

**Cinvestav**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

---

---

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**“Evaluación de los efectos oxidativos, hepáticos y reproductivos  
inducidos por el cadmio en el pez *Goodea atripinnis*”**

**TESIS**

Que presenta:

Q.F.B. ISAAC ISRAEL SÁNCHEZ ROSALES

Para Obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE  
FARMACOLOGÍA

Director de la Tesis: Dra. Liliana Favari Perozzi

México, Distrito Federal

Diciembre, 2014

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Farmacología, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría de la Dra. Liliana Favari Perozzi.

Se contó además, con una beca del CONACYT para estudios de posgrado con clave de registro: **514237**.

## *Dedicatorias*

*Primeramente quiero dar gracias a Dios por estar conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para poder seguir adelante. Esta tesis se la dedico a con todo mi amor y fe a Dios quien me da la oportunidad de vivir y por qué hoy puedo decir:*

*Hasta aquí nos ayudó Jehová.*

*1 Samuel 7:12 b*

*A una persona muy especial en mi vida, Ilse Torres Escobar, le dedico este trabajo, por estar conmigo siempre y darme su apoyo en momentos difíciles. Por ser mi mejor amiga y cómplice, no hay palabras para darte las gracias por todo el tiempo que has compartido conmigo. ♥*

*Con todo cariño a mis padres que me dieron la vida. A ti papá por tu fe y confianza que siempre me brindaste. A ti mamá que con tus oraciones y sabios consejos me has guiado adelante. Por el valioso apoyo que siempre me brindaron durante mi maestría, sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer toda una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo. Gracias por todos sus consejos, regaños, alegrías, enojos, peleas y discusiones que hayamos podido tener, porque todo eso enriquece mi formación.*

*Con Amor, Admiración y Respeto*

*Agradecimientos:*

*A la Dra. Liliana Favari Perozzi por su gran apoyo que recibí y la confianza para formar parte de su laboratorio. Gracias por sus consejos, correcciones, su tiempo y valiosas aportaciones, las cuales fueron invaluable para mi formación académica.*

*A mis sinodales, Dr. Pablo Muriel de la Torre y Dr. Carlos Hoyo Vadillo, agradezco su apoyo en la realización de este trabajo, su disposición para compartir su conocimiento, sus consejos y críticas para poder realizar este trabajo.*

*A la Dra. Eugenia López López por su paciencia, disposición y tiempo, ya que no solamente fue parte de mi comité tutorial sino que me recibió en su laboratorio para enseñarme un poco más del inmenso mundo que son los peces. Su conocimiento y valiosas aportaciones contribuyeron al buen término de esta tesis.*

*A Ma Teresa García Camacho, por sus enseñanzas y apoyo técnico para la realización de este trabajo. Gracias por su ayuda y compañerismo y por hacer mi estancia en el laboratorio muy amena.*

*A todos mis amigos de generación, gracias por todos los momentos de trabajo en equipo tratando de entender artículos. Por su compañerismo y horas compartidas en el propedéutico y en la maestría, es difícil de encontrar un grupo tan unido.*

*A mi compañero de maestría, MC Eric Daniel Salinas, gracias por ser siempre un buen amigo.*

*A todos mis compañeros y amigos del departamento de Farmacología, aunque no los mencione a cada uno de ellos, de manera directa o indirecta participaron durante el desarrollo de mi tesis, los llevo en mi corazón. A mi compañero de laboratorio Miguel Ángel García, gracias por brindarme su apoyo y valiosa ayuda durante nuestra estancia en el laboratorio.*

*Isaac Israel Sánchez Rosales*

# ÍNDICE

## Páginas

### Contenido

ÍNDICE DE TABLAS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	10
1 Introducción .....	12
1.1 Contaminación del ecosistema acuático.....	12
1.2 Metales.....	13
1.3 Cadmio.....	15
1.3.1 Usos del cadmio.....	15
1.3.2 Vías de exposición al cadmio.....	16
1.3.3 Efectos del cadmio.....	17
1.4 Biomarcadores.....	18
1.4.1 Biomarcadores de estrés oxidativo.....	19
1.4.2 Biomarcadores de daño hepático.....	20
1.5 Índices Morfofisiológicos.....	21
1.5.1 Factor de condición o índice de fulton (K).....	22
1.5.2 Índice hepatosomático (IHS).....	23
1.5.3 Índice gonadosomático (IGS).....	23
1.6 Organismo de estudio.....	24

