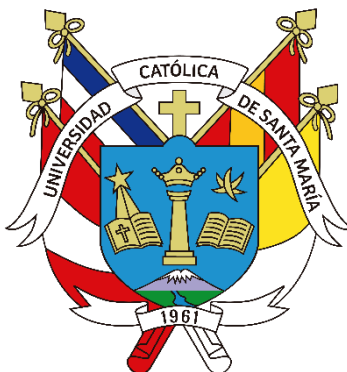


Universidad Católica de Santa María

Facultad de Arquitectura e Ingenierías Civil y del Ambiente

Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental



**Evaluación ecotoxicoproteómica y riesgo ecotoxicológico del boro en
el modelo acuático *Danio rerio* “Pez Cebra”**

Tesis presentada por las Bachilleres:

Campana Fuentes, Paola Candelaria

ORCID: 0009-0003-3633-7385

Cota Ramos, Astrid Yanira

ORCID: 0009-0001-8021-0942

para optar el Título Profesional de Ingeniero Ambiental

Asesor:

Dr. Arenazas Rodríguez, Armando Jacinto

ORCID: 0000-0002-0940-2204

Arequipa - Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA AMBIENTAL

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 02 de Julio del 2024

Dictamen: 010519-C-EPIA-2024

Visto el borrador del expediente 010519, presentado por:

2015100352 - CAMPANA FUENTES PAOLA CANDELARIA

2015601552 - COTA RAMOS ASTRID YANIRA

Titulado:

**EVALUACIÓN ECOTOXICOPROTEÓMICA Y RIESGO ECOTOXICOLÓGICO DEL BORO EN EL
MODELO ACUÁTICO DANIO RERIO "PEZ CEBRA"**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO AMBIENTAL

**29727348 - LAZARTE ARREDONDO SONIA
DICTAMINADOR**



**43238145 - BENEGAS LLANOS ROSARIO CAROLINA
DICTAMINADOR**



**E0085162 - COLINA ANDRADE GILBERTO DE JESUS
DICTAMINADOR**



Evaluación ecotoxicoproteómica y riesgo ecotoxicológico del boro en el modelo acuático Danio rerio "Pez Cebra"

INFORME DE ORIGINALIDAD

23%

INDICE DE SIMILITUD

23%

FUENTES DE INTERNET

8%

PUBLICACIONES

18%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	12%
2	repositorio.uap.edu.pe Fuente de Internet	4%
3	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	dspace.uclv.edu.cu Fuente de Internet	1%
5	revistanefrologia.com Fuente de Internet	1%
6	gestop.pe Fuente de Internet	1%
7	repositorio.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
8	Submitted to University of Birmingham Trabajo del estudiante	1%

Dedicatoria

A Dios, por guiarme en cada paso que doy, por ser mi fortaleza y por su inmenso amor.

A mis padres, Imelda y Víctor, por su amor y sus palabras de aliento, sin ellos no habría podido superar los obstáculos que se atravesaron en este camino de aprendizaje. Este logro es un testimonio de su inmenso amor, esfuerzo y dedicación.

A mi papá German, quien desde el cielo me guía en cada paso de este camino. Tu espíritu y tus enseñanzas seguirán vivos en mí, gracias por tu sabiduría, por tus palabras de aliento y por inspirarme a dar lo mejor de mí en todo momento.

A mi mamá Graciela, por enseñarme el camino de la vida, por sus consejos, por el amor que me ha dado y su apoyo incondicional.

A mi hermana Islady, quien es mi mejor amiga, por ser mi ejemplo y mi guía en cada paso que doy.

A mis prima Pamela, por ser fuente constante de alegría y felicidad, su amor y amistad son de gran valor para mí.

A mi amiga Astrid, por ser parte de este proceso, por compartir conmigo sus conocimientos, su tiempo y su valiosa amistad.

Paola Candelaria Campana Fuentes

A mi mamá Elena en el cielo, quien siempre será mi ejemplo de amor, valentía, dedicación y fortaleza; y que estoy segura me acompaña e ilumina mi camino día a día.

A mi padre Efraín, quien es mi apoyo incondicional y fuente de sabiduría, ya que me aconseja y guía de la mejor manera.

A mi hermanita Karla, quien es mi mayor impulso y gran motivo para salir adelante.

A mi mejor amiga Paola, quien siempre ha estado para mí brindándome su amistad sincera y verdadera; así como a su familia quienes en todo momento me han hecho sentir en casa.

A mis familiares y amistades, quienes son un gran soporte en mi vida.

Astrid Yanira Cota Ramos

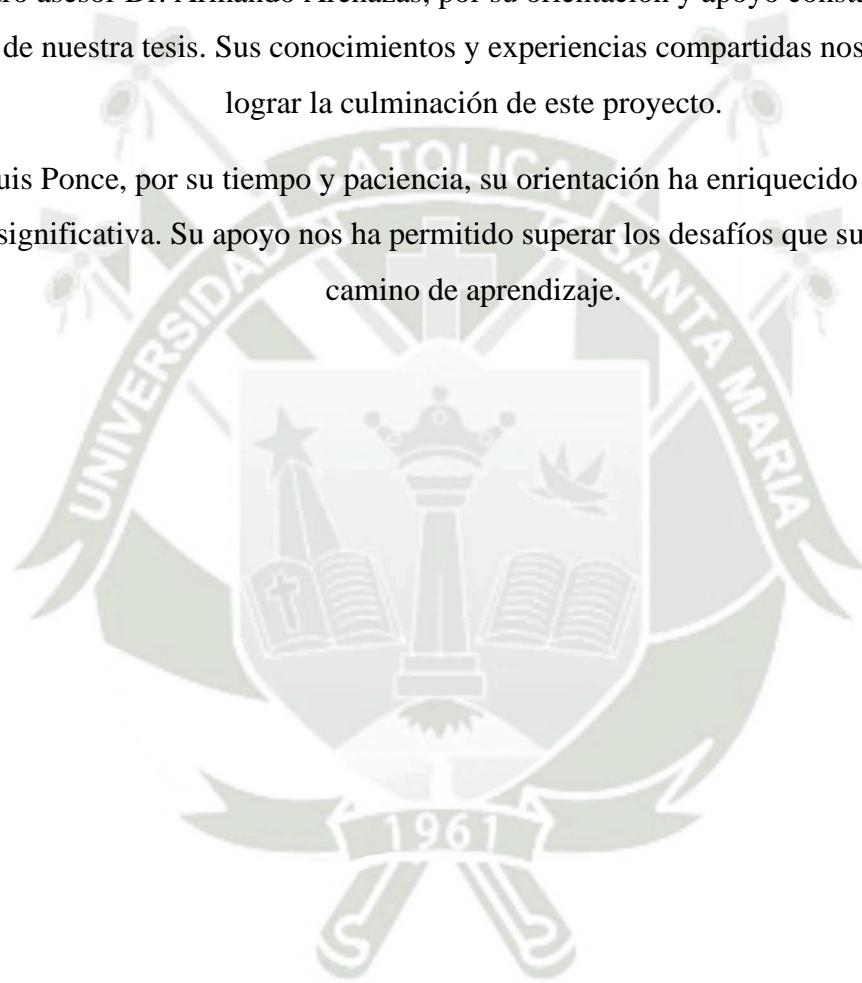
Agradecimiento

A la Universidad Católica de Santa María, por brindarnos una formación académica integral.

A los docentes de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, por sus enseñanzas y las experiencias compartidas que han fortalecido nuestra formación académica, proporcionándonos una base sólida para enfrentar los desafíos futuros.

A nuestro asesor Dr. Armando Arenazas, por su orientación y apoyo constante durante el proceso de nuestra tesis. Sus conocimientos y experiencias compartidas nos han permitido lograr la culminación de este proyecto.

Al Dr. Luis Ponce, por su tiempo y paciencia, su orientación ha enriquecido nuestra tesis de manera significativa. Su apoyo nos ha permitido superar los desafíos que surgieron en este camino de aprendizaje.



RESUMEN

La investigación se llevó cabo en los laboratorios de investigación de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa y se evaluó la aproximación ecotoxicoproteómica y el riesgo ambiental del boro en el organismo modelo acuático *Danio rerio* "pez cebra". Se realizó un bioensayo agudo (96 h) con el organismo modelo *Danio rerio* "pez cebra" con tres dosis de boro (4, 8 y 12 mg/L) y un control con agua declorinada y se determinaron valores porcentuales de los efectos letales y subletales diariamente, además de índices ecotóxicos, al final del bioensayo se extrajo el hígado para la evaluación de aproximación proteómica por electroforesis bidimensional (SDS-PAGE 2D).

Los resultados determinan que *Danio rerio*, no registró efectos letales (mortalidad) por exposición a diferentes tratamientos de boro (4, 8 y 12 mg/L), pero sí generó dos efectos subletales; hipoactividad con $53.57 \pm 31.68\%$ y escape al fondo con $57.14 \pm 43.64\%$ en el tratamiento mayor de 12 mg/L de boro.

El cociente de riesgo (QR) calculado, indica que el boro, para los dos efectos subletales evaluados en el organismo modelo *Danio rerio*, corresponden a un riesgo *medio*.

La evaluación de la aproximación ecotoxicoproteómica de hígado de *Danio rerio* "pez cebra", determina la ausencia o no expresión de dos enzimas hepáticas en los organismos modelo expuestos a boro (4, 8 y 12 mg/L), la Gamma-glutamil transferasa (GGT) y Aspartato aminotransferasa (AST), moléculas orgánicas que son biomarcadores de detoxificación, acción antioxidante y de daño hepático. Predecimos que la presencia excesiva y constante de boro en ecosistemas acuáticos, puede llevar a la muerte a los organismos en un corto tiempo.

Palabras clave: ecotoxicoproteómica, riesgo ambiental, *Danio rerio*, Gamma-glutamil transferasa, Aspartato aminotransferasa.

ABSTRACT

The research was carried out in the research laboratories of the Catholic University of Santa María from Arequipa and the ecotoxicoproteomic approach and the environmental risk of boron in the aquatic model organism *Danio rerio* "zebrafish" were evaluated. An acute bioassay was carried out (96h) with the model organism *Danio rerio* "zebrafish" with three doses of boron (4, 8 and 12 mg/L) and a control with dechlorinated water and percentage values of the lethal and sublethal effects were determined daily, in addition to ecotoxic indices, At the end of the bioassay, the liver was removed for evaluation of the proteomic approach by two-dimensional electrophoresis (2D SDS-PAGE).

The results determine that *Danio rerio* did not register lethal effects (mortality) due to exposure to different boron treatments (4, 8 and 12 mg/L), but it did generate two sublethal effects; hypoactivity with $53.57 \pm 31.68\%$ and escape to the bottom with $57.14 \pm 43.64\%$ in the treatment greater than 12 mg/L of boron.

The calculated risk quotient (QR) indicates that boron, for the two sublethal effects evaluated in the model organism *Danio rerio*, correspond to a medium risk.

The evaluation of the ecotoxiproteomic approach of the liver of *Danio rerio* "zebrafish" determines the absence or non-expression of two liver enzymes in model organisms exposed to boron (4, 8 and 12 mg/L), Gamma-glutamyl transferase (GGT) and Aspartate aminotransferase (AST), organic molecules that are biomarkers of detoxification, antioxidant action and liver damage. We predict that the excessive and constant presence of boron in aquatic ecosystems can lead to the death of organisms in a short time.

Keywords: ecotoxicoproteomics, environmental risk, *Danio rerio*, Gamma-glutamyl transferase, Aspartate aminotransferase

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN..... 1

CAPÍTULO I..... 2

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... 3

1.1. Problemática de la investigación 3

1.2. Justificación 4

1.3. Objetivos 6

1.4. Hipótesis..... 7

CAPÍTULO II..... 8

2. FUNDAMENTO TEÓRICO..... 9

2.1. Antecedentes de la investigación..... 9

2.2. Marco teórico 12

2.3. Marco legal 21

CAPÍTULO III..... 24

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN 25

3.1. Tipo y nivel de la investigación 25

3.2. Diseño de la investigación..... 25

3.3. Área de estudio y material biológico 25

3.4. Evaluación del riesgo y rangos de toxicidad por efecto a la exposición del boro en el modelo *Danio rerio* “pez cebra..... 26

3.5. Evaluación por aproximación ecotoxicoproteómica por efecto a la exposición del boro en el modelo *Danio rerio*. 28

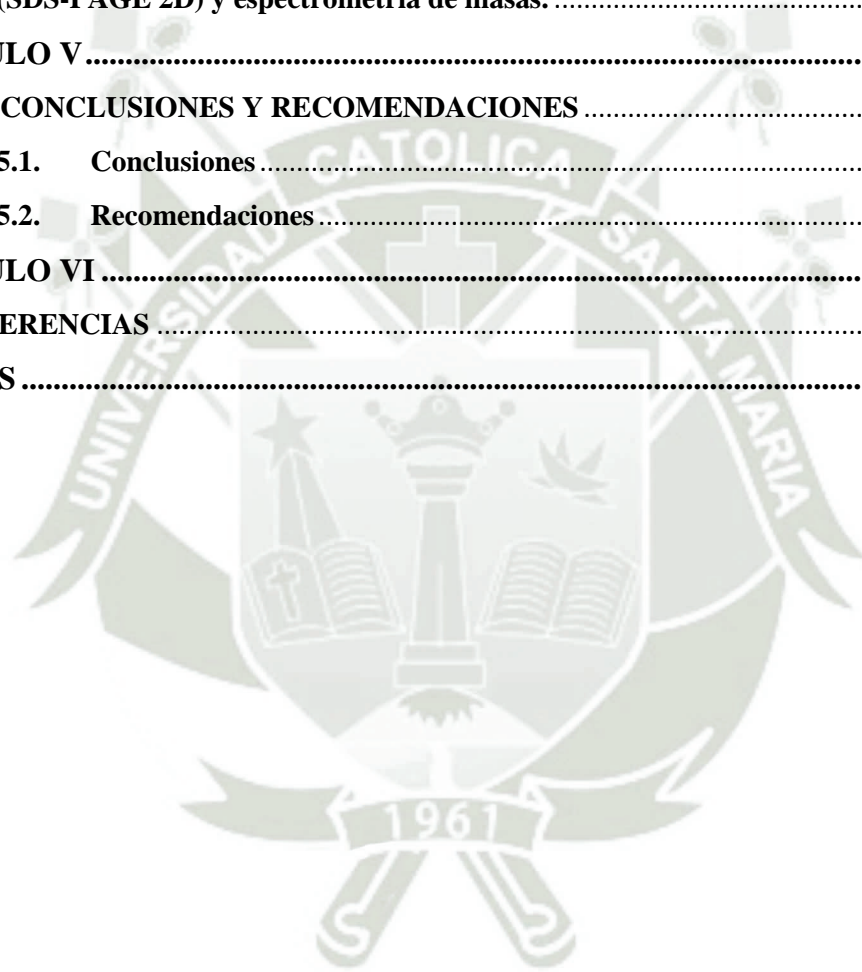
3.6. Electroforesis bidimensional 2D SDS-PAGE 28

3.7. Parámetros UPCC-Xevo G2-XS QTOF para los estudios de espectrometría de masas..... 29

3.8. Procesamiento estadístico..... 30

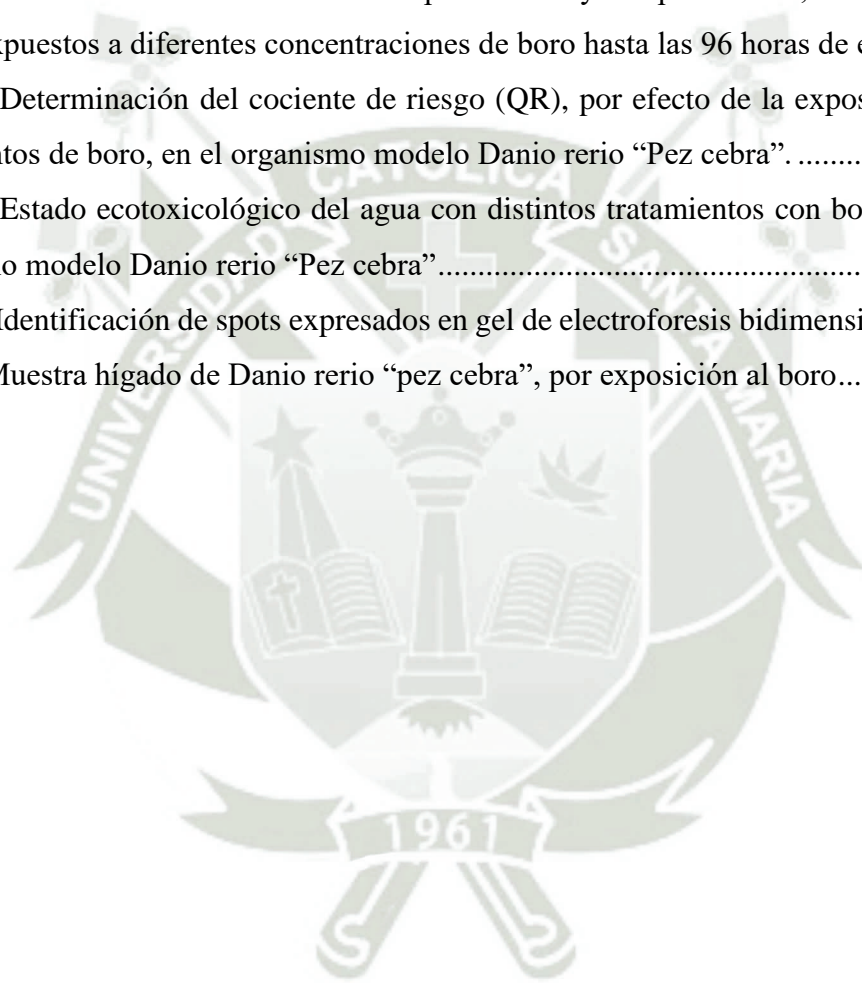
CAPÍTULO IV 31

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
4.1. Determinación de los efectos letales y subletales e índices ecotóxicos provocados por la exposición aguda de boro, sobre el organismo modelo acuático <i>Danio rerio</i> "pez cebra"	32
4.2. Determinación del riesgo y rangos de toxicidad por efecto a la exposición del boro en el modelo <i>Danio rerio</i> "Pez cebra".	38
4.3. Evaluación de la aproximación proteómica por efecto del boro en el organismo modelo acuático <i>Danio rerio</i> "Pez cebra" por electroforesis bidimensional (SDS-PAGE 2D) y espectrometría de masas.	39
CAPÍTULO V	47
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
5.1. Conclusiones	48
5.2. Recomendaciones	49
CAPÍTULO VI	50
REFERENCIAS	51
ANEXOS	58



