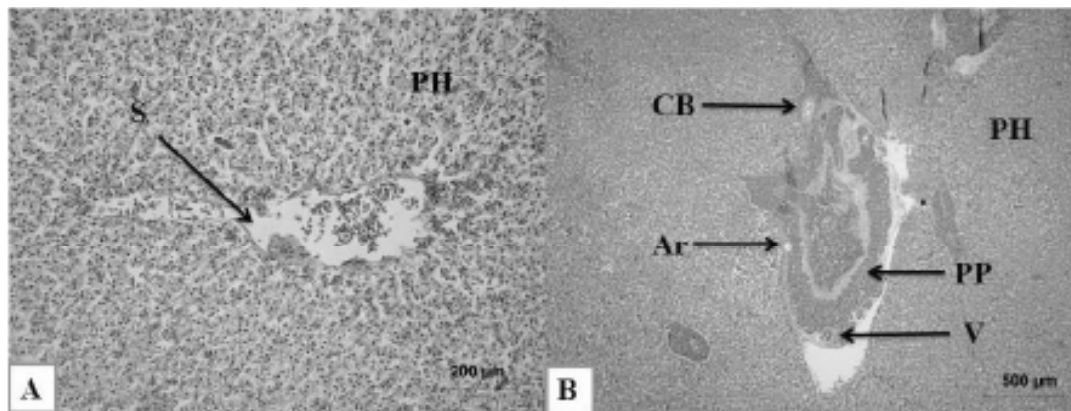


Figura 5. Estructura tisular de hígado de bagre (*Ariopsis felis*). Observe la estructura de la unidad morfológica del hígado. A) parénquima hepático (PH), sinusoides (S). B) estructura hepática con arteria (Ar), conducto biliar (CB), vena (V), hepatocitos (PH), células pancreáticas (PP). Tinción H-E.

Algunas alteraciones en este órgano incluyen; congestión de eritrocitos en el tejido, infiltración de eritrocitos en parénquima hepático, degeneración y destrucción de estructuras hepáticas, granulomas y centros melanomacrófagos (Zepeda-Roman, 2015).

Resultados




Discuta la función de los diferentes tipos de tejidos y estructuras celulares identificados en las preparaciones tisulares.

Identifique lesiones tisulares e investigue las definiciones de cada una.

Cuestionario

1. ¿Qué es histopatología?
2. ¿Qué es un biomarcador?
3. ¿En qué consiste la tinción hematoxilina-eosina?
4. Mencione la funcionalidad de los tejidos: conectivo, muscular, epitelial y nervioso
5. Haga un glosario con los siguientes términos: secreciones eosinófilas, vasos congestivos, inflamación, infiltración sanguíneas, granuloma, centros melanomacrófagos, necrosis, hiperplasia, fusión lamelar.

Bibliografía

-  Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm P. & T. Wahli. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22: 25-34.
-  García-González, C.E. 2014. *Caracterización y análisis histológico de la branquia del bagre de Tecolutla, Veracruz*. Reporte de Investigación. Fac. de Ciencias, UNAM, UAM-I, México.
-  Guzmán-García, X., Hernández-Calderas, I., Luis-Hernández, D., Jerónimo-Juárez, J. R. & M. Luis-Hernández. 2016. *Video Deshidratación e inclusión de la muestra*. Lab. De Ecotoxicología. UAMI, México.
-  Guzmán-García, X., Hernández-Calderas, I., Luis-Hernández, D., Jerónimo-Juárez, J. R. & M. Luis-Hernández. 2016. *Video Análisis tisular de organismos acuáticos y experimentales*. Lab. De Ecotoxicología. UAMI, México.
-  Guzmán-García, X., Ramírez-Romero, P. & S. López-Vite. 2009. *Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, México.
-  Huerta-Aguirre, G., Calderas-Hernández, I., Jerónimo-Juárez, J. R. & X. Guzmán-García. 2016. *Caracterización histopatológica del intestino de Mugil cephalus en sitios de referencia ambiental*. VII Congreso de la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Unidad Zacatenco, México.
-  Paredes-Ramos, K.M., Calderas-Hernández, I., Jerónimo-Juárez, J. R. & X. Guzmán-García. 2016. *Evaluación histopatológica del intestino de Ariopsis felis en sitios de referencia ambiental*. VII Congreso de la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Unidad Zacatenco, México.
-  Zepeda-Roman, P. 2015. *Diagnóstico de salud en el hígado de bagre proveniente de zonas de monitoreo ambiental*. Tesis de Maestría en Biología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México.

Caracterización de células sanguíneas de peces

Introducción

Los peces son buenos bioindicadores y son útiles para el estudio de los efectos de factores de estrés ambiental (Galeano *et al.*, 2010). En particular, el análisis de la sangre de los peces se ha utilizado para evaluar sus condiciones fisiológicas y de salud (Ruíz, 2009). Aunque la composición sanguínea de los peces está determinada genéticamente, también es influenciada por el ambiente (Valenzuela *et al.*, 2003). Así, los patrones hematológicos son usados como referencia para el diagnóstico de cuadros patológicos en peces; como malnutrición, edad, tamaño y diferencias estacionales, entre otros.

El porcentaje de células de la sangre, es un indicador utilizado en los análisis sanguíneos. El hematocrito mide la porción de la sangre compuesta por glóbulos rojos. En concreto, mide el volumen de glóbulos rojos que transportan oxígeno a través de la corriente sanguínea a todas las células del organismo. Esto es muy importante, ya que se necesita oxígeno para mantener los órganos sanos.

El estrés ambiental, provocado por diversos contaminantes puede generar reacciones inflamatorias, disminución generalizada de la concentración de inmunoglobulinas, monocitosis, neutrofilia, leucopenia e incluso supresión fagocítica. En esta práctica se observarán posibles cambios en la concentración y la morfología de las células sanguíneas de peces.

Objetivo

Caracterizar y evaluar la concentración de células en muestras de sangre de peces.

Material

Para obtención de muestras sanguíneas de peces

- Peces comerciales (recién extraídos) cebra
- Jeringas de 3 y 5 ml
- Tubos tapón lila con anticoagulante EDTA
- Capilares de vidrio heparinizados

Para frotis de sangre

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio de campo claro
- Lápiz punta diamante

Para tinción

- Jarras Coplin
- Vasos Coplin

Reactivos

Para tinción Giemsa:

- Colorante Giemsa
- Agua acética
- Alcohol absoluto
- Benzocaína

Para tinción Wright

- Colorante de Wright
- Buffer de fosfatos

Método

Obtención de sangre

1. Sedar a los peces con benzocaína al 5%.
2. Realizar la extracción de sangre mediante punción cardíaca o por aleta dorsal introduciendo la aguja formando un ángulo de 45° con jeringas de 3 o 5 ml (dependiendo el tamaño del pez).
3. Retirar la aguja de la jeringa y vaciar la sangre por las paredes del tubo con anticoagulante EDTA.

Las diferencias en las concentraciones se determinarán mediante microscopía de campo claro y tinción de Wright, Giemsa.

Frotis de sangre

1. Extraer una gota (cerca de 20 μ l) de sangre de peces.
2. Colocar la sangre en un extremo del portaobjetos.
3. Colocar otro portaobjetos sobre el primero formando un ángulo de 45 grados como se muestra en la figura 1.
4. Cuando el portaobjetos de arriba toque la sangre, recórrase con rapidez hasta el otro extremo del portaobjetos de base
5. Dejar secar el frotis a temperatura ambiente y realizar las tinciones necesarias.

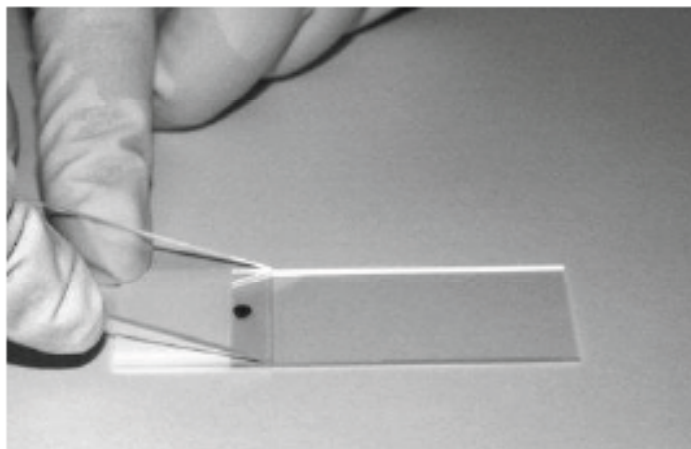


Figura 1. Técnica de extensión de sangre.

Tinción de Giemsa

1. Primera fijación: secado del frotis a temperatura ambiente.
2. Segunda fijación: agregar alcohol absoluto en un vaso Coplin e incubar durante una hora.
3. Escurrir la preparación y se dejar secar.
4. Agregar el colorante Giemsa, diluido sobre el portaobjetos en una jarra Coplin y dejar actuar durante una hora.
5. Lavar con agua destilada y dejar secar.
6. Realizar una inmersión rápida en agua acética, seguida de una inmersión en agua potable para detener el efecto del agua acética.
7. Dejar secar y observar al microscopio.

