



## FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DETERMINACIÓN DEL CL50 Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA  
DEL ARSÉNICO SOBRE LOS ERITROCITOS NUCLEADOS DE LA SANGRE  
PERIFÉRICA DEL PEZ CEBRA (Danio rerio, Hamilton, 1822)

**Línea de investigación:**

**Genética, bioquímica y biotecnología**

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

**Autor:**

Céspedes Lizárraga, Ricardo Jesús

**Asesor:**

Scotto Espinoza, Carlos Jesús  
(ORCID: 0000-0003-1592-0419)

**Jurado:**

Murrugarra Bringas, Victoria Isabel

Rodrigo Rojas, Marielena

López Bulnes, Jorge Luis

**Lima - Perú**

**2022**

## Reporte de Análisis de Similitud

Archivo: 1A\_Céspedes\_Lizárraga\_Ricardo\_Jesús\_Título\_Profesional\_2022

Fecha del Análisis: 12.08.2022

Operador del Programa Informático: ALAVI MAMANI BONIFACIO

Correo del Operador del Programa Informático: balavi@unfv.edu.pe

Porcentaje: 2 %

Asesor: Mg. SCOTTO ESPINOZA, Carlos Jesús

Título: Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Enlace:

Jefe de la Oficina de Grados y Gestión del Egresado:

Sello

Firma

Mg. RODOLFO PUMACHAGUA HUERTAS



Firmado digitalmente por:  
PUMACHAGUA HUERTAS  
Rodolfo FAU 20170934289 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 10/08/2023 19:17:40-0500



Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

**VRIN** | VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

## FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DETERMINACIÓN DEL CL50 Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL  
ARSÉNICO SOBRE LOS ERITROCITOS NUCLEADOS DE LA SANGRE PERIFÉRICA DEL  
PEZ CEBRA (*Danio rerio*, Hamilton, 1822)

Línea de Investigación:  
Genética, bioquímica y biotecnología

para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Autor(a)

Céspedes Lizárraga, Ricardo Jesús

Asesor(a)

Scotto Espinoza, Carlos Jesús

(ORCID: 0000-0003-1592-0419)

Jurado

Murrugarra Bringas, Victoria Isabel

Rodrigo Rojas, Marielena

López Bulnes, Jorge Luis

Lima – Perú

2022

***Agradecimientos:***

Carlos Scotto Espinoza como mi asesor y guía en el proyecto.

Félix Javier Álvarez Álvarez con su apoyo y los docentes en general por mi formación, a los  
compañeros de aula por su apoyo como Hugo Medina Gómez entre otros.

A mi Familia en general, a mi novia Sara Catalina Pineda Heresi y a mi Padrastro Carlos

Bandini Borda por su apoyo incondicional.

## INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	7
1.1	Descripción y formulación del problema .....	9
I.2	Antecedentes.....	11
1.3	Objetivos .....	13
1.3.1	<i>Objetivo general</i> .....	13
1.3.2	<i>Objetivos específicos</i> .....	13
1.4	Justificación .....	13
1.5	Hipótesis.....	16
1.5.1	<i>Hipótesis nula</i> .....	16
1.5.2	<i>Hipótesis alternativa</i> .....	16
II.	MARCO TEÓRICO .....	17
2.1	Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	17
2.1.1	<i>Genotoxicidad</i> .....	17
2.1.2	<i>Concentración Letal Media CL<sub>50</sub></i> .....	18
2.1.3	<i>Arsénico</i> .....	18
2.1.4	<i>Pez Cebra</i> .....	20
2.1.5	<i>Ensayo cometa</i> .....	22
III.	METODO.....	28
3.1	Tipo de investigación .....	28
3.2	Ámbito temporal y espacial.....	28
3.3	Variables .....	28
3.3.1	<i>Variable independiente</i> .....	28
3.3.2	<i>Variable dependiente</i> .....	28
3.4	Población y muestra.....	28
3.5	Instrumentos .....	29
3.6	Procedimientos.....	31
3.7	Análisis de Datos.....	35
3.8	Consideraciones éticas .....	35
IV.	RESULTADOS .....	38
V.	DISCUSION DE RESULTADOS.....	53
VI.	CONCLUSIONES.....	61
VII.	RECOMENDACIONES.....	62
VIII.	REFERENCIAS.....	64
IX.	ANEXOS.....	75

## RESUMEN

En los últimos años la investigación científica se ha dotado de diversos animales modelo para entender cómo se producen diversas patologías, expresión génica, genotoxicidad entre muchas ramas de la biología, entre estos animales modelo sin duda el que más ha destacado en los últimos años por sus aplicaciones es el Pez cebra (*Danio rerio*), además diversos autores han utilizado al pez cebra como indicador de genotoxicidad siendo de mucha utilidad en el presente trabajo las alteraciones morfológicas nucleares en eritrocitos y en otros tejidos, lo cual es necesario el uso de una técnica muy sensible para detectar estas alteraciones, en este trabajo se obtuvo la  $CL_{50}$  en el pez cebra (*Danio rerio*) para el arsénico que fue 0,3 mg/L luego se usó la sangre periférica del pez cebra para poder visualizar el daño genotóxico causado por el arsénico en los eritrocitos nucleados, utilizamos el ensayo cometa la cual nos permitió detectar el daño genotóxico desde 0,3 mg/L ( $CL_{50}$ ) hasta 0,03 mg/L, siendo esta concentración la décima parte de la  $CL_{50}$  encontrando todos los tipos de cometas que representan el nivel de daño mostrando la alta sensibilidad del ensayo cometa y la gran versatilidad del pez cebra (*Danio rerio*).

**Palabras clave:** Pez cebra, genotoxicidad, ensayo cometa, ADN, Arsénico.

## ABSTRACT

In recent years, scientific research has provided itself with various model animals to understand how various pathologies, gene expression, genotoxicity are produced among many branches of biology, among these model animals, without a doubt, the one that has stood out the most in recent years for its applications is the Zebrafish (*Danio rerio*), in addition several authors have used the zebrafish as an indicator of genotoxicity, being very useful in the present work the nuclear morphological alterations in erythrocytes and in other tissues, which is necessary the use of a technique very sensitive to detect these alterations, in this work the LC<sub>50</sub> was obtained in the zebrafish (*Danio rerio*) for arsenic, which was 0.3 mg/L, then the peripheral blood of the zebrafish was used to be able to visualize the genotoxic damage caused by arsenic in nucleated erythrocytes, we used the comet assay which allowed us to detect genotoxic damage from 0.3 mg/L (LC<sub>50</sub>) to 0.03 mg/L, being this concentration one tenth of the LC<sub>50</sub> finding all types of comets representing the level of damage showing the high sensitivity of the comet assay and the great versatility of the zebrafish (*Danio rerio*).

**Keywords:** zebrafish, genotoxicity, comet assay, DNA, arsenic

## I. INTRODUCCIÓN

En los estudios relacionados en genotoxicidad se suele usar a ratas y ratones para así tener resultados más cercanos al ser humano; sin embargo, existen modelos animales que recientemente se vienen utilizando para la investigación científica como algunos invertebrados (*Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*), anfibios (*Xenopus laevis*) y peces (*Danio rerio*). Estos últimos han sido muy útiles para la investigación en diversas áreas de las ciencias biológicas desde la embriología hasta la neurociencias y biomedicina destacando el pez Cebra (*Danio rerio*).

El pez cebra (*Danio rerio*) ha sido en los últimos años muy útiles en la investigación en diversos desordenes genéticos, metabólicos y hasta en cancerogénesis, pero en genotoxicidad se ha vuelto muy útil por su gran versatilidad. Los peces son considerados como buenos bioindicadores porque dependen de varios eslabones de la cadena trófica y son capaces de acumular sustancias tóxicas y responden fácilmente a bajas concentraciones de agentes mutagénicos (Gustavino *et al.*, 2001).

Esto producen alteraciones morfológicas nucleares en eritrocitos y en otros tejidos y tipos celulares, lo cual han sido utilizadas por diversos autores como posibles indicadores de genotoxicidad (Cavas *et al.*, 2005; Da Silva Souza y Fontanetti *et al.*, 2006; Ergene *et al.*, 2007).

Un ensayo muy utilizado para detectar el daño al ADN muy sensible es el ensayo cometa, este se ha utilizado en diversos modelos animales, pero existe poca bibliografía sobre

la utilización de esta técnica en la sangre periférica en el pez cebra (*Danio rerio*), este trabajo es un importante primer paso para el empleo de esta técnica y demostrar su efectividad.

El ensayo cometa ha sido aplicado con éxito en los eritrocitos en una gran cantidad de especies de peces, mostrando la sensibilidad de las células de la sangre de estos animales a los efectos genotóxicos (Padrangi *et al.*, 1995; Gontijo *et al.*, 2003).

Por otra parte, es conocido que en los estudios de genotoxicidad in vivo se utilizan sustancias tóxicas con efectos mutagénicas, como por ejemplo cobre, cadmio, y arsénico, mercurio entre muchos otros (Cavas & Ergene-Gözükara *et al.*, 2005; Da Silva Souza & Fontanetti *et al.*, 2006; Ergene *et al.*, 2007).

En el presente estudio, el objetivo fue evaluar la actividad genotóxica del arsénico en eritrocitos de la sangre periférica utilizando como bioindicador al pez Cebra (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) a diferentes concentraciones y periodos de exposición, también hallando la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), usando la técnica ensayo cometa, se visualizó los efectos de la exposición al arsénico en diversas concentraciones y las diversas manifestaciones del efecto al ADN y todos los tipos de cometa desde el tipo 0 (sin daño) hasta la forma más severa del tipo 4 (daño severo) de esta manera la detección es relativamente rápida y precisa gracias a la gran sensibilidad de dicha técnica siendo posible visualizar los núcleos con el contenido genético dañado.

Los resultados evidenciaron la gran efectividad y la versatilidad del pez cebra para evaluar los efectos al nivel del ADN en la sangre del pez cebra.

## 1.1 Descripción y formulación del problema

El Arsénico es un agente altamente tóxico y muy involucrado en contaminación de forma natural y artificial por la actividad minera, el desarrollo de ciertos trastornos humanos a menudo requiere muchos años de exposición al arsénico. Por lo tanto, una exposición a largo plazo al arsénico es muy útil para la evaluación de enfermedades crónicas toxicidad por arsénico, así como el desarrollo de nuevas terapias y prevenciones (Hallauer *et al.*, 2016).

Los estudios de genotoxicidad en los laboratorios en el país son escasos por lo que es necesario desarrollar estudios de daño genotóxico con protocolos debidamente estandarizados utilizando un animal modelo vertebrado filogenéticamente cercano al humano, pero económicamente sostenible en el tiempo y de bajo costo como es el caso del pez Cebra, en este proyecto se pretende usar la sangre periférica ya que en los peces las células sanguíneas son nucleadas permitiendo la observación del daño genotóxico en el ADN mediante el análisis de la morfología de las células (Torres de Lemos *et al.*, 2007; Møller *et al.*, 2020).

El pez cebra, *Danio rerio*, es un pequeño pez teleosteo, perteneciente a la familia de los ciprínidos, originaria del sur de Asia. Durante los últimos años, el pez cebra ha surgido rápidamente como uno de los organismos modelo más utilizados en los campos de la genética, la biomedicina, la biología del desarrollo y probablemente el sistema in vivo más utilizado para la expresión génica y el análisis de la función genética.

Este amplio uso se justifica por las características morfofisiológicas intrínsecas de los vertebrados que hacen que el pez cebra esté más cerca de los humanos que de los invertebrados y por el hecho de que es relativamente fácil de mantener en un laboratorio (Varga *et al.*, 2018).

El ensayo cometa es una herramienta útil en la detección de daño en el ADN en las células de distintos tejidos. Por su gran flexibilidad se puede evaluar una gran cantidad de agentes que producen alteraciones en el material genético como en los enlaces entrecruzados entre las fibras de ADN o ADN – proteínas, bases oxidadas, dímeros inducidos por UV y la capacidad de reparación del material genético (Dusinská & Collins *et al.*, 1996; Møller *et al.*, 2020).

El desarrollo del ensayo con una muestra pequeña de células y la posibilidad de que sea empleado en tejidos celulares no proliferativos es una gran ventaja que lo vuelve una de las técnicas más empleados en la actualidad, incluso tanto como las técnicas de citogenética convencional para la detección de aberraciones cromosómicas y la prueba de micronúcleos (Tice *et al.*, 2000; Di Giorgio *et al.*, 2001; Yumnamcha, *et al.*, 2020).

La gran mayoría de las publicaciones están relacionadas con el efecto citotóxico, genotóxico o mutagénico de muchos agentes dependiendo de su interacción con el ADN. En el ensayo cometa se suele utilizar el Bromuro de Etidio, este componente es altamente cancerígeno, por él se utilizó para el proyecto el Nitrato de plata, siendo este último inofensivo para la salud (Tharwat *et al.*, 2012; Yumnamcha, *et al.*, 2020).

En el Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Universidad Nacional Federico Villarreal, se logró hallar la concentración letal media y se evaluó la actividad genotóxica del arsénico en eritrocitos de la sangre periférica utilizando como bioindicador al pez Cebra (*Danio rerio*).

¿Cuál es la actividad genotóxica del arsénico en los eritrocitos nucleados de la sangre periférica utilizando como bioindicador al pez Cebra (*Danio rerio*)?

## I.2 Antecedentes

Rydberg y Johanson (1978) fueron los primeros en cuantificar directamente el daño genotóxico del ADN en las células individuales mediante la lisis de células embebidas en agarosa sobre portaobjetos bajo condiciones alcalinas suaves para permitir el desenrollado parcial del ADN.

Ostling y Johanson en 1984, fueron los que desarrollaron originalmente el ensayo cometa como tal para la evaluación del daño en el ADN a nivel celular.

En el año 2007 en España se hacen estudios en el pez Cebra que se ha convertido en un excelente modelo animal para la investigación de diferentes procesos biológicos, sus cualidades genéticas y embrionarias se aprovechan para buscar nuevos medicamentos que permitan controlar enfermedades devastadoras, como el cáncer y el Parkinson (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007).

Hasta nuestros días, uno de los peces modelo más estudiados y en el cual se ha desarrollado gran parte de la investigación básica en biología y genética molecular es el pez tropical de agua dulce *Danio rerio* de la familia Cyprinidae (Detrich *et al.*, 1999; Westerfield *et al.*, 1995).

Este es uno de los modelos animales en que se avanza en las aplicaciones de los transposones como posibles vectores de transferencia de genes (Coll *et al.*, 2001; Ivics *et al.*, 1997).

El pez Cebra (*Danio rerio*), se ha convertido en los últimos años en uno de los modelos animales más populares en las diferentes áreas de investigación como la biología del desarrollo,

genética, farmacología y toxicología (Aleström *et al.*, 2006). El pez Cebra se utiliza en estudios de toxicología desde 1950 (Carvan *et al.*, 2007).

Entre sus aplicaciones en este campo destacan el análisis de los efectos de residuos tóxicos y contaminantes en el medio ambiente y la creación de bioindicadores que emiten una señal cuando detectan un compuesto tóxico (Aleström *et al.*, 2006).

En un estudio en los efectos transgeneracionales en la metilación del ADN, genotoxicidad y fenotipo reproductivo por exposición crónica al arsénico mostro evidencia reciente que sugiere una transferencia transgeneracional de fenotipos aberrantes de individuos expuestos a descendientes no expuestos relacionados con enfermedades al inicio en la edad adulta incluido el fenotipo reproductivo. El potencial transgeneracional del arsénico es bien conocido. En aquel experimento se evaluaron los efectos tóxicos del arsénico en las generaciones y combinado con estudios recientes revelan que las alteraciones en la vida temprana de un individuo pueden afectar la salud de las generaciones posteriores (Nava-Rivera *et al.*, 2021).

En otros estudios se usa el pez cebra transgénico para la cuantificación y visualización de la toxicidad tisular causada por los elementos en metales biodegradable el pez cebra es un modelo in vivo útil que permite la observación directa de defectos específicos en órganos durante el desarrollo causados por la exposición a elementos genotóxicos. (Han *et al.*, 2018).

Estos elementos genotóxicos se encuentran en concentraciones significativamente más bajas que las observadas en ensayos celulares in vitro, aunque la utilización del embrión de pez cebra es también ampliamente usado y permite una observación rápida, eficiente y precisa de la toxicidad in vivo de dichos sistemas (Han *et al.*, 2018).