1.6.1	Familia <i>Goodea</i> .....	24
1.6.2	<i>Goodea atripinnis</i> . ....	24
1.7	Justificación.....	28
1.8	Hipótesis. ....	28
2	Objetivos.....	30
2.1	Objetivo General. ....	30
2.2	Objetivos específicos. ....	30
3	Materiales y métodos.....	32
3.1	Material Biológico.....	32
3.2	Diseño Experimental. ....	32
3.3	Determinación de biomarcadores. ....	35
3.3.1	Elaboración de los homogeneizados hepáticos. ....	35
3.3.2	Determinación de la fosfatasa alcalina (FA). ....	36
3.3.3	Determinación de la gamma-glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GTP). ....	37
3.3.4	Determinación de la peroxidación lipídica (PL). ....	39
3.3.5	Determinación del contenido de glucógeno. ....	40
3.3.6	Actividad de la catalasa (CAT). ....	41
3.3.7	Actividad de la superóxido dismutasa (SOD). ....	41
3.3.8	Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx). ....	43
3.3.9	Acetilcolinesterasa (AChE). ....	43
3.3.10	Determinación de proteínas. ....	44
3.4	Análisis estadístico de los resultados.....	45
4	Resultados.....	48
4.1	Cálculo de la Concentración Letal media (CL <sub>50</sub> ). ....	48
4.2	Exposición aguda.....	48

4.2.1	Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y la gamma glutamiltranspeptidasa. ....	48
4.2.2	Determinación del contenido de glucógeno y actividad de la enzima acetilcolinesterasa. ....	50
4.2.3	Determinación del nivel de peroxidación lipídica. ....	51
4.2.4	Actividad enzimática de la catalasa, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa. ....	52
4.3	Exposición subcrónica.....	54
4.3.1	Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y la gamma glutamiltranspeptidasa. ....	54
4.3.2	Determinación del contenido de glucógeno y actividad de la enzima acetilcolinesterasa ....	55
4.3.3	Determinación del nivel de peroxidación lipídica. ....	57
4.3.4	Actividad enzimática de la catalasa, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa ....	58
4.4	Respuesta Integrada de Biomarcadores (RIB).....	60
4.5	Evaluación del cadmio en la reproducción y el desarrollo embrionario....	61
4.5.1	El número y la sobrevivencia de alevines. ....	61
4.5.2	Evaluación de los índices morfofisiológicos ....	63
5	Discusión de Resultados. ....	67
6	Conclusiones. ....	78
7	Bibliografía.....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Efectos del cadmio en distintos órganos. ....	17
Tabla 2. Importantes biomarcadores de estrés oxidativo. ....	20
Tabla 3. Importantes biomarcadores de daño hepático. ....	21
Tabla 4. Disolventes utilizados para realizar los homogeneizados hepáticos. ....	36
Tabla 5. Curva estándar de la fosfatasa alcalina. ....	37
Tabla 6. Curva de calibración de la gamma glutamil transpeptidasa. ....	39
Tabla 7. Concentración letal media del cadmio en distintas especies de peces. ...	67



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación esquemática de la interacción del cadmio con células animales.....	18
Figura 2. <i>Goodea atripinnis</i> macho .....	26
Figura 3. <i>Goodea atripinnis</i> hembra .....	26
Figura 4. Desarrollo metodológico.....	33
Figura 5. Regresión logística de organismos muertos por Log [concentración (mg/L)]. .....	48
Figura 6. Actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	49
Figura 7. Gamma glutamiltranspeptidasa (GGTP) en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	49
Figura 8. Cantidad de glucógeno hepático en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	50
Figura 9. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	51
Figura 10. Peroxidación lipídica (PL) en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	52
Figura 11. Actividad de la catalasa (CAT) en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	53
Figura 12. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	53
Figura 13. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	54

Figura 14. Actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	55
Figura 15. Gamma glutamiltranspeptidasa (GGTP) en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	55
Figura 16. Cantidad de glucógeno hepático en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	56
Figura 17. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	57
Figura 18. Peroxidación lipídica (PL) en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	57
Figura 19. Actividad de la catalasa (CAT) en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	58
Figura 20. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	59
Figura 21. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en <i>G. atripinnis</i> control e intoxicados. ....	59
Figura 22. Respuesta Integrada de Biomarcadores (RIB) en el hígado de <i>Goodea atripinnis</i> . Exposición aguda. ....	60
Figura 23. Respuesta Integrada de Biomarcadores (RIB) en el hígado de <i>Goodea atripinnis</i> . Exposición subcrónica. ....	61
Figura 24. Promedio de alevines en <i>G. atripinnis</i> , control e intoxicados. ....	62
Figura 25. Porcentaje de sobrevivencia de alevines <i>G. atripinnis</i> , control e intoxicados. ....	63
Figura 26. Factor de condición (FC) de alevines <i>G. atripinnis</i> , control e intoxicados. ....	64
Figura 27. Índice hepatosomático (IGS) de alevines <i>G. atripinnis</i> , control e intoxicados. ....	65