Tinción de Wright

1. Colocar la laminilla en el puente de tinción hacia arriba.
2. Cubrir el extendido completamente con colorante de Wright y dejarlo actuar 5 min.
3. Agregar el buffer poco a poco y de manera gentil con ayuda de una pipeta (la laminilla debe presentar una coloración verde metálico).
4. Dejar actuar de 10 a 15 min.
5. Eliminar la mezcla agregando agua corriente, lavando por flotación.
6. Dejar secar en posición vertical inclinada.
7. Observar a inmersión.

Análisis

1. Enfocar el microscopio con el objetivo de 100x.
2. Explorar el frotis para localizar las mejores zonas (donde se aprecien las células bien teñidas y no aglomeradas).
3. Realizar la observación en forma de zig-zag y diferenciar las células encontradas reportándolas como: neutrófilo (banda), neutrófilo segmentado, linfocito, monocito, basófilo, eosinófilo (línea blanca) y eritrocitos inmaduros. Se recomienda hacer observaciones sobre la presencia de núcleos policromáticos, poiquilocitosis, anisocromia e hiper Cromía (línea roja).
4. Para una correcta identificación, se recomienda el uso de un atlas ictiohematológico.

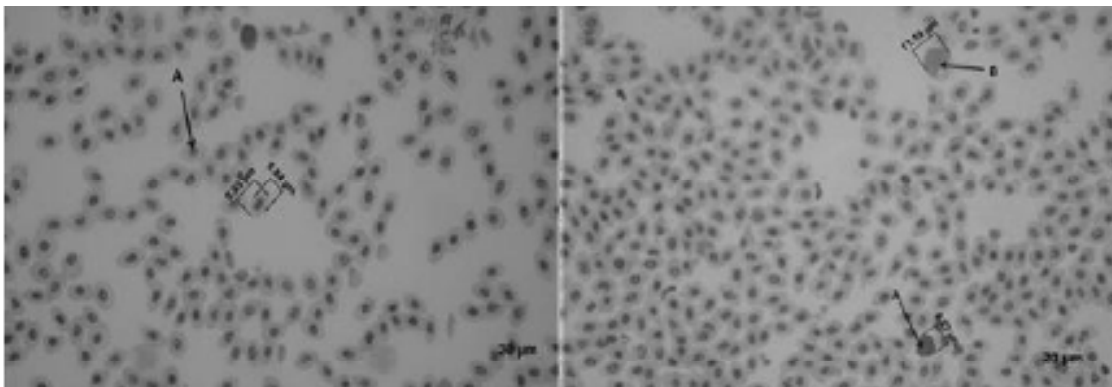


Figura 2. Células sanguíneas del pez *Trichiurus lepturus*. Las células predominantes en ambas fotografías, son eritrocitos maduros (citoplasma y núcleo ovalado) las cuales son vitales para el transporte de nutrientes e intercambio gaseoso. En la microfotografía de la izquierda se observa en el tamaño de un eritrocito (A, 9.33 μm). En la fotografía de la derecha, se observan una célula basófila (A), la cual está relacionada con enfermedades inflamatorias o parasitarias, ya que en condiciones normales en peces sanos estas células son escasas y en algunos casos ausentes, también se aprecia una célula inmadura blástica (B), la cual se relaciona con patologías. Tinción Giemsa.

5. Dibuje las células que se observaron en el microscopio óptico (o si es posible, tome fotografías) y discuta su función.
6. Adicionalmente se realizarán observaciones de laminillas previamente elaboradas las cuales serán proporcionadas por el profesor.

Hematocrito (Ht)

1. Con la sangre obtenida, llenar $\frac{3}{4}$ partes del capilar de vidrio heparinizado (duplicado).
2. Limpiar el exterior de los tubos con gasas o sanitas.
3. Sellar un extremo del tubo con ayuda del mechero, sin quemar la sangre.
4. Colocar el tubo capilar en posición vertical y esperar una hora aproximadamente para observar la separación de los compuestos de la sangre.
5. Medir y realizar cálculos necesarios: calcule la medida total de eritrocitos, leucocitos y plasma (mida en mm y considérela como un 100%). La medida de los eritrocitos en mm permite obtener el porcentaje, con respecto a éste, por medio de una regla de tres, por ejemplo:

Medida total= 58 mm (eritrocitos, leucocitos y plasma)

Medida de eritrocitos= 29 mm

58 mm -100%

29 mm - x (hematocrito)

HEMATOCRITO = 50 %

Interprete este resultado con ayuda de la bibliografía

Cuestionario







1. ¿Qué tipo de células se pueden encontrar en el torrente sanguíneo de un pez?
2. ¿Qué efectos tienen los estresores ambientales sobre las células sanguíneas de los organismos? Mencione dos ejemplos.
3. ¿Qué diferencias se observan en las laminillas elaboradas comparadas con las proporcionadas por el profesor?
4. Con los siguientes datos, obtener el valor del Ht.

Caso 1: Volumen total 80mm, Volumen eritrocitario 65mm.

Caso 2: Volumen total 76mm, Volumen eritrocitario 48mm.

Caso 3: Volumen total 90mm, Volumen eritrocitario 60mm.

Bibliografía

-  Hernández Díaz, M., Hernández Calderas, I., Becerra Amezcua, M.P. Jerónimo-Juárez, J.R. & X. Guzmán García. 2015. *Morphological alteration in blood cells of fishes exposed to cadmium*. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular. VI Internacional Congress of Histology and Tissue Engineering. II Congreso Iberoamericano de Histología. Bilbao.
-  Hernández-Díaz, M., Becerra-Amezcua, M. P., Calderas-Hernández, I., Jerónimo-Juárez, J. R. & X. Guzmán-García. 2016. *Ictiohematología: propuesta como biomarcador de estrés fisiológico ambiental*. VII Congreso de la Asociación Mesoamericana de Ecotoxicología y Química Ambiental A.C. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Unidad Zacatenco, México.
-  Galeano, N. A., Guagliardo, S. E., Schwerdt, C. B., & R.D. Tanzola. 2010. Características hematológicas de *Porichthys porosissimus* (Pisces: Batrachoidiformes) en el estuario de bahía blanca, Argentina. *Anales acta Veterinaria* 30 (1): 5-11.
-  Matadamas-Guzman, F., Guzmán-Paredes y X. Guzmán García. 2014. *Cambios hematológicos en el bagre (Ariopsis felis) como biomarcadores de contaminación*. 2do Congreso Estudiantil de investigación del Sistema Incorporado "Para estimular la creatividad científica y humanística". Universidad Nacional Autónoma de México, México.
-  <http://vinculacion.dgire.unam.mx/Congreso-Trabajos-pagina/PDF/Congreso%20Estudiantil%202014/Proyectos%202014-%20C3%81rea/1.%20Ciencias%20Biol%20C3%B3gicas/biologia/1.12%20CIN2014A10244-%20Biolog%C3%ADa.pdf> Consultado el 29 de marzo del 2017.
-  Ruíz, G. J. 2014. *Fundamentos de Hematología*. 5ª ed. Ed. Médica Panamericana, México, p. 394.

- 📖 Valenzuela, A., Oyarzún, C. & V. Silva. 2003. *Blood cells of the Schroederichthys chilensis (Guichenot 1848): The Leukocytes (Elasmobranchii, scyliorhinidae)*. Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Departamento de Oceanografía, Laboratorio de Piscicultura. Universidad de Concepción, Gayana (Concepción) 67(1): 130-137.

Biomarcadores: estabilidad lisosomal

Introducción

El uso de biomarcadores es un enfoque prometedor en la evaluación de la salud de los ecosistemas. Los biomarcadores se aplican con el fin de evaluar el síndrome de estrés inducido en los organismos por la acumulación de contaminantes en sus tejidos, la rápida acción de los productos químicos tóxicos a nivel molecular y como una alerta temprana del efecto de los contaminantes a largo plazo. Por lo tanto, las alteraciones pueden ser detectadas antes que otros trastornos, como la enfermedad o la mortalidad.

Para evaluar el efecto de la exposición a contaminantes sobre los lisosomas se ha empleado la técnica llamada retención de rojo neutro (RRN) (Lowe et al., 1995a; Lowe *et al.*, 1995b); asimismo se ha evaluado la variabilidad de este biomarcador asociada a los cambios ambientales, los ciclos reproductivos, la temperatura, exposición al aire y la disponibilidad de alimentos (Harding *et al.*, 2004), así como a perturbaciones mecánicas relacionadas con las actividades de procesamiento post-cosecha y condiciones de almacenamiento.

Objetivo

Que el alumno implemente la técnica de estabilidad lisosomal como un biomarcador de efecto.

