



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Inducción de Metalotioneínas como biomarcador de
exposición *in situ* a metales en *Ambystoma mexicanum***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

FABIOLA RODRÍGUEZ EVANGELISTA



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez
2011**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mis padres Martha y Rómulo a quienes agradezco la vida.

A mi hermana Martha.

A mis abuelos y a mi familia (Tíos David, Manuel, Maye, Oscar y Silvia; primos Edith y Manolo y nuevos integrantes de la familia Chio, Nacho y Santi)

De todo corazón gracias por formar parte de mi vida y por todo el apoyo y paciencia durante la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas a las que tengo que agradecer su apoyo que tal vez tendría que escribir otra tesis. Me llena de gozo agradecer a todas esas personas que alguna vez se cruzaron en mi camino, sinceramente, ¡muchas gracias!

Mi querida UNAM, gracias, me has enseñado tanto...

Facultad de Ciencias gracias porque en ti encontré mi camino en la ciencia.

UNAAMB, no solo fuiste el lugar en donde di mis primeros pasos como científica, fuiste como mi segunda casa.

Quiero agradecer a mis queridos “Duendes Mágicos”, David gracias por haber compartido una parte de tu vida conmigo y por darme tu mano cada vez que la necesité; gracias por esperarme tantas veces en las que llegaba la noche y no terminaba los experimentos. Horacio muchísimas gracias por tu amistad, por tu apoyo, por las rolas garra y sobre todo porque me enseñaste a ver la vida con ese entusiasmo que te caracteriza.

Manuelito muchísimas gracias, no solo por abrirme las puertas de la UNAAMB sino por brindarme tu amistad y por destapar tantas veces el Absorción Atómica por causa de mis muestras.

Dra. Cecilia Vanegas muchas gracias porque no solo encontré a una asesora y una guía en este camino de la ciencia, sino a una gran amiga.

A mis sinodales Dra. Irma Rosas, Dra. Cecilia Robles, Dr. René Cárdenas y M. en C. Sebastian Zúñiga y Dra. Cecilia Vanegas muchísimas gracias por sus correcciones y por el tiempo que dedicaron para mejorar que este trabajo.

Gracias a todos los chicos de Ecofisiología, a Shere por brindarme su amistad y por haberme adoptado, muchísimas gracias. Xarini gracias por tu amistad. Seb, gracias por todo y por brindarme tu amistad. Cecy Robles gracias por brindarme tu amistad. Luz muchas gracias por tu apoyo, por escucharme y por esos días soleados de Petacalco. Gracias a Guille, Karla, Elsay, Leslie, Cynthia, Carlos, Barbarita y Gastón por haberme brindado su amistad y por hacer tan amena mi estancia en el laboratorio.

A mis amigas inseparables Adriana, Alin, Ana Lilia y Nallely gracias porque siempre me tendieron su mano, me escucharon y me dieron valiosos consejos. Gracias, Chayo, David Medina, Gerardo (Tore), Beto, Alejandra, Arisbel, Isaac, Diana (arañita). Gracias a todas esas hermosas personas que han llegado a mi vida.

A todos mis profesores muchas gracias por todo.

Quiero agradecer al proyecto CFE-PUMA que me dio, además de sustento económico, grandes experiencias como científica y grandes amigos.

Gracias al apoyo financiero del Proyecto Hacia el fortalecimiento de la Unidad de Análisis Ambiental (UNAAMB): una experiencia exitosa en la enseñanza de las ciencias experimentales en la Facultad de Ciencias de la UNAM 2006- 2008. PAPIME PE205206.

Gracias al apoyo financiero de BECANETSUP08B “Fortalecimiento al Programa de Becas 2008”.

Inducción de Metalotioneínas como biomarcador de exposición *in situ* a metales en *Ambystoma mexicanum*

Indicadores bioquímicos de la exposición *in situ* a metales en *Ambystoma mexicanum*

Contenido	pags.
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Contaminación por metales	5
1.2. Inducción de estrés oxidante por metales	7
1.3. Marcadores biológicos	11
1.3.1.. Biomarcadores de exposición a metales. Metalotioneínas.	12
1.3.2.. Biomarcadores de efecto (integrador de estrés oxidante). Proteínas Carboniladas.	17
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo general.....	20
3.2. Objetivos particulares.....	20
4. HIPÓTESIS	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Área de de estudio.....	21
5.2. Especie de estudio	22
5.2.1. Taxonomía <i>Ambystoma mexicanum</i>	22
5.2.2. Biología de <i>Ambystoma mexicanum</i> (axolotl)	22
5.3. Trabajo de campo.	23
5.3.1. Trasplante de organismos.....	23
5.4. Respuestas Bioquímicas. Evaluación de biomarcadores	24
5.4.1. Proteínas Carboniladas.....	25
5.4.2. Metalotioneínas	26
6. RESULTADOS	26
6.1. Metalotioneínas.....	27
6.2. Proteínas Carboniladas	27
6.3. Proteína Soluble Total	27
6.4. Concentración hepática de metales en <i>A. mexicanum</i> e interacciones	30
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES	44
9. CONSIDERACIONES FINALES	45
10. REFERENCIAS	47

RESUMEN

La Zona lacustre de Xochimilco, considerada patrimonio cultural de la humanidad y Humedal RAMSAR por su importancia en el sustento y mantenimiento de la biodiversidad, presenta una grave y compleja problemática ecológica en la cual se inserta el riesgo de extinción ecológica del ajolote *Ambystoma mexicanum*, anfibio endémico de la cuenca central del Valle de México. Actualmente la Zona lacustre de Xochimilco recibe distintos aportes de contaminantes, entre los cuales destacan los metales. El presente estudio se inserta en el proyecto general “Diagnóstico Ambiental y Evaluación de Riesgo en la Zona Chinampera de Xochimilco” y da continuidad a la investigación previamente realizada por González (2006), en la que se plantearon interrogantes acerca de los mecanismos de defensa que pudiera presentar *A. mexicanum* para compensar las altas concentraciones de metales registradas en su hábitat. Es por esto que el objetivo del presente estudio fue evaluar las concentraciones de Metalotioneínas (MT's) y Proteínas Carboniladas (PC) en el hígado de juveniles de *A. mexicanum* transplantados por 21 d a los canales de Xochimilco, considerados como biomarcadores de exposición y de efecto a los metales, así como establecer relaciones de causalidad con los niveles hepáticos de los metales. Los resultados obtenidos denotaron que los biomarcadores evaluados, fueron indicadores de estrés asociados a la exposición crónica a metales en *A. mexicanum*. Las MT's no se correlacionaron con los metales inductores de estas metaloproteínas; sin embargo, de los resultados obtenidos destaca la participación del selenio como agente inductor indirecto de las MT's y el papel funcional de éstas en la protección celular al estrés oxidante de los metales. Las PC se correlacionaron con los metales inductores de estrés oxidante (IEO) dando cuenta del efecto oxidante ocasionado por los metales lo que aunado a sus elevadas concentraciones hepáticas (PC e IEO) sugieren que los ajolotes y en especial los provenientes del sitio Apatlaco se encuentran bajo un severo estrés oxidante, representando un considerable riesgo para las poblaciones del ajolote *A. mexicanum*.

1. INTRODUCCIÓN

La zona lacustre de Xochimilco localizada en la parte centro-sureste del Distrito Federal en México, se originó como resultado de las actividades tectónicas y a finales del terciario y principios del cuaternario dieron origen a la formación de un complejo sistema volcánico, el cual obstruyó el drenaje natural de la Cuenca de México hacia el sur, dando origen a una cuenca endorreica y favoreciendo la formación de un sistema de lagos intercomunicados: Chalco, Xolchmilco, Xaltocan, Texcoco y Zumpango, alimentados por ríos estacionales y permanentes y, por manantiales (Jiménez *et al.*, 1995; González *et al.*, 1997).

Con la Conquista española, el área lacustre se modificó con los cambios en el uso de suelo, incluida la expansión urbana. A partir del siglo XVII se construyeron obras de drenaje con el objeto de proteger a la ciudad del riesgo de inundaciones, obras que a su vez contribuyeron sustancialmente a generar cambios hidrológicos relevantes en la cuenca (Ezcurra, 1990; Jiménez *et al.*, 1995).

Debido al gran crecimiento de la Ciudad México, durante el Porfiriato se inició un proyecto para abastecer de agua a la metrópoli utilizando los manantiales de Xochimilco; para los años cuarenta y cincuenta estos manantiales dejaron de alimentar los canales y lagunas de la región, ocasionando una drástica reducción del nivel de agua en la zona chinampera. En 1957 y ante las presiones de los chinamperos, el Departamento del Distrito Federal decidió restituir parte del volumen del agua extraída de los manantiales mediante la alimentación artificial de los canales con aguas negras tratadas de la planta de Aculco, Coyoacán; en 1959 se procedió a la realimentación del lago de Xochimilco con aguas negras, previamente tratadas por un proceso secundario, provenientes de la planta del Cerro de la Estrella y de San Luis Tlaxialtemalco. Este cambio en la fuente de abastecimiento debido a la explotación irracional de los recursos hidráulicos ha constituido un problema histórico y ocasionado un decremento en la calidad y cantidad del agua de la zona (Jimenez *et al.*, 1995; González *et al.*, 1997; Losada *et al.*, 1998).

La Zona Lacustre de Xochimilco es un sistema que continúa deteriorándose producto de los múltiples cambios del uso de suelo en la zona y del crecimiento no regulado de la Ciudad de México (Losada *et al.*, 1998). La introducción de especies exóticas depredadoras y competidoras, el aporte de materia orgánica y de contaminantes diversos ha contribuido a

la fragmentación del hábitat en la zona, la introducción de patógenos, la alteración de la dinámica trófica, , que en última instancia han incidido en la extinción y/o la reducción de poblaciones de especies nativas como el ajolote *Ambystoma mexicanum* (Zambrano, 2004; CITES, 2005; Zambrano *et al.*, 2010).

Entre las principales fuentes de contaminantes en la zona destacan (Rojas, 1995):

- Vertido de aguas tratadas de la Planta de tratamiento del Cerro de la Estrella que aportan sales, metales, detergentes y organismos patógenos.
- Las descargas urbanas directas de las construcciones aledañas a los canales con aportes de heces fecales (de humanos y ganado), microorganismos patógenos (la mayoría de origen fecal), detergentes, materia orgánica y desechos sólidos.
- El uso de agroquímicos principalmente plaguicidas y fertilizantes como consecuencia del cambio en las prácticas agrícolas tradicionales.
- La introducción de suelos y material utilizado como abono con aportes compuestos nitrogenados y metales: Al, Cd, Fe, Zn, Pb.
- La contaminación atmosférica donde la lluvia precipita compuestos y organismos patógenos como bacteria, protozoarios y huevos de helmintos parásitos aunada a la contaminación por ozono, monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno y de azufre y, compuestos orgánicos.

Los estudios realizados por Ramírez (1990) advierten que las concentraciones más elevadas de metales (Pb, Cr, Cd, Fe y Cu) registradas en charales, agua y sedimentos en los canales Xochimilco se asocia al crecimiento de la mancha urbana en la zona, además de que el mayor aporte de contaminantes proviene de las descargas artificiales de agua hacia los canales de la región (González *et al.* 1997, Jiménez *et al.*, 1997).

En estudios *in situ* González (2006) analizó las concentraciones de metales en agua, sedimento e hígado de juveniles del ajolote *A. mexicanum*. Si bien las concentraciones de metales en agua fueron inferiores a las establecidas por la Norma Mexicana para riego agrícola (NOM 001-ECOL, 1996), sobrepasaron las establecidas en Canadá de protección a la vida acuática (CEQG, 2003); y de manera similar en sedimento las concentraciones de Cu, Zn, As y Cd superaron los valores establecidos por las guías de calidad sedimentaria canadienses para cuerpos de agua dulce (ISQG; CEQG, 2003). En cuanto a los niveles de

metales en hígado de ajolote se encontraron concentraciones de metales similares y en algunos casos mayores a las reportadas para *Proteus anguinus*, *Rana catesbeiana*, *Rana utricularia* y *Bufo terrestres* procedentes de ambientes contaminados, particularmente de Cr, Co, Cu, Zn, Se, Ni, Cd y Pb (Hopkins *et al.*, 1998; Buger y Snodgrass, 2001; Bulog *et al.*, 2002 y Cooper y Fortin, 2010) (Anexo 3).

1.1. Contaminación por metales

El término contaminación se refiere al “cambio perjudicial en las características físicas, químicas o biológicas del ambiente y que puede afectar la vida humana y de otras especies” así como a “la presencia en el ambiente por acción del hombre de cualquier sustancia química, objetos, partículas, microorganismos, formas de energía o componentes del paisaje urbano o rural, en niveles o proporciones que alteren la calidad ambiental y, por ende las posibilidades de vida” (Espina y Vanegas, 1996). Si bien diversos contaminantes son de origen natural, usualmente están relacionados con las actividades humanas (Hsu y Agoramoorthy, 2006). Los contaminantes ambientales son divididos en dos grandes categorías: contaminantes orgánicos y contaminantes inorgánicos; en éstos últimos destacan los metales (Newman y Unger, 2003).

Los metales son sólidos (excepto el mercurio), conducen la electricidad, suelen ser dúctiles, maleables y forman aleaciones. Forman cationes perdiendo electrones y no tienden a combinarse químicamente unos con otros, pero sí reaccionan con los no metales formando diversos compuestos (Whitten *et al.*, 1992; Kotz *et al.*, 2003). Los metales son elementos abundantes en la naturaleza; algunos son esenciales para la vida mientras otros no tienen una función biológica conocida y pueden ser tóxicos en concentraciones traza (Marigómez *et al.*, 2002; Newman y Unger, 2003; Rainbow, 2007).

Los metales se encuentran de manera natural en el ambiente y aunque no son generados en procesos industriales se consideran como contaminantes de origen antropogénico si sus concentraciones ambientales son alteradas por actividades humanas (Newman y Unger, 2003). El incremento de la actividad industrial a nivel mundial en las últimas décadas, ha ocasionado el aumento en el uso de metales en los distintos procesos industriales dando como resultado la emisión y descarga de grandes cantidades al ambiente (Hsu y Agoramoorthy, 2006; Strydom *et al.*, 2006). Los metales que son considerados

contaminantes ambientales se les ha denominado comúnmente “metales pesados”; sin embargo éste término puede referirse a metales cuya densidad es mayor de 3.5 a 7 g cm³, a metales de transición o bien a metales utilizados frecuentemente en la industria que son tóxicos para los organismos. Estas definiciones basadas en la densidad específica, el peso atómico, el número atómico o inclusive en clasificaciones arbitrarias, han generado una confusión derivada de la ambigüedad del término, cuyos significados generalmente son distintos y en la mayoría de las ocasiones son contradictorios (Walker *et al.*, 1996; Hodson, 2004).

Una alternativa para clasificar a los metales fue sugerida por Lewis (1923, en Hudson, 2004) y posteriormente desarrollada por Nieboer y Richardson (1980, en Hudson, 2004). Esta clasificación divide a los metales de acuerdo a su reactividad en tres clases: metales de Clase A o duros, metales de Clase B o suaves y metales de Clase C o intermedios.

- Metales de Clase A o duros. Estos metales reaccionan primordialmente con el oxígeno (reactividad $O > N > S$), forman enlaces iónicos y son fácilmente desplazados por otros metales. Se incluyen en esta clase al Ca, Mg, Mn, K, Sr, Na y Ba.
- Metales de Clase B o suaves. Los metales pertenecientes a esta clase tienen una afinidad alta por el azufre (reactividad $S > N > O$) y tienden a acumularse en los organismos ocasionándoles efectos tóxicos. Los metales de esta clase son Cd, Hg, Cu (I) y Ag.
- Metales de Clase C o intermedia: Los metales de esta clase tienen una afinidad intermedia e incluyen al Zn, Pb, Fe, Co, Cr, Ni, As, V y Cu(II).

Los metales esenciales son fundamentales para la supervivencia de los seres vivos y desempeñan numerosas funciones vitales en el metabolismo y crecimiento celular. Entre los metales con función biológica conocida se encuentran el Cu, Co, Cr, Fe, Mn, Ni, Mo, Se, Zn, I y Si (Walker *et al.*, 1996; Hayes, 2001). Su deficiencia ocasiona daños o alteraciones, mismas que pueden ser reversibles cuando las concentraciones del metal son restablecidas (Marigómez *et al.*, 2002; Rainbow, 2007). No obstante si sus concentraciones en la célula son lo suficientemente altas para exceder los procesos de regulación celular, los metales esenciales pueden ocasionar efectos tóxicos o incluso letales de manera similar a los metales sin función biológica conocida. En este escenario, la diferencia con los metales sin función

biológica conocida (i.e. Cd y Hg), es que éstos últimos ejercen un efecto tóxico a concentraciones muy bajas (Hayes, 2001; Marigómez *et al.*, 2002).

De manera general, la toxicidad de un metal se asocia a la cantidad que ingresa al organismo. Sin embargo, las cantidades de metales encontradas usualmente en diversos tejidos son varios órdenes de magnitud mayores que las requeridas para saturar contenidos proteicos y enzimáticos, lo cual sugiere que los organismos cuentan con procesos eficientes de regulación y desintoxicación de los metales. Entre estos procesos de desintoxicación a metales destacan su excreción, su secuestro en gránulos mineralizados para su posterior eliminación y la unión a ligandos proteicos específicos como las metalotioneínas (Palmiter, 1998; Marigómez *et al.*, 2002; Newman y Unger, 2003; Rainbow 2007).

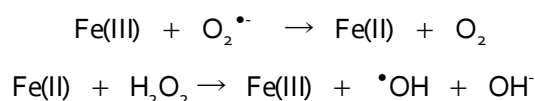
1.2. Inducción de estrés oxidante por metales

Los efectos fisiológicos que los metales ejercen en los organismos son diversos e incluyen la sustitución de metales esenciales reaccionando de manera covalente o no covalente en: reacciones enzimáticas, en el metabolismo energético, en la neurotransmisión, en los componentes estructurales (i.e. hueso) y estimulando la producción de especies reactivas de oxígeno (Stohs y Bagchi, 1995; Hayes, 2001).

La presencia de radicales libres en los organismos fue descubierta hace aproximadamente 50 años y son definidos por Halliwell y Gurreridge (1999) como moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital atómico o molecular (Drögue, 2002; Čolak, 2008). Entre los radicales libres se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las de nitrógeno (RNS). Entre las principales ROS destacan el radical superóxido (${}^{\cdot}\text{O}_2$, ${}^{\cdot}\text{O}_2^-$), el radical hidroxilo (${}^{\cdot}\text{OH}$, HO_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); entre las principales RNS se encuentran el óxido nítrico (NO^{\cdot}) y el peroxinitrito (ONOO^-). Si bien las ROS y RNS desempeñan diversos papeles fisiológicos y son continuamente sintetizadas como productos del metabolismo y la respiración celular, un exceso de éstos puede ocasionar efectos tóxicos, por lo cual suelen ser eficientemente eliminados del organismo para prevenir sus efectos oxidantes (Čolak, 2008; Bell y Vallee, 2009).

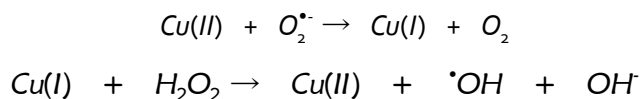
Los metales intervienen directa o indirectamente en la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, las cuales en altas concentraciones pueden ocasionar daños a los distintos componentes celulares (i.e. proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, azúcares) (Valko *et al.*, 2005). Con base en la actividad de los metales, éstos se dividen en dos grupos. El primer grupo comprende a los metales redox-activos como Fe y Cu, que intervienen en la generación de ROS. El segundo grupo comprende a los metales redox-inertes como Cd, Hg, Pb, As y Zn, que si bien no participan directamente en la producción de ROS, tienen una alta afinidad por los grupos sulfhidrilo y en especial por los grupos tiol de las proteínas (Dundęski, 2004; Stohs y Bagchi, 1995). Estudios realizados en las dos últimas décadas demuestran que metales como Fe, Cu, Cd, Cr, Hg, Ni y V producen radicales reactivos, los cuales pueden ocasionar daños al DNA, peroxidación de lípidos y daño a proteínas (Hayes, 2001; Dundęski, 2004; Valko *et al.*, 2005).

Los metales redox-activos son los metales de transición que actúan como catalizadores en el deterioro de las macromoléculas biológicas mediante la producción de estrés oxidante. Los mecanismos básicos para la producción de ROS por metales de transición involucran la reacción de Fenton/Haber-Weiss (Esquema 1). En estas reacciones el Fe cataliza la conversión del anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), formando el radical hidroxilo ($\bullet OH$) (Stohs y Bagchi, 1995).



Esquema 1. Reacción de Fenton/Haber-Weiss

De manera similar al hierro, el cobre también participa como catalizador en la formación de ROS (Figura 2) mediante una reacción similar a la de Fenton/Haber-Weiss.



Esquema 2. Formación de ROS, catalizadas por Cu.

Diversos estudios han confirmado que los cambios redox ocasionados por metales activan vías de señalización celular de factores de transcripción sensibles a estos cambios como son los factores NF- κ B, AP-1 y p53. Estos factores de transcripción intervienen en la

respuesta inflamatoria, en el crecimiento y diferenciación celular y en el control del ciclo celular, respectivamente. Cabe resaltar que la activación de NF- κ B y AP-1 puede inducir tanto proliferación celular como apoptosis y la activación de p53 induce proliferación celular sin control. De esta manera, se explica la muerte celular y los efectos carcinogénicos ocasionados por la exposición a metales (Valko *et al.*, 2005).

Producto del metabolismo celular, los radicales libres (ROS y RNS) son generados en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria y son producto de la reducción del NADPH (nicotinamida-adenina dinucleotido fosfato) en la respiración. Los radicales libres desempeñan diversas funciones fisiológicas como la regulación del tono vascular, el monitoreo de la tensión del oxígeno en el control de la ventilación, la regulación de la producción de eritropoyetina y participan en la activación de señales de transducción de distintos procesos fisiológicos. También, son los responsables de la producción de estrés oxidante y por consiguiente son los responsables de activar los mecanismos celulares de defensa para conservar la homeostasis redox (Figura 1) y así prevenir sus efectos tóxicos (Dröge 2002; Valko *et al.*, 2005; Ogino y Wang, 2007; Čolak, 2008). Los mecanismos de defensa comprenden dos estrategias, enzimáticas y no enzimáticas (Imlay, 2008; Sies, 1997):

- Antioxidantes no enzimáticos. Este mecanismo de defensa ejerce dos funciones primordiales. 1) Interceptar a los radicales libres recién formados antes de que reaccionen con los componentes celulares. Este proceso denominado de desactivación, consiste en la formación de productos no reactivos y “no radicales”. Debido a su naturaleza, los radicales libres reaccionan por transferencia univalente de electrones; esto es, cuando un radical libre reacciona, sus productos poseen un electrón desapareado los que al reaccionar de nuevo con otro compuesto dan como resultado un producto que posee nuevamente un electrón desapareado. A esta forma de reaccionar de los radicales libres también se le ha denominado “reacción en cadena”. 2) Alejar a los radicales de los sitios más sensibles y transferirlos a compartimentos celulares donde el efecto oxidante sea menor. Esto involucra alejar y transferir a los radicales de los sitios hidrofóbicos a los sitios hidrofílicos (i.e. de la membrana al citosol o de lipoproteínas al plasma). Entre los antioxidantes no enzimáticos destacan las vitaminas E y C, y proteínas de bajo peso molecular como el glutatión y las metalotioneínas.

- Los antioxidantes enzimáticos comprenden a las enzimas antioxidantes altamente especializadas que reaccionan directamente con los oxidantes, las cuales se dividen en tres grandes grupos: las superóxido-dismutasas, las catalasas y las glutatión peroxidasas. Además, hay enzimas que tienen funciones antioxidantes indirectas ya que catalizan reacciones para “devolver la función enzimática”. Entre estas enzimas destaca la GSSG reductasa que cataliza la conversión del glutatión disulfuro (GSSG) a glutatión (GSH).

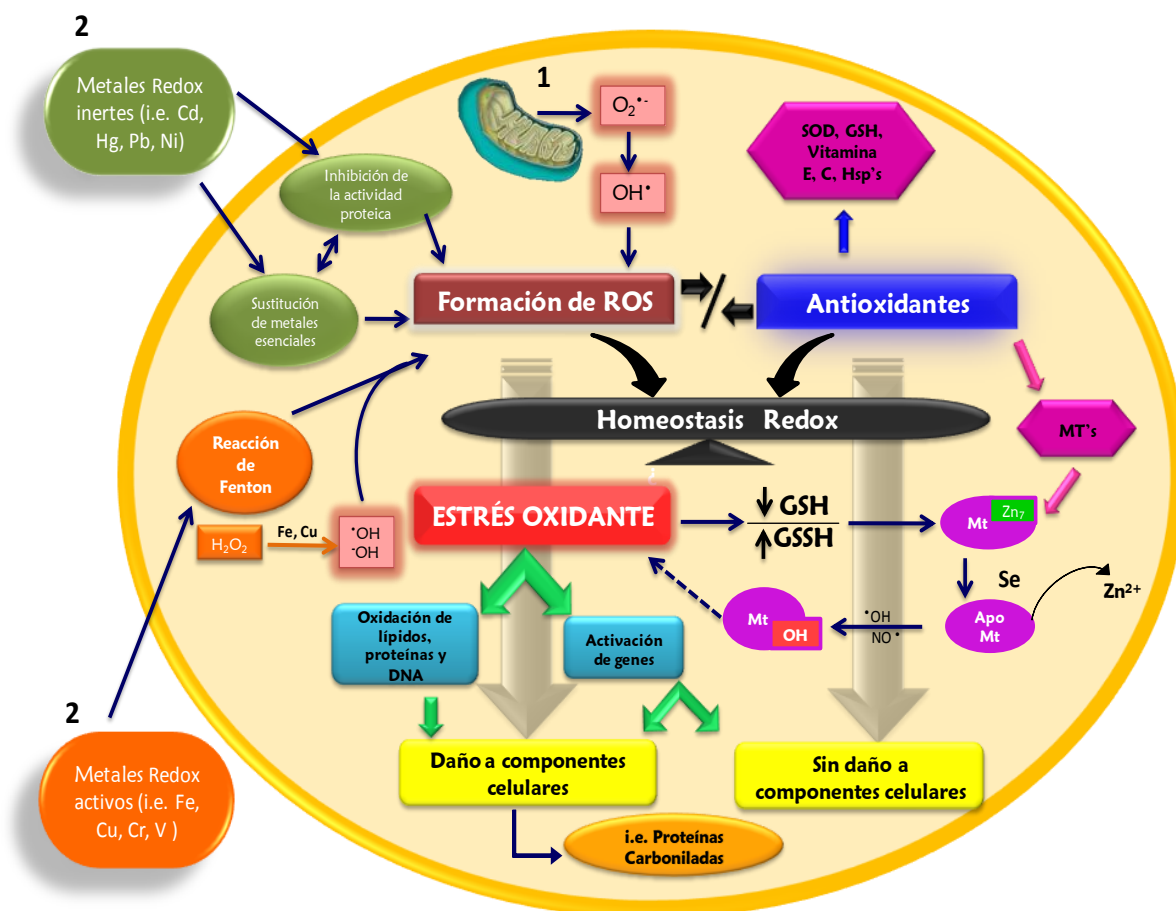


Figura 1. Formación de radicales libres en la célula y mantenimiento de la homeostasis redox. 1. Indica procesos normales (i.e. metabolismo, respiración); 2. Factores exógenos (i.e. metales) que modifican la homeostasis redox. Flechas continuas denotan promotores de procesos y flechas no continuas, inhibición de procesos. SOD, superóxido dismutasa; Hsp, proteína de choque térmico; GSH, glutatión; GSSG, glutatión disulfuro; MT, metalotioneína; Apo Mt, tioneína sin grupo prostético. (Esquema construido en base a Davis y Cousins, 2000; Dröge 2002; Dalle-Donne *et al.*, 2003; Dunderski, 2004; Monserrat *et al.*, 2007; Bell y Vallee 2009).