La minería artesanal en algunas regiones del Perú continúa expandiéndose rápidamente, lo que genera preocupaciones sobre aumentos en la carga de ciertos genotóxicos al medio ambiente. el análisis de peces es fundamental, se correlaciona positivamente con las concentraciones de genotóxicos transformadas en los peces. Las condiciones degradadas del hábitat y los cambios proporcionales en las especies de peces y los procesos ecológicos influyen en la bioacumulación (Martínez *et al.*, 2018).

### **1.3 Objetivos**

#### ***1.3.1 Objetivo general***

Determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y evaluar la actividad genotóxica del arsénico en los eritrocitos nucleados de la sangre periférica del pez Cebra (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) como bioindicador.

#### ***1.3.2 Objetivos específicos***

- a. Determinar la CL<sub>50</sub> del arsénico sobre el pez Cebra.
- b. Determinar el daño genotóxico en el núcleo de los eritrocitos producidos por el arsénico en el pez Cebra mediante el ensayo cometa.

### **1.4 Justificación**

En la actualidad, la contaminación, especialmente en el medio acuático, por la contaminación por metales pesados se ha convertido en un gran tema de preocupación para los biólogos y ambientalistas (Velma *et al.*, 2009). La industrialización extensa y la rápida urbanización han tenido un impacto adverso apreciable en la calidad del agua de los lagos, estanques y ríos de todo el mundo (Bakshi & Panigrahi *et al.*, 2018).

El problema se ha vuelto más peligroso porque las industrias a menudo liberan al medio ambiente sus desechos que contienen contaminantes metálicos que exceden el límite permisible a pesar de los avances en el sistema de gestión de residuos ambientales, las complicaciones debidas a la descarga de metales pesados siguen planteando un inmenso impacto adverso en la vida biológica acuática especialmente los metales litofílicos están marcados como más peligrosos para el ecosistema y el grupo central de contaminantes acuáticos debido a su larga persistencia, propiedades de bioacumulación, biomagnificación y no biodegradabilidad ya que pueden destruir el marco de la diversidad de especies. Los metales pesados pueden mostrar una alta toxicidad incluso en concentraciones bajas produciendo efectos perjudiciales acumulativos en un ecosistema acuático (Bakshi & Panigrahi *et al.*, 2018).

Los genotóxicos tienen efectos directos e indirectos sobre el material genético, como por ejemplo la inducción de mutaciones que pueden desencadenar procesos de carcinogénesis en el cual mediante un estudio *in vitro* se puede observar aberraciones cromosómicas y cambios estructurales en la células lo que indica que hay daño celular y genético, también en estudios *in vivo* se pueden observar cambios morfológicos y fisiológicos en los individuos expuestos al arsénico y otros metales pesados afectando en especial al hígado y al sistema nervioso (Togar *et al.*, 2015).

Las alteraciones genéticas producidas por un determinado producto son muy relevantes en las pruebas de toxicidad génica para la identificación de cancerígenos potenciales.

El ensayo cometa es una herramienta para el daño a nivel genético de las distintas sustancias por su alta sensibilidad en concentraciones muy bajas, el empleo de animales modelo como el pez Cebra (*Danio rerio*) nos da una idea de las alteraciones que se pueden presentar y es un excelente bioindicador, en el presente proyecto el agente toxico empleado será el

Arsénico, un agente altamente tóxico y muy involucrado en contaminación de forma natural y artificial por la actividad minera (Pérez *et al.*, 2004; Kohl *et al.*, 2020).

El arsénico es un elemento químico altamente tóxico y este se puede encontrar en la naturaleza como sales. La exposición a este elemento causa diversos daños a nivel genético, produciendo distintas patologías como infertilidad, deformidades, etc.

El arsénico, si bien es un elemento ubicuo vigésimo en la corteza terrestre, décimo segundo en el agua del mar y décimo cuarto en el cuerpo humano y en similar posición en otros organismos vertebrados, el arsénico es uno de los contaminantes con más alta toxicidad que provoca diversas patologías en los organismos expuestos por lo que su estudio es muy importante no solo desde la biología ambiental sino también en medicina, genética, neurobiología y en farmacología (Cayuela Fuentes *et al.*, 2012; Nava-Rivera *et al.*, 2021).

Se han observado efectos de salud extremadamente graves en regiones donde el arsénico natural se encuentra en altas concentraciones en el agua potable. La presencia de arsénico en los suelos y las aguas subterráneas ha recibido mucha atención durante las últimas décadas debido a la posible exposición humana al arsénico a medida que se han producido cambios en el uso de la tierra en respuesta al crecimiento de la población.

En la actividad agrícola, rural y en un entorno urbano, las concentraciones ambientales naturales de fondo de arsénico en los suelos, así como las áreas donde los influjos antropogénicos han aumentado las concentraciones por encima del fondo ambiental, han planteado preocupaciones de salud pública. basado en la posible exposición humana al arsénico en el agua potable y el suelo (Missimer *et al.*, 2018)

Los estudios de genotoxicidad realizados en organismos hidrobiológicos como los peces son muy importantes, hay pocos estudios en la literatura científica en el pez Cebra (*Danio rerio*). Por ello este proyecto pretende proveer más información en este tema y de su uso en el análisis genotóxico no solamente con el Arsénico sino en otros metales pesados.

## **1.5 Hipótesis**

### **1.5.1 Hipótesis nula**

- La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del Arsénico en el pez Cebra (*Danio rerio*) fue determinada.
- La técnica ensayo cometa permite detectar el daño genotóxico por el Arsénico en el pez Cebra (*Danio rerio*).

### **1.5.2 Hipótesis alternativa**

- La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del Arsénico en el pez Cebra (*Danio rerio*) no fue determinada.
- La técnica ensayo cometa no permite detectar el daño genotóxico por el Arsénico en el pez Cebra (*Danio rerio*).

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

#### 2.1.1 Genotoxicidad

La genotoxicidad es el resultado nocivo de la interacción de agentes químicos o físicos en el ADN, y se manifiesta como alteraciones genéticas y/o cambios en el número o estructura de los cromosomas, que pueden incorporarse en generaciones celulares subsecuentes llamadas mutaciones (Clayson & Grant *et al.*, 2002).

En la genética, la genotoxicidad describe la propiedad de los agentes químicos que dañan la información genética dentro de una célula causando mutaciones, lo que puede conducir a cáncer. Mientras que la genotoxicidad se conduce a menudo con la mutagenicidad, todos los mutágenos son genotóxicos, mientras que no todas las sustancias genotóxicas son mutagénicas.

La alteración puede tener efectos directos o indirectos sobre el ADN como son la inducción de mutaciones, la activación de eventos inoportunos, y lesión directa del ADN provocando mutaciones. Los cambios hereditarios permanentes pueden afectar a cualquiera de las células somáticas del organismo o células germinales que se pasarán a las generaciones futuras.

Las células impiden la expresión de la mutación genotóxica ya sea por reparación del ADN o la apoptosis; sin embargo, el daño puede no conducir a la mutagénesis, el bioensayo consiste en exponer a los organismos de prueba a diferentes concentraciones de los compuestos problema o diluciones porcentuales de efluentes y muestras de agua problema. Se requiere la

preparación de al menos cinco concentraciones o diluciones, más una serie control. Estas soluciones se preparan después de un ensayo exploratorio para la determinación del intervalo. Para cada solución se debe contar con al menos dos replicas, cada una de las cuales constará de entre 6 y 10 individuos (Ramírez *et al.*, 2008).

### **2.1.2 Concentración Letal Media $CL_{50}$**

La Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. El valor de la  $CL_{50}$  se expresa en peso de sustancia por unidad de volumen de aire normal (Ramírez *et al.*, 2008; Scotto *et al.*, 2019; Nava-Rivera *et al.*, 2021).

### **2.1.3 Arsénico**

El arsénico (Número Atómico: 33, estado de oxidación: +5, Masa atómica (g/mol): 74,922, Símbolo químicos: As es un elemento químico altamente tóxico. La exposición a este elemento causa diversos daños a nivel genético, produciendo distintas patologías como infertilidad, deformidades, etc.

El arsénico, si bien es un elemento ubicuo –vigésimo en la corteza terrestre, décimo segundo en el agua del mar y décimo cuarto en el cuerpo humano y en similar posición en otros organismos vertebrados - es uno de los contaminantes con más alta toxicidad, (Cayuela Fuentes *et al.*, 2012).

Reconocido como cancerígeno por la OMS (Organización Mundial de la Salud) (The National Institute of Environmental Health Sciences, 2005; WHO, 2001).

El arsénico puede generar daño genotóxico, las roturas de cadenas de ADN son las lesiones más comunes después de la generación de especies reactivas oxidativas (ROS / RNS) o por inhibición del proceso de reparación del ADN. La fragmentación del ADN por arsénico ya se ha determinado en humanos y en roedores.

La fragmentación del ADN se evalúa mediante ensayo cometa en sangre periférica de peces después de la eliminación de las membranas del citoplasma con una solución de lisis y la posterior disolución de los nucleosomas y el desenrollamiento del superenrollamiento de ADN mediante un tratamiento con solución alcalina que aparecen como roturas que migran hacia el ánodo durante la electroforesis produciendo una apariencia de 'cometa', con una 'cabeza' fluorescente brillante (el núcleo / ADN no dañado) y una 'cola' que es el ADN fragmentado (Nava-Rivera *et al.*, 2021).

Si bien este elemento a bajas concentraciones puede ser producto de procesos naturales, como la meteorización de minerales o la actividad biológica o por intervención humana, como en la actividad minera y la agricultura. La toxicidad depende del estado de oxidación, la estructura química, el estado físico y la tasa de absorción en las células involucradas, ya que estas pueden sufrir distintos efectos dependiendo del grupo celular o tejido (Mandal *et al.*, 2002; Nava-Rivera *et al.*, 2021).

la exposición al arsénico en el hígado del pez cebra produce un estrés oxidativo inducido por lo que es consistente con informes de que el estrés oxidativo es un factor iniciador importante en la patogénesis de la lesión hepática inducida por arsénico (Xu *et al.*, 2013).

#### 2.1.4 Pez Cebra

El pez Cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en los últimos 30 años en uno de los modelos biológicos más importantes en la experimentación e investigación científica junto con otros modelos animales como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* o *Mus musculus* (Fan *et al.*, 2004; Crodian *et al.*, 2004).

La importancia de usar este organismo como modelo experimental en comparación con otros modelos radica en que su patrón de desarrollo es similar al de los vertebrados superiores, incluidos los mamíferos y por lo tanto el hombre (Rocha *et al.*, 2001).

También se ha demostrado la similitud entre el genoma humano y el del pez cebra, y es por esta razón que muchas de las mutaciones que se producen en el pez cebra pueden dar lugar a fenotipos similares a los que presentan muchas enfermedades humanas (Fan *et al.*, 2004; Crodian *et al.*, 2004).

Las características que han hecho del pez Cebra una herramienta de gran valor para estudiar la biología del desarrollo se utilizan ahora para el descubrimiento de nuevos medicamentos gracias a la posibilidad de realizar experimentos a gran escala (Rojas & Muñoz *et al.*, 2007).

No solo tiene importancia en el campo de la biomedicina, también es utilizado en toxicogenómica para analizar los efectos de la contaminación en el medio ambiente, convirtiendo al pez Cebra en un excelente modelo en estudios de toxicidad y para crear bioindicadores que emitan señales de alarma cuando hay un compuesto tóxico en el medio (Aleström *et al.*, 2006).

La versatilidad de las características de este organismo modelo hace que pueda ser aplicado en diversos campos de estudio (Fan *et al.*, 2004; Crodian *et al.*, 2004).

El embrión del pez Cebra no llega a medir más de 1mm, mientras que el adulto mide entre 3-4 centímetros. Los machos y las hembras son fácilmente reconocibles. Precisamente su pequeño tamaño es una de las ventajas que tiene para los laboratorios de investigación, ya que se puede tener mayor cantidad de animales en menos espacio y su mantenimiento es relativamente barato entre 100 y 1000 veces menos que el coste de mantenimiento de ratones de laboratorio (María L. Cayuela Fuentes *et al.*, 2012).

Durante décadas, se han utilizado ratones, ratas, conejos y perros para experimentos de toxicología, pero estos experimentos a menudo son costosos y requieren mucho tiempo (Rowan *et al.*, 2015).

Recientemente se está usando el pez cebra (*Danio rerio*) para la evaluación de la genotoxicidad en función de la homología entre los genomas del pez y humano gracias a las similitudes fisiológicas de los sistemas cardiovascular, nervioso y digestivo e incluso existen muchos estudios que se están llevando a cabo en los distintos tipos de cáncer (Wang *et al.*, 2013). Los embriones de pez cebra tardan menos de 1 semana para generar estas estructuras de órganos importantes y permanecer transparentes durante todo el desarrollo, lo que permite la observación en tiempo real de este proceso (Lee *et al.*, 2017).

Además, con la alta tasa de fecundidad de 200 a 300 huevos por día cada 5-7 días y el mantenimiento de los individuos adultos, el costo y el tiempo de las pruebas de toxicidad se

reduce significativamente en comparación con los que se usan cuando se utilizan otros animales (Chakraborty *et al.*, 2016).

El uso del pez cebra como modelo para evaluar la toxicidad *in vivo* de partículas como metales pesados puede acelerar el proceso de desarrollo de protocolos para los estudios en contaminación ambiental por metales pesados, eludiendo las consideraciones éticas asociadas con el uso de mamíferos como herramientas de investigación (Han *et al.*, 2018).

### **Figura 1.**

*Pez cebra (Danio rerio) macho y hembra.*



*Nota.* Pez cebra macho el cual presenta características más estilizadas y una aleta dorsal más pronunciada y la hembra la cual presenta una aleta dorsal más pequeña que la del macho y un abdomen abultado en un acuario estándar (Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, 2009).

#### **2.1.5 Ensayo cometa**

El ensayo de cometa, o electroforesis en gel de una sola célula, es un método genotoxicológico altamente sensible para evaluar el daño en el ADN de las células

individuales, lo que permite la cuantificación de las roturas del ADN. Esta técnica es el resultado de los estudios realizados por Östling y Johanson, que desarrolló la metodología de electroforesis de ADN en micro-gel, y aquellos por Singh *et al.* (1988), que mejoró la técnica.

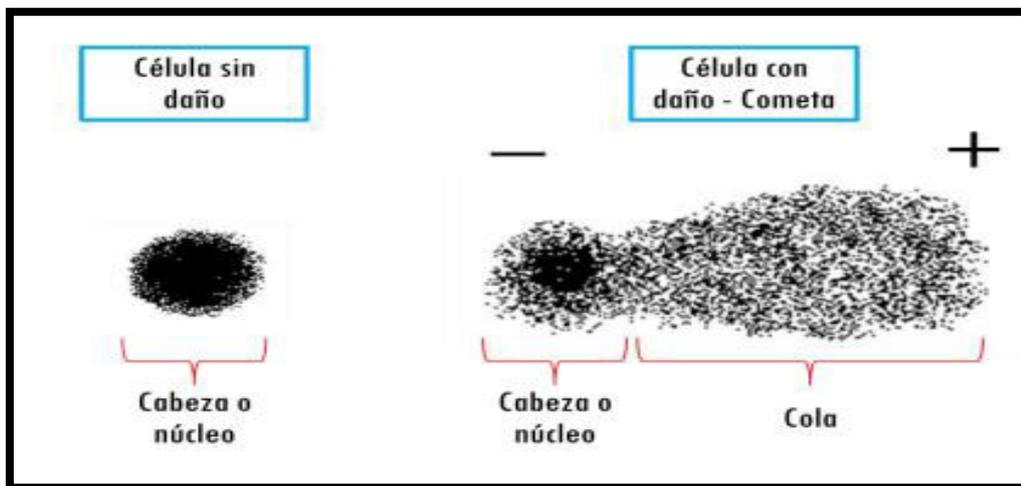
Actualmente, varios grupos de investigación internacionales han publicado recomendaciones que describen los protocolos y criterios para el ensayo cometa, cuyo objetivo es establecer altos estándares para obtener datos válidos, reproducibles y precisos (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Di Paolo *et al.*, 2006).

Se le conoce con el nombre de ensayo cometa por la forma que toma el ADN en cada célula, después de la exposición a un agente genotóxico. Los agentes genotóxicos ocasionan rupturas que originan la fragmentación del material genético, lo cual se puede observar como la cola de un cometa luego de ser sometido a una electroforesis, ante la acción de un genotóxico, se espera tener cabezas con información intacta y colas con material afectado, en el caso de células sin daño se espera obtener solo cabezas o núcleos sin colas. La cola del cometa se forma debido a que los fragmentos de ADN son menos pesados que el resto de la cadena de ADN y a consecuencia de ello, su velocidad de migración hacia el polo positivo es mayor (Bücker *et al.*, 2006; Nava-Rivera *et al.*, 2021).

