

Evaluación de efectos tóxicos del cianuro, protección de tiosulfato de sodio en tilapia (*Oreochromis sp.*)

Evaluation effects toxics of cyanide, protección of tyosulffate of sodium on tilapia (*Oreochromis sp.*)

Evaluacão efeitos tóxicos de cianeto, proteção do tiosulfato do sódio e Tilapia (*Oreochromis sp.*)

Angie Lisseth León-Pinzón¹, Shirley J. Marroquín-A², Javier Borbón³, Jaime F González-M⁴

¹ MVZ, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia,

² MV, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional, Bogotá, Colombia,

³ MV, MSc, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional, Bogotá, Colombia

⁴ MV, MSc, PhD, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional, Bogotá, Colombia.

Email: leonpinzonangie@gmail.com

Recibido: 30 de septiembre de 2016

Aceptado: 25 de noviembre de 2016

Resumen

En Colombia, la minería se ha proyectado como un área de desarrollo para el país con el uso indiscriminado de químicos contaminantes como el cianuro, pero los riesgos ambientales y de salud pública ligados a esta actividad son altos con las limitaciones de control en el análisis y monitoreo que ejercen las autoridades ambientales sobre estos compuestos que se consideran efluentes contaminantes y tóxicos para peces nativos y exóticos. Objetivo. Determinar los efectos tóxicos generales del cianuro, el efecto protector de tiosulfato de sodio y las variaciones de los parámetros sanguíneos y bioquímicos en *Oreochromis sp.*, expuesta a concentraciones agudas de cianuro de sodio. Métodos. Se trabajó con (36) tilapia roja (*Oreochromis sp.*), expuestos por 24 h a cuatro tratamientos; 1: grupo control (libre de sustancia); 2: 1 ppm de NaCN; 3: 1 ppm de NaCN y 50 ppm de tiosulfato de sodio; 4: 50 ppm de tiosulfato de sodio. Se evaluaron los efectos tóxicos generales y se tomaron muestras de sangre para hematocrito y parámetros bioquímicos (proteínas plasmáticas, glucosa y lactato). Los peces fueron eutanasiados y realizada la necropsia para colecta de fragmentos de hígado y cerebro para determinar cualitativamente la presencia de cianuro por medio de la prueba del ácido pícrico. El análisis e interpretación de los resultados de las variables cualitativas se realizó mediante descripción de las mismas y comparación entre tratamientos, los datos de las variables cuantitativas fueron comparados por estadística descriptiva y la prueba de Tukey. Resultados. Dentro de los primeros 15 minutos los peces de los tratamientos 2 y 3 presentaron signos agudos de intoxicación como dificultad respiratoria, hiperactividad, nado errático e imposibilidad de movimiento. El hematocrito se encontró alto en los peces de los tratamientos 2 y 3 comparado con los tratamientos 1 y 4, los niveles de glucosa y lactato en sangre se encontraron significativamente altos ($p < 0,05$) en los especímenes de los tratamientos 2 y 3; por el contrario el nivel de proteína plasmática no mostró diferencias significativas entre tratamientos. El resultado de la prueba del ácido pícrico no fue concluyente en hígado y cerebro. Conclusión. Alteraciones en el comportamiento son manifestaciones clínicas de intoxicación y es evidente que el NaCN en exposición aguda, afecta notoriamente los parámetros bioquímicos sanguíneos evaluados, que serían de gran utilidad para diagnosticar casos de sintomatología similar y con sospecha de cianurotoxicosis, el tiosulfato de sodio a la dosis usada no mostró su efecto protector, posiblemente por la gran sensibilidad de la especie a esta concentración del tóxico.

Palabras clave: Cianuro, glucosa, lactato, tilapia roja, tiosulfato de sodio.

Abstract

In Colombia, the mining is designed as an area of development for the country with the indiscriminate use of polluting chemicals such as cyanide, but environmental risks and public health related to this activity are high with control limitations in the analysis and monitoring exercise environmental authorities on these compounds that are considered polluting effluents and toxic for native and exotic fish. Objective. Determine the effects general toxics of cyanide, the protect effect of thiosulfate of sodium and the variations in biochemical parameters blood in *Oreochromis sp*, exposed to acute concentrations of cyanide of sodium. Methods. Worked with (36) tilapia red (*Oreochromis sp.*), exposed for 24 h to four treatments; 1: control group (free substance); 2: 1ppm of NaCN; 3: 1ppm of NaCN and 50ppm of thiosulfate of sodium. Was assessed the general toxics effects and was take samples of blood to hematocrit and biochemical parameters (plasma proteins, glucose and lactate). The fish were euthanized and necropsied to collect fragments of liver and brain to qualitatively determine the presence of cyanide for mean of test picric acid. The analysis and interpretation of results of the qualitative variables was performed using same description and comparison between treatments, the date of variables quantitative was compared by descriptive statistics and test tukey. Within the first 15 minutes the fishes of treatments 2 and 3 showed acute signs of intoxication as respiratory distress, hyperactivity, erratic swimming, and inability to move. The hematocrit was found high in fish treatments 2 and 3 compared to treatments 1 and 4, the glucose and lactate levels in blood was found significantly higher ($p < 0.05$) in the specimens of treatments 2 and 3; but the plasma protein level showed no significant difference between treatments. The result of test picric acid was not conclusive in liver and brain. Conclusion. Changes in behavior are clinical manifestations of intoxication and it is clear that the NaCN in acute exposure, markedly affects the blood biochemical parameters evaluated, that would be very useful to diagnose cases of similar symptoms and suspected cyanurotoxicosis, sodium thiosulfate to doses used showed no protective effect, possibly because of the high sensitivity of the species to this toxicant concentration.

Key words: Cyanide, glucose, lactate, tilapia red, thiosulfate of sodium.

Resumo

Na Colômbia, a mineração é concebida como uma área de desenvolvimento para o país com o uso indiscriminado de poluentes químicos tais cianeto como, mas os riscos ambientais e de saúde pública relacionadas com esta atividade são elevados com as limitações de controle na análise e monitoramento de exercício, as autoridades ambientais sobre estes compostos são considerou que efluentes poluentes e tóxicos para peixes nativos e exóticos. Objetivo. Determinar os efeitos de tóxicos de cianeto gerais, o efeito de tiossulfato de sódio e de proteger as variações nos parâmetros bioquímicos do sangue de *Oreochromis sp*, expostos a concentrações agudas de cianeto de sódio. Métodos. Trabalhou com (36) tilápia vermelha (*Oreochromis sp.*), expostos por 24 h em quatro tratamentos; 1: Grupo controle (substância livre); 2: 1 ppm de NaCN; 3: 1 ppm de NaCN e 50 ppm de tiossulfato de sódio. Foi avaliada em geral e foi os efeitos tóxicos recolher amostras de sangue para hematócrito e parâmetros bioquímicos (proteínas do plasma, glicose e lactato). Os peixes foram sacrificados e necropsiados estavam a recolher fragmentos de fígado e cérebro à presença de cianeto qualitativamente determinado para o teste de ácido pícrico de média. A análise e interpretação dos resultados das variáveis qualitativas foi realizada utilizando mesma descrição e comparação entre os tratamentos, a data de variáveis quantitativas foi de estatística descritiva e comparadas pelo teste de Tukey. Nos primeiros 15 minutos os peixes dos tratamentos 2 e 3 mostraram sinais de intoxicação como angústia respiratória aguda, hiperatividade, natação errática, e incapacidade de se mover. O hematócrito foi encontrada alta em tratamentos de peixes 2 e 3 em relação aos tratamentos 1 e 4 os níveis de glicose e lactato no sangue foi significativamente maior ($p < 0,05$) nas amostras dos tratamentos 2 e 3; mas o nível de proteína do plasma não mostrou diferença significativa entre os tratamentos. O resultado do teste de ácido pícrico não foi conclusivo no fígado e no cérebro. Conclusão. Mudanças de comportamento são manifestações clínicas de intoxicação e é claro que o NaCN em exposição aguda, marcadamente afeta os parâmetros bioquímicos sanguíneos avaliados, Isso seria muito útil para diagnosticar casos de sintomas semelhantes e cyanurotoxicosis Suspeita, tiossulfato de sódio para duques utilizados mostraram nenhuma proteção efeito, possivelmente por causa da alta sensibilidade das espécies a esta concentração tóxico.