1.3. Marcadores biológicos

El aporte de metales producto de las distintas actividades humanas ha dado como resultado su acumulación en el ambiente, ya que debido a su naturaleza química no pueden degradarse en compuestos más simples. Ante esta problemática mundial se han planteado distintas interrogantes del efecto adverso que pueden ejercer este tipo de contaminantes en las células, los organismos y en los ecosistemas, por lo cual se ha propuesto el uso de marcadores o respuestas biológicas para evaluar su acción y efecto tóxico (Walker *et al.*, 1996, Dunderski, 2004).

Los biomarcadores son respuestas medibles (a nivel bioquímico, fisiológico o morfológico) que se asocian con la exposición a un tóxico. De manera general se clasifican en biomarcadores de exposición, de efecto y de sensibilidad (Adams, 1990; Walker *et al.*, 1996; Ward y Henderson, 1996; Schlenk, 1999; Beliaeff y Burgeot, 2002):

- Biomarcadores de exposición. Son aquellos que evidencian la exposición de los organismos a un cierto contaminante y dan cuenta de su mecanismo de acción; denotan que el tóxico ha entrado al organismo y de manera ideal, proporcionan información cuantitativa sobre la exposición. Sin embargo no proporcionan información del daño biológico que ocasionó el contaminante. Entre estos biomarcadores se encuentran las metalotioneínas como indicadores de la exposición a metales.
- Biomarcadores de efecto. Son aquellos que evidencian un efecto tóxico asociado con la exposición del organismo a un contaminante e indican que el tóxico ha ejercido un efecto biológico adverso en el organismo. Estas respuestas son analizadas a niveles molecular, bioquímico, fisiológico u organísmico así como a nivel supra-organismo (población y/o comunidades). Un ejemplo de este tipo de biomarcadores son las proteínas carboniladas (nivel bioquímico), las que dan cuenta del estrés oxidante ocasionado por la exposición de contaminantes.
- Biomarcadores de susceptibilidad. Son utilizados para identificar a los individuos más susceptibles a daños en una población y usualmente son analizados a nivel genético molecular.

Se ha propuesto de manera ideal, el uso de los biomarcadores para establecer una relación de causa-efecto entre una respuesta biológica y un factor de estrés (i.e. un

xenobiótico). La interacción entre un tóxico y un organismo ocurre inicialmente a nivel molecular; no obstante si el efecto del tóxico (i.e. a nivel bioquímico, citológico, fisiológico) excede la capacidad de compensación del organismo, el efecto se visualizará en el nivel de organización biológica sucesivo. Estos efectos pueden alterar la estabilidad de una comunidad o en última instancia de un ecosistema. De tal manera se plantea que el uso de biomarcadores en niveles bajos de organización biológica puede permitir la detección de manera temprana de los efectos nocivos de los contaminantes antes de que se evidencien cambios en los niveles de organización superiores (Ward y Henderson, 1996; Schlenk, 1999; Beliaeff y Burgeot, 2002; Lam y Gray, 2003; Vasseur y Cossu-Leguille, 2003; Eggen et al., 2004) (Figura 2).

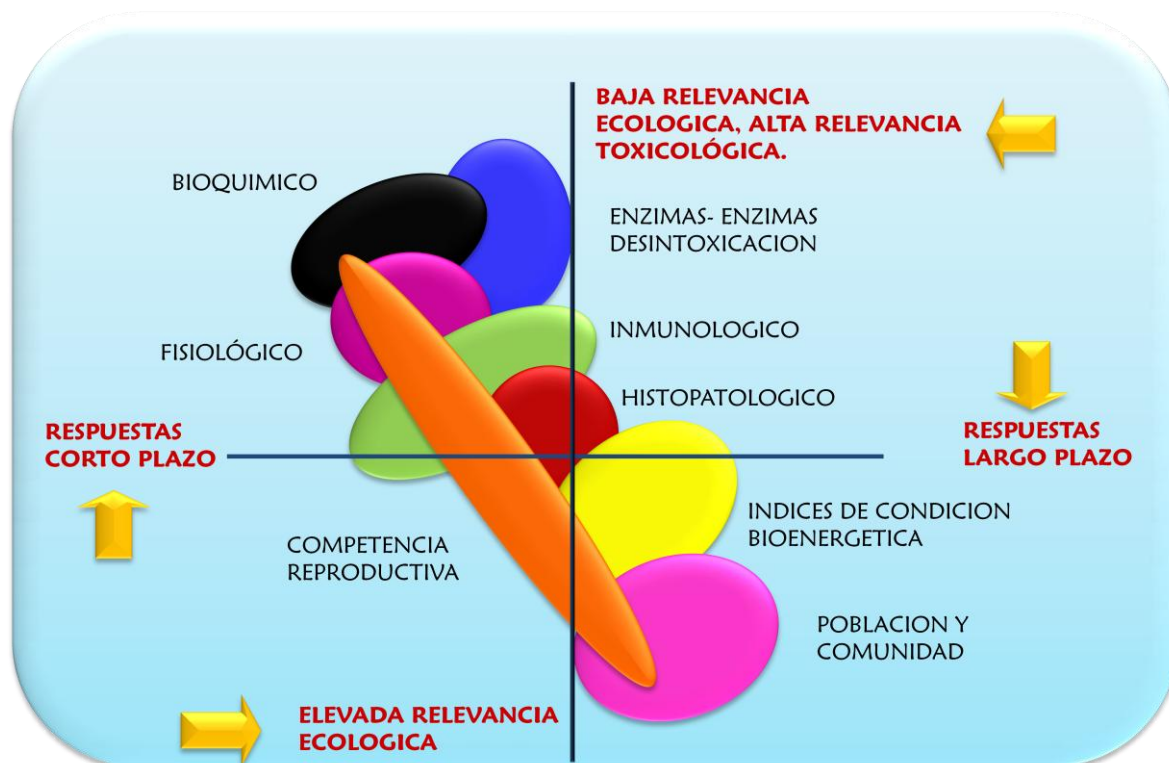


Figura 2. Respuestas biológicas de los organismos a los tóxicos ambientales en relación al tiempo de respuesta y a la relevancia ecológica (Adams, 1990).

1.3.1. Biomarcadores de exposición a metales. Metalotioneínas.

Las Metalotioneínas (MT's) (descubiertas en 1957 por Margoshes y Vallee) son proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa), termoestables, no contienen aminoácidos aromáticos y son no enzimáticas. Presentan un alto contenido de cisteína, lo cual les confiere una alta afinidad con ciertos metales como Ag^+ , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} y Zn^{2+} (Sheuhammer y Cherian,

1986; Klaassen *et al.*, 1999; Thirumoorthy, *et al.*, 2007) (Figura 3). Las metalotioneínas se encuentran en todos los organismos vivos, bacterias, invertebrados, vertebrados y plantas (fitoquelatinas). En invertebrados y vertebrados acuáticos las mayores concentraciones se registran en tejidos hepáticos, riñón, branquias e intestinos (Roesijadi, 1992; Coyle *et al.*, 2002). Su papel fisiológico no está bien establecido y es aún controversial (Palmiter, 1998; Amiard *et al.*, 2006 y Carpenè *et al.*, 2007); sin embargo, la conservación evolutiva de esta proteína en muchos *phyla* sugiere que desempeña papeles importantes en el funcionamiento de la célula como (Roesijadi, 1992; Vogiatzis y Loumbourdis, 1997; Klaassen *et al.* 1999; Viarengo, 1985):

- Participación en el mantenimiento de la homeostasis de los metales traza esenciales, fundamentalmente Cu y Zn, actuando como reservorio de éstos para ser donados a otras metaloproteínas.
- Secuestradoras de metales tóxicos como cadmio y mercurio, además de regular el exceso de los metales esenciales.
- Protección ante el daño oxidante intracelular por compuestos orgánicos e inorgánicos o especies reactivas de oxígeno.

Las metalotioneínas pueden ser inducidas por una gran variedad de sustancias y por ciertas condiciones fisicoquímicas del medio, por lo que son consideradas por algunos autores como proteínas relacionadas al estrés (Newman y Unger, 2003; Dunderski, 2004). En distintas especies de anélidos, moluscos, crustáceos, peces, mamíferos y anfibios, entre otros, se ha demostrado que la inducción de MT's está relacionada con la exposición a metales. De tal manera la inducción de metalotioneínas en tejidos animales ha sido ampliamente utilizado como un marcador biológico de la exposición a metales sin función biológica conocida o a concentraciones elevadas de metales esenciales (Amiard *et al.*, 2006).

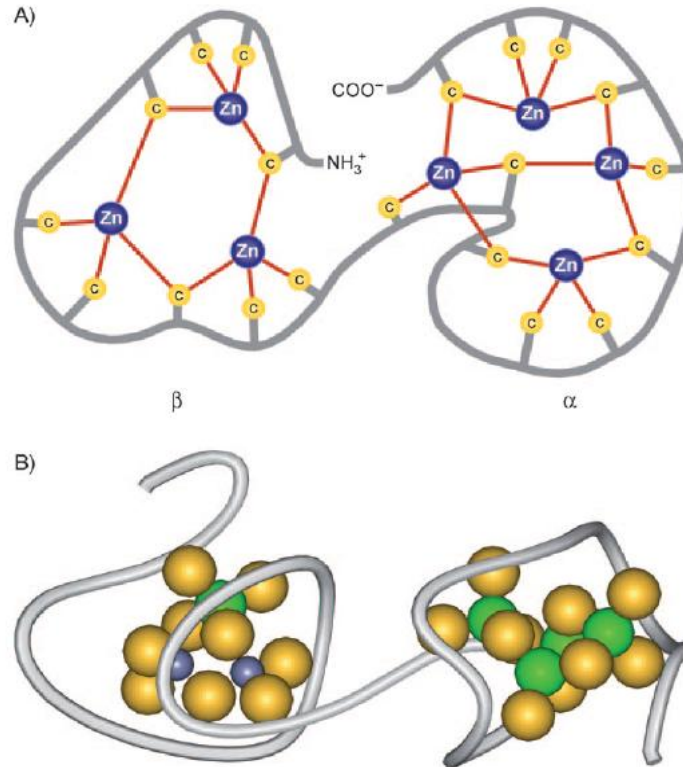


Figura 3. A) Dominios α y β de una Metalotioneína unida a Zn. B) Esquema de metalotioneína de ratón (PDB ID: 4MT2) unida a Cd y Zn. En el dominio α se encuentran unidos cuatro átomos de cadmio (verde) y en el dominio β se encuentran unidos un átomo de cadmio y dos átomos de zinc (azul). (Imagen tomada de Bell y Valle, 2009).

No obstante, diversos estudios resaltan la inducción de las MT's como un mecanismo de protección al daño oxidante intracelular ocasionado por compuestos orgánicos no-metálicos, inorgánicos o especies reactivas de oxígeno. En la inducción de MT's por agentes oxidantes es relevante considerar dos factores centrales muy relacionados entre sí que intervienen en su regulación: la capacidad de éstas de ser oxidadas y reducidas (Bell y Vallee, 2009; Davis y Cuisins, 2000) y, la participación del Se orgánico en su inducción (Panter *et al.*, 1996; Lenz y Lens, 2009). Por un lado, la capacidad de oxido-reducción de las MT's (y con ello la liberación o unión al Zn) les confiere actividad redox; por ende, oxidantes fisiológicos como el disulfuro y componentes que contengan selenio afectan su oxido-reducción. Un factor relevante en la unión-liberación del Zn de la MT es su interacción con el GSH y el GSSG. La relación GSG/GSSG (Figura 4), además de ser el principal factor que determina el estado redox de la célula, modula la unión/liberación del Zn de la MT y/o Tioneína (Apo-Metalotioneína; T). Al interactuar el GSSG con la MT la oxida, ocasionando que el Zn contenido en ésta sea liberado; en ausencia de GSSG y en presencia de GSH, la

transferencia de Zn a la MT y/o T es inhibida, proceso que se recupera en presencia de GSH y GSSG. De tal manera el GSH y el GSSG son moduladores de la transferencia de Zn y son responsables del número de átomos de Zn que se transfieren (Bell y Vallee, 2009; Davis y Cuisins, 2000).

En la inducción de MT's por agentes oxidantes, hay dos factores centrales muy relacionados entre sí que intervienen en su regulación: la capacidad de éstas de ser oxidadas y reducidas (Bell y Vallee, 2009; Davis y Cuisins, 2000) y, la participación del Se orgánico en su inducción (Panter *et al.*, 1996; Lenz y Lens, 2009). Es conocido que los péptidos unidos a selenio (i.e. selenocistamina) facilitan la unión entre la MT y el GSH/GSSG (Figura 4); de esta forma estos derivados modulan por medio de una catálisis redox la unión y liberación de Zn al intervenir en los cambios redox del GSH y por consiguiente en la disponibilidad tanto de donadores como de aceptores de Zn (Bell y Vallee, 2009). Por otro lado, los mecanismos por los cuales el Se ejerce un efecto tóxico son todavía inciertos; se propone que el Se (en forma metálica) está asociado a la formación de radicales libres y al estrés oxidante celular e induce daños al DNA y afecta la función y/o la integridad de las proteínas de reparación del DNA. De tal manera, los efectos tóxicos del Se se relacionan a sus compuestos inorgánicos mientras que sus efectos antioxidantes se asocian a la presencia de selenoproteínas (Panter *et al.*, 1996; Lenz y Lens, 2009).

Pese a que los anfibios son buenos indicadores de contaminación ambiental y las metalotioneínas buenos biomarcadores de exposición a metales y del efecto de agentes oxidantes, existen pocos estudios donde se evalúen estas moléculas en anfibios. Dobrovoljc *et al.* (2003) señalan que las metalotioneínas han sido estudiadas únicamente en doce especies de anfibios, en su mayoría anuros, mientras que en salamandras solamente se han reportado estudios para *Tritus pyrrhogaster*, *Ambystoma maculatum* y *Ambystoma mexicanum*. En condiciones controladas de laboratorio, Mouchet *et al.*, (2006) reportan la inducción de metalotioneínas en *Xenopus laevis* a partir de exposiciones a $10 \mu\text{g Cd L}^{-1}$; Vogiatzis y Loumbourdis (1997) señalan que la concentración de metalotioneínas hepáticas en *Rana ridibunda* ($68.08 \pm 12.48 \mu\text{g g}^{-1}$) expuesta a 200 mg Cd L^{-1} aumenta en relación a la concentración del metal acumulado en hígado ($133.15 \pm 15.79 \text{ mg g}^{-1}$). Dobrovoljc *et al.*, (2003) señalan que del Cd total en el citosol de células hepáticas de la salamandra neoténica *Proteus anguinus*, aproximadamente el 80 % se encuentra unido a metalotioneínas, lo que

sugiere que estas proteínas desempeñan un papel fundamental de protección celular ante el Cd.

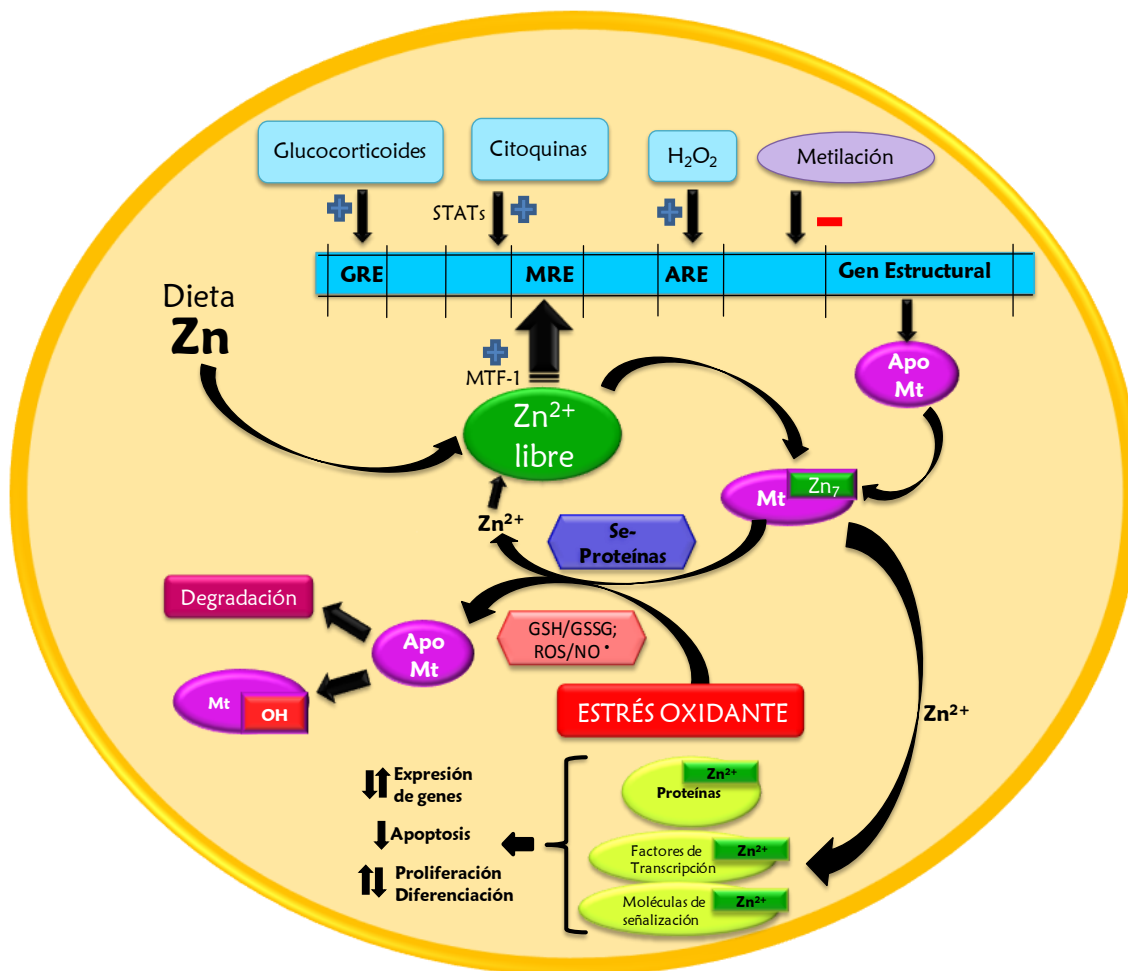


Figura 4. Regulación génica y función de las Metalotioneínas (MT's). El promotor del gen de la MT posee varios elementos de respuesta que regulan su transcripción. Entre estos se encuentran: 1) los elementos de respuesta a metales (MRE), los cuales son activados por el factor de transcripción de respuesta a metales (MTF-1) acoplado a Zn; 2) elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE); 3) elementos activados por STAT (transductores de señales y activadores de transcripción) a través de vías de señalización de citoquinas y 4) elementos de respuesta antioxidante (ARE), que son activados en respuesta a las condiciones redox. En células tumorales, la metilación regula de manera negativa la expresión de MT's. La concentración de Zn libre está influenciada por el consumo de Zn en la dieta y por el transporte de éste. Cabe destacar que el Zn libre es el que puede unirse a la MT. La capacidad de las MT's de transferir Zn a distintas proteínas (factores de transcripción, moléculas de señalización y adaptadores de moléculas que utilizan dedos de Zn para una interacción proteína-proteína) sugiere que las concentraciones de MT's en la célula tienen influencia en procesos como regulación génica, proliferación y diferenciación celular, en la transducción de señales, apoptosis y también en el daño causado por estrés oxidante y electrófilos. Tomado de Davis y Cousins (2000) con modificaciones de Sato y Bremner (1993), Dunderski (2004) y Bell y Valle (2009).

1.3.2. Biomarcadores de efecto (integrador de estrés oxidante). Proteínas Carboniladas

Si bien los biomarcadores de estrés oxidante no son específicos, proveen información útil del daño a los componentes celulares producidos por radicales libres (ej. ROS y RNS) (Parvez y Raisuddin, 2005). De manera particular, las proteínas son altamente susceptibles al efecto de los radicales libres (Levine *et al.*, 1990; Stadtman, 1993;) y su evaluación presenta múltiples ventajas respecto a la de otros productos del daño producido por estrés oxidante (Čolak, 2008):

- Las proteínas tienen funciones específicas en la célula; por lo tanto, cambios en su conformación tienen secuelas singulares a nivel funcional e incluso estructural.
- Las proteínas son muy susceptibles a la oxidación y los productos derivados de estas reacciones son relativamente estables.
- El tipo de modificación en la proteína provee de información acerca del agente que ocasionó la oxidación

Todos los aminoácidos son susceptibles a oxidación; sin embargo, la formación de grupos carbonilo en las proteínas se produce únicamente en condiciones extremas de estrés oxidante y por ende pone de manifiesto el daño celular asociado a un severo estrés (Berlett y Stadtman, 1997; Parvez y Raisuddin, 2005; Čolak, 2008). De tal manera, recientemente las proteínas carboniladas han sido propuestas y utilizadas como indicadores de estrés oxidante severo.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos 25 años las poblaciones de anfibios a nivel mundial han disminuido drásticamente, estimándose que un tercio de éstas (32%) se han reducido o bien se han extinto (IUCN, 2004; Beebee y Griffiths, 2005; Stuart *et al.*, 2004). Pese a que el declive de las poblaciones ha sido en todo el mundo, las áreas más afectadas son Centroamérica, el Caribe, Sudamérica y Australia y en general, los países tropicales (IUCN, 2004; Venturino *et al.*, 2003, Wake y Vredenburg, 2008).

Se ha propuesto que la disminución de las poblaciones de anfibios es consecuencia de distintos factores causales, entre los que destacan la destrucción y contaminación de su

hábitat, la introducción de especies exóticas, las enfermedades por contaminación microbiológica (i.e. chytridiomicosis), la colecta inmoderada y el cambio climático global. Cabe resaltar que la relevancia de cada factor depende del tipo de hábitat y de la especie afectada, y que los efectos sinérgicos que puedan resultar de la interacción de los distintos factores ambientales también son de vital importancia para poder discernir las causas de la disminución de cada especie afectada (Gardner, 2001; Stuart, *et al.*, 2004; Vences y Köhler, 2008; Wake y Vredenburg, 2008).

El ajolote *Ambystoma mexicanum*, un anfibio neoténico endémico de la Cuenca del Valle de México, es una de las 197 especies de anfibios amenazadas en México. Actualmente se encuentra sujeta a protección especial (NOM-059-SEMARNAT-2001) y se está gestando su transferencia a la categoría de especie en Peligro de Extinción (CITES, 2005) ya que tan solo en un periodo de cinco años (1998-2003) sus poblaciones se han reducido cinco veces y de seguir así podrían desaparecer en algunos años (Zambrano, 2004; CITES, 2005).

Las poblaciones de ajolote están sujetas a diversas presiones ambientales las cuales pueden ser las causantes de su disminución (Zambrano, 2004):

- a) Pérdida y modificación de su hábitat, producto del crecimiento desmesurado y no regulado de la Ciudad de México.
- b) Contaminación química. Las concentraciones de algunos contaminantes son muy altas, entre ellos los metales, y pueden ser la causa de la baja sobrevivencia de los ajolotes en Xochimilco.
- c) Enfermedades relacionadas a la contaminación microbiológica. Algunas enfermedades reportadas en los ajolotes se relacionan con distintos contaminantes bacterianos como estreptococos, enterobacterias y bacterias infecciosas (*Pseudomonas* y *Aeromonas*), cuya fuente es principalmente antropogénica.
- d) Enfermedades causadas por el hongo perteneciente al phylum Chytridiomycota, *Batrachochytrium dendrobatidis*. Frías *et al.*, (2008) sugieren que la chytridiomicosis, causante del declive de 43 especies de anfibios en América latina, está afectando al ajolote pues aunque en estado silvestre no se tiene evidencia de organismos enfermos, los ajolotes en cautiverio están siendo severamente afectados.
- e) Colecta inmoderada de especímenes, especialmente por la colecta de organismos en edad reproductiva.

- f) Introducción de especies exóticas. La carpa (*Cyprinus carpio*) y la tilapia (*Oreochromis niloticus*) fueron introducidas hace aproximadamente 20 años como parte de un programa de acuicultura. El comportamiento depredador y competidor trófico de estas especies puede relacionarse con el dramático declive de las poblaciones de ajolotes. Por un lado, sus hábitos alimenticios reducen los recursos disponibles para las poblaciones de ajolote aunado al hecho de que la dieta de la carpa incluye huevos de ajolote, factor que reduce la sobrevivencia del ajolote en sus estadios tempranos. (Zambrano *et al.*, 2010).

En este complejo escenario ambiental donde el ajolote *Ambystoma mexicanum* está sujeto a la interacción de múltiples presiones bióticas y abióticas, es necesario discernir el impacto que ejercen cada uno de los principales factores relacionados con la disminución de sus poblaciones. Es por esto que el presente estudio aborda de manera concreta el efecto de la contaminación por metales en *Ambystoma mexicanum*, aspecto relevante como parte central de la problemática ambiental en la zona.

En México, es escasa la información sobre el efecto tóxico de metales en anfibios (González *et al.*, 1997; González, 2006), por lo que es necesario profundizar en el efecto biológico adverso que este tipo de contaminantes pudiera ejercer sobre especies endémicas como son los ajolotes, actualmente en riesgo de extinción ecológica.

En el estudio *in situ* del efecto de metales en *A. mexicanum* realizado por González (2006) en Xochimilco, se registraron altas concentraciones de los mismos en las distintas matrices ambientales (agua y sedimento). De igual manera, se encontró que las altas concentraciones de metales bioacumulados en el hígado de ajolote reportadas como letales para otras especies de anfibios, no lo fueron para *A. mexicanum*. Ante estos resultados surgen varias interrogantes sobre la tolerancia de estos organismos al efecto tóxico de los metales. Es por esto que el presente estudio profundiza sobre el trabajo de González (2006) y se enfoca a discernir si los ajolotes presentan mecanismos de desintoxicación y de protección celular a los metales y a evaluar su probable acción como oxidantes celulares, mediante la evaluación de biomarcadores de exposición (Metalotioneínas) y de efecto (Proteínas Carboniladas), respectivamente.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar en juveniles de *Ambystoma mexicanum* trasplantados a los canales de Xochimilco, la concentración hepática de metalotioneínas y de proteínas carboniladas, como biomarcadores de exposición y de efecto a metales.

3.2. Objetivos particulares

- Determinar la concentración de metalotioneínas y proteínas carboniladas hepáticas en juveniles de *Ambystoma mexicanum*.
- Valorar si hay diferencias en la concentración de metalotioneínas y proteínas carboniladas hepáticas de organismos provenientes de los sitios con diferentes niveles de aporte de metales.
- Establecer si existen relaciones de causalidad entre la concentración de metalotioneínas, proteínas carboniladas y la acumulación hepática de metales en los ajolotes.

4. HIPÓTESIS

La zona lacustre de Xochimilco, hábitat del ajolote *Ambystoma mexicanum*, es receptora de múltiples contaminantes entre ellos los metales. Bajo estas condiciones, es central el papel funcional relevante de las metalotioneínas no sólo en la regulación de metales esenciales, sino en la desintoxicación de metales sin función biológica conocida y del exceso de metales esenciales y, en la reducción del estrés oxidante ocasionado por múltiples compuestos y factores, incluidos los metales.

De tal manera, en el presente estudio se espera encontrar una relación entre los niveles hepáticos de los metales y las concentraciones de metalotioneínas (MTs) como una respuesta temprana al efecto adverso de los metales en los juveniles de *A. mexicanum*. Además, si las MT's están siendo inducidas en respuesta a los metales bioacumulados, se espera que los niveles de éstas se relacionen con los principales metales inductores (i.e. Zn, Cu, Cd).

La producción de estrés oxidante es un fenómeno sumamente complejo que puede ser consecuencia de diversos factores, entre ellos los metales. De tal manera se espera obtener a nivel hepático, una relación entre las Proteínas Carboniladas (resultantes de un estrés

oxidante severo y crónico) y los metales inductores de estrés oxidante (i.e. Fe, Cu, Cr, V y Co) en el ajolote.