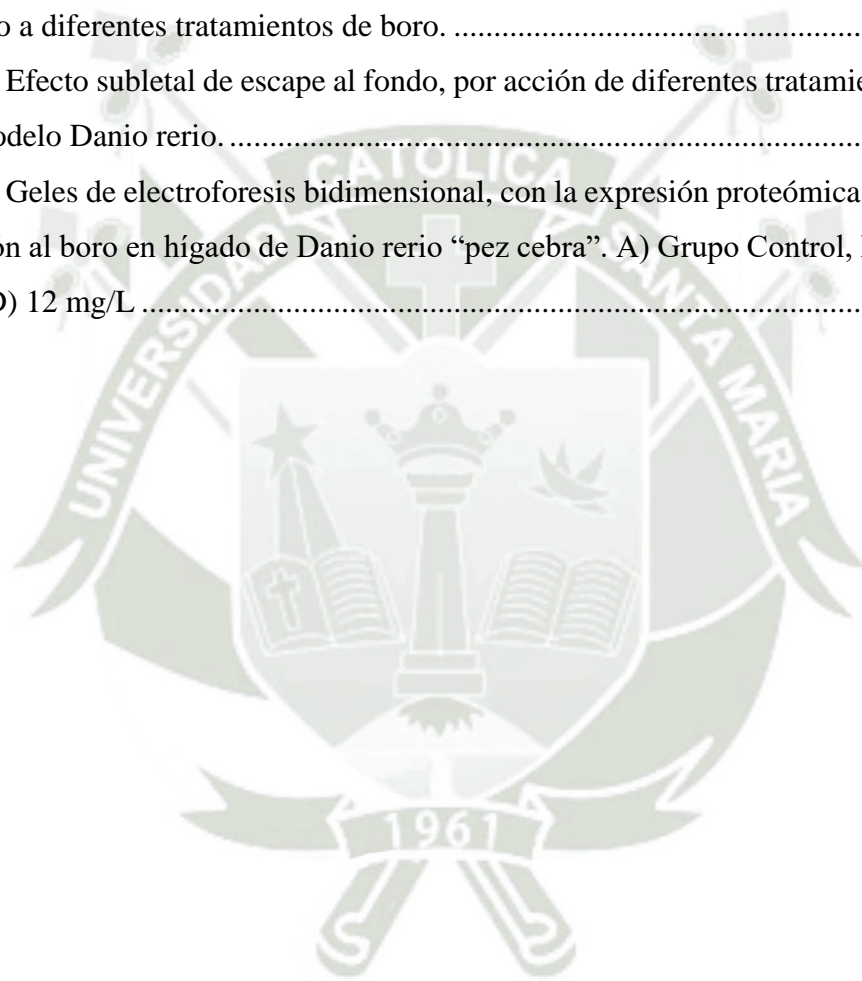
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Operacionalización de variables.....	7
Tabla 2 Clasificación de riesgo ecotoxicológico de una sola sustancia y mezclas, basada en el cociente de riesgo (QR).....	27
Tabla 3 Clasificación según Unidades de Toxicidad Aguda (UTa).....	27
Tabla 4 Rangos y estados de ecotoxicidad de agua de exposición	28
Tabla 5 Efectos subletales evaluados de hipoactividad y escape al fondo, en Danio rerio “Pez cebra” expuestos a diferentes concentraciones de boro hasta las 96 horas de exposición....	37
Tabla 6 Determinación del cociente de riesgo (QR), por efecto de la exposición de cuatro tratamientos de boro, en el organismo modelo Danio rerio “Pez cebra”.	38
Tabla 7 Estado ecotoxicológico del agua con distintos tratamientos con boro (mg/L) en el organismo modelo Danio rerio “Pez cebra”	39
Tabla 8 Identificación de spots expresados en gel de electroforesis bidimensional (2D) SDS-PAGE. Muestra hígado de Danio rerio “pez cebra”, por exposición al boro.....	41



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Evaluación a través del tiempo del efecto subletal de hipoactividad en <i>Danio rerio</i> por efecto a diferentes tratamientos de boro.	33
Figura 2 Efecto de hipoactividad por acción de diferentes tratamientos de boro en el pez modelo <i>Danio rerio</i>	34
Figura 3 Evaluación a través del tiempo del efecto subletal de escape al fondo en <i>Danio rerio</i> por efecto a diferentes tratamientos de boro.	35
Figura 4 Efecto subletal de escape al fondo, por acción de diferentes tratamientos de boro en el pez modelo <i>Danio rerio</i>	36
Figura 5 Geles de electroforesis bidimensional, con la expresión proteómica por efecto de la exposición al boro en hígado de <i>Danio rerio</i> “pez cebra”. A) Grupo Control, B) 4 mg/L, C) 8 mg/L y D) 12 mg/L	40



ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación para el calculo del cociente de riesgo.	26
Ecuación 2. Ecuación para el Cálculo de Unidades de Toxicidad Aguda.....	27



INTRODUCCIÓN

En Perú, la contaminación por metales ha tenido un impacto negativo en la salud de la población, y se estima que más de 250 mil personas están expuestas a este problema. En el sur del país, la contaminación por metales tiene un origen natural vinculado a la actividad volcánica en las regiones de Tacna, Moquegua, Puno y Arequipa. La contaminación por la actividad humana se ha reportado en los departamentos de Huancavelica y Junín, como resultado de la explotación de plomo, plata, cobre y zinc (Trelles, 2013).

Los cambios globales están exponiendo cada vez más a los sistemas acuáticos a diversos factores estresantes, sin embargo, predecir sus efectos sobre los organismos acuáticos a distintos niveles biológicos sigue siendo un reto (Gandar et al., 2017).

La calidad del agua puede verse alterada por la contaminación de origen antropogénico, es decir, por los vertidos líquidos urbanos e industriales sin tratamiento previo, por los arrastres de fertilizantes hacia los cauces, por los productos utilizados en la agricultura y por las propiedades de los suelos del lugar, estos son los principales causantes de la contaminación. Además, la calidad del agua influye directamente en la conservación de los ecosistemas y el bienestar humano, los cuales han sufrido un deterioro en diferentes magnitudes en el país debido al crecimiento de la población, la gestión de los recursos y las actividades industriales de sectores productivos como: minero-energético, hidrocarburos, agrícola, pesquero, saneamiento y otros sectores (ANA, 2018). La contaminación provoca el deterioro de los componentes ambientales, lo que permite que ciertas disciplinas aplicadas evalúen el grado de equilibrio a nivel de ecosistemas (Argota y Iannacone 2018).



1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Problemática de la investigación

El boro es un metaloide, un elemento que posee propiedades metálicas como no metálica. Es inodoro y sólido, aunque también puede tener la apariencia de un polvo de color marrón. Tiene propiedades semiconductoras y es sumamente difícil de obtener en su estado puro, debido a su elevado punto de fusión (2167 ° C) (Navinta y Condori, 2016).

Liu et al. (2022) señalan que este metaloide es uno de los compuestos que genera mayor preocupación, ya que su presencia en el medio acuático constituye un riesgo sobre el ambiente, la salud humana, los cultivos y los animales, con efectos a largo plazo. El boro ingresa mediante la extracción de minerales, la quema de carbón, el vertido de aguas residuales, el uso de fertilizantes, la quema de madera tratada con boruro, entre otros.

La Región de Arequipa es una de las principales reservas de mineral de boro, donde operan empresas procesadoras de boratos, tal es el caso de la mina INKABOR, quien le confiere al boro diversos usos, tales como fertilizantes, inhibidores de corrosión, preservantes de madera, productos farmacéuticos y cosméticos, pesticidas, retardantes de flama, entre otros (Delgado & Huanca, 2018). En la actualidad, la implementación de nuevas tecnologías y el cambio de actividades productivas por extractivas están generando impactos ambientales, sociales y económicos que van modificando este geosistema y poniendo en vulnerabilidad su intangibilidad. Estas situaciones probablemente se originan debido a la ausencia de políticas de saneamiento ambiental, lo que ocasiona la contaminación de las zonas urbanas colindantes a estas empresas (Polanco y Umiyauri, 2019).

Bellido (2021) en sus estudios ha determinado que las evaluaciones del agua subterránea del remanso de Characato muestran concentraciones de boro entre 2.96 mg/L a 3.43 mg/ L, valores que fueron encontrados en las estaciones de monitoreo de Yumina y Bautista, los cuales exceden los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) de agua actuales; así mismo se considera que el territorio Arequipeño, está ubicado en una zona volcánica con fenómenos geotérmicos, lo cual al ser una fuente de boro podría incrementar la presencia del mismo en aguas subterráneas.

Así mismo el boro se encuentra en el principal río de la ciudad, el Chili y también en la cuenca media de Tambo (Islay) en ambos casos de manera excesiva, en este último caso llegando a registrar valores de 3.86 a 4.559 mg/L, de acuerdo a los estándares nacionales, ECA cat. 3, que permiten valores máximos entre 1 y 5 mg/L para riego de vegetales y bebida de animales respectivamente (Decreto Supremo N° 077-2024-PCM, 2024).

Da Silva et al. (2015) afirma que ante el gran problema relacionado con la contaminación a la que están expuestos los ríos, embalses y aguas subterráneas, los monitoreos se realizan con la finalidad preventiva y correctiva, y los ensayos ecotoxicológicos son poderosas herramientas para evaluar la calidad de sus aguas, utilizando organismos de ensayo como bioindicadores de los tóxicos de diferentes lugares, en este caso con el biomonitor u organismo modelo acuático el pez cebra *Danio rerio*.

1.2. Justificación

1.2.1. Ambiental

La utilización de especies acuáticas, permite evaluar el efecto de sustancias químicas y nocivos en organismos vivos. Las evaluaciones ecotoxicológicas cuantifican las concentraciones letales de un contaminante sobre una especie específica, mientras que las evaluaciones de toxicidad, que emplean tóxicos de referencia (contaminantes) en condiciones de laboratorio, se han utilizado en los últimos años debido a la brevedad con la que se obtienen los resultados, principalmente sobre la concentración letal media (CL50) y los efectos subletales que afectan de manera negativa a la biota en los ambientes acuáticos (Iannacone et al., 2007). La proteómica es de particular interés para la ecotoxicología, debido a que implica el estudio de las proteínas, las cuales son los agentes del cambio biológico que crean la respuesta de un organismo a la presión tóxica (Gouveia et al., 2019).

1.2.2. Social

Al obtener los resultados de la investigación, podríamos conseguir referencias sobre los daños causados, lo que nos permitiría tomar medidas frente a la contaminación por boro en aguas, dado que, si las concentraciones exceden los límites establecidos por la Organización Mundial de la Salud y la legislación nacional, esta situación pondría

en riesgo el uso del agua para consumo humano, debido a que las concentraciones de sales y metales tales como la presencia de boro pueden ser nocivas para los humanos.

Según la Organización Mundial de la Salud (2006), se ha indicado que la exposición al boro puede causar enfermedades como melanosis, queratosis, cáncer (piel, vejiga, riñón y pulmón), hipertensión arterial, trastornos reproductivos, diabetes, deficiencia en el desarrollo intelectual de los niños.

1.2.3. Económica

La aplicación de la investigación se puede considerar económicamente viable, ya que no presenta muchas dificultades tanto económicas como técnicas. Además, su aplicación permitirá obtener resultados del efecto molecular del boro sobre los recursos biológicos de los diferentes cuerpos de agua continental, los cuales van a ser importantes en nuestra región.

En la agricultura, las concentraciones elevadas del boro provocan que las plantas absorban estos minerales excesivos, lo que resulta la pérdida de cosechas y el retorno de los productos en los mercados externos.

1.2.4. Científico – tecnológico

La presente investigación es importante y pionera en el tema de evaluación de impactos ecotoxicológicos en bioindicadores acuáticos, analizando la influencia de contaminantes en todos los niveles tróficos. Siendo viable tanto económica, técnica como científicamente, ya que se emplearán técnicas y protocolos estandarizados de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA), evaluando los efectos en organismos modelo y/o bioindicadores. De esta forma, se obtendrían resultados que pueden ser útiles para abordar los problemas que afectan la calidad de agua, la biodiversidad y la gestión adecuada para la conservación del ambiente.

Este enfoque se puede utilizar para identificar vías de toxicidad, para cuantificar con mayor precisión nuevos biomarcadores y para diseñar las posibles vías de resultados adversos.

Paules (2003), manifiesta que durante mucho tiempo se ha sugerido que cualquier estudio basado en Omics debe estar respaldado por un "anclaje fenotípico" para establecer la relación causa y efecto; sin embargo, se podría argumentar que, a nivel

de proteínas y metabolitos, ya se está observando un "fenotipo". Al considerar la visión más simple del dogma central de la biología molecular, el flujo de información va del gen a la transcripción de la proteína, lo cual también puede interpretarse como el movimiento del genotipo al fenotipo.

Una de las principales utilidades de la proteómica en la evaluación de riesgos químicos es informar sobre el mecanismo de acción de un químico. Conforme la evaluación del riesgo químico se aleja de un enfoque de mecanismo de acción único hacia un paradigma basado en la vía de la toxicidad, la proteómica cuantitativa se integra frecuentemente con la transcriptómica y la metabolómica para medir los efectos de la exposición a nivel molecular. Posteriormente, las vías toxicológicas identificadas pueden vincularse de manera causal con los criterios de valoración apicales. (Liang et al., 2020)

Los retos y oportunidades de la proteómica en la ecotoxicología comparativa se centran en los últimos años, y se han realizado esfuerzos significativos para cuantificar la consistencia de los datos ómicos en todos los laboratorios (Feswick et al., 2017). Las ómicas no se pueden utilizar en la evaluación de riesgos, si los datos no son reproducibles en diferentes laboratorios. Se han realizado revisiones críticas y talleres para estandarizar técnicas, informes, evaluación comparativa y evaluación de puntos de partida en toxicología regulatoria para transcriptómica y metabolómica (Kauffman et al., 2017; Sauer et al., 2017).

1.3.Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Evaluar la aproximación ecotoxicoproteómica y el riesgo ambiental del boro en el organismo modelo acuático *Danio rerio* "pez cebra".

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar los efectos letales y subletales e índices ecotóxicos provocados por la exposición aguda de cuatro tratamientos de boro, sobre el organismo modelo acuático *Danio rerio* "pez cebra"
- Determinar el riesgo ecotoxicológico y rangos de toxicidad de cuatro tratamientos de boro en el modelo acuático *Danio rerio* "pez cebra"
- Evaluar por aproximación proteómica, a través de la plataforma proteómica por electroforesis bidimensional (SDS-PAGE 2D) y espectrometría de masas, sistema de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en un sistema de

electrospray, analizador cuadrupolo por tiempo de vuelo (LC/ESI-Q-TOF MS/MS).

1.4.Hipótesis

La exposición aguda del boro en el modelo acuático *Danio rerio* "pez cebra" provocara efectos ecotoxicoproteómicos notables y por lo tanto un alto riesgo de los diferentes tratamientos evaluados.

1.5.Operacionalización de variables

Tabla 1

Operacionalización de variables

VARIABLES	DIMENSIÓN	INDICADORES
Independiente	<ul style="list-style-type: none"> Concentraciones de boro 	0, 4, 8, 12 mg/L
Dependiente	<ul style="list-style-type: none"> Modelo biológico <i>Danio rerio</i> "Pez cebra" Mortalidad Hipoactividad Escape al fondo C(E)L50 LOEC NOEC Uta Cociente de riesgo (QR) Expresión del Proteoma 	<ul style="list-style-type: none"> % % % % % % unidad unidad

Nota. Elaboración propia



2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Delgado (2022) evaluó el riesgo ecotoxicológico agudo de tres concentraciones de boro (3.4, 6.8 y 13.6) mg/L y un control con agua de clorinada, en tres bioindicadores acuáticos: *Daphnia magna* (neonatos) (24 y 48) h, *Physa venustula* (masas con huevos) 216 h y *Xenopus laevis* (huevos-embriones y larvas de 6 días) 96 h. Se analizaron efectos letales (mortalidad) y subletales, como la reducción de pigmentación en anfibios y alteraciones morfológicas durante el desarrollo y experimentación en *Physa venustula* y *Xenopus laevis*. Los resultados de la evaluación ecotoxicológica de las tres concentraciones de boro, se resume en orden de mayor a menor letalidad y subletalidad, destacando el tratamiento más alto (13.6 mg/L) para *Physa venustula*, seguido de huevos-embriones de *Xenopus laevis* (desarrollo temprano), *Daphnia magna* (desarrollo embrionario) y finalmente, las larvas de *Xenopus laevis*.

Las principales alteraciones morfológicas en *Physa venustula* incluyeron retraso en el desarrollo, anomalías en la concha y los ojos (3.4 mg/L de boro), así como el retraso con destrucción temprana (coagulación) de los organismos dentro del huevo a concentraciones de 6.8 y 13.6 mg/L de boro. En los huevos y embriones de *Xenopus laevis* tratados con 3.4 y 6.8 mg/L de boro, se observaron anomalías a nivel de saco vitelino y reducción de la pigmentación dorsal. En el tratamiento con 13.6 mg/L de boro, hubo retraso en el desarrollo temprano con ausencia de estructuras cefálicas y pigmentación dorsal nula. En las larvas, se detectaron retrasos en el desarrollo larval (6.8 y 13.6 mg/L), con desprendimiento de la epidermis y reducción de la pigmentación (13.6 mg/L). El boro se considera de riesgo ecotoxicológico medio y muy alto para *Daphnia magna* (48 h) y *Physa venustula*, y de riesgo medio para *Xenopus laevis*. El estado ecotoxicológico de la concentración mayor de boro se clasifica como altamente tóxica para *Physa venustula*, marginalmente tóxica para huevos de *Xenopus laevis* y ligeramente tóxica para *Daphnia magna*.

Según Gouveia et al. (2019), en su investigación “Ecotoxicoproteómica: una década de progreso en nuestra comprensión del impacto antropogénico en el medio ambiente” nos reportan de la importancia del estudio de la ecotoxicoproteómica, nos dice que siempre ha tenido el impacto que la proteómica ha tenido en la gestión de la salud humana, ofreciendo herramientas de diagnóstico y pronóstico. Cuando se trata de determinar el

impacto de los contaminantes en el medio ambiente, la ecotoxicoproteómica se ha centrado en analizar la dinámica de proteínas de especies ambientales en masa, métodos analíticos de alto rendimiento basados en espectrometría (MS). Como resultado obtienen las huellas dactilares de proteínas que se pueden comparar en varias condiciones para comprender los modos de acción de los productos químicos, descifrar el método adaptativo y los mecanismos adaptativos por los organismos, identificar contaminantes y especies específicas utilizadas como biomarcadores. La proteómica a gran escala impulsada por el descubrimiento no requiere hipótesis a priori. Como no está basado en hipótesis, puede revelar nuevos mecanismos de acción de los contaminantes. Desde un punto de vista ecotoxicológico, esto es muy significativo debido a la amplia gama de productos químicos que existen y sus efectos fuertemente contrastantes en las diferentes especies presentes en un ecosistema, la proteómica no sólo puede descifrar los cambios que ocurren en unas pocas proteínas también puede revelar la cascada de procesos bioquímicos asociados con la regulación positiva o negativa de la proteína. Por lo tanto, facilita la comprensión de los efectos tóxicos potenciales de productos químicos en diferentes organismos, y el establecimiento de vínculos entre variación molecular y fisiológica/orgánica.