Palavras chave: Cianeto, glicosa, lactato, tilapia, tiossulfato de sódio.

Introducción

El cianuro (CN⁻) es un grupo químico formado por un átomo de carbono (C), y nitrógeno (N), conectados por tres enlaces. Los cianuros existen en estado natural y artificial. Existen más de 2000 fuentes naturales de CN con grado de complejidad y toxicidad variable; el CN es un potente agente citotóxico que mata la célula por inhibir la citocromo oxidasa de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Akinku y col., 2010). La decisión de si cierto xenobiótico es pe-

ligroso para el sistema acuático y el ciclo alimenticio sólo puede tomarse cuando se hacen pruebas de toxicidad aguda en mamíferos, bacterias, peces y pruebas de disociación biológica en detalle. El hecho de que haya un uso incrementado de químicos contaminantes en muchas partes industrializadas, hace absolutamente necesario el desarrollo de técnicas de medición de eco toxicidad. El primer paso es la prueba de toxicidad aguda en peces, para mostrar el riesgo potencial de estos químicos, las indicaciones más afectivas de po-

lución tóxica son los cambios comportamentales y los peces son centinelas ideales para ensayos comportamentales de exposición a varios estresores y químicos tóxicos, debido a 1) tienen constante contacto directo con el medio ambiente acuático, donde ocurre la exposición química en toda la superficie corporal, 2) Son de importancia ecológica en cualquier sistema natural, 3) Son fáciles de cultivar, 4) Tienen buena disposición reproductiva y 5) Larga historia de uso en toxicología comportamental. Además, la contaminación de cuerpos de agua con CN se ha visto incrementada por industrias como la aurífera que lo utiliza (Dube y Hosetti, 2010). Tanto en minería aurífera artesanal como en la gran minería, además de la amalgamación del oro con mercurio, se utiliza lixiviación con cianuro para recuperar oro puro por métodos electroquímicos y por supuesto en gran minería se usan piscinas gigantescas de cianuración e infraestructura para los procesos electroquímicos y de metalurgia. Por lo que cualquier pérdida en la permeabilidad de las piscinas puede conducir a la liberación de cianuro, con afectación y muerte de la biota presente en las fuentes de agua receptoras. Los impactos ambientales producto de las liberaciones o de derrames a fuentes de agua, constituyen una amenaza para la salud pública, en función de la utilización de dichas aguas para consumo humano. Independiente de la escala, el empleo de cianuro en minería aurífera constituye un riesgo latente. Existen ejemplos catastróficos, como el ocurrido el año 2000 en la planta de oro de Aurul, en Rumania; luego del rompimiento de una barrera de contención, la solución de cianuro se liberó incorporando cianuro y metales pesados, contaminando múltiples fuentes de agua en Rumania, Hungría, Yugoslavia y Bulgaria, con la consecuente muerte de peces y cierre de acueductos (López Bravo *et al.*, 2010).

Los peces nativos y exóticos empleados en explotaciones, para servir como fuente de alimento o recreacional para la humanidad, están directa e indirectamente afectados por desechos mineros y otras industrias en donde se utiliza el CN, por lo que todo esfuerzo que se haga para generar conocimiento acerca del impacto y/o efecto del CN sobre los organismos acuáticos; aportará las bases científicas necesarias para establecer pautas de actuación por parte de autoridades competentes (Mancera y Álvarez, 2006). Además, La extracción de metales preciosos como el oro, facilita la movilización de sustancias tóxicas, por lo que el suelo y el agua se contaminan, permitiendo que seres humanos se expongan a través de múltiples rutas y los efectos en la salud pueden ser diversos, dada la variedad de sustancias y las mezclas (Miller *et al.*, 2004).

Materiales y métodos

Unidades y grupos experimentales

La fase experimental se desarrolló en el laboratorio de Toxicología Acuática de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. El estudio se llevó a cabo con juveniles (n=36) de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) de 51, 6±12,5 gr de peso y 14,2±1,1 cm de longitud total, obtenidos de la estación piscícola la Terraza (Villavicencio, Colombia). Antes de iniciar el estudio los peces fueron sometidos a 2 semanas de aclimatación en condiciones de laboratorio, en acuarios de vidrio donde se mantuvo aireación constante, alimentación, fotoperiodo y parámetros fisicoquímicos del agua adecuados para la especie. Una vez terminado este periodo, los ejemplares se distribuyeron en 4 grupos al azar, de 9 animales cada uno en acuarios individuales de 20 litros; dando inicio al periodo experimental durante el cual no se suministró alimento. Los tratamientos se designaron así: grupo control: libre de cualquier sustancia (tratamiento 1 -Tto 1), grupo expuesto a cianuro de sodio (NaCN) (1ppm) (tratamiento 2 -Tto 2), grupo expuesto a NaCN (1ppm) + tiosulfato de sodio (50 ppm) (tratamiento 3 -Tto 3) y grupo control positivo: expuesto a tiosulfato de sodio (50ppm) (tratamiento 4 -Tto 4).

Reactivos

Cianuro de Sodio Art. 6438 MERCK, Tiosulfato de sodio Art. 64271 MERCK

Materiales y Equipos

Multiparámetro para análisis de calidad de agua, Báscula digital marca ae ADAM^R AQT- 600, balanza AdventureTM OHAUS, centrífuga mrc Simple Hematocrit Centrifuge H- 240 y HERAEUS^R Labofuge 400R, glucómetro ACCU-CHEK^R Active, Refractómetro, espectrofotómetro UV- Visible Shimadzu UV- 160 A TM, homogenizador de tejidos.

Tratamientos

24 horas antes de iniciar la exposición se preparó una solución de NaCN con 20 mg + 20 ml de agua destilada en frascos de plástico, para lograr una concentración de 1 mg/L, en cada acuario; ésta solución se agregó a los acuarios de los tratamientos 2 y 3. La concentración de tiosulfato de sodio fue 50 veces azufre por cada parte de ión CN y de igual forma que para el NaCN, se preparó la solución con 2 gr de tiosulfato de sodio + 2 ml de agua destilada y se agregó a los acuarios de los tratamientos 3 y 4. Las concentracio-

nes escogidas están basadas en experimentos previos hechos por AQUÁTICA, grupo de investigación en Toxicología Acuática y Ambiental.

Experimento

Una vez distribuidos en forma aleatoria, los peces se sometieron a cada tratamiento. Se vigiló el comportamiento durante las 24 horas de exposición, en el caso de los especímenes de los tratamientos 1 y 4 y hasta cuando se presentaron signos extremos de intoxicación; como disnea permanente e incapacidad de movimiento interpretada por permanecer más de 5 minutos en decúbito lateral al fondo del acuario, en todos los especímenes de los tratamientos 2 y 3. Los animales fueron retirados del acuario y desensibilizados por choque térmico, posteriormente, muestreados con jeringa heparinizada tomando muestra sanguínea de la vena caudal para análisis de glucosa, lactato, hematocrito, y proteínas plasmáticas. Luego fueron sacrificados mediante corte cervical, practicándose la necropsia para evaluar cambios macro en los órganos. Posteriormente, se tomó, pesó e hizo homogenizado a 4°C del hígado y cerebro para detectar cualitativamente la presencia de CN utilizando la prueba del ácido pícrico, la misma prueba se utilizó para determinar la presencia de CN en agua.

Determinación de glucosa y lactato

Una vez extraída la sangre, se colocó una gota en la tira reactiva y se colocó inmediatamente en el glucómetro ACCU-CHEK^R Active tomando la lectura. Para la medición del lactato se centrifugó la sangre a 10000 rpm por 10 minutos con HERAEUS^R Labofuge 400R y así extraer el plasma sanguíneo llevando a cabo la reacción enzimática con lectura espectrofotométrica (espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu UV-160 ATM).