Figura 28. Índice gonadosomático (IGS) de alevines <i>G. atripinnis</i> , control e intoxicados.....	65
Figura 29. Hígado control de <i>Goodea atripinnis</i> .....	71
Figura 30. Hígado de <i>Goodea atripinnis</i> expuesto a cadmio. Tratamiento subcrónico.....	71
Figura 31. Hígado de <i>Goodea atripinnis</i> expuesto a cadmio. Tratamiento agudo.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABT	Ácido barbitúrico
AChE	Acetilcolinesterasa
ANOVA	Análisis de Varianza
Cd	Cadmio
CdCl <sub>2</sub>	Cloruro de cadmio
EO	Estrés oxidativo
FA	Fosfatasa alcalina
FC	Factor de condición
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
γ-GTP	Gamma-glutamyltranspeptidasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
IGS	Índice gonadosomático
IHS	Índice hepatosomático
LC <sub>50</sub>	Concentración letal media
PL	Peroxidación lipídica
MDA	Malondialdehído
OH <sup>·</sup>	Radical hidroxilo
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RIB	Respuesta Integrada de Biomarcadores
SOD	Superóxido dismutasa

## RESUMEN

El cadmio es un metal ampliamente utilizado en la industria, éste se encuentra en forma natural en la corteza terrestre, sin embargo, es tóxico para todas las formas de vida y carece de función biológica. *Goodea atripinnis*, una especie endémica de la Mesa central de la República Mexicana fue elegida para evaluar el daño que produce este metal, cuantificado su efecto mediante el uso de biomarcadores de daño temprano ya que se espera que el cadmio induzca daño hepático y estrés oxidativo en *Goodea atripinnis*. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la exposición al cadmio sobre el estrés oxidativo y el daño hepático en *Goodea atripinnis*. El proyecto fue dividido en 3 etapas principales: 1) Determinación de la dosis letal media (CL<sub>50</sub>) de *Goodea atripinnis* utilizando un sistema estático, donde los ejemplares se expusieron a distintas concentraciones de cloruro de cadmio. La CL<sub>50</sub> para cadmio fue de 9.44 mg/L, calculada mediante el método Probit. 2) Evaluar el efecto agudo y subcrónico del cadmio exponiendo los peces a ½ y a ⅓ de la CL<sub>50</sub> por 5 días y 30 días, respectivamente. Al finalizar el periodo, los peces se sacrificaron y se les extrajo el hígado para la determinación de los biomarcadores de daño temprano: las actividades enzimáticas de la gamma glutamiltranspeptidasa y la fosfatasa alcalina, las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa y la actividad de la enzima acetilcolinesterasa. Adicionalmente se determinó el grado de peroxidación lipídica y la cantidad de glucógeno hepático. Una vez determinada la batería de los biomarcadores se realizó la integración de las respuestas mediante el índice de la Respuesta Integral de Biomarcadores (RIB). 3) Finalmente, se evaluó el efecto del cadmio sobre la reproducción y el desarrollo embrionario de *Goodea atripinnis*. Para evaluar el efecto reproductivo, hembras preñadas de la primera generación fueron expuestas a 1/4 de la LC<sub>50</sub> durante 90 días para evaluar el efecto del cadmio sobre el número de alevines y la sobrevivencia de los mismos y se evaluó el efecto del cadmio sobre el desarrollo de los embriones mediante la exposición de alevines durante 1, 2 y 3 meses a un 1/5 de la LC<sub>50</sub>; al finalizar el periodo de exposición, los organismos fueron sacrificados, medidos y pesados y a cada uno de los grupos se le calculó el índice gonadosomático, el índice hepatosomático y el factor de condición. Los resultados muestran que a pesar de que *Goodea atripinnis* es considerado un organismo tolerante, enfrenta severos daños por estrés oxidativo, las respuestas antioxidantes muestran diferencias sustanciales, lo cual refleja el efecto tóxico del cadmio sobre las defensas antioxidantes. La cantidad y sobrevivencia de los alevines, aunados a los resultados obtenidos en la RIB, evidencian que el cadmio puede ocasionar daño hepático y afectar de manera importante la reproducción de *Goodea atripinnis*. El efecto del cadmio sobre el desarrollo de los alevines quedó manifestado por los cambios en los índices somáticos, debido a los constantes reajustes energéticos o “trade offs” que realiza *Goodea atripinnis* para adecuarse a la exposición al xenobiótico. Los resultados obtenidos en los bioensayos evidencian que el efecto del cadmio sobre los biomarcadores de daño temprano, varía dependiendo del tiempo de exposición, la dosis administrada y la edad del pez.