Arenazas (2018) empleó dos especies bioindicadoras: *Carassius auratus* “Goldfish” y el caracol *Physa venustula*, para evaluar el efecto ecotoxicológico de los contaminantes minero- industriales en el desarrollo embrionario de estas especies. Concluyendo que el cloruro de mercurio tuvo un mayor efecto sobre la eclosión de los embriones de *Carassius auratus* “Goldfish” en el grupo control con $94.25 \pm 2.29 \%$, mientras que en el tratamiento de 0.050 mg/L con $36.72 \pm 4.63\%$, ($p < 0.05$) fue menor. El detergente doméstico causó una mortalidad moderada en *Physa venustula* en los tratamientos de 25 y 50 mg/L .

Gismondi et al. (2017) en su estudio, utilizó un enfoque ecotoxicoproteómico para evaluar la respuesta integrada y los posibles mecanismos de aclimatación en *Gammarus fossarum* luego de exposiciones crónicas a Cd, Cu o Pb, en concentraciones ambientalmente realistas (es decir, $0,25$, $1,5$ y $5 \mu\text{g/L}$ respectivamente). Después de 10 semanas de exposición, se investigaron los cambios en la expresión de proteínas en ciegos de machos de control y expuestos. Los análisis proteómicos sin gel permitieron identificar 35 proteínas involucradas en varias funciones biológicas, de las cuales 23 estaban significativamente desreguladas por la exposición a metales. Los perfiles de

desregulación de proteínas fueron específicos para cada metal, lo que proporcionó evidencia de los sitios de acción específicos del metal y las respuestas de los gammaridos. Entre los metales probados, Cu fue el más tóxico en términos de mortalidad, probablemente relacionado con el estrés oxidativo persistente. La muda y la osmorregulación fueron las principales funciones biológicas afectadas por el Cu a largo plazo. En gammaridos expuestos a Pb, se observaron desregulaciones significativas de proteínas involucradas en la respuesta inmune y el citoesqueleto. La reproducción se evidenció fuertemente afectada en gammaridos expuestos crónicamente a Cd y Pb. Además, las expresiones modificadas de varias proteínas implicadas en la transferencia de energía y el metabolismo destacaron una importante reorganización energética para hacer frente a las exposiciones crónicas a metales. Estos resultados apoyan el hecho de que las presiones metálicas inducen un costo funcional y energético para los individuos de *G. fossarum* con potenciales repercusiones en la dinámica poblacional.

Borgatta et al. (2015) analizaron las diferencias en la expresión de proteínas resultantes de la exposición aguda (2 días) y a medio plazo (7 días) del microcrustáceo acuático *Daphnia pulex* al fármaco anticancerígeno tamoxifeno. Utilizando un enfoque de escopeta de cromatografía líquida y espectrometría de masas, se pudieron identificar unas 4000 proteínas, proporcionando el mayor conjunto de datos de proteómica de *D. pulex* publicado hasta ahora. Teniendo en cuenta tanto los puntos de tiempo como las concentraciones probadas, 189 proteínas mostraron un cambio significativo. La identidad de las proteínas reguladas sugirió una disminución en la traducción, un aumento en la degradación de proteínas y cambios en el metabolismo de carbohidratos y lípidos como los principales efectos del fármaco. Además de estos procesos afectados, que reflejan una respuesta de estrés general del organismo, algunas otras proteínas reguladas desempeñan un papel en la reproducción de *Daphnia*. Estos últimos resultados están de acuerdo con nuestras observaciones previas del impacto del tamoxifeno en la reproducción de *D. pulex* e ilustran el potencial de la ecotoxicoproteómica para desentrañar los vínculos entre los efectos xenobióticos a nivel bioquímico y de organismos.

Condori (2016) en su estudio sobre los niveles de boro y arsénico en los suelos agrícolas del distrito de Cocachacra, Valle de Tambo, “Estudio de niveles de boro y arsénico en suelo agrícola en el distrito de Cocachacra Valle de tambo Arequipa”, encontró que los

suelos del distrito son adecuados para la agricultura y para la retención de boro y arsénico. Además, el estudio demostró concentraciones muy altas de boro, entre los 221,0 mg/kg y 346,5 mg/kg, y concentraciones de arsénico que varían entre los 49,1 mg/kg y 57,1 mg/kg. Siendo el arsénico, en particular, quien estaría superando los límites máximos permitidos establecidos en el Decreto Supremo N° 002-2014-MINAM “Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo”.

Iannacone et al. (2007) analizaron los efectos ecotoxicológicos del insecticida carbámico cartap sobre *Poecilia reticulata* “Guppy” y *Paracheiroidon innesi* “Neon tetra” (Characidae), evaluando el impacto ecotoxicológico de dicho insecticida utilizado en el control de plagas agrícolas y como molusquicida en vectores de importancia para la Salud Pública, en dos especies de peces del ecosistema acuático continental: *Poecilia reticulata* (Peters 1859) “Guppy” (Poeciliidae) y *Paracheiroidon innesi* (Myers 1936) “Neon tetra” (Characidae). Los resultados indicaron que después de 3 horas de exposición, *P. reticulata*, presentó un valor de CL₅₀ de 6,75 mg/L y valores de CE₅₀ entre 7,55 a 8,16 mg/L para el incremento del movimiento opercular y nado errático, respectivamente.

2.2.Marco teórico

En Arequipa, la contaminación por metales en el agua es un grave problema, siendo el boro una de las principales preocupaciones en el valle de Tambo, ya que la contaminación afecta a los animales, las plantas y a la salud de los habitantes. De acuerdo al último monitoreo por la ANA, se encontraron niveles elevados de boro alcanzando los 5.673 mg/L, lo que supera los límites establecidos por el ECA categoría III para el riego de vegetales (1 mg/L) y bebida de animales (5 mg/L) (ANA, 2018).

2.2.1. Contaminación del agua

La contaminación del agua ocurre cuando una sustancia ajena ingresa al medio acuático, alterando su composición química, biológica y física, lo que afecta la calidad del agua. Esta contaminación puede originarse en diversos tipos de aguas y fuentes. En el país, las principales causas de la contaminación del agua provienen de dos fuentes: fuente natural relacionada a la actividad volcánica, y de origen antropogénico como el vertido de aguas residuales, aguas de actividades mineras, desechos industriales, entre otros (Miranda, 2019).

2.2.1.1. Fuentes de contaminación

La contaminación del agua puede tener un origen natural o antropogénico. El origen antropogénico, que es el más común, proviene de las diversas actividades humanas, que representan la principal fuente de contaminación, ya que el crecimiento y la industrialización implican un mayor consumo de agua y una considerable producción de residuos, muchos de los cuales terminan en el agua (Díaz, 2000).

- a) **Fuentes de origen natural:** Son dispersas y no suelen generar altas concentraciones de contaminantes, excepto en áreas específicas, como las relacionadas con yacimientos minerales (Díaz, 2000).
- b) **Fuentes de origen antrópico:** Se originan por actividades humanas, como el uso doméstico del agua, la agricultura, ganadería, industrias, entre otros (Díaz, 2000).

2.2.1.2. Metales pesados

Son elementos químicos presentes de forma natural en la corteza terrestre, con diversas propiedades metálicas y altos pesos moleculares. Entre ellos se encuentran los metales de transición, lantánidos y actínidos. La industria minera explota estos metales para utilizarlos en diversas actividades industriales y tecnológicas, por este motivo se ven asociadas con la contaminación debido a su elevado nivel de toxicidad para los seres vivos (Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes España, 2016).

2.2.1.2.1. Boro

El boro es un elemento químico con número atómico 5, masa atómica 10.81 y símbolo B. Es un no metal sólido que actúa como semiconductor, es trivalente, puede formar tres enlaces, tiene un alto punto de fusión 2384 K en su forma cristalina, siendo casi tan duro como el diamante. En la naturaleza solo se encuentra combinado con otros elementos; se utiliza en la industria metalúrgica y en los reactores nucleares (Ortiz-Dominguez et al., 2015).

El boro se encuentra en el ambiente principalmente combinado con oxígeno en compuestos denominados boratos. Algunos boratos comunes incluyen ácido bórico, tetraborato de sodio (bórax) y óxido de boro, este elemento puede liberarse al aire, agua o suelo debido a la erosión natural de suelos y rocas. En menor cantidad, el boro también puede ser liberado por plantas que manufacturan vidrio, plantas de energía que queman carbón, fundiciones de cobre, uso de plaguicidas y de abonos agrícolas. El boro no se destruye en el ambiente, simplemente cambia de forma o se adhiere o se separa de partículas en el suelo, el sedimento y el agua (Toxicological Profile for Boron, 2010).

El boro no se consideraba un nutriente esencial para los seres humanos antes de 1980. En 1981, un estudio informó que el boro estimulaba el crecimiento óseo en pollos con deficiencia de vitamina D, lo que ayudaba a prevenir anomalías óseas. El boro ahora se considera un oligoelemento esencial que afecta la absorción, el metabolismo y la excreción de calcio, cobre, magnesio, nitrógeno, glucosa, triglicéridos, especies reactivas de oxígeno y estrógeno en el cuerpo (Betharia et al., 2014). Se utiliza comercialmente para la fabricación de vidrio, detergente, cerámica y fertilizante. El bórax deshidratado y el bórax pentahidratado se utilizan como fertilizantes en plantas, aguas superficiales y aguas subterráneas. Aunque el boro tiene un efecto tóxico muy bajo en los mamíferos, es muy tóxico para los artrópodos y se usa para insecticidas. Por otro lado, el ácido bórico, otra forma de boro, se usa como antibiótico en algunas infecciones superficiales en humanos (Kabu et al., 2015).

2.2.2. Bioensayo

El ensayo es un proceso en el que se mide la potencia de una sustancia mediante la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes (Ronco et al., 2004). Estos métodos permiten dar una respuesta rápida en la evaluación directa de la toxicidad, los cuales son procedimientos rápidos, poco onerosos y sensibles y se pueden aplicar en el laboratorio o sobre el terreno (Gómez & Ramírez, 2004; Di Marzio y Sáenz, 2013).

2.2.3. Contaminante

Sustancia ajena, presente en un sistema natural en una concentración superior a lo normal debido a la actividad humana, ya sea de forma directa o indirecta. De manera más amplia se considera la presencia de cualquier agente físico, químico o biológico, o la combinación de estos, en lugares, formas y concentraciones específicas, con tal duración que sean o puedan ser perjudiciales para la salud, la seguridad o bienestar de la población, o afectar negativamente la vida animal y vegetal, o que impidan el uso y goce de las propiedades y áreas de recreación (Di Marzio y Sáenz, 2013).

2.2.4. Ensayo de toxicidad

La determinación del impacto de un material o mezcla sobre un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones controladas implica medir las proporciones de organismos afectados (efecto cuantal) o el grado de efecto (graduado) después de la exposición a la muestra. Los efectos de los contaminantes pueden ser observarse en diferentes niveles de organización biológica, desde el nivel molecular y la respuesta fisiológica global del organismo, hasta los niveles superiores como población, comunidad y ecosistema. Las alteraciones moleculares son usualmente las primeras

respuestas detectables y cuantificables, destacándose por su capacidad para identificar la presencia de contaminantes incluso en niveles subletales. Este conjunto de señales se conoce como biomarcadores (Gómez & Ramírez, 2004; Di Marzio y Sáenz, 2013).

2.2.5. Evaluación de riesgo ecotoxicológico

La evaluación del riesgo ecotoxicológico de los metales y otros contaminantes generalmente implica el desarrollo de concentraciones umbral basadas en datos de toxicidad para un número limitado de especies de prueba estándar (es decir, algas, microcrustáceos, peces, etc.) y la aplicación de factores de evaluación. Se espera que los factores de evaluación tengan en cuenta las diferencias de sensibilidad entre especies, de modo que las concentraciones umbral derivadas también puedan proteger a los organismos de prueba no estándar. La protección de estos factores de evaluación para especies de prueba no estándar de productores primarios, invertebrados y peces ha sido bien documentada. Sin embargo, la sensibilidad de estas especies de prueba estándar con respecto a la de microorganismos como bacterias, hongos o ciliados no se ha evaluado adecuadamente. El cociente de riesgo (RQ) se emplea para evaluar el riesgo ecotoxicológico potencial de un solo compuesto en el agua (Vilas et al., 2020).

2.2.6. Marco conceptual

La ecotoxicología estudia las sustancias químicas y su efecto contaminante en alimentos, el agua, el suelo y la atmósfera. Además, analiza las sustancias y contaminantes tóxicos que ingresan a cuerpos de agua como lagos, arroyos, ríos y océanos, y estudia la forma en que las plantas, animales y seres humanos son afectados por la exposición a las sustancias tóxicas.

De ahí que el término de Ecotoxicología tenga varias definiciones:

- Es la ciencia que se encarga del análisis de los efectos y el destino de los agentes tóxicos de origen antropogénico a los ecosistemas acuáticos y terrestres (Silva et al., 2003).
- Es una rama de la ciencia que estudia y analiza los efectos de agentes químicos y físicos en los organismos vivos, enfocándose especialmente en las poblaciones y comunidades de ecosistemas específicos (Ronco et al., 2004).
- La ecotoxicología aplicada tiene como fin el desarrollo de protocolos de ensayo para ser usados como herramientas de predicción tempranas que permitan definir umbrales permisibles, con niveles de incertidumbre aceptables y sirvan

de guía a las entidades reguladores en la toma de decisiones (Ronco et al., 2004).

- Índices de toxicidad: Expresan los resultados de diversos ensayos de toxicidad como un único valor numérico que clasifica la muestra en distintas categorías. No existen reglas establecidas para la designación de estos índices (Ronco et al., 2004).
- CE50/CI50: La concentración efectiva o de inhibición media es la concentración del contaminante en agua, suelo o sedimento que se estima afecta al 50% de los organismos evaluados. La CE50 y sus intervalos de confianza (95%) generalmente se obtienen mediante análisis estadísticos. Concentración inhibitoria es una técnica que mide la concentración de un contaminante potencial, lo que reduce la capacidad de bioluminiscencia de una bacteria marina en un 50%. El sistema Backman Microtox fue desarrollado para medir CI50. Esta técnica es simple, rápida y relativamente económica (Ronco et al., 2004; Mohapatra & Rengarajan, 1995).
- CL50: La concentración letal media se refiere a la cantidad de una sustancia en agua, suelo o sedimento que se estima letal para el 50% de los organismos evaluados. La CL50 y sus intervalos de confianza (95%) se obtienen generalmente mediante análisis estadísticos (Ronco et al., 2004). Este indicador se utiliza para expresar los resultados de un bioensayo cuyo criterio de toxicidad es la letalidad. Es la concentración de una sustancia que causa la muerte del + 50% de los organismos de prueba en un periodo de 96 horas. El prefijo señala la duración de la exposición y el sufijo indica el porcentaje de mortalidad registrado en el experimento (Mohapatra & Rengarajan, 1995).
- LOEC: La concentración más baja a la cual se observa efecto (LOEC, por sus siglas en inglés) (Castillo, 2004).
- NOEC: La concentración a la cual no se observa efecto (NOEC, por sus siglas en inglés) (Castillo, 2004).
- TOEC: La concentración umbral a la cual se observa efecto (media geométrica del NOEC y LOEC) (Ronco et al., 2004).
- Toxicidad aguda: El efecto adverso (letal o subletal) causado en los organismos de prueba durante un período de exposición del material de ensayo, generalmente de pocos días (Ronco et al., 2004).

- Toxicidad crónica: Los efectos tóxicos a largo plazo que están asociados con alteraciones en el metabolismo, el crecimiento o la capacidad de sobrevivir (Ronco et al., 2004).
- Límite de detección: El menor contenido a partir del cual resulta posible inferir la presencia de la sustancia analizada con un nivel de certeza estadística razonable (Huetos, 2004).
- Límite de determinación: Contenido más pequeño de sustancia analizada, para el cual el método ha sido validado con una exactitud y precisión específicas (Huetos, 2004).

2.2.7. *Danio rerio* “Pez cebra”

Danio rerio es un pequeño pez tropical de agua dulce, ha sido un modelo establecido en la investigación científica durante más de 100 años. A principios de la década de 1980, George Streisinger en la Universidad de Oregón produjo el primer mutante de pez cebra. En las últimas décadas, el pez cebra surgió como un sistema modelo adecuado en muchas áreas de investigación, como la toxicidad reproductiva y del desarrollo, la genética, la toxicología y el estrés, el cáncer y otras enfermedades humanas, el descubrimiento de nuevos productos biotecnológicos y aplicaciones ambientales, la respuesta inmunitaria innata e investigación antiviral, así como nanomedicina y nanotoxicología. *D. rerio* es un sistema modelo atractivo debido a su bajo costo de mantenimiento, fertilización externa, gran número de descendientes, embriones transparentes, ciclo de vida corto, desarrollo rápido, órganos primarios desarrollados 5 días después de la fertilización y numerosas homologías entre peces y humanos (Guerrero, 2015).

Estas características hacen de los embriones de pez cebra un modelo animal viable, considerando los criterios 3R (reemplazo, reducción y refinamiento). Los embriones pueden reemplazar el uso de animales adultos en las pruebas reglamentarias y reducir el número de animales para las pruebas in vitro e in vivo debido a su alta sensibilidad. Además, las pruebas con etapas tempranas de desarrollo implican procedimientos menos invasivos (menos estrés para el animal) debido a la transparencia de los embriones, así como a la exposición a través del agua. Además, existen bases de datos donde la información genética, como marcadores genéticos, diferentes líneas y el genoma del pez cebra, están disponibles en línea (es decir, Ensembl y Zfin) (Trigueiro et al., 2020).

