2006-A COD. 396551835

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

# "Bioacumulación de COP's y daño genético en hígado y sangre de Goodea atripinnis del Lago de Chapala"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

MÓNICA REYNOSO SILVA

Las Agujas, Zapopan , Jal. Abril del 2006

# BIOACUMULACIÓN DE COP'S Y DAÑO GENÉTICO EN HÍGADO Y SANGRE DE *Goodea atripinnis* DEL LAGO DE CHAPALA

# Universidad de Guadalajara

## Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

*Coordinación de titulación y Carrera de Licenciatura en Biología*

**C. MONICA REYNOSO SILVA** **029 C. C. BIOLOGIA**
**PRESENTE**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el titulo: **"Bioacumulación de COP´s y daño genético en hígado y sangre de Goodea atripinnis del Lago de Chapala""** para obtener la Licenciatura en Biología

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo a el/la **DR. CARLOS ALVAREZ MOYA** y como asesor/a el/la

Le reiteramos la información de que ha sido sinodal, le corresponde evaluar en cuanto a viabilidad (si/no ) de este proyecto y, en su caso, aprobarlo para su realización. Se requiere que su respuesta no exceda el plazo de una semana de la fecha en que lo reciba.

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo

**ATENTAMENTE**
**"PIENSA Y TRABAJA"**
**Las Agujas, Zapopan ., 18 de Noviembre del 2004**

**DR. CARLOS ALVAREZ MOYA**
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

COORDINACION DE LA CARRERA DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**DRA. ANA ISABEL RAMIREZ QUINTANA**
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA.**
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN.**
**CARRERA DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA.**
**CUCBA.**
**PRESENTE**

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de **Tesis e informes**, opción **Tesis** con el título: **"Bioacumulación de COP´S y daño genético en hígado y sangre de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala"** que realizó la pasante **Mónica Reynoso Silva** con número de código **396551835** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
Las Agujas, Zapopan a 17 de Marzo del 2006

DIRECTOR DEL TRABAJO

**Dr. Carlos Álvarez Moya**

| Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación | Firma de aprobado | Fecha de aprobación |
|---|---|---|
| Dra. Anne Santerre Lucas | | 27 Marzo 2006. |
| Dr. Alfredo Feria Velasco | | 23 Marzo 2006 |
| Biol. Sergio Álvarez Barajas | | 3-Abril-2006 |
| Supl. M. C. Guillermo Barba Calvillo | | 05/Abril/2006 |

*AGRADECIMIENTOS*

*A Dios por el hermoso regalo de la vida y por rodearme de personas que me han ayudado a realizar mis sueños.*

*A la Dra. Anne Santerre Lucas, Dr. Alfredo Feria Velasco, Biól. Sergio Álvarez Barajas y M. C. Guillermo Barba Calvillo. Por su atención, paciencia y apoyo para la realización de la tesis.*

*Al Dr. Carlos Álvarez Moya por ser tan fina persona, por su apoyo incondicional, comprensión y motivación. "Muchas Gracias".*

*A Fernando Álvarez Moya por su valiosa amistad, apoyo y comprensión. Y por ser un hombre noble, lleno de valores morales y "Súper buena onda".*

*A Armando Arévalo Hernández por su amistad y súper buena onda.*

# INDICE


| | Página |
|---|---|
| Introducción | 1 |
| Antecedentes | 2 |
| Chapala | 2 |
| Importancia biológica | 2 |
| Localización y extensión | 3 |
| Sayula | 4 |
| *Goodea atripinnis* | 7 |
| Contaminación ambiental | 8 |
| Pesticidas | 9 |
| Compuestos orgánico persistentes y su problemática | 11 |
| Efectos en las cadenas tróficas | 14 |
| Mutación y cáncer | 15 |
| Cáncer | 17 |
| Mutágenos | 18 |
| Sistemas para la detección de daño genético | 20 |
| Prueba de mutación rosa en *Tradescantia* (clon 4430) | 21 |
| Prueba cometa alcalino | 23 |
| Justificación | 26 |
| Hipótesis | 27 |
| Objetivos | 28 |
| Material y métodos | 29 |
| *Goodea atripinnis* | 29 |
| Toma de muestra de agua | 29 |
| Diseño experimental | 29 |
| Análisis estadístico para PCA | 30 |
| Determinación de COP'S | 30 |
| Análisis de agua | 30 |
| Análisis de tejido | 31 |
| Resultados | 33 |
| Discusión | 40 |
| Conclusiones | 44 |
| Referencias | 45 |

## RESUMEN

Los compuestos orgánicos persistentes (COP´S) son sustancias con capacidad mutagénica utilizadas en la agricultura e industria. Se determinó la concentración de COP´S en aguas del Lago de Chapala y la Laguna de Sayula, así como el daño genético en hígado y sangre de *Goodea atripinnis* (mojarra criolla) de estos mismos lugares, durante dos años y en dos épocas del año (sequía y lluvia). Las lecturas indicaron muy bajas concentraciones, sin embargo, de una a otra etapa variaron dependiendo de la entrada de agua en estos embalses. Llama la atención el incremento de metoxicloro, 2,4 D y DDT lo que indica que estos son arrastrados hasta los cuerpos de agua durante la temporada de lluvias. Se observó también dilución, lo que mostró que estos compuestos se encuentran en concentraciones residuales. En este sentido, salvo algunas excepciones, pocas diferencias se encontraron entre el Lago de Chapala y la Laguna Sayula.

El análisis de COP´S en hígado de *Goodea atripinnis* de Chapala y Sayula durante la primera etapa mostró que todos ellos están presentes, pero 2,4 D se encuentra 10 veces más concentrado en peces de Chapala con respecto a los de Sayula y se intuye bioacumulación no definitiva o bioacumulación desigual entre los organismos. Se observó daño genético en los peces de ambos embalses y quedó claro que la Laguna de Sayula no fue el testigo negativo ideal, ya que, presentó concentraciones de COP´S inesperadamente similares a los del Lago de Chapala. Fue evidente la presencia de sustancias con capacidad mutagénica que incrementaron la longitud de la cauda del cometa de un embalse con respecto a otro, pero no podemos concluir en cual ocurrió más daño. Tampoco podemos excluir a otras sustancias diferentes a COP´S responsables del incremento de la longitud de la cauda, sin bien 2,4 D y hexaclorobenceno parecen ser fuertes sospechosos.

# INTRODUCCIÓN

Los compuestos orgánicos persistentes (COP´S) son sustancias químicas a base de carbono que incluyen químicos industriales como los Bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas y plaguicidas: DDT, aldrin, drieldrin, mirex, toxafeno, clordano, heptacloro son, principalmente, productos de la actividad industrial y de origen relativamente reciente. Provocan problemas como: daño al sistema nervioso central y periférico, desordenes reproductivos, quebrantamientos en el sistema inmunológico, malformaciones en el nacimiento y hasta la muerte. Algunos de ellos poseen actividad mutagénica y carcinogénica. Se tienen reportes de su presencia en aguas del Río Lerma-Santiago y el lago de Chapala, donde habita una gran cantidad de organismos que obviamente los consumen, más aún, de Chapala se extrae el agua para consumo de los habitantes de Guadalajara, lo que representa un gran riesgo si los niveles de COP´S son altos.

Una de las características más importante de los COP´S es su capacidad para bioacumularse en tejidos animales lo que lleva a un incremento de su concentración hasta diez veces mayor con respecto al medio y se incrementa nuevamente diez veces por cada nivel trófico, por ello se magnifica su presencia en el hígado de los peces que los consumen. El hombre no está exento de este peligro ya que el consumo de organismos contaminados constituye un riesgo a la salud. *Goodea atripinnis* es uno de los peces más abundantes del lago de Chapala y puede ser un monitor importante para detectar bioacumulación y daño genético. En el presente trabajo se evaluó la concentración de COP´S en agua de Chapala y en hígado de este pez y se utilizó la prueba del cometa alcalino para determinar la presencia de daño genético.

# ANTECEDENTES

CHAPALA

Chapala es el lago más grande de la República Mexicana y se abastece de varios ríos, especialmente el Santiago. A lo largo de la cuenca se encuentran ubicadas una gran cantidad de industrias que, se sabe, depositan sus residuos en él. Entre los contaminantes vertidos existen metales pesados como: plomo, arsénico y mercurio (González y Ramírez, 2001). La contaminación por pesticidas es también importante, ya que éstos son arrastrados por las lluvias desde los campos de cultivo y, en adición, las aguas de drenajes de distintas poblaciones también se incorporan al lago.

La mayor parte del agua de la que se abastece la ciudad de Guadalajara proviene de Chapala, ésta, al llegar a las plantas potabilizadoras se somete a un proceso de tratamiento y clarificación para su posterior distribución. Sin embargo, el proceso de cloración y sedimentación elimina principalmente la contaminación biológica pero no la química representada por metales pesados, pesticidas, residuos de tipo industrial entre otros (Romero, 2001). Al llegar a las plantas potabilizadoras, se inicia el proceso de cloración, éste, aunque recomendable, puede provocar la producción de derivados clorados altamente mutagénicos que pueden causar el desarrollo de cáncer estomacal (Álvarez y Santerre, 2001). En la ciudad de Guadalajara, el efecto mutagénico del agua de consumo público fue estudiada, pero no se encontró que los pozos representaran peligro (Álvarez y Santerre, 2001).

**Importancia biológica**

El lago de Chapala presenta gran variedad de organismos, una ictiofauna compuesta por 39 especies agrupadas en nueve familias. De ellas 4 familias y 15 especies son comerciales Cyprinidae (carpas), con cuatro especies Ictaluridae (bagres), con tres especies; Atherinidae, con siete especies (incluye a los charales, con cuatro especies y a los pescados blancos, con tres y finalmente la familia Ciclidae (tilapia), con

una especie. Así mismo el lago, es zona de hibernación de aves acuáticas migratorias se ha vuelto por demás importante. Se convierte en una de las pocas alternativas de una vasta región del occidente de México. Las rutas migratorias que llegan al lago son parte de la ruta central y del pacífico (que viene de Alaska, Canadá y Estados Unidos). La diversidad de las aves acuáticas para la zona del lago de Chapala se estima en más de 80 especies (Guzmán et al., 2003). Desde el comienzo del siglo XX, el lago sufrió una serie de alteraciones que de manera natural quizá se hubieran presentado en lapsos grandes de tiempo. Hoy en día el agua de este embalse está invadido de lirio y tule y contaminado por desechos de origen pesticidas, descargas industriales y las urbanas entre otros contaminantes, que traen consigo los diversos aportes que hasta él llegan (http://www.semarnap.gob.mx/regiones/chapala/problematica.shtml).

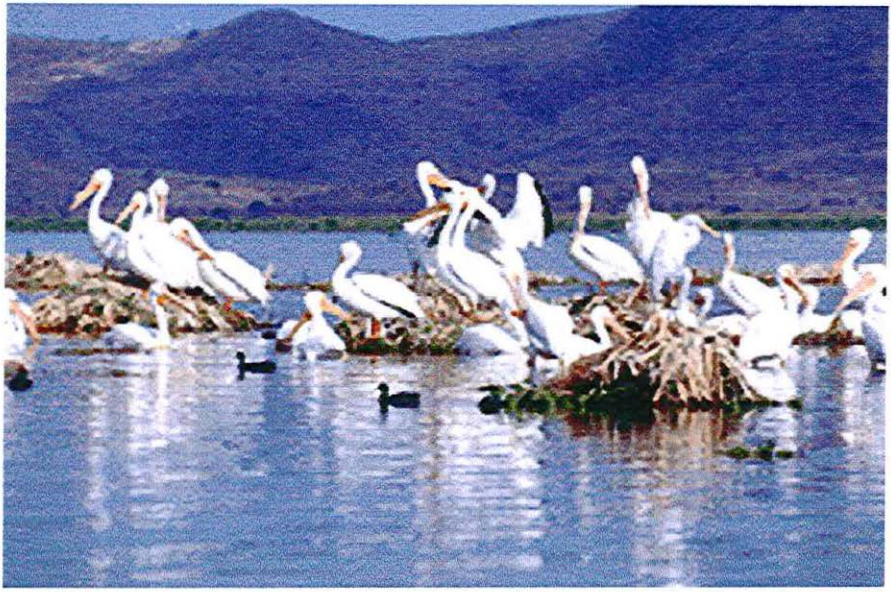
El lago de Chapala (Fig. 1) tiene una superficie total de 7,355.28 kilómetros cuadrados, de los cuales 52% aproximadamente corresponden al estado de Jalisco y el resto a Michoacán. El lago de Chapala permitió una pesca rica, variada y segura desde años antes de que la agricultura fuera realmente rentable, permitiendo un modo de vida estable para los primeros pobladores ribereños (Guzmán, 2003; Alejo, 2002).