Medición de hematocrito

Se determinó mediante el uso de capilares para aplicar la técnica de micro hematocrito; a 5000 rpm por 5 minutos con centrífuga mrc Simple Hematocrit Centrifuge H-240 y se realizó la lectura posterior (Vásquez y col. 2010).

Determinación de proteínas plasmáticas totales

Se midió manualmente colocando una gota del plasma obtenido del tubo capilar después de medir hematocrito, y se colocó en el refractómetro, registrando el dato (Ortega y Ladero, 2007).

Determinación del contenido de cianuro en hígado y cerebro

Se aplicó la técnica del ácido pícrico o reacción de Guignard, la cual consiste en exponer el tejido macerado y homogenizado a una tira impregnada con solución al 5% de ácido pícrico. El material se ubicó en un tubo en donde se evaluó el grado de volatilización del CN eventualmente presente en el tejido analizado, lo cual causaría un cambio de coloración (amarillo a naranja) en la tira de papel de filtro, previamente impregnada con el ácido reactivo. Este procedimiento se realizó en hígado y cerebro, ensayando la mejor forma de obtener buenos resultados.

Análisis Estadístico

Los resultados de parámetros bioquímicos se compararon mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente mediante una prueba de Tukey-Kramer utilizando SPSS para Windows versión 19; los datos se expresan como promedio \pm desviación estándar, con un valor $p < 0.05$ considerado como significativo.

Resultados

Sintomatología clínica

Expuestos a Cianuro

Los signos clínicos comenzaron entre los 6 a 13 minutos, inicialmente permanecieron quietos en el fondo y subieron a la superficie para tomar aire "boqueo" por varios minutos (fig. 3, 4) Posteriormente, empezaron a cambiar su comportamiento, presentando nado errático, en torneo y frenético brusco golpeándose con las paredes del acuario, en forma vertical y horizontal hacia la superficie y el fondo, en algunas ocasiones intentando salir del mismo (fig. 7, 8). En últimas instancias los peces adoptan una posición horizontal, de cubito lateral en el fondo del acuario, en donde se evidencia una gran dificultad respiratoria observada por la exageración en los movimientos operculares y apertura bucal. El tiempo de exposición fue aproximadamente entre 1 hora, 45 minutos a 3 horas, 58 minutos, ya que los peces presentaron signos extremos de intoxicación (dificultad respiratoria, incapacidad de movimiento por varios minutos) y fue necesario retirarlos del acuario para realizar los procedimientos planteados.

Expuestos a Cianuro + Tiosulfato de sodio

Los peces presentaron signos desde el minuto uno al 15, en donde se observaron signos similares a los ejem-



Figura 1. Inicio de experimento, obsérvese el tamaño de los acuarios y la rotulación.



Figura 2. Pez del acuario 5, tratamiento CN:S; Intenta tomar aire de los dispensadores

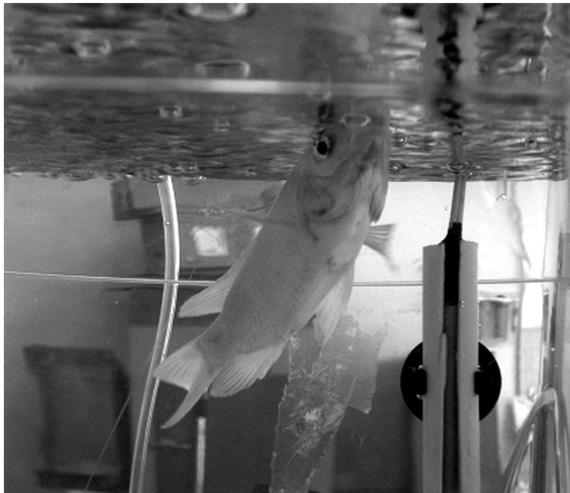


Figura 3. Pez en la superficie por varios minutos, tratamiento 3



Figura 4. Pez en la superficie por varios minutos, tratamiento 2



Figura 5. Pez en la superficie por varios minutos, a los 10 minutos de iniciado el experimento.

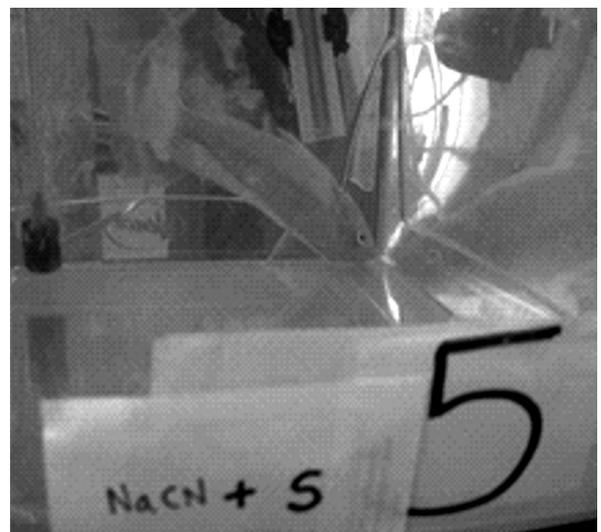


Figura 6. Pérdida del eje de nado, con nado en torneo horizontal.



Figura 7. Pérdida del eje de nado, nado en torneo vertical hacia la superficie.

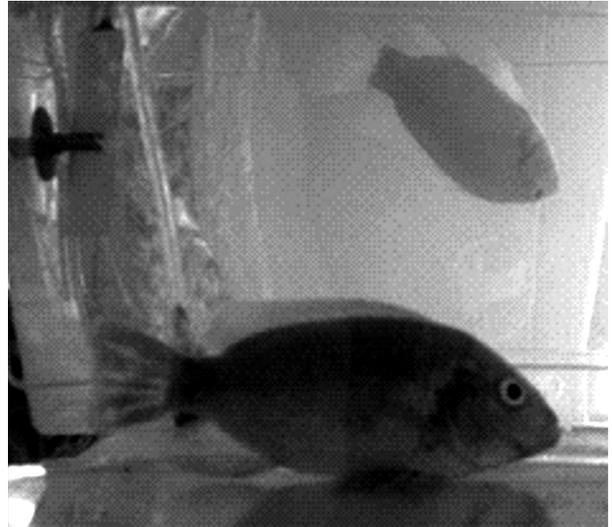


Figura 8. Pez cerca: asentado quieto en el fondo; (tratamiento 3). Pez lejos: Nado errático (tratamiento 2).

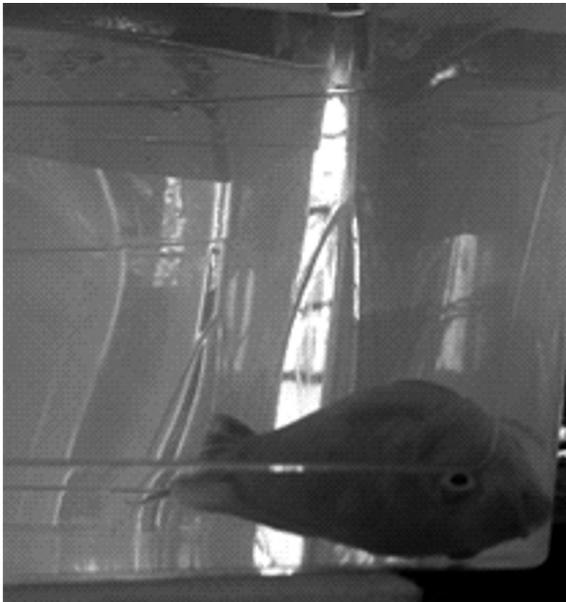


Figura 9. Pez en decúbito lateral, ligeramente arqueado (tratamiento 3)

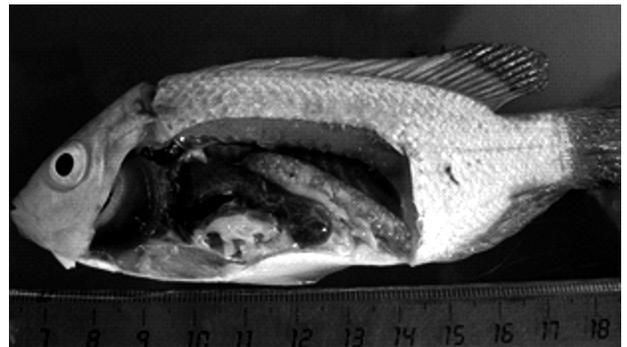


Figura 10. Necropsia pez: tratamiento 3. Branquias color rojo brillante claro.