2.2.8. Ecotoxicología y proteínas

La ecotoxicología es el estudio de las interacciones entre los organismos vivos, sus ecosistemas y los factores estresantes. Usualmente, este análisis se ha llevado a cabo evaluando los efectos de dichos factores estresantes a nivel fisiológico, conductual o comunitario. Los efectos sobre la supervivencia y el crecimiento, la muda, el comportamiento, las tasas de alimentación, los parámetros de reproducción, la proporción sexual (en concreto, para los compuestos disruptores endocrinos), las anomalías morfológicas y muchos otros se han utilizado ampliamente como puntos finales de los efectos de los compuestos exógenos en una amplia variedad de organismos. El proteoma es altamente dinámico y cambia constantemente como respuesta a numerosas señales intra y extracelulares. Se reconoce que todos los organismos vivos reaccionan incluso a los cambios ambientales más sutiles a través de alteraciones en la expresión de diversos genes y proteínas. Cuatro procesos distintos están implicados en la concentración de proteínas celulares individuales (Lemos et al., 2010):

- a) Síntesis de proteínas
- b) Procesamiento de proteínas
- c) Secreción de proteínas
- d) Degradación de proteínas

En las ciencias toxicológicas, la posibilidad de evaluar el proteoma es un paso gigantesco ya que los perfiles proteómicos encarnan el vínculo entre los efectos tanto a nivel molecular como a nivel de todo el organismo, dado que las proteínas son la primera etapa funcional afectada directa o indirectamente por los tóxicos (Kovacevic et al., 2009).

2.2.9. La ecotoxicoproteómica

Según García – Reyero y Perkins (2011), menciona que los enfoques tradicionales se han centrado en el estudio de unos pocos genes o metabolitos individuales a la vez. Sin embargo, en la última década, las tecnologías “ómicas” han cobrado relevancia como un medio para caracterizar los cambios moleculares y los mecanismos que determinan estados específicos y capacidades metabólicas de un organismo a escala global.

Las principales técnicas “ómicas” son la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, que estudian los cambios en la composición y abundancia de grandes cantidades de transcripciones de ARNm, proteínas y pequeños metabolitos, respectivamente. Las dos primeras técnicas proporcionan información directa sobre los cambios en la expresión de genes particulares (Groh & Suter, 2015).

Actualmente, la proteómica es la segunda plataforma ómica más utilizada que proporciona un mapeo sistemático cualitativo y cuantitativo de todo el proteoma en células y tejidos, e identifica proteínas expresadas diferencialmente como biomarcadores (Kim et al., 2015).

La aplicación de tecnologías ómicas puede ser de gran valor para dilucidar cómo los contaminantes causan efectos adversos en un organismo. También son de gran valor para identificar biomarcadores apropiados de efectos. De hecho, los cambios proteicos en respuesta a varios contaminantes, como metales pesados, algas nocivas y biocidas, se han determinado mediante proteómica (Chen et al., 2015; Du et al., 2019; Kwan et al., 2019; Liu et al., 2021).

Los métodos proteómicos se están aplicando cada vez más en ecotoxicología bajo la premisa de que la identificación de cambios específicos en la expresión de proteínas en respuesta a una sustancia química en particular permitiría la elucidación de las vías moleculares subyacentes que conducen a un efecto adverso. A su vez, se espera que esto promueva el desarrollo de estrategias de prueba enfocadas en grupos específicos de tóxicos. Aunque tanto las técnicas de caracterización global basadas en gel como las libres de gel proporcionan una cobertura limitada del proteoma, las conclusiones sobre los procesos celulares afectados aún se están extrayendo en función de los pocos cambios detectados (Groh & Suter, 2015).

El creciente interés en la aplicación de tecnologías proteómicas para resolver problemas toxicológicos y su relevancia en la investigación ecotoxicológica ha dado lugar al surgimiento de la “ecotoxicoproteómica”, además existe un consenso general de que esta herramienta es poderosa para detectar eventos moleculares tempranos involucrados en respuestas tóxicas, que son responsables de los efectos adversos observados en niveles superiores de organización biológica, contribuyendo así a dilucidar el modo de acción de los factores estresantes y a identificar biomarcadores específicos. En última instancia, se pueden desarrollar indicadores de alerta temprana

y aplicarlos en bioensayos «in situ» y en la evaluación de riesgos ambientales. El número de experimentos de campo o ensayos de laboratorio que utilizan especies de prueba ecológicamente relevantes y que involucran proteómica ha sido, hasta hace poco, insuficiente para permitir un análisis crítico de los beneficios reales de la aplicación de este enfoque a la ecotoxicología (Lemos et al., 2010).

La ecotoxicoproteómica ha evolucionado y hoy en día se acepta como una técnica adecuada y fundamental para comprender de manera integral la interacción de los estresores con los organismos. Esta herramienta resulta especialmente útil para generar hipótesis sobre el modo de acción de los estresores y también para identificar biomarcadores específicos de los estresores. Por lo tanto, permite la identificación de los eventos moleculares que están involucrados en las respuestas tóxicas que desencadenan efectos adversos en niveles superiores de organización biológica, incluso en etapas tempranas, con menores concentraciones de estresores ambientales (Gouveia et al., 2019).

Con el desarrollo de tecnologías “ómicas”, como la proteómica, ahora es posible descubrir vínculos entre los efectos de los xenobióticos a nivel del organismo y los cambios a nivel molecular. Las proteínas, específicamente, reflejan las funciones bioquímicas que pueden verse afectadas directa o indirectamente por el estrés químico, y los análisis proteómicos pueden detectar respuestas imprevistas y no observables a nivel del organismo durante la exposición a xenobióticos (Lemos et al., 2010).

Gouveia et al (2019), señala que la ecotoxicoproteómica es una metodología centrada en proteínas que es útil para la ecotoxicología y podría tener aplicaciones futuras como parte de la evaluación de riesgos químicos y el monitoreo ambiental. La ecotoxicología que emplea organismos centinela no modelo con antecedentes filogenéticos muy divergentes tiene como objetivo preservar el funcionamiento de los ecosistemas y la gama general de especies biológicas que los sustentan. El flujo de trabajo de la proteómica clásica implica la identificación de proteínas, la anotación funcional y la extrapolación de la toxicidad entre especies.

Por lo tanto, es esencial desarrollar enfoques multiómicos para desentrañar la información molecular y construir las bases de datos más adecuadas para la identificación de proteínas y el análisis de vías en especies no modelo. La

instrumentación actual y el software disponible permiten realizar estudios transcriptómicos/proteómicos combinados relevantes para casi cualquier especie. La ecotoxicoproteómica resume diversos enfoques e ilustra cómo se pueden implementar en ecotoxicología para el biomonitoreo de rutina (Gouveia et al., 2019).

2.3.Marco legal

2.3.1. Contexto internacional

Actualmente, las normativas de los países se establecen considerando las principales características de los compuestos químicos que los hacen peligrosos para el ambiente, como su toxicidad, persistencia y potencial de bioacumulación. Es en este contexto donde los estudios ecotoxicológicos cobran relevancia, ya que proporcionan la información científica que luego se traduce en legislaciones con distinto alcance: convenios internacionales que prohíben el uso de ciertos compuestos químicos a nivel mundial; regulaciones para las descargas de efluentes; autorizaciones para la aplicación deliberada de compuestos químicos; evaluación y remediación de sitios contaminados y clasificación de productos químicos (Planes y Fuchs, 2015).

2.3.2. Contexto nacional

a) Constitución Política del Perú

En el Artículo 2°, inciso 22 menciona que: “toda persona tiene derecho a la paz, a la tranquilidad, al disfrute del tiempo libre y al descanso, así como a gozar de un ambiente equilibrado y adecuado al desarrollo de su vida” (Constitución Política del Perú, 1993).

b) Ley N° 28611. Ley General del Ambiente

En el Artículo I del Título Preliminar, establece que: “toda persona tiene el derecho irrenunciable a vivir en un ambiente saludable, equilibrado y adecuado para el pleno desarrollo de la vida, y el deber de contribuir a una efectiva gestión ambiental y de proteger el ambiente, así como sus componentes, asegurando particularmente la salud de las personas en forma individual y colectiva, la conservación de la diversidad biológica, el aprovechamiento sostenible de los recursos naturales y el desarrollo sostenible del país”.

En el Artículo 31°, menciona que: “el estándar de calidad ambiental - ECA es la medida que establece el nivel de concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, presentes en el aire, agua o suelo, en su condición de cuerpo receptor, que no representa riesgo significativo para la salud de

las personas ni al ambiente. Según el parámetro en particular a que se refiera, la concentración o grado podrá ser expresada en máximos, mínimos o rangos”. (Ley General del Ambiente, 2005).

c) Ley N° 29338. Ley de Recursos Hídricos

El Artículo 84° - Régimen de incentivos – se menciona que la autoridad nacional, en coordinación con el consejo de cuenca, otorga reconocimientos e incentivos a favor de quienes desarrollen acciones de prevención de la contaminación del agua y de desastres, forestación, reforestación o de inversión en tecnología y utilización de prácticas, métodos o procesos que coadyuven a la protección del agua y la gestión integrada del agua en las cuencas (Ley de Recursos Hídricos, 2009).

d) Decreto Supremo N° 001-2010-AG. Reglamento de la ley de Recursos Hídricos

El Artículo 9°, establece los objetivos del Sistema Nacional de Gestión de Recursos Hídricos, lo cuales son los siguientes:

- Coordinar y asegurar la gestión integrada, participativa y multisectorial; el aprovechamiento sostenible, el uso eficiente, la conservación, la protección de la calidad y el incremento de la disponibilidad de recursos hídricos, en los ámbitos territoriales de los órganos desconcentrados de la Autoridad Nacional del Agua y en las cuencas hidrográficas.
- Promover la elaboración de estudios y la ejecución de programas y proyectos de investigación y capacitación en materia de gestión de recursos hídricos, de acuerdo con la Política y Estrategia Nacional de los Recursos Hídricos, el Plan Nacional de los Recursos Hídricos y los planes de gestión de recursos hídricos en la cuenca.
- Contribuir en la planificación, concertación, regulación y uso sostenible, conservación, preservación y la recuperación del agua y de sus bienes asociados.
- Promover el establecimiento de una cultura del agua que reconozca el valor ambiental, cultural, económico y social del agua (Decreto Supremo N° 001-2010-AG, 2010)

e) Decreto Supremo N°031-2010-SA. Reglamento de calidad de agua para consumo humano

El Artículo 62° - Parámetros inorgánicos y orgánicos – menciona que: “toda agua destinada para el consumo humano, no deberá exceder los límites máximos permisibles para los parámetros inorgánicos y orgánicos”.

El Artículo 68° - Control de parámetros químicos – indica que: “cuando se detecte la presencia de uno o más parámetros químicos que supere el límite máximo permisible, en una muestra tomada en la salida de la planta de tratamiento, fuentes subterráneas, reservorios o en la red de distribución, el proveedor efectuará un nuevo muestreo y de corroborarse el resultado del primer muestreo investigará las causas para adoptar las medidas correctivas, e inmediatamente comunicará a la Autoridad de Salud de la jurisdicción, bajo responsabilidad, a fin de establecer medidas sanitarias para proteger la salud de los consumidores y otras que se requieran en coordinación con otras instituciones del sector” (Decreto Supremo N°031-2010-SA, 2010).





CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Tipo y nivel de la investigación

El tipo de investigación es experimental ya que se tiene el control de las situaciones en la cual podemos manipular, de manera intencional, una o más variables independientes (concentración de contaminante) para analizar las consecuencias de tal manipulación sobre una o más variables dependientes (mortalidad de especies) (Sampieri et al., 1998).

3.2. Diseño de la investigación

La investigación corresponde a un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), en cada tratamiento 7 individuos y los bloques (4) referidos al tiempo de evaluación: 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

3.3. Área de estudio y material biológico

Los bioensayos fueron llevados a cabo en los laboratorios de la Universidad Católica Santa María de Arequipa.

El organismo modelo con el cual se trabajó fue *Danio rerio* “pez cebra” cuyos especímenes se obtuvieron del acuario y criadero “Santillana” ubicado en el distrito de Characato en la provincia de Arequipa y posteriormente fueron ambientados en los laboratorios de la UCSM (pabellón de laboratorios E- 4to piso).

3.3.1. Bioensayos de ecotoxicidad

Para el diseño del experimento se contó con 28 individuos machos juveniles (dos meses de edad y ≤ 2 cm. de longitud) luego se colocaron en peceras de vidrio de 3000 cm^3 y fueron ambientados (Temperatura ambiente $21\text{ }^{\circ}\text{C}$, y 12/12 h de luz y oscuridad respectivamente) hasta por una semana antes de iniciar el bioensayo y alimentados con Artemias diariamente y dos días antes del inicio de la experimentación se les suprimió el alimento, posteriormente se inició la exposición de los tratamientos con boro: 4, 8 y 12 mg/L y un control negativo con agua de clorinada, las unidades experimentales corresponden a peceras de cuatro litros de capacidad y cada una de ellas con 7 especímenes (Anexo 1).

La temperatura ambiental del ensayo fue de $21\text{ }^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa de 75 % y agua con un pH de 6.8, de acuerdo a la guía de la OCDE (2019). Diariamente se

registró la mortalidad (ausencia de movimiento durante 15 segundos de observación) y efectos subletales: hipoactividad y escape al fondo, luego al final del ensayo de toxicidad aguda (96 h) se determinó los índices: concentración efectiva/letal media C(E)L50, concentración más baja de efectos observables (LOEC), concentración de efectos no observables (NOEC).

3.4. Evaluación del riesgo y rangos de toxicidad por efecto a la exposición del boro en el modelo *Danio rerio* “pez cebra

Para este procedimiento donde se evalúa el riesgo potencial de un solo compuesto en el agua, se ensayó el cálculo del cociente de riesgo (QR) el cual está en función de la concentración ambiental prevista (PEC) en este caso, se consideró los valores de boro del ECA de agua categoría 3: D1 riego de vegetales (1 mg/L) y D2 bebida de animales (5 mg/L) (MINAM, 2017), por lo tanto, se codificaron como PEC 1 y el PEC 2 para los cálculos. La concentración esperada sin efecto en el ambiente PNEC, se calculó, dividiendo la NOEC por un factor de seguridad de 100, el cociente de riesgo se resume en la siguiente fórmula de Gosset et al. (2021):

Ecuación 1. Ecuación para el cálculo del cociente de riesgo.

$$QR = \frac{PEC}{PNEC}$$

Donde:

QR: Cociente de riesgo.

PEC: Concentración ambiental prevista.

PNEC: Concentración esperada sin efecto en el ambiente.

Según Gosset et al. (2021), proponen que, cuando el valor QR es inferior a 1, se considera que no existe riesgo, y cuando es superior a 1, se considera que existe riesgo para el curso de agua, la clasificación más específica del riesgo en función del valor QR se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2

Clasificación de riesgo ecotoxicológico de una sola sustancia y mezclas, basada en el cociente de riesgo (QR).

Cociente de riesgo (QR)	Categorías de clasificación
$RQ < 0.1$	No hay riesgo
$0.1 < RQ < 1$	Riesgo insignificante
$1 < RQ < 10$	Riesgo bajo
$10 < RQ < 100$	Riesgo medio
$100 < RQ$	(Muy) alto riesgo

Nota. Tomado de Gosset et al. (2021)

Así mismo se determinaron la Unidades de Toxicidad Aguda (*UTa*) con la siguiente expresión matemática (Saldaña et al., 2002):

Ecuación 2. Ecuación para el Cálculo de Unidades de Toxicidad Aguda.

$$UTa = \left(\frac{1}{CL_{50}} \right) * 100$$

Dónde:

UTa: Unidades de Toxicidad Aguda

CL50: Concentración letal media.

La interpretación está de acuerdo con la clasificación de Saldaña et al. (2002) plasmada de manera específica en la Tabla 3.

Tabla 3

Clasificación según Unidades de Toxicidad Aguda (UTa)

Unidades Toxicológicas	Clasificación	CL ₅₀
Agudas		
> 4	Muy tóxico	> 25%
2 a 4	Tóxico	50 – 25%
1.33 a 1.99	Moderadamente tóxico	75 – 50%
< 1.33	Ligeramente tóxico	<75%

Nota. Tomado de Saldaña et al. (2002)

Adicionalmente se determinó la ecotoxicidad del agua de exposición con cuatro tratamientos con boro (mg/L) a través de la clasificación (Tabla 4) en función a porcentaje de supervivencia y la concentración letal media CL50 expresada en porcentaje (%) del tratamiento con boro, según los rangos propuestos por Roig et al. (2015).

Tabla 4

Rangos y estados de ecotoxicidad de agua de exposición

	No tóxico	Ligeramente tóxico	Marginalmente tóxico	Moderadamente tóxico	Altamente tóxico
CL ₅₀	>100	100-61	60-21	20-10	< 10
% de supervivencia	> 80	80-50%	50-21%	20-10%	< 10%

Nota. Tomado de Roig et al. (2015)

3.5. Evaluación por aproximación ecotoxicoproteómica por efecto a la exposición del boro en el modelo *Danio rerio*.

Al finalizar los ensayos de ecotoxicidad aguda, se tomaron los especímenes del pez cebra y se eutanzaron por hipotermia siguiendo el método de enfriamiento rápido (Rapid chilling) (anexo 2) aprobado por American Veterinary Medical Association (Panel AVMA, 2001), luego cuidadosamente se extrajo el hígado se lavó y se fijó en alcohol de 70 % en frascos eppendorf (anexo 3 y 4), posteriormente los hígados obtenidos se trituraron y se fue agregando Tris – HCL y 50 nM de cloruro de sodio hasta 10 veces el volumen de la muestra inicial, posteriormente la muestra obtenida se filtró, se centrifugó a 6000 rpm por 5 a 6 minutos y se retiró el sobrenadante para su liofilización; proceso que se repitió en todos los tratamientos de boro para ser sometidos al procesamiento de expresión proteómica que a continuación se describe los principales métodos.

3.6. Electroforesis bidimensional 2D SDS-PAGE

La electroforesis en gel bidimensional se realiza en dos fases principalmente, primero la separación de las proteínas según su punto isoelectrico, utilizando un kit de proteínas Bio-Rad. Se aplica muestras de 1 mg de proteína en tiras de gradiente no lineales inmovilizadas de pH 3 a 10 en vasos de muestra en sus extremos básico y ácido. El

enfoque comenzó a 200 V y el voltaje se aumenta gradualmente hasta 8000 a 4 V/min y se mantiene constante durante 3 h más (aproximadamente 150 000 Vh en total).