## ABSTRACT

Cadmium, a metal widely used in the industry, is found in soil and comprises part of the earth's crust, nevertheless, this is toxic for all known forms of life because cadmium has no biological role. *Goodea atripinnis*, is a viviparous fish native to the Central Plateau of Mexico, was chosen to assess the damage of cadmium, evaluating oxidative stress with a set of early biomarkers of injury. The aim of the present study was to assess the toxic effects of the cadmium on *G. atripinnis*. The project was divided into three parts: 1) The acute toxicity bioassay for the test chemical cadmium chloride was conducted in static system to determine the 96 h LC<sub>50</sub> in the test species *G. atripinnis*. The data obtained were statistically evaluated by the use of XLSTAT computer program based on Probit Analysis Method and a 96-h LC<sub>50</sub> value for *G. atripinnis* was found to be 9.44 mg/L in a static bioassay test system. 2) Based on the LC<sub>50</sub> the acute and subchronic effects were evaluated; by the acute test the fish were exposed to ½th of LC50 for a period of 5 days, and ⅓rd of LC50 by 30 days for the subchronic trials. At the end of the exposure period, the fish were killed with a sharp blow to the head, and the livers were removed for determination of biomarkers: hepatic enzymes alanine aminotransferase and gamma glutamyltranspeptidase, antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase and the acetylcholinesterase activity. Additionally, in liver was assessed the glycogen content and the degree of lipid peroxidation. We determined the Integrated Biomarkers Response (IBR), with the results obtained for the battery of biomarkers. Antioxidant responses show substantial differences, reflecting the toxic effect of cadmium on antioxidant defense systems in *G. atripinnis*. 3) Finally, we evaluate the reproductive effects and embryonic development of *Goodea atripinnis* exposed to cadmium. In the evaluation of the reproductive effects, we evaluated the effect of cadmium on the offspring of exposed pregnant females exposed to cadmium chloride (⅓rd LC<sub>50</sub>) for 90 days. To compare the offspring of untreated and treated females, we evaluate the brood size (number of alevins in each brood) and the proportion of offspring surviving to adulthood for each brood (number of adult fish divided by total number of fish born). The effect of cadmium on the development of the embryos was assessed by exposing alevins for 1, 2 and 3 months to 1/5th of the LC50; at the end of the exposure period, the organisms were sacrificed, measured and weighed and each group was calculated the condition factor, hepatosomatic index and the gonadosomatic index. The results show that although *G. atripinnis* is considered as a tolerant species, cadmium is responsible for damage by oxidative stress in the fish. The number and survival of the alevins, combined with those the IBR, for enzyme activities and level of lipid peroxidation, showed that the cause liver injury and affect significantly the reproduction in *G. atripinnis*. Our results suggest that cadmium concentrations affect immature fish with possible consequences later in life; the effect of cadmium in the development of alevins the remain manifested by changes in somatic indices, due to the constant energy adjustment or "trade offs" that makes *G. atripinnis* to suit xenobiotic exposure. The results of the bioassays show that the effect of cadmium on biomarkers of early damage, change depending on the time of exposure, the dose and the age of the fish.

---

# CAPITULO I

Marco Teórico

---



## 1 Introducción

### 1.1 Contaminación del ecosistema acuático.

Las actividades humanas y el desarrollo industrializado aunque pensado para ser benéfico, trae como consecuencia la producción y liberación de contaminantes que se incorporan al ecosistema y afectan los distintos ambientes de una manera adversa (Shugart, 1994). El impacto sobre el medio ambiente está relacionado con el crecimiento de la población mundial, producto de la incorporación de los contaminantes a la atmósfera, agua y suelo, los cuales se van acumulando hasta alcanzar concentraciones que consecuentemente limitan el uso y explotación de recursos (White and Rainbow, 1987). Muchos de estos contaminantes no son biodegradables y por lo tanto, su permanencia en el ambiente plantea una amenaza a largo plazo para la salud pública y la vida silvestre, donde los cambios biológicos debido a la contaminación ocurre en todos los niveles de organización, desde el molecular hasta la comunidad (Järup, 2003).

Como sucede con los ecosistemas terrestres, los acuáticos están sometidos a la influencia del hombre, lo que ha resultado en distintos grados de perturbación o degradación por las cantidades excesivas de contaminantes que incorpora al ambiente. Las actividades como el gran desarrollo de las tecnologías, el crecimiento demográfico, el turismo, el crecimiento petrolero e industrial y la utilización de agroquímicos para la agricultura causan efectos adversos en el ambiente y afectan severamente a los organismos que lo habitan. De las actividades antes mencionadas, las principales sustancias y productos que se desechan al ambiente en cantidades inmoderadas se encuentran los residuos industriales, aguas negras sin tratar, residuos radioactivos, aceites, petróleo, restos de plásticos, productos químicos como el dicloro difenil dricloroetano (DDT), policlorobifenilos (PCB), aldrín, dieldrín, compuestos organoclorados y los metales





pesados como el plomo (Pb), mercurio (Hg), cadmio (Cd), zinc (Zn), cromo (Cr), entre otros (Albert and Badillo, 1991). Es común pensar en los contaminantes en términos de concentraciones altas, pero los metales pesados en concentraciones muy pequeñas pueden ocasionar serios problemas tanto a los organismos, como a los consumidores de los mismos (Cirillo et al., 2012) debido a su capacidad de bioacumulación y biomagnificación a lo largo de la cadena trófica (Souid et al., 2013).