**Localización y extensión**

La cuenca directa e inmediata del lago de Chapala ocupa en la parte centro-este del estado de Jalisco y la porción norte-noreste del estado de Michoacán, entre los 19°45' y 20°55' de longitud norte, 101°50' y 103°00' de longitud oeste. Comprende la llamada ribera y ciénega de Chapala correspondientes a la cuenca directa del embalse, así como las cuencas de los ríos Zula al noreste y la del Duero al sureste, ambas consideradas como cuencas inmediatas (Alejo, 2002).

**Figura 1. Lago de Chapala en la actualidad.**

(http://images.google.com.mx/images?hl=es&q=chapala&lr=lang_es&sa=N&tab=wi).



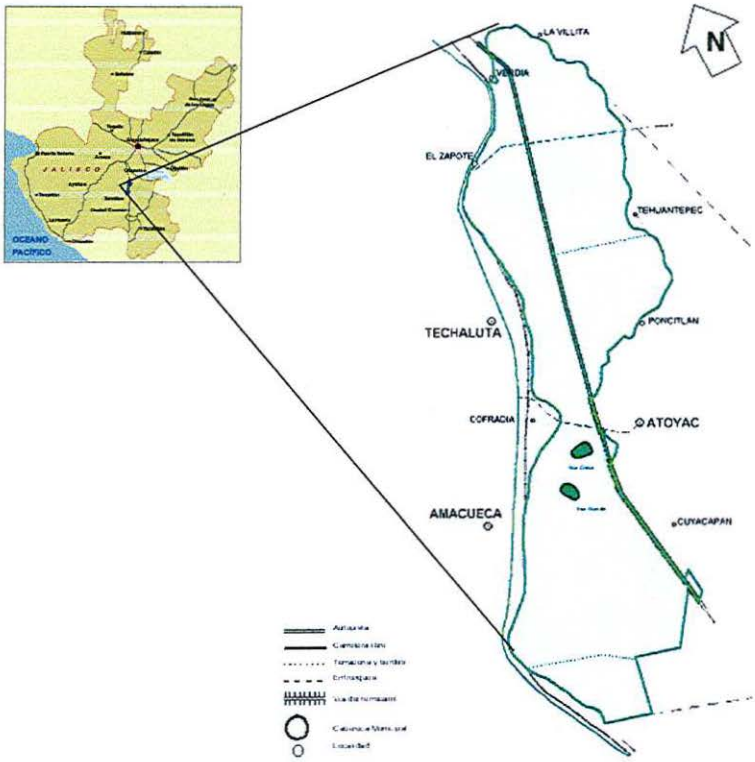
SAYULA

Sayula (Fig. 2 y 3) se encuentra al sur del estado de Jalisco a una distancia aproximada de 60 Km de la ciudad de Guadalajara. Se halla inscrita dentro de las coordenadas geográficas 19º54´24´´ - 20º10´32´´ latitud Norte y 103º27´39´´-103º36´40´´ longitud oeste, con una altitud a nivel del mar de 1,350 metros y cuenta con una superficie aproximada de 16,800 hectáreas presentando una longitud de 31.8 km y un ancho promedio de 5.3 km (http://www.cucba.udg.mx/sayula/localizacion.htm). El vaso pertenece a seis municipios cuyas cabeceras municipales se encuentran localizadas de la siguiente manera: al noroeste Zacoalco de Torres (lugar de la

pirámide), al noreste Teocuitatlán de Corona (lugar de oro), al este Atoyac (junto al río), al suroeste Sayula (lugar de las moscas), y al oeste por Amacueca (lugar de amates) y Techaluta (lugar de las ardillas).

**Figura 2. Laguna de Sayula** (http://www.cucba.udg.mx/sayula/localizacion.htm).

**Figura 3. Ubicación de la Laguna de Sayula, en el Estado de Jalisco.**
(http://www.cucba.udg.mx/sayula/localizacion.htm).



***Goodea atripinnis***

Los peces de la familia *Goodeidae* son en su mayoría vivíparos cyprinodontoides originarios de la Mesa Central de México (Uyeno et al., 1983). Comprenden aproximadamente 40 a 45 especies, cuatro de estas son ovíparos encontrados en ríos de E.U. y el resto son vivíparos de México del alto altiplano y su periferia. La diversidad de *Goodeidae* se genera de varios eventos asociados con vulcanismo y orogenia durante el plioceno y pleistoceno. *Tapatía occidentalis*, un fósil, conocido del grupo establece la mínima edad de los *Goodeinae* en el Mioceno (Webb y Miller, 1998).

*G. atripinnis* es un pez omnívoro, con preferencia por los vegetales en las primeras fases de desarrollo, la cual cambia en tallas mayores cuando consume crustáceos, también consume en menor proporción algas, insectos y rotíferos, entre otros (http://www.inp.sagarpa.gob.mx/publicaciones/sustentabilidad/continental/PATZCUARO .pdf). Su crianza ocurre durante los meses más caliente y el número de embriones por hembra en promedio es de 19.1 (http://www.inp.sagarpa.gob.mx/publicaciones/sustentabilidad/continental/PATZCUARO .pdf). El tamaño en machos es de 7 cm. y las hembras de 14. En el Lago de Chapala habita *Goodea atripinnis* (Fig. 4) de alimentación superficial en aguas poco profundas lacustres (Torres, 1991).

**Figura 4. *Goodea atripinnis*** (mojarra criolla).

CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

El desarrollo de las sociedades humanas se acompaña del uso y desecho de gran cantidad de compuestos químicos (Grimmer, 1983). Existen algunas sustancias que pueden causar daño fisiológico e incluso alterar nuestro material genético. Cuando esto último ocurre se dice que es una sustancia mutagénica. Ésta entra a través de la membrana celular y cuando llega al núcleo puede inducir mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas entre otras (Heflich, 1991). Nuestros hábitos y un ambiente cargado de contaminantes físicos, químicos y hasta biológicos, pueden afectar al organismo. Se calcula que un ser humano común puede estar expuesto de manera cotidiana a un promedio de 100,000 agentes químicos diferentes (Loera y Albert, 1990; Álvarez y Zaitseva, 2001). Existen varios grupos de sustancias potencialmente peligrosas desde el punto de vista genético, por mencionar solo algunas: a) las farmacéuticas; b) los plaguicidas y c) emisiones gaseosas.

Actualmente se tiene calculada la existencia de más de 5 millones de sustancias químicas distintas y cada año 100 mil nuevas son producidas y entran en contacto con las poblaciones de manera muy diversa: contaminación ambiental, exposición ocupacional, alimentación, aplicación médica, etc. Lo anterior puede tener consecuencias sobre la salud a nivel genético: de todos los niños que nacen vivos, según (Torres, 2001) el 1% presenta anormalidades cromosómicas, el 50% de todos los abortos se deben a la presencia de cromosomas anormales. Las enfermedades genéticas heredables debidas a mutaciones en un solo gen, aunque se presentan en frecuencia relativamente bajas, todas ellas juntas pueden llegar a constituir un porcentaje importante (Torres, 2001 y Ramírez, 2001). Otros datos indican que de 10 a 15% de las enfermedades son debidas a causas genéticas y el 80% de todos los cánceres son de origen ambiental (Rendon y Albert, 1990; Álvarez y Zaitseva, 2001). Es clara e importante la relación entre la generación, uso y control de las sustancias químicas, la salud y el aspecto económico.

PESTICIDAS

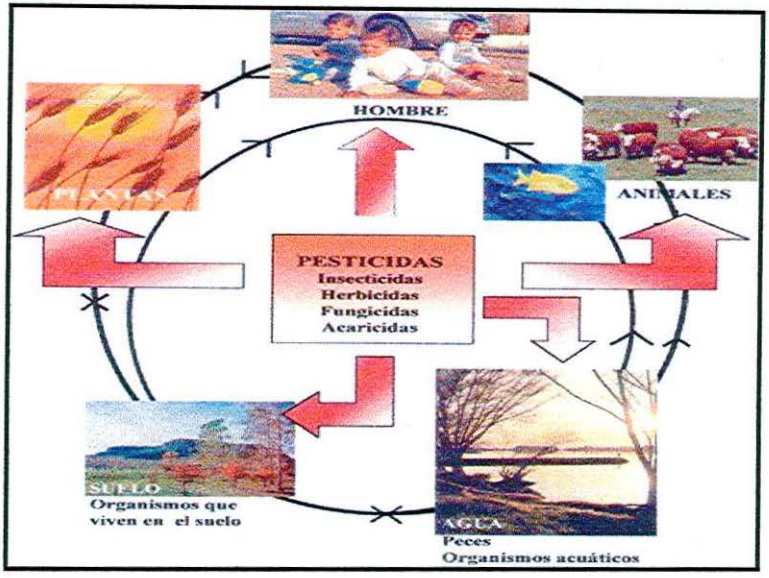
El uso de plaguicidas en el mundo se duplicó en los últimos 20 años y según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de intoxicaciones agudas por plaguicidas en el mundo aumentó de 1973 a 1985 en un 600% con un incremento en la mortalidad de 1 a 7.3 por cada 100 intoxicados (http://www.col.ops-oms.org/sivigila/2003/BOLE20_03.pdf). En México, durante 1985 se presentaron 725 intoxicaciones crónicas ocupacionales, 10,000 no ocupacionales y 200,000 casos de cáncer relacionados con residuos de plaguicidas en los alimentos, a pesar de ello en 1995 se usaron 54,600 toneladas de plaguicidas. Así pues, con el incremento de la contaminación por pesticidas aumentó la necesidad de la población por conocer los efectos causados por estas sustancias (Carrillo y Vélez, 1996). De acuerdo con Martínez (1994), los principales plaguicidas organoclorados que contaminan las aguas subterráneas y superficiales en México son: DDT, HCH, lindano, clordano, heptacloro,

metoxicloro, toxafeno, aldrín y dieldrín (llamados también compuestos organo-persistentes (COP´S) debido a su persistencia en el medio. Jalisco ocupa el tercer lugar en cuanto al uso de agroquímicos no recomendados, y los estados vecinos también utilizan estas sustancias e incluso aquellas prohibidas en nuestro país y otros países, por lo que el riesgo de exposición a mezclas de varios plaguicidas a través de los cuerpos de agua dulce es muy grande (Jiménez, 2001). Investigadores de la Universidad de Guadalajara reportaron residuos de plaguicidas organoclorados en concentraciones mayores a las recomendadas por la OMS en leche del área metropolitana de Guadalajara; en suelo y agua de la cuenca de Chapala (Gaceta Universitaria, 2002). Se detectaron pozos de agua contaminados con 1,2 dibromo-3-cloropropano, insecticida organoclorado, en el área metropolitana de Fresno, California (Grella et al., 1994; Zou et al., 1995; Klos, 1996). Por otra, parte en México se detectaron plaguicidas organoclorados en aguas de riego en el Valle de Mexicali (Carrillo y Vélez, 1996). Varios tipos de pesticidas se encontraron en camarón de granjas acuícolas del centro de Sinaloa y el puerto de San Blas, Nayarit (Ramírez, et al., 1996). Otros plaguicidas organoclorados se encuentran como contaminantes en leche materna de mujeres que habitan en zonas cercanas a Veracruz (Waliszewski et al., 1996).