La separación en segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida-SDS al 12%. Los geles (180 x 200 x 1,5 mm³) se procesaron a 40 mA/gel. Después de la fijación de proteínas en metanol al 50% que contiene ácido fosfórico al 5 % durante 2 h. Los geles se tiñeron con Nitrato de Plata durante 12 h y posteriormente se decoloró con agua, metanol y ácido acético en una proporción de 5:4:1 (por volumen), y finalmente se visualizaron las manchas de proteínas en el gel, las cuales se digitalizaron utilizando un escáner GS-800 de luz blanca de alta calidad Bio-Rad (400–750 nm). Las proteínas expresadas diferencialmente se identificaron utilizando el software de análisis PD-Quest 2DE (Bio-Rad, EE. UU.). La cantidad de cada mancha en un gel se normaliza como un porcentaje de la cantidad total de todas las manchas en ese gel y se evalúa en términos de densidad óptica (OD). Se aplicó la prueba t de Student para comparar el volumen relativo de la mancha entre dos grupos. Se seleccionó puntos significativos que muestran cambios consistentes y una diferencia de al menos 2,0 veces ($p < 0,05$) para el análisis de espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

3.7. Parámetros UPCC-Xevo G2-XS QTOF para los estudios de espectrometría de masas.

Sobre la base de experimentos preliminares, las condiciones experimentales finales se determinaron de la siguiente manera: Sistema de fase líquida: ACQUITY UPCC; columna: Torus 2-PIC, 3,0 × 100 mm, 1,7 μm; fase móvil A: CO₂, fase móvil B: metanol acetonitrilo = 9:1; temperatura de la columna: 55°C, ABPR: 2600 psi; solución de compensación: solución de metanol con formiato de amonio 0,5 mM; velocidad de flujo: 0,5 mL/min; y volumen de inyección: 0,3 μL. El programa de gradiente se utilizó con un caudal de 1,0 ml/min y fue el siguiente: 0–2 min (1 % B), 2–7 min (1 %–5 % B), 7–10 min (5 % B), y 10-13 min (5%-1% B).

Las condiciones para la espectrometría de masas son las siguientes: Sistema de espectrometría de masas: Xevo G2-XS QTOF; método de ionización: ESI +/- ; modo de adquisición de datos: MS E ; Energía de impacto MS E : baja, apagada, alta, 20–50 eV; ión cuantitativo: m/z 902,8177; rango de masa de recolección: 100–1200 Da; tensión capilar: 2,0 kV; tensión de orificio cónico: 40 V; temperatura de la fuente de iones: 120 °C; temperatura de atomización: 500°C; caudal de gas de cono: 50 L/h; y

caudal de gas atomizado: 1000 L/h. La calibración de los datos se realizó utilizando una referencia externa (LockSpray) con la infusión constante de solución de leucina-encefalina (200 pg/ μ L) a un caudal de 5 μ L/min. El software de procesamiento de datos incluía UNIFI 1.9.4 y Masslynx V 4.1.

3.7.1. Adquisición y análisis de datos

Xevo G2-XS QTOF utiliza la tecnología patentada LockSpray para garantizar la precisión de los datos recopilados en tiempo real. Se pueden obtener números de masa de alta precisión, y la combinación de números de masa de alta precisión y distribución de isótopos e información de fragmentos secundarios proporciona fórmulas moleculares con precisión. Xevo G2-XS QTOF aplica la tecnología MS E patentada para obtener la información espectral de masas primaria y secundaria de los compuestos para una mayor confirmación estructural con una inyección al mismo tiempo.

El modo ESI +/- se utiliza para el análisis de péptidos y aminoácidos. El primer paso consistió en comprender el patrón de fragmentación de los péptidos, previamente digeridos por proteasas en su conjunto. En el segundo paso, al combinar los patrones de fragmentación y consultar la literatura relacionada, se estableció una base de datos MASCOT para el análisis de secuencia de proteínas. En el tercer paso, la base de datos autoconstruida se importó a MASCOT.

3.8. Procesamiento estadístico

El análisis para cada grupo de resultados obtenidos a partir de cada bioensayo y la determinación de la C(E)L50 para los tratamientos, será mediante el método Probit, realizado mediante el programa Statistica 12. Los límites de confianza estadísticos fueron al 95 % y para la generación de los gráficos se utilizó el programa Sigma Plot 14.

El diseño experimental corresponde a un Diseño de bloques completamente randomizado (DBCA). Para evaluar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos se realizarán pruebas de Shapiro-Wilk. Para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos se realizarán Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba a posteriori de Tukey ($\alpha = 0,05$) para determinar diferencias entre los tratamientos con respecto al control.



CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

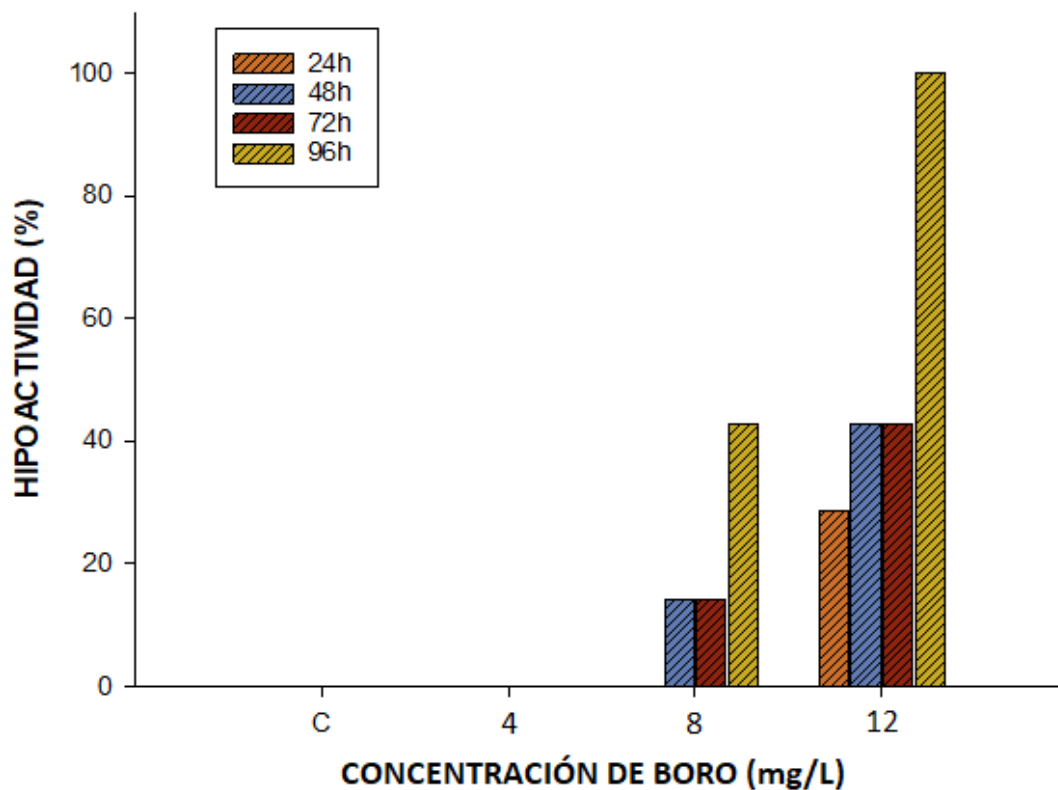
4.1. Determinación de los efectos letales y subletales e índices ecotóxicos provocados por la exposición aguda de boro, sobre el organismo modelo acuático *Danio rerio* "pez cebra"

Una vez realizada la experimentación en laboratorio, los resultados después de la exposición aguda y evaluación hasta las 96 h (4 días) de cuatro tratamientos de boro en los especímenes del organismo modelo pez cebra, no expresaron efectos letales o de mortalidad, por lo tanto, se evaluó y registraron los efectos subletales de **hipoactividad** y **escape al fondo** y luego se procesaron estadísticamente para obtener los índices ecotóxicos, como la concentración efectiva media (CE_{50}), la concentración a la cual no hay efectos NOEC y la concentración más baja de efectos LOEC, que más adelante se presentan, interpretan y discuten.

En la Figura 1 se presenta el desarrollo del efecto subletal de hipoactividad a través del tiempo por exposición a cuatro tratamientos de boro en *Danio rerio*, nótese que el efecto es proporcional conforme se incrementa el tiempo de exposición hasta las 96 h, siendo mayor el efecto subletal en el tratamiento de 12 mg/L (100 %) y no se observó en el control y a 4 mg/L de boro.

Figura 1

*Evaluación a través del tiempo del efecto subletal de hipoactividad en *Danio rerio* por efecto a diferentes tratamientos de boro.*

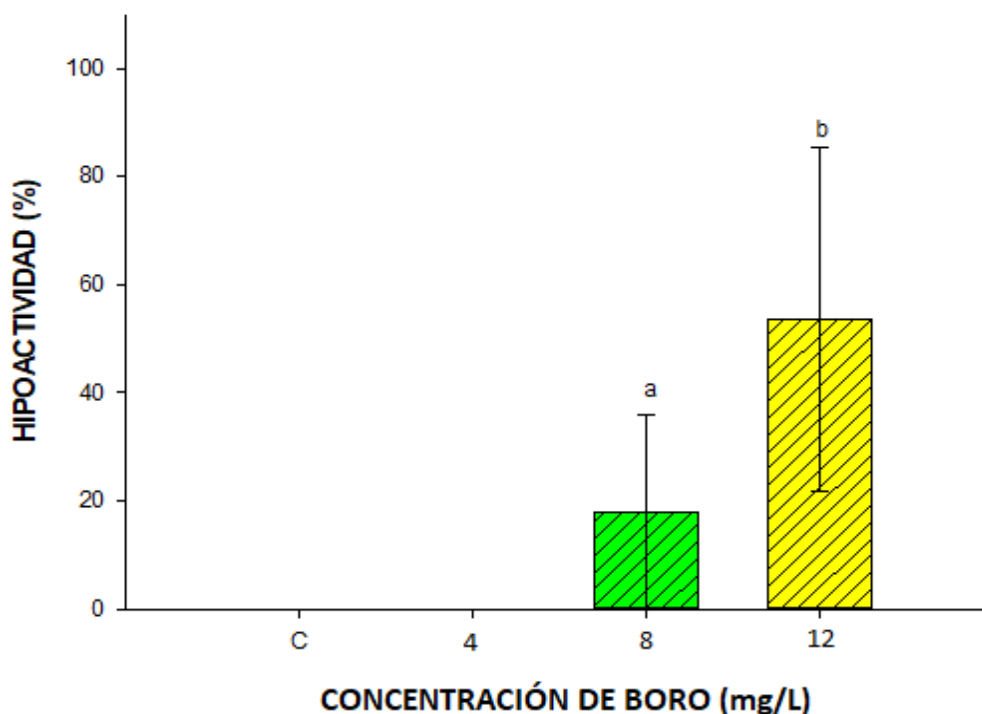


Nota. Elaboración propia

La Figura 2 muestra las diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) del efecto de hipoactividad del pez cebra entre los tratamientos, destacando los mayores, en especial 12 mg/L de boro con 53.57 ± 31.68 % de efecto subletal, además se denota que en los tratamientos control y 4 mg/L, no se observaron dicho efecto durante los 4 d de experimentación.

Figura 2

*Efecto de hipoactividad por acción de diferentes tratamientos de boro en el pez modelo
Danio rerio.*

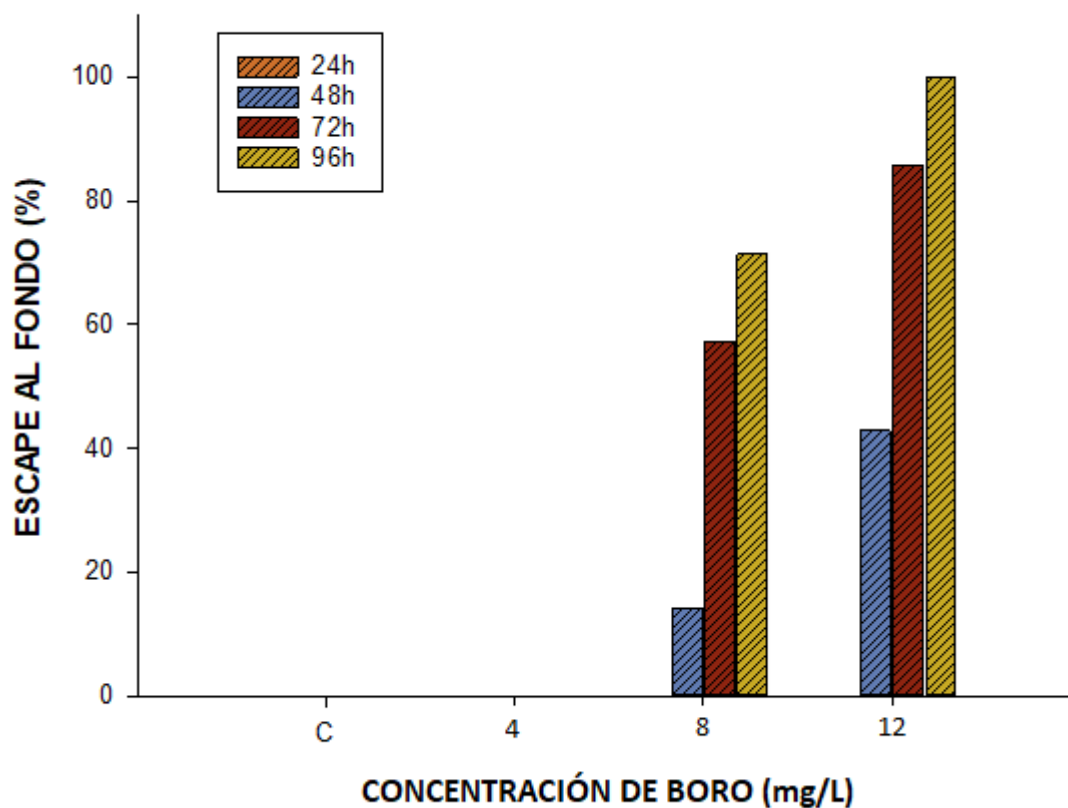


Nota. Elaboración propia

En la Figura 3 se presenta el desarrollo del efecto escape al fondo a través del tiempo por exposición a cuatro tratamientos de boro en *Danio rerio* “pez cebra” se observa similares resultados que el anterior efecto subletal (hipoactividad), siendo proporcional conforme se incrementa el tiempo de exposición hasta las 96 horas, donde es muy notorio el efecto en el tratamiento de 12 mg/L con el 100 % de individuos expresando escape al fondo y no se registraron efectos de escape al fondo en el control y a 4 mg/L de boro.

Figura 3

Evaluación a través del tiempo del efecto subletal de escape al fondo en Danio rerio por efecto a diferentes tratamientos de boro.

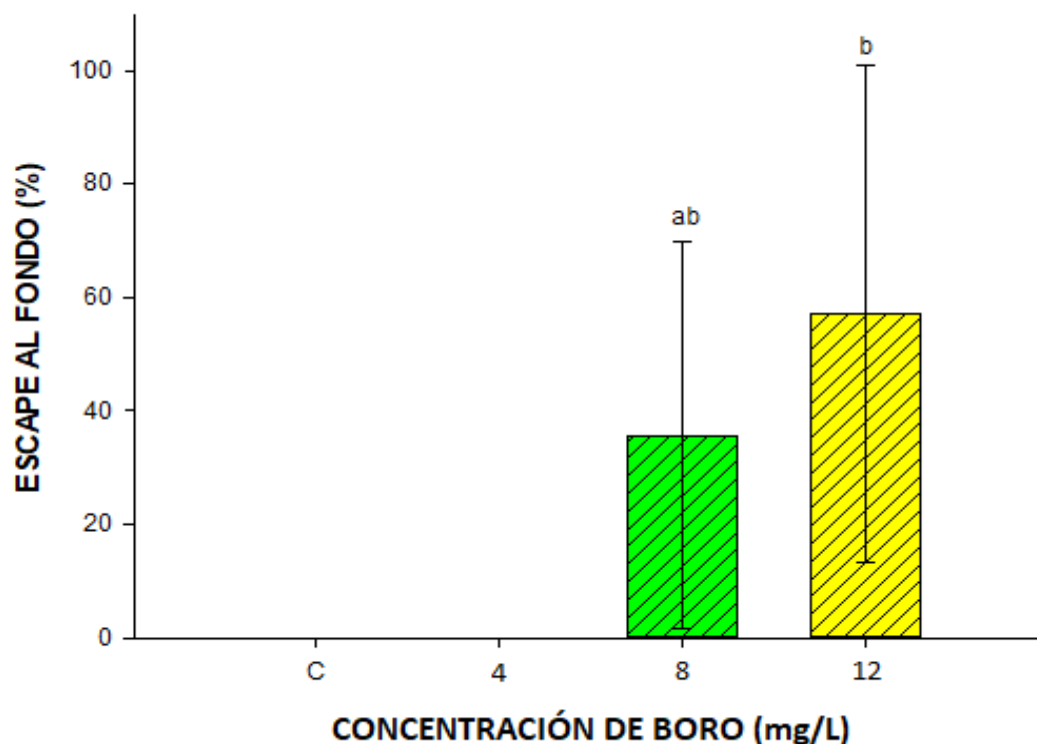


Nota. Elaboración propia

El escape al fondo del pez cebra, mostro diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, (Figura 4), donde el tratamiento de 12 mg/L de boro expresa un porcentaje de 57.14 ± 43.64 del efecto subletal, además se denota que en los tratamientos control y 4 mg/L, no se observaron dicho efecto durante los 4 días de experimentación.

Figura 4

*Efecto subletal de escape al fondo, por acción de diferentes tratamientos de boro en el pez modelo *Danio rerio*.*



Nota. Elaboración propia

La tabla 5, resume el procesamiento estadístico después de cuatro días (96 h) de experimentación de la ecotoxicidad aguda de cuatro tratamientos de boro en *Danio rerio* “pez cebra” en el laboratorio.

La concentración efectiva media (CE50), es muy similar entre los dos efectos evaluados, 10.96 y 11.10 mg/L para hipoactividad y escape al fondo respectivamente, estando ambos cerca del máximo valor de experimentación de dosificación de boro (12 mg/L) y según los resultados de la investigación se calcula una NOEC de 8 mg/L de boro, es decir, esta es la dosis de boro en el ambiente, donde no se observarían los efectos subletales evaluados, resultado controversial debido a que, los ECA de agua para el elemento en exposición (boro) oscilan entre 1 y 5 mg/L.

Tabla 5

Efectos subletales evaluados de hipoactividad y escape al fondo, en Danio rerio “Pez cebra” expuestos a diferentes concentraciones de boro hasta las 96 horas de exposición.

Danio rerio VARIABLES - 96 h					
TRATAMIENTOS	% HIPOACTIVIDAD		% ESCAPE AL FONDO		
	mg/L	VALOR +/- DE	Sig.	VALOR +/- DE	Sig.
Control		0.00 ± 0.00	a	0.00 ± 0.00	a
4		0.00 ± 0.00	a	0.00 ± 0.00	a
8		17.86 ± 17.98	a	35.71 ± 34.01	ab
12		53.57 ± 31.68	b	57.14 ± 43.64	b
NOEC		8		8	
LOEC		12		12	
CE₅₀		10.96		11.10	
SW		0.967		0.96	
Sig.		>0.1		>0.1	
Friedman					
Sig.					
F		10.71		5.78	
Sig.		0.00		0.02	

Nota. Elaboración propia

Sig.: significancia estadística; h=horas; DE: desviación estándar. Las letras que figuran en minúscula para cada columna representan la variación en la significación entre las variables de los tratamientos (prueba de Tukey $p < 0,05$). NOEC: concentración en la que no se observa efecto; LOEC: concentración más baja en la que se observa efecto; CE₅₀= concentración efectiva media. Los valores de las variables analizadas corresponden al promedio de las cuatro réplicas. SW: prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad. F: estadístico de Fisher del ANOVA.