En la figura 2 que aparece a continuación se muestra la imagen de una célula sin daño y una célula con daño, en donde se ilustran las partes a destacar del cometa: cabeza y cola, ambas fundamentales en la comprensión y análisis de este ensayo.

## Figura 2.

*Célula sin daño y con daño.*



*Nota.* Célula sin daño y con daño, la imagen muestra la estructura del cometa y partes de este (Luna-González *et al.*, 2018).

Existen una gran variedad de bioensayos útiles para evaluar genotoxicidad, entre ellos se encuentra el de electroforesis unicelular en gel, llamado comúnmente ensayo cometa, el cual es un método genotoxicológico sensible para la evaluación de daños en el ADN en las células individuales, lo que permite la cuantificación de las roturas del ADN y de sitios lábiles alcalinos.

En comparación con otras pruebas de genotoxicidad, las ventajas del ensayo de cometa son la detección de ligero daño en el ADN debido a la alta sensibilidad de esta técnica, el bajo número de células requerido, de bajo costo, precisión, facilidad de aplicación, reproducibilidad, y corto período de tiempo para llevar a cabo el experimento (Tice *et al.*, 2000; Møller *et al.*, 2020). Después de la neutralización, las células se tiñan con naranja de acridina y el grado de daño en el ADN se cuantificaba midiendo la proporción de verde (indicando ADN de doble

hebra) a rojo (indicando ADN de una sola hebra) de fluorescencia utilizando un fotómetro. Para mejorar la sensibilidad para la detección de daño en el ADN en las células aisladas, el mismo laboratorio (Ostling, O., and Johanson, K. J., 1984) desarrolló una técnica de electroforesis en microgel.

En esta técnica, las células estaban incrustadas en gel de agarosa en portaobjetos, se lisaron por los detergentes y la alta concentración de sal, y luego a electroforesis durante un corto período de tiempo en condiciones neutras.

La célula con aumento de la pantalla de daño en el ADN aumentó la migración de ADN desde el núcleo hacia el ánodo (Nava-Rivera *et al.*, 2021).

El ADN migración se cuantificó por tinción con bromuro de Etidio y por la medición de la intensidad de fluorescencia a dos posiciones fijas dentro del patrón de migración con un fotómetro microscopio (Tice *et al.*, 2000; Bücker *et al.*, 2006).

Actualmente, varios grupos de investigación internacionales han publicado recomendaciones que describen los protocolos y criterios para el ensayo cometa, cuyo objetivo es establecer altos estándares para obtener datos válidos, reproducibles y precisos (Brendler & Schwaab *et al.*, 2005; Di Paolo *et al.*, 2006; Nava-Rivera *et al.*, 2021).

El fundamento de este ensayo para detectar daños al ADN producido por un rompimiento simple o doble en la cadena, daño oxidativo inducido y entrecruzamiento de ADN-ADN/ADN-proteína, se basa en la fragilidad que poseen los sitios dañados; al ser sometidos a un pH superior a trece y su comportamiento en una electroforesis.

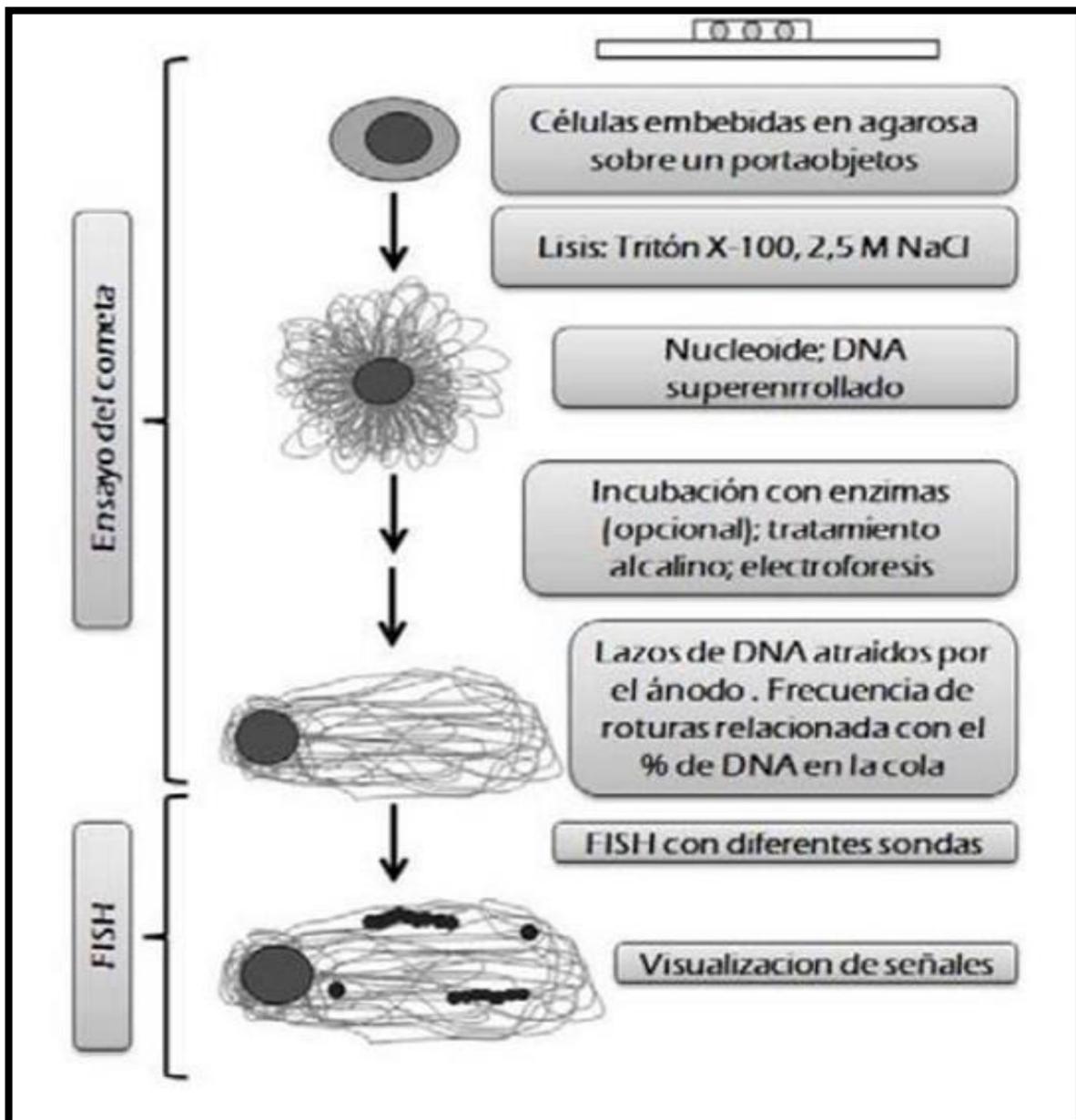
Los fragmentos de ADN, producto de la acción de la sustancia a probar, afectados por el pH alcalino, migran a una velocidad diferente del resto del material nuclear formando la cola del “cometa”, entre más larga sea esta porción mayor será el daño ocasionado al ADN (Brendler & Schwaab *et al.*, 2005; Di Paolo *et al.*, 2006; Nava-Rivera *et al.*, 2021).

El ensayo cometa se realiza mediante una serie de pasos que corresponden a:

- (1) El preparado de láminas, en las que las células a evaluar son embebidas en agarosa y colocadas sobre portaobjetos.
- (2) La lisis celular por acción de altas concentraciones de sales y detergentes con los que se degradan las membranas, los residuos de RNA y otras proteínas.
- (3) La denaturación del ADN.
- (4) La electroforesis, que permite la migración del material genético dañado hacia el ánodo.
- (5) La neutralización, en la que se eliminan restos de sales presentes en los geles y se renaturalizan las cadenas de ADN en la cabeza del cometa.
- (6) La tinción.
- (7) El análisis (Mudry & Carballo *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2009; Zúñiga *et al.*, 2009).

Figura 3.

Esquema de la formación del cometa propuesto por Shaposhnikov et al. 2009.



### III. METODO

#### 3.1 Tipo de investigación

El presente Proyecto es de tipo analítico, experimental con ensayos y se desarrolló en el Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la UNFV.

#### 3.2 Ámbito temporal y espacial

El presente trabajo se realizó entre julio del 2016 hasta noviembre del 2017 en el laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

#### 3.3 Variables

##### 3.3.1 Variable independiente

- a) Concentración de Arsénico
- b) Tiempo de exposición al Arsénico

##### 3.3.2 Variable dependiente

Daño genotóxico en el núcleo de los eritrocitos de la sangre del pez Cebra (*Danio rerio*).

#### 3.4 Población y muestra

Se compraron 300 especímenes de Pez Cebra (*Danio rerio*) adultos de ambos sexos de diversos acuarios del Jr. Ayacucho y se aclimataron a las instalaciones en condiciones

controladas del Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

Los animales fueron instalados en peceras adaptadas con las condiciones apropiadas y controladas (temperatura de 25-28 °C y pH 7) para el desarrollo normal de los individuos.

La investigación, así como el empleo de los equipos y materiales utilizados se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, ubicado en Calle Río Chepén s/n Cuadra, El Agustino, Lima, Perú.

### **3.5 Instrumentos**

#### **Reactivos**

- Agarosa bajo punto de fusión
- Agarosa normal punto de fusión
- NaCl
- NaOH
- Tris
- Tritón X-100
- Nitrato de plata
- EDTA
- DMSO
- Formaldehído 37%
- Arseniato de Sodio
- PBS 1X (madre PBS 10X)
- Bencina

**Equipos**

- Balanza analítica
- Cámara electroforético
- Microscopio

**Otros materiales**

- Agua Mili Q
- Láminas portaobjeto
- 40 litros de agua de mesa
- Probetas 50 mL, 100 mL y 250 mL
- Matraces 50 mL
- Baquetas
- 40 Recipientes Plásticos de 1L
- Espátulas
- Fiolas 250 mL
- Erlenmeyer 250 mL
- Beakers
- Cubreobjetos
- Agua destilada
- Estuche de disección

**Material Biológico**

300 Peces Cebra adultos

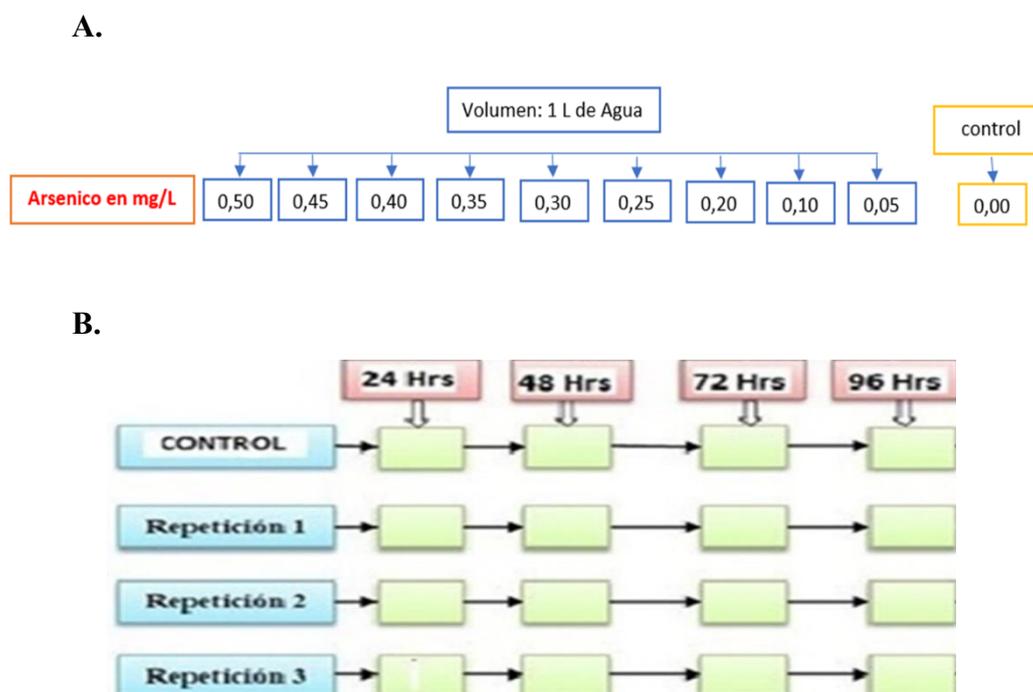
### 3.6 Procedimientos

#### Obtención de concentración letal media ( $CL_{50}$ ):

Se observará la supervivencia de un grupo de 6 peces en tres repeticiones y las de un grupo control del mismo número durante 96 horas usando las siguientes concentraciones como se muestra en la figura 4 (Barch *et al.*, 1997; Ramírez *et al.*, 2008; Scotto *et al.*, 2019; Nava-Rivera *et al.*, 2021).

**Figura 4.**

Esquema propuesto para determinar la  $CL_{50}$ .



Nota. A. Ensayo preliminar para determinar el posible  $CL_{50}$  del arsénico en el pez cebra (*Danio rerio*) hasta las 96 horas de exposición. B. Ensayo mostrando las respectivas repeticiones por cada concentración para determinar el  $CL_{50}$  del arsénico realizado a las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición (Scotto *et al.*, 2019).

Durante el proceso se debe:

1. Aclimatar a los peces unas dos semanas antes del inicio de la prueba.
2. Dividir aleatoriamente los peces en grupos de seis individuos por cada concentración, además de un control negativo.
3. Adicionar las soluciones de prueba en recipientes plásticos y registrar la mortalidad a las 96 horas.
4. Ingresar los datos a un programa estadístico Probit (Statgraphics Technologies, Inc., 2016) para obtener la estimación de la  $CL_{50}$ .

Luego de hallar la  $CL_{50}$  con los límites de confianza al 95% se usarán concentraciones por debajo de la  $CL_{50}$  y luego se fracciona al 1/2, 1/5, 1/10 con tres repeticiones más su control como en la figura 4 B (Barch *et al.*, 1997; Ramírez *et al.*, 2008; Scotto *et al.*, 2019; Nava-Rivera *et al.*, 2021).

#### **Procedimiento en ensayo cometa:**

1. Previamente se limpian las láminas en bencina para retirar la capa de grasa que contiene, luego se debe secar con papel tisú.
2. En un portaobjetos limpio formar una capa delgada de agarosa de normal punto de fusión al 1.5% (Christofolletti *et al.*, 2009). En un beaker colocar la agarosa líquida y sumergir el portaobjetos unas 25 – 30 veces dejando un espacio de 30 segundos en cada una. Dejar secar a temperatura ambiente por 1 ½ - 2 h.

3. En portaobjetos aplicar sobre la primera capa la mezcla de 5  $\mu$ L de sangre periférica de *D. rerio*. con 85  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (Christofolletti *et al.*, 2009). Colocar un cubreobjetos sobre ella y llevar a 4 °C por 10 min.

4. Retirar del portaobjetos la laminilla cubreobjetos y agregar 85  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión 0.5% (Christofolletti *et al.*, 2009), colocar una laminilla cubreobjetos y llevar a 4 °C por 10 min.

5. Colocar las láminas en una solución de lisis (volumen suficiente como para cubrirlas) constituida por 2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris pH10, 20 ml DMSO y 1 ml Tritón X-100. Por 1h y media a 4°C en oscuridad. Al cabo del tiempo sacar las láminas y lavar con solución de electroforesis; Dejar secar.

6. Colocar las láminas en una placa Petri con solución de denaturación (volumen suficiente como para cubrirlas) compuesta por NaOH 300mM y EDTA 1mM, pH 12, durante 20 min en oscuridad y a 4°C.

7. Colocar las láminas en la cámara electroforética oscura con solución de electroforesis (NaOH 300mM y EDTA 1mM) por 20 min, 21 V. y 270 mA.

8. Las láminas deben pasar por tres baños de 5 minutos cada uno con 3 ml de solución de neutralización: 0.4M Tris-HCl, pH 7.5; Dejar secar la lámina.