Si bien bajo condiciones de exposición a metales, la inducción de las metalotioneínas (respuesta temprana) y la formación de proteínas carboniladas (respuesta tardía) no son procesos directamente relacionados, es probable observar una relación entre ambos biomarcadores ya que ambos procesos son resultantes del estrés oxidante.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Área de de estudio

El Área natural protegida “Ejidotes de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco” se localiza en la porción centro y norte de la Delegación Política de Xochimilco y está integrada por un polígono con una superficie de 2,522.43 ha. (Gaceta oficial del Distrito Federal, 2006). Constituye un humedal remanente de la Cuenca de México de suma importancia y por su valor excepcional es Patrimonio Cultural de la Humanidad (UNESCO) desde el 11 de diciembre de 1987. A partir del 2 de febrero de 2004 se le incorporó a la lista de Humedales Ramsar pues cumple con cuatro de los ocho criterios citados por dicha Convención Internacional (Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar, 2004):

Criterio 1. Humedal representativo. Constituye el ecosistema remanente de la Cuenca de México del gran lago en donde temporalmente se fusionaba el lago de Texcoco con los lagos de Xochimilco, Chalco, Xaltocan, Zumpango y Tenochtitlan. El sistema funciona como regulador de flujos a nivel local y regional. Además, la zona se caracteriza por el uso de chinampas para el cultivo de alimentos desde la época prehispánica, lo cual le otorga una relevancia histórica y cultural.

Criterio 2. La zona lacustre representa un ecosistema importante para el mantenimiento de la biodiversidad del Distrito Federal y/o del Valle de México. Se registran seis especies endémicas, 20 bajo alguna categoría de riesgo, 10 bajo protección especial, 8 amenazadas y dos en peligro de extinción.

Criterio 4. Sitio de sustento o refugio de especies de flora y/o fauna importantes. En esta zona se localizan poblaciones de ajolote (*Ambystoma mexicanum*), constituye uno de los sitios para el refugio de aves locales y migratorias y es sitio para la reproducción de especies residentes.

Criterio 7. El sitio presenta dos especies de peces endémicas, el charal del valle de México *Chirostoma humboldtianum* y *Algansea tincella*, relicto de las cuatro especies extintas del orden de los ciprínidos.

5.2. Especie de estudio

5.2.1. Taxonomía *Ambystoma mexicanum*

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Clase: Amphibia

Orden: Caudata (Urodela)

Familia: Ambystomatidae

Género: *Ambystoma*

Especie: *Ambystoma mexicanum*

5.2.2. Biología de *Ambystoma mexicanum* (axolotl)

La palabra “ajolote” proviene del náhuatl axolotl (*atl*, agua y *xolotl*, monstruo acuático, duende) que significa “perro de agua” o “monstruo del agua”. Según la leyenda del “Quinto Sol” el axolotl nació cuando el dios Azteca Xolotl hermano mellizo de Quetzalcóatl, temiendo su inminente sacrificio huyó transformándose en diversas formas hasta que se arrojó al agua y fue transformado “en un pez” llamado axolotl (Ortega, 1999; Smith, 2000).

El ajolote (Figura 5) es un anfibio endémico de la Cuenca del Valle de México perteneciente a la familia *Ambystomatidae* constituida por 4 géneros (*Rhyacotriton*, *Dicamptodon*, *Rhyacosiredon* y *Ambystoma*) todos endémicos de Norteamérica (Armstrong y Maacinski, 1989; Duellman y Trueb, 1994); representa una de las 17 especies del género *Ambystoma* que se encuentran en México y se distribuye en los cuerpos de agua de Xochimilco y Chalco (Ortega, 1999; CITES, 2005). A diferencia de otros anfibios, el ajolote no cambia de su vida acuática a una terrestre (metamorfosis), sino que presenta un fenómeno llamado paedogénesis, alcanzando su madurez sexual en la forma larval acuática (neotenia) a la edad de aproximadamente un año (Voss y Shaffer, 1997). No presenta un dimorfismo sexual marcado, si bien los machos se distinguen por sus protuberantes labios cloacales que albergan a los espermátóforos y que son más prominentes durante la época de

reproducción; por el contrario, las hembras poseen la zona cloacal plana o ligeramente pronunciada (Sever *et al.*, 1989; Armstrong y Maacinski, 1989). Los adultos de *A. mexicanum* son generalmente de color oscuro y/o negro, pueden llegar a medir hasta 30 cm de largo y vivir hasta 25 años (en cautiverio). La fecundación es interna y se lleva a cabo durante el apareamiento, cuando la hembra con sus labios cloacales recoge el espermátforo depositado por el macho, ya sea sobre una roca o sobre la arena. Una hembra puede llegar a poner de 40 hasta 1500 huevos (Duellman y Trueb, 1994).

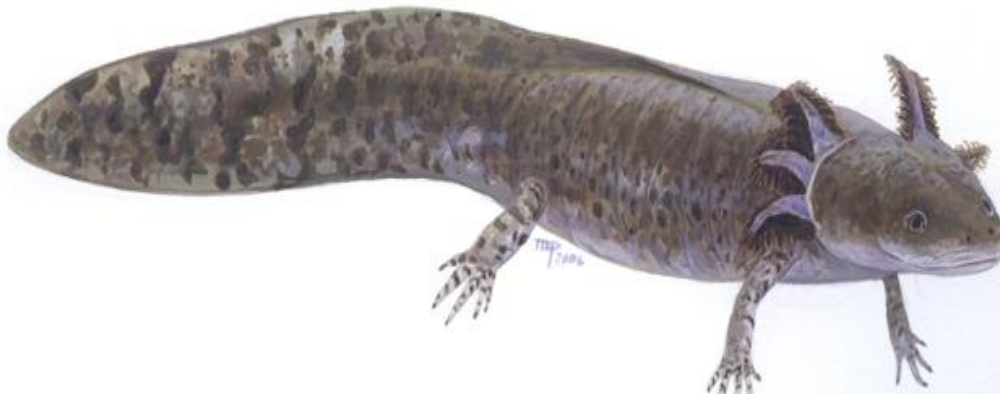


Figura 5. *Ambystma mexicanum* adulto (Tomado del Banco de imágenes CONABIO).

Durante muchos años, el ajolote ha sido objeto de explotación con diferentes fines (i.e. alimentación, ornato) y ha sido objeto de investigación en diferentes ramas de la medicina y de la biología, pues se considera un modelo experimental adecuado dada su capacidad de regeneración, tanto de extremidades como de células de cerebro y corazón (Ortega, 1999; Zambrano, 2004).

5.3. Trabajo de campo.

5.3.1. Trasplante de organismos

El presente estudio es la continuación del estudio realizado por González (2006) con juveniles de ajolote mantenidos en condiciones controladas de laboratorio y posteriormente trasplantados a los cuatro meses de edad (12 ± 5 g PH) a cuatro sitios de estudio en los canales de Xochimilco:

- Sitio 1. Puente de Urrutia: sitio con bajo impacto urbano y alto impacto agrícola; en donde a probable fuente de metales son los aportes de agroquímicos.

- Sitio 2. Apatlaco: sitio con moderado impacto urbano y alto impacto agrícola. De manera similar a Puente de Urrutia la probable fuente de metales es el aporte de agroquímicos.
- Sitio 3. Laguna de la Asunción: sitio con alto impacto urbano y bajo impacto agrícola. En este sitio la probable fuente de metales son las descargas urbanas directas.
- Sitio 4. La Draga: sitio con alto impacto urbano y bajo impacto agrícola. En este sitio la probable fuente de metales es el aporte de aguas residuales de la planta de tratamiento Cerro de la Estrella.

En cada sitio de estudio se trasplantaron doce ajolotes en jaulas diseñadas *ex profeso* y colocadas en zonas poco profundas, cuidando de que el agua no cubriera las jaulas y permitiendo el nado de los ajolotes a la superficie y el contacto con los sedimentos. Los organismos fueron alimentados semanalmente con medio millar de charales por ajolote (*Christoma jordani*; 0.27 ± 0.46 mg PH) y se mantuvieron en las jaulas durante un mes, al término del cual fueron sacrificados y el hígado fue disectado. El tejido hepático se mantuvo bajo congelación (-60° C; REVCO) hasta su análisis.

5.4. Respuestas Bioquímicas. Evaluación de Biomarcadores

La determinación de Metalotioneínas y Proteínas Carboniladas se realizó en las muestras de hígado de ajolote mediante el acoplamiento de las técnicas para metalotioneínas (Martínez *et al.* 1993; Scheuhammer y Cherian, 1986) y para proteínas carboniladas (Levine *et al.*, 1990 modificada por Floor y Wetzel, 1998). Los Procedimientos Estandarizados de Operación (PRESOP's) de las técnicas implementadas se describen en los Anexos 1 y 2.

Para cada sitio de estudio y por ajolote, el hígado disectado se homogenizó con un generador (Polytron PT1200) a 22 000 rpm durante 3 min en solución de sacarosa 0.25 M (en intervalos de 1 min para evitar el calentamiento de la muestra por la fricción) en una relación 1:4 peso/volumen. Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 1000 g por 5 min, se desechó la pastilla y la fracción sobrenadante se centrifugó a 12 000 g por 30 min. A la fracción sobrenadante se le determinó el contenido de Proteína Soluble Total (PST) por el método de Bradford (1976). A partir de los resultados obtenidos del contenido de

PST en las muestras, se ajustaron a una concentración de a 9 mg mL^{-1} con solución de homogenado para partir con concentraciones similares en todas las muestras. Una vez realizado esto se tomaron tres alícuotas de cada muestra, dos de $375 \text{ }\mu\text{L}$ para el análisis de Metalotioneinas y una de $200 \text{ }\mu\text{L}$ para la evaluación inmediata de Proteínas Carboniladas. Las alícuotas tomadas para la evaluación de metalotioneínas fueron congeladas a -80°C para su evaluación al día siguiente.

5.4.1. Proteínas Carboniladas

A la alícuota de $200 \text{ }\mu\text{L}$ de sobrenadante se adicionó $200 \text{ }\mu\text{L}$ de solución de sacarosa 0.25 M y se tomaron dos alícuotas de $120 \text{ }\mu\text{L}$. Posteriormente a cada una se le adicionó $1080 \text{ }\mu\text{L}$ de buffer frío de fosfatos (0.1 M , pH 7.4) con KCl (1.17%) para obtener un volumen final de $1200 \text{ }\mu\text{L}$ (concentración de 0.45 mg mL^{-1} PST). A continuación, de estas muestras se tomaron dos alícuotas de $500 \text{ }\mu\text{L}$ cada una y se les adicionó $56 \text{ }\mu\text{L}$ de solución de estreptomina al 10% ; se incubó por 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a $11\ 000 \text{ g}$ por 10 min . Se desechó la pastilla y al sobrenadante (de dos de las cuatro muestras) se le adicionó $500 \text{ }\mu\text{L}$ de 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) disuelto en ácido clorhídrico 2 M y se incubó por una hora a temperatura ambiente; las otras dos muestras fueron consideradas como blancos y se incubaron con ácido clorhídrico 2 M , sin adición del 2,4 DNPH.

La proteína contenida en las muestras se precipitó agregando $500 \text{ }\mu\text{L}$ de ácido tricloroacético (TCA) al 18% y se centrifugó a $11\ 000 \text{ g}$ por 3 min . Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó tres veces resuspendiéndola en $1000 \text{ }\mu\text{L}$ de etanol/acetato de etilo (1:1); se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 11000 g por 3 min . La pastilla se resuspendió agregando $600 \text{ }\mu\text{L}$ de solución de guanidina 6 M , se incubó por una hora a temperatura ambiente y se centrifugó a $16\ 000 \text{ g}$ por cinco min.

El contenido de Proteína Soluble Total se determinó por el método de Bradford (1976) y el contenido de carbonilos se determinó leyendo en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Genesys 10 VIS) a 366 nm , utilizando un coeficiente de extinción molar de $22\ 000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El contenido de grupos carbonilo en las muestras se expresó en nanomoles de carbonilo mg^{-1} PST.

5.4.2. Metalotioneínas

Para la determinación de Metalotioneínas, las alícuotas de 375 μL (previamente descongeladas) se ajustaron a un volumen de 1200 μL con buffer de glicina. Posteriormente a cada muestra se le adicionó 500 μL de solución de plata ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente por 15 min, con el fin de desplazar los metales acoplados a la Metalotioneína por la plata adicionada, dado el principio del método basado en la mayor afinidad de Ag por los grupos tiol de la metaloproteína. El exceso de plata se removió adicionando 600 μL de hemolizado de sangre de rata. Posteriormente las muestras se colocaron en baño María a 100°C por 3 min a fin de precipitar a la hemoglobina y otras proteínas, excepto las metalotioneínas que son estables al calor. A continuación se centrifugó a 12 000 g por 5 min a temperatura ambiente; se separó el sobrenadante y se colocaron las muestras dos veces más en baño María a 100°C por 3 min (sin agregar hemolizado) y se centrifugaron en cada paso a 15 000 g por 5 min. Se separó el sobrenadante final y se determinó en una alícuota la concentración de Proteína Soluble Total por el método de Bradford (1976). El resto del sobrenadante fue congelado a -80°C y posteriormente se le evaluó la concentración de plata en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA) (Perkin Elmer AAnalyst 800).

La concentración de Metalotioneínas en las muestras se determinó a partir de la interpolación de los valores obtenidos de la concentración de Ag ($\mu\text{g L}^{-1}$) en una curva patrón construida a partir de concentraciones conocidas de Metalotioneínas (mg L^{-1} ; estándares MT's) y su correspondiente concentración de Ag ($\mu\text{g L}^{-1}$) (Ver PRESOP Metalotioneínas, Anexo 2). Acorde al método seguido, la cantidad de plata en la fracción del sobrenadante final es proporcional a la cantidad de (MT) presente en el estándar.

6. RESULTADOS

Los resultados de los biomarcadores evaluados en el hígado de *A. mexicanum* de los distintos sitios de estudio se señalan en la Tabla 1. Cabe señalar que al término del periodo del trasplante a los diferentes sitios de estudio, los juveniles de ajolote presentaron pesos similares (g PH) ($p>0.05$) (Tabla 1).

6.1. Metalotioneínas

Las concentraciones de Metalotioneínas hepáticas de los organismos provenientes de los cuatro sitios de muestreo (Tabla 1; Figura 6) no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) debido a la dispersión observada entre los grupos. No obstante los valores observados en el tejido hepático de los ajolotes provenientes de La Draga (alto impacto urbano y bajo impacto agrícola) son 78% mayores que los de Puente de Urrutia (bajo impacto urbano y alto impacto agrícola).

6.2. Proteínas Carboniladas

En contraste a las Metalotioneínas, las concentraciones de Proteínas Carboniladas en el hígado de *A. mexicanum* presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sitios de estudio. Los organismos provenientes del sitio Apatlaco (con alto impacto agrícola y moderado impacto urbano) presentaron la mayor concentración de carbonilos ($p < 0.05$), mientras que los grupos provenientes de Puente de Urrutia (bajo impacto urbano y alto impacto agrícola), de Laguna de la Asunción (alto impacto urbano y bajo impacto agrícola) y de La Draga (alto impacto urbano y bajo impacto agrícola), presentaron concentraciones similares ($p > 0.05$) (Tabla 1, Figura 7).

6.3. Proteína Soluble Total

La concentración hepática de Proteínas Solubles Totales (PST) presentó un comportamiento similar al de las Proteínas Carboniladas (PC). Los organismos provenientes del sitio Apatlaco (moderado impacto urbano y alto impacto agrícola) presentaron la mayor concentración de PST ($p < 0.05$), mientras que los organismos provenientes de Puente de Urrutia (bajo impacto urbano y alto impacto agrícola), L. Asunción (alto impacto urbano y bajo impacto agrícola) y La Draga (alto impacto urbano y bajo impacto agrícola) presentaron concentraciones similares ($p > 0.05$) (Tabla 1, Figura 8).

Tabla 1. Concentración de Metalotioneínas (MT's), Proteínas Carboniladas (PC) y Proteína Soluble Total (PST) evaluadas en tejido hepático de juveniles de *A. mexicanum* trasplantados a cuatro canales de Xochimilco. Se señalan valores promedio y error estándar. Se incluyen los pesos húmedos de los organismos y del hígado analizado (g PH).

Sitio	Peso Organismo (g PH)	Peso Hígado (g PH)	MT's ($\mu\text{g g}^{-1}$ PH)	PC (nmol mg ⁻¹ PST)	PST (mg mL ⁻¹)
1. P. Urrutia	24.2 ± 2.3 ^a	0.49 ± 0.05 ^a	17.0 ± 2.3 ^a	29.8 ± 3.9 ^a	15.9 ± 0.6 ^a
2. Apatlaco	28.2 ± 2.4 ^a	0.48 ± 0.05 ^a	20.1 ± 5.3 ^a	63.5 ± 2.4 ^b	25.0 ± 1.7 ^b
3. L. Asunción	21.9 ± 2.3 ^a	0.51 ± 0.06 ^a	29.0 ± 3.4 ^a	28.0 ± 2.5 ^a	15.8 ± 1.1 ^a
4. La Draga	23.8 ± 1.5 ^a	0.48 ± 0.05 ^a	30.3 ± 4.5 ^a	20.4 ± 1.2 ^a	18.2 ± 0.4 ^a

Para cada respuesta, letras distintas denotan diferencias significativas entre sitios ($p < 0.05$).

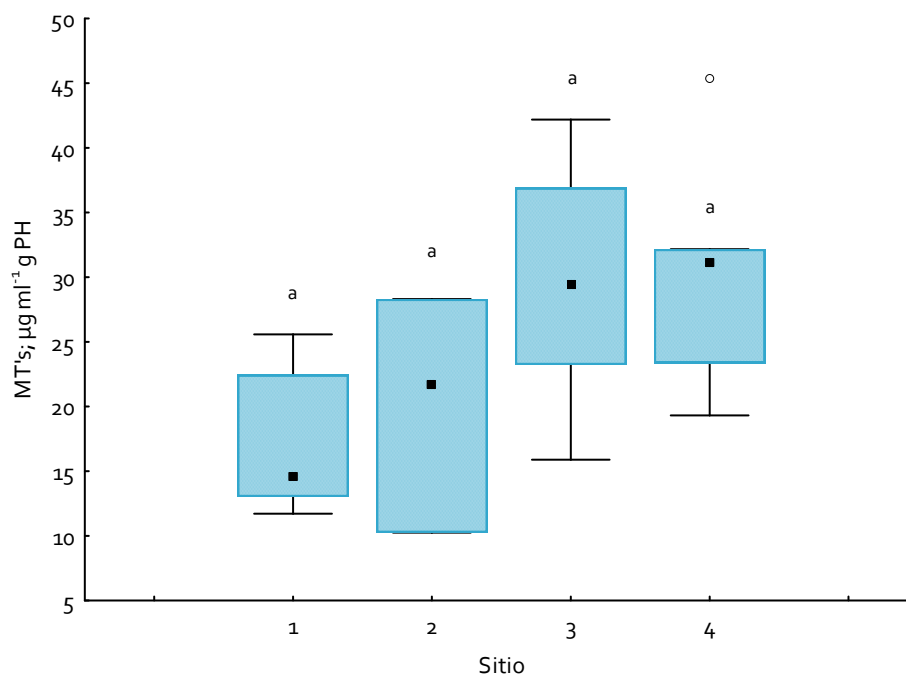


Figura 6. Diagramas de Cajas en Paralelo de la Concentración de Metalotioneínas (MT's; $\mu\text{g g}^{-1}$ PH) en el hígado de juveniles de *Ambystoma mexicanum* trasplantados en cuatro canales de Xochimilco. Sitio 1. Puente de Urrutia, 2. Apatlaco, 3. Laguna de la Asunción y 4. La Draga. En cada caso la caja corresponde al 50% de los datos y las cotas superior e inferior al 50% restante de los datos. El punto denota la mediana y ° denota valores extremos. Letras distintas denotan diferencias significativas entre sitios ($p < 0.05$).

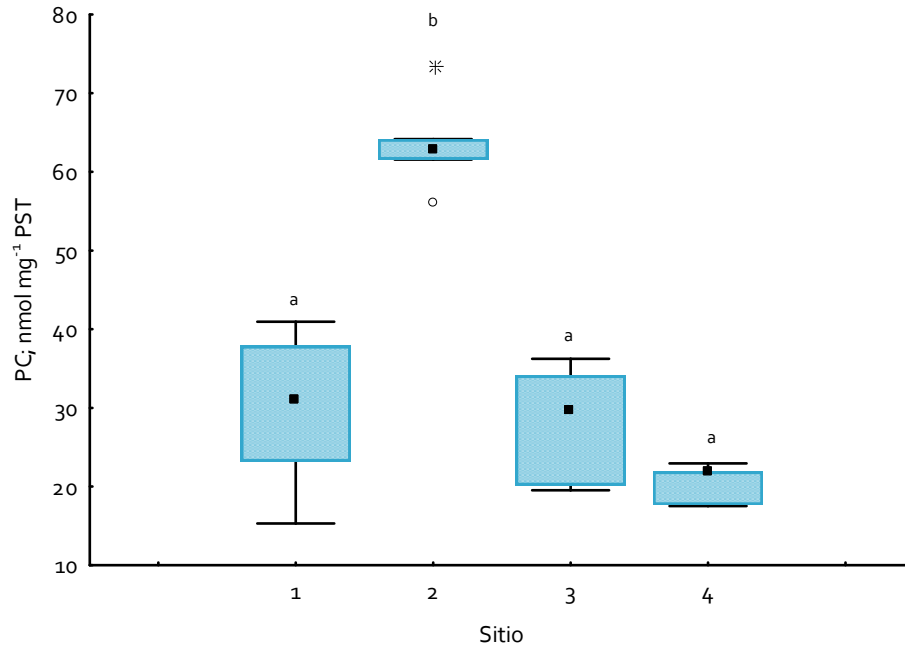


Figura 7. Concentración de Proteínas Carboniladas (PC; nmol mg⁻¹ PST) en el hígado de juveniles de *Ambystoma mexicanum* trasplantados en cuatro canales de Xochimilco. Sitio 1. Puente de Urrutia, 2. Apatlaco, 3. Laguna de la Asunción y 4. La Draga. En cada caso la caja corresponde al 50% de los datos y las cotas superior e inferior al 50% restante de los datos. El punto denota la mediana y ^{o*} denotan valores extremos. Letras distintas denotan diferencias significativas entre sitios ($p < 0.05$).

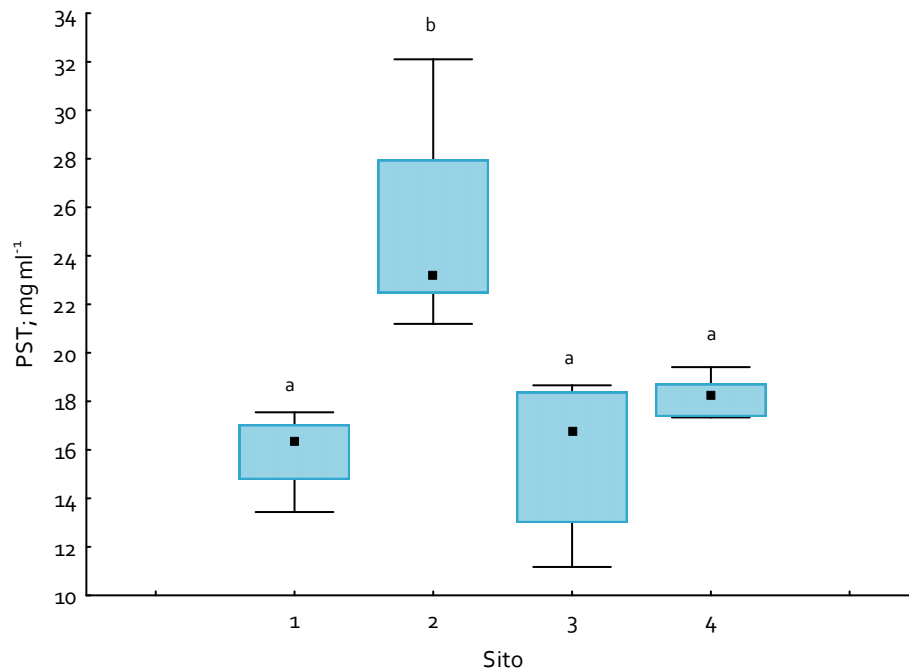


Figura 8. Concentración de Proteínas Solubles Totales (PST; mg ml⁻¹) en el hígado de juveniles de *Ambystoma mexicanum* trasplantados en cuatro canales de Xochimilco. Sitio 1. Puente de Urrutia, 2. Apatlaco, 3. Laguna de la Asunción y 4. La Draga. En cada caso la caja corresponde al 50% de los datos y las cotas superior e inferior al 50% restante de los datos. El punto denota la mediana y letras distintas denotan diferencias significativas entre sitios ($p < 0.05$).

6.4. Concentración hepática de metales en *A. mexicanum* e interacciones

Las concentraciones de los metales en hígado de *A. mexicanum* reportadas por González (2006) se señalan en la Tabla 2 y en la Figura 9; en ésta última se incluye la sumatoria por sitio de los metales referidos. Cabe resaltar que los organismos provenientes del Sitio Apatlaco (Sitio 2; moderado impacto urbano y alto impacto agrícola) presentaron la mayor concentración hepática de los metales analizados. Es importante señalar que la acumulación de metales a nivel hepático es la resultante de la biodisponibilidad de metales en agua, sedimento y alimento de los distintos sitios de estudio, comportamiento ampliamente discutido en el trabajo realizado por González (2006)(Anexo 4).

Tabla 2. Concentración de metales (mg kg⁻¹ PS; ppm) en el hígado de juveniles de *A. mexicanum* (González, 2006) trasplantados a cuatro canales de Xochimilco. Se señalan valores promedio y error estándar.

Sitio Metal	1. P. Urrutía	2. Apatlaco	3. L. de Asunción	4. La Draga
Cr	0.59 ± 0.26 ^a	2.36 ± 0.44 ^b	1.45 ± 0.4 ^{ab}	1.51 ± 0.22 ^{ab}
Mn	9.04 ± 2.4 ^a	4.68 ± 0.26 ^{ab}	2.83 ± 0.27 ^b	3.93 ± 0.29 ^b
Fe	137.83 ± 1.89 ^a	193.52 ± 48.29 ^a	137.85 ± 0.0004 ^a	79.86 ± 49.73 ^a
Co	0.2 ± 0.01 ^a	1.64 ± 0.84 ^a	0.88 ± 0.08 ^a	0.99 ± 0.07 ^a
Cu	34.79 ± 1.5 ^a	31.2 ± 5.0 ^a	16.83 ± 1.68 ^a	25.47 ± 5.0 ^a
Zn	93.58 ± 6.9 ^a	64.69 ± 6.27 ^a	76.38 ± 5.34 ^{ab}	97.48 ± 2.65 ^a
Se	1.92 ± 0.29 ^a	5.02 ± 1.24 ^{ab}	7.09 ± 0.52 ^b	7.99 ± 0.08 ^b
As	0.56 ± 0.05 ^a	0.39 ± 0.05 ^{ab}	0.22 ± 0.02 ^b	0.31 ± 0.01 ^b
Ni	1.64 ± 0.16 ^a	4.88 ± 1.18 ^a	1.37 ± 0.03 ^a	1.49 ± 0.24 ^a
V	0.24 ± 0.03 ^a	0.32 ± 0.06 ^a	0.2 ± 0.03 ^a	0.28 ± 0.02 ^a
Sr	1.32 ± 0.02 ^a	1.63 ± 0.23 ^a	1.51 ± 0.3 ^a	0.59 ± 0.2 ^a
Cd	0.16 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.02 ^a	1 ± 0.62 ^a
Pb	0.86 ± 0.1 ^{ab}	1.87 ± 0.31 ^a	0.47 ± 0.2 ^b	1.92 ± 0.3 ^a

Para cada metal, letras distintas denotan diferencias significativas entre sitios (p<0.005)

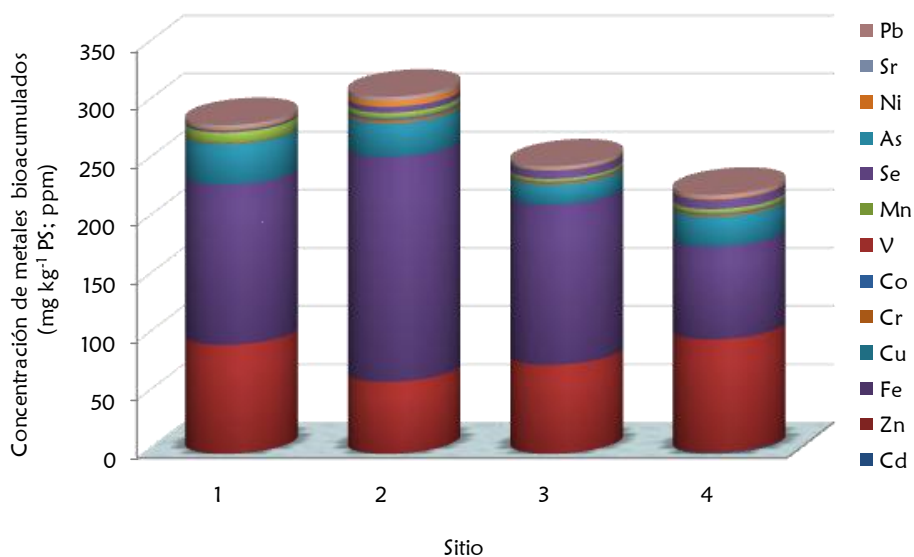


Figura 9. Concentración de metales en el hígado de *A. mexicanum* (mg Kg^{-1} PS) trasplantados a cuatro sitios de Xochimilco. Sitio 1. Puente de Urrutia, 2. Apatlaco, 3. Laguna de la Asunción y 4. La Draga (datos analizados de González, 2006).