Figura 11. Necropsia pez: tratamiento 3. Se observa congestión hepática.



Figura 12. Necropsia pez: tratamiento 2. Se observa hígado congestionado y aumentado de tamaño.

plares expuestos a cianuro pero con una mayor duración, tanto respiración laboriosa como cambio en su comportamiento y pérdida total del eje de nado (fig.5, 6, 8, 9). La exposición duró entre 1 hora, 50 minutos y 4 horas, 33 minutos, hasta que se decidió retirarlos del acuario por las razones anteriormente nombradas.

Peces control negativo y positivo

Los peces en estos dos tratamientos no mostraron signos respiratorios ni alteración en su comportamiento. Por lo cual se retiran del acuario a las 24 horas de exposición.

Hallazgos a la necropsia

Expuestos a Cianuro

Fueron 7 peces machos y 2 hembras; tres presentaron abundante moco externo; seis con aumento de tamaño en el hígado, de consistencia friable al tacto, con cambios de coloración, zonas congestionadas y

blanquecinas en todo el órgano (fig.12, 14). En dos animales se observó congestión en el riñón y esplenomegalia leve. El cerebro presentó congestión y edema marcado en todos los peces (fig.15, 16).

Expuestos a Cianuro + Tiosulfato de sodio

En este tratamiento hubo 5 machos y 4 hembras; dos peces presentaron abundante moco externo; seis tenían el hígado pálido, friable, con aumento de tamaño, congestión y cambios de coloración con hemorragias petequiales en uno. El riñón presentó aumento de tamaño y congestión en cinco peces y uno de ellos mostró un color rojo claro en branquias y esplenomegalia. El cerebro tenía congestión y abundante edema en todos los animales (fig.17, 18).

Peces control

Tratamiento 1: En este grupo hubo 5 machos y 4 hembras; el hígado en estos ejemplares se encontró friable,



Figura 13. Necropsia pez: tratamiento 4. Se observa hígado pálido, aumentado de tamaño y zonas de congestión.

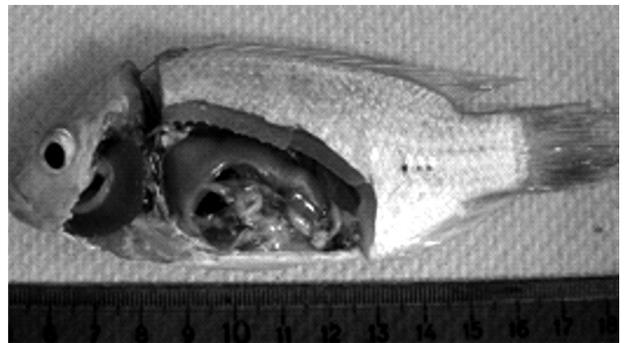


Figura 14. Necropsia pez: tratamiento 2. Se observa hígado pálido, aumentado de tamaño y zonas de congestión.

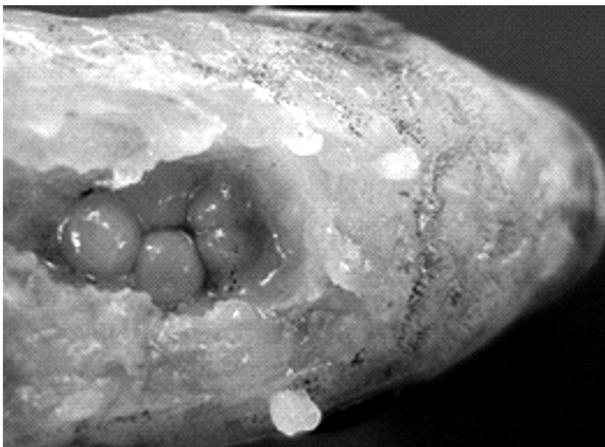


Figura 15. Necropsia pez: tratamiento 2: se observa cerebro congestionado y edematoso..



Figura 16. Necropsia pez: tratamiento 2: cerca, cerebro congestionado y edematoso



Figura 17. Necropsia pez: tratamiento 3. Se observa cerebro congestionado y edematoso.

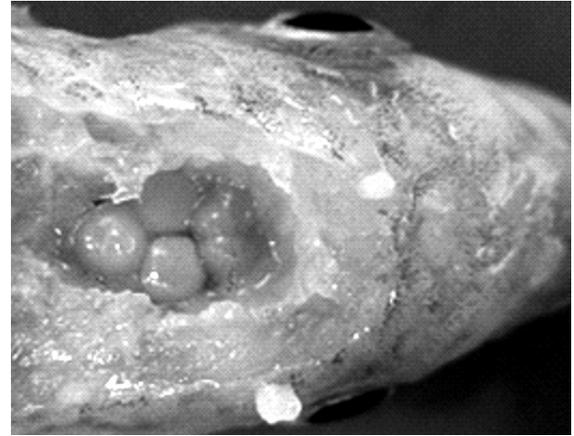


Figura 18. Necropsia pez: tratamiento 3. Se observa cerebro congestionado y edematoso.

congestionado con cambios de coloración blanquecinas, con deposiciones de fibrina en la parte ventral y hepatomegalia en otro ejemplar. Dos de los peces presentaban esplenomegalia y uno cerebro y riñón congestionado.

Tratamiento 4: fueron 7 hembras y dos machos; el hígado tenía consistencia friable, congestión y patrón moteado de coloración blanquecina con algunas zonas amarillas. En tres ejemplares hubo aumento de tamaño en el bazo y en uno congestión cerebral.

Parámetros Bioquímicos y Hematológicos

Los valores de los parámetros bioquímicos evaluados para el tratamiento 1 y 4 se muestran en la tabla 1 y los de los tratamientos 2 y 3, en la tabla 2. Por otro lado, la media de cada parámetro en los cuatro tratamientos se ilustra en las gráficas 1 (glucosa), 2 (hematocrito), 3 (PPT) y 4 (lactato). Los niveles de glucosa y lactato obtenidos, se mostraron normales para los peces de los tratamientos 1 y 4, pero se obtuvo valores elevados de

estos parámetros en los animales de los tratamientos 2 y 3. Cabe resaltar que el hematocrito en los peces control y control positivo fue bajo en comparación con los valores encontrados en los animales de los tratamientos 2 y 3, pero las proteínas plasmáticas no muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

Determinación cualitativa de Cianuro en hígado, cerebro y agua

Cianuro en hígado

La prueba del ácido pícrico para detección de CN, es de tipo cualitativa-colorimétrica, generalmente se usa en agua y plantas con sospecha de contener este tóxico, en este caso, se obtuvo del homogenizado de hígado de los especímenes, una reacción leve, es decir, las tiras impregnadas con ácido pícrico, puestas dentro de los tubos con homogenizado, cambió ligeramente su coloración en los grupos 2 y 3 y sin ningún cambio en las tiras de los grupos 1 y 4; sin embargo al momento de comparar la coloración de las tiras entre los grupos



Figura 19. Prueba del ácido pícrico en muestra de agua, tratamiento CN:S.

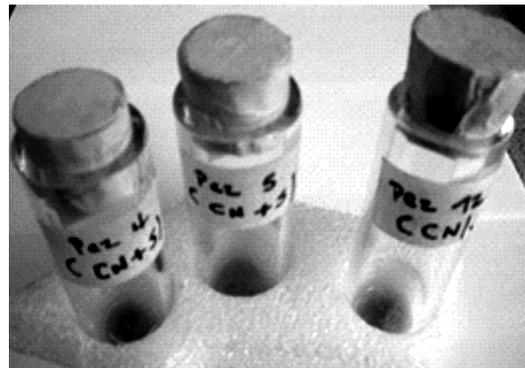


Figura 20. Prueba del ácido pícrico en muestras de macerado de hígado.