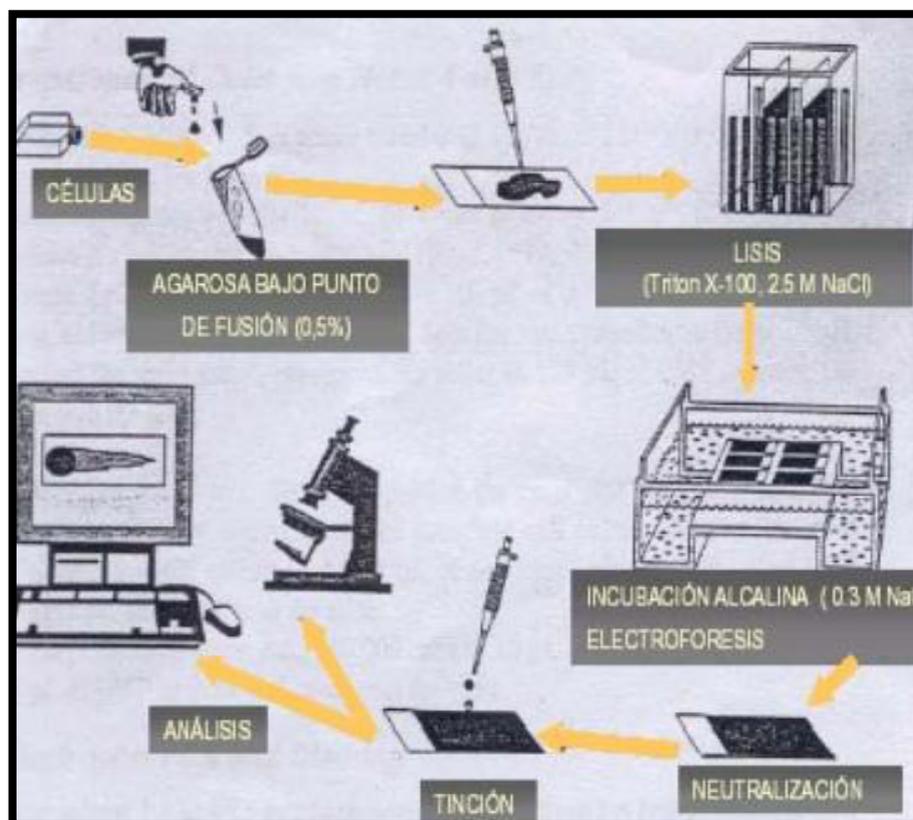
9. Se sumergen las láminas en etanol absoluto por 10 min para fijar. Luego se deja secar.

10. Utilizar una solución de 0.25 % de Nitrato de plata, 40  $\mu$ L/100 mL de formaldehído 37% y agua destilada. Las láminas fueron cubiertas de la solución por 15 min o hasta observar un oscurecimiento de la lámina, luego enjuagarlas con agua destilada y dejar secar.

11. Al observar en el microscopio las células tienen apariencia de cometas con una cabeza en la región nuclear y una cola que contiene los fragmentos o roturas que migran en dirección del ánodo en las láminas, estas deberán ser observadas a aumento de 400x.

### Figura 5.

*Esquema del procedimiento del ensayo cometa.*



*Nota.* El esquema muestra de forma general el procedimiento en el laboratorio del ensayo cometa con sus principales partes (XVI congreso argentino de toxicología, 2009).

### **3.7 Análisis de Datos**

Se trabajó con una serie de soluciones de arsénico a distintas concentraciones (ver figura 4) con 6 individuos con tres repeticiones, luego de 96 horas se determinará la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) mediante el programa Probit (Statgraphics Technologies, Inc., 2016).

El fraccionamiento de la Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) para la solución con arsénico, se trabajará con el entero de la  $CL_{50}$  encontrada y se fracciona la misma en la mitad ( $1/2$ ), un quinto ( $1/5$ ) y un décimo ( $1/10$ ) en tres repeticiones más su control respectivamente. Se realiza el ensayo de exposición para encontrar el daño genotóxico en el núcleo de los eritrocitos del pez Cebra.

Se colectará la data en base a las cometas observadas en cada concentración, para la cual, se sacrificará un pez por cada repetición, la búsqueda de cometas se realizará mediante el microscopio óptico en un aumento total de 400X.

Se evaluarán alrededor de 100 cometas por cada concentración en mg/L. Determinándose las frecuencias de los tipos de cometas encontrados mediante tablas del programa estadístico EXCEL (2017).

### **3.8 Consideraciones éticas**

El manejo de los animales de laboratorio se realizó teniendo en cuenta los siguientes principios básicos: evitar el sufrimiento innecesario de los animales, evitar riesgos del

manipulador y fomentar la aplicación de la regla de las 3R (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) (OIE, 2011).

Los experimentos se realizaron de acuerdo con todos los protocolos de bioseguridad en el laboratorio de Genética y Reproducción animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad Nacional Federico Villareal dado por la ASOPEBAID (Asociación para el empleo y bienestar animal en la investigación y docencia del Perú, <https://asopebaid.org.pe/>):

(a) se seleccionaron a los peces con características similares, (b) se utilizó el mismo número de machos y hembras, y (c) se aseguró el mínimo número de peces por tratamiento, teniendo conocimiento previo sobre los rangos de las variables a estudiar en la especie. Las condiciones ambientales fueron controladas, la dieta y el agua fueron estandarizadas en su calidad y composición durante todo el periodo de estudio.

Se tomó en cuenta los pasos y formulación del proyecto en un país donde si está debidamente normado y es requerido un permiso: En la Unión Europea - Italia, el organismo que se ocupa de la gestión de todas las actividades experimentales de Universidades y la protección del bienestar animal es el Organismo encargado de Bienestar Animal [OPBA] (Beaus *et al.*, 2009), este se rige por el Decreto Ley 25 de 2014, Art. 31 “Autorización de proyectos”: Los proyectos de investigación que impliquen el uso de animales de acuerdo con los fines a que se refiere el artículo 5, párrafo 1, deberán estar en posesión de la autorización previa del Ministerio.

El Órgano encargado del bienestar animal, OPBA, para lo que se remitió una solicitud específica de autorización al Ministerio de Salud, adjuntando: Propuesta de proyecto, Resumen

no técnico del proyecto (artículo 34, anexo IX), Formulario (anexo VI), Solicitud de adiciones a proyectos ya autorizados y Módulo de sustracción de órganos.

En el presente trabajo se empleó el principio de las 3R que fue introducido hace unos 60 años y establece los estándares aceptados para la investigación en animales. Estos principios han sido endosados e incorporados de una manera responsable en las prácticas del presente trabajo y formando parte de las leyes nacionales e internacionales que regulan la utilización de animales en la experimentación científica.

**Manejo de animales aplicando las 3Rs:** Los peces vivos fueron mantenidos en un ambiente de laboratorio con todas las medidas tomadas para un normal desarrollo de los individuos y evitar cualquier tipo de interferencia en la parte experimental. Se seleccionaron a los peces con características similares en tamaño y peso. Las condiciones ambientales fueron controladas en un sistema de soporte total bajo una recirculación total del agua dulce (25-28°C, pH 7), se usó una misma dieta *ad libitum* con una iluminación de 14 horas y control de la calidad de agua (°dH entre 3.35 y 4.2) cuyos parámetros estuvieron estandarizados durante todo el periodo de estudio.

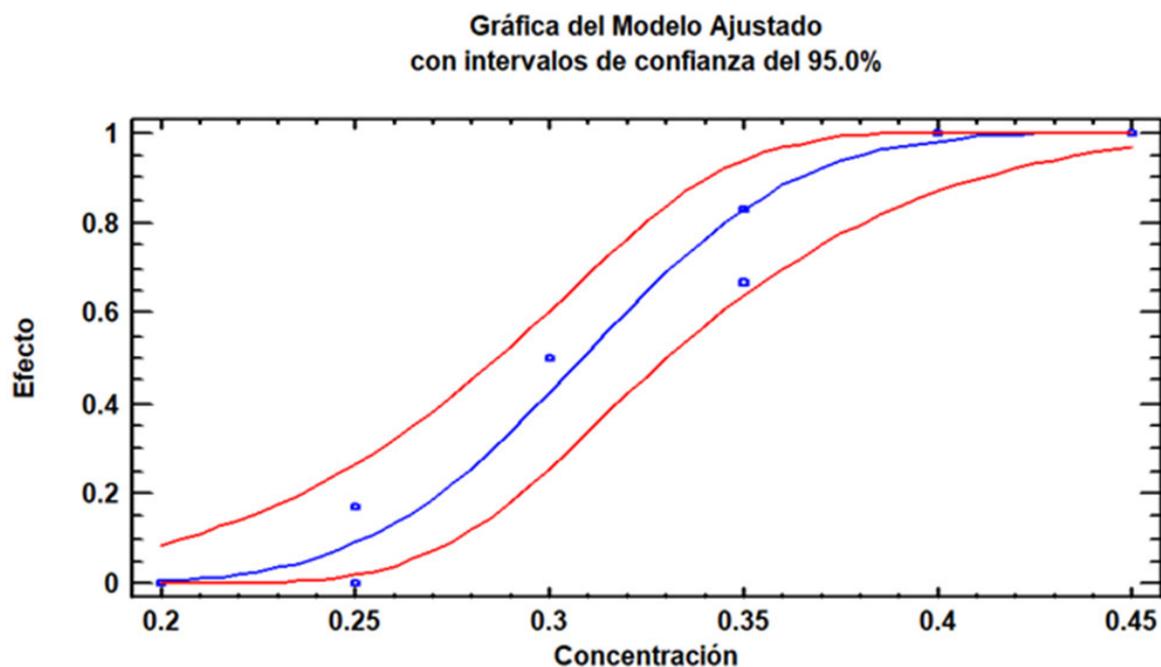
**Sacrificio:** Se consideró una dosis de 60 mg/L de la solución de eugenol en el agua para ocasionar la muerte del animal a los 10 minutos con la pérdida completa de los reflejos del animal e ingreso a estado de inconciencia (Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, 2017).

#### IV. RESULTADOS

El valor de la  $CL_{50}$  a 96 horas (95% de límites de confianza) fue 0,30 mg/L (Tabla 1) en *Danio rerio*, la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) fue hallada mediante el programa Probit (Statgraphics Technologies, Inc., 2016). También se observan los efectos de toxicidad en *Danio rerio* entre las 2 a las 48 horas de exposición, pero esta se mantiene hasta las 96 horas sin variaciones. La serie de soluciones de arsénico a distintas concentraciones se muestran en la figura 4 en la cual podemos destacar una relación del nivel de daño y tipos de cometas acorde con la concentración mostrando también unos resultados alentadores por el nivel de sensibilidad de la técnica ensayo cometa que permite exponer al *Danio rerio* a muy bajas concentraciones de exposición.

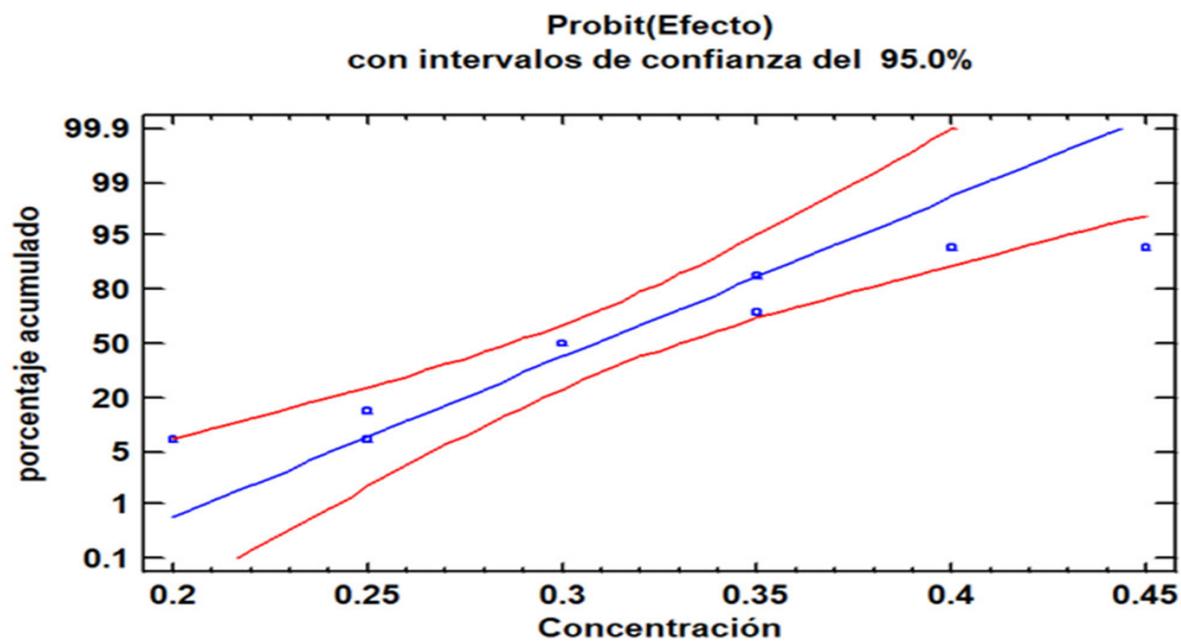
#### Figura 6.

Grafica del modelo ajustado con intervalos de confianza del 95% entre efecto y concentración.



**Figura 7.**

*Modelo de regresión Probit para describir la relación entre porcentaje acumulado y Concentración.*



*Nota.* Se muestra los resultados de ajustar un modelo de regresión Probit para describir la relación entre Efecto y Concentración en la figura 6 y la relación del porcentaje acumulado y la concentración en la figura 7.

**Tabla 1.**

*Tabla de Predicciones Inversas para Concentración.*

Porcentaje	Concentración	LC Inferior 95.0% Límite Conf.	LC Superior 95.0% Límite Conf.
0,1	0,18073	0,0846206	0,22116
0,5	0,201334	0,120052	0,236199
1	0,211327	0,137148	0,243579
10	0,253175	0,207484	0,27575
20	0,270796	0,235782	0,290614
30	0,283502	0,255104	0,302415
40	0,294359	0,270471	0,31364
45	0,299473	0,277243	0,319396
50	<b>0,304506</b>	0,283579	0,325388
55	0,309539	0,289584	0,331711
60	0,314654	0,295353	0,338469
70	0,32551	0,306602	0,353814
80	0,338216	0,318422	0,373117
90	0,355837	0,333301	0,401399
99,5	0,407678	0,372868	0,488816
99,9	0,428283	0,387909	0,524245

*Nota.* Se desarrolló la tabla inversa de predicciones con los porcentajes más relevantes con su respectiva concentración con límite de confianza de la CL50 inferior 95.0% y CL50 superior 95.0%.

**Tabla 2.***Tabla de Predicciones Inversas para Concentración.*

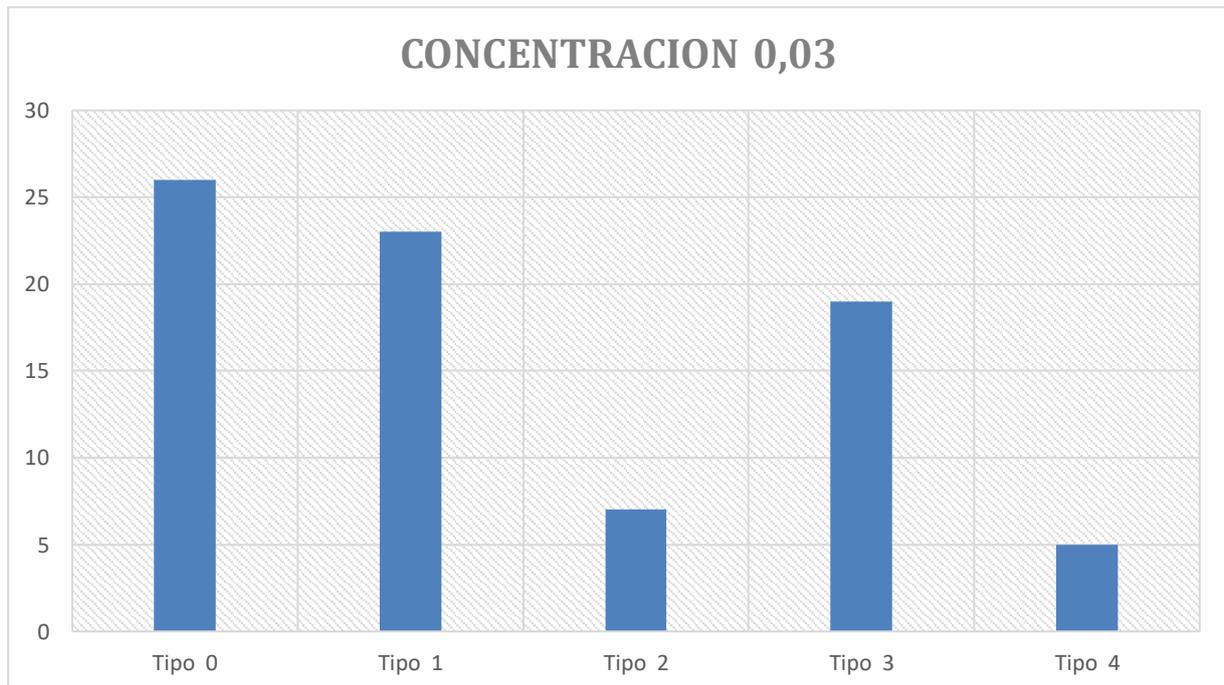
Tipo de cometa	Concentración					Control
	0,30 mg/L	0,15 mg/L	0,06 mg/L	0,03 mg/L		
0	21	18	13	26	8	
1	14	22	24	23	4	
2	15	10	8	7	0	
3	13	8	5	19	0	
4	41	29	18	5	0	

*Nota.* El fraccionamiento de la CL50 para la solución con arsénico se trabajó con el entero de la CL50 que fue 0.30 mg/L y se fracciona la misma en la mitad (1/2), un quinto (1/5) y un décimo (1/10). En el ensayo de exposición para encontrar el daño genotóxico en el núcleo de los eritrocitos del pez Cebra se encontraron poblaciones celulares o cometas más frecuentes en las distintas concentraciones siendo comparándolas con el control. Esta variada frecuencia está relacionada al grado de toxicidad es decir de acuerdo con la prevalencia de un tipo de cometa podemos inferir la concentración a la que han sido expuestos los eritrocitos del Pez Cebra, siendo los más frecuentes la del tipo 4 en la concentración 0,30 mg/L.