Reactivos

Rojo neutro (RN)

Dimetilsulfoxido (DMSO)

Cloruro de Calcio (CaCl₂)

Sulfato de Magnesio (MgSO₄)

Cloruro de Potasio (KCl)

HEPES

Poly-L-Lysina

Material

Ostiones comerciales

Agua destilada

Cuchillo de cocina

Jeringa de 1 mL

Tubo de silicona Eppendorf

Incubadora (Recipiente hermético con toallas de papel húmedas)

Microscopio óptico

Potenciometro

Micropipeta 1 mL

Micropipeta 200 μ L

Puntas para micropipeta

Portaobjetos

Cubreobjetos

Vortex

Papel aluminio

Guantes

Toallas de papel

Método

Preparación de reactivos:

1. Solución Fisiológica Salina. Disolver 4.77 g de HEPES, 25.48 g de NaCl, 13.06 g de MgSO₄, 0.75 g de KCl y 1.47 g de CaCl₂ en 500 mL de agua destilada, aforar a 1 L. El pH debe ser aproximadamente 7.36. Conservarse en refrigeración hasta su uso.
2. Solución stock de colorante Rojo Neutro. Disolver 20 mg de (NR) en 1 mL de Dimetilsulfoxido (DMSO), filtrar en filtro de 0.45 μ m. Guardar en vial color ámbar a 4°C.
3. Solución de Tinción. Disolver 100 μ L de solución stock en 900 μ L de solución fisiológica salina. Conservar en vial color ámbar. Prepararse al inicio de la extracción de la muestra.

Método

Determinación del tiempo de retención del rojo neutro.

- 1) El material será previamente lavado con Extran, enjuagado abundantemente con agua corriente y enjuagado al final con agua destilada.
- 2) Para la extracción de la muestra de hemolinfa se prepararán las jeringas con 500 μ L de solución fisiológica salina, y se mantendrán a 4°C.
- 3) La preparación de los portaobjetos se realizará agregándole 30 μ L de poli-L-lisina.
- 4) Se procederá a abrir con un cuchillo los ostiones y se les escurrirá el exceso del líquido intervalal. De la cavidad pericárdica (membrana que envuelve al corazón) se extraerá la hemolinfa insertando la aguja de una jeringa previamente preparada,
- 5) Pasar el líquido extraído a un tubo Eppendorf y mezclar suavemente.
- 6) Transferir 75 μ L de la mezcla (hemolinfa, solución salina) a un portaobjetos previamente tratado.

- 7) Agregar 40 μL de la solución de tinción o rojo neutro a la muestra.
- 8) Colocar una muestra bajo el microscopio, usando el objetivo 40X, con baja intensidad de luz.
- 9) Durante los primeros 60 minutos se examinarán las muestras cada 15 minutos, posteriormente cada 30 minutos. Las observaciones continuarán hasta que se haya perdido el 50% de la tinción.
- 10) Tabular los resultados, como el tiempo de retención del rojo neutro (+ no se produce ningún efecto, +/- signo de estrés, - más del 50% están estresado).
- 11) Registrar los resultados en la siguiente tabla:

Muestra	Tiempo de observación (minutos)								Tiempo de Retención
	0	15	30	45	60	90	120	180	
1									
2									
3									

Utilizar los datos para realizar un gráfico y comparar el tiempo de retención de los ostiones para determinar la toxicidad celular.



NOTA: La práctica deberá realizarse a 17°C de temperatura. La tinción se debe realizar en ausencia de luz.







Los organismos constituirán desechos biológicos irreconocibles de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y serán dispuestos como residuos biológicos no peligrosos.

Cuestionario

1. ¿Por qué los bivalvos son ampliamente utilizados como organismos indicadores?
2. ¿Cuáles son las limitaciones de la técnica de estabilidad lisosomal?
3. ¿Por qué la técnica debe realizarse en ausencia de luz?
4. ¿Qué importancia y aplicaciones tiene la prueba de estabilidad lisosomal en los estudios ecotoxicológicos?

Bibliografía

-  Cho, S.M. & W.G. Jeong. 2005. Spawning impact on lysosomal stability of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 244: 383-387.
-  Diario Oficial de la Federación. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. DOF, México.

-  Hauton, C., Hawkins, L.E. & S. Hutchinson. 1998. The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European Flat Oyster *Ostrea edulis* (L). *Comp. Biochemistry and Physiology* 119B: 619–623.
-  Lowe, D.M., Soverchia, C. & M.N. Moore. 1995a. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicology* 33: 105–112.
-  Lowe, D.M., Fossato, V.U. & M.H. Depledge. 1995b. Contaminant induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study. *Marine Ecology (progress series)* 129: 189– 196.
-  Harding, J.M., Couturiera, C., Parsons, G.J. & N.W. Ross. 2004. Evaluation of the neutral red assay as a stress response indicator in cultivated mussels (*Mytilus* spp.) in relation to post-harvest processing activities and storage conditions. *Aquaculture* 231: 315-326.
-  Ringwood, A.H., Conners, D.E. & J. Hoguet. 1998. The effects of natural and anthropogenic stressors on lysosomal destabilization in oysters *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology (progress series)* 166: 163– 171.
-  Zhang, Z., Li, X., Vandeeper, M. & W. Zhao. 2006. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256: 502–509.

Análisis de los cambios tisulares por exposición a cadmio en moluscos bivalvos

Introducción

Las actividades antropogénicas han perjudicado al ambiente y a diversos organismos que en él habitan. Los ambientes terrestres y acuáticos han sido impactados por estas actividades; sin embargo, las zonas costeras, se consideran uno de los ambientes más vulnerables a el efecto de los contaminantes (Villanueva y Botello, 1998; Botello, 2010).

En los sistemas acuáticos se ha reportado la presencia de contaminantes críticos entre los que destacan hidrocarburos, plaguicidas, descarga de aguas residuales y metales. Uno de los metales potencialmente más tóxicos que se encuentran en la naturaleza es el cadmio. En su forma biodisponible puede ser mutagénico o carcinogénico, afectando el crecimiento, la tasa de respiración, la actividad enzimática y la contracción muscular de los organismos (Eisler, 1985).

Los moluscos han sido ampliamente utilizados en estudios de monitoreo de la contaminación, debido a su naturaleza filtradora, su posición sésil en el ambiente y la organización de sus tejidos (Salazar y Salazar, 1991). En la evaluación de los efectos de los contaminantes se ha propuesto el uso de la histología, la cual constituye una herramienta de evaluación independientemente de la fuente de estrés. El empleo de este biomarcador permite reconocer los cambios histopatológicos tempranos que pueden detectarse antes de que se produzcan efectos irreversibles a niveles de organización más elevados (Guzmán-García, 2007).

Además de la evaluación tisular, se pueden conocer los índices de condición, utilizados para determinar el valor nutritivo, comercial y también ecológico, de estos organismos. Los índices de condición se pueden relacionar con el estado reproductivo y los patrones morfométricos, y permiten conocer cómo responde el organismo a las variaciones del ambiente (Crosby y Gale, 1999; Arrieche *et al*, 2002).

Objetivo

Analizar el efecto del cadmio sobre el índice de condición y la estructura tisular de bivalvos expuestos a dosis subletales de Cadmio.

Reactivos

Alcohol absoluto

Alcohol al 96 %

Alcohol al 70 %

Xilol

Formol amortiguado al 10 %

Agua destilada

Agua corriente

Hematoxilina

Eosina

Material

Charola de disección

Cajas Petri de vidrio

Vasos de precipitados de 500 ml

Cassettes histológicos modelo Histossete I

Balanza analítica

Vernier

Estufa de secado

Procesador de tejidos

Centro de inclusión

Placa enfriadora

Microtomo

Termómetro

Microscopio óptico

Cuchillo de navaja corta

Guantes de carnaza

Muestras de bivalvos (Ostión o almejas comerciales)

Preparaciones permanentes de tejidos de ostión y/o almeja expuestos a cadmio.

Método

Limpieza de organismos

Cepille los organismos con solución de alcohol 70%, principalmente en el umbo de los organismos. Los organismos deberán ser limpiados de cualquier organismo asociado. Posteriormente deberá sumergir a los organismos en alcohol al 96 % por 5 minutos. Transcurrido ese tiempo, colocar en agua destilada para eliminar el exceso de alcohol.

Parámetros morfométricos e índice de condición

Tome parámetros morfométricos con ayuda del vernier. Registre el peso (g); húmedo, de las valvas y de la masa visceral. Registre sus observaciones en el formato de la siguiente tabla.

Registro de parámetros morfométricos para calcular el Índice de Condición						
clave de la muestra	Largo (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso completo (g)	Peso de la masa visceral (g)	Peso de valvas (g)

Para el cálculo del índice de condición, deberá etiquetar y pesar una caja de petri (una para las valvas y prepare otra para la masa visceral; registre el peso de las cajas). Posteriormente coloque en cada caja la masa visceral y las valvas según corresponda. Cada muestra será colocada dentro de una estufa de secado a 60 °C. Haciéndose registros del peso de cada muestra cada 24 h hasta que el peso sea constante. Cuando el peso sea constante calcular el índice de condición mediante fórmula propuesta por Devenport y Chen (1987):

$$IC = \frac{\text{Peso seco de la masa visceral (g)}}{\text{Peso seco de las conchas (g)}} \times 100$$

Obtención de secciones tisulares.