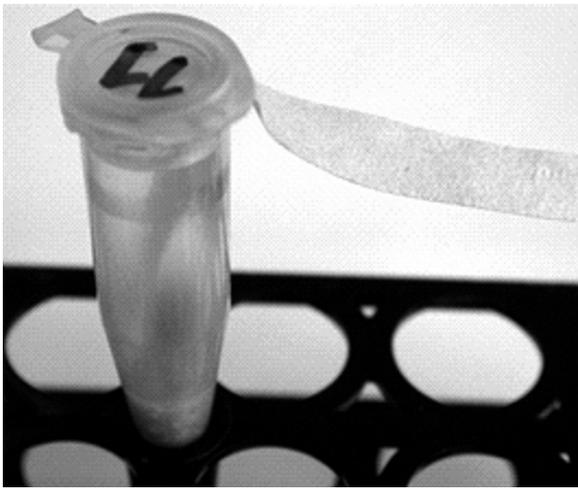


Figura 21. Prueba del ácido pícrico en muestra de macerado de cerebro

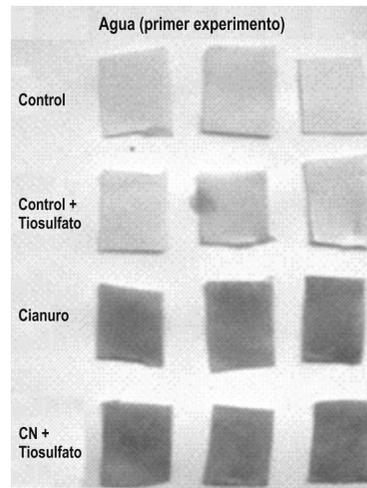


Figura 22. Resultado de la prueba del ácido pícrico en muestras de agua (primer experimento).

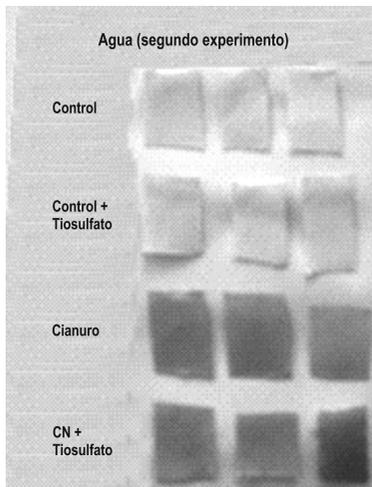


Figura 23. Resultado de la prueba del ácido pícrico en muestras de agua (segundo experimento).

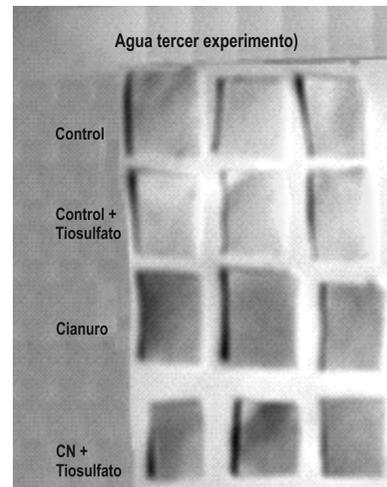


Figura 24. Resultado de la prueba del ácido pícrico en muestras de agua (tercer experimento).

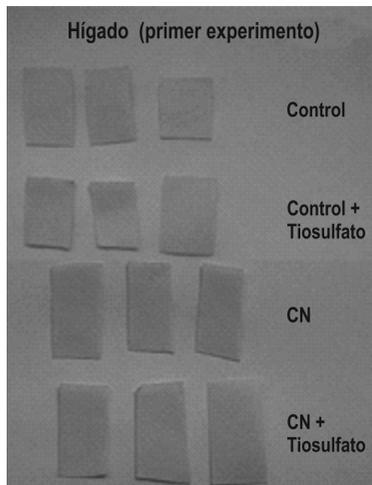


Figura 25. Resultado de la prueba del ácido pícrico en muestras de hígado.

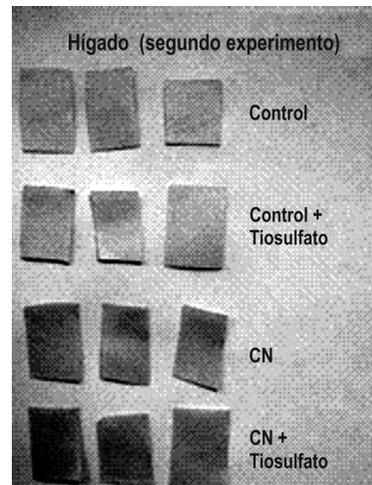


Figura 26. Resultado de la prueba del ácido pícrico en muestras de hígado. (oscurecimiento tardío)

Tabla 1. Parámetros sanguíneos evaluados, en juveniles de tilapia roja (*Oreochromis sp*) expuestos a diferentes concentraciones de NaCN grupo control (Tto1) y grupo control positivo (Tto 4)

Tratamiento	Glucosa (mg/dL)	Hto (%)	PPT (gr/dL)	Lactato (mg/dl)
1	90	23	4,6	12,991
1	42	14	3,2	7,136
1	53	20	3	9,401
1	58	23	4,2	7,818
1	33	15	4,4	10,699
1	48	19	4,4	7,983
1	47	22	4,8	11,646
1	56	24	3,4	17,201
1	71	20	2,8	11,81
4	30	16	4	10,17
4	64	16	3,2	5,982
4	30	29	4,6	8,931
4	59	14	5,4	6,337
4	32	18	3,4	7,613
4	55	28	6,6	12,592
4	74	22	6	8,23
4	41	17	3,2	9,876
4	50	23	3,4	11,687

Tabla 2. Parámetros sanguíneos evaluados, en juveniles de tilapia roja (*Oreochromis sp*) expuestos a NaCN grupo CN (Tto2) y grupo CN+S (Tto3)

Tratamiento	Glucosa (mg/dL)	Hto (%)	PPT (g/dL)	Lactato (mg/dl)
2	221	31	3,4	70,198
2	306	33	4	82,976
2	229	31	4,6	71,865
2	394	39	6	69,909
2	340	27	3,8	89,184
2	422	35	4,8	90,214
2	203	25	3,6	49,341
2	180	28	3,6	59,794
2	167	32	4	35,061
3	188	38	5,6	57,738
3	343	32	4,2	49,087
3	303	27	5	82,341
3	214	30	5,4	83,09
3	348	34	4,6	88,798
3	369	30	6	87,124
3	332	28	4,6	47,942
3	289	24	3,8	66,172
3	343	25	3,4	77,325

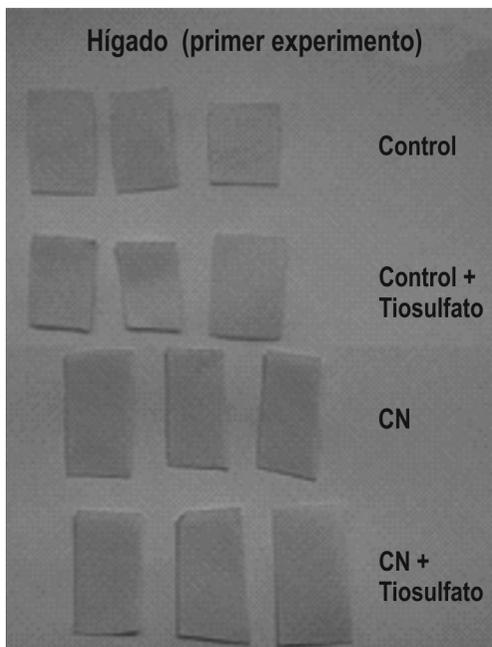


Figura 27. Resultado de la prueba del ácido pícrico en muestras de cerebro.

control (1 y 4) y grupos 2 y 3 hubo un oscurecimiento tardío de estas últimas, tal vez el ambiente en el laboratorio influyó en este cambio.