Esta decrece a medida que se fracciona la concentración de la misma podemos observar que en 0,30 mg/L fueron encontradas 41 cometas del tipo 4 pero esta frecuencia decrece a solo 29 en la concentración de 0,15 mg/L, 18 a 0,06 mg/L y en 0,03 mg/L solo fueron encontradas 5 cometas del tipo 4, el tipo 1 es más frecuente entre las concentraciones 0,15 mg/L y 0,03 mg/L; la del tipo 2 resulto ser más abundante en la concentración de 0,30 mg/L, la del tipo 3 fue más abundante en 0,03 mg/L, estos resultados fueron ilustrados desde la Figura 8 a la Figura 12.

**Figura 8.**

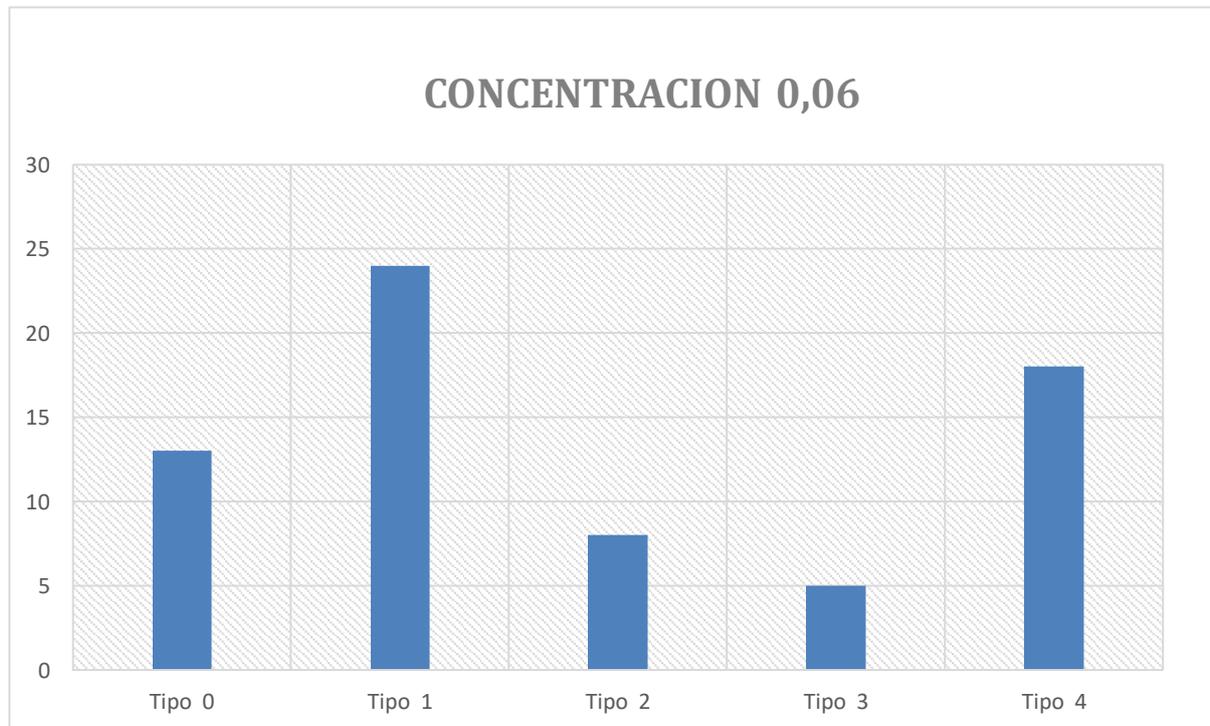
*Conteo de cometas de acuerdo con la concentración 0,03 mg/L*



*Nota.* Se puede observar una mayor cantidad de células con el tipo de cometa 0 el cual significa un nulo efecto, casi con la misma frecuencia la presencia del tipo 1 y los otros tipos de cometas decrecen en frecuencia.

**Figura 9.**

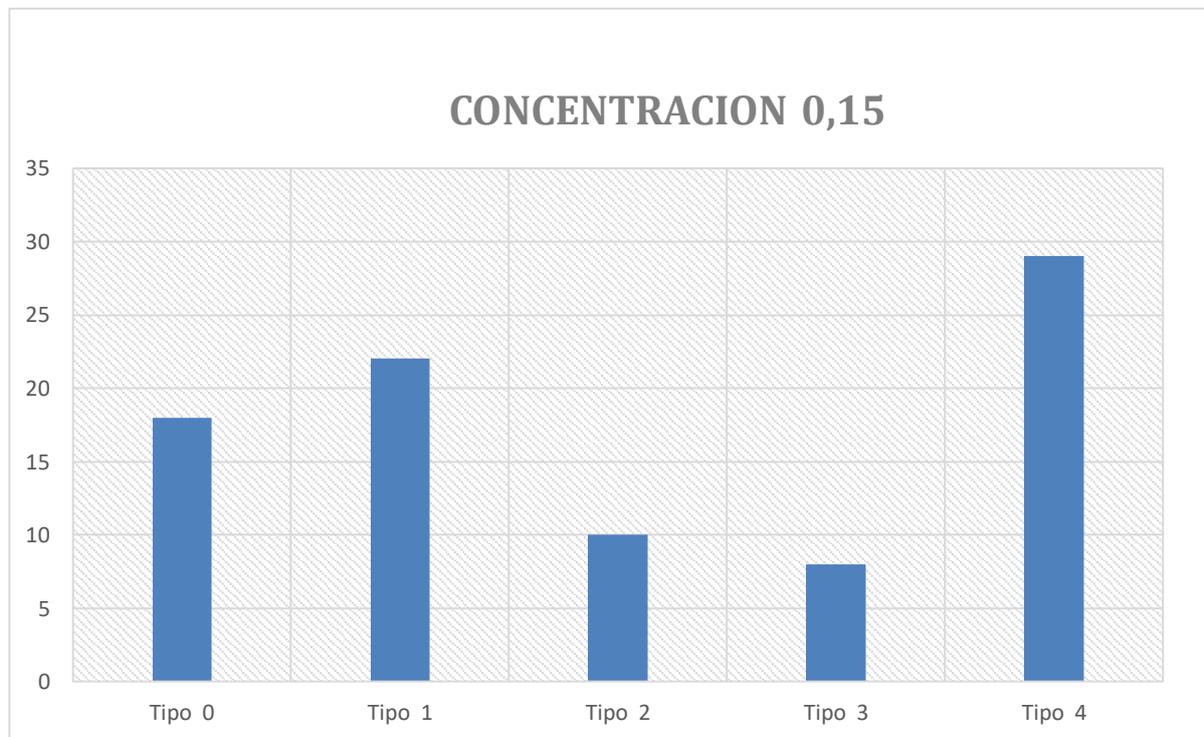
*Conteo de cometas de acuerdo con la concentración 0,06 mg/L.*



*Nota.* Se puede observar una mayor cantidad de células con el tipo de cometa 1 el cual significa un daño moderado con una frecuencia alta del tipo de cometa 4 el cual es un daño severo y los otros tipos de cometas decrecen en frecuencia

**Figura 10.**

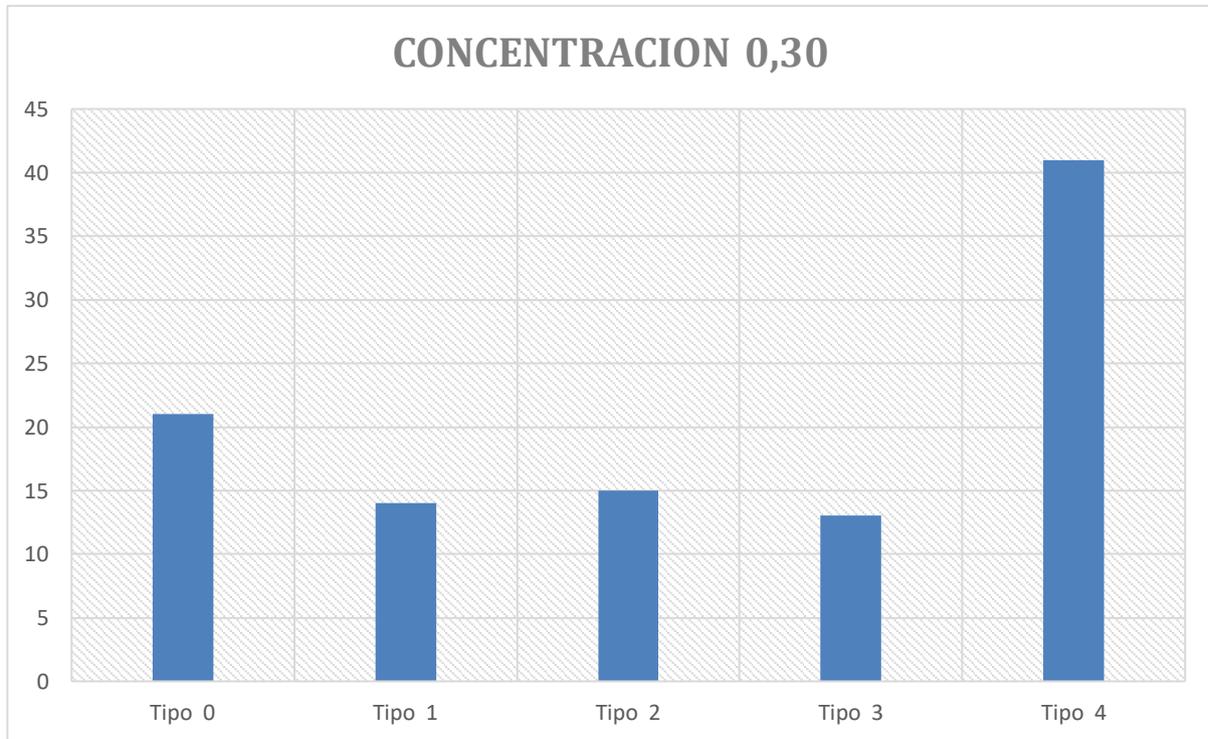
*Conteo de cometas de acuerdo con la concentración 0,15 mg/L.*



*Nota.* Se puede observar una mayor cantidad de células con el tipo de cometa 4 el cual significa un daño severo y presencia de los otros tipos de cometas con una frecuencia más baja.

**Figura 11.**

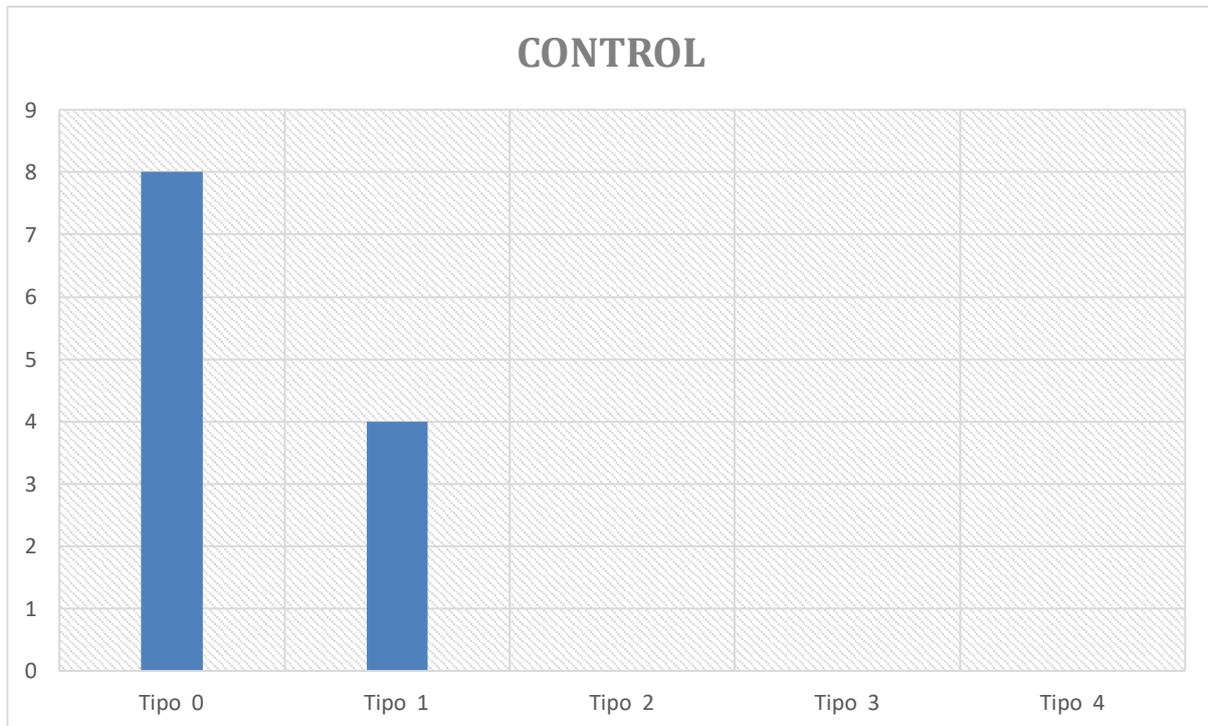
*Conteo de cometas de acuerdo con la concentración 0,30 mg/L.*



*Nota.* Se puede observar que la frecuencia mayor es del cometa tipo 4 el cual indica un daño severo, el resto de los tipos de cometas están presentes, pero en una frecuencia inferior con respecto a la del tipo 4.

**Figura 12.**

*Conteo de cometas en el control.*



*Nota.* Se puede observar solo cometas del tipo 0 que quiere decir con nulo daño y del tipo 1 con una frecuencia muy baja que significa daño leve.