4.2. Determinación del riesgo y rangos de toxicidad por efecto a la exposición del boro en el modelo *Danio rerio* “Pez cebra”.

Los valores de la concentración a la cual no se observa efecto (NOEC) calculados para los dos efectos subletales (hipoactividad y escape al fondo) del bioensayo, son considerados para determinar el riesgo, cuyos resultados se resumen en la Tabla 6.

Se registra que para ambos efectos subletales el riesgo resulta como medio, de acuerdo al ECA de agua categoría 3: D1 riego de vegetales (1 mg/L) y D2 bebida de animales (5 mg/L) (MINAM, 2017) respectivamente.

Tabla 6

*Determinación del cociente de riesgo (QR), por efecto de la exposición de cuatro tratamientos de boro, en el organismo modelo *Danio rerio* “Pez cebra”.*

Especie	Efecto	Periodo (h)	NOEC (mg/L)	PEC 1 (mg/L)	PEC 2 (mg/L)	PNEC (NOEC/100)	QR 1 PEC/PNEC	QR 2 PEC/PNEC	R 1	R 2
<i>D. rerio</i>	Hipoactividad	96	8	1	5	0.0800	12.5	62.5	Medio	Medio
	Escape al fondo	96	8	1	5	0.0800	12.5	62.5	Medio	Medio

Nota. Elaboración propia

h: hora; NOEC: concentración en la que no se observa efecto; PEC: concentración ambiental prevista; QR: cociente de riesgo; PNEC: concentración esperada sin efecto en el ambiente; R: riesgo.

El estado ecotoxicológico del agua con cuatro tratamientos con boro (mg/L) se presenta en la Tabla 7, pero debemos indicar que solo se ha determinado el rango y estado de ecotoxicidad del agua, propuestos por Roig et al. (2015) ya que se cuenta con resultados de 100 % de supervivencia en todos los tratamientos con boro después de 96 horas de exposición, por lo tanto, el agua resulta ser no tóxica para los individuos del pez cebrá en experimentación, además, la determinación de las unidades toxicológicas agudas *UTa* (Saldaña et al., 2002), no se calcularon debido a que no se observó mortalidad de los organismos durante la experimentación, y no se logró calcular la concentración letal media (CL50).

Tabla 7

Estado ecotoxicológico del agua con distintos tratamientos con boro (mg/L) en el organismo modelo Danio rerio “Pez cebra”

Metaloides	Especie	Periodo (h)	CL50	% S	Uta	CS	CR-%S	CR-CL₅₀
Boro	<i>D. rerio</i>	96	ND	100	ND	--	No tóxica	ND

Nota. Elaboración propia

h: hora; CL50: concentración letal media; %S: porcentaje de supervivencia; Uta: unidades toxicológicas agudas; CS: clasificación según Saldaña; CR: clasificación según Roig (con referencia al porcentaje de supervivencia CR-%S y concentración letal media CR-CL50)

4.3. Evaluación de la aproximación proteómica por efecto del boro en el organismo modelo acuático *Danio rerio* “Pez cebra” por electroforesis bidimensional (SDS-PAGE 2D) y espectrometría de masas.

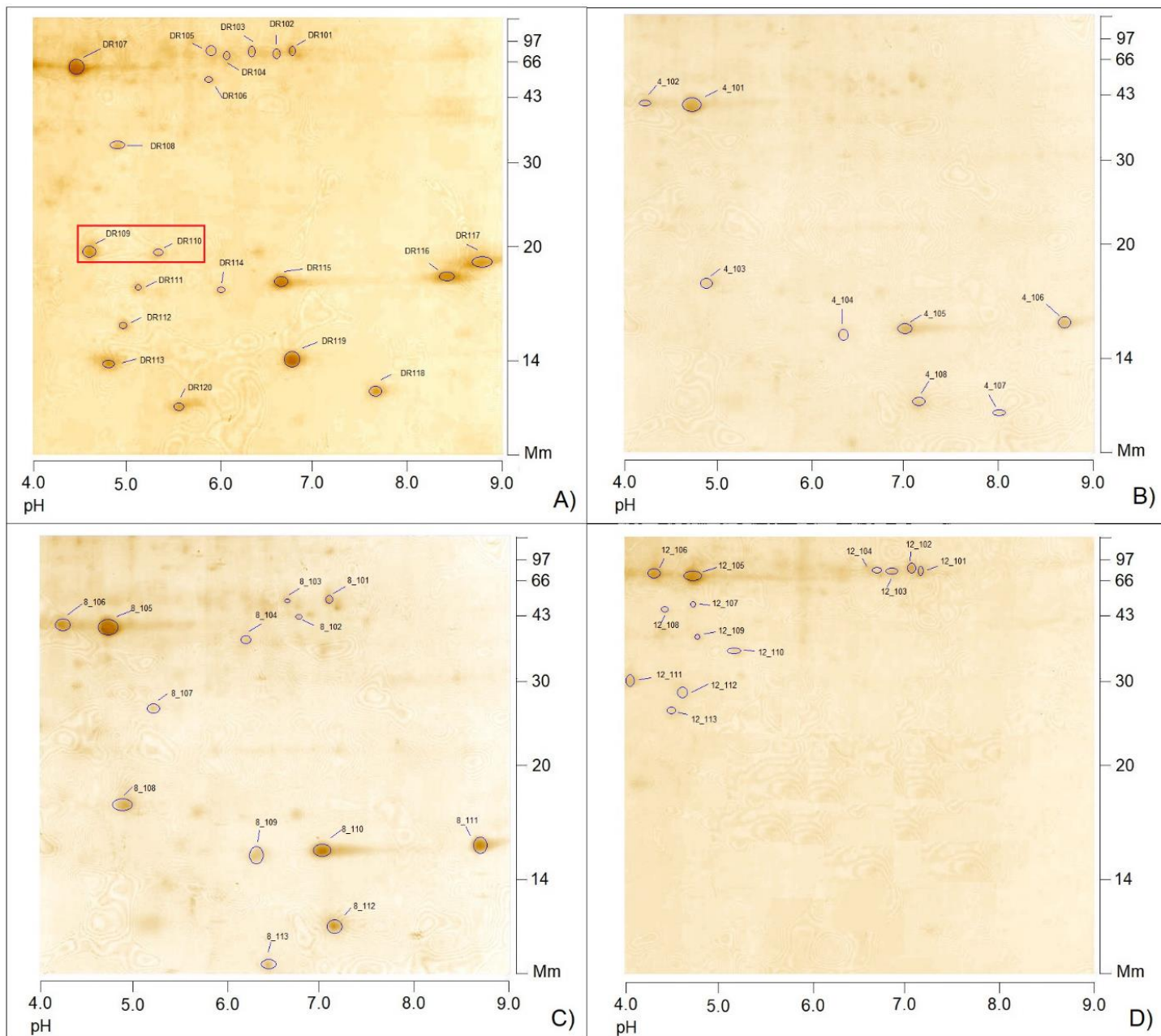
4.3.1. Geles de electroforesis bidimensional.

Los geles representan el nivel de expresión del tejido bajo diferentes condiciones, así observamos en la Figura 5: **A)** gel del grupo control con la expresión de 20 spots de proteína, **B)** gel del tratamiento con 4 mg/L de boro con 08 spots, **C)** gel del tratamiento de 8 mg/L con 13 spots de proteínas y **D)** gel del tratamiento de 12 mg/L de boro con 13 proteínas. Todas en un rango de masas de 14 a 97 kDa y un rango de pH de 4 a 9. Fueron seleccionadas para el estudio de expresión los spots del grupo control, DR109 y Dr110, el cual se encuentra en un recuadro rojo (Figura 5 A), por ser los spots diferenciados y significativos, por no encontrarse en los demás geles de los tratamientos en estudio. Posteriormente fueron digeridos con tripsina bovina y secuenciados péptidos al azar. Posteriormente fueron secuenciados los péptidos elegidos y comparados en la base de datos.

De acuerdo con la consulta de bases de datos de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> fueron identificadas ambos spots (Tabla 8) como las siguientes proteínas: Aspartato aminotransferasa (AST) y Gamma glutamil transpeptidasa (GGTP).

Figura 5

Geles de electroforesis bidimensional, con la expresión proteómica por efecto de la exposición al boro en hígado de Danio rerio “pez cebra”. A) Grupo Control, B) 4 mg/L, C) 8 mg/L y D) 12 mg/L



Nota. Elaboración propia

Tabla 8

Identificación de spots expresados en gel de electroforesis bidimensional (2D) SDS-PAGE. Muestra hígado de Danio rerio “pez cebra”, por exposición al boro

Gel 2D (mg/L)	Tip o	N° Spot	Analizados	Secuencia del Péptido	Identidad ID
Control	DR	120	DR109	...KVN LGV GAY RTDD CHPW VLPVVKKVEQK...	<i>Aspartato aminotransferasa (AST)</i>
	DR	120	DR110	...KGLTYHRIVEAFRFAYAKR TLLGDPK...	<i>Gamma glutamil transpeptidasa (GGTP)</i>
4 mg/L	4_	108		---	
8 mg/L	8_	113		---	
12 mg/L	12_	113		---	

Nota. Elaboración propia

Las proteínas, los lípidos y los carbohidratos son las principales fuentes de energía y tienen funciones tanto estructurales como funcionales en el metabolismo energético, la regulación osmótica y otros procesos metabólicos esenciales en los organismos (Wang et al., 2002, tomado de Liu et al., 2021).

En el presente estudio, el efecto subletal del boro en diversas concentraciones fue evidente y generó algunas deficiencias en las funciones antes mencionadas en los peces, además de corroborarse con la evaluación de aproximación proteómica, donde se infiere que el boro habría inducido principalmente a que dos proteínas (enzimas) Aspartato aminotransferasa (AST) y Gamma glutamil transpeptidasa (GGTP) no se expresen en los tratamientos de 4, 8 y 12 mg/L (Figura 5), pero si en el control (libre de boro), dichas moléculas están implicadas en diversos procesos fisiológicos y metabólicos que más adelante se detallaran, sin embargo discutimos algunos efectos del boro en diferentes organismos de experimentación.

El boro se caracteriza por ser un agente hipolipidemiante en su perfil lipídico. Sin embargo, aún no se ha aclarado el mecanismo de acción del boro sobre los lípidos.

Asimismo, aunque existen diferentes opiniones sobre el efecto reductor del boro sobre la glucosa, se necesitan nuevos estudios que expliquen su mecanismo (Demirdogen, 2020).

En un estudio reciente, se ha informado que existe una correlación negativa entre los niveles séricos de boro y los niveles de colesterol total, triglicéridos y LDL en el caso de diabetes y obesidad, y se puede concluir que el boro afecta el metabolismo de los lípidos durante estas enfermedades. Por tanto, se destaca que la suplementación con boro puede ser beneficiosa en el tratamiento de la diabetes y los trastornos relacionados con la obesidad.

Se estudiaron en varios animales los efectos del boro sobre los triglicéridos, el colesterol HDL, el colesterol LDL y el colesterol total. En un estudio en ratas, Acaroz et al. (2018) examinaron el efecto curativo del boro contra el efecto nocivo de la acrilamida y afirmaron que el boro aumentaba los niveles de LDL, triglicéridos y colesterol total, al tiempo que reducía el colesterol HDL. Cakir et al. (2018), enfatizaron que es posible que dosis más altas tengan una actividad antihiperlipidémica más fuerte en ratas. Afirmaron que el efecto del boro puede deberse al cambio en el nivel de lipólisis bajo el control de la insulina o las actividades de las enzimas involucradas en la síntesis del colesterol, así mismo Hunt y Herbel (1991) informaron que el boro aumentaba los niveles de triglicéridos.

En el estudio de Hall et al. (1998) indican que dos agentes hipolipidémicos que contienen boro (N, N-dimetil-n-octadecilamina borano y tetrakis-mu-(trimetilamina-boranocarboxilato) bis-(trimetilamina-carboxiborano)-dicopper(II)) reducen niveles séricos de colesterol LDL, triglicéridos y colesterol total en ratas. Se ha predicho que se suprime la unión y entrada del colesterol LDL al hígado y las células aórticas, de modo que el boro puede eliminar el colesterol de los tejidos y disminuir la acumulación de lípidos.

Al final de un estudio de cuatro semanas para investigar el efecto del ácido bórico en el perfil lipídico, se observó que tenía efectos significativos en ratas con diabetes. Si bien no hay diferencia en el nivel de colesterol LDL cuando solo se administra boro; Se ha informado que el boro a un nivel de 10 mg/kg tiene un efecto reductor del colesterol LDL en ratas con diabetes. En este caso, se destacó que el boro puede tener un efecto antihiperlipidémico en presencia de un factor de estrés. Pensaron que este

efecto del boro puede ocurrir como resultado del cambio en el nivel de lipólisis bajo el control de la insulina, o también puede ser el resultado de su efecto sobre la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis del colesterol. Armstrong et al. (2000) en su estudio con cerdos investigaron el efecto de una dieta con boro sobre el perfil de lípidos óseos y plasmáticos, afirmando que el borato de sodio semipurificado disminuía la proporción de lípidos óseos y aumentaba la flexibilidad ósea en cerdos machos.

Teniendo en cuenta dichos antecedentes y aunque los estudios muestran que no afecta ni aumenta el perfil lipídico, el boro agregado a la dieta tiene un papel en la reducción del nivel de lípidos y algunos investigadores han afirmado que el boro puede ser un agente hipolipidemiante. De acuerdo con los resultados obtenidos de los estudios, se puede decir que los fármacos que contienen boro tienen un efecto reductor sobre los valores séricos de colesterol LDL, colesterol total y triglicéridos.

Con respecto a los resultados de aproximación proteómica por efecto del boro en peces cebra, Gomes et al. (2017), indican que el objetivo principal de la proteómica ambiental y/o ecotoxiproteómica es analizar el proteoma de los organismos e identificar variaciones en la expresión de proteínas inducidas por contaminantes (u otros factores de estrés ambientales) sin la necesidad de detallar minuciosamente sus mecanismos de toxicidad.

La comparación de los proteomas de una condición de estrés con un control, en este caso 3 concentraciones de boro (4, 8 y 12 mg/L) tiene el potencial de identificar no solo marcadores proteicos individuales, sino también patrones de expresión proteica específicos del tipo y grado de estrés y, en consecuencia, distinguir entre la exposición y/o el efecto del contaminante. La expresión diferencial de proteínas se puede comparar entre contaminantes, concentraciones o mezclas complejas en varios ecosistemas acuáticos.

El proteoma evaluado en la presente investigación (Figura 5 y Tabla 8) resultan en la ausencia de dos enzimas la Aspartato aminotransferasa, o AST, y la Gamma glutamil transpeptidasa (GGTP) en los tratamientos 4, 8 y 12 mg/L de boro, respecto del control.

AST es una enzima que ayuda al hígado a transformar el alimento en energía. Las variaciones en las concentraciones de esta enzima puede ser un signo de que el hígado está lesionado o irritado y que estas enzimas están disminuyendo de las células hepáticas, respuesta asociada a la ausencia de vitaminas (B6) que regulan entre otras

funciones, los niveles adecuados de glucosa en la sangre y el funcionamiento del sistema nervioso, además se indica que los niveles de esta enzima pueden tener variaciones cuando existe enfermedades crónicas de hígado (Catagua, 2020), circunstancia que explicaría los efectos subletales que se observaron en los peces como la hipoactividad y el escape al fondo con 53.57 ± 31.68 y $57.14 \pm 43.64\%$ respectivamente (Tabla 5), durante la exposición aguda (96 h), pues esta ausencia de energía en los organismos modelo fue gatillado por las dosis de boro en los animales de experimentación.

La Gamma-glutamyl transferasa (GGT) es una enzima presente en el suero y en la superficie externa de las células de diferentes órganos como el hígado, páncreas, intestino, pulmones y riñones (Caravaca-Fontán et al., 2017). La GGT sérica no solo representa un marcador tradicional de consumo de alcohol o de enfermedades hepato biliares, sino que, además, en diferentes estudios se ha demostrado una asociación entre niveles séricos elevados de GGT y enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, hipertensión arterial o síndrome metabólico.

Los niveles de GGT son predictores de mortalidad en la población general y, de hecho, esta enzima ha sido incluida recientemente en un índice de mortalidad basado solo en parámetros bioquímicos. Además, los niveles séricos de GGT podrían ayudar a interpretar incremento de otra enzima la fosfatasa alcalina (FA) de origen poco claro.

Existen muy pocos estudios que hayan analizado el significado clínico y pronóstico de la GGT sérica en las enfermedades renales crónicas (ERC). Así, el objetivo de este estudio fue investigar las características clínicas de los pacientes con ERC y elevación anormal de los niveles de GGT sérica, su interacción con la FA, así como determinar el valor de este parámetro como predictor de mortalidad (Caravaca-Fontán et al., 2017).

El papel fisiológico que presenta esta enzima (GGT) es de importancia, ya que interviene en el metabolismo de algunos componentes endógenos y exógenos además de estar fuertemente involucrada en la desintoxicación de drogas, xenobióticos y actividad antioxidante, además se menciona que su disminución puede deberse a factores ambientales (Nuñez, 2020), cabe resaltar que GGT está íntimamente relacionada con una enzima (Glutación transferasa) reportada en la lista de las “25 principales” familias de proteínas de *D. rerio* “pez cebra” identificadas repetidamente

mediante proteómica diferencial por efecto de diferentes contaminantes (Groh & Suter, 2015).

Dicho esto, podemos explicar que en los organismos modelo (peces) en los tratamientos con boro, no hubo expresión de esta enzima (Figura 5 y tabla 8), por lo tanto, los peces expuestos en concentraciones iguales y mayores a 4 mg/L, no habrían podido realizar la detoxificación normal de dicho elemento en el agua y se habrían generado efectos subletales (hipoactividad y escape al fondo), como consecuencia probablemente de alteraciones metabólicas tal como se explicó antes y corroborándose con los valores que registraron con más del 50% de organismos que presentaron dichos efectos subletales principalmente con el tratamiento mayor (12 mg/L) de boro, el cual también se le considera como contaminante de riesgo medio (Tabla 6), además predecimos que su presencia excesiva y constante en ecosistemas acuáticos, puede llevar a la muerte a los organismos en un corto tiempo.