Cianuro en cerebro

En la prueba de ácido pícrico para detección de CN en cerebro, se obtuvo resultado similar al caso explicado arriba con homogenizado de hígado.

Cianuro en agua

En este caso, la prueba se realizó con todas las muestras al tiempo, la lectura se hizo a las 24 horas y el resultado fue positivo para todas las muestras pertenecientes a los tratamientos 2 y 3.

Discusión

Sintomatología clínica

Cambios en el comportamiento y patrones de nado fue indicativo de efectos tóxicos potenciales en los peces expuestos a 1ppm de CN (tto 2) y 1ppm de CN:50ppm de tiosulfato de sodio (tto 3) desde el minuto 1 al 15, finalizando entre las 1 hr 45 minutos a 4 hr 33 minutos; en este lapso de tiempo fue evidente la dificultad respiratoria y motriz de los ejemplares, hasta imposibilidad en el movimiento. Quang Dung y col. 2005, encontraron que cobia (*Reachycentrum cana-*

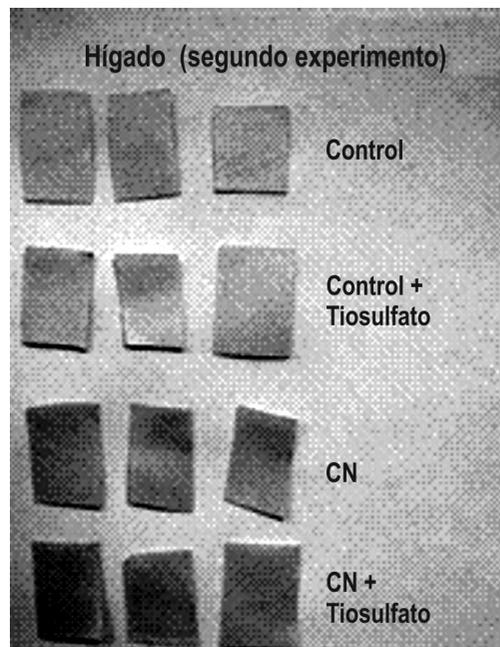
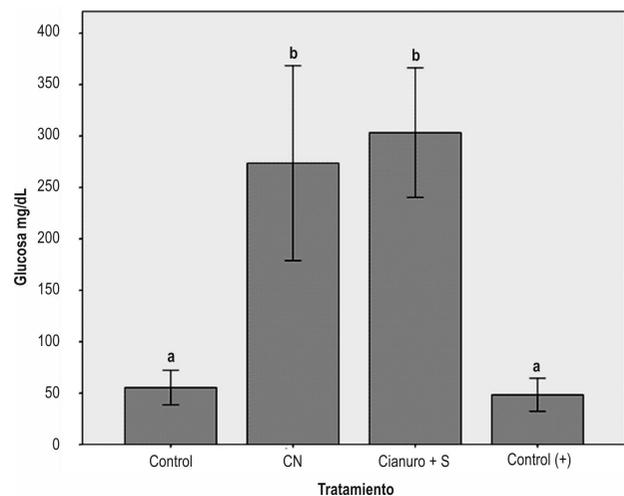


Figura 28. Resultado de la prueba del ácido pícrico en muestras de cerebro. (oscurecimiento tardío)

dum) es muy sensible a cianuro, debido a que la mayoría de las mortalidades ocurrieron inmediatamente durante los primeros 15-30 minutos de exposición. En este caso, los animales inicialmente intentan huir del ambiente hostil, lo cual se explica por el efecto del CN a nivel celular, donde al inhibir la enzima citocromo C oxidasa de la respiración celular, imposibilita la utiliza-



Gráfica 1. Comparación de niveles de glucosa (mg/dL) de juveniles de *tilapia roja* (*Oreochromis sp*) bajo diferentes tratamientos. Control (55.33±16.8), NaCN (273.56±94.7), NaCN + tiosulfato de sodio (303.2±63.0) y control (+) (48.33±16.03). Valores mostrados como media ± SD. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). n=?

ción de oxígeno; de esta forma el individuo lo interpreta como falta de oxígeno e intenta suplir este déficit con aire de la superficie; manifestado como boqueo, taquipnea y polipnea, lo que evidencia la condición hipoxica. Los patrones de nado errático indican pérdida del equilibrio ya que el CN tiene profundo efecto sobre el sistema nervioso central. Esto es soportado por los cambios en los niveles de neurotransmisores del cerebelo y cuerpo estriado. Sin embargo, también habría inhibición de la actividad de citocromo C oxidasa cerebral, lo que causa hipoxia citotóxica y genera daño en la región cerebral encargada del equilibrio (Shwetha., B.B. Hosetti, 2009). Además, que la actividad locomotora puede reflejar más una respuesta no específica al estrés, lo que resulta en cambios en los niveles de cortisol y glucosa en sangre.

En este trabajo se decidió finalizar la exposición al tóxico al observar signos extremos de intoxicación como fueron incapacidad de movimiento y dificultad respiratoria grave. Al contrario de los peces en los tratamientos 2 y 3, los ejemplares de los tratamientos 1 y 4 no tuvieron ninguna alteración sugiriendo que el tiosulfato de sodio es inofensivo para estos animales.

Anatomopatología

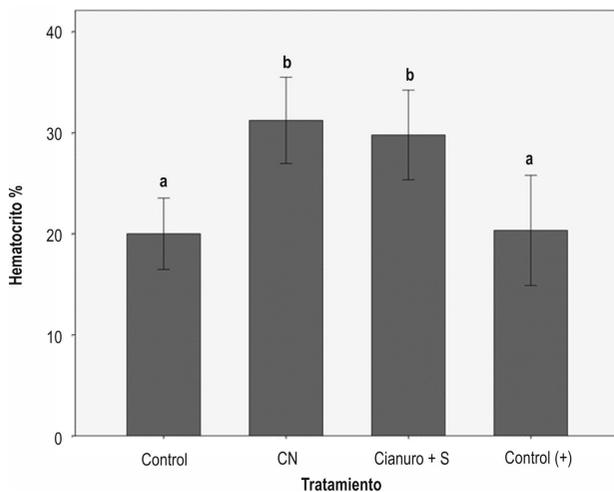
A diferencia de los peces en los tratamientos 1 y 4, en varios animales de los tratamientos 2 y 3 hubo presencia de abundante moco externo, que puede ser debido a una respuesta general a condiciones de estrés en los animales a causa de la presencia de un agente tóxico como el NaCN, solo uno de los peces del tratamiento 3 mostró un color rojo claro brillante en las branquias lo que se considera indicativo en la intoxicación por CN. El hígado de la mayoría de los peces en los tratamientos 2 y 3 y algunos del grupo control y control positivo tenía consistencia friable al corte, aumento de tamaño y cambios de coloración generalizados con zonas de congestión, por otra parte, en dos ejemplares del tratamiento 2, cinco del tratamiento 3 y uno del grupo control se encontró el riñón congestionado y esplenomegalia en dos del tratamiento 2, uno del tratamiento 3 y uno del grupo control, además fue evidente la congestión y edema marcado en el cerebro de todos los peces de los tratamientos 2 y 3 y ligera congestión en uno de los grupos control y control positivo respectivamente; aunque estas alteraciones macroscópicas en los órganos nombrados se presentaron en su mayoría en los peces expuestos a CN y CN:tiosulfato, no puede atribuirse esto como efecto del NaCN puesto que algunos de los peces libres de cualquier sustancia y con tiosulfato de sodio únicamente, presentaron alte-

raciones en algunos órganos. Aun así, la congestión severa y edema marcado en el cerebro de todos los animales con exposición a NaCN evidencia el profundo efecto de este tóxico sobre el sistema nervioso central en donde por acción directa, inhibe el complejo enzimático citocromo C oxidasa mitocondrial que conduce a anoxia citotóxica, por otro lado, el CN puede provocar acumulación de calcio intracelular en neuronas, liberación de neurotransmisores excitatorios en cerebro, peroxidación lipídica (por inhibición de enzimas antioxidantes), y liberación de catecolaminas desde glándulas adrenales y terminales nerviosas adrenérgicas. Afecta la respiración a nivel celular en la cadena respiratoria y a nivel fisiológico a través de los quimiorreceptores; esto explicaría la predominancia de afecciones neurológicas, ya que el SNC es más vulnerable por su alta demanda de oxígeno (Isea Gerardo y col, 2003).