## 1.2 Metales.

El contenido de los metales en la corteza es inferior a 0.1% y, en general, se encuentran en los minerales, rocas, suelo y aguas a concentraciones usualmente bajas. Sin embargo, las actividades antropogénicas han aumentado sus concentraciones en el ambiente ya que, desde hace siglos, los metales han sido usados por el hombre para fabricar utensilios de cocina, armas, herramientas de trabajo, medios de transporte, etc. (Vázquez Botello et al., 2004). En las últimas décadas, el uso de los metales se ha ampliado e incrementado de manera muy importante en actividades industriales y agrícolas e incluso en medicina. Todas estas actividades han contaminado el ambiente y han aumentado la exposición de los seres vivos hacia estas sustancias. Por lo tanto, la toxicidad de los metales pesados es un problema de salud pública (Harmanescu et al., 2011).

La exposición a los metales se realiza a través de varias rutas, como agua, tierra, aire, extracción de minerales, procesos industriales y alimentos contaminados, como el pescado. Los metales pesados pueden pasar del suelo a los vegetales y de allí a los animales y al hombre. Por ello, las células pueden atrapar agentes tóxicos que se quedan en su interior o se incorporan en la membrana, lo que altera el funcionamiento de algunos mecanismos bioquímicos y fisiológicos e incluso puede generarse daño mortal (Houston, 2012).



El riesgo de la toxicidad producida por los metales depende de la magnitud y la duración de la exposición a ellos. Por lo tanto, para adoptar medidas preventivas y evitar daños a la salud, se deben conocer las concentraciones de los metales a la que están expuestos los humanos (Praveena et al., 2014).

Al llegar a la sangre, la mayoría de los metales se transportan unidos a las proteínas plasmáticas. Su distribución tisular depende de la facilidad con la que atraviesan las membranas de las células, del flujo sanguíneo local y de la afinidad por las estructuras de órganos y tejidos. Las principales vías de eliminación de los metales son la renal y la gastrointestinal (bilis), otras rutas incluyen al sudor y la saliva.

Las acciones tóxicas producidas por los metales generalmente se derivan de la interacción entre el metal libre y el blanco celular (membranas, organelos celulares, procesos bioquímicos, etc). Al respecto, los metales pesados pueden establecer enlaces con biomoléculas, como las proteínas y el ADN, y por ello, pueden dañar diferentes órganos o tejidos. En este contexto, las acciones tóxicas de los metales se relacionan con: a) la inhibición de enzimas, b) el daño estructural o funcional de organelos celulares, c) la interacción con los metales esenciales por similitud electrónica, d) la generación de cáncer, e) el daño renal, f) la neurotoxicidad, g) el daño pulmonar y h) las alteraciones endocrinas y de la reproducción.

La membrana plasmática de las células y de las enzimas son sitios frecuentes de la acción tóxica de los metales; en la membrana plasmática dañan su permeabilidad y el funcionamiento de las proteínas acarreadoras (Norseth, 1988).

Entre los metales que tradicionalmente están considerados más tóxicos y dañinos para la salud así como fuertemente relacionados con actividades industriales y de



combustión cabe destacar: el mercurio, el aluminio, el zinc, el plomo y el cadmio (Järup, 2003).

### **1.3 Cadmio.**

El cadmio (Cd) es un metal blando, blanco-azul, maleable, lustroso, o un polvo blanco-grisáceo, se encuentra en la naturaleza comúnmente asociado con el zinc en las vetas de mineral, y se obtiene como subproducto en el refinado de otros metales. El cadmio es un metal "moderno" desde el punto de vista del aumento que se ha producido en su utilización durante los últimos 30 años (Godt et al., 2006).

#### **1.3.1 Usos del cadmio.**

Los principales usos que tiene el cadmio y sus fuentes de liberación antropogénicas de son las siguientes (INECC, 2009; ATSDR., 2011):

- De la fundición para la refinamiento del Zinc.
- Producción de galvanizados.
- Pigmentos utilizados en la industria del plástico, cerámica, pintura y de revestimientos.
- Estabilizantes en la producción de plásticos (PVC).
- Baterías recargables.
- En aleación con cobre, aluminio y plata.
- Usos diversos como tubos de televisión, lámparas fluorescentes y tubos de rayos catódicos.
- En la producción de equipo y aparatos de telecomunicaciones.
- Combustión de carbón.



### 1.3.2 Vías de exposición al cadmio.

La exposición de la población general ocurre al respirar humo de tabaco o al consumir alimentos contaminados con el metal; los alimentos que son ricos en cadmio son: carnes, vísceras (hígado, principalmente), cereales, hortalizas, mariscos, mejillones, entre otros (Fernández and Rodríguez, 2012).