Las variaciones específicas en los componentes, procesos, estructuras o funciones celulares inducidas por xenobióticos (y otros factores estresantes), en un organismo o muestra, por ejemplo, los biomarcadores, también se han utilizado como puntos finales de los efectos potenciales sobre los organismos vivos. Se han seleccionado diversas moléculas, como hormonas, enzimas (citocromo P450, y enzimas como: colinesterasa, catalasa, glutatión S-transferasa) y otras proteínas (vitelogenina, proteínas de la zona radiata, proteínas de shock térmico-Hsp, etc.) e incluso orgánulos, como biomarcadores de sustancias químicas específicas o clases de sustancias químicas (Lemos et al., 2010).

El conocimiento de las consecuencias fenotípicas del estrés debe ir acompañado de información sobre los determinantes moleculares (genes) que se inducen o suprimen, el tipo y nivel de expresión de sus productos (proteínas) y el tipo y cantidad de metabolitos resultantes de la acción de las proteínas. En conjunto, los datos fenotípicos y moleculares ayudarán no solo a detectar el modo de acción del factor estresante, sino también a determinar qué componentes afectan la supervivencia, el crecimiento, el comportamiento y la reproducción de una especie determinada, lo que en última instancia puede afectar a las poblaciones y comunidades (Bundy et al., 2009; Lemos et al., 2010).

Por lo tanto, se espera que un conocimiento detallado de los procesos moleculares involucrados promueva la comprensión de los mecanismos de acción tóxica y la

identificación de biomarcadores moleculares que puedan usarse en la evaluación prospectiva de riesgos, así como en el biomonitoreo de organismos principalmente acuáticos (Van Aggelen et al., 2010; Groh & Suter, 2015).





5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

PRIMERO: *Danio rerio*, no registró efectos letales (mortalidad) por exposición a diferentes tratamientos de boro (4, 8 y 12 mg/L), pero sí generó dos efectos subletales; hipoactividad y escape al fondo, con valores por encima del 50%, principalmente en el tratamiento mayor de 12 mg/L de boro.

SEGUNDO: El cociente de riesgo (QR) calculado, indicó que el boro, para los dos efectos subletales evaluados en los organismos modelo *Danio rerio*, corresponden a un riesgo *medio*.

TERCERO: La evaluación ecotoxicoproteómica de hígado de *Danio rerio* “pez cebra”, determina la ausencia o no expresión de dos enzimas hepáticas en los organismos modelo expuestos a boro (4, 8 y 12 mg/L), moléculas orgánicas que son biomarcadores de detoxificación, acción antioxidante y de daño hepático.

5.2. Recomendaciones

- Realizar pruebas de toxicidad aguda y crónica y evaluar la expresión ecotoxicoproteómica de otros contaminantes de coyuntura local y regional.
- Realizar pruebas de toxicidad y evaluar la expresión ecotoxicoproteómica en organismos de otros niveles tróficos y entender los resultados de vías adversas en el ambiente acuático.





REFERENCIAS

- Acaroz, U., Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Gurler, Z., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., ... & Zhu, K. (2018). The ameliorative effects of boron against acrylamide-induced oxidative stress, inflammatory response, and metabolic changes in rats. *Food and chemical toxicology*, 118, 745-752.
- Arenazas, A. 2018. Evaluación ecotoxicológica de contaminantes minero industriales en el desarrollo embrionario de especies bioindicadoras *Carassius auratus* “Goldfish” y el caracol *Physa venustula* (Gould 1847). [Tesis Doctor, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa].
- Armstrong, T. A., Spears, J. W., Crenshaw, T. D., & Nielsen, F. H. (2000). Boron supplementation of a semipurified diet for weanling pigs improves feed efficiency and bone strength characteristics and alters plasma lipid metabolites. *The Journal of nutrition*, 130(10), 2575-2581.
- Argota-Pérez, G., & Iannacone, J. (2018). Ecotoxicología como herramienta predictiva en la evolución sostenible de los sistemas acuáticos. *Biotempo*, 15(2), 165-174.
- Autoridad Nacional del Agua (ANA). (2018). Metodología para la determinación del índice de calidad de agua ICA-PE, aplicado a los cuerpos de agua continentales superficiales. Ministerio de Agricultura y Riego.
- Betharia S, Farris FF, Corcoran GB, Ray SD. (2014). Mechanisms of toxicity. In: Encyclopedia of toxicology 3rd edition. Wexler P (ed). Elsevier Academic Press, Oxford, pp165-175.
- Bellido Dávila, R. (2021). Evaluación del agua subterránea del sector de remanso de Characato Arequipa, factibilidad del uso del agua para consumo humano [Tesis grado, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa Perú].
- Borgatta, M., Hernandez, C., Decosterd, L. A., Chevre, N., & Waridel, P. (2015). Shotgun ecotoxicoproteomics of *Daphnia pulex*: biochemical effects of the anticancer drug tamoxifen. *Journal of proteome research*, 14(1), 279-291.
- Bundy, J. G., Davey, M. P., & Viant, M. R. (2009). Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics*, 5, 3-21.
- Cakir, S., Eren, M., Senturk, M., & Sarica, Z. S. (2018). The effect of boron on some biochemical parameters in experimental diabetic rats. *Biological trace element research*, 184, 165-172.
- Caravaca-Fontán, F., Azevedo, L., Bayo, M. Á., Gonzales-Candia, B., Luna, E., & Caravaca, F. (2017). Niveles séricos elevados de gamma-glutamyl transferasa y fosfatasa alcalina

- son predictores independientes de mortalidad en la enfermedad renal crónica estadio 4-5. *nefrologia*, 37(3), 267-275.
- Castillo, G. (2004). Ensayos ecotoxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones, 1a Edición, Centro Internacional de Investigación Para El Desarrollo–CIID e Instituto Mexicano de Tecnología Del Agua–IMTA, México, DF.
- Catagua Párraga, M. A. (2020). “Análisis de aspartato aminotransferasa, hemograma e ionograma en bocachico (*Ichthyoelephas humeralis*) y vieja azul (*Andinoacara rivulatus*) en ecosistemas lóticos de la provincia de los Ríos”. [Tesis Ingeniero Agropecuario, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Ecuador].
- Chen, L., Sun, J., Zhang, H., Au, D.W., Lam, P.K., Zhang, W., Bajic, V.B., Qiu, J.-W., Qian, P.-Y. (2015). Hepatic proteomic responses in marine medaka (*Oryzias melastigma*) chronically exposed to antifouling compound butenolide [5-octylfuran-2 (5H)-one] or 4, 5- dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT). *Environ. Sci. Technol.* 49, 1851–1859.
- Condori Díaz, M. A. (2016). Estudio de niveles de boro y arsénico en suelo agrícola en el distrito de Cocachacra. Valle de Tambo. [Tesis Licenciado en Química, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa].
- Constitución Política del Perú. (1993). *Constitución Política del Peru*. Presidencia de la Republica del Perú. <https://www.gob.pe/institucion/presidencia/informes-publicaciones/196158-constitucion-politica-del-peru>
- Da Silva, D., Pompêo, M., & de Paiva, T. (2015). A ecotoxicologia no contexto atual no Brasil. Ecología de reservatórios e interfaces. *Instituto de Biociência da USP*, cap, 22.
- Decreto Supremo N° 001-2010-AG. (2010). *Reglamento de la ley de Recursos Hídricos*. Ministerio de Agricultura.
- Decreto Supremo N°031-2010-SA. (2010). *Reglamento de calidad de agua para consumo humano*. Ministerio de Salud.
- Decreto Supremo N° 077-2024-PCM. (2024). *Difusión de resultados de calidad de agua superficial en la Cuenca Tambo. Declaratoria de estado de emergencia por peligro inminente ante contaminación hídrica*. Presidencia del Consejo de Ministros del Perú.
- Delgado Caballero, M. M. (2022). Evaluación del riesgo ecotoxicológico del boro en bioindicadores acuáticos. [Tesis Biólogo, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa].

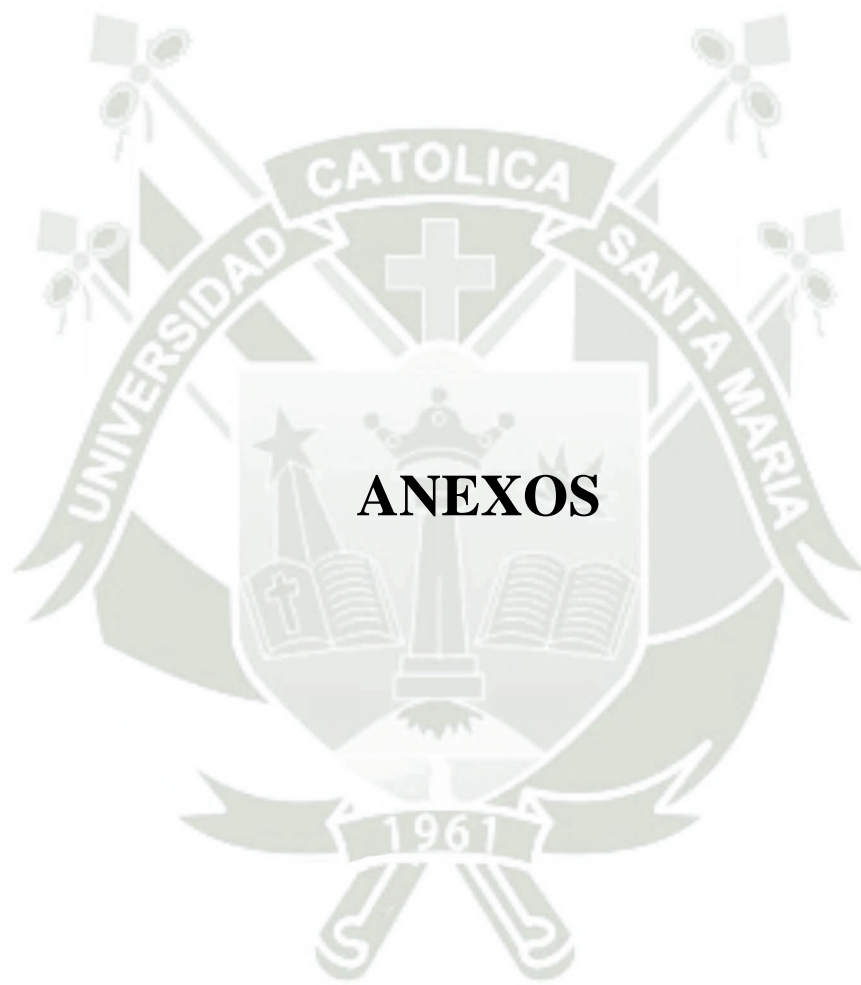
- Delgado, M. Z., & Huanca, M. M. (2018). El Boro y la sal: Sustento y Transformación en familias comuneras altoandinas. *Arequipa. Veritas*, 18(1), 37-47.
- Demirdogen, R. E. (2020). Relationship among blood boron level, diabetes mellitus, lipid metabolism, bone metabolism and obesity: Can boron be an efficient indicator for metabolic diseases. *Health Sci. J*, 14(1), 1-11.
- Diaz, M. (2000). La responsabilidad civil por daños al medio ambiente. El caso del agua en México. Biblioteca Jurídica Virtual del Instituto de Investigaciones Jurídicas de la UNAM.
- Di Marzio, W. D., & Sáenz, M. E. (2013). *Ecotoxicología. Buenos Aires: Eudeba. 366p.*
Disponible en: <http://www.prtr-es.es/conozca/Sustancias-contaminantes-1026062012.html>.
- Du, B., Liu, G., Ke, M., Zhang, Z., Zheng, M., Lu, T., Sun, L., Qian, H. (2019). Proteomic analysis of the hepatotoxicity of *Microcystis aeruginosa* in adult zebrafish (*Danio rerio*) and its potential mechanisms. *Environ. Pollut.* 254, 113019.
- Feswick, A., Isaacs, M., Biales, A., Flick, R.W., Bencic, D.C., Wang, R.L., Vulpe, C., Brown-Augustine, M., Loguinov, A., Falciani, F., 2017. How consistent are we? Interlaboratory comparison study in fathead minnows using the model estrogen 17 α -ethinylestradiol to develop recommendations for environmental transcriptomics. *Environmental toxicology and chemistry* 36, 2614-2623.
- Gandar, A., Laffaille, P., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Perrault, A., Gress, L., Mormède, P., Tapie, N., Budzinski H., & Jean, S. (2017). Adaptive response under multiple stress exposure in fish: From the molecular to individual level. *Chemosphere*, 188, 60-72.
- Garcia-Reyero, N., Perkins, E. (2011). Systems biology: leading the revolution in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 265–273.
- Guerrero, A. (2015). Efectos Tóxicos asociados con la exposición a contaminantes derivados de la minería de carbon. [Tesis Doctoral, Universidad de Cartagena].
- Gismondi, E., Thomé, J. P., Urien, N., Uher, E., Baiwir, D., Mazzucchelli, G., ... & Lebrun, J. D. (2017). Ecotoxicoproteomic assessment of the functional alterations caused by chronic metallic exposures in gammarids. *Environmental Pollution*, 225, 428-438.
- Gómez L. & Z. Ramírez (2004). Microalgas como biomonitores de contaminación. *Revista Cubana de Química*. 15(2):34-48.
- Gosset, A., Wiest, L., Fildier, A., Libert, C., Giroud, B., Hammada, M., & Perrodin, Y. (2021). Ecotoxicological risk assessment of contaminants of emerging concern identified by

- “suspect screening” from urban wastewater treatment plant effluents at a territorial scale. *Science of the Total Environment*, 778, 146275.
- Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., & Armengaud, J. (2019). Ecotoxicoproteómica: una década de progreso en nuestra comprensión del impacto antropogénico en el medio ambiente. *Revista de proteómica*, 198, 66-77.
- Groh, K. J., & Suter, M. J. F. (2015). Stressor-induced proteome alterations in zebrafish: a meta-analysis of response patterns. *Aquatic Toxicology*, 159, 1-12.
- Huetos Hidalgo, O. (2004). Estudio comparativo y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos de corticosteroides en muestras biológicas. [Tesis Doctor, Universidad Complutense de Madrid].
- Hall, I. H., Spielvogel, B. F., Griffin, T. S., Docks, E. L., & Brotherton, R. J. (1989). The effects of boron hypolipidemic agents on LDL and HDL receptor binding and related enzyme activities of rat hepatocytes, aorta cells and human fibroblasts. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, 65(3), 297-317.
- Hunt, C. D., & Herbel, J. L. (1991). Boron affects energy metabolism in the streptozotocin-injected, vitamin D3-deprived rat. *Magnesium and trace elements*, 10(5-6), 374-386.
- Iannacone, J., Onofre, R., Huanqui, O., Giraldo, J., Mamani, N., Miglio, M. C., & Alvariño, L. (2007). Evaluación del Riego Ambiental del Insecticida Metamidofos en Bioensayos con Cuatro Organismos Acuáticos no Destinatarios. *Agricultura Técnica*, 67(2), 126-138.
- Insua, D. A., García, C. P., Monteagudo, A. M., Vásquez, Z. A. V., & Marcel, A. M. (2010). Evaluación ecotoxicológica de detergentes comerciales y naturales, como criterio de contaminación ambiental. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 11(3B), 1-9.
- Kabu, M., Uyarlar, C., Zarczynska, K., Milewska, W. y Sobiech, P. (2015). El papel del boro en la salud animal. *Revista de Elementología*, 20 (2).
- Kauffmann, H.M., Kamp, H., Fuchs, R., Chorley, B.N., Deferme, L., Ebbels, T., Hackermuller, J., Perdichizzi, S., Poole, A., Sauer, U.G., Tollefsen, K.E., Tralau, T., Yauk, C., van Ravenzwaay, B., (2017). Framework for the quality assurance of 'omics technologies considering GLP requirements. *Regul Toxicol Pharmacol* 91 Suppl 1, S27-s35.
- Kim, H.J., Koedrith, P., Seo, Y. (2015). Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate, *Daphnia* model organism. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 12261–12287.
- Kovacevic, R., Teodorovic, I., Kaisarevic, S., Planojevic, I., Fa, S., Dakic, V., ... & Virijevic, S. (2009). First REP-LECOTOX Workshop—ecotoxicogenomics: the challenge of

- integrating genomics/proteomics/metabolomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 130-131.
- Kwan, Y.H., Zhang, D., Mestre, N.C., Wong, W.C., Wang, X., Lu, B., Wang, C., Qian, P.-Y., Sun, J. (2019). Comparative proteomics on deep-sea amphipods after in situ copper exposure. *Environ. Sci. Technol.* 53, 13981–13991.
- Lemos, M. F., Soares, A. M., Correia, A. C., & Esteves, A. C. (2010). Proteins in ecotoxicology—how, why and why not?. *Proteomics*, 10(4), 873-887.
- Ley 28611. (2005). *Ley General del Ambiente*. Ministerio del Ambiente. <https://sinia.minam.gob.pe/normas/ley-general-ambiente>
- Ley 29338. (2009). *Ley de Recursos Hídricos*. Autoridad Nacional del Agua. <https://www.ana.gob.pe/publicaciones/ley-no-29338-ley-de-recursos-hidricos>
- Liang, X., Martyniuk, C. & Simmons, D. (2020). Are we forgetting the “proteomics” in multi-omics ecotoxicology?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 36 (100751). <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2020.100751>
- Liu, Z., Li, Y., Pérez, E., Jiang, Q., Chen, Q., Jiao, Y., Huang, Y., Yang, Y., Zhao, Y. (2021). Polystyrene nanoplastic induces oxidative stress, immune defense, and glycometabolism change in *Daphnia pulex*: application of transcriptome profiling in risk assessment of nanoplastics. *J. Hazard. Mater.* 402, 123778.
- Liu, Z., Li, Y., Sepúlveda, M. S., Jiang, Q., Jiao, Y., Chen, Q., ... & Zhao, Y. (2021). Development of an adverse outcome pathway for nanoplastic toxicity in *Daphnia pulex* using proteomics. *Science of the Total Environment*, 766, 144249.
- Liu, X., Xu, C., Chen, P., Li, K., Zhou, Q., Ye, M., Lu, Y. (2022). Advances in technologies for boron removal from water: A comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(17) doi:10.3390/ijerph191710671.
- MINAM. (2017). Estándares de Calidad Ambiental para Agua (ECA). In El Peruano. <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>
- Miranda, E. (2019). Evaluación de la capacidad fitorremediadora *Schoenoplectus Californicus* (*Totora*) para remoción de Arsénico y Boro mediante humedales de flujo horizontal in vitro. [Tesis Ingeniería Ambiental, Universidad Alas Peruanas].
- Mohapatra, B. C., & Rengarajan, K. (1995). Manual on bioassays in the laboratory and their techniques. CMFRI Special Publication, 64, 1–75.
- Navinta, E. y Condori, W. (2016). Evaluación Físico Química de los parámetros para metales pesados Boro (B) y Manganeso (Mn) del recurso hídrico para consumo humano en el

- Centro Poblado Mollendo – Islay. [Tesis Ingeniería Química, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa].
- Núñez Sam, S. (2020). Eficacia de la gammaglutamil transpeptidasa y fosfatasa alcalina como biomarcador predictor de coledocolitiasis en pacientes atendidos en el Hospital de Vitarte. Periodo enero–diciembre 2019. [Tesis profesional, Universidad Privada San Juan Bautista], Lima-Perú.
- OECD. (2019). Test Guideline N°. 203 Fish, Acute Toxicity Testing.
- OMS. (2006). Guías para la calidad del agua potable. Primer apéndice a la tercera edición. Ginebra.
- Ortiz-Domínguez, M., Sánchez-Campos, D., Abreu-Quijano, M. A., Hernández-Garrido, V. J., Cruz-Trejo, R., Rosales-Xicotécatl, C. G. & Muñoz-Sánchez, Y. (2015). Evaluación de la cinética de crecimiento del boro en una fundición de hierro gris endurecido empleando el proceso borurización de empaquetamiento en caja. *Tópicos de Investigación en Ciencias de la Tierra y Materiales*, 2(2), 198-208.
- Panel AVMA. On euthanasia, American Veterinary Medical Association. (2000) Report of the AVMA Panel on Euthanasia. *J Am Vet Med Assoc* 2001;218:669–96.
- Paules, R. (2003). Phenotypic anchoring: linking cause and effect. *Environ Health Perspect* 111, A338-339.
- Planes, E. I., & Fuchs, J. S. (2015). Cuáles son los aportes de la ecotoxicología a las regulaciones ambientales. Ed. Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias. *Revista: Ciencia e Investigación. Argentina*.
- Polanco Correa, N. M., & Umiyauri Magaña, R. (2019). Selección de cepas bacterianas para su uso en la Bio-remoción de boro de efluentes del Parque Industrial Rio Seco–PIRS–Arequipa. [Tesis Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa].
- Registro estatal de emisiones y fuentes contaminantes España. Sustancias Contaminantes. PRTR. [En línea] Madrid-España: 2016, [Consulta: 22 de abril 2024]
- Roig, N., Sierra, J., Nadal, M., Moreno-Garrido, I., Nieto, E., Hampel, M., Gallego, E., Schuhmacher, M., & Blasco, J. (2015). Assessment of sediment ecotoxicological status as a complementary tool for the evaluation of surface water quality: The Ebro river basin case study. *Science of the Total Environment*, 503–504, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.125>.