Los efectos directos de la exposición a plaguicidas en el hombre comprenden daños que van desde simples irritaciones epidérmicas hasta envenenamientos, mutaciones genéticas, cáncer y finalmente la muerte (Gómez et al., 1992; Moses, 1992; IARC, 1991). Al mismo tiempo, los efectos genotóxicos de pesticidas y sus mezclas se reportan *in vitro* (Dolara et al., 1994).

Como se observa la contaminación del suelo, aire y agua por pesticidas representa un riesgo y su exposición ocurre de múltiples formas: ocupacional, ambiental o a través de su incorporación a los alimentos (Fig. 5).

**Figura 5. Vías de transferencia de los pesticidas en el ambiente y al hombre.** (http://iibce.edu.uy/posdata/drit.htm).




COMPUESTOS ORGANICOS PERSISTENTES Y SU PROBLEMÁTICA

Los COP'S son sustancias químicas que provocan enfermedades como: cáncer (Guillette, 1994), daño al sistema nervioso central y periférico, desórdenes reproductivos, quebrantamientos en el sistema inmunológico (Guillette, 1994; Guruge et al., 2001 y Lombardi, 1998), malformaciones en el nacimiento y hasta la muerte, tanto en humanos como en animales. Las Naciones Unidas dentro de su programa ambiental UNEP (United Nations Environmental Programme) seleccionaron los COP'S de mayor peligro; ocho son los **pesticidas organoclorados: aldrín, clordano, DDT, dieldrín, heptacloro, mirex, hexaclorobenceno y toxafeno; un químico industrial PCBs** y dos derivados de procesos de combustión industrial como **dioxinas y furanos** (Semarnap.gob.mx.2002). Estas sustancias duran por años en el ambiente (Fig. 6) debido a que sus estructuras químicas son muy estables y son absorbidas o

retenidas por los tejidos grasos de los animales (Piatrapiana et al., 2002) donde las concentraciones pueden aumentar hasta 70 mil veces respecto a los niveles ambientales (bioacumulación) (Guillette, 1994; Zhou et al., 1999) y dependiendo del nivel trófico que ocupan dentro de una cadena alimenticia: a mayor nivel acumulan mayores cantidades de estos químicos (Sun, et al., 2002 y Lippman, 1999). Algunos COP'S tienen, aún en cantidades muy pequeñas, actividad estrogénica antagonista o agonista e intervienen con el sistema endocrino, lo cual afecta la reproducción (Dunier, 1994; Guillette y Uribe, 2001). En los peces expuestos a los plaguicidas organoclorados se han observado cambios conductuales, dificultad para reproducirse y mortandad de peces jóvenes. Se demostró que el DDT es tóxico para todas las especies de peces estudiadas (Rendon, 1990). Aunado a lo anterior, (Gillette et al., 1994) reportaron un efecto sinérgico de estos xenobióticos que potencia su acción de 160 a 1,600 veces. El DDT fue uno de los pesticidas más utilizados, por lo menos en décadas pasadas. Por su persistencia puede encontrarse en terrenos labrantíos y en ambientes domésticos. No se disuelve en el agua, pero se absorbe en partículas suspendidas en el agua que se acumulan en los peces afectando su crecimiento, ya que tienen efectos inhibidores para algunas enzimas, disminuye la cantidad de ARN y afecta su reproducción. En algunos animales este insecticida causa cambios celulares en el hígado y el riñón. En el hombre se absorbe fácilmente por los tegumentos y por las vías respiratorias y digestivas. La intoxicación aguda produce nauseas, diarreas, aturdimiento, parálisis parcial de las extremidades, convulsiones y pérdida del conocimiento (Álvarez, 2003).

**Figura 6. Persistencia de algunos plaguicidas organoclorados en suelos**. (Rendon, 1990).

PERSISTENCIA DE ALGUNOS PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS EN SUELOS

| PLAGUICIDA | VIDA MEDIA (Años) |
|---|---|
| Aldrín | 5 |
| Clordano | 8 |
| DDT | 10.5 |
| Dieldrín | 7 |
| Endrín | 10 |
| Heptacloro | 4 |
| Lindano | 2 |
| Metoxicloro | — |
| Toxafeno | 11 |

Estas sustancias son reportadas como contaminantes en algunos cuerpos de agua incluido el Lago de Chapala.

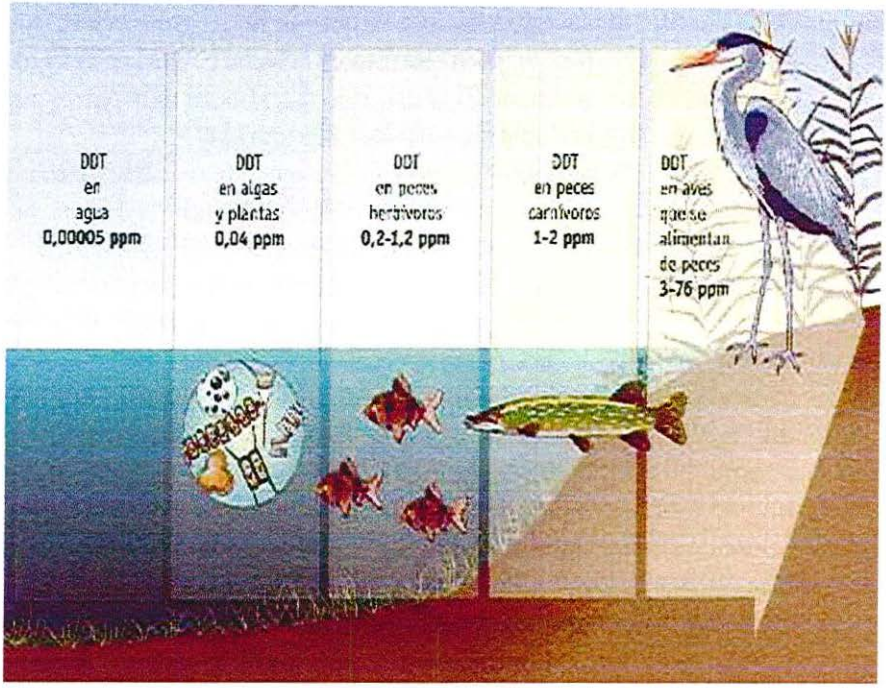
EFECTOS EN LAS CADENAS TROFICAS

Cuando los plaguicidas persistentes entran a las cadenas alimenticias, se distribuyen en ellas, se bioacumulan en cada nivel trófico y se biomagnifican sucesivamente hasta que alcanzan una concentración letal para algún organismo de la cadena, o hasta que llegan a los niveles superiores de la red. La bioacumulación depende, sobre todo, de la naturaleza química del compuesto, de la cantidad que esta en contacto con el organismo y de la velocidad de absorción y de excreción del tóxico en cada organismo. Las propiedades que favorecen que un plaguicida se bioacumule son: baja solubilidad en agua, liposolubilidad elevada y alta estabilidad ante la humedad, la luz, el calor y la presencia de microorganismos. La capacidad de bioacumulación y de biomagnificación de un producto esta en relación directa con su persistencia (Loera y Albert, 1990).

El consumo de peces con altos contenidos en grasa en el Mar Báltico alrededor de la costa de Suecia provocó altos niveles de dioxinas y furanos en la sangre de los consumidores. (http://www.greenpeace.org.ar/media/informes/2387.pdf). La emisión de dioxinas y furanos al medio ambiente marino por parte de la industria provocó altos niveles de contaminación en peces en la Bahía de Tokio en Japón (http://www.greenpeace.org.ar/media/informes/2387.pdf). Los peces de los ríos San Lorenzo y British Columbia, en Canadá, presentaron mayores concentraciones de dioxinas, furanos y PCBs tipo de dioxinas que los límites fijados por las descargas de la industria (http://www.greenpeace.org.ar/media/informes/2387.pdf). En la (Fig. 7) se representa el proceso de bioacumulación del DDT.

**Figura 7. El DDT se acumula en las grasas de los animales, y es mayor de acuerdo al nivel trófico.**

(http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/T2_inicio.pdf).




MUTACIÓN Y CÁNCER

Durante mucho tiempo el hombre observó que eventualmente ocurren cambios en las características visibles o funcionales de un organismo, por ejemplo: cambios en la altura o fertilidad de plantas o animales y aparición de enfermedades heredables. Algunos de estos cambios pueden conferir ventajas a un organismo pero, en la

mayoría de los casos no es así; se pueden observar organismos enfermos o anormales. Estos cambios o mutaciones se deben a alteraciones en la información genética (ADN) y pueden ser de varios tipos: génicos, cromosómicos y genómicos. Las consecuencias de los cambios dependerán de la importancia de los genes implicados, los nucleótidos afectados dentro del gen y las células en las que ocurran. En este sentido, encontramos dos tipos de mutación: germinales que son las que ocurren en los gametos (espermas y óvulos). Es obvio que un cambio de este tipo no afectará directamente al organismo que produce los gametos, pero si esta célula llega a dar origen a un nuevo ser, este presentará las consecuencias de dicho cambio ( Álvarez y Zaitseva, 2001). Si la mutación ocurre en células somáticas (cualquier célula del cuerpo excepto las germinales) pueden ocurrir varios eventos: a) la célula muere, b) la célula porta la anormalidad pero no resulta importante para el resto del organismo y c) la célula empieza a tener un comportamiento anormal: crecen sin control invadiendo diferentes tejidos hasta que finalmente ocasiona la muerte del organismo completo.

Las mutaciones puntuales son cambios en una o en pocas bases nitrogenadas en el ADN. La enfermedad de la anemia falciforme (Hb S) ejemplifica las consecuencias de una mutación de este tipo. Las mutaciones cromosómicas son alteraciones de fragmentos muy grandes de ADN; pérdida de secciones de un cromosoma o incluso de un cromosoma completo. Muchas enfermedades genéticas en el hombre son debidas a estos fenómenos. El cáncer puede ser originado, tanto por mutaciones de tipo puntual, es decir, debido al cambio de una sola base como a mutaciones de tipo cromosómico (Álvarez y Zaitseva, 2001).

Un carcinógeno o cancerígeno, es cualquier agente químico, biológico o físico que puede, en potencia, inducir cáncer. El término se aplica con más frecuencia a sustancias químicas introducidas en el ambiente por la actividad humana. Los investigadores clasifican una sustancia como carcinógeno cuando al afectar a una población, cuyos organismos no han sido expuestos a ella con anterioridad, se presenta un aumento estadísticamente significativo de alguna forma de neoplasia (crecimiento celular anómalo) (Trichopoulus et al., 1996).

Es importante notar que la incidencia de cáncer órgano-específico difiere dramáticamente entre regiones, algunos órganos muestran diferencias en los registros de cáncer, por lo que se cree que factores exógenos podrían ser los inductores, mientras que en otros órganos no se observa esto y los factores endógenos son probablemente los causantes (Torres, 2001).

**Cáncer**

Se calcula que el 80% de los cánceres son de tipo ambiental y sólo 2.5% son de origen genético (Pratt et al., 1994; Torres, 2001), esto significa de las personas que desarrollaron cáncer, alguna vez y de alguna forma, estuvieron en contacto con mutágenos y/o carcinógenos. La mutación es un prerrequisito para el desarrollo del cáncer: todo cáncer se originó a partir de una mutación, si bien, no todas las mutaciones producen cáncer, ya que nuestro sistema de reparación del material genético juega un papel muy importante (Torres, 2001). Para que el cáncer se produzca, existen múltiples factores: predisposición genética, sexo, edad, alimentación, salud, hábitos, etc. (Torres, 2001).