El cadmio se incorpora al aire de fuentes como la minería, la industria, y al quemar carbón y desechos domésticos; en el aire, las partículas de cadmio pueden viajar largas distancias antes de depositarse en el suelo o en el agua, así plantas, peces y otros animales lo incorporan del medio ambiente. Se han encontrado concentraciones altas de este metal en sedimentos y partículas suspendidas de las aguas de los ríos (Hellström et al., 2007; Fowler, 2009). A bajas concentraciones, el cadmio puede afectar los índices sanguíneos de los peces y producir daños irreversibles en estos organismos porque tiende a acumularse en órganos como el hígado y el riñón (Cirillo et al., 2012).

El agua de los mares y de los ríos ha sido usada tradicionalmente como medio de evacuación de los desperdicios humanos. Las aguas procedentes de las industrias como la minera, la de recubrimientos metálicos, las fundidoras y otras más contaminan el agua con cadmio, las fuentes de contaminación en agua potable incluyen corrosión de tuberías galvanizadas, erosión de depósitos naturales, residuos por refineras de metales, y escorrentía por residuos de baterías y pinturas (Järup, 2003).

En el ambiente, este metal es peligroso porque muchos vegetales y algunos animales lo absorben eficazmente y lo concentran en sus tejidos, por ejemplo, los granos y los productos de los cereales pueden ser una fuente de contaminación por cadmio, en los alimentos (Godt et al., 2006). Otras vías de exposición incluyen



el agua de consumo por el galvanizado o cobrizado de las tuberías (Nordberg, 2009).

### 1.3.3 Efectos del cadmio.

Este metal afecta a los pulmones, hígado y riñones en las intoxicaciones agudas y en las exposiciones crónicas produce nefrotoxicidad, inmunotoxicidad, osteotoxicidad y tumores (Fowler, 2009).

Tabla 1. Efectos del cadmio en distintos órganos.

Órgano o Sistema	Efecto	Referencia
<i>Hígado</i>	Deformación de los hepatocitos y posterior inducción de muerte celular.	Koyo et al., 2006
<i>Riñones</i>	Daños en los túbulos proximales, inflamación de la capsula de Bowman y los glomérulos generando deficiencias en su funcionamiento.	Lavery et al., 2009
<i>Pulmones</i>	Inflamación que conlleva a una reducción de la función pulmonar.	Kirschvink et al., 2006
<i>Huesos</i>	Osteoporosis dada por la interferencia del Cd en la absorción del calcio desde los intestinos, y por la reducción de la actividad de enzimas provenientes del riñón que aportan a la activación de la vitamina D.	Gallagher, Kovach and Meliker, 2008
<i>Sistema reproductivo</i>	Machos: muerte celular en los testículos. Hembras: fallas en la ovulación y el desarrollo de óvulos.	Thompson and Banningan, 2008

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) con frecuencia están implicadas en la toxicidad producida por el cadmio. Los radicales  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{O}_2\cdot$ , así como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , generados *in vivo* por el cadmio se han detectado mediante espectros de resonancia electrónica de spin. Estos radicales activan factores de transcripción sensibles al estado redox de las células (como NF- $\kappa$ B, AP-1 y Nrf2) y alteran la expresión de genes que están involucrados con la progresión del ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis (Martelli et al., 2006, Nawrot et al., 2010).

