

7. ANEXOS

ANEXO I.1. Determinación de proteínas totales por el método Bradford

El ensayo Bradford o azul de Coomassie, descrito por Marion Bradford en 1976, es uno de los métodos más populares para la determinación de la concentración de proteínas. Está basado en la formación de un complejo entre el azul brillante de Coomassie y las proteínas en solución, principalmente a los residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina. Con ello, la concentración de proteínas puede ser medida como la cantidad de colorante presente, que absorbe a una longitud de onda de 592 nm. La reacción por la que tiene lugar esta posible medición de la cantidad de proteínas queda detallada en la Figura I.1. (Kruger, 1994).

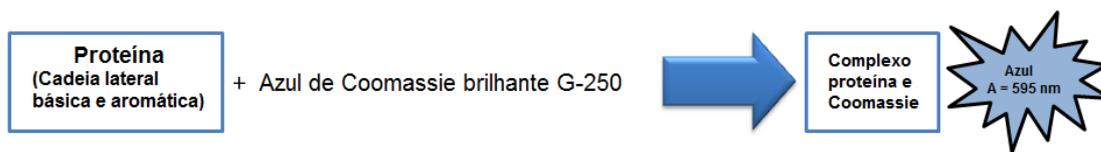


Figura I.1. Representación esquemática de la reacción que tiene lugar en el ensayo de Bradford (Johnson, 2012).

Entre sus ventajas destaca su compatibilidad con agentes reductores empleados para la estabilización de las proteínas en soluciones, los cuales no resultan compatibles en otros métodos de cuantificación tales como el ensayo de Lowry o en ensayo de BCA, además de la posibilidad de medir proteínas de alto peso molecular, ya que el colorante en cuestión (Coomassie) no se une a péptidos de bajo peso molecular (Olson & Markwell, 2007).

ANEXO I.2. Uso del enzima acetilcolinesterasa (AChE)

La acetilcolinesterasa (AChE) pertenece a una familia de enzimas conocidas como colinesterasas, que son un grupo de esterasas de serina capaces de hidrolizar ésteres de colina, tales como la acetilcolina. Estas colinesterasas tienen una amplia distribución, ya que se encuentran presentes en organismos unicelulares, plantas, invertebrados, y en los vertebrados aparece ya en las primeras etapas del desarrollo embrionario, por lo que estas enzimas pueden tener diferentes funciones (Sánchez-Chávez & Salceda, 2008). Es una de las enzimas más cruciales en la respuesta y función nerviosa, encargada de degradar el neurotransmisor acetilcolina (ACh) a colina y ácido acético (Massoulié, 1993).

A partir de esta hidrólisis, las moléculas que son liberadas a las uniones neuromusculares durante los impulsos nerviosos, consiguen detener la transmisión sináptica permitiendo la recepción de impulsos nuevos. Si hay una inhibición en la actividad AChE, ello implica la acumulación de acetilcolina en el espacio sináptico, lo que mantiene la unión neuromuscular en estado permanente de excitación (Zinkl et al., 1991). La neurotransmisión mediada por AChE es crucial para la función del Sistema Nervioso Central (SNC), ya que su interrupción abrupta resulta letal, y su pérdida gradual induce múltiples atrofas, como lo es en la enfermedad del Alzheimer, asociado a un deterioro cognitivo progresivo de la función neuromuscular (Sánchez-Chávez & Salceda, 2008). Además, cabe

destacar que la actividad de la AChE ha sido empleada con éxito, y en combinación con otros biomarcadores bioquímicos, como una robusta herramienta para el diagnóstico de la exposición a diferentes compuestos químicos en numerosos organismos, entre ellos, los peces (Sancho et al., 2000).

ANEXO I.3. Uso del enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima del metabolismo intermedio que se encuentra presente en todas las células del organismo, bajo cinco formas isoenzimáticas diferentes. Sus mayores concentraciones se encuentran en el hígado, corazón, riñón, músculo esquelético y eritrocitos (Navarro et al., 1996). Esta enzima citoplasmática, relacionada con la producción de energía, es una enzima transportadora de oxígeno que juega un relevante papel en la glucólisis, catalizando la conversión reversible de piruvado a lactado (Tietz, 1987).

