

INFORME PARCIAL

CGPI 20060186

ESTUDIOS DE TOXICIDAD Y CAPTACIÓN DE ALUMINIO EN AGUA SOBRE DIVERSAS ESPECIES DE PECES DE LA PRESA MADÍN

Galar-Martínez M.^{1*}, López-López E¹., Amaya-Chávez A.², Gómez-Oliván L.²,
Sedeño-Díaz J.E¹.

¹ Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Sección de Graduados,
Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, CP 11340, México
D.F, México.

² Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Autónoma del
Estado de México, 50100 Toluca, Estado de México, Mexico

1. RESUMEN

La presa Madín es un embalse de gran importancia para el Estado de México, ya que abastece de agua potable a los municipios de Naucalpan y Atizapán y en él se llevan a cabo actividades recreativas como la pesca y el veleo.

Este embalse recibe las descargas domésticas directas de los poblados de Nuevo y Viejo Madín, así como los desechos arrastrados por el río Tlalnepantla a lo largo de su cause. Además en sus orillas se encuentran tiraderos de basura, por lo que su degradación es evidente. Es importante mencionar que este cuerpo de agua cuenta con una planta potabilizadora, que utiliza aluminio para la floculación de materia orgánica, el cual puede constituirse en una fuente importante de este metal.

Considerando que los peces capturados en la zona son consumidos por la población aledaña y que el embalse recibe múltiples contaminantes, entre ellos aluminio, que pueden bioconcentrarse en estos organismos, el objetivo del presente trabajo es

evaluar la toxicidad producida por el aluminio adicionado a matrices naturales y artificiales en diversas especies de peces (*Goodea gracillis*, *Stenopharingodon idella* y *Cyprinus carpio*).

Durante esta primera fase del proyecto, se realizó la evaluación química de los contaminantes presentes tanto en el agua como en los sedimentos de la presa Madín, encontrándose la presencia de aluminio, fierro y mercurio, en cantidades que superan los límites permisibles establecidos para la protección de la vida acuática, además de otros metales e hidrocarburos de diversos tipos.

En cuanto a los estudios de toxicidad del aluminio, se evaluó el daño producido sobre *Goodea gracillis*, tanto en sedimentos naturales como artificiales y sobre *Stenopharingodon idella* en agua, encontrándose que produce estrés oxidativo (aumento del grado de lipoperoxidación y actividad de superóxido dismutasa y catalasa) en ambas especies y cambios en la concentración de catecolaminas (adrenalina y serotonina) en *C. idella*, correlacionados con la concentración del metal captada por los organismos en estudio.

Palabras clave: Aluminio, *C. idella*, *G. gracillis*, estrés oxidativo, neurotransmisores.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 La presa Madín.

El agua superficial de la Cuenca del Valle de México contribuye sólo con alrededor del 2% ($1.4 \text{ m}^3/\text{s}$) al abastecimiento de agua de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM). El río Magdalena proporciona el agua para el Distrito Federal, mientras que la presa Madín, en el río Tlalnepantla, abastece al Estado de México con una cantidad de $0.5 \text{ m}^3/\text{s}$. Cuando se encuentran disponibles, se emplean los pequeños arroyos y manantiales naturales, fuentes que también ingresan directamente al sistema de distribución.

La presa Madín provee de agua a Atizapan de Zaragoza, Naucalpan y Tlalnepantla. En esta zona se ubica un sistema hidrológico que se compone por ríos y arroyos vinculados con dos presas, 1) la Presa Madín es alimentada por el río Tlalnepantla; y los arroyos El Polvorín, El Sifón, El Aguaje, La Nopalera, Paso Hondo y El Pozo, y 2) la Presa de Guadalupe por los siguientes arroyos Xinte, La Bolsa y Plan de Guadalupe.

La presa Madín se construyó a los $99^\circ 15' 33''$ longitud Oeste y $19^\circ 31' 37''$ latitud Norte para regular los caudales (avenidas) del río Tlanepantla y potabilizar parte del volumen almacenado. Fue inaugurada en 1980 y tiene una capacidad límite de $25,000,000 \text{ m}^3$, aunque solo almacena $13,000,000 \text{ m}^3$, previendo caudales mayores. Una parte mínima de dicho volumen aproximadamente de 540 a 600 L/s se bombea a la planta potabilizadora para ser tratada y distribuida a la red municipal. Esta planta emplea sulfato de aluminio durante el proceso de floculación de materia orgánica.

Una de las principales fuentes de contaminación del agua en la zona es el nivel de acidez de las precipitaciones pluviales, cuyo pH varía de 5 a 5.4. Este fenómeno se presenta principalmente por las altas emisiones de contaminantes, SO_x , NO_x y Cl_2 generados por fuentes fijas y móviles (industria y automotores). Además, como el municipio no cuenta con el equipo necesario para el tratamiento adecuado de sus aguas residuales, la presa Madín se encuentra contaminada con descargas

sanitarias directas, provenientes de los asentamientos humanos localizados en la zona. Las aguas residuales, especialmente las de tipo industrial, contienen elementos nocivos como lo son: sustancias químicas diversas, metales pesados, solventes, ácidos, grasas y aceites, entre otros. Asimismo, en las casas - habitación se tiene el uso extendido de detergentes en lugar de jabones y los talleres mecánicos comúnmente arrojan aceites quemados a las alcantarillas.

Es importante mencionar que en el embalse se realizan actividades recreativas como el veleo y la pesca de diversas especies, que son consumidas por la población aledaña, por lo que los contaminantes del sitio pueden ser bioconcentrados y finalmente llegar al último eslabón de la cadena trófica, el ser humano.

2.2 El aluminio

El aluminio es uno de los metales más ampliamente usados y también uno de los más frecuentemente encontrados en los compuestos de la corteza terrestre. Se emplea principalmente en la fabricación de contenedores, en la elaboración de alimentos, medicamentos, cosméticos, pinturas y en el tratamiento de aguas. En forma de sulfato ha sido utilizado históricamente para tratar todo tipo de aguas, ya sea para el consumo humano, mejorar la calidad de los efluentes industriales o cloacales, en el encolado de papel y como mordiente en tintorerías. En la actualidad se utiliza predominantemente en tratamiento de aguas.

2.1.1 Efectos ambientales del aluminio

El aluminio es un riesgo para ciertos ambientes de trabajo, como son las minas, donde se puede encontrar en el agua. La gente que trabaja en fábricas donde el aluminio es aplicado durante el proceso de producción puede aumentar los problemas de pulmón cuando ellos respiran el polvo (Kippes, 2004).