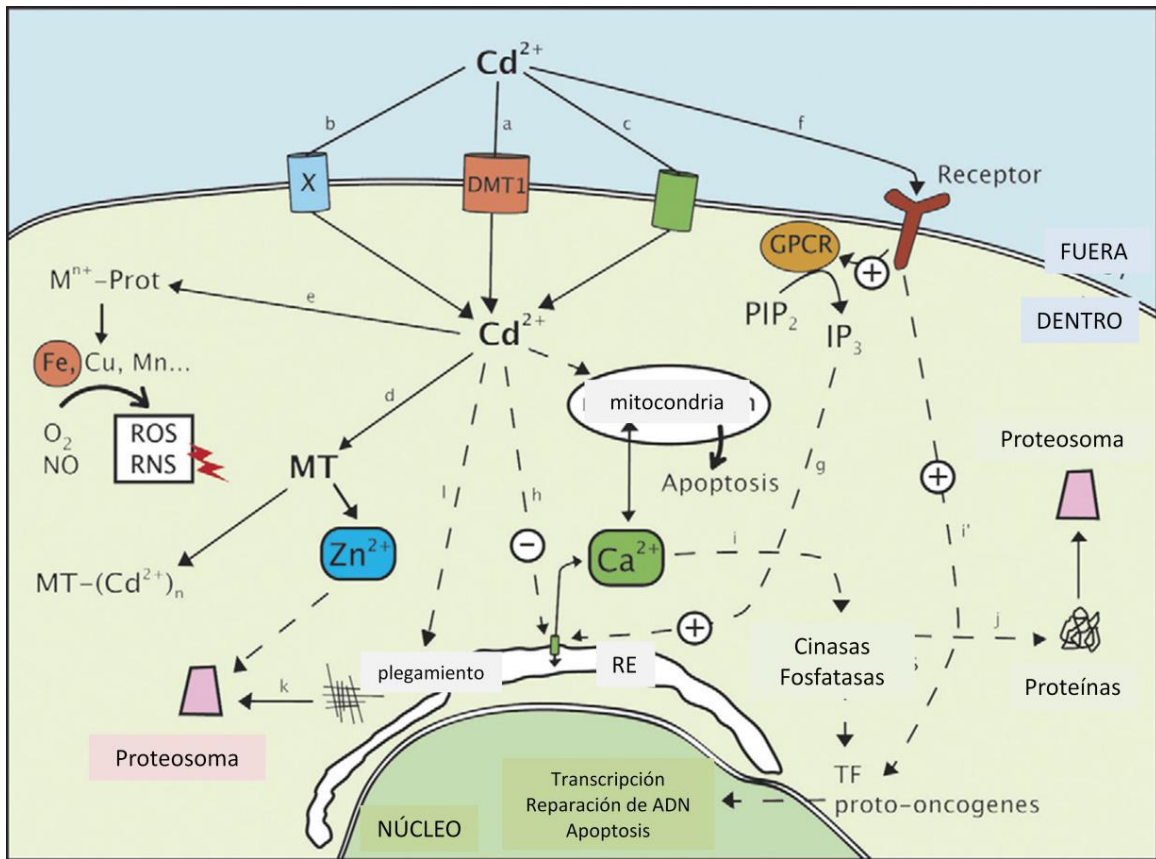


Figura 1. Representación esquemática de la interacción del cadmio con células animales.

Fuente: Martelli et al., 2006.

#### 1.4 Biomarcadores.

La presencia de un tóxico en el ambiente implica un riesgo, no obstante, para hablar de exposición hay que detectar el tóxico en el organismo, y para que exista intoxicación debe aparecer una sintomatología o alteraciones clínicas. Un método de cuantificar la exposición a xenobióticos y su posible impacto sobre la especie humana es el uso de procedimientos de monitorización biológica por medio de biomarcadores.



Un biomarcador se puede definir como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra.

Estos biomarcadores permiten dar la medida de la interacción entre el sistema biológico y los factores ambientales, los cuales pueden ser químicos, físicos o biológicos (von Osten, 2005), midiendo un grupo de respuestas y efectos que abarcan un intervalo de escalas temporales y biológicas, para evaluar los efectos subletales.

#### **1.4.1 Biomarcadores de estrés oxidativo.**

La oxidación es un proceso químico normal en el organismo que produce moléculas inestables conocidas como radicales libres, sin embargo, cuando se produce un desequilibrio entre la producción de radicales libres o agentes prooxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante o la capacidad antioxidante de un organismo se conoce como estrés oxidativo. En la tabla 2 se muestra el nivel de peroxidación y algunas enzimas antioxidantes que han sido propuestas como biomarcadores de contaminación mediada por estrés oxidativo y su inducción como una respuesta específica ante la exposición a contaminantes. La cuantificación de los mecanismos antioxidantes y de los daños provocados por la condición de estrés oxidativo en sistemas biológicos puede ser usada para evaluar los efectos tóxicos inducidos por diferentes clases de contaminantes ambientales.



Tabla 2. Importantes biomarcadores de estrés oxidativo.

BIOMARCADOR	DESCRIPCIÓN
Súperoxido dismutasa (SOD)	Metaloproteína capaz de catalizar la conversión del anión superóxido ( $O_2^-$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y oxígeno ( $O_2$ ).
Catalasa (CAT)	Enzima cuya función es detoxificar ó reducir el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), a oxígeno molecular ( $O_2$ ) y agua.
Glutación peroxidasa (GPx)	Enzima citosólica que cataliza la reacción a través de la cual el glutati6n reducido (GSH) reacciona con peróxidos ( $H_2O_2$ a bajas concentraciones) para transformarlos en agua.
Nivel de peroxidaci6n	Proceso de degradaci6n oxidativa de los l6pidos membranales. Involucra la conversi6n oxidativa de ácidos grasos insaturados a productos primarios conocidos como hidroperóxidos, lo cual surge de un proceso de ataque por radicales libres.

#### 1.4.2 Biomarcadores de daño hepático.

El hígado es uno de los 6rganos primarios para la detoxificaci6n del organismo, por lo cual, detectar las alteraciones en la actividad de las enzimas y otros compuestos end6genos pueden ser utilizados como marcador de lesiones hepáticas ocasionadas por diversos xenobi6ticos. En la tabla 3 se encuentran algunos biomarcadores hepáticos importantes.





Tabla 3. Importantes biomarcadores de daño hepático.