Para la apertura de las valvas, coloque la punta del cuchillo en la unión de la charnela y haga un movimiento en forma de palanca para abrir las valvas (Este paso, es necesario realizarlo con guantes de carmaza para evitar lesiones). Expuesta la masa visceral, se divide en tres secciones: anterior, media y posterior (figura 1).

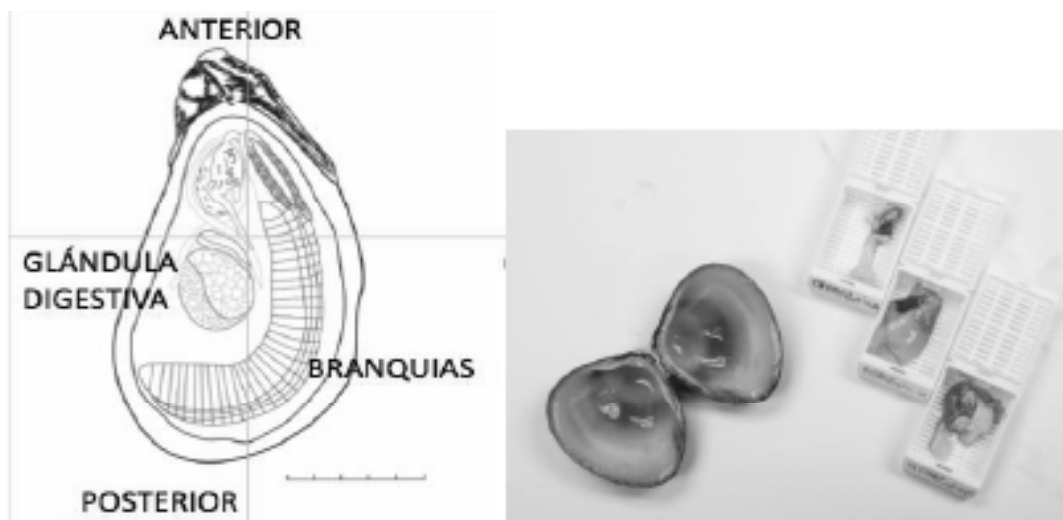


Figura 1. Masa visceral y conchas de dos especies de bivalvos. Izquierda, *Crassostrea virginica* y Derecha, *Polymesoda caroliniana*.

Análisis tisular

Las secciones tisulares, serán procesadas histológicamente de acuerdo a la metodología descrita por Guzmán-García et al., (2007). Para la revisión de los cortes tisulares, se utilizará microscopio óptico. Observe cada preparación en "Zig-zag", primero con el objetivo de 10x y posteriormente en 40x.

Reconozca la región del canal alimentario por la presencia de numerosos pliegues de absorción que conforman el esófago (Figura 2). El canal alimentario, presenta revestimiento epitelial en su parte apical (Figura 3) y numerosos túbulos conforman

la glándula digestiva (Figura 4). Las láminas branquiales están formadas por lámelas revestidas de epitelio y cilios (Figura 5). La pérdida de la estructura, es inducida por agentes como el cadmio. Las alteraciones más frecuentes reportadas son: incremento en células cafés en branquia, en el manto y en los túbulos de glándula digestiva, Inclusiones esféricas en gónada, atrofia en tejido conectivo en gónada y túbulos, pérdida de cilios en el canal alimentario (Figura 6).



Figura 2. Región del esófago, en *Crassostrea virginica* observe: 1, epitelio; 2, células epiteliales, 3, núcleos; 4, células eosinófilas y 5, células mucosas y tejido conjuntivo. 10X Tinción H-E.

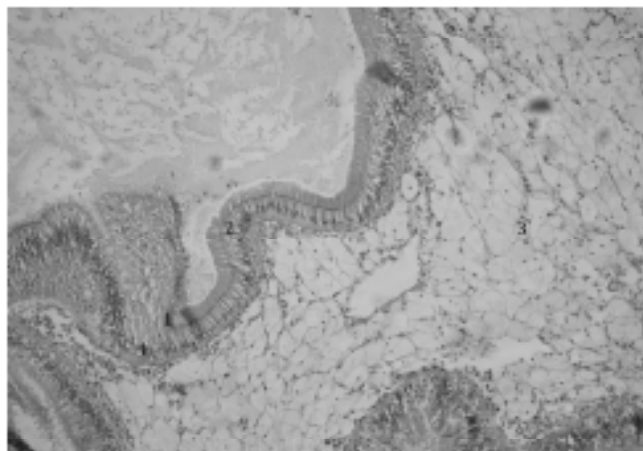


Figura 3. Porción del canal alimentario, se distingue la región del saco del estilete: 1, epitelio de transición; 2, núcleos basales; 3, tejido conjuntivo y 4, membrana basal. 40X Tinción H-E.

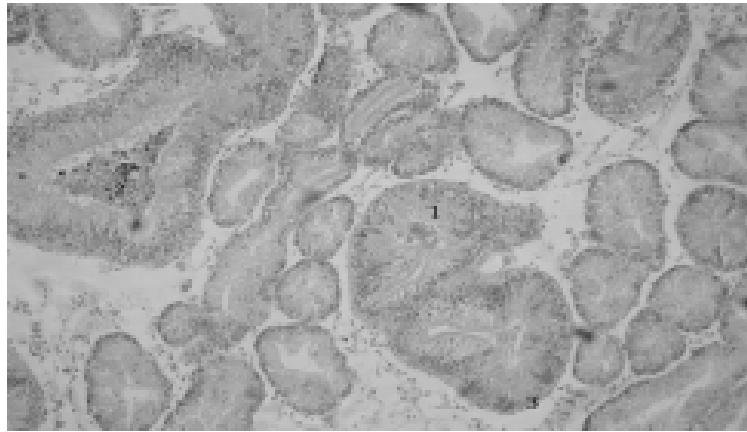


Figura 4 Apariencia de la glándula digestiva. 1, Túbulo digestivo; 2, contenido alimenticio; 3, membrana basal. 10X Tinción H-E.

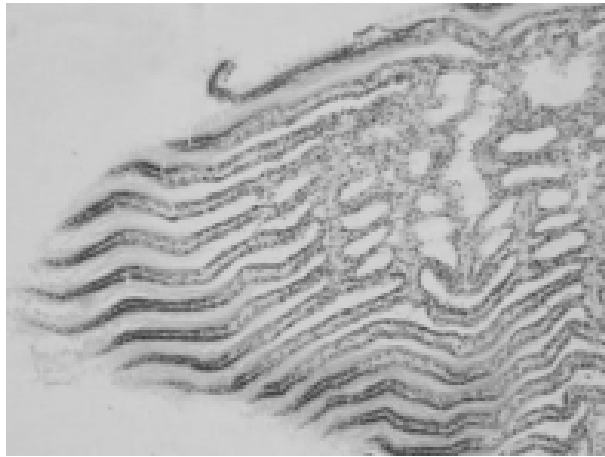


Figura 5. Aspecto de la branquia, se muestran las lámelas branquiales. Algunos cilios de la branquia pueden perderse por intoxicación de cadmio.

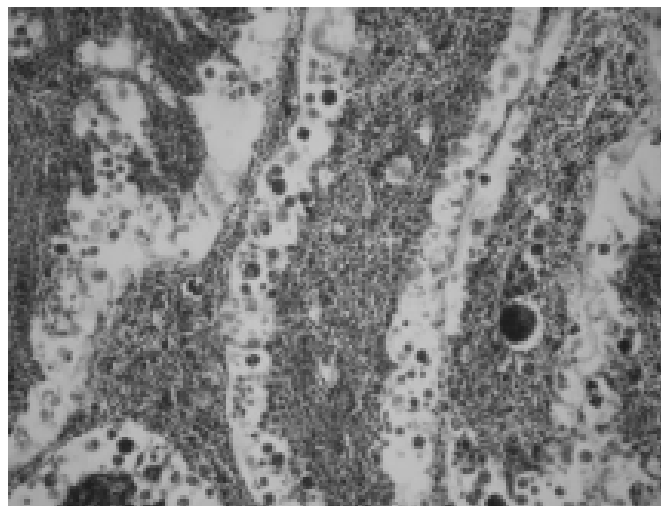


Figura 6. Cambios tisulares en la región de la branquia.

Reporte de los resultados.

Después de realizar el análisis macroscópico y calcular el índice de condición, interprete el significado de estos resultados.









Describa los órganos y tejidos observados en cada una de las secciones analizadas.

Elabore esquemas para asociar el reconocimiento tisular (tipo de órgano, tejido y células características). Anote sus observaciones y capture fotografías como evidencia.