En la actualidad, el cáncer es una de las causas más importantes de la mortalidad en el mundo; ésta enfermedad es diferente para cada sexo (Grant, 1994), por ésta causa, ha preocupado tanto la presencia en el ambiente de sustancias de acción carcinogénica que incluyen tanto productos naturales como sintéticos. Existen suficientes pruebas que indican que una gran parte de los cánceres que afectan a la humanidad, son atribuidos a factores ambientales. Prevenir el cáncer de origen ambiental puede ser un gran propósito que iniciaría primeramente con la identificación de mutágenos y carcinógenos. Debe recordarse que la investigación clínica y los estudios epidemiológicos son esenciales en la identificación de carcinógenos ambientales que representen un riesgo para el humano (Albert, 1990). Desgraciadamente, los estudios de tipo epidemiológico, ofrecen datos una vez que ocurrió el problema, por tanto, contar con sistemas para detectar la presencia de

agentes mutagénicos en cualquier medio o bien medir la potencia carcinogénica de estos es sumamente conveniente.

Los estudios para evaluar mutagenicidad o carcinogenicidad se tornaron muy importantes a partir de la gran cantidad de cáncer que apareció en los habitantes de las ciudades atacadas con bombas atómicas (Loera y Albert, 1990). Después, la contaminación, los hábitos, medicación y consumo de alimentos contaminados han sido estudiados con estos sistemas. A la fecha, más de 300 diferentes sistemas se desarrollaron con muy diferentes propósitos, todos con ventajas y desventajas.

**Mutágenos**

Los mutágenos son agentes que pueden ocasionar cambios en el material genético de células (Ramírez, 2001), debido a esto, la frecuencia de mutación puede incrementarse con la exposición a ellos. Se dividen en tres grupos: agentes físicos, químicos y biológicos.

***Mutágenos físicos***

Aquí se agrupan varios tipos de radiaciones que elevan la frecuencia de eventos mutacionales como: rompimientos, rearrelos y/o distorsión de la cadena de ADN al alterar las bases (dímeros de timina) bloqueando así futuras replicaciones (Ramírez, 2001).

Rayos X

Los rayos X fueron descubiertos por Muller en 1927, desde entonces, la *Drosophila melanogaster* es el modelo más utilizado para estudiar las radiaciones y, con ella, se obtuvieron gran cantidad de datos sobre la inducción de mutaciones génicas y variaciones estructurales por estos agentes (Lindsley y Grell, 1968).

Rayos Ultravioleta (UV)

Los rayos ultravioleta inducen mutaciones de tipo puntual y cromosómica (Griggs y Bender, 1973; Meltz, 1991) y se han obtenido un gran número de mutantes en *Neurospora* en diversas levaduras (Lí y Loretz, 1991). En adición, el sistemático deterioro de la capa de ozono incrementó la penetración de este tipo de radiación y algunos estudios señalan la relación entre la exposición solar y el incremento de cáncer de piel.

Ondas ultrasónicas

Las ondas ultrasónicas con una frecuencia de 400.000 ciclos por segundo pueden producir mutaciones letales en *Drosophila melanogaster* (Ciaravino, et al., 1986), así como variaciones estructurales en los cromosomas somáticos de plantas (Meltz, 1991).

***Mutágenos químicos***

Los mutágenos químicos producen cambios en el ADN como son las sustituciones de bases y ocasionan errores de apareamiento. Se calcula que en la actualidad un ser humano común puede estar expuesto a un promedio de 100 mil diferentes sustancias, aunque se calcula que en la actualidad existen aproximadamente 10 millones de diferentes compuestos y la velocidad con la que se diagnostica su peligrosidad genética es notablemente inferior a la cantidad de nuevas sustancias producidas (Ramírez, 2001).

***Mutágenos biológicos***

Respecto a los mutágenos biológicos éstos producen cambios que van desde simples rompimientos cromosómicos hasta la pulverización total del complemento cromosómico (Ramírez, 2001). Los virus pueden producir diferentes tipos de cánceres en animales, por ejemplo, en el ser humano, el virus de Epstein-Barr se asocia con el linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaringeo y los linfo epiteliomas, el virus de la

hepatitis B esta implicado con el hepatocarcinoma, el virus herpes simple (tipo 2) y varios tipos de papiloma, virus humanos están relacionados con el cáncer cervical (Ramírez, 2001).

## SISTEMAS PARA LA DETECCIÓN DE DAÑO GENÉTICO

El sistema más adecuado para detectar actividad mutagénica es aquel que localiza los mutágenos antes de que estos manifiesten sus efectos en los seres humanos. Por lo anterior, resulta apropiado basarnos en datos obtenidos en sistemas de prueba sobre otros organismos, siempre y cuando estén expresadas las limitaciones y diferencias en el metabolismo y en los sistemas de reparación del ADN (Li y Loretz, 1991). Algunos autores opinan que tales diferencias no son tan evidentes y que los resultados pueden extrapolarse inclusive al hombre, de tal suerte que, estos tipos de estudios se han recomendado a la Organización Mundial de la Salud (Grant et al., 1992).

En muchos paises se establecieron los requisitos de ensayos (agudo o de corto plazo y crónico o de largo plazo) y se fijaron normas y niveles de tolerancia, así como, el desarrollo de una serie de bioensayos de tiempos cortos para la observación de cambios genéticos. Estos sistemas de prueba tienen diferentes propósitos como son: (1) búsqueda de productos ambientales con propiedades mutagénicas, (2) identificación de carcinógenos en fluidos del cuerpo, (3) entendimiento de los mecanismos de la activación química de carcinógenos y sus reacciones con el ADN y (4) predicción de carcinogenicidad de sustancias. Generalmente se requieren de 2 o 3 bioensayos para afirmar que una sustancia química es carcinogénica (Casiano, 1991).

Actualmente se cuenta con una gran variedad de pruebas con las que se puede determinar daño genético o detectar compuestos genotóxicos, estas pruebas pueden ser bioquímicas, realizarse *in vivo o in vitro*, con microorganismos o macroorganismos y pueden determinar daño microscópico o molecular (Ramírez, 2001).

El cáncer y los efectos teratogénicos son algunos de los peligros para la salud debidos a la exposición de sustancias durante plazos largos (Montesano y Tomatitis, 1977). Por lo anterior, es necesario el uso de indicadores biológicos para

evaluar la calidad del ambiente, por ello, se desarrollaron diferentes sistemas de prueba o bioensayos para detectar daño genético inducido por agentes químicos y físicos en plantas (Grant y Salamone, 1994; Ichikawa, 1992; Grant, 1994; Grant et al., 1992), en insectos (Graf y Singer, 1992; Graf et al., 1984) y en bacterias (Ames et al., 1973). Los sistemas de prueba antes mencionados poseen ventajas y desventajas que deben de ser consideradas seriamente para obtener mejores resultados. Así pues, resulta apropiado basarnos en datos obtenidos en sistemas de prueba sobre otros organismos (bioensayos), siempre y cuando estén expresadas las limitaciones y diferencias en el metabolismo y en los sistemas de reparación del ADN (Li y Loretz, 1991).

**Prueba de mutación rosa en *Tradescantia* (clon 4430)**

La prueba de mutación rosa es un excelente bioensayo para la detección de cambios genéticos provocados por diferentes compuestos químicos y físicos en el medio ambiente, sin embargo, los resultados pueden variar de acuerdo a la naturaleza de los agentes (Álvarez y Santerre, 2001).

Algunas especies de *Tradescantia*, entre ellas, *Tradescantia virginiana* tienen la característica de poseer pocos cromosomas. Existen más especies como son: *Tradescantia occidentalis, Tradescantia ohiensis, Tradescantia subacaulis y Tradescantia hirsutiflora,* con estas dos últimas se logró obtener un híbrido conocido como clon 4430 (Fig. 8).

El clon 4430 se propaga vegetativamente y se puede mantener en condiciones de invernadero donde florece por largos periodos de tiempo. El principio básico de prueba de *Tradescantia* (clon 4430) se basa en el color de las células estaminales de la flor (Fig. 9) como criterio para determinar mutaciones (Mericle y Mericle, 1967). El clon es heterocigoto para el color de la flor (Aa) en la que se expresa el color azul de los pelos estaminales como dominante y el color rosa como recesivo (Mericle y Mericle, 1967).

Cuando los pelos estaminales son jóvenes se encuentran en división celular activa, esta etapa es adecuada para la inducción de mutaciones. Cada pelo estaminal se deriva de una célula epidérmica simple y crece a través de divisiones sucesivas de células terminales y subterminales. En la madurez los estambres muestran un rango de

40-70 pelos cada uno conteniendo arriba de 32 células aproximadamente (el número varia de acuerdo al clon y a las condiciones de cultivo) (Aguilera, 1996).

**Figura 8. Flor de *Tradescantia* clon 4430** (Álvarez Moya C. y Santerre Lucas A., 2001).

**Figura 9. Pelos estaminales de *Tradescantia* clon 4430. Pueden observarse las células rosa que representan el alelo mutado Aa→aa** (Álvarez Moya C. y Santerre Lucas A., 2001).

**Prueba del cometa alcalino**

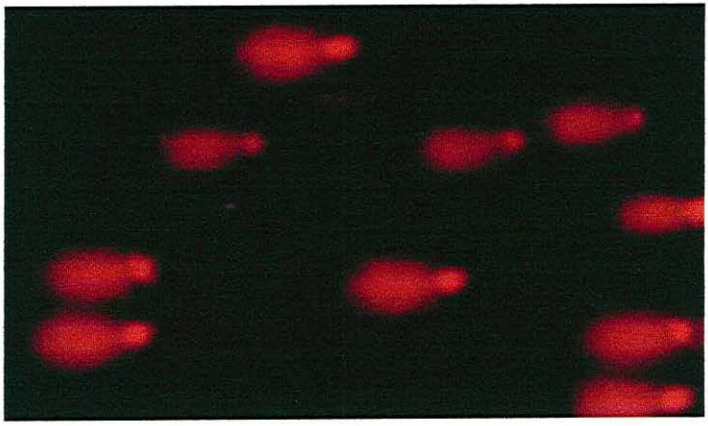
En 1988 se mejoró una técnica que detecta alteraciones del ADN en células individuales conocida como "prueba del cometa alcalino" (PCA) o electroforesis de células individuales (Singh et al., 1988). La PCA permite medir el rompimiento en el ADN y detectar sitios sensibles al álcali en células de mamífero y algunas plantas (Arévalo, 1999; Tebbs et al., 1999; Wagner et al., 1998: Koppen y Verschaeve, 1996, Zuñiga, 2001) y es muy empleada ya que es rápida, simple y sensible. Otras técnicas utilizadas para medir el daño al ADN, detectan la fragmentación pero involucran la lisis de una población de células de modo que ellas miden la media de la respuesta de las células individuales y no la respuesta de cada célula.

Con PCA es posible obtener imágenes, lo que facilita la observación y el análisis, además de que su costo es bajo, por lo que es una excelente herramienta para la detección de agentes genotóxicos, bastan sólo unas cuantas células (1-10,000) para realizar el ensayo y los resultados se obtienen en un día (McKelvey et al., 1993; Fairbair et al., 1995). Con esta prueba se estudió la inducción de daño sobre el ADN en células cultivadas y en suspensión, así como en sistemas *in vivo*. La PCA tiene varias ventajas: (A) Es posible investigar el grado de rompimiento del ADN en pequeñas muestras de tejidos animales y biopsias humanas. (B) Se lleva a cabo en pocas horas y, si se cuenta con un analizador de imágenes, los resultados son obtenidos y evaluados inmediatamente. (C) En términos generales, el equipamiento es el mismo utilizado para otros ensayos de poca duración con excepción del analizador de imágenes, el cual es costoso, pero resulta ventajoso tenerlo.