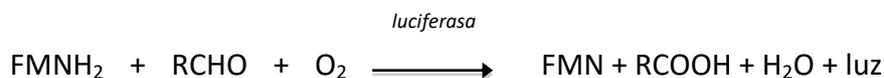
El empleo de este biomarcador está basado en que un supuesto estrés químico generalmente requiere de obtener energía adicional de forma rápida, lo que aumenta la glicólisis anaerobia. Por ello, se han llevado a cabo diferentes estudios en distintos organismos con el fin de observar estos incrementos en la actividad de la LDH, hecho que se intenta también reproducir en el presente trabajo para detectar diferencias significativas, y como con el biomarcador AChE, entre grupos de *O. latipes* expuestos a microcontaminantes y grupos control.

ANEXO II.1. *Vibrio fischeri*

De entre las muchas especies que se emplean en tests de toxicidad que pueden realizarse sobre bacterias, algas, protozoos, crustáceos o peces (EPA, 1993), el bioensayo que incluye la bacteria luminiscente *V. fischeri* destaca por ser uno de los más utilizados dada su elevada estandarización, su alta sencillez y sensibilidad (Kungolos *et al.*, 1999).

V. fischeri es una proteobacteria gram-negativa, anaerobia facultativa, presente en aguas dulces y saladas. En condiciones ambientales favorables, estas bacterias emiten luz naturalmente, requiriendo para ello una concentración de oxígeno superior a 0.5 mg/L (Romero & Cantú, 2008). El uso de estas bacterias para monitorizar la contaminación ambiental se inició en los años 60-70, para la determinación de toxicidad de aguas, sedimentos y productos diversos. Tras ello, los métodos fueron estandarizándose y normalizándose hasta dar con eficientes protocolos (Romero & Cantú, 2008).

Esta bacteria, con frecuencia establece relaciones simbióticas con animales marinos, como el calamar o ciertos peces. Su bioluminiscencia deriva de la expresión de una serie de proteínas contenidas en el operón *lux*. Esta luminiscencia se da cuando la concentración bacteriana es suficiente. Es entonces cuando se produce la reacción química catalizada por la luciferasa, enzima encargada de oxidar compuestos orgánicos, que libera energía libre en forma de luminiscencia, tal y como queda plasmado en la siguiente reacción.



El uso de esta bacteria en ensayos toxicológicos tiene como objetivo medir la luminiscencia emitida por las bacterias *V. fischeri* tras su exposición con una muestra de contaminantes y compararla con la intensidad emitida por bacterias que permanecen en condiciones de crecimiento control. Esto es debido como consecuencia de la carga tóxica a la que le hemos sometido se producen una serie de daños en los procesos metabólicos asociados con la respiración bacteriana, que en final instancia, hace disminuir de forma proporcional la luminiscencia emitida (Romero & Cantú, 2008).

ANEXO II.2. *Pseudokirchneriella subcapitata*

P. subcapitata es un alga verde (clorofita) unicelular cuya morfología recuerda a una media luna, con un volumen de entorno a 40-60 μm^3 , que se encuentra presente en sistemas acuáticos epicontinentales eutróficos y oligotróficos (Romero & Cantú, 2008). Este alga está encargado de producir oxígeno y sustancias orgánicas, que serán utilizadas por otros organismos, incluyendo peces e invertebrados. Es por ello que es un organismo productor (Satyavani *et al.*, 2012).

Si este ecosistema se encuentra alterado debido a la presencia de compuestos químicos que resultan tóxicos para los organismos que habitan en él, ello puede afectar directamente a la estructura y función del mismo, que resulta en un agotamiento del oxígeno y una disminución de la productividad primaria, afectando a la cadena alimentaria del ecosistema acuático (Cetin & Mert, 2006).

Dado que el daño en este organismo productor genera un impacto en el resto del ecosistema, es necesario evaluar el efecto de estos cinco microcontaminantes y la mezcla de los mismos sobre esta especie, para ver, no solo el efecto que tiene sobre la misma, si no también para evaluar el posible riesgo sobre el resto del ecosistema. Este ensayo es apto para ser utilizado por sí mismo, o como parte de una batería de ensayos para estimar el potencial toxicológico de los compuestos en aguas dulces superficiales o subterráneas, entre otros tipos de muestras líquidas. Además, este ensayo destacar por requerir una infraestructura básica en el laboratorio, siendo además sencillo y de bajo coste (Romero & Cantú, 2008). El objetivo del mismo es exponer las células a las muestras que contienen los contaminantes tóxicos para poder ver cómo se ve alterada la tasa de crecimiento de la población de algas, a través de la inhibición del mismo.