Analice si hay cambios en la estructura tisular y realice una investigación bibliográfica sobre las alteraciones que encontró. En su discusión indique el potencial patológico de dichas respuestas (lesiones reversibles o irreversibles).

Elabore un cuadro comparativo de las observaciones hechas en la región anterior, media y posterior.

Bibliografía

-  Arrieche, D., Licet, B., García, N., Lodeiros, C. & A. Prieto. 2002. Índice de condición, gonádico y de rendimiento del mejillón marrón *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae), del Morro de Guarapo, Venezuela. *Interciencia* 27(11): 613-619.
-  Botello, A.V. 2010. Introducción. In: Botello, A.V., Villanueva, S. Gutiérrez, J. & J.L. Rojas Galviz (Eds.). *Vulnerabilidad de las zonas costeras mexicanas ante el cambio climático*. Gobierno del estado de Tabasco. SEMARNAT-INE. UNAM-ICMyL. Universidad Autónoma de Campeche, México.
-  Crosby, M.P. & L. Gale. 1990. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *Journal of Shellfish Research* 9 (11): 233-237.
-  Devenport, J. & X. Chen. 1987. A comparison of methods for the assessment of condition in the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Journal of Molluscan Studies* 53: 293-297.
-  Eisler, R. 1985. *Cadmium hazard to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review biological report*. Dep. of the interior, fish and wildlife Service, Washigton D.C.
-  Guzmán-García, X. 2007. *Empleo de biomarcadores para evaluar el proceso de daño en ostión *Crassostrea virginica* y su respuesta ambiental*. Tesis de Doctorado en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, México.
-  Salazar, M.H. & S.M, Salazar. 1991. Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Marine Environmental Research* 32: 131-150.
-  Villanueva, S.F. & A.V. Botello. 1998. Metal pollution in coastal areas of Mexico. *Reviews Environmental Contamination and Toxicology* 157: 53-94.

Identificación de vegetales modificados por ingeniería genética

Introducción

Desde la creación del jitomate Flavr Savr (el primer vegetal genéticamente modificado) en 1985, se ha desarrollado una gran cantidad de especies vegetales con genes ajenos, capaces de producir proteínas específicas de otros organismos. El objetivo principal de esta práctica es mejorar los cultivos, logrando producir plantas resistentes a plagas, a condiciones ambientales extremas, a pesticidas e incluso a infecciones bacterianas o víricas. Asimismo, se han desarrollado organismos con otras características potencialmente benéficas para el ser humano, como los plántanos enriquecidos con tiamina para reducir la incidencia de la enfermedad de Beriberi.

A pesar de que dichas modificaciones tienen objetivos favorecedores, existe la posibilidad de que los productos de los genes externos tengan efectos nocivos para quien los consume (Séralini *et al.*, 2012), sin mencionar la posibilidad de que exista dispersión en el ambiente de estos organismos por sus inherentes mecanismos de reproducción.

Objetivo

Determinar la presencia de las secuencias del promotor de la subunidad 35S del virus del mosaico de la coliflor y del terminador de la sintasa de noplina de *Agrobacterium tumefaciens* (presentes en la mayoría de los organismos modificados por ingeniería genética) en vegetales de consumo cotidiano.

Reactivos

Agua destilada

Reactivo para extracción de DNA (InstaGene Matrix, BioRad)

Polimerasa taq

Cloruro de magnesio

SYBR green

Agua libre de nucleasas

NTPs

DNA de control positivo

DNA de control negativo

Primers CaMV :

FWD- GCTCCTACAAATGCCATCA;

REV- GATAGTGGGATTGTGCGTCA

Primers NOS:

FWD- GAATCCTGTTGCCGGTCTTG;

REV-T TATCCTAGTTTGCGCGCTA

Material

Tubos de microcentrífuga de 1500 y 200ul.

Pipetas de Pasteur.

Baño de agua.

Mortero y maja.

Pipetas de 1000, 200 y 10 μ l.

Puntas para pipetas de 1000, 200 y 10 μ l.

Alimento (DNA experimental)

Balanza.

Microcentrífuga.

Termociclador de tiempo real.

Método

Extracción de DNA.

1. Seleccionar un vegetal que se consuma de manera regular o en el cual se tenga particular interés.
2. Homogeneizar 1 g de tejido vegetal en el mortero, con agua destilada (5 ml por gramo de alimento).
3. Transferir 50 μ l de la mezcla a un tubo de microcentrífuga con 500 μ l de InstaGene Matrix (BioRad).
4. Colocar el tubo en baño maría a 95°C durante cinco minutos.
5. Centrifugar a 13,000 g durante 5 minutos.
6. Aislar el sobrenadante (donde se encuentra el DNA), teniendo cuidado de no transferir nada del sedimento.
7. Determinar la pureza y la concentración de DNA mediante absorción espectrofotométrica.
8. Congelar el DNA extraído a -20°C.

PCR

1. Preparación de la reacción en cadena de la polimerasa:
 - 50 ng de DNA experimental
 - 10 nM de dNTPs
 - 2.5 U de polimerasa taq
 - 50pmoles de oligonucleótidos FWD y REV de 35SCAMV y NOS





- 5 µ de SYBR Green 1X
 - Agua libre de nucleasas
2. Colocar los tubos en el termociclador de tiempo real, ejecutando el siguiente programa. Interpretar los datos observados en el electroferograma.

Desnaturalización inicial	94°C	x	2 minutos
40 ciclos:			
desnaturalización	94°C	x	1 minuto
hibridación	54°C	x	1 minuto
extensión	72°C	x	2 minutos
Extensión final	72°C	x	10 minutos
Hold	4°C	x	∞

Cuestionario

1. ¿Cree usted que el consumo de alimentos modificados mediante ingeniería genética podría tener alguna consecuencia para la salud?
2. ¿Cuál es el organismo gubernamental encargado de regular la comercialización y la siembra de vegetales genéticamente modificados?
3. ¿Qué criterios establece dicha institución para determinar que es seguro el consumo de estos alimentos?
4. ¿Sería benéfico para las personas etiquetar todos los GMO que están a la venta?
5. ¿Qué consecuencias podría tener la reproducción sexual involuntaria entre organismos modificados por ingeniería genética y plantas silvestres en el ambiente?

Bibliografía

-  Ganapathi, T. R. & S. B. Ghag, S. B. 2017. Genetically modified bananas: To mitigate food security concerns. *Scientia Horticulturae* 214: 91–9.
-  Séralini, G. E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., Hennequin, D. & J.S. Vendomois. 2012. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup tolerant genetically modified maize. *Food and Chemical toxicology* 50:4221-4231.
-  Thomas, E. W. & J.D. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal 6-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Cell Science* 60: 181-197.
-  Waltz, E. 2014. Vitamin A Super Banana in human trials. *Nature Biotechnology* 32 (857). doi:10.1038/nbt0914-857.

Ejercicios

La bioética en la ecotoxicología

Introducción

La única manera de conocer los efectos de los contaminantes en los organismos es evaluarlos en ellos mismos, por lo que la ecotoxicología debe utilizar seres vivos, o partes de éstos, para avanzar en el conocimiento de los efectos de los contaminantes. Por lo anterior es necesario trabajar dentro del marco de la bioética la cual puede definirse como “la parte de la filosofía moral que considera la naturaleza, fines y circunstancias, y, por tanto, la licitud o ilicitud de las intervenciones sobre la vida de los organismos, particularmente aquellas conexas con el desarrollo de las ciencias médicas y biológicas”.

Objetivo

Que el alumno reflexione sobre la importancia de la bioética en los estudios ecotoxicológicos.

Desarrollo

1. Durante la primer media hora los equipos leerán uno de los siguientes artículos:
 - a) Garcés Giraldo, L. F. & C. Giraldo Zuluaga. 2012. Bioética en la experimentación científica con animales: cuestión de reglamentación o de actitud humana. *Revista Lasallista de Investigación* 9(1): 159-166.
 - b) dos Santos Silva, J., Barros dos Santos Rocha, I.K., Carvalho de Freitas, L, Jovita Pereira, N. & N. F. Carvalho Neta. 2015. Principios bioéticos aplicados a los estudios ecotoxicológicos acuáticos *Revista de Bioética* 23 (2): 416-26.
 - c) Lineamientos para la Conducción Ética de la Investigación, Docencia Y Difusión en la División de Ciencias Biológicas y de La Salud 2010 de la UAMI de la UAMI.
http://148.206.32.94/informacion/consejo_divisional/lineamientos/LINEAMIENTOSDEETICA2012.pdf
2. En la segunda media hora se llevará a cabo una discusión grupal del contenido de los artículos y de la aplicación de la bioética en las ciencias biológicas.
3. Los equipos desarrollarán un código de bioética para el trabajo en el laboratorio de ecotoxicología.
4. El reporte de este ejercicio incluirá:
 - a) Un ensayo de la importancia de la bioética en los estudios ecotoxicológicos.
 - b) El código de bioética desarrollado en clase.
 - c) Un resumen de los Lineamientos de la Comisión de Ética de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAMI.