**Tabla 3.**

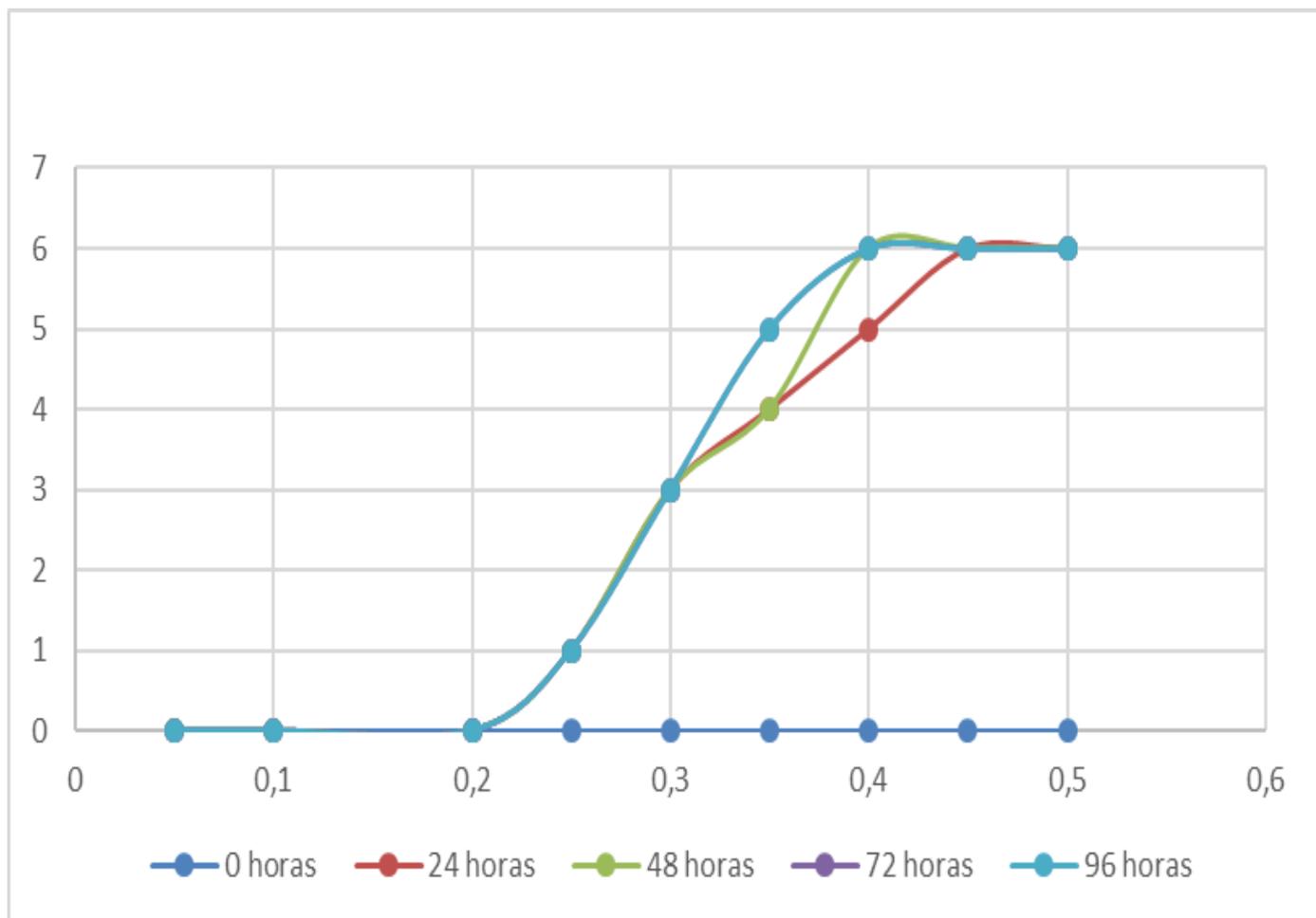
*Mortalidad versus la concentración desde las 24 a las 96 horas de exposición.*

Concentracion es Arseniato de Sodio (mg/L)	Mortalidad en el Tiempo (Horas)				
	0	24	48	72	96
0,5	0	6	6	6	6
0,45	0	6	6	6	6
0,4	0	5	6	6	6
0,35	0	4	4	5	5
0,3	0	3	3	3	3
0,25	0	1	1	1	1
0,2	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0
Control Negativo	0	0	0	0	0

*Nota.* La mortalidad de acuerdo con la concentración se muestra desde las 24h a las 96h de exposición teniendo una tendencia muy regular luego de las 24 horas, ver Figura 13.

**Figura 13.**

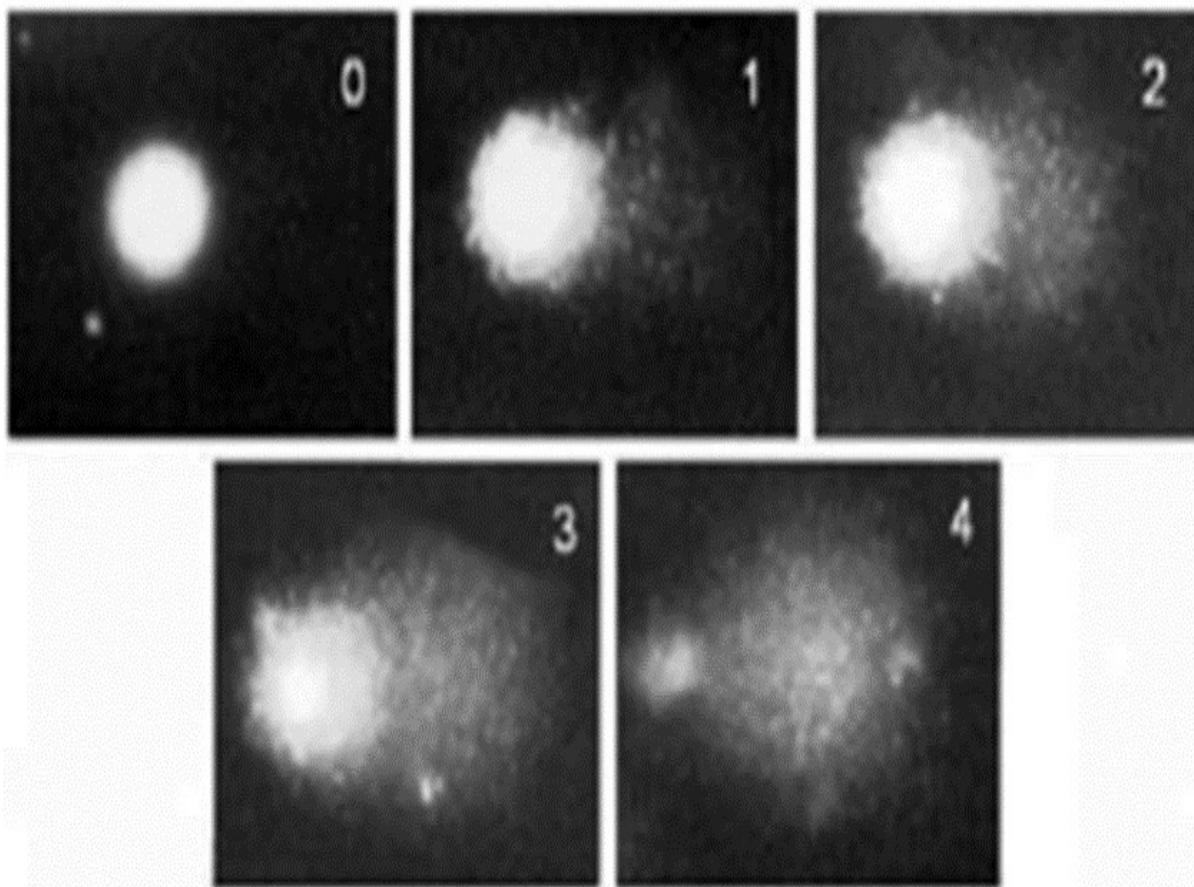
*Mortalidad versus la concentración expresada en mg/L.*



Se utilizó la data en base de las cometas observadas en cada concentración, para la cual, se sacrificó un pez por cada repetición, las búsquedas de cometas se realizaron mediante el análisis y observación en el microscopio óptico en un aumento total de 400X.

**Figura 14.**

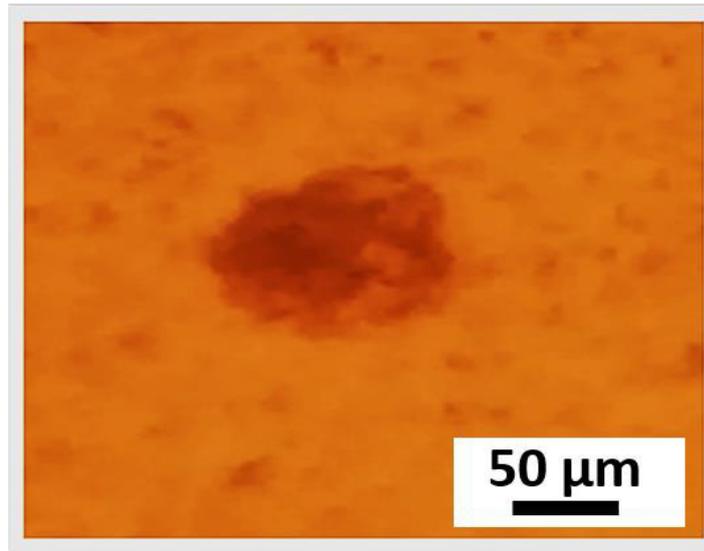
*Categorización del daño en las cometas*



*Nota.* Se puede observar los cometas el cual se distingue el nivel de daño de acuerdo con la longitud de la cola: 0/ sin daño, 1/ daño leve, 2/daño moderado, 3/ daño alto, 4/daño grave, visualización de cometas con fluorescencia (Kumaravel *et al.*, 2009). A continuación, se muestra desde las figuras 15 a la figura 19 se muestran los diferentes tipos de cometas encontradas en este trabajo.

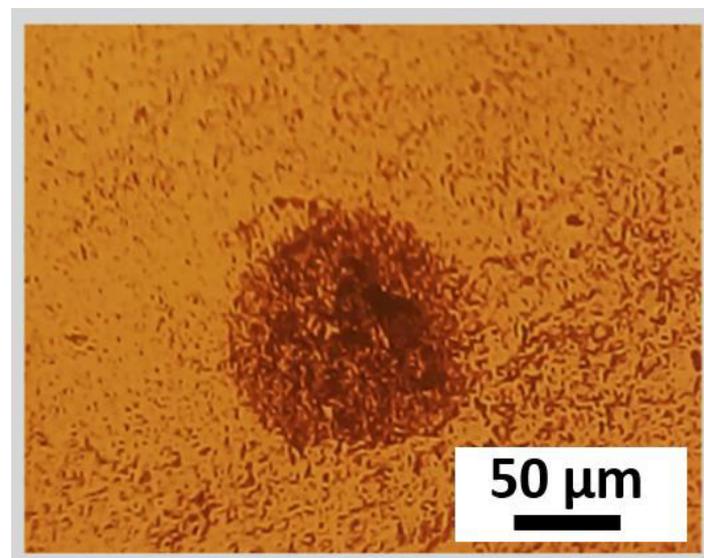
**Figura 15.**

*Presencia de cometa Tipo 0 (400x)*



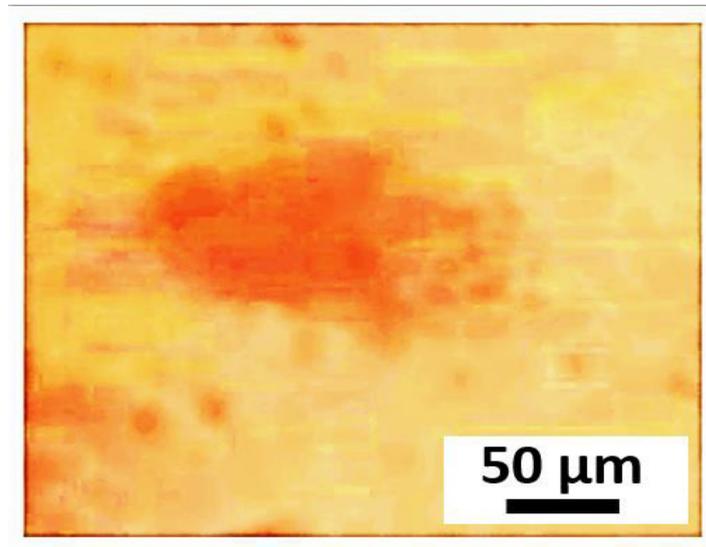
**Figura 16.**

*Presencia de cometa Tipo 1 (400x).*



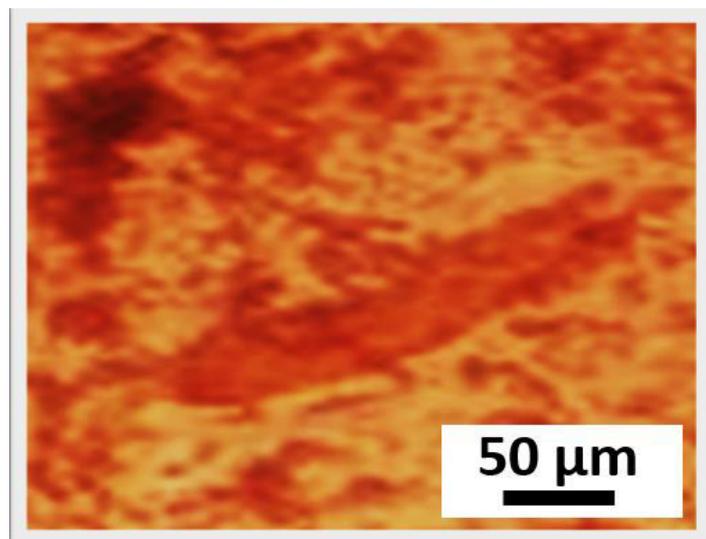
**Figura 17.**

*Presencia de cometa Tipo 2 (400x).*



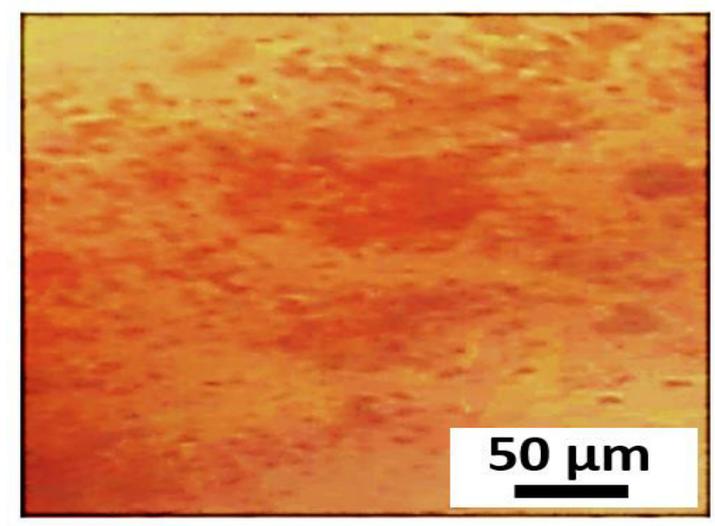
**Figura 18.**

*Presencia de cometa Tipo 3 (400x).*



**Figura 19.**

*Presencia de cometa Tipo 4 (400x).*



## V. DISCUSION DE RESULTADOS

Los peces son considerados como buenos bioindicadores siendo muy útiles en estudios de impacto medio ambientales y esto es porque dependen de varios eslabones de la cadena trófica siendo capaces de acumular sustancias tóxicas y responden fácilmente a bajas concentraciones de agentes mutagénicos el cual pueden ser cuantificados y evaluados con diversas técnicas empleadas en estudios de impacto ambiental (Gustavino *et al*, 2001).

Esto producen alteraciones morfológicas nucleares en eritrocitos y también en otros tejidos como el sistema nervioso alterando muchas veces el comportamiento y la locomoción de los individuos expuestos, lo cual han sido utilizadas por diversos autores como posibles indicadores de genotoxicidad (Cavas & Ergene-Gözükara *et al*, 2005; Da Silva Souza y Fontanetti *et al*, 2006; Ergene *et al*, 2007).

En otros trabajos de investigación se ha estudiado el desarrollo embrionario debido a la exposición temprana a las influencias ambientales, incluidos los tóxicos, podría generar cambios fenotípicos en la descendencia y generaciones posteriores sin ninguna exposición directa, influyendo la salud a largo plazo de las sucesivas generaciones muchas veces provocando malformaciones o la no conclusión del desarrollo embrionario y el Pez cebra es un excelente animal modelo para los estudios relacionados a genotoxicidad por muchas características y ventajas que hacen de este un excelente animal modelo (Nava-Rivera *et al*, 2021).

La comunidad científica ha sido consciente del dilema con respecto a la exposición crónica a bajas dosis de arsénico y las asociaciones con la inducción de patogenicidad y carcinogenicidad en humanos durante décadas y a otros muchos efectos y consecuencias por

la exposición a este y otras sustancias contaminantes no solamente provocadas de manera natural sino también por la actividad humana.

Se ha realizado una amplia investigación hecho con varios modelos animales, incluidos roedores, que han iluminado y desmitificado el campo de arsénico en toxicología. Aunque los modelos de roedores comparten un metabolismo de arsénico análogo al de los humanos, a muchos informes les preocupa que estos modelos sigan siendo algo inconsistentes con los humanos y sean costosos. Los ratones, por ejemplo, excretan el doble de arsénico que se ha informado en humanos.

En las ratas, el arsénico ingerido permanece en la sangre durante mucho más tiempo que en los humanos. Las ratas también metilan el arsénico de manera más extensa y generan metabolitos metilados que son raros en los estudios en humanos (Hallauer *et al.*, 2016).