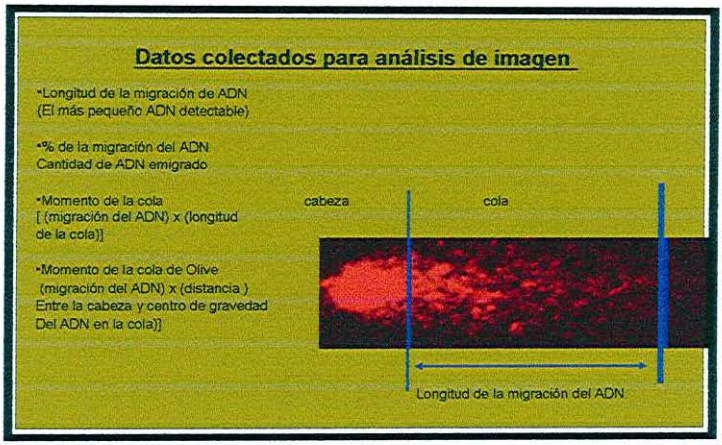
En esta técnica los núcleos de las células o las células mismas se colocan dentro de un gel de agarosa sobre un portaobjetos, posteriormente son electroforizadas por poco tiempo bajo condiciones alcalinas. Las células con un incremento de daño en su material genético presentan una mayor migración de los fragmentos de ADN hacia el

ánodo o bien, una mayor intensidad ( fluorescencia) de la cauda con respecto a las células normales. El resultado de lo anterior es un núcleo con apariencia de un cometa en la cual pueden analizarse distintos parámetros que miden el daño genético (Fig. 10a y b). La longitud de la migración se cuantifica en el microscopio de fluorescencia una vez que se han teñido los núcleos con bromuro de etidio (Singh et al., 1988).

**Figura 10. (a) Núcleos cometizados observados con microscopía de fluorescencia donde se observa el típico "cometa". (b) Parámetros analizados sobre la imagen de un cometa mediante el análisis de imágenes.** (http://www.cometassay.com)



a


Datos colectados para análisis de imagen
•Longitud de la migración de ADN
(El más pequeño ADN detectable)
•% de la migración del ADN
Cantidad de ADN emigrado
•Momento de la cola
[ (migración del ADN) x (longitud
de la cola)]
•Momento de la cola de Olive
(migración del ADN) x (distancia )
Entre la cabeza y centro de gravedad
Del ADN en la cola)]
cabeza
cola
Longitud de la migración del ADN

b

# JUSTIFICACIÓN

Los COP'S son un grupo de sustancias con actividad genotóxica frecuentemente encontrados como contaminantes en diversos cuerpos de agua incluyendo el Lago de Chapala. Pueden bioacumularse en los tejidos animales, particularmente en hígado, donde podrían ocasionar daño genético y cáncer. Además se sabe que la bioacumulación es mayor en animales que se encuentran al final de la cadena trófica. A la fecha no existen reportes sobre la relación bioacumulación daño genético en hígado y sangre de organismos que habitan en cuerpos de agua contaminados con COP'S. Por lo tanto este tipo de estudios contribuirá a determinar la peligrosidad genética de sustancias bioacumulables en los organismos.

# HIPÓTESIS

La bioacumulación de COP´S en los tejidos *Goodea atripinnis* induce daño genético en células hepáticas y eritrocitarias manifestado por un incremento en la longitud de la cauda cuando estas son sometidas a la electroforesis unicelular (prueba del cometa).

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la concentración de COP´S en el agua de Chapala, su bioacumulación y el daño genético en hígado y sangre de *Goodea atripinnis*.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.1 Determinar la concentración de COP'S en el agua del Lago de Chapala en dos épocas del año (sequía y lluvias).

1.2 Determinar la concentración de COP'S en hígado de *Goodea atripinnis* en el Lago de Chapala.

1.3 Modificar la técnica de PCA para células de hígado y sangre de *Goodea atripinnis.*

1.4 Evaluar el daño genético del COP'S en hígado y sangre de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala mediante la prueba del cometa (PCA).

1.5 Relacionar el daño genético de hígado y sangre de *Goodea atripinnis* con la concentración de COP'S en aguas e hígado.

# MATERIAL Y METODOS

**Tipo de estudio.** Experimental, transversal y prospectivo.

***Goodea atripinnis.*** Se colectaron varios ejemplares del Lago de Chapala (Isla Alacranes y Petatán) en dos épocas del año (sequía y lluvia) mediante el empleo de tarrayas para charales. Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca con jeringa heparinizada, inmediatamente después de disectar, se transportó al laboratorio. El hígado fue obtenido por disección completa y se colocó en una bolsa de polietileno con hielo.

**Toma de muestra de agua.** Se colectaron muestras de agua en varios sitios del lago de Chapala (Puerto Corona, Petatán (Michoacán), Isla Alacranes y Chapala) y la laguna de Sayula (Atoyac y la Joya), en frascos completamente limpios y se trasladaron al laboratorio para la obtención de tejido y envío inmediato a cuantificación de COP´S. Una parte de este tejido se utilizó para el estudio con la prueba del cometa.

**Diseño experimental**. La Laguna de Sayula no tiene los fuertes problemas de contaminación que presenta Chapala, por lo tanto 10 peces de este lugar fueron usados como controles (5 por lugar muestreado). Se obtuvieron la misma cantidad de muestras con el mismo tratamiento que en el caso de Chapala. Se espera tener una diferencia significativa entre las muestras de Chapala con las obtenidas en Sayula. Se realizó la toma de muestras en época de lluvias y secas en ambas localidades.

*Preparación de células para ensayo del cometa.* Las muestras de hígado fueron lavadas con PBS/solución salina. Para la disociación celular se incubó en 10 mililitros de PBS conteniendo 200 mM de N-t-butil-alfa-fenilnitrona de 30 minutos a una hora. Las células suspendidas se deben centrifugar a 5,000 rpm por 10 minutos. Se quitó el sobrenadante y se resuspendió el pellet. En el caso de la sangre se usó sin separación (entera) directamente los eritrocitos para la prueba del cometa alcalino (PCA).

*Ensayo Cometa alcalino (PCA).* Se prepararon dos laminillas por espécimen para microelectroforesis como describe Belpaeme et al.(1998). Posteriormente se colocó en

Buffer de lisis fresco y frío por 1 a 2 horas (2.5 M NaCl, 100 mM $Na_2EDTA$, 10mM Tris, 1% N-lauroylsarcosina, 1% Triton –X 100, 10% DMSO). Después de la lisis, se realizó la electroforesis a 18°C. Se colocó a continuación el buffer para electroforesis en la cámara de electroforesis (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH> 13). La electroforesis se realizó a 25 v, 300 mA, 10 a 20 minutos. Al finalizar la electroforesis, las laminillas fueron neutralizadas con 0.4 M tris (pH = 7.5). Se neutralizo 3 veces por 5 minutos cada vez. Después se fijó por 5 minutos en metanol puro frío. Se procedió a su impregnación con bromuro de etidio (para microscopio de fluorescencia). La observación al microscopio óptico o de fluorescencia se realizó a 10x, 45x y 100x. Se midió la longitud de la cola del cometa de al menos 100 células por laminilla (en promedio se midieron hasta 500 células).

Las laminillas fueron analizadas por un solo observador para minimizar la variabilidad por este conteo (Singh et al., 1988).

**Análisis estadístico para PCA.** Se analizaron por lo menos100 cometas por tejido para obtener la media de migración del ADN para PCA. Los datos se analizaron con el programa ESTADISTICA y se utilizó el análisis de varianza de una cola (ANOVA) que compara los resultados del grupo de estudio con los datos de los testigos.

**Determinación de COP'S.** La determinación de COP'S se realizó por cromatografía de gases (GC) por columna capilar con detector por captura de electrón (ECD). Para muestras líquidas y sólida, siguiendo el método 608 y 8080 de la EPA (EPA, 1994). Se colectaron muestras de agua, se congelaron a 18° C hasta el momento de su análisis. La sensibilidad del cromatógrafo permite el uso de 1 microlitro de líquido a medir, por lo que una pequeña porción de cada tejido es suficiente para obtener esta cantidad.

**Análisis de agua.** Se obtuvo la muestra de COP'S por extracción líquido-líquido (LLE) con diclorometano (DCM). Para su análisis se condensaron (deshidrataron) por evaporación y re-disolvieron en 5 mililitros de hexano, para finalmente concentrarlas a 0.2 mililitros bajo una suave corriente de $N_2$, y se inyectó una alícuota de 1 microlitro del extracto al cromatógrafo de gases. Como control negativo se usó agua destilada sometida al mismo tratamiento y se sometió al cromatógrafo de gases 5890 de Hewlett Packard con detector de captura de electrones (ECD), usando el método PLAGA. MTH

bajo las siguientes condiciones de operación (Datos enviados por Ingeniería de proyectos de la Universidad de Guadalajara).

Columna:

Ultra 2 Crosslinked 5% Ph Me Silicona

25m x 0.20 mm x 0.33 microlitros

Gas acarreador: Nitrogeno a 10 psi.

Temperatura del inyector: 250° C.

Temperatura del detector (ECD): 300° C.

Temperatura en el horno: 100 ° C durante un minuto con incremento de 30° C/min hasta 150° C permaneciendo así 2 minutos, incrementando 9° C/min hasta 205° C permaneciendo así durante 0 minutos y por último un incremento de 15° C/min hasta 280° C permaneciendo así durante 10 minutos.

Flujo de división: 100 ml/min.

Inyección:

Para RF04288A.D se inyectó directamente 1 microlitro de muestra extraída en hexano.

Para STPLAGUI.D se inyectó directamente 1 microlitro de estándar de organoclorados de 0.5 ppm.

Para HEXARECU.D se inyectó directamente 1 microlitro de hexano recuperado.

**Análisis de tejido**. El tejido se descongeló, homogenizó y suspendió en 5 mililitros de hexano, se filtró (poro de 1 micra de diámetro) para evitar que el pesticida eluido se contamine con microorganismos (Miller, 1992) y se introdujo al cromatógrafo estandarizado con el kit básico para detección de compuestos organoclorados y PCBs de la EPA (EPA, 1994). (Datos enviados por Ingeniería de proyectos de la Universidad de Guadalajara).

Se sometió al cromatógrafo de gases 5890 de Hewlett Packard con detector de captura de electrones (ECD), usando el método **PLAGA.MTH** bajo las siguientes condiciones de operación.

Columna:

Ultra 2 crosslinked 5% Ph Me Silicona

25m x 0.32 mm x 0.52 microlitros

Gas acarreador: Nitrogeno a 10 psi.

Temperatura del inyector: 250 °C

Temperatura del detector (ECD): 300°C.

Temperatura en el horno: 100°C durante un minuto con incremento de 30°C/min hasta 150°C permaneciendo así 2 minutos, incrementando 9°C/min hasta 205°C permaneciendo así durante 0 minutos y por último un incremento de 15°C/min hasta 280°C permaneciendo así durante 10 minutos.

Flujo de división: 100 ml/min.

Inyección:

Para RF04287.D se inyectó directamente 1 microlitro de muestra extraída en cloruro de metileno.

Para STPLAGUI.D se inyectó directamente 1 microlitro de estándar de organoclorados de 0.5 ppm.

Para CH2CL2RE.D se inyectó directamente 1 microlitro de cloruro de metileno recuperado.

# RESULTADOS

***Cuantificación cromatográfica de COP´S en aguas.*** La cuantificación cromatográfica de los COP´S en muestras de agua del Lago de Chapala y la Laguna de Sayula durante 4 etapas (dos años) se presenta en la **tabla 1**. Todas las lecturas indican muy bajas concentraciones de COP´S tanto en Chapala como en Sayula y, además, muy cerca del límite de resolución del cromatógrafo utilizado. La concentración de **metoxicloro, 2,4 D y DDT** en aguas de Chapala y Sayula se incrementan de la 1ª a la 2ª etapa en aproximadamente 10 veces la concentración, pero las concentraciones de **hexaclorobenceno, heptacloro y epóxido de heptacloro disminuyen** notablemente en la segunda etapa (lluvias) en Sayula y para Chapala sólo disminuye el heptacloro.