Este metal puede acumularse en las plantas y causar problemas de salud a animales que las consumen. Los efectos del aluminio han atraído la atención, debido principalmente a los problemas de acidificación en aguas. Las concentraciones del Al

parecen ser muy altas en lagos acidificados (Mc Dowell, 1992). En estos lagos un número de peces y anfibios están disminuyendo debido a las reacciones de sus iones con las proteínas de las branquias de los peces y los embriones de las ranas.

Otro efecto negativo en el ambiente del aluminio es que estos iones pueden reaccionar con los fosfatos disminuyendo su disponibilidad para los organismos acuáticos.

Altas concentraciones de aluminio no sólo pueden ser encontrados en lagos ácidos y aire, también en aguas subterráneas y suelos ácidos. Hay fuertes indicadores de que puede dañar las raíces de los árboles cuando estas están localizadas en las aguas subterráneas (Teien et al, 2006).

2.2.2 Efectos tóxicos del aluminio

El aluminio es comúnmente conocido como un compuesto inocuo. Pero cuando se expone a altas concentraciones, este puede causar daños. La forma soluble en agua del aluminio es la responsable de dichos efectos. La ruta de intoxicación de este metaloide es a través de la ingestión así como el contacto con la piel y las membranas del sistema respiratorio.

Los metales pesados son importantes contaminantes ambientales. En los cuerpos de agua, y dependiendo de su estado químico, pueden ser encontrados en forma soluble en la columna de agua, o bien ser acumulados en los sedimentos. Diversos estudios han demostrado que de manera general, estos tóxicos son capaces de unirse a los grupos sulfhidrilo y dañar por lo tanto a las diversas estructuras que los poseen, tales como el DNA, RNA, proteínas, etc.

Ward *et al.*, (2006) demostraron que en los peces expuestos a Al, la membrana externa (cascarón) de los huevos es más fina, produciendo además una baja tasa de reproducción y peso de los productos, aumento en la secreción de mucosidades en branquias, disminución de sus respuestas inmunes e hipoxia en la hemolinfa. Este metal es capaz de incrementar los niveles de lipoperoxidación, así como disminuir la actividad de diversas enzimas como la glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, aspartato aminotransferasa, entre otras en diversos tejidos (Yousef *et al.*, 2005). En diferentes modelos animales se ha observado que el Al puede producir cambios químicos y patológicos en el hígado. Esta habilidad hepatotóxica puede ser generada por diversos mecanismos ya sea de forma directa o indirecta. Por un lado, puede interactuar directamente con los grupos SH de los aminoácidos como la cisteína y metionina, además inducir la formación de aductos con las bases nitrogenadas debido a la formación de enlaces covalentes con los grupos fosfatos de dichas biomoléculas y como consecuencia pérdida de la estabilidad del DNA. De forma indirecta este metaloide es capaz de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) y como resultado estrés oxidativo (Yokel, 2000).

Datos obtenidos por exposición en humanos y diversos estudios en animales, han encontrado una asociación entre concentraciones excesivas de aluminio en tejido nervioso y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (AD) y problemas óseos por diálisis renal. Además se han encontrado cantidades importantes de este metal en la sustancia *nigra* de las neuronas en pacientes con parkinsonismo idiopático y en infantes prematuros expuestos a altas concentraciones de aluminio en fluidos parenterales. (Barquero *et al.*, 2001). Los estudios de Neri y Hewitt (1991), encontraron una asociación estadísticamente significativa entre el riesgo del primer diagnóstico de AD o un temprano daño cognitivo en la edad avanzada y elevadas concentraciones de aluminio en el agua de distribución.

2.3 *Ctenopharyngodon idella*

Este pez pertenece a la familia de los Ciprinidos y es conocido como carpa herbívora, debido a sus hábitos alimenticios. Es de color pardo verdusco. Los adultos suelen pesar unos 2.3 kg, pero se tienen datos de algunos ejemplares que han alcanzado los 35 kg. Las carpas crían desde mayo hasta julio, y las hembras ponen sus huevos entre las plantas acuáticas. Se desarrollan mejor en aguas cálidas, en especial las poco profundas de lagos fangosos. En la temporada seca pueden sobrevivir varias semanas enterradas en el lodo. Las carpas son prolíficas. Se alimentan de la vegetación acuática y como remueven los fondos fangosos son capaces de vivir en aguas sucias y estancadas. (www.lagunasruidera.com).

2.4 *Goodea gracillis*

La familia Goodeidae tiene presencia en Nevada y el oeste del centro de México. Su reproducción es por fertilización interna y es de las pocas especies ovovivíparas existentes. Los machos de esta familia tiene la particularidad de tener las rayas anteriores de la aleta anal muy juntas, mas cortas y parcialmente separadas del resto de la aleta, lo cual se sospecha es un gonopodio primitivo llamado pseudofalo. En la hembra los ovarios están parcialmente fusionados para formar un solo órgano. Los embriones y recién nacidos tienen una estructura llamada trophotaeniae que funciona como una placenta. La forma corporal y hábitos alimenticios son diversos y llegan a alcanzar una longitud máxima de 20 cm. (Hubbs *et al.* 1939).

La familia Goodeidae pertenece a la clase Actinopterygii y orden Cyprinodontiformes. Contiene 19 géneros y 40 especies. Puede ser encontrada en agua dulce y salina con una concentración media entre agua dulce y agua marina. La principal modalidad de nado en los peces adultos es subcaragniforme (Hubbs *et al.* 1939).

El *Goodea gracillis* tiene presencia predominante en San Luís Potosí en el río Panuco. El macho alcanza un tamaño de aprox. 8 cm. y la hembra de hasta 12 cm., vive en aguas profundas, prefiere un pH de 7.0 a 7.7 y una temperatura de 21 a 27 °C. Es vivíparo y tiene una tasa de reproducción media a alta. Este pez es resistente a condiciones adversas y tiene la capacidad de vivir en aguas alcalinas (Hubbs *et al.*

1939). Actualmente se encuentra clasificada como especie vulnerable (Contreras *et al.* 1996).

2.5 *Cyprinus carpio*

La carpa común (*Cyprinus carpio*) es un pez de agua templada a semifrías, que soporta poco oxígeno y altos niveles de pH, amoníaco, nitratos, nitritos y fosfatos. Este organismo fue introducido en México en los años 60`s ya que requerían cultivar una especie que fuera barata y de fácil manejo.

La carpa es una variedad bentónica, se alimenta tanto de animales como de vegetales monocelulares o pluricelulares (omnívora). Comúnmente es empleada en cultivos comerciales y se ha propuesto como un organismo de prueba para ensayos toxicológicos por su importancia económica y amplia distribución geográfica.