Buenas prácticas de laboratorio

Introducción

La validez de los estudios de laboratorio depende, en gran medida, de que éstos se lleven a cabo bajo un sistema de calidad que garantice su representatividad, la posibilidad de repetirlos en otro laboratorio y de obtener resultados similares. En el caso de los estudios ecotoxicológicos esto es de suma importancia ya que pueden tener repercusiones legales.

Objetivo

Que el alumno conozca el concepto de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y los aplique en el desarrollo de las prácticas de laboratorio de Ecotoxicología.

Desarrollo

1. El profesor explicará las generalidades de las Buenas Prácticas de Laboratorio (ver notas del anexo de este ejercicio).
2. Los alumnos prepararán su bitácora personal para el laboratorio de Ecotoxicología (Portada, Índice, numeración de páginas).
3. Los alumnos diseñarán en equipo:
 - Formato de cadena de custodia
 - Formato de etiqueta de muestra de agua, sedimento, organismo
 - Formato para datos de campo
 - Formato para datos de laboratorio
4. El equipo revisará el documento: Zúñiga Estrada, A., Vega Segura, V. & A. N. Ochoa Terreros. 2016. Buenas Prácticas de Laboratorio. Base para el aseguramiento de calidad de los resultados analíticos. Revista COFEPRIS. Protección y Salud. <http://revistacofepris.salud.gob.mx/n/no7/ciencia.html> Consultado el 27 de marzo de 2017.
5. El reporte incluirá los formatos elaborados y un resumen del documento OCDE Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997).
https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_glpcm.pdf




BPL: Definición

Las buenas prácticas de Laboratorio (BPL) son una serie de principios que proveen un marco dentro del cual se:

- planean,
- llevan a cabo,
- monitorean,
- reportan y
- archivan

estudios de laboratorio.



¿Por qué usar BPL?



- A principios de los años 70s se hizo evidente que algunos laboratorios tenían prácticas de laboratorio muy pobres.
- Se descubrieron prácticas fraudulentas como:
 - Equipo mal calibrado que daba medidas erróneas.
 - Informes incorrectos/impresos de los estudios
 - Sistemas de prueba inadecuados.



Ejemplo

El laboratorio Industrial Bio Test hacía pruebas para la compañía Procter & Gamble.

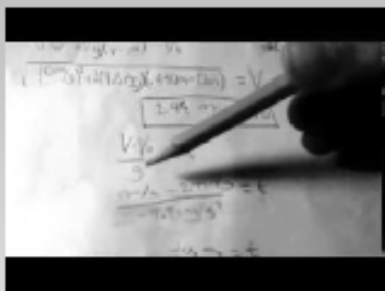
Se descubrió que los ratones que usaban para probar cosméticos, como cremas y desodorantes corporales, desarrollaban cáncer y morían.

Industrial Bio Test tiraba a la basura los ratones muertos y alteraba los resultados de las pruebas, dando como resultado que dichos productos eran seguros para el consumo humano.

Algunos de los involucrados fueron condenados a prisión.



Objetivos de las BPL



- Asegurarse que los datos reportados son un reflejo verdadero de los resultados que se obtienen en un estudio.
- Asegurar que los datos pueden seguirse hasta su origen en la documentación, pudiendo verificar su veracidad.



Misión de las BPL

- Sistemas de pruebas.
- Archivo de documentos y materiales.
- Aparatos, materiales y reactivos.
- Programas de aseguramiento de calidad.
- Desempeño del estudio.
- Reporte de los resultados del estudio.
- Procedimientos de operación estándares.
- Organización del personal y la instalación.



Procedimientos de operación estándares (POS)



- Procedimientos de laboratorio por escrito.
- Definen como se llevan a cabo las actividades específicas del protocolo.
- Con frecuencia se escriben como una lista cronológica de los pasos a seguir.
- Se escriben para explicar como es que los procedimientos deben funcionar.



POS

- Rutinas de inspección, limpieza, mantenimiento, calibración y prueba.
- Acciones que se deben tomar en respuesta a una falla de equipo.
- Métodos analíticos.
- Definición de los datos crudos.
- Instrucciones de cómo mantener los registros, reportes, almacenaje y recuperación de los datos.



Procedimientos Estadísticos de Análisis de Datos

- Los procedimientos estadísticos no se escogen simplemente de un libro de texto.
- En cada campo de conocimiento se adoptan ciertos estándares que son considerados como aceptables.
- Las agencias reguladoras con frecuencia establecen estos procedimientos.



Validación de los Aparatos/Instrumentos

- Procedimiento necesario en todo laboratorio analítico.
- Los datos producidos por equipos con fallas pueden producir datos que se consideren como válidos.
- La frecuencia de calibración, revalidación y prueba depende del instrumento y de la extensión de su uso en el laboratorio.
- Cuando el desempeño de algún aparato se encuentra fuera de los "límites control" su uso debe ser discontinuado.



Validación Instrumental

- Los records de los instrumentos deben incluir:
 - Nombre del equipo y fabricante
 - Modelo o tipo, para su identificación
 - Número de serie
 - Fecha en la que el equipo fue recibido en el laboratorio
 - Copia del manual de operación del fabricante.



Certificación de Reactivos/Materiales



- Para asegurar que los reactivos usados son los especificados en los POS.
- Tanto la compra como las pruebas deben manejarse a través de un programa de aseguramiento de calidad.



Reactivos y Soluciones

- Deben estar etiquetados.
- Los caducos o deteriorados no deben ser usados.
- Incluir la fecha de primer uso.
- Se deben almacenar de acuerdo a los POS (temperatura ambiente, refrigeración, congelación).
- Anotar fecha de caducidad.



Seguimiento de las muestras

- Para conocer quienes han estado involucrados en la toma, transporte, recepción y análisis de las muestras (Cadena de Custodia).
- Para tener un registro de las etiquetas y la información que corresponde a cada muestra.
- Para mantener la conexión inequívoca entre un grupo de datos analíticos y las muestras de las que fueron obtenidos.



Documentación y Mantenimiento de Records.



- El mantener todos los records permite tener la documentación que puede ser solicitada en caso de un procedimiento legal por las consecuencias de los resultados del estudio.
- En general se deben mantener todos los records por un periodo mínimo de cinco años, pero esto puede variar.



La bitácora de laboratorio

- Uso exclusivo para el laboratorio
- Portada (datos contacto)
- Índice
- Páginas numeradas y con fecha
- Escribir con tinta
- No borrar, corregir con iniciales.
- Respaldo de todo (copia, escaneo)
- Incluir procedimiento, cambios, resultados, análisis de datos



Determinación del estrés metabólico asociado a la exposición a tóxicos a través de la relación O:N

Introducción

Las respuestas fisiológicas tales como el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada se registran dentro de ciertos intervalos cuando el organismo se encuentra en buenas condiciones, pero se modifican como resultado de la acción tóxica de xenobióticos. Estas respuestas pueden integrarse en modelos denominados integraciones simples y complejas. Entre el primer tipo, se encuentra la razón O:N, la cual proporciona información sobre el gasto energético que realiza un organismo para mantener su homeostasis.

La razón (o relación) O:N es un indicador de estrés fisiológico. Cuando el valor fluctúa entre 40 y 50, indica que existe un metabolismo equilibrado de proteínas, carbohidratos y lípidos. Si el organismo no se alimenta normalmente o no tiene alimento consume sus reservas, las cuales consisten en carbohidratos y lípidos, se generan valores de O:N superiores a 50, porque predomina el gasto en ATP en el catabolismo y hay mayor consumo de oxígeno. En el otro extremo, si el animal se encuentra en condiciones tan malas que ya no tiene material de reserva que consumir, o no puede hacerlo, empieza a consumirse a sí mismo, es decir toma sus propias proteínas. En este caso se obtienen valores de O:N menores a 3, por ejemplo. Esto implica que hay una mayor excreción nitrogenada, lo que se presenta cuando se degradan las proteínas.

Objetivo

Determinar si la exposición a tóxicos genera estrés metabólico en organismos acuáticos.

Desarrollo

Este ejercicio puede realizarse con los resultados obtenidos en la práctica "Efecto de tóxicos en la respiración y la excreción nitrogenada", y/o con las tablas 1, 2 y 3, que son resultado de un bioensayo realizado con ostión sometido a diferentes concentraciones de cromo.

Tabla 1. Consumo de oxígeno (mg/h) registrado en ostión *Crasostrea virginica* expuesto a cromo.