**Tabla 1. Concentración de COP´S en las muestras de agua de Chapala y Sayula a lo largo de 2 años.**

| COP´S | Chapala | | | | Sayula | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Etapa 1, sequía 02/2004 P | Etapa 2, lluvias 10/2004 P | Etapa 3, sequía 05/2005 P | Etapa 4, lluvias 12/2005 P | Etapa 1, sequía 02/2004 P | Etapa 2, lluvias 10/2004 P | Etapa 3, sequía 05/2005 P | Etapa 4, lluvias 12/2005 P |
| Lindano | <0.0023 | <0.002 | Pérdida de muestras | <0.002 | <0.0023 | <0.0023 | <0.002 | <0.002 |
| Aldrín | <0.0004 | <0.00003 | | <0.00003 | <0.0004 | <0.00003 | <0.00003 | <0.00003 |
| Dieldrín | <0.0005 | <0.00003 | | <0.00003 | <0.0005 | <0.00003 | <0.00003 | <0.00003 |
| Clordano | <0.0003 | <0.0003 | | <0.0003 | <0.0003 | <0.0003 | <0.0002 | <0.0003 |
| DDT | <0.0006 | <0.001 | | <0.001 | <0.0006 | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| Hexacloroben ceno | <0.0001 | <0.0001 | | <0.001 | <0.0001 | <0.00001 | <0.001 | <0.001 |
| 2,4,D | <0.002 | <0.05 | | <0.03 | <0.002 | <0.05 | <0.03 | <0.03 |
| Heptacloro | <0.0005 | <0.00001 | | <0.00003 | <0.0005 | <0.00003 | <0.00003 | <0.00003 |
| Epóxido de Heptacloro | <0.0004 | <0.0003 | | <0.00003 | <0.0004 | <0.00003 | <0.00003 | <0.00003 |
| Metoxicloro | <0.0022 | <0.02 | | <0.02 | <0.0022 | <0.02 | <0.02 | <0.02 |

**P= promedio de las regiones 1 y 2 en partes por millón**

Tanto en Chapala como en Sayula se observa una notable disminución de la aldrín y dieldrín durante la época de lluvias (etapa 2). Lindano y clordano mantienen la misma concentración en la etapa 1 y 2 tanto en Chapala como en Sayula.

En la etapa 3 (sequía) en Sayula los valores tienden a ser muy similares a la etapa 2 (lluvia) con excepción del hexaclorobenceno cuya concentración se incrementó 10 veces. En la etapa 4 (lluvias 2005) se encontraron las mismas concentraciones de COP´S que en la etapa 3.

***Cuantificación cromatográfica de COP´S en tejido.*** Al igual que en las muestras de agua también se realizó la cuantificación cromatográfica de los COP´S en hígado de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala y la Laguna de Sayula en dos épocas del año durante dos años y los datos se presentan en las **tablas 2, 3, 4 y 5. En la etapa 1 (Tabla 2)** no existen diferencias de concentración de COP´S entre hígado de peces de Chapala y Sayula, a excepción del 2,4 D cuya concentración está 10 veces más alta en Chapala.

La media de migración de las caudas en hígado y eritrocitos de peces de la Laguna de Sayula es mayor que en Chapala. La comparación de la longitud de los cometas mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$).

**Tabla 2. Concentración de COP´S en tejidos de *Goodea atripinnis* de Chapala y Sayula**

| TEJIDOS CHAPALA | MEDIA ( X ) COMETA MIGRACIÓN EN MICRAS | PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE COP´S EN PARTES POR MILLÓN EN TRES DIFERENTES MUESTRAS DE HÍGADO | |
|---|---|---|---|
| Eritrocitos de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala | 17.84 ± 6.385 | | |
| Hepatocitos de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala | 29.40 ± 12.013 | Lindano | <0.0023 |
| | | Aldrín | < 0.0004 |
| | | Dieldrín | <0.0005 |
| | | Clordano | <0.0003 |
| | | DDT | <0.0006 |
| | | Hexaclorobenceno | <0.00001 |
| | | 2,4,D | <0.02 |
| | | Heptacloro | <0.0005 |
| | | Epóxido de heptacloro | <0.0004 |
| | | Metoxicloro | < 0.0022 |
| **TEJIDOS SAYULA** | | | |
| Eritrocitos de *Goodea atripinnis* de Laguna de Sayula | 27.83 ± 5.469 | | |
| Hepatocitos de *Goodea atripinnis* de Laguna de Sayula | 30.63 ± 27 235 | Lindano | <0.0023 |
| | | Aldrín | < 0.0004 |
| | | Dieldrín | <0.0005 |
| | | Clordano | <0.0003 |
| | | DDT | <0.0006 |
| | | Hexaclorobenceno | <0.00001 |
| | | 2,4,D | <0.002 |
| | | Heptacloro | <0.0005 |
| | | Epóxido de heptacloro | <0.0004 |
| | | Metoxicloro | < 0.0022 |

**Comparación de la migración del ADN (tamaño de la cauda) entre núcleos hepáticos y eritrocitos de peces de Chapala y la Laguna de Sayula.**

| MUESTRAS | HGS | EGS |
|---|---|---|
| HGCH | P<0.001 | |
| EGCH | | P<0.001 |

**en la etapa 1 (02/2004, sequía). Se presenta también la migración promedio de la cauda del cometa y en la parte inferior su comparación estadística.**

HGS Hígado *Goodea atripinnis* Sayula; EGS Eritrocitos *Goodea atripinnis* Sayula
HGCH *Goodea atripinnis* Chapala ;EGCH *Goodea atripinnis* Chapala.

**En la etapa 2 (tabla 3).** No existen diferencias en la concentración de COP´S entre hígado de peces de Chapala y Sayula. La media de migración de las caudas en hígado y eritrocitos de peces del Lago de Sayula es nuevamente mayor que en Chapala. La comparación de la longitud de los cometas mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$).

**Tabla 3. Concentración de COP´S en tejidos de *Goodea atripinnis* de Chapala y Sayula en la etapa 2 (10/2004, lluvias). Se presenta también la migración promedio de la cauda del cometa y su comparación estadística en la parte inferior.**

| TEJIDOS CHAPALA | MEDIA ( X ) COMETA MIGRACIÓN EN MICRAS | PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE COP´S EN PARTES POR MILLÓN EN TRES DIFERENTES TEJIDOS | |
|---|---|---|---|
| Eritrocitos de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala | 21.89 ±1 0.38 | | |
| Hepatocitos de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala | 23.54 ± 4.607 | Lindano | <0.002 |
| | | Aldrín | < 0.00003 |
| | | Dieldrín | <0.00003 |
| | | Clordano | <0.0003 |
| | | DDT | <0.001 |
| | | Hexaclorobenceno | <0.00001 |
| | | 2,4,D | <0.05 |
| | | Heptacloro | <0.00003 |
| | | Epóxido de heptacloro | <0.00003 |
| | | Metoxicloro | < 0.02 |
| **TEJIDOS SAYULA** | | | |
| Eritrocitos de *Goodea atripinnis* de Laguna de Sayula | 28.89 ± 5.301 | | |
| Hepatocitos de *Goodea atripinnis* de Laguna de Sayula | 28.26 ± 5.420 | Lindano | <0.002 |
| | | Aldrín | < 0.00003 |
| | | Dieldrín | <0.00003 |
| | | Clordano | <0.0003 |
| | | DDT | <0.001 |
| | | Hexaclorobenceno | <0.00001 |
| | | 2,4,D | <0.05 |
| | | Heptacloro | <0.00003 |
| | | Epóxido de heptacloro | <0.00003 |
| | | Metoxicloro | < 0.02 |

**Comparación de la migración del ADN (tamaño de la cauda) entre núcleos hepáticos y eritrocitos de peces de Chapala y la Laguna de Sayula.**

| MUESTRAS | HGS | EGS |
|---|---|---|
| HGCH | P<0.001 | |
| EGCH | | P<0.001 |

**En la etapa 3 (tabla 4).** En la 3ª etapa no fue posible realizar la cuantificación cromatográfica de los COP´S en tejidos, si bien se realizó el estudio de daño genético. La media de migración de las caudas en hígado de peces de Chapala es superior a los de la Laguna de Sayula no así para el caso de los eritrocitos. La longitud de los cometas mostró diferencias estadísticamente significativas (P < 0.001).

**Tabla 4. Migración promedio de la cauda del cometa en tejidos de *Goodea atripinnis* de Chapala y Sayula en la etapa 3 (02/2005, sequía) y en la parte inferior su comparación estadística.**

| TEJIDOS CHAPALA | MEDIA ( X ) COMETA MIGRACIÓN EN MICRAS | PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE COP´S EN PARTES POR MILLÓN EN TRES DIFERENTES TEJIDOS |
|---|---|---|
| Eritrocitos de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala | 13.29 ± 2.063 | |
| Hepatocitos de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala | 15.86 ± 4.629 | Lindano<br>Aldrín<br>Dieldrín<br>Clordano<br>DDT<br>Hexaclorobenceno<br>2,4,D<br>Heptacloro<br>Epóxido de heptacloro<br>Metoxicloro |
| **TEJIDOS SAYULA** | | |
| Eritrocitos de *Goodea atripinnis* de Laguna de Sayula | 23.29 ± 6.956 | |
| Hepatocitos de *Goodea atripinnis* de Laguna de Sayula | 14.80 ± 2.268 | Lindano<br>Aldrín<br>Dieldrín<br>Clordano<br>DDT<br>Hexaclorobenceno<br>2,4,D<br>Heptacloro<br>Epóxido de heptacloro<br>Metoxicloro |

**Comparación de la migración del ADN (tamaño de la cauda) entre núcleos hepáticos y eritrocitos de peces de Chapala y la Laguna de Sayula.**

| MUESTRAS | HGS | EGS |
|---|---|---|
| HGCH | P<0.001 | |
| EGCH | | P<0.001 |

**En la etapa 4 (tabla 5).** En la 2ª y 4ª etapa los niveles de COP´S se mantienen prácticamente idénticos tanto en Chapala como en Sayula a excepción del hexaclorobenceno de Sayula cuya concentración se incrementó 100 veces. La media de migración de las caudas de eritrocitos de peces en la Laguna de Sayula es superior a los de Chapala. En el caso de hepatocitos de peces de la Laguna de Sayula la cauda resulto menor a los de peces de Chapala. La longitud de los cometas mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$).

**Tabla 5. Concentración de COP´S en tejidos de *Goodea atripinnis* de Chapala y Sayula en la etapa 4 (12/2005, lluvias). Se presenta también la migración promedio de la cauda del cometa y en la parte inferior su comparación estadística.**

| TEJIDOS CHAPALA | MEDIA ( X ) COMETA MIGRACIÓN EN MICRAS | PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE COP´S EN PARTES POR MILLÓN EN TRES DIFERENTES TEJIDOS | |
|---|---|---|---|
| Eritrocitos de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala | 19.75 ± 3.335 | | |
| Hepatocitos de *Goodea atripinnis* del Lago de Chapala | 27.81 ± 5.612 | Lindano | <0.002 |
| | | Aldrín | < 0.00003 |
| | | Dieldrín | <0.00003 |
| | | Clordano | <0.0002 |
| | | DDT | <0.001 |
| | | Hexaclorobenceno | <0.001 |
| | | 2,4,D | <0.03 |
| | | Heptacloro | <0.00003 |
| | | Epóxido de heptacloro | <0.00003 |
| | | Metoxicloro | < 0.02 |
| **TEJIDOS SAYULA** | | | |
| Eritrocitos de *Goodea atripinnis* de Laguna de Sayula | 38.84 ± 5.843 | | |
| Hepatocitos de *Goodea atripinnis* de Laguna de Sayula | 24.93 ± 5.865 | Lindano | <0.002 |
| | | Aldrín | < 0.00003 |
| | | Dieldrín | <0.000003 |
| | | Clordano | <0.0002 |
| | | DDT | <0.001 |
| | | Hexaclorobenceno | <0.001 |
| | | 2,4,D | <0.03 |
| | | Heptacloro | <0.00003 |
| | | Epóxido de heptacloro | <0.00003 |
| | | Metoxicloro | < 0.02 |

**Comparación de la migración del ADN (tamaño de la cauda) entre núcleos hepáticos y eritrocitos de peces de Chapala y la Laguna de Sayula.**

| MUESTRAS | HGS | EGS |
|---|---|---|
| HGCH | P<0.001 | |
| EGCH | | P<0.001 |

El comportamiento de los COP´S en las diferentes etapas tanto en Chapala como en Sayula se muestra en las tablas 2, 3, 4, y 5.