Estos peces responden a estímulos ambientales a través de la estimulación de los órganos sensores, el cerebro y/o la medula espinal. El sistema endocrino y nervioso se encuentran íntimamente relacionados, por ejemplo, la conducta sexual esta influida por la percepción de los cambios ambientales.

2.6 Biomarcadores

2.6.1 El estrés oxidativo

Se consideran radicales libres (RL) aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad y lo hace extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente con la diversidad de moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Los RL son un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos. Una elevación o disminución de las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno (ROS) puede acarrear importantes alteraciones funcionales. La aterosclerosis, el envejecimiento y el cáncer, son solo algunos de los problemas fisiológicos y padecimientos asociados con una elevada concentración de RL. (Freeman y Crapo, 1982; Basaga, 1989).

El oxígeno molecular (O_2) tiene 2 electrones no apareados en su orbital externo. La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por acción del complejo citocromo-oxidasa (citocromo A+a3) de la cadena respiratoria mitocondrial. En la molécula de O_2 se generan por su reducción parcial las especies reactivas siguientes: O_2^- = anión superóxido, OH = radical hidroxilo, H_2O_2 = peróxido de hidrógeno y $*O_2$ = oxígeno singlete (Reilly y Bulkley, 1990; Witztum, 1993).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es estrictamente un RL pero por su capacidad de generar el OH^- en presencia de metales como el hierro, se le considera como tal.

La mitocondria constituye la fuente principal de RL. Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP. En este proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de electrones y se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas puede entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los RL (Turrens, 1994). Otras fuentes son los peroxisomas, ricos en oxidasas y que generan H_2O_2 , el cual es depurado por las catalasas y transformado en agua. Los RL se forman por lo tanto en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos defensivos celulares. En situaciones patológicas esta producción se incrementa, ocasionando un estado de estrés oxidativo.

Algunos de los factores considerados importantes en la producción de RL son los químicos (aumento de metales pesados, hidrocarburos y componentes del tabaco),

los físicos (radiaciones ultravioleta e hiperoxia, entre otros) y los orgánicos y metabólicos (dieta hipercalórica o insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios y traumatismos).

Por la alta inestabilidad atómica de los RL colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. Si se trata de los lípidos (ácidos grasos polinsaturados), se dañan las estructuras ricas en ellas como las membranas celulares, alterando la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular.

La oxidación lipídica por los RL se lleva a cabo mediante una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina. Este proceso es conocido como lipoperoxidación y genera numerosos subproductos, muchos de ellos como el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos para evaluar el estrés oxidativo.

En caso de las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el normal desarrollo de sus funciones (Oteiza, 1995).

Otra molécula que es dañada por los RL es el ADN; el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, promoviendo el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión por daño al gen específico.

La vida en presencia del oxígeno molecular exige contar con una batería múltiple de defensa contra los diversos RL de oxígeno, que por un lado tiendan a impedir su formación y por otro, los neutralicen una vez formados.

El desbalance entre la producción de RL y la defensa antioxidante provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular

(Aejmelaus y cols., 1997; Wei y cols., 1996). Se puede medir este daño mediante métodos directos e indirectos. Entre los indirectos, los cuales son más indicados, se encuentran los siguientes: a) determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre biomoléculas, como el grado de lipoperoxidación a través de la cuantificación del malondialdehído (MDA); b) medición de la concentración de antioxidantes como vitaminas E, C y coenzima Q, que se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución, sobre material biológico que puede ser plasma, orina o tejido; c) medición del estado oxidativo, que refleja el balance entre el sistema oxidante y pro-oxidante y es beneficioso en muchas enfermedades.

De todos estos métodos el más empleado por su sencillez y bajo costo es la determinación plasmática de MDA, uno de los subproductos de la peroxidación lipídica. La determinación del daño oxidativo constituye aún un terreno poco desarrollado y se realizan esfuerzos a nivel mundial para el desarrollo de nuevos y sencillos métodos de evaluación.

2.6.2 Neurotoxicidad y la evaluación de catecolaminas

Las catecolaminas son una clase de neurohormonas que contienen un núcleo catecol (3,4- dihidroxifenilo) y un grupo amino. Ellas son sintetizadas a partir de la L-tirosina, vía una secuencia de pasos enzimáticos en nervios simpáticos, la médula adrenal y células cromafinas. Generalmente, el término catecolaminas se refiere a la dopamina, norepinefrina y epinefrina, que juegan un papel importante en la transmisión nerviosa y regulación del metabolismo en el organismo. Elevados niveles de norepinefrina y dopamina indican algún tipo de desorden neurológico y su análisis cuantitativo es importante para el diagnóstico de un gran número de enfermedades tales como hipertensión, Parkinson, esquizofrenia, epilepsia, etc. (D'Alesandro *et al.*, 1990).

2.6.2.1 Noradrenalina / norepinefrina (NE)

La colección más prominente de neuronas noradrenérgicas está localizada en el *locus ceruleus* de la materia gris de los núcleos de pons y en el tegmentaria lateral.

También hay un cluster en la médula. La NE está encargada de la regulación del ánimo (disminuye en depresión y aumenta en manía), los sistemas de recompensa funcionales y la excitación.

2.6.2.2 Dopamina (DM)

La distribución de DM en el cerebro no es uniforme, pero es más restrictiva que la de NE. Los núcleos dopaminérgicos son encontrados principalmente en: a) *substantia nigra pars compacta* que se proyecta a la región del estriado y en gran parte modula el movimiento coordinado; b) el área tegmentaria ventral que se proyecta a la corteza frontal y cíngulo, *nucleus accumbens*, y otras estructuras límbicas; y c) el núcleo arcuato del hipotálamo que se proyecta a la glándula pituitaria. Una proporción grande de dopamina del cerebro es encontrada en el *corpus striatum*, la parte del sistema extra piramidal ocupado por el movimiento coordinado.

La dopamina es metabolizada en monoamino oxidasa (MAO) y catecol-O-metil transferasa (COMT) en ácido dihidroxifenil acético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA). El HVA es usado como un índice periférico del volumen de central dopamina en la gente, pero este uso ha sido poco explorado en la medicina veterinaria. Todos los receptores dopaminérgicos están unidos a receptores de proteínas G. Los receptores D₁ exponen su inhibición post-sináptica en el sistema límbico y son afectados en desórdenes de humor y estereotipias. Todos los receptores D₂, D₃, y D₄ son afectados en desórdenes de humor y estereotipias. El exceso de dopamina, producido por agentes de liberación de dopamina (anfetaminas y agonista de dopamina, como apomorfina) tiene que ver con el desarrollo de estereotipias.