Las mayores concentraciones de metales esenciales fueron registradas en los sitios Apatlaco (Sitio 2; moderado impacto urbano y alto impacto agrícola) y Puente de Urrutia (Sitio 1: bajo impacto urbano y alto impacto agrícola) (Figura 10). Respecto a los metales sin función biológica conocida, las concentraciones más altas se registraron en Apatlaco y La Draga (Sitio 4: alto impacto urbano y bajo impacto agrícola) (Figura 11).

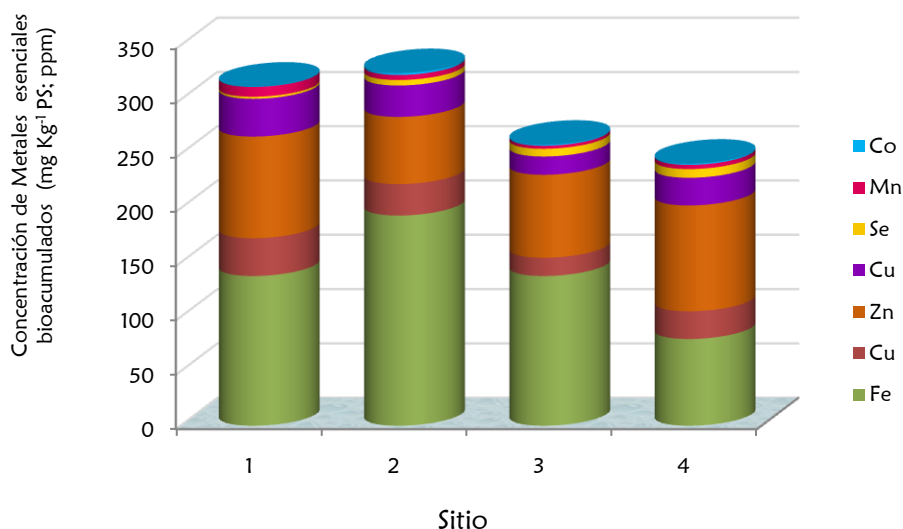


Figura 10. Concentración de metales esenciales en el hígado de *A. mexicanum* (mg Kg^{-1} PS) trasplantados a cuatro sitios de Xochimilco. Sitio 1. Puente de Urrutia, 2. Apatlaco, 3. Laguna de la Asunción y 4. La Draga (datos analizados de González, 2006).

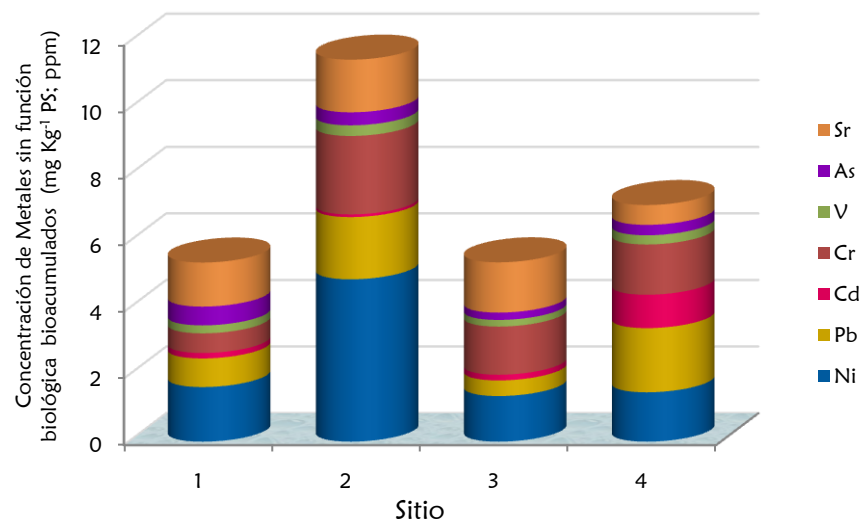


Figura 11. Concentración de metales sin función biológica conocida en el hígado de *A. mexicanum* (mg Kg^{-1} PS) trasplantados a cuatro sitios de Xochimilco. Sitio 1. Puente de Urrutia, 2. Apatlaco, 3. Laguna de la Asunción y 4. La Draga (datos analizados de González, 2006).

Con el propósito de analizar probables relaciones de causalidad entre los biomarcadores evaluados de exposición y efecto a metales (MT's y PC, respectivamente) y la concentración hepática de los metales registrados por González (2006), éstos últimos se agruparon en tres categorías:

1. Principales metales inductores de Metalotioneínas (PIMT's). Incluyen Cu, Cd y Zn en orden decreciente de afinidad (Scheuhammer y Cherian, 1986; Amiard *et al.* 2006) (Figura 12).
2. Metales inductores totales de Metalotioneínas (ITMT's). Incluyen además de los anteriores, al Co, Ni, Mn, Cr y Fe en orden decreciente de afinidad (Scheuhammer y Cherian, 1986; Sato y Bremner, 1993; Amiard *et al.* 2006) (Figura 13).
3. Metales inductores de estrés oxidante (IEO). Incluyen Fe, Cu, Cr, V y Co (Valko *et al.*, 2005) (Figura 14).

Las mayores concentraciones hepáticas de los Principales Metales Inductores de Metalotioneínas (PIMT's; Cu, Cd y Zn) se registraron en los organismos provenientes de los sitios 1 y 4 (Puente de Urrutia -bajo impacto urbano y alto impacto agrícola- y, La Draga -alto impacto urbano y bajo impacto agrícola-, respectivamente; Figura 12). De manera particular, las mayores concentraciones fueron de Zn y se encontraron en los organismos provenientes de los Sitios 1 y 4, previamente descritos (Figura 12; Tabla 2).

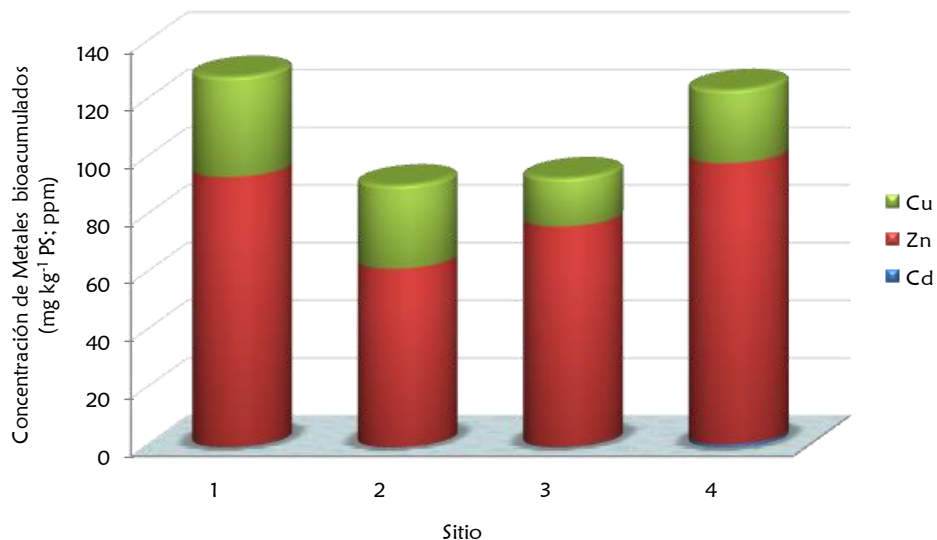


Figura 12. Concentración de los Principales metales Inductores de Metalotioneínas (PIMT's; Cd, Zn y Cu) en el hígado de *A. mexicanum* (mg kg^{-1} PS; ppm) trasplantados a cuatro sitios de Xochimilco. Sitio 1. Puente de Urrutia, 2. Apatlaco, 3. Laguna de la Asunción y 4. La Draga (datos analizados de González, 2006).

En el caso de los metales Inductores Totales de Metalotioneínas (ITMT's; Cu, Cd, Zn, Co, Ni, Mn, Cr y Fe), las mayores concentraciones se registraron en los organismos provenientes del Sitio 2 (Apatlaco, moderado impacto urbano y alto impacto agrícola) seguido de los organismos del Sitio 1 (Puente de Urrutia, bajo impacto urbano y alto impacto agrícola) (Figura 13).

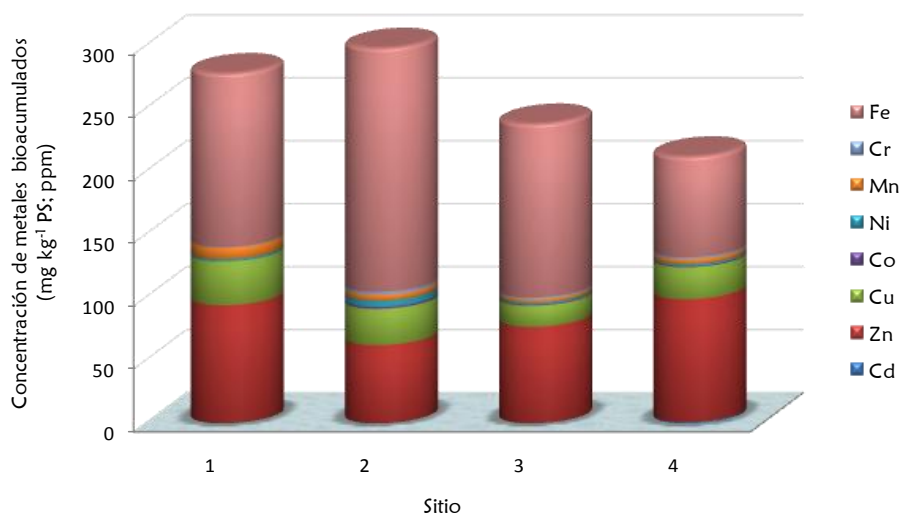


Figura 13. Concentración de los metales Inductores Totales de Metalotioneínas (ITMT's; Cd, Zn, Cu, Co, Ni, Mn, Cr y Fe) en el hígado de *A. mexicanum* (mg kg^{-1} PS; ppm) trasplantados en cuatro sitios de Xochimilco. Sitio 1. Puente de Urrutia, 2. Apatlaco, 3. Laguna de la Asunción y 4. La Draga (datos analizados de González, 2006).

Respecto a los metales Inductores de Estrés Oxidante (IEO; Fe, Cu, Cr, V y Co) la mayor concentración se registró en los organismos del Sitio 2 (Apatlaco, moderado impacto urbano y alto impacto agrícola) y la menor en los organismos del Sitio 4 (La Draga, alto impacto urbano y bajo impacto agrícola) (Figura 14).

Es interesante resaltar el comportamiento del Fe, pues pese a que no se encontraron diferencias significativas en la concentración de éste metal en los organismos provenientes de los diferentes sitios de estudio debido a la dispersión de los datos, los ajolotes del Sitio 2 (Apatlaco, moderado impacto urbano y alto impacto agrícola) registraron 2.5 veces más que los organismos provenientes del Sitio 4 (La Draga, alto impacto urbano y bajo impacto agrícola) (Figuras 9 y 14; Tabla 2).

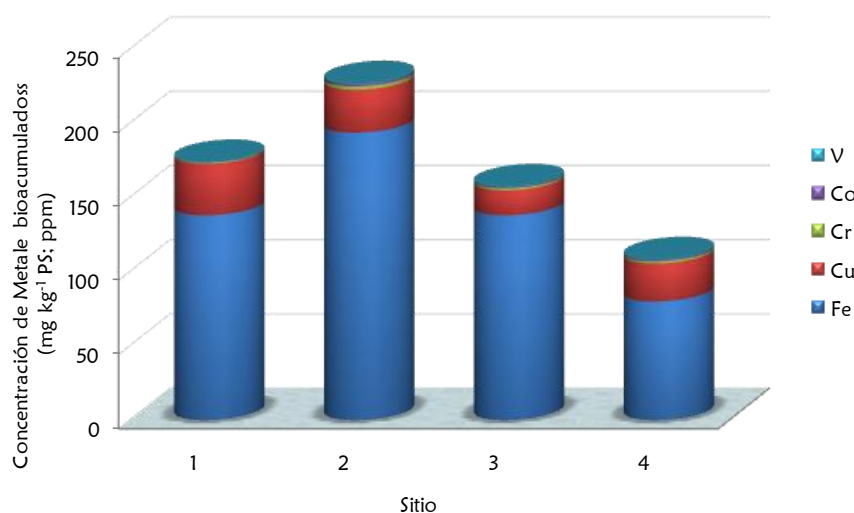


Figura 14. Concentración de los principales metales inductores de estrés oxidante (IEO, Fe, Cu, Cr, Co y V) en hígado de *A. mexicanum* (mg kg^{-1} PS; ppm) trasplantados en cuatro sitios de Xochimilco. Sitio 1. Puente de Urrutia, 2. Apatlaco, 3. Laguna de la Asunción y 4. La Draga (datos analizados de González, 2006).

En la Tabla 3 se incluyen sólo los coeficientes de correlación significativos entre las variables analizadas (MT's, PC, PST y concentración hepática de los metales) en los ajolotes provenientes de los cuatro sitios de estudio. Contrario a lo esperado, no se encontró una relación significativa entre la concentración hepática de MT's y los metales inductores de

éstas (Cd, Cu, Zn) ($p > 0.05$), ni entre las MT's y la sumatoria de todos sus metales inductores (Cu, Cd, Zn, Co, Ni, Mn, Cr y Fe) ($p > 0.05$).

Tabla 3. Interacciones globales. Correlaciones entre los biomarcadores de exposición y de efecto a metales y las concentraciones de metales en el hígado de juveniles de *A. mexicanum*.

Variable	MT's	PC	PST	Se	Ni	PI MT's	IT MT's	IEO
MT's	-	-	-	0.954	-	-	-	-
PC	-	-	-	-	0.978	-	-	0.937
PST	-	-	-	-	0.963	-	-	-

PIMT's: Principales metales Inductores de Metalotioneínas (Cd, Cu y Zn)

ITMT's: Metales Inductores Totales de Metalotioneínas (Cd, Cu, Zn, Co, Ni, Mn, Cr y Fe)

IEO: Metales Inductores de Estés Oxidante (Fe, Cu, Cr, V y Co)

MT's: Metalotioneínas hepáticas

PC: Proteínas Carboniladas hepáticas

PST: Proteínas Solubles Totales hepáticas

Pese a que en los sitios 1 y 4 (Puente de Urrutia y La Draga, respectivamente) se registraron las mayores concentraciones hepáticas de los principales inductores de las MTs (Cu, Cd y Zn), no se observó una relación entre éstas y los niveles hepáticos de metales en *A. mexicanum*. De manera similar, en los sitios 1 y 2 (Puente de Urrutia y Apatlaco, respectivamente) se registraron las mayores concentraciones de los metales totales inductores de metalotioneínas sin que se observara una relación con la inducción de MTs. Por otra parte, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de MTs debido a la dispersión de los datos, destacan los ajolotes del sitio 3 (Laguna de la Asunción) y del sitio 4 (La Draga) por presentar una tendencia a tener las mayores concentraciones de MT's mientras que en el Sitio 2 (Apatlaco) se registró la mayor concentración hepática de todos los metales inductores de metalotioneínas.

Únicamente se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de MT's y la concentración de Selenio (Figura 15; $p > 0.05$), entre la concentración de Proteínas Carboniladas y la concentración de Níquel (Figura 16; $p > 0.05$), entre la Proteína Soluble Total y el Níquel (Figura 17; $p > 0.05$) y, conforme a lo esperado, entre las Proteínas Carboniladas y la sumatoria de los principales metales inductores de estrés oxidante (IEO) (Figura 16; $p > 0.05$). Cabe señalar que la relación entre las Proteínas Carboniladas y los IEO no fue lineal como las tres anteriores sino de tipo exponencial y, destaca el comportamiento del sitio 2 (Apatlaco) donde se registró la mayor concentración hepática de los metales inductores de estrés oxidante (Figura 18).

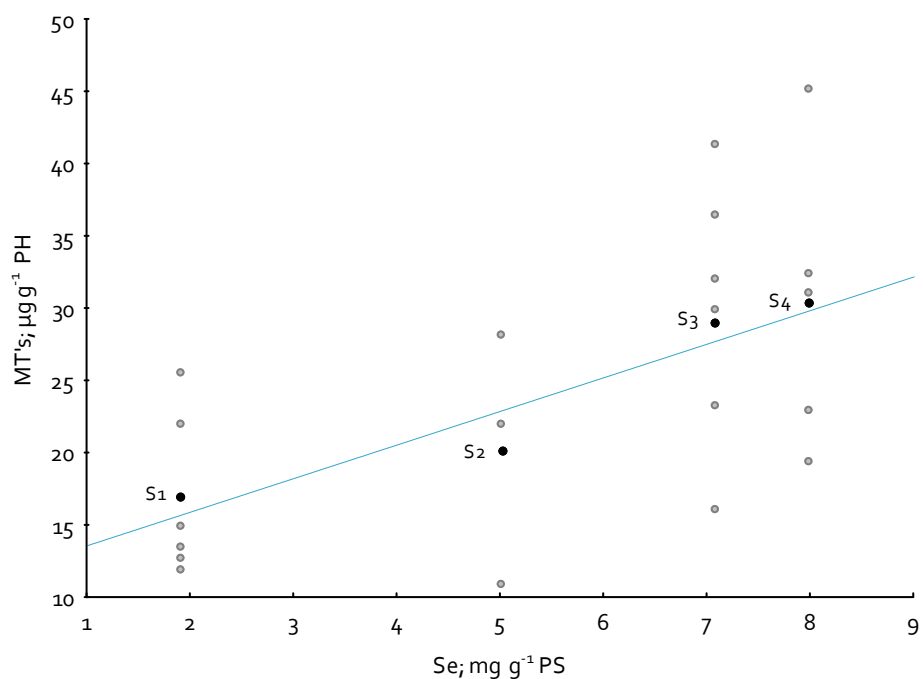


Figura 15. Correlación entre las concentraciones de metalotioneínas (MT's; $\mu\text{g g}^{-1}$ PH) y el Se (mg g^{-1} PS) en el hígado de *A. mexicanum*. Sitio 1. Puente de Urrutia, 2. Apatlaco, 3. Laguna de la Asunción, 4. La Draga ($r=0.95$, $p<0.005$).

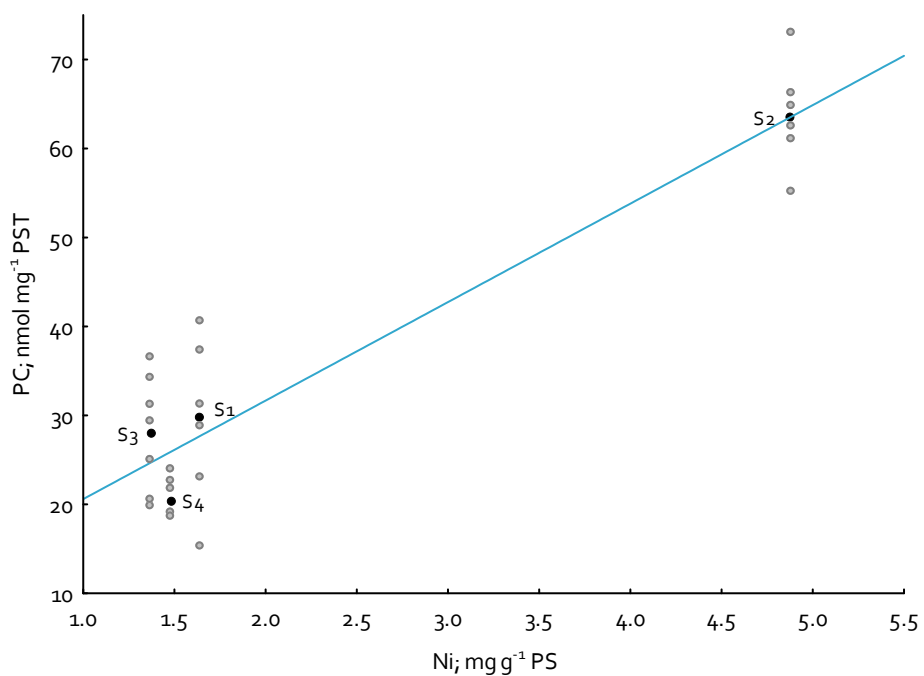


Figura 16. Correlación entre las Proteínas Carboniladas (PC; nmol mg^{-1} PST) y el Ni (mg g^{-1} PS) en el hígado de *A. mexicanum*. Sitio 1. Puente de Urrutia, S2. Apatlaco, S3. Laguna de la Asunción, S4. La Draga ($r=0.978$, $p<0.005$).

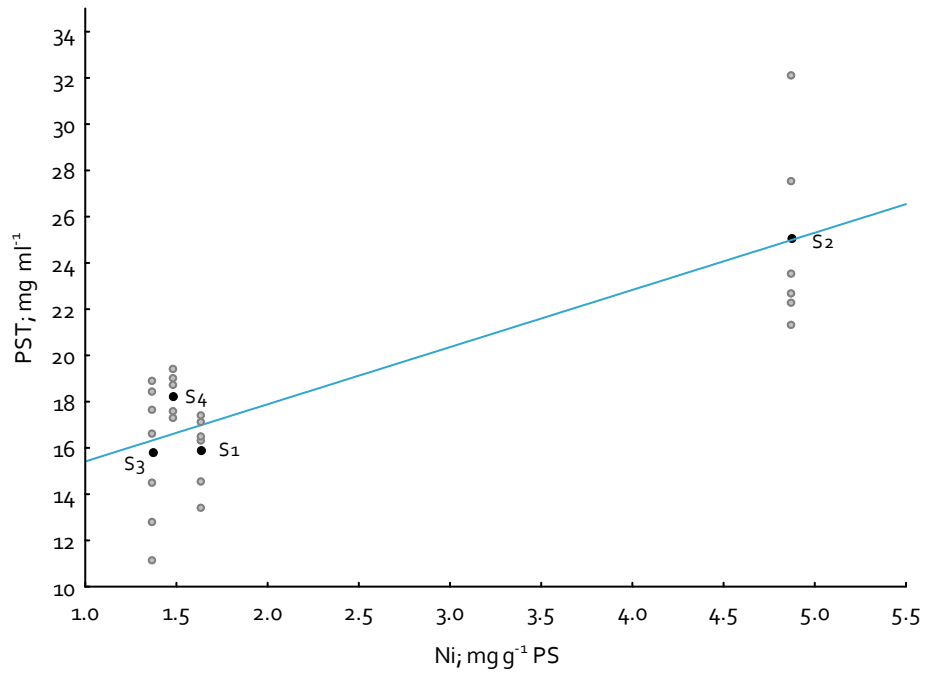


Figura 17. Correlación entre las concentraciones de Proteína Soluble Total y el Ni en hígado de *A. mexicanum*. Sitio 1. Puente de Urrutia, S2. Apatlaco, S3. Laguna de la Asunción, S4. La Draga ($r=0.963$, $p<0.005$).

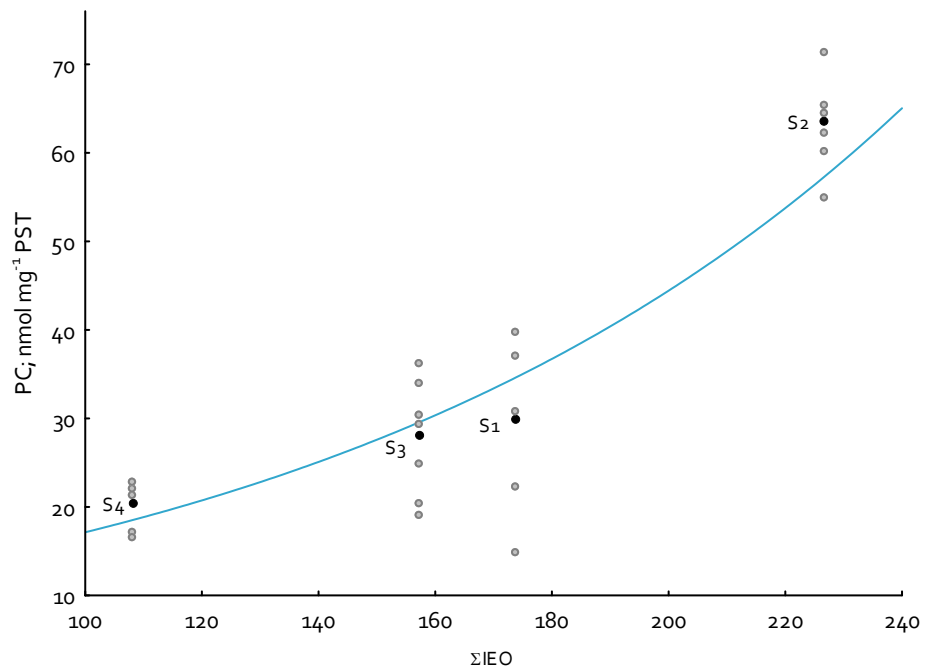


Figura 18. Correlación entre las Proteínas Carboniladas (PC; nmol mg⁻¹ PST) y los principales metales Inductores de Estrés Oxidante (IEO) en el hígado de *A. mexicanum*. Sitio 1. Puente de Urrutia, S2. Apatlaco, S3. Laguna de la Asunción, S4. La Draga ($r^2=0.937$, $p<0.005$).

En cuanto a las interacciones de los distintos biomarcadores evaluados, no se encontraron correlaciones significativas ($p > 0.05$) entre las Metalotioneínas, las Proteínas Carboniladas ó las Proteínas Solubles Totales.

7. DISCUSIÓN

Las MT's son uno de los principales biomarcadores utilizados en programas de monitoreo ambiental y su inducción por metales (i.e. Cd, Cu, Zn, Co, Ni, Mn, Cr, Fe, Ag, Hg) ha sido demostrada en numerosas especies (moluscos, anélidos, crustáceos, peces y anfibios) (Amiard *et al.*, 2006). Diversos estudios, tanto en condiciones controladas de laboratorio como en el medio natural, demuestran que el incremento en la concentración de MT's asociado al incremento en la concentración corporal de metales, se relaciona con un menor deterioro (i.e. molecular, bioquímico, fisiológico) de los organismos bajo análisis (Sato y Bremner, 1993; Vogiatzis y Loubourdis, 1997; Palmiter, 1998; Venturino *et al.*, 2003; Amiard *et al.*, 2006; Carpenè *et al.*, 2007).