ANEXO II.3. *Oryzias latipes*

Los efectos tóxicos de los microcontaminantes pueden ser examinados detectando cambios en el desarrollo fisiológico normal de determinados organismos vertebrados primitivos, como son los peces.

De entre todas las especies, el pez cebra (*Danio rerio*) y el pez medaka (*Oryzias latipes*) destacan por ser organismos modelos con amplias ventajas frente a otros organismos. Entre estas ventajas se incluye el conocimiento completo de su genoma, que comparte además con mamíferos un 20%-40%

del mismo. Además, la puesta de huevos tiene lugar con frecuencia sin dependencia de la estación. Los embriones obtenidos, al ser transparentes, facilitan el seguimiento de la dinámica de formación de sus tejidos y órganos y la observación de anomalías si las hay, como consecuencia de un determinado tratamiento o exposición. A ello cabe sumarle que la maduración sexual de los mismos tarda solo entre 2 y 3 meses, siendo además relativamente poco laborioso. Todo ello permite reducir, no solo el tiempo requerido para obtener individuos adultos, si no también los costes asociados a ello (Lin *et al.*, 2016).

De entre las dos especies barajadas, *D. rerio* y *O. latipes*, finalmente se optó por la segunda, dado que la puesta de huevos resulta más eficiente. Cabe destacar que las condiciones de mantenimiento son fáciles de reproducir y la viabilidad de los embriones es considerablemente buena (Tabla II.3.1).

Tabla II.3.1. Condiciones, duración y supervivencia del ensayo para la especie *O. latipes*. (*OECD Guideline for testing of chemicals. 212., 1998*)

Especie	Temperatura (°C)	Salinidad (o/oo)	Fotoperiodo (horas)	Duración de los estadios (días)		Duración típica del test	Supervivencia del control (% mínimo)	
				Embrión	Alevín		Éxito de eclosión	Post-eclosión
<i>Oryzias latipes</i> (medaka)	23 ± 2	-	12-16	8-11	4-8	Tras la fertilización (estadio temprano de gastrula) hasta 5 días tras la eclosión (13-16 días)	80	80

ANEXO II.4. Líneas celulares de mamíferos (HEK y N2a)

Línea HEK 293

Esta línea recibe el nombre de HEK-293, cuyas siglas corresponden a *Human embryonic Cells*, y el número hace referencia a que fueron obtenidas en el experimento 293avo de Frank Graham en 1977. Estas células embrionarias de riñón humano fueron recolectadas de un feto, aparentemente sano, abortado en Holanda en la década de los 70 (Van der Eb, 2012). Se trata de una línea celular ampliamente empleada en estudios de bioquímica, sobre el uso de adenovirus como vectores. Además, también actúan como vehículos de expresión en proteínas recombinantes.

Además, investigaciones toxicológicas de diferentes compuestos químicos presentes en la bibliografía (Arora *et al.*, 2016; Mallebra Simarro, 2016), entre otros, hacen de esta línea celular, una buena opción para el estudio toxicológico en células humanas de los cinco contaminantes emergentes de interés del presente trabajo.

Línea N₂a

La línea celular Neuroblastoma 2a (Neuro 2^a o N2a), son células que pertenecen al neuroblastoma cerebral de un ratón albino, que proviene de un tumor espontáneo de la especie *Mus musculus*, que se caracteriza por tener un crecimiento adherentes y por poseer una morfología neuronal ameboidal.

Cabe destacar que el sistema nervioso puede ser susceptible a múltiples efectos tóxicos debido a la exposición a compuestos químicos. Según la EPA, entre el 3 y el 28% de los compuestos químicos son potencialmente neurotóxicos (US EPA, 1998). Por ello, muchos trabajos se centran en la evaluación, descripción y utilización de métodos *in vitro*, que permitan, de forma alternativa al empleo de animales, la investigación en el campo de la neurotoxicología en cultivos primarios de células (Monell, 2007). Es por ello, y debido también a su amplia versatilidad y su fácil crecimiento, que han sido objeto de estudio en un gran número investigaciones, y una herramienta para conocer los efectos citotóxicos de los cinco microcontaminantes de estudio del presente trabajo.