- Ronco, A., Díaz Báez, MC, & Pica Granados, Y. (2004). Conceptos generales. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones, Castillo Morales (Ed.), 17-22.
- Saldaña, P., Lerdo, T. A., Gómez, M. A., & López, R. (2002). La importancia de incluir análisis de toxicidad en descargas industriales y municipales que afectan a los cuerpos receptores. *Instituto Mexicano de Tecnología Del Agua*, 1–11.
- Sampieri, R. H., Collado, C. F., Lucio, P. B., & Pérez, M. D. L. L. C. (1998). *Metodología de la investigación* (Vol. 6). México: Mcgraw-hill.
- Sauer, U.G., Deferme, L., Gribaldo, L., Hackermuller, J., Tralau, T., van Ravenzwaay, B., Yauk, C., Poole, A., Tong, W., Gant, T.W. (2017). The challenge of the application of 'omics technologies in chemicals risk assessment: Background and outlook. *Regul Toxicol Pharmacol* 91 Suppl 1, S14-s26.
- Silva, J., Torrejón, G., Bay-Schmith, E., & Larrain, A. (2003). Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera) usando un tóxico de referencia. *Gayana (Concepción)*, 67(1), 87-96
- Toxicological Profile for Boron, 2010. ATSDR. CAS #: 7440-42-8.
- Trelles, J. A. (2013). Biosorción de arsénico en medio acuoso empleando biomásas vegetales inertes. *Lima, Perú: Universidad Nacional de Ingeniería*.
- Trigueiro, N. S. D. S., Canedo, A., Braga, D. L. D. S., Luchiarri, A. C., & Rocha, T. L. (2020). Zebrafish as an emerging model system in the global south: two decades of research in Brazil. *Zebrafish*, 17(6), 412-425.
- Van Aggelen, G., Ankley, G.T., Baldwin, W.S., Bearden, D.W., Benson, W.H., Chipman, J.K., Collette, T.W., Craft, J.A., Denslow, N.D., Embry, M.R., Falciani, F., George, S.G., Helbing, C.C., Hoekstra, P.F., Iguchi, T., Kagami, Y., Katsiadaki, I., Kille, P., Liu, L., Lord, P.G., McIntyre, T., O'Neill, A., Osachoff, H., Perkins, E.J., Santos, E.M., Skirrow, R.C., Snape, J.R., Tyler, C.R., Versteeg, D., Viant, M.R., Volz, D.C., Williams, T.D., Yu, L. (2010). Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements, and future outlook. *Environ. Health Perspect.* 118, 1–5.
- Vilas-Boas, J. A., Cardoso, S. J., Senra, M. V. X., Rico, A., & Dias, R. J. P. (2020). Ciliates as model organisms for the ecotoxicological risk assessment of heavy metals: A meta-analysis. *Ecotoxicology and environmental safety*, 199, 110669.



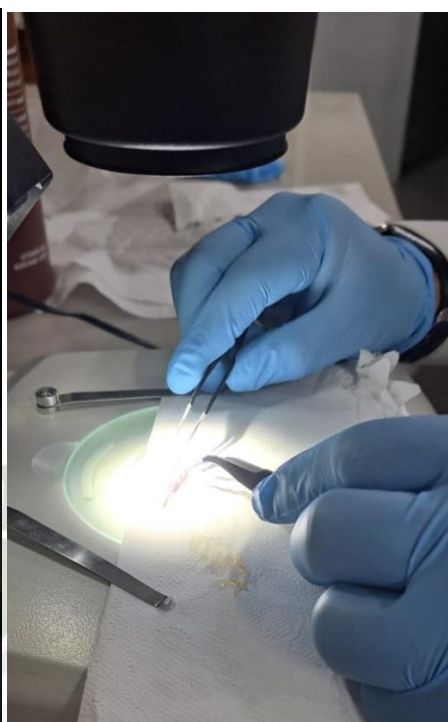
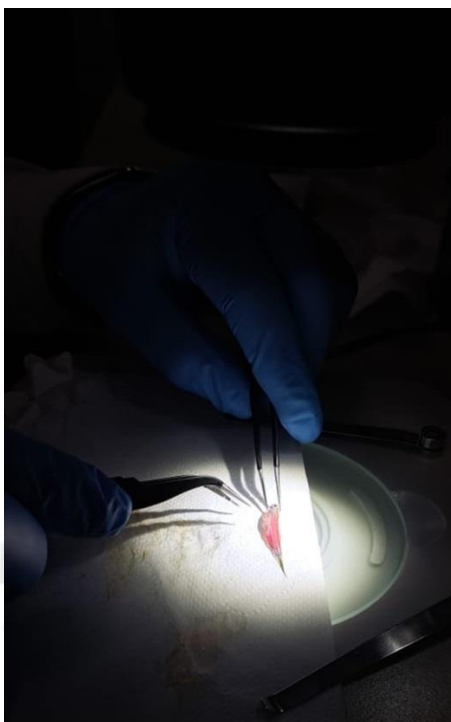
Anexo 1. Diseño de experimentación



Anexo 2. Eutanzación de especímenes de pez cebra, por enfriamiento rápido



Anexo 3. Extracción del hígado en los especímenes del pez cebra en el laboratorio



Anexo 4. Fijación en alcohol al 70% de los especímenes del pez cebra en el laboratorio



Anexo 5. Modelo de tabla de análisis de signos clínicos observados en peces (OECD,2019)

Observación	Día 0	Día 0	Día 1	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Tiempo de observación. aprox.	2.5 h	5.5 h	24 h	30 h	48 h	72 h	96 h
Fecha / Hora							
Nº peces vivos							
Nº peces muertos							
Pérdida del equilibrio							
Orientación horizontal anormal							
Orientación vertical anormal							
Pérdida del control de flotabilidad							
Comportamiento anormal de natación							
Hipoactividad							
Distribución anormal en la superficie							
Distribución anormal en el fondo							
Alta reacción ante estímulos							
Baja reacción ante estímulos							
Aislamiento social							
Función ventilatoria anormal							
Ventilación irregular							
Acción de tragar (Gulping)							
Pigmentación anormal							
Pigmentación anormal							
Otras anomalías visibles							
Edema							
Hemorragia							
Agresión / Canibalismo							

Anexo 6. Datos de evaluación de bioensayos – Control

CONTROL				
Observación	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Tiempo de observación. aprox.	24 h	48 h	72 h	96 h
Nº peces muertos	0	0	0	0
Pérdida del equilibrio				
Orientación horizontal anormal	0	0	0	0
Orientación vertical anormal	0	0	0	0
Comportamiento anormal de natación				
Hipoactividad	0	0	0	0
Reacción anormal	0	0	0	0
Escape al fondo	0	0	0	0
Otras anomalías visibles				
Hemorragia	0	0	0	0

Anexo 7. Datos de evaluación de bioensayos – 4mg/L

4 mg/L				
Observación	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Tiempo de observación. aprox.	24 h	48 h	72 h	96 h
Nº peces muertos	0	0	0	0
Pérdida del equilibrio				
Orientación horizontal anormal	0	0	0	0
Orientación vertical anormal	0	0	0	0
Comportamiento anormal de natación				
Hipoactividad	0	0	0	0
Reacción anormal	0	0	0	0
Escape al fondo	0	0	0	0
Otras anomalías visibles				
Hemorragia	0	0	0	0

Anexo 8. Datos de evaluación de bioensayos – 8mg/L

8 mg/L				
Observación	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Tiempo de observación. aprox.	24 h	48 h	72 h	96 h
Nº peces muertos	0	0	0	0
Pérdida del equilibrio				
Orientación horizontal anormal	0	0	0	1
Orientación vertical anormal	0	0	0	0
Comportamiento anormal de natación				
Hipoactividad	0	1	1	3
Reacción anormal	0	0	1	1
Escape al fondo	0	1	4	5
Otras anomalías visibles				
Hemorragia	0	0	0	1

Anexo 9. Datos de evaluación de bioensayos – 12mg/L

12 mg/L				
Observación	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Tiempo de observación. aprox.	24 h	48 h	72 h	96 h
Nº peces muertos	0	0	0	0
Pérdida del equilibrio				
Orientación horizontal anormal	0	0	0	0
Orientación vertical anormal	0	0	1	2
Comportamiento anormal de natación				
Hipoactividad	2	3	3	7
Reacción anormal	0	0	1	1
Escape al fondo	3	3	4	7
Otras anomalías visibles				
Hemorragia	0	0	0	1

Anexo 10. Datos de evaluación de bioensayos

	HIPOACTIVIDAD	ESCAPE AL FONDO	% H	PROM	DE	% EF	PROM	DE
B-C-24h	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B-4mg/L-24h	0	0	0.00			0.00		
B-8mg/L-24h	0	0	0.00			0.00		
B-12mg/L-24h	2	3	28.57			0.00		
B-C-48h	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B-4mg/L-48h	0	0	0.00			0.00		
B-8mg/L-48h	1	1	14.29			14.29		
B-12mg/L-48h	3	3	42.86			42.86		
B-C-72h	0	0	0.00	17.86	17.98	0.00	35.71	34.01
B-4mg/L-72h	0	0	0.00			0.00		
B-8mg/L-72h	1	4	14.29			57.14		
B-12mg/L-72h	3	6	42.86			85.71		
B-C-96h	0	0	0.00	53.57	31.68	0.00	57.14	43.64
B-4mg/L-96h	0	0	0.00			0.00		
B-8mg/L-96h	3	5	42.86			71.43		
B-12mg/L-96h	7	7	100.00			100.00		

Anexo 11. Análisis estadístico de hipoactividad

Fuente	GL	SC Ajust.	MC. Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTOS	3	7653	2551	10.71	0.003
HDE	3	1837	612.2	2.57	0.119
Error	9	2143	238.1		
Total	15	11633			

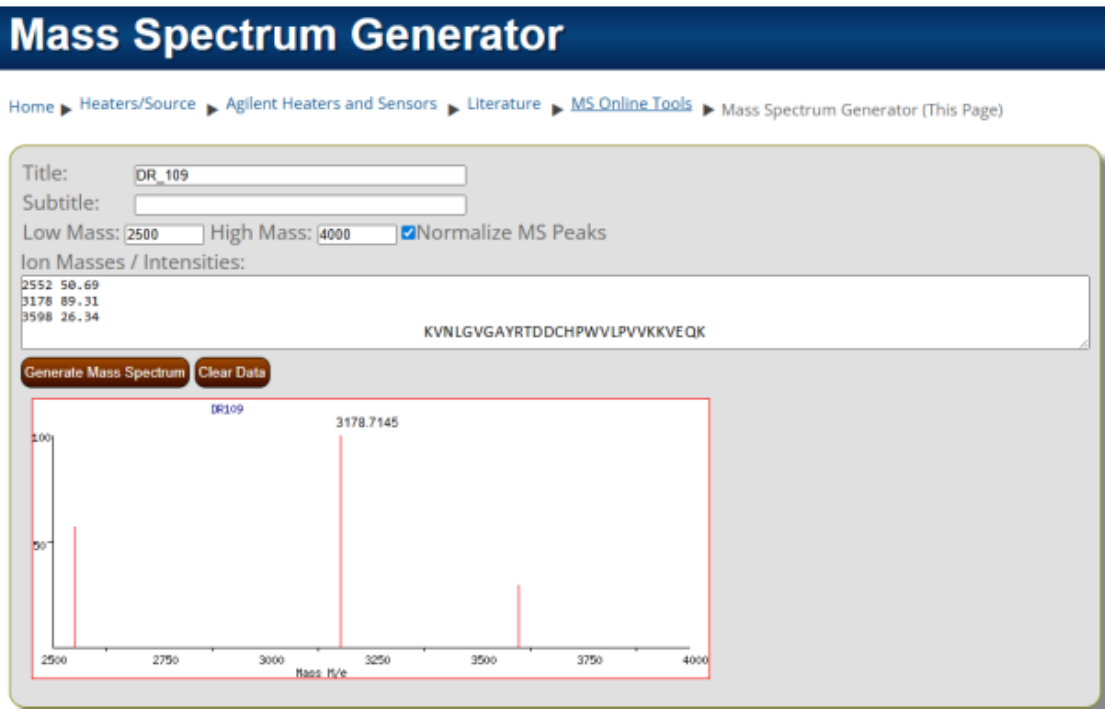
TRATAMIENTOS	N	Media	Agrupación
B-C	4	0	a
B-4mg/L	4	0	a
B-8mg/L	4	17.8571	a
B-12mg/L	4	53.5714	b

Anexo 12. Análisis estadístico de Escape al Fondo

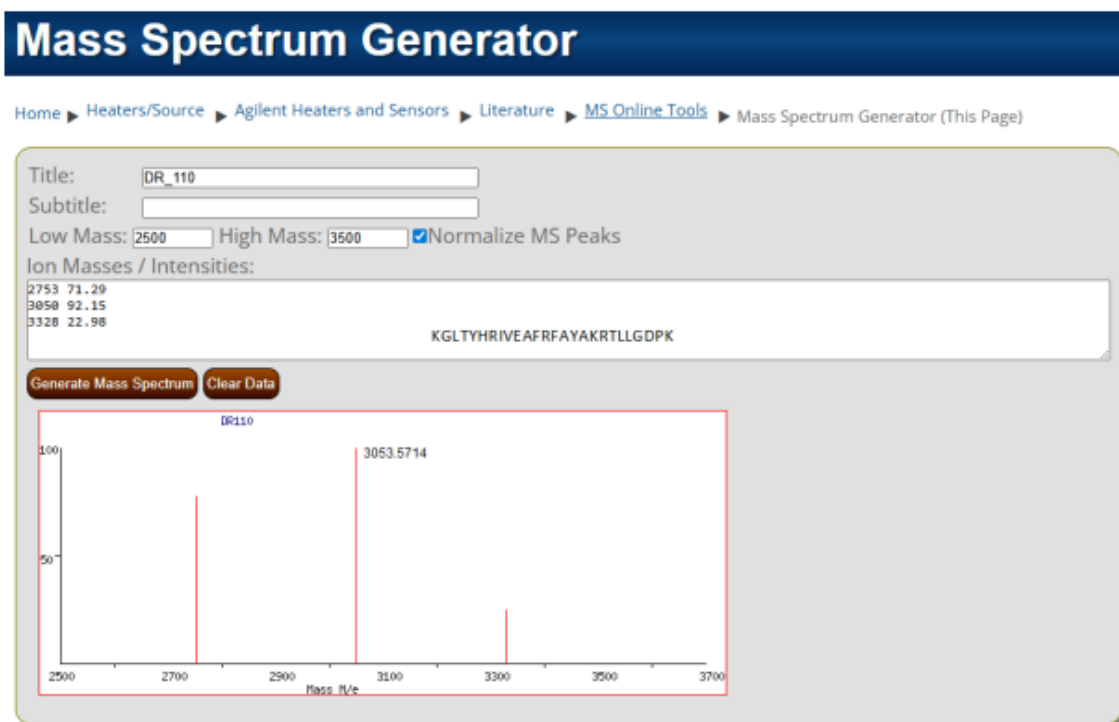
Fuente	GL	SC. Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTOS	3	9541	3180.3	5.78	0.017
HDE	3	4643	1547.6	2.81	0.1
Error	9	4949	549.9		
Total	15	19133			

TRATAMIENTOS	N	Media	Agrupación
B-C	4	0	a
B-4mg/L	4	0	a
B-8mg/L	4	35.7143	ab
B-12mg/L	4	57.1429	b

Anexo 13. Espectrometría de Masas DR_109



Anexo 14. Espectrometría de Masas DR_110



Anexo 15. Reporte de Calibración del Equipo Xevo Ge-XS-Qtof

PROTOCOLO DE USO DEL Xevo Ge-XS-Qtof**CONFIDENCIAL****FICHA TECNICA:
Xevo Ge-XS-Qtof
Calibration Report****Summary**

RMS residual mass: 0.4 ppm (0.2 mDa)
95% confidence band: 0.6 ppm
Threshold: 1.0 ppm
Matched: 03 of 03 peaks

Action: Create Calibration (Automatic)
Calibration Profile: Small molecules
Mass Range: 2000 to 4000 Da
Mode: Resolution
Polarity: Positive
Flow Rate: 20.00
Calibration file: <C:/MassLynx/IntellStart/Results/Small Molecules TESIS>
Cone Voltage Used: 15.00
Capillary Voltage Used: 3.00

Instrument Id: **UPCC-Xevo G2-XS QTOF**
Computer Name: MMLAPS65
Software Version: MassLynx 4.1 SCN923 – Build 55
User Name: micromass