En anfibios, la inducción de las MT's por exposición y/o inyección intramuscular a metales ha sido reportada en *Rana japonica*, *Rana nigromaculata*, *Rhacophorus schlegelii*, *Rana ridibunda* y *Xenopus laevis* (Suzuki y Tanaka, 1983; Suzuki *et al.*, 1983; Suzuki y Kawamura, 1984; Vogiatzis y Loubourdis, 1997, 1998; Papadimitriou y Loubourdis, 2003; Anexo 3). Debido a las distintas técnicas empleadas para la evaluación de MT's, no es posible establecer comparaciones entre los niveles hepáticos de MT's reportados en otros anfibios, sobre todo provenientes de sitios contaminados, y los obtenidos en *A. mexicanum* en el presente estudio. No obstante, los niveles registrados de MT's hepáticas en *A. mexicanum* son similares a los reportados para *Rana ridibunda* ($68.08 \pm 12.48 \mu\text{g g}^{-1}$) expuesta a 200 mg Cd L^{-1} (Vogiatzis y Loubourdis, 1998).

Contrario a lo esperado, los niveles hepáticos de MT's de los juveniles de *A. mexicanum* provenientes de los diferentes sitios de estudio, no presentaron diferencias significativas pese a las concentraciones de los principales metales inductores de éstas metaloproteínas en el hígado del ajolote. Es posible suponer que el comportamiento observado de las MT's sea consecuencia de varios aspectos: los niveles en el tejido hepático de los metales inductores;

el curso de la inducción de las MT's y, factores ambientales adicionales a los metales inductores de MT's, aspectos que se abordarán más adelante.

En cuanto a los metales inductores de MT's registrados en el hígado de *A. mexicanum*, si bien las concentraciones de los metales inductores totales de MT's (ITMT's; Cd, Cu, Zn, Co, Ni, Mn, Cr, Fe) fue ligeramente mayor en los organismos provenientes del sitio 1 (Puente de Urrutia) y sitio 2 (Apatlaco), no se observó relación ($p > 0.05$) con las concentraciones hepáticas de MT's, ni considerando sólo los principales metales inductores de metalotioneínas (PIMT's; Cd, Cu, Zn). Cabe resaltar que de éstos últimos sólo el zinc presentó diferencias significativas entre sitios; no obstante, tampoco se observó correlación entre las concentraciones tisulares de Zn y las MT's. De tal manera, los resultados obtenidos denotan que en los juveniles de *A. mexicanum*, transplantados durante un mes a los canales de Xochimilco, la inducción hepática de MT's no se relaciona con los niveles tisulares de los metales inductores de éstas. Este comportamiento aparentemente contradictorio, ha sido documentado en diversas especies en las que no se observa un incremento en la concentración de MT's aún en ambientes donde los metales biodisponibles se encuentran en elevadas concentraciones (Amiard *et al.*, 2006). En contraste, Cooper y Fortin (2010) señalan que en *Rana catesbeiana* proveniente de sitios contaminados, si bien las MT's no se relacionaron con las concentraciones hepáticas de los metales, si se relacionaron con los niveles de los metales en el medio.

La falta de correlación entre las MT's hepáticas y sus metales inductores en *A. mexicanum* puede ser reflejo del curso de la inducción de las MT's. Al respecto, estudios bajo condiciones controladas de laboratorio demuestran que la inducción de MT's se produce en periodos relativamente cortos (horas, días) y constituye una primera línea de defensa y de protección celular frente al efecto tóxico celular de metales (Amiard *et al.*, 2006; Wang y Ranibow, 2010). Dado que en el presente estudio, los juveniles de *A. mexicanum* se transplantaron a los diferentes sitios de los canales de Xochimilco durante un mes, es probable sugerir que la concentración hepática de MT's al término de la exposición "in situ" no es reflejo directo de su inducción como mecanismo de protección celular inicial ante la exposición a metales. Este comportamiento ha sido reportado en *Rana ridibunda* expuesta al Cu en el que durante los primeros 15 de exposición se observa una correlación entre las concentraciones hepáticas del Cu y la inducción tisular de MT's; sin embargo esta

relación no se observa al término de la exposición (30 d), e incluso los niveles de MT's disminuyen a los niveles iniciales previos a la exposición (Papadimitriou y Loumbourdis, 2003). De tal manera y de manera similar que en otros anfibios, es posible sugerir que en los juveniles de *A. mexicanum* en exposiciones crónicas *in situ*, la concentración hepática de las MTs no es un marcador biológico adecuado de la magnitud de los metales a los que están expuestos en el medio.

Si bien de manera general las MT's se caracterizan por ejercer un efecto de protección celular ante la toxicidad producida por metales, diversas líneas de investigación sugieren que su inducción también se presenta bajo diversos estímulos químicos. Éstos incluyen compuestos que generan especies reactivas de oxígeno como compuestos no metálicos (i.e. citocinas, cloroformo, tetracloruro de carbono, paraquat, quinonas, compuestos nitroaromáticos), metales oxidantes (i.e. Fe, Cu, Cr, V, Co) y cambios en la salinidad, entre otros estresores ambientales (Sato y Bremner, 1993; Conrad, *et al.*, 2000; Achard, *et al.*, 2007; Monserrat *et al.*, 2007). En un escenario de elevada complejidad ambiental como es la zona lacustre de Xochimilco, receptor además de diversos contaminantes de origen doméstico, agrícola e industrial (González, 1997; González, 2006; Robles *et al.*, 2009 y CITES, 2005), es probable sugerir que numerosas variables ambientales que ejercen estrés oxidante intervienen en los niveles de MT's hepáticas registrados en los juveniles de *A. mexicanum*.

Como se señaló previamente, dos factores centrales muy relacionados entre sí intervienen en la regulación de la inducción de MT's por agentes oxidantes: la capacidad de éstas de ser oxidadas y reducidas (Bell y Vallee, 2009; Davis y Cuisins, 2000) y, la participación del Se orgánico en su inducción (Panter *et al.*, 1996; Lenz y Lens, 2009). Los péptidos unidos a selenio (i.e. selenocistamina) facilitan la unión entre la MT y el GSH/GSSG modulando por medio de una catálisis redox la unión y liberación de Zn al intervenir en los cambios redox del GSH y por consiguiente en la disponibilidad tanto de donadores como de aceptores de Zn (Bell y Vallee, 2009). De tal manera, la correlación observada entre las concentraciones de Se y de las MT's hepáticas en *A. mexicanum* sugiere que este metal induce de manera indirecta la síntesis de MT's como un mecanismo de protección al estrés oxidante celular, metal que a nivel celular podría estar asociado a selenoproteínas.

Cabe destacar que en el hígado de los ajolotes provenientes de la Laguna de la Asunción y de La Draga (sitios 3 y 4 respectivamente) se registraron las mayores concentraciones de Se ($p < 0.05$), una tendencia a presentar las mayores concentraciones de MT's y un menor daño por estrés oxidante evaluado a través de las Proteínas Carboniladas ($p < 0.05$). Esta relación de resultados sugiere que en estos organismos, el Se pudiera estar modificando las condiciones redox de los hepatocitos y por ende estar induciendo la liberación del Zn que a su vez induce la transcripción de MT's, las cuales estarían fungiendo como agentes antioxidantes (Sato y Bremner, 1993; Davis y Cuisins, 2000; Dunderski, 2004 Bell y Vallee, 2009). De tal manera, en los organismos provenientes tanto de la Laguna de Asunción como de la Draga, sitios de elevado impacto urbano, la inducción de MT's como mecanismo de protección celular a agentes oxidantes estaría modulado por la concentración hepática de Se. No obstante esta hipótesis requiere ser comprobada a partir de estudios de especiación química del Se y de la probable participación de las selenoproteínas como agente antioxidante.

En general, los resultados obtenidos en los organismos provenientes de la Draga y de la Laguna de la Asunción sugieren que las MT's estarían ejerciendo un papel de protección celular en el ajolote y además de unirse a metales, estarían desempeñando un papel como agentes quelantes. Lo anterior se sustenta además en el hecho de que si bien el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), una de las ROS más reactivas derivadas del estrés oxidante producido por metales, es considerado como responsable de la formación de grupos carbonilo en las proteínas (Conrad *et al.*, 2000; Čolak, 2008; Palmiter, 1998; Sato y Bremner, 1993 y Stohs y Bagchi, 1995), estas biomoléculas presentaron los niveles más bajos asociadas a los niveles más elevados de MTs, en los ajolotes transplantados al sitio de La Draga.

Los resultados de la concentración de las Proteínas Carboniladas (PC) en los hepatocitos del ajolote denotan que los organismos provenientes de Apatlaco (S2), sitio de moderado impacto urbano y elevado impacto agrícola, presentaron el mayor daño ocasionado por estrés oxidante ($p < 0.05$). El comportamiento exponencial de la correlación significativa entre las PC y la sumatoria de los principales Metales Inductores de Estrés Oxidante (IEO; Fe, Cu, Cr, V y Co) sugiere que los mecanismos de protección celular para reducir el estrés oxidante, entre ellos la inducción de MT's, han sido rebasados y que estos organismos se encuentran bajo un severo estrés. Cabe destacar que si bien los grupos carbonilo son

producidos por distintos ROS, éstos solamente se producen en condiciones extremas de estrés oxidante (Čolak, 2008). De tal manera, en los ajolotes provenientes de Apatlaco, las elevadas concentraciones de PC relacionadas con las mayores concentraciones de metales IEO dan cuenta de un daño severo en los organismos ocasionado por metales. No obstante, no se descarta el efecto adicional de otros contaminantes no metálicos que pueden generar estrés oxidante, producto de los aportes de las actividades agrícolas y urbanas de la zona (González, 2006; Robles, 2008).

Si bien las proteínas carboniladas son buenos indicadores globales de estrés oxidante, son pocos los estudios realizados en organismos acuáticos, la mayoría de ellos efectuados en peces y muy limitados los realizados en anfibios (Anexo 3). Cabe destacar que los niveles hepáticos de las PC determinados en el presente estudio en *A. mexicanum* son similares a los reportados por Falfushinska *et al.* (2008) en *Rana ridibunda* expuesta durante 14 días a una mezcla de fungicidas (0.091mg L^{-1} , Anexo 3). En peces, las proteínas carboniladas han sido utilizadas como biomarcadores del estrés oxidante ocasionado por la exposición a plaguicidas (Parvez y Raisuddin, 2005) y a metales (Xiong *et al.*, 2010). Sin embargo, Almroth *et al.* (2008) señalan que en ambientes complejos con distintos aportes de contaminantes, las proteínas carboniladas son mejores indicadores del estrés oxidante ocasionado por metales que por plaguicidas. De tal manera, si bien los grupos carbonilo son inducidos por todos los tipos de ROS y por lo tanto no sugieren el tipo de oxidante (Čolak, 2008), la correlación observada entre las PC y los IEO a nivel hepático en los ajolotes provenientes de los canales de Xochimilco sugiere que este grupo de metales puede ser responsable del estrés oxidante severo, particularmente de los organismos provenientes del sitio de Apatlaco.

El comportamiento de las Proteínas Solubles Totales (PST) similar al registrado en las PC, donde las mayores concentraciones se registraron también en los organismos provenientes de Apatlaco, apoya las condiciones de severo estrés ambiental de los organismos de este sitio. Los niveles de PST en diversos tejidos ha sido ampliamente utilizado como indicador de la condición fisiológica de organismos acuáticos (peces e invertebrados) sujetos a la exposición aguda y crónica de contaminantes. Al respecto, Sreedevi *et al.* (1992) señalan que el incremento de las PST y PT (proteínas totales) a nivel hepático en el pez *Cyprinus carpio* por la exposición crónica a Ni sugiere la participación de

mecanismos compensatorios y de desintoxicación al metal. Si bien no se cuenta con suficiente información en anfibios de los mecanismos fisiológicos compensatorios ante el estrés ocasionado por tóxicos ambientales, es posible sugerir que el incremento de la concentración de las PST en el tejido hepático de los ajolotes del sitio de Apatlaco, refleje a la vez el aumento de biomoléculas asociadas al estrés oxidante (i.e. catalasas, evaluados indirectamente a través del método Bio-Rad Protein Assay) o bien denote su mayor movilización como sustrato energético, requerido para procesos de protección celular y de compensación fisiológica. Es interesante hacer notar que González (2006) registró el menor crecimiento en los ajolotes provenientes del sitio Apatlaco, lo cual sugiere alteraciones en el metabolismo energético de los organismos y que pudiera obedecer a los costos energéticos asociados a procesos de desintoxicación, protección celular y/o compensación frente a las severas condiciones de estrés oxidante del medio. No obstante se requiere la realización de estudios *in situ* para probar estas hipótesis.

Al analizar las probables relaciones de los niveles hepáticos de los metales y los biomarcadores evaluados en los ajolotes, llama la atención la correlación significativa de las PC y PST sólo con el Ni. Si bien, es precisamente en el sitio de Apatlaco donde se observaron los mayores niveles hepáticos de PC y PST, también se registraron las mayores concentraciones de Fe y de Ni, el primero uno de los principales metales inductores de estrés oxidante y el segundo, un metal oxidante pero en mucho menor grado. A la fecha se carece de una explicación adecuada de las relaciones observadas entre PC, PST y el Ni debido a los procesos de regulación homeostática de un metal cuya esencialidad se desconoce en organismos acuáticos y que incluso a nivel humano, está sujeta a debate (Hayes, 2001).

Una de las limitaciones de la evaluación de biomarcadores en organismos expuestos *in situ* en ambientes alterados, es la multiplicidad de factores e interacciones que intervienen en las respuestas bioquímicas o fisiológicas evaluadas. Entre estos factores destacan las condiciones climáticas, las características físico-químicas del medio, la biodisponibilidad de los contaminantes, las peculiaridades genéticas de la especie, las relaciones entre los individuos y/o especies así como las propias interacciones entre contaminantes, lo cual dificulta la interpretación de las respuestas evaluadas (Jamil, 2001). El presente estudio fue realizado en un escenario de elevada complejidad ambiental como es la zona lacustre de Xochimilco, el cual es receptor de diversos contaminantes metálicos y no metálicos de

origen doméstico, agrícola e industrial, (González, 1997; González, 2006; Robles et al., 2009 y CITES, 2005). Si bien el presente trabajo se enfocó a evaluar particularmente el efecto de metales en el jolote *Ambystoma mexicanum*, los resultados obtenidos permiten sugerir que los biomarcadores evaluados dan cuenta del efecto de la exposición crónica a los metales. De tal manera, los niveles hepáticos de MTs dan cuenta de su función como agentes quelantes de protección celular al estrés oxidante, en tanto que las PC dan cuenta de manera general de la condición de estrés por la acción oxidante de metales. No obstante se requieren estudios posteriores que analicen el curso de la inducción de estas respuestas y los mecanismos de acción tanto de los metales como de compuestos orgánicos, no metálicos (i.e. plaguicidas, compuestos nitrogenados) relacionados con el estrés oxidante. A la vez, se requiere la realización de estudios que consideren otros indicadores de estrés oxidante (i.e. relación GSG-GSSG, peroxidación de lípidos) así como la evaluación de biomarcadores a diferentes niveles de organización biológica (i.e. molecular, conductual, fisiológico) que aporten información de la contribución del efecto de los múltiples contaminantes en el hábitat del ajolote *Ambystoma mexicanum* sobre el deterioro de sus poblaciones.

8. CONCLUSIONES

- De manera general, los biomarcadores evaluados (PC, PST) fueron indicadores de estrés asociados en gran parte a la exposición crónica a metales de los juveniles de *Ambystoma mexicanum* en los canales de Xochimilco.
- A nivel hepático las metalotioneínas (MT's) no se comportaron como un biomarcador idóneo de la exposición a metales inductores de estas metaloproteínas; ya que no se registró una relación causa/efecto (metales inductores de MT's/MT'). No obstante, los resultados obtenidos denotan el papel funcional de las MTs como agentes protectores a la acción oxidante de los metales.
- La correlación significativa observada entre las concentraciones del Se y las MT's hepáticas sugiere la participación de este metal (probablemente asociado a selenoproteínas) en la inducción de las MT's como agente protector al estrés oxidante de los metales.

- Los resultados obtenidos en el tejido hepático de los organismos provenientes de la Draga y de la Laguna de la Asunción (elevadas concentraciones de Se y de MT's, bajos niveles de PC y PST, niveles menores de MIEO) denotan la participación de mecanismos de protección celular al estrés oxidante de metales, entre ellos la síntesis de MT's. En contraste, en los organismos provenientes de Apatlaco los resultados obtenidos (mayores concentraciones de MIEO, niveles elevados de PC y PST y bajos niveles de MT's) sugieren que los ajolotes se encuentran sujetos a un severo estrés oxidante asociado en gran parte a metales.
- La relación de causalidad entre los principales metales inductores de estrés oxidante (MIEO) y las proteínas carboniladas (PC), denotan que este biomarcador da cuenta del estrés oxidante ocasionado por los metales.
- Acorde a los resultados obtenidos, el sitio de Apatlaco en la zona lacustre de Xochimilco, zona de elevado impacto agrícola y bajo impacto urbano, representa un área de elevada alteración, particularmente por la mayor concentración de metales inductores de estrés oxidante. No obstante, debe considerarse la interacción y el efecto de otros contaminantes no metales inductores de estrés oxidante, producto de las actividades agrícolas y urbanas en la zona.

9. CONSIDERACIONES FINALES

Durante los últimos años las poblaciones de ajolote han declinado significativamente en la zona lacustre de Xochimilco, y hoy al borde de una extinción ecológica, el ajolote “emprende carrera contra el tiempo”. A pesar de la compleja problemática del deterioro de su medio, las investigaciones realizadas respecto al impacto de los contaminantes sobre las poblaciones del ajolote son escasas. El presente estudio contribuye a aportar información encaminada a profundizar en los efectos del estrés crónico de los metales sobre juveniles de *Ambystoma mexicanum* en su medio.

De manera particular y respecto a los temas tratados en el presente estudio es importante encaminar esfuerzos futuros para realizar estudios enfocados a:

- Establecer los niveles basales de metales en *A. mexicanun*, información de gran utilidad para profundizar en la regulación homeostática de los metales esenciales y entender el efecto del incremento de éstos y de los metales sin función biológica conocida en las poblaciones de ajolote.
- En cuanto al empleo de los biomarcadores evaluados en este estudio (metalotioneínas, proteínas carboniladas, proteína soluble total), es fundamental establecer sus niveles basales y/o “normales”, para profundizar en los cambios y/o alteraciones de estas respuestas biológicas por estresores ambientales.
- En cuanto al uso de las metalotioneínas (MT's) como biomarcador de exposición a metales, en estudios futuros es necesario tomar en cuenta el curso de la inducción de éstas para discernir respuestas a corto plazo (i.e. mecanismo de regulación y protección celular a metales) de respuestas a mediano y largo plazo (i.e. mecanismos de reducción de estrés oxidante).
- En un sistema tan complejo como la zona Lacustre de Xochimilco, es necesario la evaluación integral en *A. mexicanum* de biomarcadores adicionales a las MT's y PC dados los diversos tipos de contaminantes presentes en la zona. Es importante destacar la importancia de la evaluación de la relación GSG/GSSG en estudios futuros, ya que además de ser un indicador sensible de estrés oxidante, está muy relacionado con la inducción de las MT's y la producción de grupos carbonilo en las proteínas (PC), lo que proveería de valiosa información acerca del estado redox celular.

10. REFERENCIAS

- Achard J.M., Moreau L.J., Megumi L., Baudrimont M., Mesmer D.N., Gonzalez P., Boudou A. and Bourdineaud J.P. 2007. Role of metallothioneins in superoxide radical generation during copper redox cycling: Defining the fundamental function of metallothioneins. *Biochimie*. 89:1474-1488.
- Adams S.M. 1990. Biological indicators of stress in fish. *American Fisheries Society Symposium* 8:145-166.
- Almroth C.B., Sturve J., Stephensen E., Holth F.T. and Förlin L. 2008. Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from heavy metal polluted and PHA polluted site. *Marine Environmental Research*. 66:271-277.
- Amiard J.C., Camiard-Triquet S., Barka J. Pellerin and Rainbow P.S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*. 76:160-202.
- Armstrong B. and Maacinski M. 1989. *Developmental biology of the axolotl*. Oxford University Press. Nueva York. 320 p.
- Beebee C.J.T. and Griffiths A.R. 2005. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biological Conservation*. 125:271-285.
- Beliaeff B. and Burgeot T. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21(6):1316-1322.
- Bell G.S. and Vallee L.B. 2009. The Metallothionein/Thionein system: An oxidoreductive metabolic zinc link. *ChemBioChem*. 10:55-62
- Berlett S.B. and Stadtman R.E. 1997. Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(33):20313-20316.
- Bio-Rad Laboratories. *Protein Assay*. Life Science Group. USA. 24 p.
- Bradford M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Bulog B., Mihajl k., Jeran Z. and Toman J.M. 2002. Trace element concentrations in the tissues of *Proeus anguinus* (Amphibia, Caudata) and the surrounding environment. *Water, Air and Soil Pollution*. 136:147-163.
- Burger J. and Snodgrass J. 2001. Metal levels in Southern Leopard frogs from Savannah River Site: Location and Body Compartment Effects. *Environmental Research*. 86A:157-166.
- Carpenè, E., Andreani, G. and Isani, G. 2007. Metallothionein functions and structural characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 21(S1):35-39.
- CEQG. 2003, *Canadian Environmental Quality Guidelines*. Canada
- CITES (Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres). Examen periódico de los apéndices de la CITES. Revisión del estatus del ajolote

- mexicano *Ambystoma mexicanum*. XXI Reunión del Comité de Fauna Ginebra (Suiza). 2005. AC21 Doc 11.2.
- Čolak E. 2008. New markers of oxidative damage to macromolecules. *Journal of Medical Biochemistry*. 27(1):1-16.
- Conrad C.C., Grabowski T.D., Walter A.C., Sabia M. and Richardson A. 2000. Using MT^{-/-} mice to study Metallothionein and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 28(3):447-462.
- Cooper S. and Fortin C. 2010. Metal and Metallothionein content in bullfrogs: Study of a whole watershed impacted by agricultural activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73(3):391-399.
- Coyle P., Philcox C.J., Carey C.L. and Rofe M.A. 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59:627-647.
- Dalle-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Rossi R., and Milzani A. 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*. 9(4):169-176.
- Davis R.S. and Cousins J.C. 2000. Metallothionein Expression on Animals: A Physiological Perspective on Function. *The Journal of Nutritional Sciences*. 130 (5):1085-1088.
- Dobrovoljc K., Falnoga I., Bulog B., Tušek-Žnidarič and Ščančar, J. 2003. Hepatic metallothioneins in two neotenic salamanders, *Proteus anguinus* and *Necturus maculosus* (Amphibia, Caudata). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 135 C:285-294.
- Dröge W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Review*. 82:47-95.
- Duellman E.W. and Trueb L. 1994. Biology of amphibians. The Johns Hopkins University Press. Londres. 670 p.
- Dunđerski J. 2004. Cellular Stress Response- Defence against metal toxicity. *Yugoslavian Medical Biochemistry*. 23:1-9
- Eggen R.I., Behra R., Burkhardt-Holm P., Escher B.I. and Schweigert N. 2004. Challenges in ecotoxicology. *Environmental Science & Technology*. 38(3):58A-64A.
- Espina S. y Vanegas C. 1996. Ecofisiología y contaminación, p 45-68. En A.V. Botello J.L., Rojas G., Benitez J.A. y Zárate L.D. (Eds.) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México, 666 p.
- Ezcurra E. 1990. De las chinampas a las megalópolis. 3era Edición. Fondo de Cultura Económica, México. 119 p.
- Falfushinska I.H., Romanchuk D.L. and Stolyar O. 2008. Different responses of biochemical markers in frogs (*Rana ridibunda*) from urban and rural wetlands to the effect of carbamate fungicide. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 148(C):223-229.

- Ficha Informativa de los humedales de Ramsar (FIR). 2004. Zona Lacustre "Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco" (<http://ramsar.conanp.gob.mx/documentos/fichas/50.pdf>).
- Floor E. and Wetzel M.G. 1998. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *Journal of Neurochemistry*. 70(1):268-275.
- Frías A.P., Vredenburg T.V., Familiar-López M., Longcore E.J., González-Bernal E., Santos-Barrera G., Zambrano L. and Parra-Olea G. 2008. Chytridiomycosis Survey in Wild and Captive Mexican Amphibians. *EcoHealth*. 5:18-26.
- Gaceta Oficial del Distrito Federal. Decreto por el cual se modifica el polígono del área natural protegida, con carácter de zona sujeta a conservación ecológica, la superficie denominada "Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco" ubicada en la Delegación Xochimilco del Distrito Federal. 4 de diciembre de 2006.
- Gardner T. 2001. Declining amphibian populations: a global phenomenon in conservation biology. *Animal Biodiversity and Conservation*. 24 (2):25-44.
- González V.E.E., Arana M.F. y Méndez G.T. 1997. Estudio preliminar sobre la concentración de metales pesados en charal, acocil y ajolote, principales especies endémicas comestibles de la zona lacustre de Xochimilco. En: Stephan-Otto E. Memorias del 2do Seminario Internacional de Investigadores de Xochimilco. 23-27. México. 2:335-341.
- González R.E.S. 2006. Evaluación in situ del efecto biológico de metales pesados en el ajolote *Ambystoma mexicanum*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 91 p.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3era Edición. Oxford University Press. 936 p.
- Hayes W.A. 2001. Principles and Methods of Toxicology. 4ta Edición. Editorial Taylor & Francis. E.U.A. 1887 p.
- Hodson E.M. 2004. Heavy metals-geochemical bogey men? *Environmental Pollution*. 129:341-343.
- Hopkins A.W., Mendonça M.T., Rowe L.C. and Congdon J.D. 1998. Elevated trace element concentrations in Southern Toads, *Bufo terrestris*, exposed to coal combustion waste. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 35:325-329.
- Hsu M.J., Selvaraj K., and Agoramoorthy G. 2006. Taiwan's industrial heavy metal pollution threatens terrestrial biota. *Environmental Pollution*. 143:327-334.
- ISQG. 2003. Interim Sediment Quality Guideline. Canadá.
- IUCN. 2004. The World Conservation Union. Anfibios en Dramático Declive, hasta 122 Extintos Desde 1980. 14 de octubre. E.U.A.
- Imlay J.A. 2008. Cellular defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annual Review of Biochemistry*. 77:755-776.

- Jamil K. 2001. Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment. Science Publishers INC. Universidad de Michigan, Estados Unidos de América. 204 p.
- Jimenez O.J., Rojas T., Del Amo R. y Gómez Pompa A. 1995. Conclusiones y recomendaciones del Taller. En: Rojas, T. Presente, pasado y futuro de las Chinampas. CIESAS y Patronato del Parque Ecológico de Xochimilco, A.C. México D.F. 19-43.
- Jimenez S.I., Ortiz D.R., Arco R.R. y Cabrera M.E. 1997. Evaluación química preliminar en los suelos chinamperos de Xochimilco y su posible repercusión en la contaminación de las hortalizas de la zona. Segundo seminario internacional de investigadores de Xochimilco. Universidad Autónoma Metropolitana. 176-185.
- Klaassen C.D., Liu J. and Choudhuri S. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 39:267-294.
- Kotz C.J., Treichel M.P. y Harman A.P. 2003. Química y reactividad química. 5ta Edición. International Thompson Editors. 64-72.
- Lam P.K.S. and Gray J.S. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*. 46:182-186.
- Lenz M., and Lens L.N.P. 2009. The essential toxin: The changing perception of selenium in environmental sciences. *Science of the total environment*. 407:3620-3633.
- Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S. and Stadtman E.R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 186:464-478.
- Losada H., Martínez H., Vieyra J., Pealing R., Zavala R., and Cortés J. 1998. Urban agricultura in the metropolitan zone of Mexico City: changes over time in urban, suburban and peri-urban areas. *Environment and Urbanization*. 10(2):37-54.
- Marigómez I., Soto M., Cajaraville P.M., Angulo E. and Giamberini L. 2002. Cellular and Subcellular Distribution of Metals in Molluscs. *Microscopy Research and Technique*. 56:358-392.
- Margoshes M. and Vallee B.L. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of American Chemical Society*. 79:1813-1814
- Martínez M., Torreblanca A., Del Ramo J., Pastor A. and Díaz-Mayans J. 1993. Cadmium induced Metallothionein in hepatopáncreas of *Procambarus clarkii*: Quantification by a silver-saturation method. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 105C(2):263-267
- Monserrat M.J., Martínez E.P., Geracitano A.L., Amado L.L., Martínez G.M.C., Lopes L.P.G., Soares C.I., Ferreria-C.M., Ventura L.J. and Bianchini A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*. 146:221-234.