3. JUSTIFICACIÓN

La presa Madín alimentada por el río Tlalnepantla, Edo. Méx., abastece de agua potable a los municipios de Naucalpan y Atizapán y en ella se realizan diversas actividades recreativas como el veleo y la pesca. Este embalse recibe las descargas domésticas directas de los poblados de Nuevo y Viejo Madín, así como los desechos arrastrados por el río Tlalnepantla a lo largo de su cause. Además en sus orillas se encuentran tiraderos de basura, por lo que la degradación de la presa es evidente. Estudios preliminares relativos a la identificación de contaminantes en el sitio han demostrado que tanto el agua como los sedimentos de este embalse cuentan con una carga considerable de metales pesados, entre los que podemos destacar al aluminio, cuyos valores rebasan los límites permisibles para la protección de vida acuática (Galar-Martínez *et al.*, en prep.).

En la presa Madín es posible encontrar diversas especies de peces, tales como *Ctenopharyngodon idella*, *Goodea gracillis* y *Cyprinus carpio*. Dadas las concentraciones de metales pesados encontradas en este embalse es posible que éstas sufran daños importantes a su salud, pudiendo modificar de manera importante al ecosistema en general. Por otra parte, estos organismos son colectados en esta presa y consumidos por algunos sectores de la población, por lo que si son capaces de bioconcentrar a los contaminantes presentes en la zona pueden finalmente constituirse en un factor de riesgo para los consumidores.

Debido a lo anterior, en este proyecto se evaluará el daño producido por el aluminio sobre estas especies y determinará la influencia de las características ambientales del embalse sobre dicha respuesta tóxica. Cabe mencionar que a excepción de los trabajos realizados por el Laboratorio de Toxicología Acuática de la ENCB y de la Facultad de Química de la UAEMex, que aún se encuentran en proceso, hasta la fecha no se han encontrado reportes toxicológicos relativos a la presa Madín y los estudios sobre el daño producido por este metal en *Ctenopharyngodon idella*, *Goodea gracillis* y *Cyprinus carpio* son escasos, en particular sobre aluminio.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la toxicidad producida por el aluminio en agua y sedimentos artificiales y de la presa Madín, sobre *Ctenopharyngodon idella*, *Goodea gracillis* y *Cyprinus carpio*.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Cuantificar la presencia de metales en las matrices agua y sedimento de la presa Madín.

4.2.3 Determinar la toxicidad producida por exposición subaguda a las matrices naturales de la presa Madín sobre *Ctenopharyngodon idella*, *Goodea gracillis* y *Cyprinus carpio*, mediante la evaluación de los siguientes biomarcadores: grado de lipoperoxidación, actividad de superóxido dismutasa y catalasa, contenido de adrenalina y dopamina, y concentración de aluminio.

4.2.4 Evaluar el daño producido por exposición subaguda a Al, adicionado a matrices artificiales a concentraciones equivalentes a las encontradas en la presa Madín sobre *Ctenopharyngodon idella*, *Goodea gracillis* y *Cyprinus carpio*, mediante los siguientes biomarcadores: grado de lipoperoxidación, actividad de superóxido dismutasa y catalasa, contenido de adrenalina y dopamina, y concentración de aluminio.

4.2.5 Determinar los factores de bioconcentración de Al en *Ctenopharyngodon idella*, *Goodea gracillis* y *Cyprinus carpio* en matrices artificiales y naturales.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Colecta de agua y sedimentos de la presa Madín

El muestreo de matrices se realizó en el mes de febrero del 2006 y corresponde a la temporada de sequía fría. Dichos muestreos se efectuaron a nivel de superficie, en cuatro estaciones que corresponden a: 1) descarga del poblado de “Viejo Madín”, 2) descarga del poblado de “Nuevo Madín”, 3) Brazo lateral del embalse y 4) afluente ó entrada al embalse del río “Tlalnepantla”. El agua fue colectada mediante botellas de cierre automático y los sedimentos mediante una draga cónica. Ambas matrices fueron colocadas en frascos de plástico previamente lavados con ácido nítrico, con el fin de evitar contaminación cruzada y trasladados al laboratorio para su tratamiento.

5.2 Mantenimiento y cultivo de los organismos de prueba

Las carpas (*Ctenopharyngodon idella* y *Cyprinus carpio*) fueron obtenidas del Centro Piscícola Tezontepec de Aldama, Hidalgo, mientras que los godeidos (*Goodea gracillis*) fueron cultivados en el laboratorio a partir de un pie de cría donado por el Laboratorio de Ictiología de la ENCB, IPN. Una vez en el laboratorio fueron colocados en acuarios de 80L de capacidad, con oxigenación constante y ciclos de luz-oscuridad natural y alimentados cada 24 horas con Wardley pond, Tend Stix, (Floating food stix for all pondfish) y con un filtro eléctrico. Los animales fueron aclimatados a estas condiciones durante 2 semanas previas a la realización del estudio de toxicidad.

5.3 Caracterización química de las matrices de la presa Madín

En ambas matrices se cuantificó el contenido de metales (Al, Fe, Hg, Cu, Ni, Cd, Cr y Pb) mediante absorción atómica, previa digestión de la muestra (1g) con HNO₃ en autoclave a 120 °C y 120 lb de presión y filtrado de la misma (APHA, 1995).

5.4 Estudios de toxicidad

Los sistemas de intoxicación consistieron en peceras de 20 L de capacidad, conteniendo para el caso de pruebas en agua 19 L de agua (natural o sintética)

adicionada con Al y para pruebas de sedimentos 19 L de agua y 1 kg de sedimento (natural o artificial) adicionado con el metal, dependiendo del estudio. Los sistemas fueron mantenidos con ciclos de luz-oscuridad naturales, oxigenación constante y sin alimentación durante cada una de las pruebas, a fin de evitar la interferencia o bien adsorción del Al al alimento.

5.4.1 Evaluación de la toxicidad aguda

Es importante mencionar que este es un proyecto recurrente, por lo que solo se mencionarán las pruebas que se han efectuado hasta la fecha.