Los COP´S que incrementan su concentración de una etapa a otra tanto en Chapala como en Sayula son clordano, ddt y hexaclorobenceno. El 2,4d se mantuvo constante en Chapala no así en Sayula donde se incremento. Los COP´S que bajan de concentración (dilución) son lindano, aldrín, dieldrín y epóxido de heptacloro. Clordano se mantuvo constante en todas las etapas de ambos embalses.

## DISCUSIÓN

Los COP'S son sustancias químicas que provocan diversas enfermedades, entre ellas el cáncer e incluso la muerte (Guillette, 1994 y Rendon, 1990). Los COP'S de mayor peligro son ocho: aldrín, dieldrín, clordano, DDT, heptacloro, mirex, hexaclorobenceno y toxafeno (pesticidas organoclorados), además de un químico industrial: PCBs y dos derivados de procesos de combustión e industrial como dioxinas y furanos (Semarnap.gob.mx.2002). De acuerdo con Martínez (1994), los principales plaguicidas encontrados en aguas subterráneas en México son: DDT, lindano, clordano, metoxicloro, toxafeno, aldrín y dieldrín. En el presente estudio se encontró que efectivamente están presentes en aguas de Chapala y Laguna de Sayula (**Tabla 1**), como se observa, los COP´S que aumentan de concentración de la 1ª a la 2ª etapa en Chapala y Sayula son **DDT, 2,4 D y metoxicloro,** lo que indica que estos son arrastrados hasta los cuerpos de agua durante la temporada de lluvias (Rendon, 1990) ocasionando un incremento de su concentración pero, después (etapa 3), se mantienen constante, incluso puede incrementarse de continuar su uso. Como se observa, el comportamiento es el mismo en Chapala y en Sayula. Los COP´S que bajan de concentración de la 1ª a la 2ª etapa son **heptacloro, aldrín y dieldrín**, inclusive se mantuvieron constantes en la 3ª y 4ª etapa tanto en Chapala como en Sayula. Al parecer la lluvia no los arrastra sino que se encuentran presentes en forma residual **(persistencia)** diluyéndose con la entrada de agua. El dato significa, probablemente, que estas sustancias ya no se utilizan pero que se mantienen en niveles residuales ya que como sabemos, duran años en el ambiente (Piatrapiana et al., 2002 y Rendon, 1990) y, además, están prohibidas en México (Semarnap, 2002). Lindano y clordano se mantuvieron en las mismas concentraciones de la 1ª a la 4ª etapa y tuvieron un comportamiento similar en los dos embalses. El epóxido de heptacloro que disminuyó durante las lluvias ( 2ª etapa) en Sayula e indica dilución y contaminación residual.

Los COP´S pueden ser absorbidos o retenidos en los tejidos grasos de los animales bioacumulándose incluso miles de veces respecto a las condiciones ambientales (Gillette, 1994 y Albert, 1990). El análisis de COP´S en hígado de *Goodea*

*atripinnis* de Chapala y Sayula durante 1ª etapa (**Tabla 2**) mostró que todos los COP´S están en concentraciones similares a excepción del 2,4 D cuya concentración mostró un incremento de 10 veces la concentración (0.02 ppm) en Chapala con respecto a Sayula (0.002 ppm) y más concentradas que los más altos niveles encontrados en el agua de Chapala (0.05 ppm) y Sayula (0.05 ppm) indicando cierta bioacumulación.

Las concentraciones de COP´S en peces de Chapala y Sayula para la 2ª etapa no mostraron diferencias, sin embargo se observó un fuerte impacto por la época en Chapala: En la 2ª etapa aldrín, dieldrín, heptacloro y epóxido de heptacloro parecen diluirse mientras que metoxicloro, DDT y 2,4 D se incrementaron durante la lluvia. Para Sayula se observó un comportamiento de estas sustancias muy similar a Chapala. Este comportamiento es muy semejante a lo encontrado en los COP´S de aguas (**Tabla 1**). Lo anterior podría indicar que si bien la bioacumulación existe esta no necesariamente es definitiva. Para la 3ª etapa no fue posible realizar la cuantificación cromatográfica de los COP´S en tejidos, si bien se realizó es estudio de daño genético.

En la 2ª y 4ª etapa los niveles de COP´S se mantienen prácticamente idénticos tanto en Chapala como en Sayula a excepción del hexaclorobenceno de Sayula cuya concentración se incrementó 100 veces denotando una fuerte y reciente contaminación por este compuesto.

**Daño genético.** Una sustancia se considera mutagénica cuando daña el ADN (Álvarez y Zaitseva, 2001) y carcinogénica cuando afecta a una población, cuyos organismos no han sido expuestos a ella con anterioridad, provoca un aumento estadísticamente significativo de alguna forma de neoplasia (crecimiento celular anómalo) (Trichopoulus, 1996). La PCA permite medir el rompimiento (y daño) en el ADN, detectar sitios sensibles al álcali en células de mamífero y algunas plantas (Arévalo, 1999; Tebbs et al., 1999; Wagner et al., 1998; Koppen y Verschaeve 1996, Álvarez y Santerre, 2001) y es muy empleada ya que es rápida, simple y sensible.

**Comportamiento de la cauda del cometa en hígado de *Goodea atripinnis* de la 1ª a la 2ª etapa.** En la 1ª etapa todos los compuestos se encontraron en similares concentraciones con excepción del 2, 4 D. La mayor concentración de 2,4 D en Chapala no se refleja en una mayor migración indicando que mismas concentraciones

provocan daños diferentes o que los individuos estudiados tenían diferentes grados de exposición debido a la edad. La mayor migración fue encontrada para peces de Sayula, al margen de que las concentraciones de COP´S son idénticas a las de Chapala, indicando probablemente la presencia de un poderoso agente contaminante en Sayula, que podría ser hexaclorobenceno. Esto mismo se observa en la etapa 3 y 4.

La migración de células hepáticas y eritrocitos de *Goodea atripinnis* del lago de Chapala y Sayula de la 1ª etapa (**tabla 2**) mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$) sin embargo, la migración resultó, contrario a lo que se esperaba, mayor en Sayula.

Para la 2ª etapa (**tabla 3**) nuevente las concentraciones de COP´S en el hígado resultaron similares en Chapala y Sayula pero nuevamente la migración resultó superior en Sayula y la medición de las caudas arrojo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$).

Al comparar las concentraciones de COP´S en tejidos hepáticos se nota un incremento de motoxicloro, 2, 4 D , DDT y disminución de aldrín, dieldrín, heptacloro y epóxido de heptacloro de la 1ª a la 2ª etapa. Las migraciones en promedio también fueron inferiores en la 2ª etapa, por lo tanto, la mayor migración en la 1ª etapa está en función de los agentes encontrados en altas concentraciones en esa etapa: aldrín, dieldrín, heptacloro y epóxido de heptacloro. Estos compuestos se reportaron como mutagénicos (http://www3.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos /Organoclor.htm), sin embargo no se excluye el efecto de otros agentes químicos no estudiados en el presente trabajo.

En la 3ª etapa no fue posible la cuantificación de COP´S en tejidos pero si se realizó la prueba cometa. Nuevamente la migración resultó mayor para eritrocitos de Sayula no así para hepatocitos donde la migración fue mayor en Chapala. La diferencia resultó estadísticamente significativa. En la 4ª etapa La media de migración de las caudas en eritrocitos de peces la Laguna de Sayula es superior a los de Chapala. No así para hepatocitos cuya cauda fue mayor en Chapala. Es clara la relación entre el alto nivel de hexaclorobenceno y el daño genético en tejidos de

*Goodea* de Sayula. La longitud de los cometas mostró también diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$).

Un análisis más detallado de cada COP´S en diferentes etapas y con un testigo negativo altamente confiable arrojará más detalle sobre el daño genético relacionado con la concentración de COP´S.

## CONCLUSIONES

1 Efectivamente, existe presencia de COP´S en bajas, aunque variables concentraciones, tanto en Chapala como en Sayula e interesantemente, se observa un efecto estacional que determina el incremento o disminución del nivel de estas sustancias lo que denota persistencia de los mismos o bien arrastre durante las época de lluvias.

2 Se observa cierto grado de bioacumulación, pero no de la magnitud esperada, además, se intuye bioacumulación no definitiva o bioacumulación desigual entre los organismos estudiados.

3 La Laguna de Sayula no fue adecuada como testigo negativo ya que se detectó la presencia de COP´S y daño genético en los peces estudiados.

4 Se observa daño genético en los tejidos estudiados de ambos embalses.

5 No hay una clara relación entre los concentraciones de COP´S y el daño genético, sin embargo, el hexaclorobenceno parece ser un agente sospechoso del incremento de la cauda del cometa.

6 La prueba del cometa es una eficiente herramienta para la detección de daño genético.

7 Se detectó la presencia de COP´S en Chapala y Sayula debido probablemente al arrastre de algunos plaguicidas de mayor persistencia, que fueron usados años atrás.

## REFERENCIAS


1. Aguilera Rodríguez J. R. Evaluación de la prueba de *Tradescantia* para la detección de daño mutagénico (tesis de Licenciatura). Guadalajara: Universidad de Guadalajara, 1996.

2. Albert A. L. (1990). Riesgos de los plaguicidas para la salud. En : Los plaguicidas el ambiente y la salud (Albert A. L. Ed). Centro de ecodesarrollo. México. pp. 65-86.

3. Alejo Castillo M. L. Análisis y estudio de la influencia del estado de Michoacán sobre la cuenca propia del Lago de Chapala (Tesis de Maestría). Guadalajara: Universidad de Guadalajara, 2002.

4. Álvarez Moya C. y Zaitseva Petrovna G. (2001). Enfermedades genéticas originadas por mutaciones. En: Genética, ambiente y salud (Alvarez Moya C. Ed.). Universidad de Guadalajara, Guadalajara. pp. 103-116.

5. Álvarez Moya C. y Santerre Lucas A. (2001). Agua de consumo publico en la ciudad de Guadalajara, México: Evaluación de la genotoxicidad en *Tradescantia*. Scientia, CUCBA. 3, 12-17.

6. Álvarez Moya C. (2003). Los pesticidas como fuente de daño genético. En sustentabilidad (Mendoza Cornejo C. y Pimienta Barrios E. Eds.). 1, 33-41.

7. Ames D. N., Durston W. R., Yamasaki E. y Lee F. D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Nat Acad. Sci. (USA). 69, 3128-3132.

8. Arévalo H. A., Evaluación de daño genético en células de Agave tequilana con marchites del agave. Uso de la prueba del cometa (Tesis de Maestría). Universidad de Guadalajara, México, Guadalajara 1999.

9. Belpaeme K., Cooreman K. y Kirsch- Volders M. (1998). Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. Mutation Research. 415 , 167- 184.

10. Carrillo C. E. y L. E. Velez (1996). Plaguicidas organofosforados en aguas de riego del Valle de Mexicali, II Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Mazatlán, México, diciembre 15 p.

11. Casiano A. D. (1991). Introduction : historical perspectives of the genetic toxicology. En: Genetic Toxicology. (Li. P.A. y Heflich R.H., Eds.) CRC Press, Nueva Jersey, pp. 1-12.