- Mouchet F., Baudrimont M., Gonzalez P., Cuenot Y., Boudineaud J.P. y Boudou A. and Gauthier L. 2006. Genotoxic and stress inductive potential of cadmium in *Xenopus laevis* larvae. *Aquatic Toxicology*. 78(2):157-166
- Newman M.C. and Unger M.A. 2003. Fundamentals of Ecotoxicology. 2da Edición. Lewis Publishers. U.S.A. 450 p.
- NOM-059-ECOL. 2001. NORMA Oficial Mexicana de Protección ambiental- Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial. Segunda Sección. 2002.
- Ogino K. and Wang D-H. 2007. Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress: An approach to disease Prevention. *Acta Medica Okayama*. 61(4):181-189.
- Ortega C.A.J. 1999. El ajolote. *Elementos*. 36:55-57
- Palmiter D.R. 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(15):8428-8430.
- Panter K.E., Hartley W.L., James L.F., Mayland H.F., Stegelmeier B.L. and Kechele P.O. 1996. Comparative toxicity of selenium from seleno-DL-methionine, sodium selenate, and *Astragalus bisulcatus* in pigs. *Toxicological Sciences*. 32:217-223.
- Papadimitriou E.A. and Loumbourdis N.S. 2003. Copper kinetics and hepatic metallothionein levels in the frog *Rana ridibunda*, after exposure to CuCl_2 . *BioMetals*. 16:271-277.
- Parvez S. and Raisuddin S. 2005. Protein carbonyls : novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 20:112-117.
- Rainbow S.P. 2007. Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environment International*. 33:576-582.
- Ramírez G. Ma. I. 1990. Evaluación del Contenido mineral (Pb, Cr, Cd, Fe, Cu) del agua lodo y fauna (*Chirostoma jordani*) de la región lacustre de Xochimilco. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM, México D.F
- Robles-Mendoza C., García-Basilio C., Cram-Heydrich S., Hernández-Quroz M. and Vanegas-Pérez, C. 2009. Organophosphorus pesticides effect on early stages of the axolotl *Ambystoma mexicanum* (Amphibia: Caudata). *Chemosphere*. 74(5):703-710.
- Roesijadi G. 1992. Methallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 22:81-114.
- Rojas R. T. 1995. Presente, pasado y futuro de las chinampas. Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropología Social (CIESAS) y Patronato del Parque Ecológico de Xochimilco, A.C. México, D. F. p 85-91 .
- Sato M. and Bremner I. 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biology and Medicine*. 14:325-337.

- Scheuhammer A.M. and Cherian M.G. 1986. Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 82:417-425.
- Schlenk D. 1999. Necessity of Defining Biomarkers for Use in Ecological Risk Assessments. *Marine Pollution Bulletin*. 39 (1-12):48-53.
- Sever D.M., Licht E.L. and Bocart J.P. 1989 Male cloacal anatomy in a hybrid population of *Ambystoma* (Amphibia: Caudata). *Herpetologica*, 45(2):161-167.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. Physiological Society Symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Experimental Physiology*. 82:291-295.
- Smith C.S. 2000. Xolótl: god of monstrosities. *Clinical Genetics*. 57:176-177.
- Sreedevi P, Sivaramakrishna B., Suresh A. and Radhakrishnaiah K. 1992. Effect of nickel on some aspects of protein metabolism in the gill and kidney of the freshwater fish, *Cyprinus carpio L.* *Environmental Pollution*. 77:59-63.
- Stadtman E.R. 1993. Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions. *Annual Review of Biochemistry*. 62:797-821.
- Stohs S.J. and Bagchi D. 1995. Oxidative Mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*. 18(2):321-336.
- Strydom C., Robinson C., Pretorius E., Whitcutt J.M., Marx J. and Bornman M.S. 2006. The effect of selected metals on the central metabolic pathways in biology: A review. *Water Research Council*. 32(4):543-554.
- Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., Young B.E., Rodrigues A.S.L., Fischmann D.L. and Waller R.W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*. 306:1783-1786.
- Suzuki K.T. and Tanaka Y. 1983. Induction of metallothionein and effect on essential metals in cadmium-loaded frog *Xenopus laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 74C(2):311-317
- Suzuki T.K., Tanaka Y. and Kawamura R. 1983. Properties of metallothionein induced by zinc, copper and cadmium in the frog, *Xenopus laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 75C(1):33-37.
- Suzuki K.T. and Kawamura R. 1984. Metallothionein present or induced in the three species of frogs *Bombina orientales*, *Bufo bufo japonica* and *Hyla arborea japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 79(2):255-260.
- Thirumorthy N., Manisenthil K.K.T., Sundar A.S., Panayappan L. and Chatterjee M. 2007. Metallothionein: An overview. *World Journal of Gastroenterology*. 13(7):993-996
- Valko M., Morris H. and Cronin M.T.D. 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*. 12:1161-1208.

- Vasseur P. and Cossu-Leguille C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International*. 28:711–717.
- Vences M. and Köhler J. 2008. Global diversity of amphibians (Amphibia) in freshwater. *Hidrobiologia*. 595:569-580.
- Venturino A., Rosenbaum E., De Castro C.A., Anguiano O.L., Gauna L., De Schroeder F.T. and De D'angelo P.A.M. 2003. Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers*. 8 (3-4):167-186.
- Viarengo A.M. 1985. Biochemical effects of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*. 16:153-158.
- Vogiatzis A.K. and Loumbourdis N.S. 1997. Uptake, tissue distribution, and depuration of cadmium (Cd) in the frog *Rana ridibunda*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 59:770-776.
- Vogiatzis A.K. and Loumbourdis N.S. 1998. Cadmium accumulation in liver and kidneys and hepatic metallothionein and glutathione levels in *Rana ridibunda*, after exposure to CdCl₂. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 34:64-68.
- Voss S.R. and Shaffer H.B. 1997. Adaptive evolution via major gene effect: Paedomorphosis in the Mexican axolotl. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(25):14185-14189.
- Wake B.D. and Vredenburg T.V. 2008. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:11466-11473.
- Walker H.C., Hopkin P. S., Sibly M.R. and Paakall B.D. 1996. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis Publishers. Great Britain. p 3-6 y 175-181.
- Wang W-X and Rainbow S.P. 2010. Significance in metal accumulation kinetics in marine animals. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 152(C):1-8.
- Ward B.J. and Henderson E.R. 1996. Identification of Needs in Biomarker Research. *Environmental Health Perspectives*. 104(5):895-900.
- Whitten W.K., Gailey D.K. y Davis E.R. 1992. Trad. Ma. Teresa Aguilar Ortega. Química General. 2da Ed. Mc Graw Hill Interamericana. México. 1120 p.
- Xiong D.W., Fang T., Chen X.D., Sima X.F. and Zhu W. 2010. Oxidative stress effects and damage of nanoscale TiO₂ and ZnO on zebrafish. *Environmental Science*. 31(5):1320-1327.
- Zambrano L. 2004. Abundancia y estructura poblacional del axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistemas dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco. Informe final del Proyecto AS004. (en: <http://www.conabio.gob.mx>).
- Zambrano L., Valiente E. and Vander Z.M.J. 2010. Food web overlap among native axolotl (*Ambystoma mexicanum*) and two exotic fishes: carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Xochimilco, Mexico City. *Biological Invasions*. 12(9):3061-3069.

ANEXOS

Anexo 1

PRESOP Cuantificación de Metalotioneínas por el método de Saturación de Plata. Evaluación para Ajolote.

Anexo 2

PRESOP Método acoplado para la cuantificación de Proteínas Carboniladas (PC; por la reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina) y de Metalotioneínas (MT's). Evaluación para ajolote.

Anexo 3

Tablas comparativas de la concentración de metales, de Proteínas carboniladas (PC) y de Metalotioneínas (MTs) en diferentes especies de anfibios.

Anexo 4

Tablas de parámetros físico-químicos de agua y sedimento y concentraciones de metales analizados en estas matrices ambientales, en los sitios de estudio de los canales de Xochimilco (cortesía de González, 2006).

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO	pág.: 55/11
	Clave: Met 012	Fecha: 20.10.10
	Título: Cuantificación de metalotioneínas por el método de Saturación de Plata. Evaluación para Ajolote	Versión: 2, Revisión y Actualización

1. Propósito

Los sistemas acuáticos (i.e. marinos, lagunares-estuarinos y de agua dulce) son receptores de elevadas concentraciones de contaminantes de origen antropogénico, incluidos los metales. Es conocido que la salinidad del medio, el pH, la temperatura y los agentes quelantes, entre otros factores, modifican en la biota la incorporación, la bioacumulación y la toxicidad de los metales, tanto esenciales como sin función biológica conocida (Zúñiga, 2002; Rainbow, 1997; Saquid, 1992). La sensibilidad a los metales varía en los organismos marinos, estuarinos y de agua dulce, la cual obedece tanto a los niveles bioacumulados como a los mecanismos de compensación, de protección celular y/o de desintoxicación involucrados (Calow, 1994; Newman y Unger, 2003). El incremento en la concentración de los metales en los diferentes tejidos de los organismos acuáticos, puede relacionarse con la concentración y la especiación química de los metales en el medio externo (Callow, 1994; Newman y Unger, 2003), el tiempo de exposición (Zúñiga, 2002; Rainbow, 1997) y los mecanismos de desintoxicación de los organismos (Newman y Unger, 2003). Generalmente los crustáceos presentan una mayor sensibilidad que otros grupos como los peces o moluscos (Amiard *et al.*, 2006; Spicer y Weber, 1991; Viarengo, 1985); a la vez, se reporta que los organismos dulceacuícolas son más sensibles que especies marinas relacionadas (Callow, 1994) en tanto que los estadios tempranos o en etapa reproductiva se ubican como los más sensibles al efecto tóxico de los metales (Berzins and Bundy, 2002 y Khangarot *et al.*, 1987).

En el metabolismo de los metales, las metalotioneínas (MT's) desempeñan un papel relevante (Klaassen, *et al.* 1999; Roesijadi, 1992 y Viarengo, 1985). Las metalotioneínas son metaloproteínas de bajo peso molecular, no enzimáticas (Amiarad, *et al.*, 2006 y Dunderski, 2004) y ricas en cisteína. Si bien su papel fisiológico no ha sido bien establecido (Achard, *et al.*, 2007; Conrad, *et al.*, 2000), la conservación de esta proteína a través de la evolución en muchos *phyla* sugiere que desempeñan un papel importante en la función celular que incluye: a) la participación en el mantenimiento de la homeostasis de los metales traza esenciales, fundamentalmente Cu y Zn actuando como reservorios de éstos para ser donados a otras metaloproteínas; b) el secuestro de metales tóxicos sin función biológica conocida como el cadmio y el mercurio y el control del exceso de los metales esenciales y, c) la protección contra el daño por estrés oxidante intracelular ocasionado por compuestos orgánicos e inorgánicos o especies reactivas de oxígeno (Klaassen, *et al.* 1999; Roesijadi, 1992; Viarengo, 1985; Vogiatzis y Loumbardis, 1998). De tal manera, la evaluación de la inducción de metalotioneínas en tejidos animales puede ser utilizada como un marcador biológico de la exposición de los organismos en su medio a metales sin función biológica conocida o bien a concentraciones no naturales de metales esenciales.

En el metabolismo de los metales, las metalotioneínas (MT's) desempeñan un papel relevante (Klaassen, *et al.* 1999; Roesijadi, 1992 y Viarengo, 1985). Las metalotioneínas son metaloproteínas de bajo peso molecular, no enzimáticas (Amiarad, *et al.*, 2006 y Dunderski, 2004) y ricas en cisteína. Si bien su papel fisiológico no ha sido bien establecido

Autor: Rodríguez F., González S., Zuñiga S. y C. Vanegas	Firma:
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Zuñiga S. y Vanegas, C.	Versión original: 05.09.05

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO	pág.: 56/11
	Clave: Met 012	Fecha: 20.10.10
	Título: Cuantificación de metalotioneínas por el método de Saturación de Plata. Evaluación para Ajolote	Versión: 2, Revisión y Actualización

(Achard, *et al.*, 2007; Conrad, *et al.*, 2000), la conservación de esta proteína a través de la evolución en muchos *phyla* sugiere que desempeñan un papel importante en la función celular que incluye: a) la participación en el mantenimiento de la homeostasis de los metales traza esenciales, fundamentalmente Cu y Zn actuando como reservorios de éstos para ser donados a otras metaloproteínas; b) el secuestro de metales tóxicos sin función biológica conocida como el cadmio y el mercurio y el control del exceso de los metales esenciales y, c) la protección contra el daño por estrés oxidante intracelular ocasionado por compuestos orgánicos e inorgánicos o especies reactivas de oxígeno (Klaassen, *et al.* 1999; Roesijadi, 1992; Viarengo, 1985; Vogiatzis y Loubardis, 1998). De tal manera, la evaluación de la inducción de metalotioneínas en tejidos animales puede ser utilizada como un marcador biológico de la exposición de los organismos en su medio a metales sin función biológica conocida o bien a concentraciones no naturales de metales esenciales.

2. Principio

La propiedad de las metalotioneínas de movilizar el Zn como metal esencial de un tejido a otro es ampliamente conocido (Martín y Rainbow, 1998; Roesijadi, 1992). En las metalotioneínas, los metales se organizan en dos dominios: el dominio α que se extiende del aminoácido 31 al 61, posee la capacidad de unir tres iones divalentes (como el Zn^{2+}), y el dominio β que se extiende desde el aminoácido 1 al 30 y puede unir cuatro iones divalentes. En el caso de los iones univalentes de metales (i.e. Cd^{1+} , Ag^{1+}), las metalotioneínas tienen la capacidad de unir 12 metales iónicos (Petrlova *et al.*, 2006). La metalotioneína se encuentra usualmente saturada con Zn^{2+} , el cual puede ser desplazado por otro metal con mayor afinidad como cadmio, plata y/o mercurio. A su vez, esta MT puede donar el Zn a una proteína aceptora en cualquier tejido u órgano (reacción 1) para las diversas funciones celulares requeridas (Jacob *et al.* 1998).




Esto es posible dada la baja constante de estabilidad del Zn con la Tioneína (T; $3.2 \times 10^{13} M^{-1}$ a pH 7.4), lo cual determina un flujo unidireccional del Zn a la Tioneína–Metalotioneína y al acepto (Jacob *et al.*, 1998). Sin embargo, esta constante de afinidad se ve modificada de acuerdo al metal que se una a la Tioneína. Esta diferencia en la afinidad de los metales es conocida desde finales del siglo pasado (Scheuhammer y Cherian, 1986; Jacob *et al.* 1998; Amiard *et al.* 2006) y se ha propuesto la siguiente escala jerárquica en afinidad:



Dado que la plata es el metal sin función biológica conocida con mayor constante de afinidad (mayor a $K_{Ag} = 3.55 \times 10^{19} M^{-1}$ a pH 7.4) puede evaluarse la inducción de Metalotioneínas por metales como Hg y Cd o por la presencia de elevados niveles de Cu y

Autor: Rodríguez F., González S., Zuñiga S. y C. Vanegas	Firma:
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Zuñiga S. y Vanegas, C.	Versión original: 05.09.05

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO	pág.: 57/11
	Clave: Met 012	Fecha: 20.10.10
	Título: Cuantificación de metalotioneínas por el método de Saturación de Plata. Evaluación para Ajolote	Versión: 2, Revisión y Actualización

Zn entre otros, o bien su inducción por algunos compuestos orgánicos. Dada la mayor afinidad de la plata a la Metalotioneína, este metal puede desplazar fácilmente otros metales enlazados a la MT; de tal manera, la concentración de plata fijada por la proteína permite cuantificar la cantidad de Metalotioneína presente (o en su caso inducida) en un determinado tejido (Scheuhammer y Cheiran, 1986).

3. PRESOP' s relacionados

- Disección de tejidos de organismos acuáticos (PRESOP Met 009, 2007; UNAAMB).
- Preparación de hemolizado de rata (PRESOP Met 010, 2007; UNAAMB).
- Cuantificación de Proteínas Solubles Totales por el método de Bradford (PRESOP Met 011, 2007; UNAAMB).

4. Materiales y reactivos empleados

En este PRESOP, se consideran los consumibles requeridos para evaluar MT's en tres muestras de tejido (por duplicado) de aproximadamente 0.3 g PH c/u, dos blancos y la curva de MT con 5 puntos (ver Anexo 1.A). Para el análisis de un número mayor de muestras, se sugiere efectuar los ajustes respectivos.

4.1. Equipo empleado

Se sugieren equipos específicos.

- Vortex
- Micropipetas y micropipetas múltiples (10, 50, 200 y 1000 µl)
- Puntas para micropipeta (10, 50, 200 y 1000 µl)
- 50 Tubos eppendorf de 2 ml
- Microcentrífuga (20 000 g; Eppendorf - 5415)
- Microcentrífuga con refrigeración (Eppendorf – 5417C)
- Baño María a 100°C (BOEKEL - GRANT). Se puede utilizar un serpentín de inmersión para aumentar la temperatura siempre y cuando se regule la máxima temperatura requerida.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Espectro de Absorción Atómica (EAA; Perkin Elmer – Aanalyst 800)

4.2. Reactivos

Se sugieren proveedores específicos.

- EDTA anhidro (Sigma 41K0285)
- Glicina (Sigma G7126)

Autor: Rodríguez F., González S., Zuñiga S. y C. Vanegas	Firma:
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Zuñiga S. y Vanegas, C.	Versión original: 05.09.05

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO	pág.: 58/11
	Clave: Met 012	Fecha: 20.10.10
	Título: Cuantificación de metalotioneínas por el método de Saturación de Plata. Evaluación para Ajolote	Versión: 2, Revisión y Actualización

- Solución estándar de plata 1 mg Ag/ml en 1% HNO₃ (Sigma S7259)
- Ácido nítrico grado analítico (Fermont 531553)
- Estándar de Metalotioneína de hígado de conejo (Sigma M5267)

5. Preparación de soluciones

- 5.1.** Solución de homogenado. Disolver en 10 ml de agua desionizada 2.1393 g de sacarosa y aforar a 25 ml. Almacenar en botella ámbar y en refrigeración. Esta solución es estable por un mes.
- 5.2.** Glicina 0.5 M a pH 8.5. Disolver 18.7675 g en 50 ml de agua desionizada, aforar a 250 ml. Almacenar en botella ámbar y mantener en refrigeración. Esta solución es estable por varios meses.
- 5.3.** Solución de plata 20 µg/ml en agua desionizada o milliQ. Tomar 5 ml del frasco original (“ampolleta”) del estándar de plata y colocarlo en un frasco plástico perfectamente lavado con ácido nítrico al 10%; este volumen del estándar será el utilizado para el procedimiento y así evitar la contaminación del estándar original. En un matraz de aforo de 10 ml colocar 5 ml de agua desionizada o milliQ; adicionar 200 µl del estándar de plata y aforar con agua desionizada o milliQ. Pasar la solución a un frasco de plástico, preferentemente ámbar o envuelto en papel aluminio y lavado con ácido nítrico al 10%. Mantener en refrigeración. La solución permanece estable por una semana, por lo que es recomendable prepararla constantemente.¹
- 5.4.** Hemolizado de rata. Para el análisis de MT's de tres muestras de tejido con su réplica, dos estándares y dos blancos, se requieren 6 ml de hemolizado de rata (ver PRESOP Met 010, 2007; UNAAMB).
- 5.5.** Curva estándar de Metalotioneínas (ver Anexo 1.A).
- 5.6.** Curva estándar de Ag (ver Anexo 1.B). Cuantificación del metal en EAA por flama.


6. Evaluación de Metalotioneínas en tejido

- 6.1.** Colocar individualmente los tejidos disectados (aprox. 0.3 g PH) en los tubos de homogenización (ej. tubo de microcentrífuga de 2 ml). Adicionar la solución fría de sacarosa 0.25 M (solución de homogenado) en una relación de 4 ml: 1 g PH tejido y homogenizar a 22 000 rpm por 3 min a 4° C² con un homogenizador de cuchilla (Polytron PT1200) o de pistilo de teflón, manteniendo la muestra siempre en hielo. Centrifugar el homogenado a 20000 g (14 000 rpm; Eppendorf

¹ Esta solución de plata será empleada para saturar los sitios de unión de metal-MT de las muestras en análisis.

² Es importante tener cuidado de no hacer “burbujas” al homogenizar las muestras ya que éste se puede tornar de color oscuro debido a la oxidación del tejido.

Autor: Rodríguez F., González S., Zuñiga S. y C. Vanegas	Firma:
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Zuñiga S. y Vanegas, C.	Versión original: 05.09.05

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO	pág.: 59/11
	Clave: Met 012	Fecha: 20.10.10
	Título: Cuantificación de metalotioneínas por el método de Saturación de Plata. Evaluación para Ajolote	Versión: 2, Revisión y Actualización

5417C) durante 20 min a 4°C. (Martínez *et al.*, 1993; Scheuhammer y Cherian, 1986).

- 6.2. Separar la fracción sobrenadante en un tubo de eppendorf.
- 6.3. Separar en otro tubo eppendorf 20 µl del sobrenadante y agregar 200 µl de agua desionizada para evaluar la concentración de las Proteínas Solubles Totales (PST) por el método de Bradford (1976) (PRESOP Met 011, 2007; UNAAMB). De manera ideal es aconsejable que todas las muestras homogenadas de los tejidos contengan una concentración similar de PST⁴.
- 6.4. Colocar por duplicado alícuotas de 375 µL³ del sobrenadante en tubos eppendorf de 2 ml. Adicionar 825 µl de buffer de glicina para tener un volumen final de 1200 µl.
- 6.5. Para los estándares de la curva de MT's (Ver Anexo 1.A), proceder de manera similar. Colocar por duplicado alícuotas de 375 µl del estándar de MT's en tubos de eppendorf y adicionar 825 µl de buffer de glicina para un volumen final de 1200 µl.
- 6.6. En el caso de los blancos se recomienda evaluar un blanco reactivo (sin hemolizado de rata), un blanco hemolizado (con hemolizado de rata) y un blanco de método (sin Ag) (Tabla 1).
- 6.7. Agitar las muestras/soluciones en Vortex.
- 6.8. Adicionar 500 µl de solución de plata (20 µg/mL) para un volumen final de 2300 µl. Agitar en Vortex.
- 6.9. Incubar en oscuridad a 20 °C por 15 min (ideal), con el fin de desplazar el metal "original" por la plata de los sitios de unión de las metalotioneínas. De manera alternativa, incubar a temperatura ambiente y en oscuridad por 10 min.
- 6.10. Adicionar 600 µl de hemolizado de sangre de rata para remover el exceso de plata. Agitar en Vortex de 1 a 2 min. (Ver resumen de adiciones en Tabla 1).
- 6.11. Colocar los microtubos con la muestra (y/o solución) tratada en baño María a 100 °C por 1.5 a 2 min (se observa la precipitación de las proteínas). Este tratamiento de calor precipita la plata unida a la hemoglobina del hemolizado y otras proteínas, excepto las metalotioneínas que son estables al calor.
- 6.12. Centrifugar⁴ los microtubos a 12000 g (11 000 rpm; Eppendorf 5415 C) por 5 min a temperatura ambiente para remover la hemoglobina y las proteínas desnaturalizadas.
- 6.13. Separar cada sobrenadante en otro microtubo de 2 ml.
- 6.14. Colocar las muestras en el baño María a 100°C por 1.5 a 2 min sin agregar hemolizado (con el fin de desnaturalizar las proteínas, excepto las metalotioneínas, que hayan quedado en la muestra).

Tabla 1. Volumen de soluciones adicionadas para la evaluación de MT's en las muestras de tejido, en los blancos y en el estándar de MT's.

³ Ajustar la concentración de proteína soluble total del homogenado a una concentración de 9 mg/ml.

⁴ Se requiere utilizar una microcentrífuga que no tenga refrigeración, para centrifugar a temperatura ambiente.

Autor: Rodríguez F., González S., Zuñiga S. y C. Vanegas	Firma:
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Zuñiga S. y Vanegas, C.	Versión original: 05.09.05

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO	
	Clave: Met 012	
	Título: Cuantificación de metalotioneínas por el método de Saturación de Plata. Evaluación para Ajolote	
		pág.: 60/11
		Fecha: 20.10.10
		Versión: 2, Revisión y Actualización

Solución	Blanco Reactivo μL	Blanco Hemolizado μL	Blanco Método μL	Muestra y/o Estándares MT's μL
Homogenado sin Tejido	375	375	375	0
Homogenado Tejido u Homogenado estandar MT's	0	0	0	375
Glicina	825	825	825	825
Solución de Ag (20 μg/ml)	500	500	500 (Agua MilliQ)	500
Hemolizado	0	600	0	600

- 6.15.** Centrifugar el sobrenadante final a 15 000 g (12 000 rpm; Eppendorf 5415 C) por 5 min.
- 6.16.** Repetir el procedimiento calor-centrifugación dos veces más (pasos 14 y 15).
- 6.17.** Separar el sobrenadante y desechar la pastilla.
- 6.18.** De una misma muestra/tejido, tomar una pequeña muestra ($\pm 50 \mu\text{l}$) del sobrenadante final para evaluar la concentración final de proteínas solubles totales (se espera una concentración final de 0 mg/l) (Bradford,1976; PRESOP Met 011, 2007; UNAAMB); el resto congelarlo a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ para el análisis posterior de la concentración de plata en el Espectro de Absorción Atómica (Ver Anexo 1.B).

Nota: Acorde al presente método, la cantidad de plata en la fracción del sobrenadante final es proporcional a la cantidad de MT's presente.

7. Cálculos

La concentración de Metalotioneínas de las muestras se determinará a partir de la interpolación de los valores obtenidos de la concentración de Ag ($\mu\text{g/l}$) en una curva patrón construida a partir de concentraciones conocidas de Metalotioneínas (mg/l ; estándares MT's) vs su correspondiente concentración de Ag ($\mu\text{g/l}$) (Ver Anexo 1.B).

7.1. Se requiere construir dos curvas estándar (de MT's y Ag) para determinar la concentración de MT's en las muestras en análisis.

7.1.1. Curva de Ag. Se construye a partir de soluciones estándar de concentraciones conocidas de Ag (Anexo B) y su lectura (nm) en el EAA.

7.1.2. Curva de MT's vs Ag. Se construye a partir de concentraciones conocidas de MT's (soluciones estandar de MT's) y la cuantificación respectiva de las concentraciones de Ag (Anexo A).