5.4.1.1 Toxicidad aguda del Al adicionado al agua sobre *C. idella*

Se formaron 5 lotes problema y 1 testigo de 6 carpas cada uno. Los lotes problema fueron expuestos durante 96 h a cinco diferentes concentraciones de sulfato de aluminio (45, 46, 47, 48, 49 y 50 mg/L) adicionadas al agua sintética. Cada 24 horas se contó el número de organismos muertos y se determinó la concentración letal media (CL₅₀) mediante el método de Probits a las 96 h (Montpellier, 1997). Esta prueba nos permitió conocer el efecto agudo producido por el Al sobre la carpa herbívora, cuando éste es adicionado solamente al agua, sin interferencias de las características propias del embalse.

5.4.1.2 Toxicidad aguda del Al adicionado a sedimentos sobre *G. gracillis*

Se formaron 5 lotes problema y 1 testigo de 6 godeidos cada uno. Los lotes problema fueron expuestos durante 96 h a cinco diferentes concentraciones de sulfato de aluminio adicionadas al sedimento artificial. Cada 24 horas se contó el número de organismos muertos y se determinó la concentración letal media (CL₅₀) mediante el método de Probits a las 96 h (Montpellier, 1997). Esta prueba nos permitió conocer el efecto agudo producido por el Al sobre los godeidos, cuando éste es adicionado a agua y sedimentos, sin interferencias de las características propias del embalse.

5.4.1.3 Letalidad de los sedimentos de la presa Madín sobre *G. gracillis*

Se formaron 5 lotes problema y 1 testigo de 6 godeidos cada uno. Los lotes problema fueron expuestos durante 96 h a los sedimentos de la presa Madín. Cada 24 horas se contó el número de organismos muertos. Esta prueba nos permitió conocer el efecto producido por los contaminantes contenidos en los sedimentos del embalse sobre los godeidos, así como la influencia de la matriz sobre la respuesta tóxica.

5.4.2 Evaluación de la toxicidad subaguda

5.4.2.1 Toxicidad subaguda del Al adicionado al agua sobre *C. idella*

Se formaron 5 lotes problema y 1 testigo de 6 carpas cada uno, empleando como concentración de prueba el límite permisible de este metal en agua para la protección de vida acuática (0.1 mg/L). Los tiempos de exposición fueron de 12, 24, 48, 72 y 96 h. Transcurrido este tiempo, se extrajo el cerebro de los organismos y se evaluó la toxicidad mediante los siguientes biomarcadores: concentración de proteínas totales (Bradford, 1975), grado de lipoperoxidación (Buege y Aüst, 1978), actividad de las enzimas catalasa (radi, 1991) y superóxido dismutasa (Misra, 1972), para la valoración del estrés oxidativo y contenido de dopamina y adrenalina (HPLC), para la evaluación de la neurotoxicidad. Se evaluó la conducta de los organismos a lo largo del estudio.

5.4.2.2 Toxicidad subaguda del Al adicionado a sedimentos sobre *G. gracillis*

Se formaron 5 lotes problema y 1 testigo de 6 godeidos cada uno, empleando como concentración de prueba el límite permisible de este metal en agua para la protección de vida acuática (0.1 mg/L). Los tiempos de exposición fueron de 12, 24, 48, 72 y 96 h. Transcurrido este tiempo, se extrajo el cerebro de los organismos y se evaluó la toxicidad mediante los siguientes biomarcadores: concentración de proteínas totales (Bradford, 1975), grado de lipoperoxidación (Buege y Aüst, 1978), actividad de las enzimas catalasa (radi, 1991) y superóxido dismutasa (Misra, 1972), para la valoración del estrés oxidativo. Se evaluó la conducta de los organismos a lo largo del estudio.

5.4.2.3 Toxicidad subaguda de los sedimentos de la presa Madín sobre *G. gracillis*

Se formaron 5 lotes problema y 1 testigo de 6 godeidos cada uno, empleando sedimentos provenientes de la presa Madín sin adicionar contaminante alguno. Los tiempos de exposición fueron de 12, 24, 48, 72 y 96 h. Transcurrido este tiempo, se extrajo el cerebro de los organismos y se evaluó la toxicidad mediante los siguientes biomarcadores: concentración de proteínas totales (Bradford, 1975), grado de lipoperoxidación (Buege y Aüst, 1978), actividad de las enzimas catalasa (radi, 1991) y superóxido dismutasa (Misra, 1972), para la valoración del estrés oxidativo. Se evaluó la conducta de los organismos a lo largo del estudio.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización química de las matrices de la presa Madín

Los resultados referentes al contenido de metales en sedimentos y agua de la presa Madín se muestran en la tabla 1. Como puede observarse, ninguno de los metales evaluados supera el límite máximo permisible seleccionado (LMP), a excepción del mercurio. Sin embargo, tanto el fierro como el aluminio, se encuentran también en cantidades considerablemente elevadas, por lo que debe establecerse una alerta al respecto. Cabe mencionar que los LMP fueron seleccionados de diferentes normatividades internacionales, incluyendo en algunos casos la mexicana, dado que estas últimas no abarcan a todos los metales dentro del rubro de protección de vida acuática.

Tabla 1. Contenido de metales en el agua y sedimentos de la presa Madín. Los resultados corresponden a la media de tres réplicas.

METAL	AGUA (mg/L)	LMP (mg/L)	SEDIMENTOS (mg/kg)	LMP (mg/kg)
Cobre	0.164	4.000 ^a	22.172 ^c	35.700
Niquel	0.040	2.000 ^a	11.824 ^c	18.000
Cadmio	0.000	0.100 ^a	0.000 ^c	0.596
Cromo	0.000	0.500 ^a	22.579 ^c	37.300
Plomo	0.000	0.200 ^a	24.586 ^c	35.000
Fierro	0.340	0.300 ^b	13 813.300 ^d	17000.000
Mercurio	0.000	0.005 ^a	397.784 ^c	0.174
Aluminio		0.200 ^b	203.613 ^c	N.A.

^a NOM 001-ECOL 1996 – El límite seleccionado fue para protección de vida acuática

^b NOM 127-SSA1 1994 – El límite seleccionado fue para agua destinada a consumo humano

^c Canadian Sediment Guidelines

^d USEPA

6.2 Toxicidad aguda del Al adicionado al agua sobre *C. idella*

Con base al análisis de probit, la concentración letal media (CL₅₀) de sulfato de aluminio en agua para la carpa herbívora es de **45.4973 mg/L**.

6.3 Letalidad de los sedimentos de la presa Madín sobre *G. gracillis*

Los resultados de la prueba de letalidad indicaron que la concentración de contaminantes presente en las muestras de sedimento de la presa Madín no es letal para *Goodea gracillis* en un periodo de hasta 96 horas, por lo que se procedió a hacer la prueba de subletalidad sin realizar ninguna dilución o modificación a las muestras de sedimento.