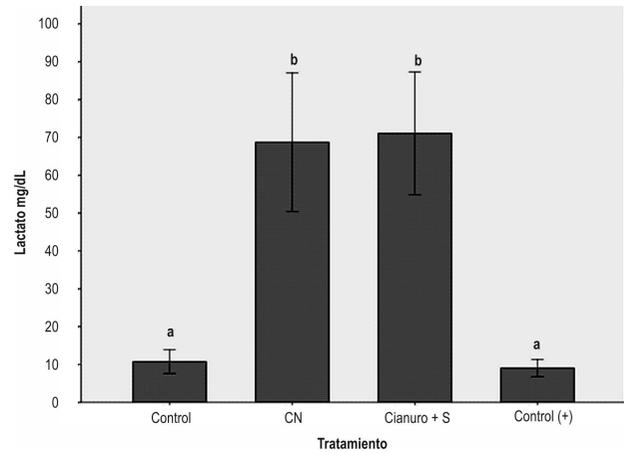
Parámetros bioquímicos y hematológicos

Como se puede apreciar en la tabla 1; el hematocrito de los peces en los tratamientos 1 y 4, grupo control y control positivo, respectivamente, es bajo para la especie según lo encontrado por Ghiraldelli y col., (2006); Azevedo y col., (2006); Araujo y col., (2011), lo cual permite considerar que no todos los animales estaban saludables, pues algunos presentaron valores tan bajos como 14, 15, 16 y 17%. Aunque, Akinrotimi y col., (2010) reportan valores normales de 17.21% mínimo y 21.22% máximo, en hembras y 18.14 mínimo y 24.12 máximo, en machos de la especie *T. guineensis*. Por otro lado, el hematocrito en los ejemplares de los tratamientos 2 y 3 (tabla 2), sí está dentro de lo que se considera normal, pero teniendo en cuenta que todos los ejemplares usados en este experimento fueron mantenidos y alimentados bajo las mismas condiciones, se puede pensar que hubo aumento en el hematocrito como efecto de la exposición al NaCN (gráfica 2). Los niveles de glucosa (gráfica 1) obtenidos de los peces control y control positivo con un promedio de 55.33±16.8 mg/dL y 48.33±16.03 mg/dL se considera normal para la especie (Azevedo y col., 2006), por el contrario, niveles promedio en glucosa de 273.56±94.7 mg/dL y 303.2±63 mg/dL para los peces de los tratamientos 2 y 3 respectivamente, están muy por encima de lo normal; la misma situación se tiene para el lactato plasmático cuyos resultados de 10.74±3.15 mg/dL y 9.04±2.26 mg/dL para los peces de los tratamientos 1 y 4 respectivamente, contrastan rotundamente con lo hallado en los peces expuestos a CN; con valores de 68.7±18.3 mg/dL y 71.06±16.2 mg/dL para los tratamientos 2 y 3 respectivamente; con diferencias significativas ($p < 0.05$), valores que so-

brepasan los niveles basales para la especie (Lian Tien y col., 1995; Gómez Manrique y col., 2009). Por lo tanto, es evidente el efecto de la exposición aguda al CN sobre los parámetros hematológicos de hematocrito y bioquímicos de glucosa y lactato; estos parámetros son considerados indicadores de estrés, que en este caso es acentuado por el desequilibrio fisiológico que genera el NaCN. Los resultados obtenidos pueden explicarse por la estimulación a nivel de la médula adrenal para liberar catecolaminas durante la intoxicación aguda (González JF, 2011), que da lugar a la contracción del bazo y a la liberación de los eritrocitos almacenados a la circulación, provocando así un incremento en el hematocrito (Weber Antonio R, 2009), lo cual, es necesario para transportar más oxígeno a los tejidos en condición de hipoxia (Gómez Manrique, y Col, 2009), sin embargo esto resulta inútil ya que las células son incapaces de utilizarlo. De igual forma, el incremento de la glucosa plasmática es una de las respuestas secundarias al estrés más típicas, siendo resultado de la movilización de las reservas del glucógeno hepático como consecuencia de la activación de la glucogenólisis por la acción de las catecolaminas y/o del cortisol, así como el incremento en los niveles plasmáticos de lactato estaría asociado a su uso como sustrato para la gluconeogénesis, cuando la disponibilidad de oxígeno a nivel celular es baja para el metabolismo celular aeróbico (Weber Antonio R, 2009), ya que al inhibir la citocromo C oxidasa, se alteran otras reacciones de óxido-reducción celular como el catabolismo de la glucosa que toma la vía pentosa-fosfato, llevando al descenso del cociente ATP/ADP (González



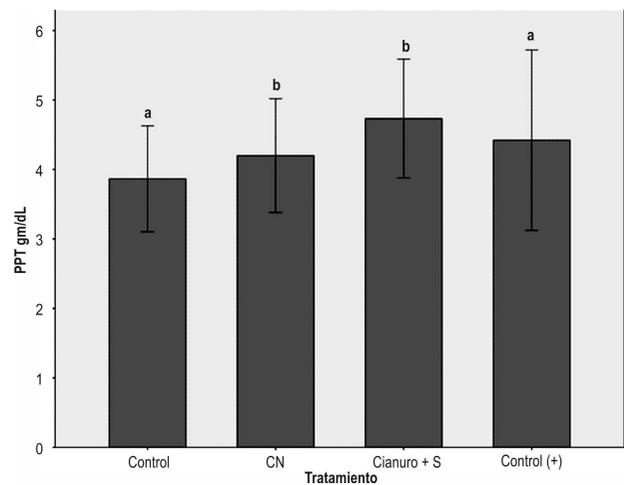
Gráfica 2. Comparación de hematocrito (%) de juveniles de tilapia roja (*Oreochromis sp*) bajo diferentes tratamientos. Control (20±3.5), NaCN (31.2±4.2), NaCN+ tiosulfato de sodio (29.78±4.4) y control (+) (20.33±5.4); letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05).



Gráfica 3. Comparación de lactato de plasmático (gr/dL) del tratamiento control 10.74 ± 3.15, NaCN 68.7±18.3, NaCN + tiosulfato de sodio 71.06 ± 16.2 y control (+) 9.04 ± 2.26; letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05)

lez JF, 2011), aumentando la oxidación anaeróbica y la actividad lactado deshidrogenasa (Lian Tien, y Col 1995), y así ser fuente importante de energía fácilmente disponible (gluconeogénesis), en el mantenimiento de unos niveles elevados de glucosa durante el estrés (Weber Antonio R, 2009).

La concentración de proteínas plasmáticas reportada para *Oreochromis niloticus* es de 3.1 g/dL y los valores encontrados para los peces de los tratamientos 1, 2, 3 y 4 fue: 3.8±0.76 gr/dL, 4.2±0.8 gr/dL, 4.7±0.9 gr/dL y 4.4±1.29 gr/dL respectivamente, que no presentaron diferencias significativas.



Gráfica 4. Comparación de PPT (gr/dL) del tratamiento control: 3.8±0.76, NaCN: 4.2±0.8, NaCN + tiosulfato de sodio: 4.7±0.9 y control (+) 4.4±1.29; No fueron observadas diferencias significativas (p>0.05).

Determinación cualitativa de CN con la reacción de Guignard o ácido pícrico

Los resultados no son concluyentes con macerado de cerebro e hígado pues no hubo un importante cambio en la coloración al momento de retirar las tiras de los recipientes, lo cual no es indicativo de una reacción positiva, pero si hubo oscurecimiento tardío de las tiras que puede llevar a interpretaciones de falso positivo. Por el contrario, la prueba fue positiva para todas las muestras de agua con contenido de NaCN, y negativa en las muestras de agua de los acuarios control y control positivo.