ANEXO III. Procesamiento de los resultados

ANEXO III.1. Procesamiento de resultados de *V. fischeri*

Con los datos de luminiscencia obtenidos del ensayo con *V. fischeri* se procede a calcular los siguientes parámetros para conocer el efecto inhibitor que tienen los compuestos de ensayo sobre la bacteria luminiscente.

- i. Factor de correlación (valores f_{kt}): se obtiene a partir de la intensidad de luminiscencia medida utilizando la ecuación (i), con el fin de corregir los valores iniciales I_0 de todas las muestras de ensayos para poder determinar la disminución de la luminiscencia provocada por la exposición al microcontaminante.

$$f_k = I_{kt}/I \quad (t= 30 \text{ minutos}) \quad (i)$$

Donde,

F_{kt} es el factor de correlación para el tiempo de contacto de 30 minutos

I_{kt} es la intensidad de luminiscencia en la muestra control tras un tiempo de contacto de 30 minutos, en unidades de luminiscencia relativa

I_0 es la intensidad de luminiscencia de la suspensión bacteriana del ensayo control, tras el acondicionamiento que tiene lugar durante 15 minutos, y antes de que se añada la solución con el microcontaminante, en unidades de luminiscencia relativa.

Con la siguiente ecuación (ii) se calcula el factor de correlación medio (\bar{f}_{kt}) y los valores individuales con respecto a la media, dándonos una cifra significativa en tanto por ciento.

$$[\bar{f}_{kt} \pm f_{kti} / \bar{f}_{kt}] \times 100 \quad (ii)$$

Donde,

f_{kti} es un de los valores individuales del factor de correlación

\bar{f}_{kt} es el valor medio del factor de correlación

Una vez hallado el factor de correlación medio se procede a calcular el valor I_{ct} .

Valor I_{ct} : se trata del valor corregido de I_0 para las microplacas de ensayo, inmediatamente antes de que se añada la muestra de ensayo, y que se obtiene a partir de la ecuación (iii).

$$I_{ct} = I_0 \times \bar{T}_{kt} \quad (\text{iii})$$

Donde,

\bar{T}_{kt} , visto anteriormente, es la media de los valores f_{ki}

I_0 es la intensidad de luminiscencia de la suspensión del ensayo control, inmediatamente antes de proceder a añadir la muestra que contiene el microcontaminante, en unidades de luminiscencia relativa

I_{ct} es el valor corregido de I_0 de los pocillos de la microplaca, inmediatamente antes de añadir la muestra de ensayo que posee el microcontaminante

Después se procede a calcular el efecto inhibitor de la muestra de ensayo a partir de la ecuación (iv)

$$H_t = [(I_{ct} - I_t) / I_{ct} \times 100] \quad (\text{iv})$$

Donde,

H_t es el efecto inhibitor de la muestra de ensayo, tras un tiempo de contacto de 30 minutos, expresado en tanto por ciento I_{ct} véase en la ecuación iii

I_t es la intensidad de luminiscencia de la muestra de ensayo, transcurridos los 30 minutos de tiempo de contacto, en unidades de luminiscencia relativa

Conociendo los valores de H_t para cada una de las réplicas de una misma dilución, se procede a calcular la media del efecto inhibitor para cada una de las diluciones ensayadas (\bar{H}_t).

Seguidamente, para evaluar las relaciones concentración/efecto (CE), se calcula, para cada dilución, el valor gamma con la siguiente ecuación (v).

$$\Gamma_t = [\bar{H}_t / (100 - \bar{H}_t)] \quad (\text{v})$$

Donde,

Γ_t es el valor gamma de la muestra de ensayo tras un tiempo de contacto de media hora.

\bar{H}_t es la media de H_t .

ANEXO III.2. Procesamiento de resultados de *P.subcapitata*

A partir de los datos de fluorescencia obtenidos, éstos son transformados a valores de concentración celular (N° células/mL), con ayuda de una curva de calibrado que ha de obtenerse previamente.

Esta curva de calibrado se obtiene llenando las microplacas de forma manual, hasta un volumen de 300 μ L/pocillo y con ayuda de una pipeta multicanal, con las diluciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512, procedentes de un cultivo de algas en fase exponencial de crecimiento. A continuación se mide la fluorescencia a las longitudes de onda de 430 nm (excitación) y 663 nm (emisión). Además, se procede a realizar un recuento del número de células por cada dilución, con la cámara cuenta glóbulos Neubauer, a un aumento de 40X en el microscopio óptico, para finalmente obtener la curva de calibrado que representa fluorescencia vs concentración celular (III.1).