Usando estos modelos animales, un individuo significativo las diferencias se observan con frecuencia. Por ejemplo, cuando se utilizan ratones para investigar la exposición al arsénico, esto es disuelto en su suministro de agua, pero es casi imposible generar condiciones de exposición uniformes entre diferentes sujetos ratones. Otro límite para el uso del modelo de roedores es el aumento del costo cuando se desea una población más grande de animales.

Una preponderancia de diseños experimentales y factores de confusión requieren un nuevo organismo modelo para investigar la genotoxicidad por arsénico. En este estudio, se utilizó el pez cebra (*Danio rerio*) como un modelo animal viable y alternativo en la exposición al arsénico.

Las ventajas de utilizar el modelo de pez cebra incluyen su vida útil corta, facilidad de exposición más prolongada, y un punto muy importante el cual no se estudió en el presente trabajo lo trastornos neurológicos a través de la locomoción y estudios sobre la progenie el cual podría ser un futuro aspecto a tomar en cuenta ya que estos tienen una alta fertilidad y proporcionan una muy buena cantidad de embriones para poder estudiar los efectos de cualquier contaminante durante el desarrollo embrionario, obviamente estos aspectos si se tienen muy en cuenta en estudios relacionados a enfermedades que provocan algún efecto en el sistema nervioso siendo muy útil el pez cebra ya que muchos genes están muy bien conservados en todos los vertebrados (Hallauer *et al.*, 2016).

Trabajos anteriores apoyan que el modelo de pez cebra en su utilidad para la investigación de anomalías inducidas por arsénico en incluso otros genotóxicos que son indicativas de la respuesta humana.

Es evidente que las vías de desintoxicación del arsénico en el pez cebra incluyen el transporte para el arsénico inorgánico a través de acuaporinas, fosfato transportadores y metilación del arsénico por metiltransferasa, todas estas vías comparten mecanismos moleculares similares para humanos. La retención tisular y el perfil metabólico del arsénico también son consistentes con los de los seres humanos (Hallauer *et al.*, 2016).

El estudio actual demostró el potencial de la exposición al arsénico para generar a nivel celular destrucción del ADN de acuerdo con la concentración. Sin embargo, en otros trabajos similares usando como modelo animal a la Rata se estudió los cambios fenotípicos, incluidos los del peso corporal y diferentes órganos, disminución de la calidad del esperma, cambios en la metilación del ADN en los tejidos de los ovarios y testículos, daño del ADN en los glóbulos blancos y la morfología aberrante de las gónadas, principalmente en los testículos.

Relacionado con el peso corporal y de diferentes órganos, se encontró en dichos estudios diferencia en el peso corporal al nacer de los individuos expuestos al arsénico, lo que contrasta con los efectos toxicológicos de arsénico en la población humana, relacionado con bajo peso y talla al nacer (Nava-Rivera *et al.*, 2021).

En este estudio, estos datos no fueron tomados en cuenta por falta de presupuesto y se trabajó principalmente en individuos adultos del pez cebra (*Danio rerio*) sin distinción entre hembras y machos. Sin embargo, estas variables serían muy importantes en un futuro estudio relacionado a la genotoxicidad del arsénico en el pez cebra aportando más información en las consecuencias y efectos biológicos durante el desarrollo del individuo hasta la adultez también tomando en cuenta cómo afectaría a las sucesivas generaciones dichos efectos.

El ensayo cometa ha sido aplicado con éxito en los eritrocitos en una gran cantidad de especies, no solamente de peces sino en otros grupos animales mostrando la sensibilidad de las células de la sangre de estos animales y los efectos genotóxicos de esta manera podemos tener un panorama más amplio en la aplicación del Pez cebra como animal modelo en genotoxicidad no solamente con el Arsénico , sino también con otras clases de contaminantes y sustancias para poder estudiar sus efectos en los diversos tipos celulares y poder de alguna manera prevenir el daño o al menos contrarrestarlo (Padrangi *et al.*, 1995; Gontijo *et al.*, 2003).

Por otra parte, es conocido que en los estudios de genotoxicidad in vivo se utilizan sustancias tóxicas con efectos mutagénicos, como por ejemplo cobre, cadmio, y arsénico, mercurio entre muchos otros, además también se podría implementar estudios In vitro para

comparar dichos hallazgos (Cavas & Ergene-Gözükara *et al*, 2005; Da Silva Souza & Fontanetti *et al*, 2006; Ergene *et al*, 2007).

En el presente estudio, el objetivo fue evaluar la actividad genotóxica del arsénico en eritrocitos de la sangre periférica utilizando como bioindicador al pez Cebra (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) a diferentes concentraciones y periodos de exposición, también hallando la concentración letal media (CL<sub>50</sub>).

Como resultado pudimos comprobar que el efecto toxico del Arsénico en los eritrocitos eran evidentes de acuerdo con la concentración de arsénico siendo el daño mayor a nivel celular y esto se fue evidenciando con los diversos tipos de cometas encontrados esto quiere decir que a mayor concentración el daño a nivel celular y en el ADN era mayor.

Los valores de CL<sub>50</sub> encontrado en el pez cebra fue de 0,30 mg/L. Sin embargo, esta concentración letal media en otras especies varía de acuerdo con la resistencia y tamaño del animal modelo empleado.

Además, tal como hay diferencias entre los diversos tipos de genotóxicos en cuanto a su capacidad de alterar al DNA, trabajos realizados en una misma especie ante un mismo genotóxico muestran diferencias en diferentes tejidos y sus efectos pueden ser variados (Torres de Lemos *et al*, 2007).

En relación a los tipos de cometas encontrados, las frecuencias registradas entre las 24 a 96 horas de tratamiento con la concentración de 0,30 mg/L fueron significativamente mayores para el tipo 4 (daño grave) mostrando una destrucción total del ADN y se puede inferir que en otros tejidos con dicho nivel de exposición el daño debe de ser similar afectando las funciones

del tejido u órgano expuesto el cual actualmente existen equipos para medir con precisión el movimiento de los peces como el DanioVision-recording system el cual es capaz de medir los movimientos en alevines de pez cebra y comparar los distintos grupos con distintas concentraciones y el control con una gráfica.

Este marcador es factible de ser cuantificado de manera objetiva y ser utilizados en los ensayos de genotoxicidad en peces.

Según estudios previos, las formas de los cometas fueron clasificados de acuerdo con la longitud de la cola como sin daño (Tipo 0), daño leve (Tipo 1), daño moderado (Tipo 2), daño alto (Tipo 3), daño grave (Tipo 4), de esa manera podemos evaluar desde el punto de vista morfológico el nivel de daño en el ADN por el nivel de destrucción del núcleo.

El fundamento de este ensayo para detectar daños al ADN producido por un rompimiento simple o doble en la cadena, daño oxidativo inducido y entrecruzamiento de ADN-ADN/ADN-proteína, se basa en la fragilidad que poseen los sitios dañados; al ser sometidos a un pH superior a trece y su comportamiento en una electroforesis (Di Paolo *et al.*, 2006).

Los fragmentos de ADN, producto de la acción de la sustancia a probar son afectados por el pH alcalino, migran a una velocidad diferente del resto del material nuclear formando la cola del “cometa”, entre más larga sea esta porción mayor será el daño ocasionado al ADN por el agente genotóxico (Brendler & Schwaab *et al.*, 2005; Di Paolo *et al.*, 2006).

La mortalidad fue marcada directamente por dos variables, la concentración y por el tiempo de exposición obteniendo que en concentraciones mayores al 0.45 mg/L todos los

individuos morían a las 24 horas. Sin embargo, dicha mortalidad se reducía a medida que la concentración disminuía. Luego de hallar la  $CL_{50}$  el cual implica que es la concentración por la cual solo el 50% de los individuos muere sin cambiar esta tendencia por el tiempo de exposición.

La frecuencia está relacionada al grado de toxicidad es decir de acuerdo a la cantidad de un tipo de cometa podemos decir que está directamente relacionado a la concentración que han sido expuestos los eritrocitos del Pez Cebra, siendo los más frecuentes en el tipo 0 en el grupo de control indicando que no hay daño alguno y siempre en las concentraciones más bajas.

En el grupo expuesto a 0,30 mg/L las células presentaron una frecuencia mucho más alta de cometas del tipo 4 evidenciando un daño severo o grave de acuerdo a la clasificación de los tipos de cometas y comprobando nuestros resultados que están acorde al de otros proyectos en el cual se hallaron resultados similares en otros animales modelo como en ratones con cometas del tipo 4 más frecuentes en mayor concentración y no solamente en sangre periférica sino que también la destrucción celular en otros tejidos (Hallauer, *et al.*, 2016).

En el fraccionamiento 1/2 de la  $CL_{50}$ , es decir a 0,15 mg/L el tipo de cometa más frecuente fue el tipo 4 seguido del tipo 1 además que se pudieron observar los otros tipos de cometa 0, 2 y 3 evidenciando un daño a diversos niveles tal como reportan otros trabajos no solamente con el efecto del arsénico sino también estudios en los efectos de otras sustancias.

En el fraccionamiento 1/5 de la  $CL_{50}$ , es decir a 0,06 mg/L el tipo de cometa más frecuente fue el tipo 1 seguido del tipo 4 además que se pudieron observar los otros tipos de cometa resaltando un daño en el ADN presente menor al de las anteriores y por último el fraccionamiento a 1/10 de la  $CL_{50}$ , es decir a 0,03 mg/L siendo más frecuente el tipo de cometa

0 que muestra un daño nulo, del tipo 1 que significa un daño leve y del tipo 3 que muestra un daño alto, los otros tipos de cometas del tipo 2 y tipo 4 a niveles muy bajos, aunque siempre presentes.

El proyecto mostro resultados satisfactorios apoyando la gran sensibilidad de la técnica del ensayo cometa y la gran versatilidad del pez cebra para su uso en este tipo de investigación con genotóxicos.

## VI. CONCLUSIONES

- La  $CL_{50}$  para del arsénico fue de 0,3 mg/L a las 48 horas
- Se pudo comprobar la versatilidad del Pez cebra para el ensayo cometa usando sus eritrocitos observando todos los tipos de cometas desde 0,3 mg/L hasta el 0,03 mg/L.

## VII. RECOMENDACIONES

- En Proyectos futuros similares al presente trabajo serían un gran aporte para estudiar las consecuencias a la exposición al arsénico a lo largo del desarrollo embrionario hasta la etapa adulta, ya que muchos individuos, ya sean peces o mamíferos, están expuestos a agentes genotóxicos desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, además de un estudio taralógico y la observación de la morfología de órganos y tejidos así como los posibles efectos en la locomoción ya que el arsénico afecta el sistema nervioso, también medir si hay efectos en el peso y tamaño para evaluar las posibles consecuencias en estas variables.
  
- Se podría estudiar y comparar los posibles cambios fenotípicos en la descendencia expuesta con las que no sufrieron ninguna exposición directa, influyendo la salud a largo plazo de las sucesivas generaciones.
  
- Sería mucho mejor el empleo de las tinciones o colorantes utilizados más específicos para el ADN. Los colorantes más empleados son el Bromuro de Etidio, el Ioduro de Propidio y el 4,6-Diamino-2 fenil indol (DAPI) (Mudry y Carballo *et al.*, 2006, Liao *et al.*, 2009, Zúñiga *et al.* 2009). Cada una de estas tinciones actúa de forma diferente sobre el ADN, el bromuro de Etidio es un agente intercalante que se inserta entre los pares de bases nitrogenadas adyacentes en la doble cadena; el ioduro de propidio se intercala entre las bases con poco o ningún orden de preferencia y el DAPI forma complejos fluorescentes en los surcos menores de la doble hélice de ADN y es

estabilizado por puentes de hidrógeno (Liao *et al.* 2009; Zúñiga *et al.* 2009) las cuales permitirían una mejor visualización del ADN.

## VIII. REFERENCIAS

- Aleström P., Holter J.L. & Nourizadeh-Lillabadi R. (2006). Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends in Biotechnology*, 24 (1), 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.11.004>
- Alien, T. & Rana, S. V. S. (2004) Effect of Arsenic (As III) on Glutathione-dependent enzyme in liver and Kidney of the freshwater fish *channa punctatus*. *Biological trace element research*, 100, 1, 39-48. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1822-3>
- Bakshi, A., & Panigrahi, A. K. (2018). A comprehensive review on chromium induced alterations in freshwater fishes. *Toxicology reports*, 5, 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.03.007>
- Barch, M. J., Knutsen, T. & Spurbeck, J. L. 1997. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. (3ra ed.). Editorial *Lippincott-Raven*.
- Beaus, E. L. A. (2009). La Unión Europea y el bienestar animal: análisis actualizado de sus normas. *Teoría & Derecho. Revista de pensamiento jurídico*, (6), 97-119.
- Belpaeme K, Cooreman Kand & Kirsch-Volders M (1998) Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 415, 167-184. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00254-0](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00254-0)
- Brendler-Schwaab, S, Hartmann, A, Pfuhrer, S. and Speit, G. (2005) The in vivo comet assay: *Use and status in genotoxicity testing*. *Mutagenesis* 20:245-254 <https://doi.org/10.1093/mutage/gei033>

- Bücker, A, Carvalho Wand & Alves-Gomes JA (2006) Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei, Gymnotiformes) *expostos ao benzeno*. *Acta Amazônia* 36:357-364
- Carvan III, M. J. (2007). Fish models in toxicology. *Zebrafish*, 4(1), 9-20. <http://doi.org/10.1089/zeb.2006.9998>
- Cavas, T. & Ergene-Gozukara, S., (2005<sup>a</sup>). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264–271 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001>
- Cavas, T. & Ergene-Gozukara, S. (2005<sup>b</sup>). Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ. Mol. Mutagen.* 46, 64–70. <https://doi.org/10.1002/em.20130>
- Cayuela Fuentes, M. L., Alcaraz Pérez, F., & Angelín Flageu, M. (2012). El pez cebra, al servicio de la investigación en cáncer. *Eubacteria*, 28 (2012).
- Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G. & Lee, S. S. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *J Nanobiotechnology* 14 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0217-6>
- Christofolletti, C. A., David, J. A. O., & Fontanetti, C. S. (2009). Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. *Genetics and Molecular Biology*, 32(1), 155-158.

- Coll J.M. (2001). El transposon SB de salmonidos como vector para transferencia de genes en vertebrados. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* 16 (2), 237-244.
- Cossio, M., González, Y., García, J. & Prieto, E. (2004). Uso del Ensayo Cometa para Evaluar el Efecto de la Temperatura sobre la Reparación del Daño Genético inducido por Peróxido de Hidrógeno y la Radiación Ultravioleta A en Células Sanguíneas Humanas. *Acta Farm. Bonaerense* 23(3), 277-84.
- Crodian, J., Liu, X., Alestrom, A., Alestrom, P., and Collodi, P. (2004). Zebrafish embryo cells remain pluripotent and germ-line competent for multiple passages in culture. *Zebrafish* 1, 21-26.  
<http://doi.org/10.1089/154585404774101644>
- Da Silva Souza & T., Fontanetti, C.S., (2006). Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutat. Res.* 605, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.02.010>
- Detrich, H., Westerfield, M. & Zon, L (1999). The zebrafish: Biology, Genetics and Genomics. *Methods in Cell Biology. Academic Press, N.Y.* 59, 60.
- Di Giorgio, M., Taja, M., Nasazzi, N., Bustos, N., Cavalieri, H. & Bolgiani, A. (2001). El ensayo de cometa como herramienta de la dosimetría biológica en la evaluación de sobreexposiciones Estandarización del Ensayo del Cometa Alcalino fuertemente localizadas. *Memorias del 5th Regional Congress on Radiation Protection and Safety*. Recife, Brasil, 29 abril al 4 mayo.

- Di Paolo, C. (2006) Aplicação do ensaio do cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à βnaftoflavona (Master Thesis, USP, São Paulo, 2006), Disponible en: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/21/21131/tde-17102006154149/>
- Dusinská, M. & Collins, A. (1996). Detection of oxidized purines and UV – induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion – specific enzymes in the comet assay. *ATLA, Altern Lab Anim* 24:405–411. <https://doi.org/10.1177/026119299602400315>
- Ergene, S., Cavas, T., Celik, A., Köleli, N., Kaya, F. & Karahan, A., (2007<sup>a</sup>). Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology* 16, 385–39. <https://doi.org/10.1007/s10646-007-0142-4>
- Fan, L., Alestrom, A., Alestrom, P. and Collodi, P. (2004). Development of cell cultures with competency for contributing to the zebrafish germ line. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 14, 43-51. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.v14.i12.20>
- Gontijo, AMMC., Barreto, RE., Speit, G., Reyes, VAV., Volpato, GL. and Salvadori, DMF. (2003) Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat Res* 534:165-172. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00276-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00276-0)
- Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio & Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies. (2017). Front Matter. In Guía para el cuidado y uso de

animales de laboratorio: Octava Edición (1st ed., pp. i–xiv). Ediciones UC. p. 87-99; 198-199.