12. Ciaravino V., Miller M. W. y Carstensen E. L. (1986). Sister- chromatid exchanges in human lymphocytes exposed in vitro to therapeutic ultrasound. Mutat. Res. 172, 185-188.

13. Dolara P., Torricelli F. y Antonelli N. (1994). Cytogenetic effects on human lymphocytes of a mixture of fifteen pesticides commonly used in Italy. Mutat. Res. 325, 47-51.

14. EPA.NOM-003-ZOO-1994

15. Dunier, M.B. (1994). Effects of Environmental Contaminants (Pesticides and Metal ions) on Fish Immune Systems. In: Models for Environmental Toxicology, Biomarkers Immunostimulators. Fair Haven, N. J.

16. Fairbair D. W., Olive P. L. y O Neill K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. Mutat. Res. 339, 37-59.

17. Gaceta Universitaria. (2002). Más información sobre la leche. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche expendida en la zona metropolitana de Guadalajara. U. de G. 11 de marzo, 2002. P:11.

18. Gómez A. S., Noriega A. N., Osorio A., Galicia F., Ling S. y Villalobos P. R. (1992). Sister chromatid exchanges analysis in a rural population of México exposed to pesticides. Mutat. Res. 281, 173-179.

19. González D. y Ramírez A. (2001), Metales tóxicos. En: (Álvarez Moya C. ed.), Genética, ambiente y salud. Universidad de Guadalajara, Guadalajara 151-157.

20. Guillette L. J. Jr. (1994). Endocrine disrupting environmental contaminants and reproduction: lessons from the study of wildlife. In: Women's Health Today: Perspectives on Current Research and Clinical Practice. ( D. R. Popkin & L. J: Peddl, eds.) Parthenon Pub. N. Y: 201-207.

21. Guillete L. y Uribe C. (2001). Alteraciones en el sistema reproductor de *Alligato, Mississipiensis* por contaminantes ambientales. Bol. Suc. Herpetol. Mex. 9, 1-11.

22. Guruge K. S.; Watanabe M.; Tanaka H. y Tanabe S.. (2001). Accumulation status of persistent organochlorines in albatrosses from the North Pacific and the Southern Ocean. Environmental Pollution. 114 (3), 389- 398.

23. Guzmán Arroyo M., Peniche Camps S. y Valdés Zepeda A. ( 2003). La cuenca del río Lerma y el Lago de Chapala. En: Chapala una crisis programada, Universidad de Guadalajara. pp. 12-36.

24. Graf U., Würgler F. R., Katz A. J., Frei H., Joan H., Hall C. B. y Kale P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ. Mutagen. 6,153-188.

25. Graf U. y Singer D. (1992). Genotoxicity of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Rev. Int. Contam. Ambient. 8, 15-27.

26. Grant W .F. (1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of enviromental mutagens. Mutat. Res. 310, 175-185.

27. Grant W. F. y Salamone M. F. (1994). Comparative mutagenicity of chemical selected for test in the International Program on Chemical Safety´s collaborative study on plant systems for the detection on environmental mutagens. Mutat. Res. 310, 187-209.

28. Grant W. F., Lee H. G., Logan D. M. y Salamone M. F. (1992). The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environmental. Mutat. Res. 270, 53-64.

29. Grella A., Spinaci A. y De Filippis P. (1994). Volatile organic halogen compounds in the drinking water of the city of Rome. Annali di Igiene 6, 909-919.

30. Griggs H. G. y Bender M. A. (1973). Photoreactivation of ultraviolet induced chromosomal aberrations. Science 179, 86-88.

31. Grimmer G. (1983). Chemistry. En : Enviromental carcinogens. (G. Grimmer, Ed.). Boca ratón, Florida, pp. 200-216.

32. Heflich R.H. (1991). Chemical mutagens. En: Genetic Toxicology (Li P. A. y Heflich H. R., Eds.) CRC press, Nueva Jersey, pp. 143-202.

33. http://www.cucba.udg.mx/sayula/localizacion.htm

34. http://www.semarnap.gob.mx/regiones/chapala/problematica.shtml.

35. http://www3.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Organoclor.htm

36. http://www.conabio.gob.mx 40.

37. http://www.greenpeace.org.ar/media/informes/2387.pdf

38. http:// www.semarnap.gob.mx/naturaleza/regiones/chapala 41.

39. http://www.semarnap.gob.mx. 2002

40. http://www.inp.sagarpa.gob.mx/publicaciones/sustentabilidad/continental/PATZCUARO.pdf

41. http://www.col.ops-oms.org/sivigila/2003/BOLE20_03.pd

42. IARC (1991). Occupational exposures in insecticide application and some pesticides. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks on humans. 53, Lyon.

43. Ichikawa S. (1992). *Tradescantia* stamen-hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: Its responses to ionizing radiations and chemical mutagens and some synergistic effects found. Mutat. Res. 270, 3-22.

44. Jiménez C. B. E. (2001). La Contaminación Ambiental en México. (Causas, Efectos y Tecnología Apropiada). Editorial Limusa, S.A. de C.V. México, D. F 60 p.

45. Koppen G. y Verschaeve L. (1996). The alkaline comet on plant cells: A new genotoxity test for DNA breaks in *Vicia faba* roots cells, Mutat. Res. 360, 193-200.

46. Kloos H. (1996). 1,2 Dibromo-3-Chloropropane (DBCP) and ethylene dibromide (EDB) in well water in the Fresno/Clovis metropolitan area, California. Arch. Environ. Health 51, 291-299.

47. Lippman M. (1999). Limiting Contaminant Exposure: PCB's in Fish. In: Environmental Toxicants. Human Exposures and Their Heath Effects. John Whiley & Sons, Inc. N.Y. 1, 283-298.

48. Li A. P. y Loretz L. J. (1991). Assay genetic toxicology. En: Genetic toxicology (P. A. Li y R.H. Heflich, Eds.). CRC. Press, Nueva Jersey, pp. 119-142.

49. Lindsley D. L. y Grell E. H. (1968). Genetic variation of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Instit. Publ. 627, 1-60.

50. Loera R. y Albert A. L. (1990). Plaguicidas y criterios de riesgo. En: Los plaguicidas el ambiente y la salud (Albert A. L. Ed). Centro de ecodesarrollo, México. pp. 31-37.

51. Loera R. y Albert A. L. (1990). La contaminación y el desarrollo de los plaguicidas sintéticos. En: Los plaguicidas el ambiente y la salud (Albert A. L. Ed). Centro de ecodesarrollo, México. pp. 21-30.

52. Lombardi J. (1998). Endocrine Disrupters. In: Comparative Vertebrate Reproduction. Kluwer Academic Publishers. Massachusetts. USA.

53. Mckelvey M. V. J., Green M. H. L., ScMHezer P., Pool Z. B. L., De Méo M. P. y Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. Mutat. Res. 288, 47-63.

54. Martínez R. F. E. (1994). Evaluación de la contaminación industrial y urbana en el Río Santiago tramo Ocotlán-Guadalajara. Tesis Profesional. Facultad de Agricultura. Universidad de Guadalajara, México, Guadalajara.

55. Meltz M. L. (1991). Physical mutagens. En: Genetic Toxicology (P.A. Li y R.H. Heflich, Eds.). CRC. Press, Nueva Jersey, pp. 143-202.

56. Mericle L. W. y Mericle R. P. (1967). Genetic nature of somatic mutation of flower color in *Tradescantia,* clon 02. Rad. Bot. 7, 449-464.

57. Montesano R. y Tomatitis L. (1977). Les cancerogenes chimiques. Lyon Med. 14, 107-117.

58. Moses M. D. (1992). Cosecha dolorosa. Pesticide Educatión Center, San Francisco, 114 p.

59. Piatrapiana D., Modena M., Guidetti P., Falugi C. y Vacchi. M. (2002). Evaluating the genotoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish

species: a case study in the Ligurian Sea (NW Mediterranean). Marine Pollution Bulletin. 44, 238- 243.

60. Pratt W. B., Ruddon R. W., Ensminger W. D., Maybaum J. (1994). The anticancer drugs. Segunda edicíon. Oxford. Nueva York pp. 9-13.

61. Ramírez C. J., Ondorica F. C., López J. O., Ríos M. A., Osuna R. I., Uribe B. M. (1996). Plaguicidas en agua y camarón capturados en granjas acuícola del centro de Sinaloa, II Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Mazatlán, México, 9.

62. Ramírez M. M. (2001). Mutágenos químicos, físicos y biológicos. En: Álvarez-Moya C. (Ed.). Genética, Ambiente y Salud. Universidad de Guadalajara, Guadalajara. pp. 51-69.

63. Rendon V. O. J. y Albert A. L., (1990). Efectos tóxicos a largo plazo de los plaguicidas. En: Los plaguicidas el ambiente y la salud (Albert A. L. Ed). Centro de ecodesarrollo. México. pp. 87-92.

64. Rendon V. O. J. (1990). Los insecticidas organoclorados. En: Los plaguicidas el ambiente y la salud (Albert A. L. Ed). Centro de ecodesarrollo. México. pp. 99-120.

65. Romero R. H. (2001). Fuentes de riesgo de daño genético. En: Álvarez Moya C. (ed.), Genética, ambiente y salud. Universidad de Guadalajara, Guadalajara. pp 191-199.

66. Singh N., McCoy M., Tice R., y Schneider L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175, 184-199.

67. Sun C., Dong Y., Xu S., Yao S., Dai J., Han S. y Wang. L. (2002). Trace analysis of dissolved polychlorinated organic compounds in the water of the Yangtse River (Nanjing, China). Environmental Pollution. 117, 9-14.

68. Tebbs R.S., Cleaver J.E., Pedersen R.A., Hartmann, A. (1999)., Modification of the comet assay for the detection of DNA strand break in extremely small tissue sample. Mutagenesis; 14, 437-438.

69. Torres Bugarín, O. (2001). Carcinogénesis ambiental. En: Genética, ambiente y salud. Universidad de Guadalajara. México, Guadalajara. pp. 71-102.

70. Torres, O. B. R. (1991). Los peces de México. AGT. México. pp. 50-55.

71. Trichopoulos D., Li F. P. y Hunter D. J. (1996). What causes cancer? Sientific American, pp. 50-57.

72. Uyeno T., Rush M. R. y Fitzsimons J. M. (1983). Karyology of the Cyprinodontoid fishes of the Mexican Family Goodeidae. Copeia. 2, 497-510.

73. Waliszewski S. M., Pardío T. V., Chantiri N. J., Aguirre A. A., Infanzon R. y Rivera J. (1996). Contaminación de leche materna por plaguicidas organoclorados en Veracruz. II Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. Mazatlán, México, 22.

74. Wagner E. D., Rayburn A. L., Anderson D. y Plewa M. J. (1998). Calibration of the single cell gel electrophoresis assay, flow cytometric analysis and forward mutation in chinese hamster ovary cells. Mutagenesis; 13, 81-84.

75. Webb B. S. A. y Miller R. R., (1998). Zoogoneticus Tequila, a new Goodeid Fish (Cyprinodontiformes) from the Ameca drainage of México, and rediagnosis of the genus. Occasional papers of the museum of zoology the university of Michigan. 23, 725-1,2.

76. Zhou, H.Y.; Cheung, R.Y.H. & M.H., Wong (1999). Bioaccumulation of organochlorines in freshwater fish with different feeding modes cultured in treated wastewater. Water Research. 33, 2747- 2756.

77. Zou X., Xu X., Zhang J. Y Zhu Z. (1995). The determination of strong mutagen MX (3-chloro-4 (dichloromethyl) -5-hydroxy-2 (5H)-furanone in drinking water in Chine. Chemosphere 30, 2219-2225.

78. Zúñiga, G. G. (2001). Sistemas de detección de daño genético. En: Genética, ambiente y salud (Álvarez Moya C. Ed.). Universidad de Guadalajara, Guadalajara. pp. 127-150.