Tabla III.1. Ecuación de regresión lineal obtenida de la curva de calibrado para el ensayo de toxicidad de *P. subcapitata*.

Organismo de ensayo	Ecuación de regresión	R ²
<i>P. subcapitata</i>	$y = 129.27x + 6971.7$	0.99

Donde,

$y = N^{\circ}$ células/mL

$x =$ valores de fluorescencia para las diluciones obtenidas de un cultivo madre en fase exponencial de *P. subcapitata*

R² = coeficiente de determinación ($p < 0.005$)

Con los valores de concentración celular obtenidos en el presente ensayo de toxicidad, de cada dilución del microcontaminante y del control, se calculan las curvas de crecimiento y los porcentajes de inhibición del crecimiento del alga, para los diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas). Con el fin de conocer el efecto que tienen muestras de ensayo sobre el crecimiento del alga, dicho efecto se determina por el método de comparación de áreas bajo las curvas de crecimiento, atendiendo a la ecuación (vi).

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{(n-1)} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{(n-1)}) \quad (vi)$$

Donde,

A = área bajo la curva de crecimiento

$N_0 = N^{\circ}$ de células/mL nominal a t_0

$N_1 = N^{\circ}$ de células/mL a un tiempo t_1

$N_n = N^{\circ}$ de células/mL a un tiempo t_n

$t_1 =$ tiempo de la primera medida tras el comienzo del ensayo

$t_n =$ tiempo de la n -ésima medida tras el comienzo del ensayo

Con el fin de calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento del alga para cada dilución de la muestra ensayada (I_A) se procede a calcular la diferencia entre el área bajo la curva del crecimiento del control (A_c) y el área bajo la curva de crecimiento del alga con la dilución del microcontaminante (A_t).

ANEXO IV. Gráficos del modelo ajustado del análisis de regresión avanzada probit para *Oryzias latipes* con límites al confianza de 95%, en los cinco microcontaminantes de estudio.

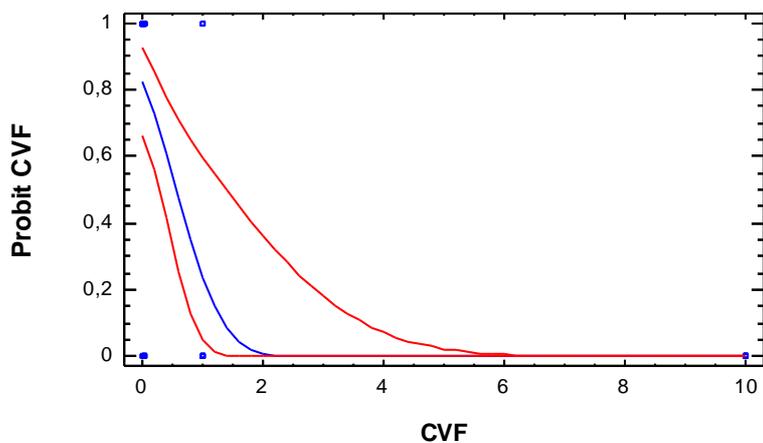


Figura IV.1. Gráfico del modelo ajustado del análisis de regresión avanzada probit en *Oryzias latipes*, para el microcontaminante CVF.

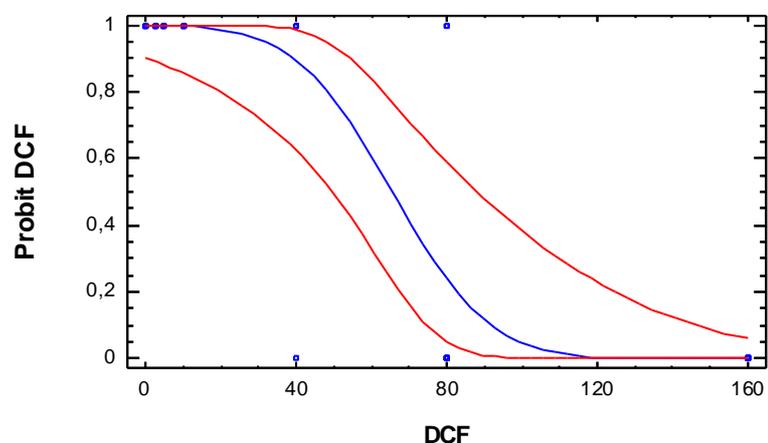


Figura IV.2. Gráfico del modelo ajustado del análisis de regresión avanzada probit en *Oryzias latipes*, para el microcontaminante DCF.