6.4 Toxicidad subaguda del Al adicionado al agua sobre *C. idella*

Los resultados referentes al contenido de proteínas totales en *C. idella* se observan en la fig.1, encontrándose un incremento significativo de estas biomoléculas hasta las 48 horas de exposición, y a partir de este tiempo se una caída, hasta prácticamente igualar las concentraciones encontradas en el testigo.

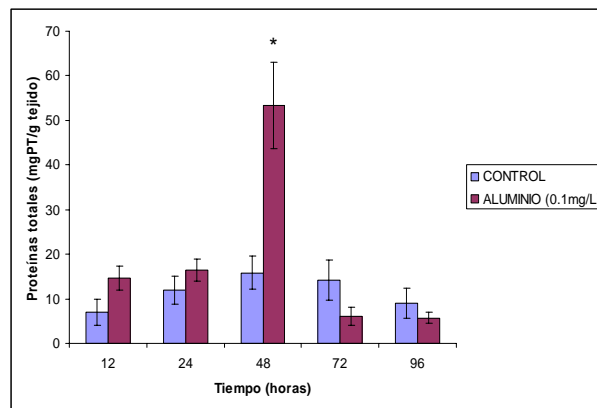


Figura 1. Contenido de proteínas totales en *C. idella* expuesta a aluminio (0.1 mg/L). Los resultados corresponden a la media de cinco réplicas.

La fig.2 muestra los resultados referentes al grado de lipoperoxidación observado en *C. idella* expuesta a aluminio (0.1 mg/L), encontrándose que a partir de las 48

horas se incrementó y dicho aumento se mantuvo tanto a 72 y 96 horas de forma tiempo-dependiente.

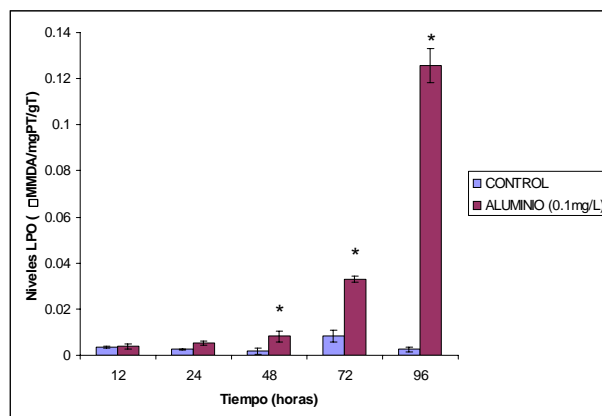


Figura 2. Grado de lipoperoxidación observado en *C. idella* expuesta a aluminio (0.1 mg/L). Los resultados corresponden a la media de cinco réplicas.

Para la actividad de la CAT (fig.3) durante los primeros dos tiempos no se observó una diferencia significativa en los organismos expuestos con respecto al testigo; sin embargo, a las 48 horas se exhibió un decremento de la actividad seguido de una recuperación de esta enzima a las 72 y 96 horas, encontrando modificaciones de ésta dependiendo del tiempo de exposición.

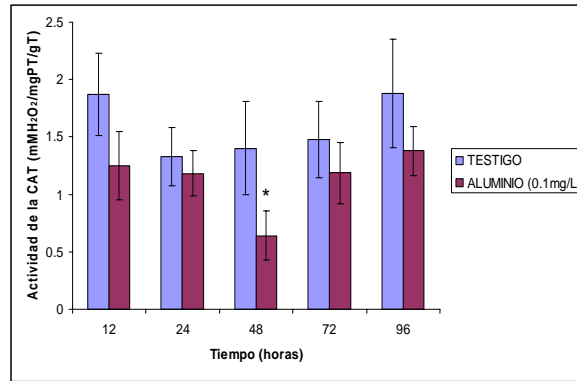


Figura 3. Actividad de catalasa en *C. idella* expuesta a aluminio (0.1 mg/L). Los resultados corresponden a la media de cinco réplicas.

En la fig. 4 se muestra que la actividad de la SOD se incrementa a partir de las 48 horas de exposición, además a las 72 y 96 horas se observó un incremento de 3 y 4 veces respectivamente de forma tiempo dependiente.

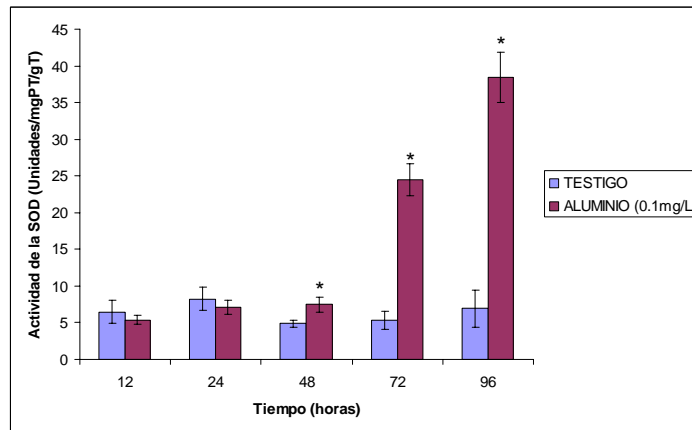


Figura 4. Actividad de superóxido dismutasa en *C. idella* expuesta a aluminio (0.1 mg/L). Los resultados corresponden a la media de cinco réplicas.

6.5 Toxicidad subaguda del Al adicionado a sedimentos sobre *G. gracillis*

Las características tanto físicas como conductuales se muestran en la tabla 2. Como podemos observar, los organismos expuestos a aluminio exhibieron cambios en su

conducta, desapareciendo el reflejo de huida y presentando letargo. En cuanto a su apariencia física, se observó la aparición de mucus en las branquias, así como cambios en la coloración de la piel.

En cuanto a las pruebas bioquímicas, podemos observar que el contenido de proteínas (fig. 5) se incrementó en comparación con el testigo conforme iba pasando el tiempo de exposición, esto nos refleja que el sulfato de aluminio si presentó un efecto toxico en la especie.

Tabla 2. Características físicas y comportamiento de *Goodea gracillis* expuesto a 0.1 mg/L de aluminio sembrado en sedimentos.