Autor: Rodríguez F., González S., Zuñiga S. y C. Vanegas	Firma:
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Zuñiga S. y Vanegas, C.	Versión original: 05.09.05

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO	pág.: 61/11
	Clave: Met 012	Fecha: 20.10.10
	Título: Cuantificación de metalotioneínas por el método de Saturación de Plata. Evaluación para Ajolote	Versión: 2, Revisión y Actualización

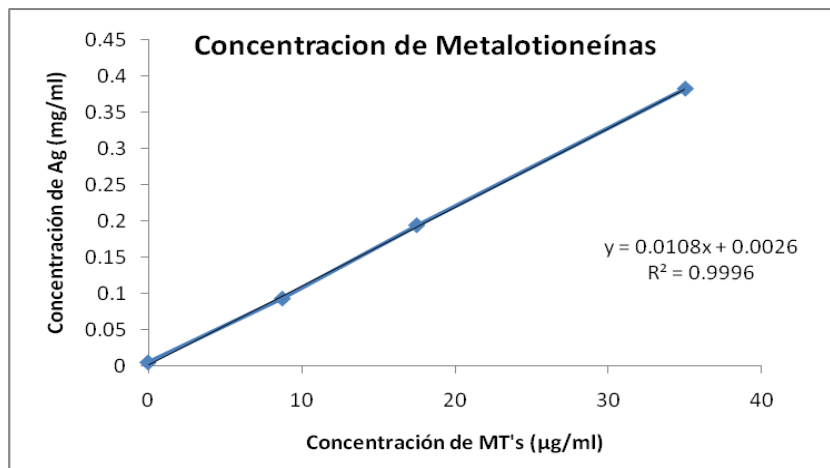


Fig. 1. Curva patrón de Metalotioneínas ($\mu\text{g MT's/ml}$ vs mg Ag/ml) (Anexo A).

La concentración de Metalotioneínas de cada muestra problema se obtiene a partir de la siguiente ecuación (Curva de MT's vs Ag):

$$[\text{Ag}] = m (\text{MT's}) + b$$

donde:

[Ag] = Concentración de plata, mg Ag/ml

m = pendiente de la curva de MT's vs Ag

b = ordenada al origen de la curva MT's vs Ag

A partir de la ecuación anterior:

$$\text{MT's} = \frac{([\text{Ag}] - b)/m}{W} * D$$

donde:

[Ag] = Concentración de plata, mg Ag/ml

m = pendiente de la curva MT's vs Ag


b = ordenada al origen de la curva MT's vs Ag

D = dilución realizada para leer la concentración de Ag en el EAA (1:10)

W = Peso del tejido analizado, mg PH

La concentración de MT's se expresa en $\mu\text{g MT's/g PH}$ de tejido (Onosaka y Cheiran, 1981; 1982; Martínez *et al.*, 1993).

Autor: Rodríguez F., González S., Zuñiga S. y C. Vanegas	Firma:
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Zuñiga S. y Vanegas, C.	Versión original: 05.09.05

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO	pág.: 62/11
	Clave: Met 012	Fecha: 20.10.10
	Título: Cuantificación de metalotioneínas por el método de Saturación de Plata. Evaluación para Ajolote	Versión: 2, Revisión y Actualización

8. Referencias

- Achard J.M., Moreau L.J., Megumi L., Baudrimont M., Mesmer D.N., Gonzalez P., Boudou A. y Bourdineaud J. P. 2007. Role of metallothioneins in superoxide radical generation during copper redox cycling: Defining the fundamental function of metallothioneins. *Biochimie*. 89:1474-1488.
- Amiard J.C., Amiard-Triquet, Barka S., Pellerin J. and Rainbow P.S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*. 76: 160-202.
- Berzins D.W. and Bundy K.J. 2002. Bioaccumulation of lead in *Xenopus laevis* tadpoles from water. *Environmental International*. 28: 69-77.
- Bradford M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Calow P. 1994. Handbook of Ecotoxicology. Blackwell Science University of Sheffield. Oxford U.S.A. 885 pp.
- Conrad C.C., Grabowski T.D., Walter A.C., Sabia M. and Richardson A. 2000. Using MT^{-/-} mice to study Metallothionein and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 28(3):447-462.
- Dunderski J. 2004. Cellular stress response-defense against metal toxicity. *Yugoslavian Medical Biochemistry*. 23 (1): 1-6.
- Jacob C., Maret W. and Vallee B.L. 1998. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein and zinc proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 3489-3494.
- Khangarot B.S. and Ray P.K. 1987. Sensitive of tadpoles *Bufo melanostictus* (Schneider), to heavy metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 38: 523 – 533.
- Klaassen C.D., Liu J. and Chaudhuri S. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39: 267-294.
- Martínez M., Torreblanca A., Del Ramo J., Pastor A. y Díaz-Mayans J. 1993. Cadmium induced Metallothionein in hepatopáncreas of *Procambarus clarkii*: Quantification by a silver-saturation method. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 105C (2):263-267
- Newman M.C. and Unger M.A. 2003. Fundamentals of Ecotoxicology. 2nd Edition. Lewis Publishers. U.S.A. 458 p.
- Onosaka S. and Cherian G. 1981. The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rat in response to metals.I. Effect of repeated injection of cadmium salts. *Toxicology*. 22 : 91-101.
- Onosaka S. and Cherian G. 1982. Comparison of metallothionein Determination by Polarographic and cadmium-saturation methods. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 63 : 270-274.

Autor: Rodríguez F., González S., Zuñiga S. y C. Vanegas	Firma:
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Zuñiga S. y Vanegas, C.	Versión original: 05.09.05

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO	pág.: 63/11
	Clave: Met 012	Fecha: 20.10.10
	Título: Cuantificación de metalotioneínas por el método de Saturación de Plata. Evaluación para Ajolote	Versión: 2, Revisión y Actualización

- Petřlová J., Potěšil D., Milkelová R., Blašřtik O., Adam V., Trnková L., Jelen F., Průša R., Kukačka J. and Kizek R. 2006. Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochimica Acta* 51: 5112-5119.
- Rainbow P.S. 1997. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 44: 169-175.
- Roesijadi G. 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 22: 81-114.
- Saquid M. (Edit). 1992. Toxic Metal Chemistry in Marine Environments. Marcel Dekker, Inc. N.Y. 369 p.
- Scheuhammer A.M. and Cherian M.G.. 1986. Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 82: 417-425.
- Spicer J.I. and Weber R.E. 1991. Respiratory impairment in crustaceans and molluscs due to exposure to heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 100 C (3): 339-342.
- Viarengo A. M. 1985. Biochemical effects of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*. 16: 153-158.
- Vogiatzis A. K. and N. S. Loumbardis. 1998. Cadmium accumulation in liver and kidneys and hepatic metallothionein and glutathione levels in *Rana ridibunda*, after exposure to CdCl₂. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 34: 64-68.
- Zúñiga L. S. 2002. Efecto del cadmio en la osmorregulación de juveniles de *Litopenaeus setiferus* (Crustacea: Decapoda). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., México. 114 p.

Autor: Rodríguez F., González S., Zuñiga S. y C. Vanegas	Firma:
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Zuñiga S. y Vanegas, C.	Versión original: 05.09.05

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO	pág.: 64/11
	Clave: Met 012	Fecha: 20.10.10
	Título: Cuantificación de metalotioneínas por el método de Saturación de Plata. Evaluación para Ajolote	Versión: 2, Revisión y Actualización

ANEXO 1.A Curva Patrón de Metalotioneínas

1. Solución madre de MT's (Estándar de MT's de hígado de conejo; 1 mg; Sigma M5267).

Agregar 1 ml de agua desionizada o milliQ al estándar de MT's y agitar suavemente para su disolución. De manera ideal, distribuir el volumen de la solución de 1 mg MT's/ml en 10 tubos eppendorf (100 µl por tubo); utilizar uno de ellos para continuar con el procedimiento y resguardar los demás en congelación para futuros análisis.

2. Curva patrón de Metalotioneínas⁵.

A partir de la solución madre de 1 mg MT's/ml, preparar las soluciones hijas para construir la curva patrón de metalotioneínas, en un intervalo de 5 a 40 µl MT's/l (Martínez *et. al.*, 1993). Para cada concentración preparar inicialmente un volumen mínimo de 375 µl adicionando el volumen de la solución de homogenado de acuerdo a la Tabla 1. El cálculo de las concentraciones iniciales de las soluciones hijas deben de considerar un volumen final de 1200 µl (ver 6.1. y 6.5) para la construcción de la curva patrón de Metalotioneínas.

Tabla 1. Soluciones hijas de MT's para la construcción de la curva patrón de MTs.

Solución	Adición de volúmenes, µl			
Solución hija MT's (1 mg/ml)	0	21	21	42
Solución de homogenado	375	729	354	333
Glicina (ver 6.6)	825	825	825	825
Volumen final	1200	1200	1200	1200
Concentración final Mt's (mg/ml)	0	8.75	17.5	35

⁵ Debido a que las soluciones para la curva patrón serán sometidas al mismo proceso de análisis y cálculos que las muestras experimentales de tejidos y blancos, es necesario tomar en cuenta que la dilución se llevará a cabo con solución de homogenado.

Autor: Rodríguez F., González S., Zuñiga S. y C. Vanegas	Firma:
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Zuñiga S. y Vanegas, C.	Versión original: 05.09.05

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO	pág.: 65/11
	Clave: Met 012	Fecha: 20.10.10
	Título: Cuantificación de metalotioneínas por el método de Saturación de Plata. Evaluación para Ajolote	Versión: 2, Revisión y Actualización

Anexo 1.B Curva de Calibración de Ag

La concentración de Ag en los estándares de metalotioneínas y en los blancos reactivos, se determina en el Espectro de Absorción Atómica (EAA) por el método de **flama**. Para ajustar la flama del equipo realizar el “Check List” de Ag con una solución estándar de 4 mg Ag/L, cuya lectura óptima de absorbancia en el EAA es de 0.25.

1. Soluciones Estándar de Ag.

1.1. Solución de 10 mg Ag/l.

En un matraz aforado de 25 ml adicionar 250 μ l del estándar de plata (1 mg Ag/ml en 1% HNO₃; Sigma S7259) y aforar con agua desionizada.

1.2. Solución de 4.0 mg Ag/l

En un matraz de 25 ml, adicionar 10 ml de la solución madre de 10 mg Ag/l y aforar con agua desionizada.

2. Curva Patrón de Ag.

2.1. Lectura en el EAA por flama.

La curva patrón de Ag se establecerá en un intervalo de **0 a 5 mg Ag/L** acorde a la sensibilidad del EEA para su lectura en **flama**⁶. Preparar una solución estándar para la curva de calibración de 10 mg Ag/l.

2.2. Solución estándar para la curva de calibración de 10 mg Ag/l.

En un matraz aforado de 25 ml, adicionar 250 μ l del estándar de plata (1 mg Ag/ml en 1% HNO₃; Sigma S7259) y aforar con solución de glicina 0.5 M pH 8.5. Preparar las siguientes diluciones.

2.2.1. 1.0 mg Ag/l. En un matraz de 25 ml, adicionar 2.5 ml de la solución estándar de 10 mg Ag/l y aforar con la solución de glicina 0.5 M pH 8.5.

2.2.2. 2.0 mg Ag/l. En un matraz de 25 ml, adicionar 5 ml de la solución estándar de 10 mg Ag/l y aforar con la solución de glicina 0.5 M pH 8.5.


2.2.3. 3.0 mg Ag/l. En un matraz de 25 ml, adicionar 7.5 ml de la solución estándar de 10 mg Ag/l y aforar con la solución de glicina 0.5 M pH 8.5.

2.1.4. 4.0 mg Ag/l. En un matraz de 25 ml, adicionar 10 ml de la solución estándar de 10 mg Ag/l y aforar con la solución de glicina 0.5 M pH 8.5.

2.1.5. 5.0 mg Ag/l. En un matraz de 25 ml, adicionar 12.5 ml de la solución estándar de 10 mg Ag/l y aforar con la solución de glicina 0.5 M pH 8.5.

⁶ Estas soluciones serán utilizadas para preparar la curva patrón de plata, a partir de la cual se extrapolarán las concentraciones del metal de las muestras experimentales para calcular los respectivos niveles de MTs.

Autor: Rodríguez F., González S., Zuñiga S. y C. Vanegas	Firma:
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Zuñiga S. y Vanegas, C.	Versión original: 05.09.05

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS	Pág. 66-86
	Clave: Met 022	Fecha: 20.10.10
	Título: Método acoplado para la cuantificación de Proteínas Carboniladas (PC; por la reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina) y de Metalotioneínas (MT's). Evaluación para ajolote.	Versión: 2 Revisión y Actualización

1. Propósito


En los organismos aerobios las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) son sintetizadas continuamente producto de las reacciones del metabolismo celular y están involucradas en la regulación de diversos procesos fisiológicos (Drögue 2002; Newman y Unger, 2003; Jung *et al.*, 2007; Colak, 2008). Entre estos radicales libres los más importantes son los derivados del oxígeno (Miller *et al.*, 1990). En condiciones normales, los radicales libres⁷ y sustancias oxidantes son formados en bajas concentraciones; sin embargo, debido a su reactividad pueden reaccionar con los distintos componentes celulares y ocasionar alteraciones, donde las proteínas son las biomoléculas más susceptibles a experimentar mayor daño (Jung *et al.*, 2007). Debido a la producción inherente de oxidantes y radicales libres durante el metabolismo aerobio, diversos mecanismos de defensa y/o protección celular han evolucionado incluyendo la producción de agentes antioxidantes no enzimáticos (i.e. Vitamina E, Vitamina C, β -caroteno, catecolaminas, glutatión, ácido úrico y otras moléculas de bajo peso molecular) así como la síntesis de enzimas como la Superóxido dismutasa (SOD), la Catalasa (CAT) y la Glutathion (GSH) peroxidasa (Jung *et al.*, 2007; Newman y Unger, 2003).

Los xenobióticos, pueden ocasionar daño oxidante en los organismos de dos maneras: 1) De manera directa al participar en reacciones que dan como resultado la generación de radicales libres; 2) De manera indirecta al interferir con los mecanismos de defensa al estrés oxidante. Debido a que los contaminantes ambientales pueden interferir con los mecanismos normales de los organismos para hacer frente al estrés oxidante, numerosos estudios se han enfocado a relacionar ciertos contaminantes con los cambios celulares en los niveles de las ROS (Newman y Unger, 2003; Parvez y Raisuddin, 2005).

Aunque los biomarcadores de estrés oxidante no son específicos del efecto de un estresor particular, se consideran indicadores importantes del efecto biológico adverso de los contaminantes (Van Der Oost *et al.*, 1994; Cossu *et al.*, 1997; Yang y Randall, 1997). De manera general, estos biomarcadores son indicadores del daño por especies reactivas de oxígeno (ROS) en carbohidratos, lípidos y proteínas (Miyata *et al.*, 1993). Durante el estrés oxidante, las proteínas son susceptibles de ser modificadas químicamente en sus aminoácidos ocasionando la adición de grupos carbonilo, por lo cual se ha sugerido a las proteínas carboniladas como un biomarcador general integral de estrés oxidante (Parvez y Raisuddin, 2005; Reznick *et al.*, 1992). Una de las técnicas para la cuantificación de proteínas carboniladas es el método por medio de la reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina método que permite la detección y cuantificación de las modificaciones en las proteínas ocasionadas por el estrés oxidante (Parvez y Raisuddin, 2005).

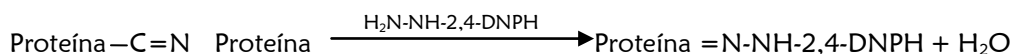
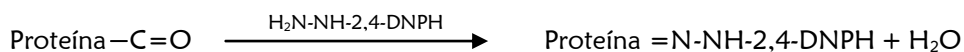
⁷ Los radicales libres pueden ser definidos como moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital atómico o molecular (Halliwell y Gurreridge, 1999).

Autor: Rodríguez E. F. y C. Vanegas	Versión original: 20.10.09
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Vanegas, C.	Firma:

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS	Pág. 67-86
	Clave: Met 022	Fecha: 20.10.10
	Título: Método acoplado para la cuantificación de Proteínas Carboniladas (PC; por la reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina) y de Metalotioneínas (MT's). Evaluación para ajolote.	Versión: 2 Revisión y Actualización

2. Principio

Cuando las proteínas reaccionan con algún oxidante, sus aminoácidos son modificados de manera tal que si una cadena polipeptídica de una proteína contiene aminoácidos oxidados, éstos pueden ser detectados (Stadtman, 1993). La introducción de grupos carbonilo en los residuos de aminoácidos de las proteínas es un sello distintivo de modificación por oxidación. La reacción de estos grupos con agentes que reaccionan específicamente con grupos carbonilos provee de técnicas para su detección y hace posible cuantificar el estrés oxidante (Levine *et al.*, 1990). Una de las técnicas más comunes para cuantificar la oxidación de las proteínas es la detección de proteínas carboniladas por medio de la reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), en donde los grupos carbonilo formados durante la oxidación de la proteína son removidos por la 2,4-Dinitrofenilhidrazina, como se muestra en la siguiente reacción:



La dinitrofenilhidrazina derivada de la unión con el grupo carbonilo puede ser detectada por espectrofotometría, donde la máxima absorbancia se encuentra en un intervalo de 360 a 390 nm (Johnson, 1953).

En el presente Procedimiento Estandarizado de Operación (PRESOP Met 019, 2010; UNAAMB) se presenta la determinación del contenido de proteínas carboniladas en muestras biológicas de acuerdo al método de Levine *et al.* (1990) con modificaciones de Floor y Wetzel (1998). El PRESOP se estandarizó particularmente para tejido hepático del ajolote *Ambystoma mexicanum*.

3. PRESOP's relacionados


- Disección de tejidos de organismos acuáticos (PRESOP Met 009, 2007; UNAAMB).
- Determinación de Metalotioneínas en muestras biológicas por el método de saturación de plata (PRESOP Met 012, 2007; UNAAMB).
- Cuantificación de Proteínas Solubles en muestras biológicas por el método de Bradford (PRESOP Met 011, 2007; UNAAMB).

4. Material, equipo y reactivos empleados

4.1. Equipo y material empleado

En su caso, se sugieren equipos específicos.

Autor: Rodríguez E. F. y C. Vanegas	Versión original: 20.10.09
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Vanegas, C.	Firma:

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS	Pág. 68-86
	Clave: Met 022	Fecha: 20.10.10
	Título: Método acoplado para la cuantificación de Proteínas Carboniladas (PC; por la reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina) y de Metalotioneínas (MT's). Evaluación para ajolote.	Versión: 2 Revisión y Actualización

- Vortex
- Homogenizador de cuchilla (Polytron PT1200)
- Micropipetas de 20, 50, 100, 500 y 1000 µl
- Puntas para micropipeta (20, 200, 500 y 1000 µl)
- Microcentrífuga (5415 C)
- Microcentrífuga con refrigeración (Eppendorf 5417 R)
- Lector de Microplaca (Bio Rad 550 o xMark)
- Microplacas de 8 x 12 de fondo curvo
- Espectrofotómetro (Genesys 10 VIS)
- Microceldas de 1.5 ml para lectura en espectrofotómetro

4. 2. Reactivos


Se sugieren proveedores específicos.

- Sacarosa (Merck- 7651)
- Na₂HPO₄ (Sigma Aldrich S9763)
- KH₂PO₄ (Sigma Aldrich P5379)
- KCl (Sigma Aldrich P4504)
- Sales HEPES (Sigma Aldrich H3375)
- Estreptomicina sulfato (Fluka 85884)
- Ácido clorhídrico (Fermont 01245)
- 2,4- Dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Sigma Aldrich D199303)
- Ácido tricloroacético (Sigma Aldrich 116114)
- Etanol (Fermont 06065)
- Acetato de etilo (J. T. Baker 9280-03)
- Ácido fórmico (Sigma Aldrich F0507)
- Guanidina clorhidrato (Sigma Aldrich G4505)

5. Preparación de soluciones

- 5.1.** Solución fría de sacarosa 0.25 M (para homogenización de tejidos). Disolver en 10 ml de agua desionizada 2.1393 g de sacarosa y aforar a 25 ml. Almacenar en botella ámbar y en refrigeración. Esta solución es estable por un mes.
- 5.2.** Buffer de fosfatos 100 mM con KCl al 1.17%, pH 7.4 (para homogenización de tejidos). Acople de métodos de PC y MT's. Disolver 3.792 g de Na₂HPO₄ en 50 ml de agua desionizada; colocar la solución en un matraz de aforo de 250 ml. Disolver 0.9 g de KH₂PO₄ en 50 ml de agua desionizada y colocarla en el matraz de 250 ml. Disolver 2.925 g de KCl en 100 ml de agua desionizada, verterla en el matraz de 250 ml y aforar a 250 ml con agua desionizada (la proporción final aproximada es de 80% Na₂HPO₄ y 20% KH₂PO₄). Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 3 N. Almacenar en una botella de


Autor: Rodríguez E. F. y C. Vanegas	Versión original: 20.10.09
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Vanegas, C.	Firma:

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS	Pág. 69-86
	Clave: Met 022	Fecha: 20.10.10
	Título: Método acoplado para la cuantificación de Proteínas Carboniladas (PC; por la reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina) y de Metalotioneínas (MT's). Evaluación para ajolote.	Versión: 2 Revisión y Actualización

vidrio transparente. Esta solución es estable por varios meses (revisar el pH antes de su uso).

- 5.3.** Solución HEPES 50 mM. Disolver 0.2978 g de sales HEPES en 10 ml de agua desionizada y aforar a 25 ml. Almacenar en una botella de vidrio transparente.
- 5.4.** Solución de Estreptomicina sulfato al 10% en HEPES 50 mM (pH 7.2). Pesar 2.5 g de estreptomicina sulfato, diluir en 10 ml de solución de sales HEPES 50 mM y aforar a 25 ml. Ajustar el pH a 7.2 con HNO₃ 1 N. Almacenar en frasco de plástico ámbar.
- 5.5.** HNO₃ 1N. Agregar a 10 ml de agua desionizada 1.5175 ml de HNO₃ y aforar a 25 ml. Almacenar en una botella de vidrio ámbar. Esta solución es estable por varios meses.
- 5.6.** HCl 2M. A 30 ml de agua desionizada adicionar 8.256 ml de HCl y aforar a 50 ml. Almacenar en una botella de vidrio transparente. Esta solución es estable por varios meses.
- 5.7.** Solución de 2,4- Dinitrofenilhidrazina (DNPH) en HCl 2M. Disolver 0.0347g en 5 ml de HCl 2 M y aforar a 10 ml. Almacenar en una botella de vidrio ámbar.
- 5.8.** Ácido tricloroacético al 18%. Disolver 4.5 g de ácido tricloroacético en 10 ml de agua desionizada y aforar a 25 ml. Almacenar en una botella de vidrio ámbar.
- 5.9.** Etanol-acetato de etilo 1:1 (v/v). En un vaso de precipitado, adicionar 25 ml de etanol y 25 ml de acetato de etilo. Almacenar en una botella de vidrio ámbar.
- 5.10.** Solución de Hidróxido de sodio saturada (12.5 N). Disolver 25 g de NaOH en 15 ml de agua desionizada y aforar a 50 ml.
- 5.11.** Solución de Guanidina 6 M con 50% de Ácido fórmico. Pesar 14.345 g de Guanidina hidrocloreto y disolver en 10.395 ml de agua desionizada. Aforar a 25 ml con Ácido fórmico concentrado. Ajustar el pH a 2.3 con solución de Hidróxido de sodio saturada. Almacenar en una botella de vidrio ámbar. Es estable por un mes (revisar el pH antes de su uso).

Autor: Rodríguez E. F. y C. Vanegas	Versión original: 20.10.09
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Vanegas, C.	Firma:

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS	Pág. 70-86
	Clave: Met 022	Fecha: 20.10.10
	Título: Método acoplado para la cuantificación de Proteínas Carboniladas (PC; por la reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina) y de Metalotioneínas (MT's). Evaluación para ajolote.	Versión: 2 Revisión y Actualización

6. Determinación de Proteínas Carboniladas (PC) – Método acoplado con la determinación de Metalotioneínas (MT's).

- 6.1. Homogenizar el tejido disectado (hígado de *A. mexicanum*) (ver PRESOP Met 009, 2007; UNAAMB) en solución fría de sacarosa 0.25 M (solución de homogenado) en una relación 4 ml : 1 g PH tejido, con un homogenizador de cuchilla (Polytron PT1200) o de pistilo de teflón a una velocidad de 22 000 rpm por 3 min a 4 °C⁸, manteniendo el tubo de homogenización con la muestra siempre en hielo.
- 6.2. Centrifugar el homogenado a 1000 g por 5 min a 4 °C.
- 6.3. Separar la fracción sobrenadante en un tubo de eppendorff y desechar la pastilla.
- 6.4. Centrifugar el sobrenadante a 12 000 g por 30 min a 4 °C.
- 6.5. Determinar en un alícuota del sobrenadante la concentración de Proteínas Solubles Totales (PST) por el método de Bradford (1976; ver PRESOP Met 011, 2007; UNAAMB). Acorde al resultado, ajustar la concentración del sobrenadante a 9 mg PST/ml con solución de homogenado. De este homogenado final, tomar cuatro alícuotas: una de 200 µL para la evaluación de Proteínas carboniladas (PC), otra de 25 µL para la evaluación de Proteínas solubles totales (PST) por el método de Bradford⁹ y dos alícuotas de 375 µL para la evaluación de Metalotioneínas (MTs; ver PRESOP Met 012, 2007. UNAAMB). Congelar el resto del homogenado a -80 °C¹⁰.
- 6.6. Con cada alícuota de 200 µL (de 9 mg PST/ml) continuar con el procedimiento para la determinación de PC. Adicionar 200 µL de solución sacarosa 0.25 M y agitar en vortex. Tomar dos alícuotas de 120 µL y colocarlas en tubos de eppendorf.
- 6.7. A cada alícuota de 120 µL agregar 1080 µL de Buffer frío de fosfatos (0.1 M, pH 7.4) con KCl (1.17%) para obtener un volumen final de 1200 µL¹¹. Agitar en vortex y separar la muestra en dos alícuotas de 500 µL. Utilizar el resto para determinar la Proteína soluble total final (PST) por el método de Bradford (1976) (ver PRESOP Met 011, 2007; UNAAMB; ver Anexo 2.A).
- 6.8. Como control de la prueba, tomar dos alícuotas de 500 µl del estándar de BSA con una concentración de 0.5 mg PST/ml (ver Anexo A) e integrar en el análisis subsecuente (Tabla 1).


⁸ Es importante evitar la formación de "burbujas" al homogenizar las muestras, ya que el homogenado se oxida (tornándose de color oscuro) interfiriendo con la técnica.

⁹ Determinar proteínas solubles totales a 595 nm.

¹⁰ Para la determinación de Metalotioneínas es conveniente congelar las alícuotas del sobrenadante de 375 µL para su posterior evaluación, la cual se recomienda realizar al día siguiente de la evaluación de las Proteínas Carboniladas .

¹¹ Para la evaluación de Proteínas Carboniladas la concentración final de PST no debe exceder 5 mg/ml; y de manera ideal, debe ser de 0.4 a 0.5 mg/ml (Levine, *et al.*, 1990). Dado que la concentración de PST de la alícuota es aproximadamente de 4.5 mg/ml, se debe efectuar una dilución 1:9.