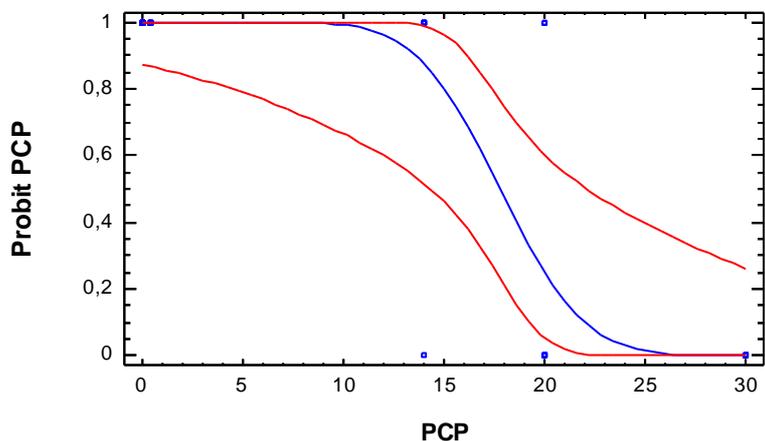


Figura IV.3. Gráfico del modelo ajustado del análisis de regresión avanzada probit en *Oryzias latipes*, para el microcontaminante PCP.

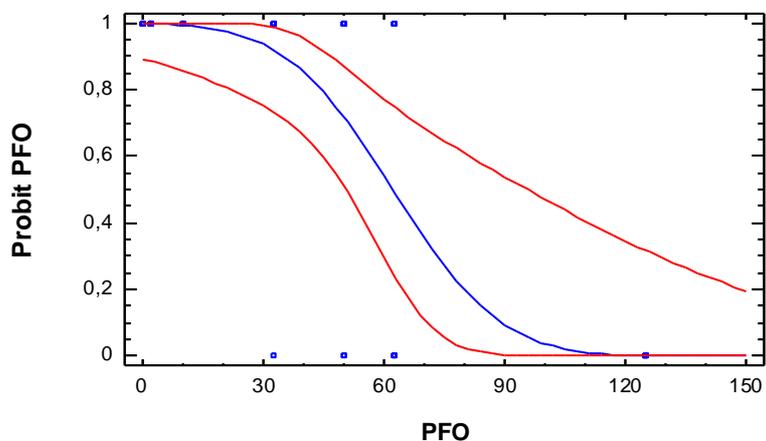


Figura IV.4. Gráfico del modelo ajustado del análisis de regresión avanzada probit en *Oryzias latipes*, para el microcontaminante PFO.

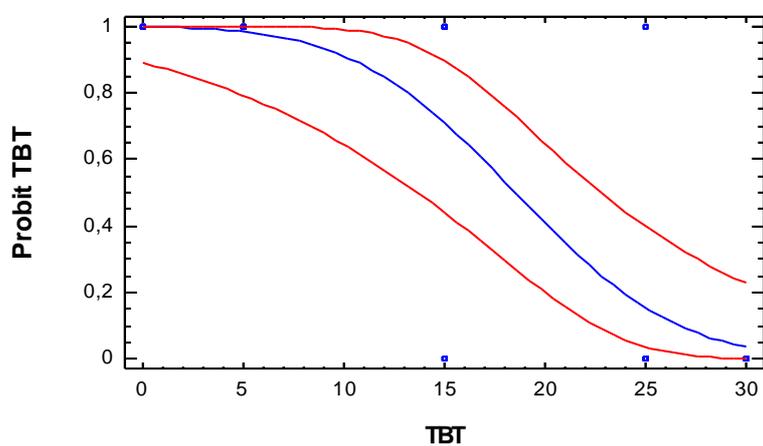


Figura IV.5. Gráfico del modelo ajustado del análisis de regresión avanzada probit en *Oryzias latipes*, para el microcontaminante TBT.