Tiempo de exposición (h)	Testigo	Problema
0	Nado en el fondo de la pecera de un extremo al otro y agrupados en las esquinas. Movimiento constante de las aletas (dorsal, caudal y anal).	
24	Movimiento de aletas. Reflejo de huida.	Nado en el fondo de la pecera de un extremo al otro y agrupados en las esquinas, nado letárgico.
48	Nado constante a ambos extremos de la pecera. Movimientos rápidos de las aletas. Color de la piel brillante.	Nado letárgico en la superficie de la pecera con presencia de mucus.
72	Nado en el fondo de la pecera de un extremo al otro y agrupados en las esquinas. Color de la piel brillante.	Nado letárgico en la superficie de la pecera con presencia de mucus excesivo.
96	Movimiento constante de nado letárgico en la superficie.	Se encuentran en la parte inferior de la pecera hay presencia de mucus excesivo. Opacidad en piel.

Los niveles de lipoperoxidación (fig. 6) de los peces expuestos a Al comparando con el testigo en el tiempo de las 24 h no presentan diferencia significativa, pero al llegar

al tiempo de 48 h se observa un aumento del grado de lipoperoxidación e incluso una diferencia significativa con respecto al testigo, debido a que probablemente se este iniciando de la destrucción celular. Sin embargo al periodo de las 72 y 96 hrs existe una disminución del grado de lipoperoxidación, en donde posiblemente se estén llevando a cabo procesos de defensa o la inhibición del proceso.

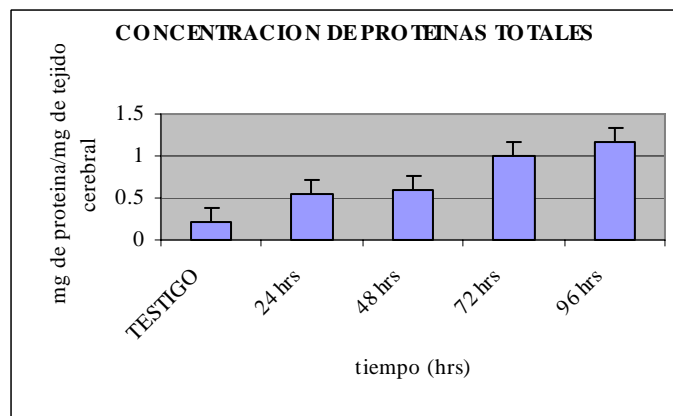


Figura 5. Concentración de proteínas de *G. gracilis* expuestos a sulfato de aluminio (0.1 mg/L) en sedimentos artificiales. Los resultados corresponden a la media de cinco réplicas.

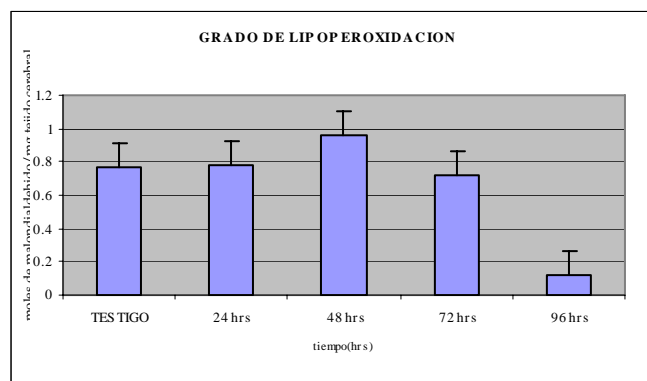


Figura 6. Grado de lipoperoxidación de *G. gracilis* expuestos a sulfato de aluminio (0.1 mg/L) en sedimentos artificiales. Los resultados corresponden a la media de cinco réplicas.

6.7 Toxicidad subaguda de los sedimentos de la presa Madín sobre *G. gracillis*

Durante este estudio se observó que a partir de las 12 h de exposición los organismos presentaron comportamiento errático con periodos de movimientos espasmódicos, así como decoloración de la piel con daño ligero en las aletas.

En cuanto al contenido de proteínas totales (fig. 7), se puede apreciar un aumento en este parámetro en los organismos expuestos a los sedimentos de la presa Madín, con respecto al testigo a lo largo de todos los tiempos de exposición, alcanzando un valor máximo de 227.88 % a las 96 horas con respecto al testigo.

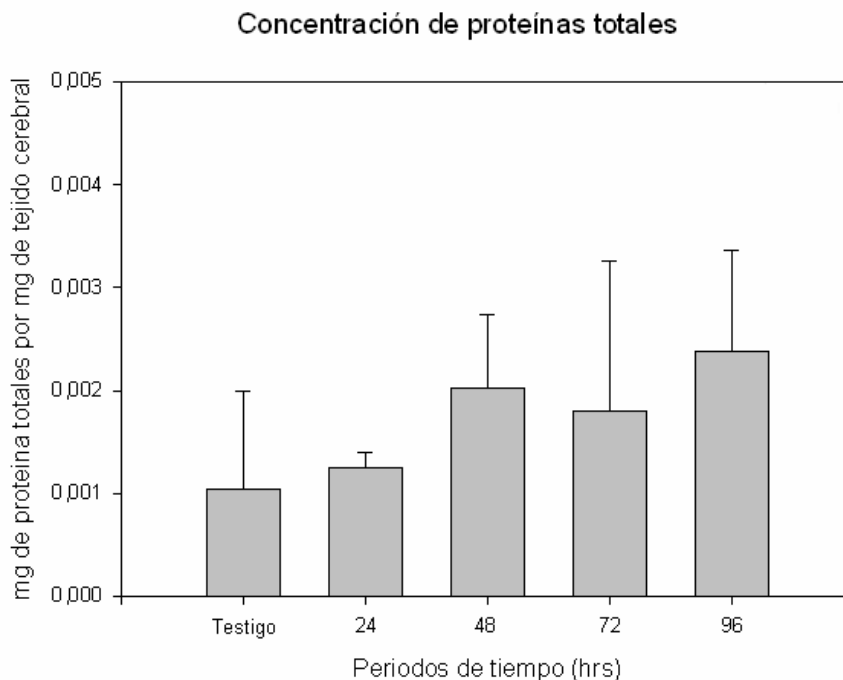


Figura 7. Concentración de proteínas de *G. gracilis* expuestos a sedimentos de la presa Madín. Los resultados corresponden a la media de cinco réplicas.

Los resultados que se obtuvieron de la determinación del grado de lipoperoxidación en cerebro de *Goodea gracillis* expuestos a sedimentos de la presa Madín se muestran en la fig. 8. Se puede observar una disminución del 74.41 % con respecto al testigo en las primeras 24 horas, para posteriormente aumentar hasta un máximo de 127,47 % a las 72 horas con respecto al mismo.