Organismo	Control 0 ppm	Cr1 0.5 ppm	Cr 1.5 ppm	Cr3 1.5 ppm	Cr4 2.0 ppm	Cámaras sin organismos
1	0.67	0.84	1.39	1.06	0.73	0.03
2	0.44	1.01	0.61	0.48	0.61	0.04
3	0.56	1.89	0.73	0.50	0.72	0.51
4	0.63	0.95	1.40	1.34	0.84	0.17
5	0.59	1.07	1.07	0.27	0.39	0.11
6	0.60	1.90	0.90	0.67	0.56	0.10
7	1.39	1.50	1.39	0.61	0.78	0.13
8	0.50	0.61	1.39	0.44	1.12	0.08
9	0.78	0.50	1.16	0.46	0.84	0.53
10	0.67	1.23	1.39	0.33	0.68	0.89

Tabla 2. Excreción nitrogenada (mg/h) registrada en ostión *Crasostrea virginica* expuesto a cromo.

Organismo	Control 0 ppm	Cr1 0.5 ppm	Cr2 1.5 ppm	Cr3 1.5 ppm	Cr4 .0 ppm	Cámaras sin organismos
1	0.04	0.05	0.17	0.06	0.20	0.02
2	0.03	0.05	0.25	0.12	0.08	0.00
3	0.02	0.05	0.12	0.22	0.07	0.01
4	0.02	0.13	0.15	0.06	0.05	0.05
5	0.05	0.07	0.10	0.17	0.29	0.01
6	0.05	0.20	0.11	0.04	0.10	0.04
7	0.06	0.05	0.16	0.18	0.15	0.04
8	0.05	0.13	0.12	0.22	0.35	0.04
9	0.03	0.07	0.16	0.06	0.20	0.03
10	0.02	0.20	0.16	0.17	0.08	0.02

Tabla 3. Pesos secos (g) de los organismos sometidos al ensayo.

Organismo	Control 0 ppm	Cr1 0.5 ppm	Cr2 1.5 ppm	Cr3 1.5 ppm	Cr4 2.0 ppm
1	0.695	1.645	1.297	0.932	1.092
2	1.412	1.050	0.575	1.845	1.571
3	1.549	0.962	1.304	2.516	1.731
4	1.689	1.033	0.616	0.552	1.275
5	1.047	0.939	0.826	1.531	1.506
6	2.169	0.723	1.069	1.229	1.375
7	0.538	0.643	0.735	1.356	1.476
8	1.433	1.317	0.720	1.766	1.383
9	1.682	0.956	0.976	0.744	1.046
10	1.732	0.596	1.113	0.852	0.537

La razón O:N se obtendrá a partir de los resultados del consumo de oxígeno (mg/h*gpS) y la excreción nitrogenada (mg/h*gpS).

1. El valor del oxígeno consumido, deberá transformarse a peso átomo gramo.

$$O = \text{Oxígeno (mg/h*gpS)} / \text{peso atómico del oxígeno; oxígeno (mg/h*gpS)/16}$$

2. El valor del nitrógeno producido deberá ser igualmente transformado considerando el peso atómico del N, que es 14.

Sin embargo, en este caso es necesario considerar que la excreción nitrogenada se calculó como nitrógeno amoniacal N-NH_3 utilizando el sistema HACH. En este caso el amoniaco producido por excreción nitrogenada es sólo una proporción de la molécula, NH_3 cuyo peso es 17. El peso del nitrógeno por tanto solo representa el 82.35% del peso de la molécula, así:

$$\text{N} = \text{Peso átomo gramo del N} = \text{NH}_3 \text{ (mg/h*gpS)} * (0.8235)/14$$

3. Se calculará la relación átomo-átomo de oxígeno y nitrógeno:


$$\text{O:N} = \text{O/N} \quad \text{El resultado es absoluto y no tiene unidades.}$$

Los resultados de cada lote experimental serán comparados por ANOVA o Kruskal-Wallis para determinar si hay diferencias significativas entre controles y expuestos. Además el valor se interpretará conforme el valor absoluto obtenido para cada organismo, el cual indicará si se encuentra en estrés metabólico como consecuencia de la exposición al tóxico y que tipo de estrés es este. Se tomarán en cuenta las siguientes preguntas para esta interpretación:

¿Por qué se asocia un alto consumo de oxígeno con el consumo de carbohidratos?

¿Por qué se relaciona la excreción nitrogenada con la degradación de proteínas?

Bibliografía

-  Mayzaud, P. & R.J. Connover. 1988. O:N atomic ratio as a tool to describe zooplakton metabolism. *Marine Ecology (progress series)* 45: 289-302.

Evaluación de riesgo ecológico

Introducción

La evaluación del riesgo ecológico (ERE) es la determinación de la probabilidad de que las actividades humanas provoquen efectos indeseables en los animales, las plantas y el ambiente. Asimismo, es una herramienta para la toma de decisiones en el manejo del medio ambiente (Ramírez-Romero y Mendoza-Cantú, 2008).

Objetivo

Llevar a cabo la evaluación del riesgo ecológico de un escenario ambiental a través del uso de información bibliográfica.

Desarrollo

El profesor asignará a cada equipo un caso de contaminación para que el equipo busque información que le permita llevar a cabo los cuatro pasos de la evaluación de riesgo ecológico:

1. Identificación del riesgo
2. Evaluación de la relación dosis-efecto
3. Evaluación de la exposición
4. Caracterización de los riesgos con la fórmula:

$$\text{Cociente de riesgo} = \frac{\text{Concentración en el ambiente}}{\text{Concentración que produce efectos inaceptables}}$$

Algunos de los posibles escenarios:

1. Derrame de petróleo frente a las costas de Campeche.
2. Disposición de sedimentos contaminados con metales (Cd, Pb y Hg) a orillas de la laguna de Coyuca, Gro.
3. Aplicación de plaguicidas (atrazina, clorpirifos y DDT) para control de plagas en cultivos de jitomate en el Valle del Yaqui, Son.
4. Disposición inadecuada de tres toneladas de semillas tratadas con paratión en una barranca que alimenta el río Suchiate.
5. Explosión de una fábrica de transformadores eléctricos en Coatzacoalcos, Ver.



El equipo deberá recabar información sobre el escenario seleccionado que incluya: antecedentes sobre este tipo de evento, información disponible sobre la toxicidad de los contaminantes que se generan en este escenario en diferentes especies, niveles previamente registrados de los contaminantes relevantes para el evento en la zona.

El equipo deberá responder las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es el riesgo?
2. ¿Están realmente expuestos los organismos al peligro?
3. En tal caso, ¿por cuánto tiempo y cuánto tiempo tomará determinar la cantidad de la exposición?

4. ¿Existe evidencia de que ha ocurrido o de que está ocurriendo una exposición?
5. ¿Hay antecedentes de casos similares?
6. En virtud de la información recabada, ¿existe un riesgo de que se presenten efectos perjudiciales en la salud de los organismos a raíz de la exposición?

Bibliografía

-  NOAA. 1999. *Screening Quick Reference Table*. NOAA HAZMAT Report 99-1, Seattle WA, Coastal Protection and Restoration Division, National Ocean and Atmospheric.
-  Ramírez-Romero, P. & A. Mendoza-Cantú. 2008. Fundamentos de la Evaluación de Riesgo Ecológico. *In*: Evans, J. & L. Roja (Eds.). *Introducción al Análisis de Riesgos Ambientales*. SEMARNAT-INE. México.

Cuestionarios de videos y artículos

Carcinogénesis por consumo de OGM

Leer el artículo:

Séralini, G-E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., Hennequin, D. & J. S. De Vendômois. 2012. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food and Chemical Toxicology* 50 (11): 4221-4231.

Contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es la justificación para llevar a cabo este estudio?
2. Describa el diseño experimental con una tabla.
3. Resuma los principales resultados de este trabajo.
4. ¿Cuáles fueron las diferencias en los efectos entre hembras y machos?
5. Resuma las conclusiones.
6. De su opinión con respecto a las implicaciones que tiene este trabajo para la salud humana.
7. Investigue las razones por las cuales este trabajo fue retirado de la revista que lo publicó.
8. ¿Cuál es su opinión con respecto a la validez de este estudio después de haber leído las críticas?

Inmunotoxicidad en organismos acuáticos

Leer uno de los siguientes artículos:

De Swart, R., Ross, P., Timmermant, H., Vos, H., Reijnders, P., Vost, J. & A. Osterhaus. 1995. Impaired cellular immune response in harbour seals (*Phoca vitulina*) feeding on environmentally contaminated herring. *Clinical Experimental Immunology* 101(3): 480-486.

Schwacke, L., Zolman, E., Balmer, B., De Guise, S., George, R., Hogue, J., Hohn, A., Kucklick, J., Lamb, S., Levin, M., Litz, J., McFee, W., Place, N., Townsend, F., Wells, R. & T. Rowles. 2012. Anaemia, hypothyroidism and immune suppression associated with polychlorinated biphenyl exposure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Proceeding Reserach in Social Biology* doi:10.1098/rspb.2011.0665. <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/early/2011/05/23/rspb.2011.0665>. Consultado el 13 de febrero de 2017.

Contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es la justificación para llevar a cabo esta investigación?
2. ¿Por qué se seleccionó a estos organismos?
3. Describa el diseño del estudio con una tabla.
4. ¿Qué biomarcadores se utilizaron para evaluar la inmunotoxicidad?
5. Resuma los principales resultados de este trabajo.
6. Resuma las conclusiones.
7. ¿Estos resultados se pueden extrapolar al ser humano y cuáles son las implicaciones de esto?

Efectos neurotóxicos del mercurio

Ver los videos de las siguientes ligas y responder las preguntas:

Video 1. Mercurio neurotóxico: Síndrome de Minamata (1952)

http://www.dailymotion.com/video/x1jhlwi_mercurio-neurotoxico-sindrome-de-minamata-1952_school

Video 2. How Mercury Causes Brain Neuron Damage.

<https://www.youtube.com/watch?v=XU8nSn5Ezd8>

1. ¿En qué animales comenzaron a verse síntomas de toxicidad en Minamata y cuáles eran estos?
2. ¿Cuáles fueron los síntomas observados posteriormente en las personas?
3. ¿Cuál era la actividad económica de las familias más afectadas?
4. ¿Qué fabricaba la empresa Chisso y cómo manejaba su agua residual?
5. Describa los experimentos que se llevaron a cabo para investigar el origen de la enfermedad.
6. ¿Qué medidas tomó la empresa ante las protestas de los pescadores?
7. ¿Cuándo se detuvieron los vertidos de mercurio al medio ambiente?
8. ¿Fue posible obtener justicia para las personas afectadas en Minamata?
9. Describa con sus propias palabras como afecta el mercurio a las neuronas.
10. ¿Por qué es posible extrapolar los resultados de experimentos con neuronas de caracol a efectos en neuronas humanas?

Excreción de contaminantes a través de la leche

Leer uno de los siguientes artículos:

Nickerson, K. 2006. Environmental Contaminants in Breast Milk. *The Journal of Midwifery & Women's Health* 51(1): 26 – 34.

Waliszewski, S. M., Pardo Sedas, V. T., Chantiri, J. N., Infanzon, P.R.M. & R.J. Rivera. 1996. Organochlorine Pesticide Residues in Human Breast Milk from Tropical Areas in Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57(1): 22 – 28.

Contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es la justificación para llevar a cabo esta investigación?
2. ¿Qué contaminantes fueron encontrados en la leche humana?
3. ¿Cuáles son los posibles efectos de las sustancias detectadas?
4. ¿Existe alguna legislación que proteja a los infantes?
5. Resuma los principales resultados de este trabajo.
6. Resuma las conclusiones.
7. ¿Cuál es su opinión respecto a la situación que muestra este estudio?

Disrupcion endócrina

Leer uno de los siguientes artículos:

Guillette, Jr. L.J., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F. & A. R. Woodwardff. 1994. Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenile Alligators from Contaminated and Control Lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives* 102(8): 680-688.

Hayes, T.B., Khourya, V., Narayana, A., Nazira, M., Parka, A., Browna, T., Adamea, L., Chana, E., Buchholzb, D., Stuevea, T. & S. Gallipeaua. 2010. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(10): 4612 - 4617.

Contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Cuáles son los antecedentes que justificaron el llevar a cabo esta investigación?
2. ¿Qué contaminantes están implicados?
3. ¿Cuáles son los efectos observados en los caimanes de Florida?
4. ¿Qué biomarcadores se utilizaron para evaluar los efectos?
5. Resuma los principales resultados de este trabajo.
6. Resuma las conclusiones.
7. ¿Estos resultados se pueden extrapolar al ser humano y cuáles son las implicaciones de esto?

Efectos teratogénicos

Leer uno de los siguientes artículos:

Teha, S.J., Dengb, X., Teha, F., & S.O. Hungb. 2002. Selenium-induced teratogenicity in Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). *Marine Environmental Research* 54: 605–608.

Hoffman, D.J. 1979. Embryotoxic and teratogenic effects of crude oil on Mallard embryos on day one of development. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 22: 632 – 637.

Contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Cuáles son los antecedentes que justificaron el llevar a cabo esta investigación?
2. ¿Qué contaminante(s) está(n) implicado(s)?
3. Describa el diseño del estudio con una tabla.
4. Cuáles son los efectos teratogénicos observados.
5. ¿Qué biomarcadores se utilizaron para evaluar los efectos?
6. Resuma los principales resultados de este trabajo.
7. Resuma las conclusiones.
8. ¿Estos resultados se pueden extrapolar al ser humano y cuáles son las implicaciones de esto?

El bebe intoxicado

Ver el video de la plática TED:

Tyrone Hayes and Penelope Jagessar Chaffer: The toxic baby.

en la siguiente liga donde además puedes poner subtítulos en español:

http://www.ted.com/talks/tyrone_hayes_penelope_jagessar_chaffer_the_toxic_baby#t-950687

Elaborar una presentación en Prezi en la que explique los efectos de los contaminantes de los que se habla en la plática.

Si no tiene Prezi, lo puede bajar de la siguiente liga:

https://prezi.com/software-de-presentacion/?gclid=Cj0KEQjwzd3GBRDks7SYuNHj3JEBEiQAlm6ElwLPYKwSmxRJLaF_pIzP-eINwGRpRkpCZniGUPVKVTMaAgzP8P8HAQ&c3api=7659%2C175858922853%2Cprezi%2Cb

Los puntos que debe tocar su presentación son (pero no están limitados a):

1. Lista de contaminantes
2. Rutas de exposición
3. Efectos en la fauna silvestre
4. Efectos en los seres humanos
5. Modos de acción
6. ¿Qué podemos hacer para evitar la exposición ambiental y humana?

Deshidratación e inclusión de la muestra

Ver el video “deshidratacion e inclusión de la muestra©” y consulte el manual MPOE para el análisis histológico e histopatológico para contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es la finalidad de la fijación y mencione un ejemplo de las soluciones que se pueden ocupar?
2. ¿Cuáles son los procesos que ocurren en el procesador automático de tejidos?
3. ¿Por qué es necesario que la muestra a procesar pase por una serie de alcoholes graduales y cuál es el orden de estos?
4. Describa brevemente el proceso de inclusión.

Guzmán-García, X., Hernández-Calderas, I., Luis-Hernández, D., Jerónimo-Juárez J. R. & M. Luis-Hernández. 2016. *Video Deshidratación e inclusión de la muestra. Sección Deshidratación e Inclusión*. Lab. De Ecotoxicología. UAMI, México.

Análisis tisular de organismos acuáticos y experimentales

Ver el video “análisis tisular de organismos acuáticos y experimentales” y contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Por qué los organismos acuáticos son considerados como buenos indicadores de calidad del medio acuático?
2. ¿Cuál es la finalidad de llevar una cadena de custodia?
3. ¿Cuáles son las fases de la técnica histológica?
4. ¿Cuál es el tiempo aproximado que se lleva el proceso de deshidratación de tejidos?
5. ¿Cuál es la finalidad de la tinción hematoxilina-eosina?
6. ¿Qué estructuras celulares tiñe la hematoxilina y cuales la eosina?

Guzmán-García, X., Hernández-Calderas, I., Luis-Hernández, D., Jerónimo-Juárez, J. R. & M. Luis-Hernández. 2016. *Video Análisis tisular de organismos acuáticos y experimentales. Sección Deshidratación e Inclusión*. Lab. De Ecotoxicología. UAMI, México.

Guzmán-García, X., Ramírez-Romero, P. & S. López-Vite. 2009. *Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, México.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a los siguientes colaboradores por su apoyo en diferentes partes del proceso de trabajo docente. A la **Dra. María del Carmen Guzmán Martínez** por su participación en la elaboración de los instructivos para las pruebas de fototoxicidad y eclosión de quistes de *Artemia* spp. A la **Ing. Ambiental Laura Elizalde Ramírez** por el montaje de la técnica de estabilidad lisosomal.

En relación al trabajo histológico, a la **Biol. Irma Hernández Calderas** quien estandarizó las técnicas histológicas de rutina y especiales útiles en el diagnóstico patológico, para la interpretación de resultados en organismos experimentales y provenientes de ecosistemas. Al **M. en B. José Roberto Jerónimo Juárez**, por su apoyo y compromiso en las actividades de docencia y elaboración de material histológico; así como a los **Biol. José Ángel Vázquez Castro** por el procesamiento de las muestras de almeja *Polymesoda caroliniana*, a la **Biol. Cynthia Elizabeth García González**, por la colecta y procesamiento de branquias de peces, al Hidrobiol. **Misael Hernández Díaz** y al **T.L.C. Brian Real Huescas**, por el procesamiento y estandarización de frotis sanguíneos, al **M. en B. Pedro Román Zepeda** por el procesamiento y colecta de hígado de bagre *Ariopsis felis*, a las Hidrobiól. **Kartagena María Paredes Ramos** y **Gabriela Huerta Aguirre** por el apoyo y procesamiento de tracto digestivo de peces.

Ecotoxicología
se terminó de imprimir en julio de 2018,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.