ANEXO V. Valores PEC/PNEC según la directriz DOCE NºL/ 161/9 (1994)
Tabla V.1. Valores PEC/PNEC para los cinco microcontaminantes de estudio.

Compuesto químico	Organismo	PEC/PNEC (PNEC = NOEC/100)	PEC/PNEC (PNEC = EC ₅₀ /1000)
CVF	<i>V. fischeri</i>	4.3E ⁻⁰³	3.6E ⁻⁰³
	<i>P. subcapitata</i>	2.0E ⁻⁰³	1.1E ⁻⁰²
	<i>O. latipes</i>	-	0.18
	Línea celular HEK	2.6E ⁻⁰³	2.7 E ⁻⁰³
	Línea celular N2a	1.3E ⁻⁰³	2,41E-03
DFC	<i>V. fischeri</i>	1.5E ⁻⁰³	8.9 E ⁻⁰³
	<i>P. subcapitata</i>	1.6E ⁻⁰²	4.4 E ⁻⁰²
	<i>O. latipes</i>	-	1.5 E ⁻⁰³
	Línea celular HEK	13E ⁻⁰⁴	1.8 E ⁻⁰⁴
	Línea celular N2a	5.1E ⁻⁰⁴	7.3 E ⁻⁰⁵
PCP	<i>V. fischeri</i>	5.7E ⁻⁰¹	9.8 E ⁻⁰⁵
	<i>P. subcapitata</i>	3.2E ⁻⁰¹	449.4
	<i>O. latipes</i>	-	2.3 E ⁻⁰²
	Línea celular HEK	5.1E ⁻⁰³	5.2 E ⁻⁰³
	Línea celular N2a	5.1E ⁻⁰³	9.8 E ⁻⁰³
PFO	<i>V. fischeri</i>	1.3E ⁻⁰⁶	-
	<i>P. subcapitata</i>	2.1E ⁻⁰⁵	6.9 E ⁻⁰⁵
	<i>O. latipes</i>	-	1.0 E ⁻⁰⁵
	Línea celular HEK	3.1E ⁻⁰⁶	5.1 E ⁻⁰⁶
	Línea celular N2a	6.1E ⁻⁰⁶	1.7 E ⁻⁰⁵
TBT	<i>V. fischeri</i>	3.1E ⁻⁰³	5.8 E ⁻⁰³
	<i>P. subcapitata</i>	7.8E ⁻⁰²	31.0
	Línea celular N2a	-	3.5 E ⁻⁰³
	<i>V. fischeri</i>	2.1 E ⁻⁰⁴	4.7 E ⁻⁰⁴
	<i>O. latipes</i>	6.6 E ⁻⁰³	6.0 E ⁻⁰³

ANEXO VI. Resultados de los índices de riesgo por descarga directa y a escala local.
Tabla VI.1. Índices de riesgo por descarga directa y a escala global para los cinco microcontaminantes.

Compuesto químico	Organismo	Índice de riesgo por descarga directa	Índice de riesgo a escala local
CVF	<i>V. fischeri</i>	0.0	3.0
	<i>P. subcapitata</i>	0.0	3.0
	<i>O. latipes</i>	0.0	3.0
	Línea celular HEK	0.0	3.0
	Línea celular N2a	0.0	3.0
DFC	<i>V. fischeri</i>	0.0	5.0
	<i>P. subcapitata</i>	0.0	5.0
	<i>O. latipes</i>	0.0	5.0
	Línea celular HEK	0.0	5.0
	Línea celular N2a	0.0	5.0
PCP	<i>V. fischeri</i>	2.5	6.3
	<i>P. subcapitata</i>	10.0	10.0
	<i>O. latipes</i>	0.0	5.0
	Línea celular HEK	0.0	5.0
	Línea celular N2a	0.0	5.0
PFO	<i>V. fischeri</i>	-	-
	<i>P. subcapitata</i>	0.0	3.0
	<i>O. latipes</i>	0.0	3.0
	Línea celular HEK	0.0	3.0
	Línea celular N2a	0.0	3.0
TBT	<i>V. fischeri</i>	0.0	3.0
	<i>P. subcapitata</i>	10.0	6.0
	Línea celular N2a	0.0	3.0
	<i>V. fischeri</i>	0.0	3.0
	<i>O. latipes</i>	0.0	3.0