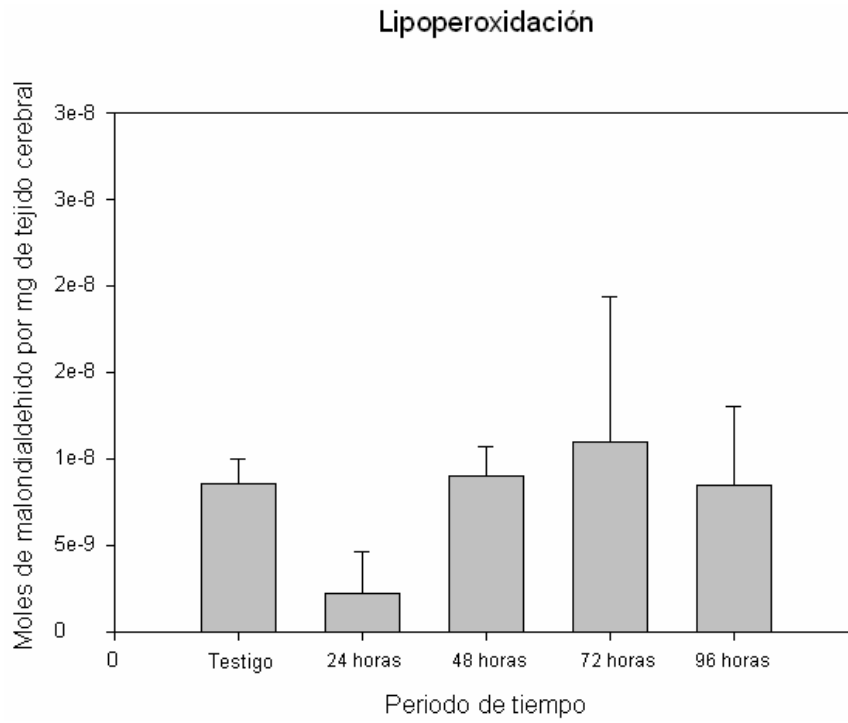


Figura 8. Concentración de proteínas de *G. gracilis* expuestos a sedimentos de la presa Madín. Los resultados corresponden a la media de cinco réplicas.

7. CONCLUSIONES

- De acuerdo con los resultados obtenidos se comprueba que el aluminio, si produce daño a nivel de estrés oxidativo en *Goodea Gracillis*, esto reflejándose tanto a nivel conductual, así como en el incremento de la concentración de proteínas totales y al comienzo del mecanismo de destrucción celular (lipoperoxidación).
- Se utilizo el límite máximo permisible de aluminio en el agua, siendo este de 0.1 mg/mL para la protección de la vida silvestre, pero dado el experimento se recomienda revisar este límite, ya que experimentalmente a esta concentración no debe de existir ningún daño en la vida acuática. Cabe señalar que la especie que se utilizó es de las más resistentes del lugar.
- Los sedimentos de la presa Madín no presentan una concentración de contaminantes letal para *Goodea gracillis*.
- Los sedimentos de la presa Madín presentan una concentración de contaminantes capaz de generar modificaciones visibles de comportamiento y morfología en *Goodea gracillis*.
- Los sedimentos de la presa Madín presentan una concentración de contaminantes capaz de aumentar significativamente la lipoperoxidación en tejido cerebral en *Goodea gracillis*.
- Los sedimentos de la presa Madín presentan una concentración de contaminantes capaz de aumentar significativamente la concentración de proteínas totales en tejido cerebral en *Goodea gracillis*.

8. IMPACTO

Los resultados obtenidos hasta el momento, indican que el aluminio tanto en agua como en sedimentos artificiales es capaz de inducir estrés oxidativo en *G. gracillis* y *C. idella*, aún a concentraciones equivalentes al LMP para la protección de vida acuática (Canadian Sediment Guidelines, 1998). Es por ello que es necesario continuar realizando ensayos toxicológicos sobre este metal, dado que hasta el momento se ha considerado inocuo y en México no existe legislación al respecto.

Por otro lado, se demostró que contaminantes presentes en los sedimentos de la presa Madín, producen daño en *G. gracillis*, por lo que es necesario continuar los bioensayos y aleratr a las autoridades pertinentes, a fin de controlar la contaminación en el sitio.

9. ANEXOS

Anexo 1 MÉTODOS ANALÍTICOS

Determinación del grado de lipoperoxidación

El método a emplear es el de Buege y Aüst (1978) que se basa en la producción de malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico, el cual es un compuesto rojizo, con un pico de máxima absorbancia a 535 nm.

Procedimiento: Se toman 500 μL de homogeneizado y se completan a 1 mL con buffer Tris-HCl pH 7.4; se incuba a 37 °C durante 30 min; se agregan 2 mL del reactivo TCA-TBA (ácido tricloroacético (TCA) al 15 % (w/v) con ácido tiobarbitúrico al 0.375 % (TBA) (w/v) en (TCA) al 15 %) y se agita en un vórtex. Posteriormente se calienta a ebullición durante 45 min, se deja enfriar y se remueve el precipitado por centrifugación a 1000 x g (3000 rpm) durante 10 min. Se determina la absorbancia de la muestra a 535 nm contra un blanco de reactivo. (Coeficiente de extinción molar del MDA = $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} / \text{M}^{-1}$).

Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

El método a utilizar es el de Misra (1972). La habilidad de la SOD para inhibir la auto oxidación de la adrenalina a pH 10.2 es la base para esta prueba.

Procedimiento: Se adicionan 20 μL del homogeneizado a la celda, se agregan 150 μL de la solución amortiguadora de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio y 0.1 mM de EDTA) a pH 10.2 y se agregan 100 μL de adrenalina 30 mM. Se determina la absorbancia a 480 nm a los 30 seg y 5 min. La actividad de la SOD se determina interpolando los datos en una curva tipo y el resultado se expresa en unidades por miligramo de proteína.

Determinación de la actividad de la catalasa

La actividad de la CAT será medida utilizando el método de Radi (1991), el cual se basa en la descomposición del H_2O_2 a 240 nm.

Procedimiento: Se toman 20 μL del sobrenadante del homogeneizado y se agrega 1 mL de la solución de buffer de aislamiento (0.3 M de sucrosa, 1 mM de EDTA, 5 mM de HEPES y 5 mM de KH_2PO_4) y 0.2 mL de la solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 20 mM) y se determina la absorbancia a 240 nm, a 0 y 60 seg.

Determinación de la concentración de proteínas

Se toman 25 μL de sobrenadante, se llevan a 100 μL y se adicionan 2.5 mL de reactivo de Bradford, se agita y deja reposar 5 minutos. Posteriormente se toma la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm. Las lecturas se interpolan en una curva tipo de albúmina.