Autor: Rodríguez E. F. y C. Vanegas	Versión original: 20.10.09
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Vanegas, C.	Firma:

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS	Pág. 71-86
	Clave: Met 022	Fecha: 20.10.10
	Título: Método acoplado para la cuantificación de Proteínas Carboniladas (PC; por la reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina) y de Metalotioneínas (MT's). Evaluación para ajolote.	Versión: 2 Revisión y Actualización

- 6.9.** A cada alícuota de 500 μL , añadir 56 μL de la solución de Estreptomina¹², incubar por 15 min y centrifugar a 11000 g por 10 min. Desechar la pastilla
- 6.10.** Tomar 500 μL del sobrenadante y adicionar 500 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (disuelta en ácido clorhídrico 2 M); incubar por 1 h a temperatura ambiente y agitar en vortex cada 10 o 15 min. A los blancos de cada muestra de tejido y del estándar de proteína (0.5 mg PST/ml; blanco negativo) adicionar 500 μL ácido clorhídrico 2 M sin DNPH.
- 6.11.** Agregar posteriormente 500 μL de Ácido tricloroacético (TCA) al 18% para precipitar las proteínas; centrifugar a 11 000 g por 3 min y desechar el sobrenadante.
- 6.12.** Lavar la pastilla resuspendiéndola con 1000 μL de etanol/ acetato de etilo (1:1); incubar por 10 min y centrifugar a 11000 g por 3 min. Desechar el sobrenadante.
- 6.13.** Repetir dos veces más el paso 6.12.
- 6.14.** Resuspender la pastilla agregando 600 μL de la solución de Guanidina 6 M. Incubar por 15 min a 37 °C (o 1 h a temperatura ambiente) y centrifugar a 16 000 g por 5 min. Separar el sobrenadante y desechar la pastilla.
- 6.15.** Determinar en este sobrenadante final el contenido de proteína soluble total por el método de Bradford (1976; 595 nm) y el contenido de carbonilos leyendo a 366 nm¹³. Para la cuantificación del contenido de carbonilos, utilizar un coeficiente de extinción molar de 22 000 M⁻¹ cm⁻¹. El contenido de grupos carbonilo en las proteínas se expresa como moles de carbonilo/ moles de proteína purificada de un peso molecular conocido¹⁴. Para extractos, los resultados se expresan en nanomoles de carbonilo/ miligramos de proteína (nmoles C/mg PST) (ver punto 7).
- 6.16.** Determinar la concentración de Metalotioneínas en las alícuotas previamente descongeladas y separadas para este propósito (ver punto 6.5) (ver PRESOP Met 012, 2007; UNAAMB).

Tabla 1. Volumen de soluciones añadidas para la evaluación de Proteínas Carboniladas en las muestras de tejido y en el control de la prueba.


Solución	Control de la prueba, μl		Muestras, μl	
	Blanco BSA	BSA + 2,4-DNPH	Blanco Muestra	Muestra – 2,4-DNPH μl
Solución de Estreptomina	56	56	56	56
2,4-DNPH disuelto en HCl 2M	0	500	0	500
HCl 2M (sin 2,4-DNPH)	500	0	500	0

¹² Relación 1:9 de acuerdo con el volumen del sobrenadante.

¹³ Máxima absorbancia del 2,4-DNPH

¹⁴ Para una proteína con un peso molecular de 50 kD el contenido de carbonilos en 1mol es de 20 nmol de carbonilo/ mg de proteína (Levine, 1990).

Autor: Rodríguez E. F. y C. Vanegas	Versión original: 20.10.09
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Vanegas, C.	Firma:

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS	Pág. 72-86
	Clave: Met 022	Fecha: 20.10.10
	Título: Método acoplado para la cuantificación de Proteínas Carboniladas (PC; por la reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina) y de Metalotioneínas (MT's). Evaluación para ajolote.	Versión: 2 Revisión y Actualización

7. Cálculos

El contenido de carbonilos se determinará por la siguiente fórmula:

$$C = \frac{[Abs_m - Abs_b]}{22000 \text{ L/mol} * \text{cm} \times H, \text{cm}} \text{ PST mg/ml}$$

donde,

C = Contenido de Carbonilos

Abs_m = Absorbancia de la muestra con 2,4-DNPH

Abs_b = Absorbancia del blanco de la muestra

22000 M⁻¹ cm⁻¹ (ó L/ moles*cm) = Coeficiente de extinción molar (ε) para 2,4- DNPH

H = Profundidad/altura de la microcelda, cm

PST = Proteína Soluble Total, mg PST/ml (Bradford, 1976).

Debido a que las PC se expresarán en nmol/mg PST, se deben realizar las conversiones pertinentes:


$$\frac{22000 \text{ l}}{\text{Mol} * \text{cm}} = \frac{22000 * 1000 \text{ ml}}{1000 \text{ mmoles} * \text{cm}} = \frac{22000 \text{ ml}}{\text{mmoles} * \text{cm}} = \frac{22000 \text{ ml}}{1000 \mu\text{moles} * \text{cm}} = \frac{22 \text{ ml}}{\mu\text{moles} * \text{cm}} = \frac{22 \text{ ml}}{1000 \text{ nmoles} * \text{cm}}$$

$$\frac{0.22}{\text{nmoles} * \text{cm}} = \frac{\text{nmol} * \text{cm}}{0.22 \text{ ml}}$$

El contenido de carbonilos por miligramo de proteína soluble total (C_c) se calculará reescribiendo la fórmula anterior; de tal manera:

$$C_c = \frac{[Abs_m - Abs_b] * (\text{nmol} * \text{cm})}{0.022 \text{ ml} * H(\text{cm}) * \text{PST} (\text{mg/ml})} = \text{nmoles/mg PST}$$


Autor: Rodríguez E. F. y C. Vanegas	Versión original: 20.10.09
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Vanegas, C.	Firma:

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS	Pág. 73-86
	Clave: Met 022	Fecha: 20.10.10
	Título: Método acoplado para la cuantificación de Proteínas Carboniladas (PC; por la reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina) y de Metalotioneínas (MT's). Evaluación para ajolote.	Versión: 2 Revisión y Actualización

8. Bibliografía

- Bradford, M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Cossu C., Doyotte A., Jacquin M.C., Babut M., Exinger A. and Vasseur P. 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Uniotumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 38 (2): 122-131
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Review*. 82: 47-95.
- Floor E. and Wetzel M.G. 1998. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *Journal of Neurochemistry*. 70 (1): 268-275.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine* (3rd Ed.). Oxford University Press. 936 p.
- Jung T., Bader N. and Grune T. 2007. Oxidized proteins: Intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 462: 231-237.
- Johnson D.G. 1953. Correlation of color and constitution. I. 2, 4-dinitrophenylhydrazones. *Journal of the American Chemical Society*. 75: 2720-2723.
- Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S. and Stadtman E.R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*. 186: 464- 478.
- Miller D.M., Buettner G.R. and Aust S.D. 1990. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*. 8: 95-108.
- Miyata H., Aozasa O., Ohta S., Chang T. and Yasuda Y. 1993. Estimated daily intakes of PCDDs, PCDFs and non-ortho coplanar PCBs via drinking water in Japan. *Chemosphere* 26 (88): 1527-1536.
- Naskalski J.W. and Bartosz G. 2000. Oxidative modifications of protein structures. *Advances in Clinical Chemistry*. 35:161-253
- Newman M.C. and Unger M.A. 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*. 2^{da} Edición. Lewis Publishers. U.S.A. 458 p.
- Parvez S. and Raisuddin S. 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 20: 112-117.
- Reznick A.Z., Witt E., Matsumoto M. and Packer L. 1992. Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 189 (2): 801-806.

Autor: Rodríguez E. F. y C. Vanegas	Versión original: 20.10.09
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Vanegas, C.	Firma:


	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS	Pág. 74-86
	Clave: Met 022	Fecha: 20.10.10
	Título: Método acoplado para la cuantificación de Proteínas Carboniladas (PC; por la reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina) y de Metalotioneínas (MT's). Evaluación para ajolote.	Versión: 2 Revisión y Actualización

Stadtman E. R. 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annual Review of Biochemistry*. 62: 797-821.

Van Der Oost R., Van Gestel L., Worst D., Hanraads M., Satumalay K., Van Shooten F., Heida H. and Vermeulen P.E. 1994. Biochemical markers in feral roach (*Rutilus rutilus*) in relation of organic trace pollutants. *Chemosphere*. 29: 801-817.

Yang R. and Randall D.J. 1997. Biomarkers for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to 1,2,4,5-tetrachlorobenzene and tetrachloroquaiacol. *Chemosphere*. 34: 1167-1180.

Autor: Rodríguez E. F. y C. Vanegas	<u>Versión original: 20.10.09</u>
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Vanegas, C.	<u>Firma:</u>

	Unidad de Análisis Ambiental, UNAAMB	
	PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS	Pág. 75-86
	Clave: Met 022	Fecha: 20.10.10
	Título: Método acoplado para la cuantificación de Proteínas Carboniladas (PC; por la reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina) y de Metalotioneínas (MT's). Evaluación para ajolote.	Versión: 2 Revisión y Actualización

ANEXO 2.A

Preparación del control de la prueba - Albúmina Sérica Bovina (BSA)

A partir de una solución madre de BSA de 1.0 mg/ml, colocar una alícuota de 600 μ l del estándar BSA en un tubo de eppendorf y adicionar 600 μ l de Buffer de fosfatos; la concentración final del estándar en un volumen final de 1200 μ l, será de 0.5 PST mg/ml.

Autor: Rodríguez E. F. y C. Vanegas	Versión original: 20.10.09
Vo.Bo. Responsable de aseguramiento de calidad: Vanegas, C.	Firma:

Anexo 3

Tabla 3.1. Concentración de los principales Metales Inductores de Metalotioneínas (PIMT's), de los metales inductores totales de Metalotioneínas (ITMT's) y de los metales inductores de estrés oxidante (IEO) en el hígado de *A. mexicanum* (mg kg^{-1} PS; ppm) trasplantados a cuatro sitios de los canales de Xochimilco. Sitio 1. Puente de Urrutia, 2. Apatlaco, 3. Laguna de la Asunción y 4. La Draga (datos analizados de González, 2006). Se incluyen sumatorias de los valores promedio registrados.

Sitio	PIMT's (Cu, Cd, Zn)	ITMT's (Cu, Cd, Zn, Co, Ni, Mn, Cr, Fe)	IEO (Fe, Cu, Cr, V, Co)
Sitio 1	128.53	277.84	173.65
Sitio 2	90.88	297.96	226.76
Sitio 3	93.38	237.75	157.20
Sitio 4	123.96	211.74	108.12

Tabla 3.2. Tabla comparativa de la concentración de metales en distintas especies de anfibios provenientes de ambientes contaminados y no contaminados.

Especie	Sitio	Cr	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	Se	As	Ni	V	Sr	Cd	Pb
<i>Ambystoma mexicanum</i> ¹ Matriz: hígado ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) Ambiente contaminado Estadio: juvenil (neoténico)	P. Urrutia Xochimilco	0.59 ± 0.26	9.04 ± 2.40	137.83 ± 1.89	0.2 ± 0.01	34.79 ± 1.50	93.58 ± 6.90	1.92 ± 0.29	0.56 ± 0.05	1.64 ± 0.16	0.24 ± 0.03	1.32 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.86 ± 0.10
	Apatlaco Xochimilco	2.36 ± 0.44	4.68 ± 0.26	193.52 ± 48.29	1.64 ± 0.84	31.2 ± 5.0	64.69 ± 6.27	5.02 ± 1.24	0.39 ± 0.05	4.88 ± 1.18	0.32 ± 0.06	1.63 ± 0.23	0.08 ± 0.01	1.87 ± 0.31
	L. Asunción Xochimilco	1.45 ± 0.40	2.83 ± 0.27	137.85± 0.0004	0.88 ± 0.08	16.83 ± 1.68	76.38 ± 5.34	7.09 ± 0.52	0.22 ± 0.02	1.37 ± 0.03	0.2 ± 0.03	1.51 ± 0.30	0.17 ± 0.02	0.47 ± 0.20
	La Draga Xochimilco	1.51 ± 0.22	3.93 ± 0.29	79.86 ± 49.73	0.99 ± 0.07	25.47 ± 5.00	97.48 ± 2.65	7.99 ± 0.08	0.31 ± 0.01	1.49 ± 0.24	0.28 ± 0.02	0.59 ± 0.20	1.0 ± 0.62	1.92 ± 0.30
<i>Proteus anguinus</i> ² Matriz: hígado ($\mu\text{g g}^{-1}$ PH) Ambiente no contaminado Estadio: adulto (neoténico)	Rio Pivka de la Cueva Planina					8.61	6.40	7.95	0.33					
	Cueva Kompolje					2.31	8.23	4.36	0.51					
<i>Proteus anguinus parkelj</i> ² Matriz: hígado ($\mu\text{g g}^{-1}$ PH) Ambiente no contaminado Estadio: adultos (neoténico obligado)	Jelsevnik					1.49	49.17	3.75	0.25					
<i>Rana catesbeiana</i> ³ Matriz: hígado ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS) Ambiente contaminado Estadio: adultos	Río Yamaska					50- 400	90- 225						0.5- 3.5	

¹ González, 2006.

² Bulog et al., 2002.

³ Cooper y Fortin, 2010.

Tabla 3.3. Tabla comparativa de la concentración de metales en distintas especies de anfibios provenientes de ambientes contaminados y no contaminados.

Especie	Metal/ Sitio	Cr	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	Se	As	Ni	V	Sr	Cd	Pb
<i>Rana utricularia</i> ⁴ Matriz: tracto digestivo ($\mu\text{g g}^{-1}$ PH) Ambiente contaminado Estadio: adultos	Río Savannah, Sitio 66 (R)	3.85 ± 0.43	50.4 ± 6.33					0.439 ± 0.03	0.38 ± 0.11				0.160 ± 0.01	6.58 ±1.30
	Sitio 10 (R)	0.386 ± 0.04	19.0 ± 1.83					0.284 ± 0.06	0.07 ± 0.02				0.076 ± 0.01	0.747 ± 0.13
	Sitio 28 (R)	2.61 ± 1.28	173 ± 62.20					0.270 ± 0.07	0.50 ± 0.14				0.47 ± 0.27	137.0 ± 3.37
	Sitio 27	0.863 ± 0.13	212 ± 19.10					309 ± 12.0	0.13 ± 0.01				0.154 ± 0.04	2.12 ± 0.173
<i>Bufo terrestres</i> ⁵ Matriz: todo el organismo ($\mu\text{g g}^{-1}$ PH) Ambiente contaminado Estadio: adultos	Deposito de Cenizas (DC)	1.87 ± 0.40	59.8 ± 11.31		0.27 ± 0.05	29.5 ± 7.19	99.2 ± 5.82	17.4 ± 3.32	1.58 ± 0.27	2.34 ± 0.32	1.24 ± 0.21	386.7 ± 74.3	0.27 ± 0.05	0.70 ± 0.14
	DC +7 semanas	1.68 ± 0.34	111.2 ± 5.89		0.21 ± 0.01	27.7 ± 4.38	268 ± 21.78	5.46 ± 0.68	1.21 ± 0.26	2.35 ± 0.19	1.07 ± 0.07	218.7 ± 25.0	0.13 ± 0.02	1.77 ± 0.27
	DC + 12 semanas	1.23 ± 0.09	49.8 ± 15.97		0.18 ± 0.02	22.8 ± 3.66	257 ± 1,73	3.45 ± 0.12	0.75 ± 0.04	2.07 ±0.22	1.18 ± 0.07	178.3 ± 4.89	0.15 ± 0.03	1.48 ± 0.3
	Ref + 12 semanas	1.31 ± 0.24	89.9 ± 25.16		1.42 ± 0.85	20.8 ± 1.67	194.3 ± 93.38	2.10 ± 0.09	0.23 ± 0.05	1.56 ±0.76	0.25 ± 0.02	132.1 ± 13.9	0.12 ± 0.02	1.06 ± 0.09

DC= organismos provenientes del sitio contaminado; DC+7 semanas y DC + 12 semanas= organismos trasplantados de un sitio de referencia a un sitio contaminado durante 7 y 12 semanas; Ref + 12 semanas= organismos trasplantados de un sitio de referencia a otro sitio de referencia durante 12 semanas.

⁴ Burger y Snodgrass, 2001.

⁵ Hopkins et al., 1998.

Tabla 3.4. Tabla comparativa de la concentración de Metalotioneínas (MT's) en distintas especies de anfibios provenientes de ambientes contaminados, no contaminados y de estudios de laboratorio.

Especie	Origen	Exposición	Tejido	MT's	Referencia	
<i>Ambystoma mexicanum</i>	Sitio contaminado Zona lacustre de Xochimilco	21 d, Puente de Urrutia	Hígado ^a	17.0 ± 2.3	Presente estudio	
		21 d, Apatlaco	(µg g ⁻¹ PH)	20.1 ± 5.3		
		21 d, Laguna La Asunción		29.0 ± 3.4		
		21 d, La Draga		30.3 ± 4.5		
<i>Rana castebeiana</i>	Sitio bajo impacto Sitio bajo impacto Sitio contaminado Sitio contaminado	Organismos capturados en sitio		Hígado ^a	990	Cooper y Fortin, 2010
				(nmol g ⁻¹ PS)	640	
					610	
					855	
<i>Rana ridibunda</i>	Laboratorio	Control	Hígado ^b	13.6 ± 2.5	Loumbourdis <i>et al.</i> , 2007	
		14 d, 10mg Cr L ⁻¹	(µg g ⁻¹ PH)	12.5 ± 2.2		
		14 d, 10 mg Cr L ⁻¹ + 10 mg Cd L ⁻¹		26.5 ± 1.9		
<i>Rana ridibunda</i>	Laboratorio	5, 15, 30 d; Control	Hígado ^b (nmol g ⁻¹ PH)	2.8 ± 0.1, 2.89 ± 0.3, 3.12 ± 0.05	Papadimitriou y Loumbourdis, 2003	
		5, 15, 30 d; 50 mg Cd L ⁻¹		7.1 ± 0.6, 8.61 ± 1.0, 3.6 ± 0.2		
		5, 15, 30 d; 100 mg Cd L ⁻¹		5.7 ± 0.3, 8.57 ± 0.1, 4.17 ± 0.2		
<i>Rana ridibunda</i>	Laboratorio	10 d, Control	Hígado ^b (µg g ⁻¹ PH)	0.7 ± 0.1	Vogiatzis y Loumbourdis, 1997	
		10 d, 200 mg Cd L ⁻¹		68.1 ± 12.5		
		10 d, desintoxicación		369 ± 41.1		
		20 d, desintoxicación		436 ± 48.2		
		30 d, desintoxicación		471.7 ± 80.2		
<i>Rana ridibunda</i>	Laboratorio	Control	Hígado ^b (nmol g ⁻¹ PH)	0.12 ± 0.07	Vogiatzis y Loumbourdis, 1998	
		4 d, 200 mg Cd L ⁻¹		1.1 ± 0.7		
		10 d, 200 mg Cd L ⁻¹		10.19 ± 2.2		
		30 d, 200 mg Cd L ⁻¹		61.3 ± 24.6		

Determinación de MT's por el método de Saturación de Hg^a y Saturación de Cd^b

Tabla 3.5. Tabla comparativa de la concentración de Proteínas Carboniladas (PC) en distintas especies de anfibios y de peces provenientes de ambientes contaminados y no contaminados.

Especie	Origen	Exposición	Tejido	PC, nmol mg ⁻¹ P	Referencia
<i>Ambystoma mexicanum</i>	Sitio contaminado Zona lacustre de Xochimilco	21 d, Puente de Urrutia	Hígado ^a	29.8 ± 3.9	Presente estudio
		21 d, Apatlaco		63.5 ± 2.4	
		21 d, Laguna La Asunción		28.0 ± 2.5	
		21 d, La Draga		20.4 ± 1.2	
<i>Rana ridibunda</i>	Sitio no contaminado (testigo)	14 d, sin exposición TATTU ^b , testigo	Hígado ^a	52.6	Falfushinka et al., 2008
	Sitio no contaminado	14 d, 0.091 mg TATTU L ⁻¹		66.6	
	Sitio contaminado	14 d, sin exposición		18.57	
	Sitio contaminado	14 d, 0.091 mg TATTU L ⁻¹		33.3	
<i>Symphodus melops</i>	Sitio referencia	Organismos capturados en sitio.	Plasma ^a	2.02 ± 0.14	Almroth et al., 2008
	Sitio contaminado (HAP's)			2.39 ± 0.22, 3.39 ± 0.35	
	Sitio referencia			1.59 ± 0.17, 2.24 ± 0.44	
	Sitio contaminado (metales)			3.55 ± 0.43, 3.34 ± 0.14	
<i>Channa punctata</i>	Sitio no contaminado	48 h, sin exposición	Plasma ^a	0.90 ± 0.09	Parvez y Raisuddin, 2005
		48 h, Deltametrin 0.75 µg L ⁻¹		2.0 ± 0.19	
		48 h, Endosulfan 10 µg L ⁻¹		1.24 ± 0.08	
		48 h, Paraquat 5 mg L ⁻¹		1.20 ± 0.06	
<i>Danio rerio</i>	Laboratorio	96 h, 50 mg TiO ₂	Hígado ^a	178.1% mayor que el control	Xion et al., 2010
		96 h, 50 mg TiO ₂		289.6% mayor que el control	

^a Evaluación de PC por el método de Reacción con 2,4-Dinitrofenilhidrazina

^b Mezcla de plaguicidas: propamocarb + mancozeb

Para mayor información de los sitios de estudio en los canales de Xochimilco, se incluyen los parámetros fisicoquímicos de agua y sedimento, así como las concentraciones de los metales analizados en estas matrices ambientales (cortesía de González, 2006).

Tabla 4.1. Parámetros fisicoquímicos de agua y sedimento de los sitios de estudio. Se señalan valores promedio y error estándar.

	P. de Urrutia	Apatlaco	L. Asunción	La Draga
AGUA				
pH	7.5 ± 0.1 ^a	7.6 ± 0.3 ^a	7.4 ± 0.2 ^a	7.2 ± 0.1 ^a
Temperatura (°C)	19.3 ± 0.6 ^a	21.1 ± 0.6 ^a	20.4 ± 0.6 ^a	20.5 ± 0.6 ^a
Oxígeno Disuelto (mg L ⁻¹)	4.92 ± 1.7 ^a	6.21 ± 0.5 ^a	4.94 ± 0.8 ^a	3.6 ± 0.2 ^a
Salinidad (‰)	0.4 ± 0.1 ^b	0.56 ± 0.04 ^a	0.42 ± 0.02 ^{ab}	0.4 ± 0.0 ^b
Aniones (mg L⁻¹)				
Bicarbonatos	192.8 ± 4.6 ^a	267.7 ± 3.9 ^b	187.3 ± 11.2 ^a	187.5 ± 18.1 ^a
Cloruros	99.2 ± 11.6 ^a	112.6 ± 1.6 ^a	120.5 ± 9.0 ^a	103.8 ± 4.1 ^a
Fosfatos	6.46 ± 0.6 ^a	6.1 ± 0.2 ^a	6.5 ± 0.3 ^a	6.4 ± 0.4 ^a
Sulfatos	132.9 ± 4.1 ^a	183.4 ± 1.9 ^b	84.8 ± 4.6 ^c	75.9 ± 2.4 ^c
Compuestos Nitrogenados (mg L⁻¹)				
Amonio	0.036 ± 0.0 ^a	0.4 ± 0.2 ^a	0.8 ± 0.3 ^a	0.8 ± 0.3 ^a
Nitrito	0.3 ± 0.2 ^a	0.2 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^a	0.1 ± 0.0 ^a
Nitrato	32.6 ± 7.9 ^a	20.1 ± 5.2 ^a	39.6 ± 11.0 ^a	36.8 ± 7.8 ^a
SEDIMENTO				
Materia Orgánica (%)	16.3 ± 0.4 ^a	17.9 ± 0.5 ^{ab}	28.9 ± 4.9 ^b	23.9 ± 1.2 ^b
Granulometría	Arena (%)	21.11	10.14	25.34
	Limo (%)	44.17	43.02	30.85
	Arcilla (%)	34.72	46.84	43.81

Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los sitios de estudio ($p > 0.05$)

Tabla 4.2. Concentración de metales en agua (ppm) de los sitios seleccionados de los canales de Xochimilco. Se señalan valores promedio y error estándar ($X \pm EE$). Por metal letras diferentes denotan diferencias significativas entre los sitios de estudio. Se incluyen los límites de detección de cada metal.

Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los sitios de estudio ($p > 0.05$); ND: no detectado.

Metal	P. de Urrutia	Apatlaco	L. de Asunción	La Draga	Límite de detección
Cr	0.01 ± 0.004^a	0.005 ± 0.001^a	0.02 ± 0.005^a	0.01 ± 0.002^a	0.07E-3
Mn	0.11 ± 0.01^a	0.07 ± 0.02^{ab}	0.04 ± 0.006^b	0.05 ± 0.005^b	0.008E-3
Fe	0.02 ± 0.005^a	0.03 ± 0.02^a	0.017 ± 0.004^a	0.018 ± 0.003^a	1.7 E-3
Co	0.00004 ± 0.0000^a	0.002 ± 0.001^a	ND	0.0001 ± 0.0001^a	0.006 E-3
Cu	0.002 ± 0.0005^a	0.001 ± 0.0004^a	0.004 ± 0.002^a	0.003 ± 0.001^a	0.03 E-3
Zn	0.08 ± 0.01^a	0.04 ± 0.008^a	0.13 ± 0.02^a	0.14 ± 0.05^a	0.1 E-3
Se	ND	ND	ND	ND	0.2 E-3
As	0.002 ± 0.0003^a	0.006 ± 0.0009^b	0.006 ± 0.0005^b	0.007 ± 0.0006^b	0.03 E-3
Ni	0.02 ± 0.005^a	0.008 ± 0.003^a	0.013 ± 0.003^a	0.02 ± 0.003^a	0.069 E-3
V	0.007 ± 0.002^a	0.006 ± 0.001^a	0.009 ± 0.0001^a	0.01 ± 0.002^a	0.4 E-3
Sr	0.2 ± 0.02^a	0.24 ± 0.04^a	0.19 ± 0.02^a	0.24 ± 0.023^a	0.003 E-3
Cd	ND	ND	ND	ND	0.005 E-3
Pb	0.0001 ± 0.0^a	0.001 ± 0.0004^a	0.001 ± 0.0003^a	0.001 ± 0.0003^a	0.02 E-3

Tabla 4.3. Concentración de metales en sedimento (ppm) de los sitios seleccionados de los canales de Xochimilco. Se señalan valores promedio y error estándar ($X \pm EE$). Se incluyen los límites de detección de cada metal.

Metal	P. de Urrutía	Apatlaco	L. de Asunción	La Draga	Límite de detección
Cr	15.19 \pm 2.04 ^a	31.8 \pm 7.83 ^{ab}	67.45 \pm 3.75 ^c	36.53 \pm 2.27 ^b	0.07 E-3
Mn	335.64 \pm 29.03 ^a	349.71 \pm 52.10 ^a	277.14 \pm 5.37 ^a	276.21 \pm 17.68 ^a	0.008 E-3
Fe	80.62 \pm 4.26 ^a	96.36 \pm 13.21 ^b	182.63 \pm 3.89 ^c	126.23 \pm 6.48 ^b	1.7 E-3
Co	1.36 \pm 0.4 ^a	1.91 \pm 0.65 ^a	4.81 \pm 0.33 ^a	7.23 \pm 2.74 ^a	0.006 E-3
Cu	40.28 \pm 4.76 ^a	36.74 \pm 12.89 ^a	137.75 \pm 12.66 ^b	104.26 \pm 16.1 ^b	0.03 E-3
Zn	532.75 \pm 77.8 ^a	152.83 \pm 2.93 ^a	583.08 \pm 118.1 ^a	355.6 \pm 82.66 ^a	0.1 E-3
Se	8.73 \pm 0.53 ^b	8.31 \pm 1.77 ^b	4.73 \pm 1.33 ^{ab}	2.76 \pm 0.82 ^a	0.2 E-3
As	5.76 \pm 0.45 ^a	5.03 \pm 1.25 ^a	8.6 \pm 3.3 ^a	8.46 \pm 2.53 ^a	0.03 E-3
Ni	21.42 \pm 1.95 ^a	30.1 \pm 9.03 ^{ab}	51.56 \pm 4.02 ^b	39.98 \pm 4.3 ^{ab}	0.069 E-3
V	261.4 \pm 23.6 ^{ab}	251.5 \pm 26 ^a	232.98 \pm 12.03 ^a	379.5 \pm 43 ^b	0.4 E-3
Sr	77.27 \pm 10.25 ^a	99.22 \pm 5.99 ^{ab}	222.81 \pm 6.25 ^c	130.67 \pm 8.53 ^b	0.003 E-3
Cd	ND	ND	4.54 \pm 0.86	3.33 \pm 0.66	0.005 E-3
Pb	34.47 \pm 9.24 ^a	26.73 \pm 7.55 ^a	252.59 \pm 80.57 ^b	70.36 \pm 10.99 ^{ab}	0.02 E-3

Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los sitios de estudio ($p > 0.05$); ND: no detectado.