Conclusiones

Las alteraciones del comportamiento, en patrones de nado, actividad en la columna de agua, patrones de respiración, entre otros, son manifestaciones clínicas de intoxicación, evidentes en tilapia sp. expuestas a 1ppm de NaCN, lo que es importante resaltar es la extrema rapidez con la que se presentan los primeros signos clínicos, así como el rápido progreso de estos, hasta volverse cada vez más acentuados y finalmente agónicos. En el presente trabajo que pretendía, entre otras cosas, evaluar el efecto protector del tiosulfato de sodio frente a exposición aguda de NaCN, se encuentra que no es efectivo en ningún momento durante el experimento, desde que los peces expuestos a NaCN y NaCN con Tiosulfato de sodio tuvieron las mismas manifestaciones clínicas y niveles similares en los parámetros evaluados. Sin embargo, se podría pensar que esta especie es muy sensible a dosis tan altas del tóxico, como también que la dosis de tiosulfato de sodio usada no fue suficiente para proteger a los animales y minimizar o revertir los efectos del CN. Por otro lado, se puede pensar que el estado de salud de los animales puede afectar la acción del tiosulfato como protector. Además, es evidente que el NaCN en exposición aguda, si afecta notoriamente los parámetros sanguíneos evaluados, que serían de gran utilidad para diagnosticar casos de sintomatología similar y con sospecha de cianurotoxicosis. Evidentemente la prueba del papel picosado es eficaz y además muy fácil de utilizar, con el fin de detectar concentraciones de cianuro en agua, pero se complica su uso en tejidos como el hígado y cerebro, por lo que se requiere perfeccionar la técnica y estandarizar formas efectivas de usarla, para lograr obtener resultados relevantes.

Agradecimientos

Al Dr. Jaime Fernando González, por la confianza y el apoyo incondicional durante el desarrollo de este experimento, para optar al grado de Médico Veterinario

y Zootecnista, a los estudiantes de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Shirly Marroquin y Javier Borbón y al laboratorio de Toxicología Acuática y Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Bibliografía

- Akinsiku OT, Agboola FK, Kuku A, Afolayan A. Physicochemical and kinetic characteristics of rhodanese from the liver of African catfish *Clarias gariepinus* Burchell in Asejire lake, Fish Physiol Biochem. 2010;36:573-86.
- Robert Moran. 1998. *Cyanide Uncertainties: Observations on the Chemistry, Toxicity, and Analysis of Cyanide in Mining-Related Waters*. Edited by Susan Brackett. MPC Issue Paper No. 1. Encontrado en: <http://www.portaec.net/library/pollution/observationsonthechemistry.html>.
- Dube PN, Hosetti BB. Behaviour surveillance and oxygen consumption in the freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton) exposed to sodium cyanide. Biotechnol Anim Husb. 2010;26(1-2):91-103.
- Mancera-Rodríguez NJ, Álvarez-León R. *Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia*. Acta Biol Colomb. 2016;11(1):3-23.
- Vásquez-Piñeros M, Rondón-Barragán I, Restrepo-Betancur L, Eslava-Mocha P. *Estudio clínico y hematológico de una infección experimental con *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* en tilapia, *Oreochromis* sp.* Orinoquia. 2010;14:33-44.
- Ortega M, Ladero J. 2005. *Pruebas de laboratorio y parámetros bioquímicos en sangre*. Cap. 3. Pp: 117-118. Encontrado en: <http://www.normon.es.media-manual-8-capitulo-03.pdf>.
- Quang-Dung L, Manh-Cuong N, Thanh-Huyen N, Nguyen-Duc C. Institute of Marine Environment and Resources, 246 Dang-nang Street, Hai Phong city, Vietnam. Australas J Ecotoxicol. 2005;11:163-166.
- Shwetha B, Hosetti B. Acute Effects of Zinc Cyanide on the Behaviour and Oxygen Consumption of the Indian Major Carp *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). World J Zool. 2009;4(3):238-246.
- Isea G, Rodríguez I, Isea E, Sánchez E, Torres M, Gil M. 2003. Valoración de la glucosa como antídoto en la intoxicación por cianuro. Retel., en: <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>.
- Ghirdelli L, Laterça-Martins M, Maia-Yamashita M, Tomas-Jerônimo G. Hematologia de *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) e *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) mantidos em diferentes condições de manejo e alimentação no Estado de Santa Catarina, Brasil. Acta Sci Biol Sci. 2006;28(4):319-325.
- Azevedo T, Martins-Laterça M, Yamashita M, Francisco-Claire J. Hematologia de *oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do rio tijucas, santa catarina, Brasil. Inst. Pesca, São Paulo. 2006;32(1):41-49.
- Magalhães-Araujo D, Celso-Pezzato A, Barros M, Edivaldo-Pezzato L, Kojima-Nakagome F. Hematologia de tilapias-do-nilo alimen-

- tadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. *Pesq Agropec Bras*. Brasília. 2011;46(3):294-302.
- Akinrotimi OA, Abu OMG, Bekibele DO, Udeme-naa B, Aranyo AA. Haematological characteristics of tilapia guineensis from buguma creek, Niger delta, Nigeria. *EJEAFChe*. 2010;9(8):1415-142.
- Lian-Tien S, Gran-Ru C, Ching-Fong C. Acute responses of blood parameters and comatose effects in salt-acclimated tilapias exposed to low temperatures. *Therm Bid*. 1995;20(3):299-306.
- Gómez-Manrique W, Massago H, Abreu-Santos D, Criscuolo-Urbinati E, Criscuolo-Urbinati E. Respuesta del *Piaractus mesopotamicus* a estímulos de persecución e hipoxia. *Orinoquia*. 2009;13:93-100.
- González JF. 2011. Cap. VII Principios Tóxicos Presentes en Plantas (8. Cianuro- Glucósidos cianogénicos); Libro: Principios de Toxicología Veterinaria. Pp. 142-144.
- Weber- Antonio R. 2009. Efecto del estrés y de la anestesia sobre indicadores primarios y secundarios de estrés y sobre los neurotransmisores monoaminérgicos cerebrales en el lenguado *solea senegalensis* (kaup 1858). (Tesis doctoral), Universidad Santiago de Compostela.
- Equipo de prensa Business News Américas. 2008. *CVC solicita cierre de minas de oro, por contaminación con cianuro en Valle del Cauca*. Encontrado en: http://www.bnamericas.com/news/aguasyresiduos/CVC_solicita_cierre_de_minas_de_oro_por_contaminacion_con_cianuro_en_valle_del_Cauca.
- Avinash CS, Rajasekhara D. 2010. Plant adaptation and phytoremediation. Part 2, 399-426 DOI: 10.1007/978-90-48-9370_18.
- Jaramillo N, Valdebenito I. 2005. *Estudio hematológico básico del Puye (galaxias maculatus) (Jenyns, 1842) en estado postlarval y adulto*. Universidad Católica de Temuco.
- García A, Genes-López F, Madariaga-Mendoza D, Pardo-Carrasco S. *Hematología y química sanguínea de juveniles de Rubio (Salminus affinis Pisces: Characidae) del río Sinú*. *Acta Biol Colomb*. 2007;12:27-40. Encontrado en: http://www.virtual.unal.edu.core-vistas-acta-biol.PDF's_v12s_1v12s-1a3.pdf.
- Quiroga P, Olmos V. *Revisión de la toxicocinética y la toxicodinamia del ácido cianhídrico y los cianuros*. *Acta Toxicología Argent*. 2009;17(1):20-32.
- Omolara TA, Femi KA, Adenike K, Adeyinka A. Physicochemical and kinetic characteristics of rhodanese from the liver of African catfish *Clarias gariepinus* Burchell in Asejire lake. *Fish Physiol Biochem*. 2010;36:573-586.