<https://doi.org/10.2307/j.ctt20fw832.1>

Gustavino, B., Scornajenghi, K.A., Minissi, S. & Ciccotti, E. (2001). Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicine. *Mutation Research*. 494 (1), 151-159. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00191-7](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00191-7)

Hallauer, J., Geng, X., Yang, H. C., Shen, J., Tsai, K. J., & Liu, Z. (2016). The Effect of Chronic Arsenic Exposure in Zebrafish. *Zebrafish*, 13(5), 405–412. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1252>

Han, H. S., Jang, G. H., Jun, I., Seo, H., Park, J., Glyn-Jones, S., Seok, H. K., Lee, K. H., Mantovani, D., Kim, Y. C., & Edwards, J. R. (2018). Transgenic zebrafish model for quantification and visualization of tissue toxicity caused by alloying elements in newly developed biodegradable metal. *Scientific reports*, 8(1), 13818. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32313-5>

Hwang, E. & Bowen, P. (2007). DNA Damage, a Biomarker of Carcinogenesis: Its Measurement and Modulation by Diet and Environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47:27–50. <https://doi.org/10.1080/10408390600550299>

Ivics, Z., Izsvak, Z. & Hackett, P.B., (1997). Molecular reconstruction of sleeping beauty, a Tc1-like transposon system from fish and its transposition in human cells. *Cell*. 91, 501-510. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80436-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80436-5)

- Klaude, M, Eriksson, S, Nygren, J and Ahnström, G. (1996) The comet assay: Mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 363:89-96. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(95\)00063-1](https://doi.org/10.1016/0921-8777(95)00063-1)
- Kohl, Y., Rundén-Pran, E., Mariussen, E., Hesler, M., El Yamani, N., Longhin, E. M., & Dusinska, M. (2020). Genotoxicity of Nanomaterials: Advanced In Vitro Models and High Throughput Methods for Human Hazard Assessment-A Review. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 10(10), 1911. <https://doi.org/10.3390/nano10101911>
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P. & Jha, A.N. (2009). Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*. 25, 53-64.
- Lee, K. Y. (2017). Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: promoting preclinical applications. *Bioscience reports* 37 (2017). <https://doi.org/10.1042/BSR20170199>
- Liao, W., McNutt, M. & Zhu, W. (2009). The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.016>
- Luna-Gonzalez, J., Martín-González, A., Brito-Loeza, C., Espinosa-Romero, A., & Pacheco-Pantoja, E. (2018). Introducción a Técnicas de Segmentación de Células del Ensayo Cometa. *Ingeniería*, 22(3), 26-37.
- Mandal, B. & Suzuki, K. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58(1): 201-35. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00268-0)

- Martínez, G., McCord, S. A., Driscoll, C. T., Todorova, S., Wu, S., Araújo, J. F., Vega, C. M., & Fernández, L. E. (2018). Mercury Contamination in Riverine Sediments and Fish Associated with Artisanal and Small-Scale Gold Mining in Madre de Dios, Perú. *International journal of environmental research and public health*, 15(8), 1584. <https://doi.org/10.3390/ijerph15081584>
- Missimer, T. M., Teaf, C. M., Beeson, W. T., Maliva, R. G., Woolschlager, J., & Covert, D. J. (2018). Natural Background and Anthropogenic Arsenic Enrichment in Florida Soils, Surface Water, and Groundwater: A Review with a Discussion on Public Health Risk. *International journal of environmental research and public health*, 15(10), 2278. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102278>
- Møller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, E. (2020). Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nat Protoc* 15, 3817–3826 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>
- Mudry M y Carballo M. (2006). Genética Toxicológica. *De los Cuatro Vientos* Editorial. Primera Edición. Buenos Aires.
- Nava-Rivera, L. E., Betancourt-Martínez, N. D., Lozoya-Martínez, R., Carranza-Rosales, P., Guzmán-Delgado, N. E., Carranza-Torres, I. E., Delgado-Aguirre, H., Zambrano-Ortíz, J. O., & Morán-Martínez, J. (2021). Transgenerational effects in DNA methylation, genotoxicity and reproductive phenotype by chronic arsenic exposure. *Scientific reports*, 11(1), 8276. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87677-y>

Ostling, O., and Johanson, K. J. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291-298.

[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X)

Padrangi R, Petras M, Ralph S and Vrzoc M (1995) Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ Mol Mutagen* 26, 345-356.

<https://doi.org/10.1002/em.2850260411>

Pérez, M. F. (2004) Dinámica de Arsénico en aguas subterráneas de pozos y sedimentos del distribuidor general de agua potable de Zimapan, Hidalgo. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Prieto, E. & Llopiz, N. (1999). Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa). *Rev cubana Invest Biomed* 18(1):34-6.

Ramírez P. & Mendoza A. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas de suelo y agua. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat)*.

Ramírez, O.A. (2001). Toxicidad del arsénico de fuentes subterráneas naturales de agua potable y presa Fernando Hirirart Balderrama de Zimapán, Hidalgo en *Oreochromis niloticus*. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional.

Rocha, A., Ruiz, S., Estepa, A. & Coll, J.M. (2001) Biología Molecular de los peces: Intereses y aplicaciones. *Acuatic*, 15:7-5.

Rojas-Muñoz A., Bernard A., Izpisúa J.C., (2007). El pez Cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y ciencia*, núm. 366: 66-69.

Rowan, A. N. Ending the Use of Animals in Toxicity Testing and Risk Evaluation. *Camb Q Healthc Ethic* 24, 448–458 (2015). <https://doi.org/10.1017/S0963180115000109>

Rydberg, B., & Johanson, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In *DNA repair mechanisms* (pp. 465-468). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-322650-1.50090-4>

Scotto, C., Rondón, R., & Arriola, C. (2019). Determinación de la concentración letal media (c150) producida por el sulfato de cobre pentahidratado en diez especies de peces dulceacuícolas bioindicadores utilizados en el Perú. *Ciencia y Desarrollo*, 22(4), 49-57. <http://dx.doi.org/10.21503/cyd.v22i4.1837>

Sorsa M. (1998). Sustancias Químicas Genotóxicas. Control Biológico: herramientas y enfoques. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo* 27.15-27.20.

Tharwat, M., Endoh, D., & Oikawa, S. (2012). DNA damage in peripheral blood mononuclear cells and neutrophils of dairy cows during the transition period. *Open veterinary journal*, 2(1), 65–68.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000). Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen*; 35: 206-21. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)

- Togar, B., Turkez, H., Tatar, A., Hacimuftuoglu, A., & Geyikoglu, F. (2015). Cytotoxicity and genotoxicity of zingiberene on different neuron cell lines in vitro. *Cytotechnology*, 67(6), 939–946. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9729-9>
- Torres de Lemos, C., Milan Rödel, P., Regina Terra, N., D'Avila de Oliveira, N. & Erdtmann, B. (2007). River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. *Ecotoxicol Environ Saf.*; 66(3), 391-401. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.01.004>
- Varga, M., Ralbovski, D., Balogh, E., Hamar, R., Keszthelyi, M., and Tory, K. (2018). Zebrafish Models of Rare Hereditary Pediatric Diseases. *Diseases* 6. <https://doi.org/10.3390/diseases6020043>
- Velma V., Vutukuru S.S., Tchounwou P.B. (2009). Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: a critical review. *Rev. Environ. Health*, 24(2):129–145. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2009.24.2.129>
- Wang, K. (2013). Toxicity assessments of near-infrared upconversion luminescent La F3: Yb, Er in early development of zebrafish embryos. *Teranostics* 3, 258–266. <https://doi.org/10.7150/thno.5701>
- Westerfield, M. (1995). The zebrafish book. Guide for laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 3rd.ed. In Univ. Oregon Press, Eugene, USA

*Statgraphics. (2016). Statgraphics Centurion XVII. Statgraphics Technologies, Inc. Recuperado de <https://www.statgraphics.net>*

Xu, H., Lam, S. H., Shen, Y., & Gong, Z. (2013). Genome-wide identification of molecular pathways and biomarkers in response to arsenic exposure in zebrafish liver. *PloS one*, 8(7), e68737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068737>

Yumnamcha, T, Devi, MD, Roy D. & Nongthomba, U. (2020). Evaluation of developmental toxicity and genotoxicity of aqueous seed extract of *Croton tiglium* L. using zebrafish. *Drug Chem Toxicol.* 2020(6), 1-9. Epub ahead of print. PMID: 31902256. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1708094>

Zúñiga L. (2009). Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. (Tesis doctoral) Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de genética y microbiología. Grupo de Mutagénesis. <http://hdl.handle.net/10803/3930>

## IX. ANEXOS

## Anexo A.

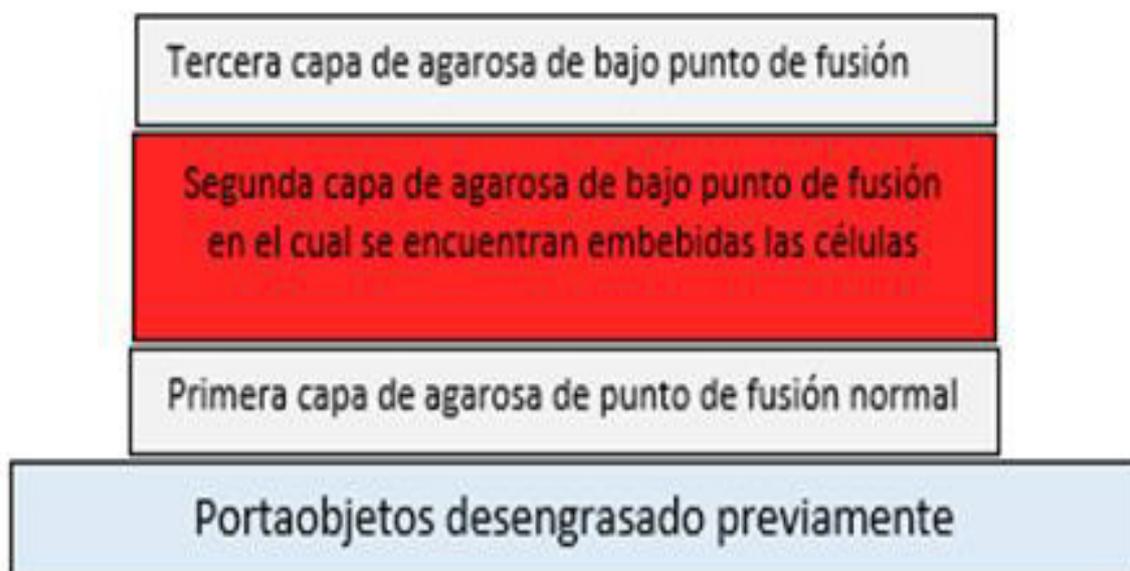
*Volúmenes de la solución de prueba necesarios para alcanzar las concentraciones finales siguiendo la formula  $C1V1=C2V2$ .*

<b>Grupo</b>	<b>Dosis (mg/L)</b>	<b>Solución de prueba (mL)</b>	<b>Agua (mL)</b>
<b>I control negativo</b>	0	0	500
<b>II</b>	0.05	25	475
<b>III</b>	0.10	50	450
<b>IV</b>	0.20	100	400
<b>V</b>	0.25	125	375
<b>VI</b>	0.30	150	350
<b>VII</b>	0.35	175	325
<b>VIII</b>	0.40	200	300
<b>IX</b>	0.45	225	275
<b>X</b>	0.50	250	250

**Anexo B.**

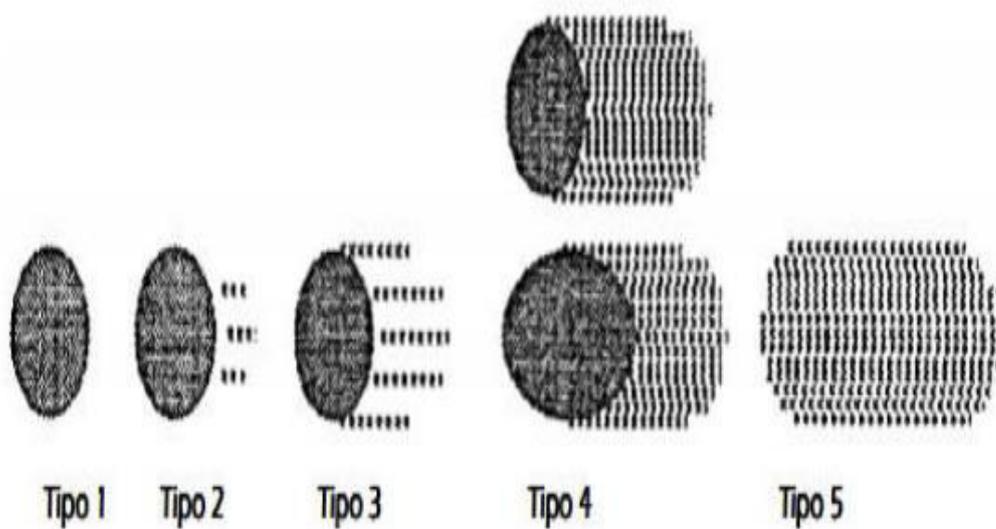
*Esquema típico de un portaobjetos con las capas de agarosa dispuestas tipo sándwich.*

*(<http://ddd.uab.cat/record/64777>).*



**Anexo C.**

*Clasificación visual esquemática usada por Kobayashi et al., 1995 Clasificación de 5 clases de cometas. Tomada de <http://ddd.uab.cat/record/64777>.*



## Anexo D.

### Matriz de consistencia

Problema	Objetivos	Marco teórico conceptual	Hipótesis	VARIABLES DE ESTUDIO	Metodología
<p><b>El problema primario</b></p> <p>Consiste en busca investigar si la exposición al arsénico causa daño genotóxico en las células sanguíneas del pez cebrá.</p> <p><b>El problema secundario</b></p> <p>Está relacionado con la escasez de estudios de genotoxicidad en laboratorios del país. Por lo tanto, se propone utilizar el pez cebrá como modelo animal por sus grandes ventajas en muchos campos de la biología.</p>	<p><b>Objetivo general</b></p> <p>Determinar la CL50 y evaluar la actividad genotóxica del arsénico en los eritrocitos nucleados de la sangre periférica del pez Cebrá como bioindicador.</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <p>Determinar la CL50 del arsénico sobre el pez Cebrá y determinar el daño genotóxico en el núcleo de los eritrocitos producidos por el arsénico en el pez Cebrá mediante el ensayo cometa.</p>	<p>se enfoca en la genotoxicidad, el uso del pez cebrá como modelo animal en la investigación biológica y toxicológica, la toxicidad del arsénico y el ensayo cometa como una herramienta para evaluar el daño en el ADN. Estos conceptos proporcionan una base teórica para comprender y analizar el impacto de sustancias genotóxicas en el ADN y su relevancia en la salud humana y el medio ambiente.</p>	<p><b>Hipótesis nula</b></p> <p>La concentración letal media (CL50) del Arsénico en el pez Cebrá (Danio rerio) fue determinada. La técnica ensayo cometa permite detectar el daño genotóxico por el Arsénico en el pez Cebrá.</p> <p><b>Hipótesis alternativa</b></p> <p>La CL50 del Arsénico en el pez cebrá no fue determinada. La técnica ensayo cometa no permite detectar el daño genotóxico por el Arsénico en el pez Cebrá.</p>	<p><b>Variable independiente</b></p> <p>Concentración de Arsénico y tiempo de exposición al Arsénico.</p> <p><b>Variable dependiente</b></p> <p>Daño genotóxico en el núcleo de los eritrocitos de la sangre del pez Cebrá (<i>Danio rerio</i>).</p>	<p><b>Tipo de Investigación</b></p> <p>Análítico y experimental con ensayos.</p> <p><b>Ámbito temporal y espacial</b></p> <p>Se realizó entre julio del 2016 hasta noviembre del 2017 en el laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la FCNM de la UNFV</p> <p><b>Población y muestra de estudio</b></p> <p>Se compraron 300 especímenes de Pez Cebrá adultos de diversos acuarios del Jr. Ayacucho y se aclimataron a las instalaciones en condiciones controladas del Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la FCNM de la UNFV. Los animales fueron instalados en peceras adaptadas con las condiciones apropiadas y controladas.</p>