BIOMARCADOR	DESCRIPCIÓN
Gamma-glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GTP)	Enzima de membrana que metaboliza el glutatión extracelular reducido, permite que precursores de los aminoácidos sean asimilados y reutilizados para la síntesis del glutatión reducido.
Fosfatasa alcalina (FA)	Enzima de la membrana canalicular del hepatocito cuya función consiste en dividir esteres fosfóricos a fosfatos inorgánicos a un pH alcalino.
Alanino aminotransferasa (ALT)	Enzima citosólica que cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al 2 $\alpha$ - cetoglutarato, formando piruvato y glutamato.
Glucógeno	Polisacárido de reserva energética en los animales que se almacena en el hígado y en los músculos. Aporte energético de emergencia, como en los casos de tensión o alerta.
Acetilcolinesterasa (AChE)	Enzima cuya función fisiológica es desdoblar rápidamente el neurotransmisor acetilcolina en colina y ácido acético, y, de esta manera, inactivarlo. La determinación de la actividad de la AChE puede ser utilizada para el diagnóstico diferencial de la enfermedad hepática, ya que su biosíntesis tiene lugar precisamente en el hígado.

### 1.5 Índices Morfofisiológicos.

La exposición a contaminantes puede provocar un estrés determinado sobre la fisiología y la morfología de los peces, que se puede reflejar en una variación de



los índices organosomáticos y morfométricos (Arcand-Hoy and Metcalfe, 1999). Para medir cambios morfológicos y fisiológicos que caracterizan el estrés en los peces se han utilizado varios índices para expresar la dinámica en la utilización de la energía endógena de órganos tales como las gónadas, el hígado y la masa corporal, así como para evaluar el estado de salud de los peces (Thilakaratne *et al.*, 2007).

Entre estos índices se encuentran el factor de condición (FC), el índice hepatosomático (IHS), el índice viscerosomático (IVS), y el gonadosomático (IGS), entre otros. Los indicadores morfofisiológicos como el FC, IGS y el IHS ofrecen una buena información sobre la actividad funcional del organismo (Bustamante *et al.*, 1994).

### **1.5.1 Factor de condición o índice de fulton (K).**

Entre los índices relativos a la condición utilizados con más frecuencia se encuentra el factor de condición, definido como la relación entre el peso del animal y su longitud patrón elevada al cubo. Indicadores muy relacionados con el anterior son la relación largo-peso y el índice de peso relativo (Geode and Barton, 1990). Los índices de condición, particularmente, los índices representativos del pez completo pueden ser usados para describir las consecuencias de las alteraciones bioquímicas y fisiológicas de los cambios observados en los individuos y la población (Shuter, 1990).

De acuerdo con Granado (1996), este índice estima las modificaciones temporales del buen estado de los peces bajo las influencias de factores externos (ambiente) e internos (fisiológicos), independientemente de la longitud, es decir el bienestar del pez o cuan saludables están los integrantes de una población. Además varía



según las especies, la morfología, el sexo, la edad, el estado reproductivo de acuerdo con la madurez gonadal, la época del año y el ambiente acuático.

### **1.5.2 Índice hepatosomático (IHS).**

El IHS se define como el peso del hígado entre el peso del animal multiplicado por 100. Es recomendable el uso del peso sin vísceras porque esto reduce la variabilidad provocada por las variaciones en el llenado del estómago, el desarrollo de la gónada o la cantidad de grasa mesenterial (Munkittrick *et al.*, 2000).

El IHS corresponde a las variaciones que reflejan los procesos de acumulación y utilización de reservas relacionadas con la reproducción e intensidad alimentaria. Responde a la movilización de las reservas energéticas que tienen lugar durante el proceso madurativo de las gónadas (Granado, 1996).

### **1.5.3 Índice gonadosomático (IGS).**

El IGS se define como el peso de la gónada entre el peso del animal multiplicado por 100. Por las mismas razones que se indicaron para el IHS, es recomendable utilizar el peso sin vísceras en el cálculo.

El índice gonadosomático o IGS, compara la importancia de las gónadas durante el desarrollo del ciclo reproductor. Este índice constituye la expresión más utilizada en el estudio del desarrollo gonadal y en la descripción del ciclo reproductivo en los peces.

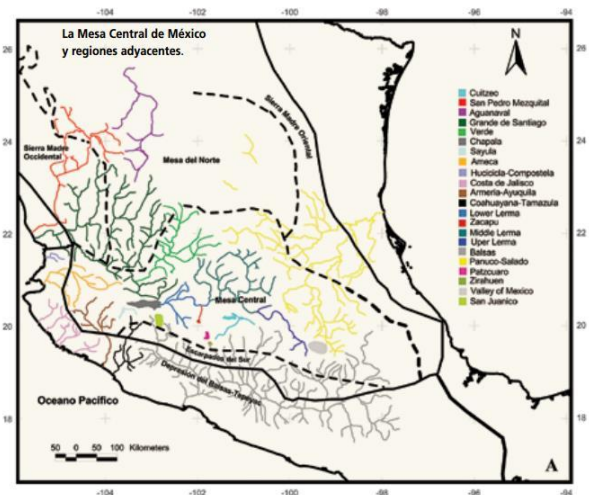


## 1.6 Organismo de estudio.

### 1.6.1 Familia *Goodea*.

La familia *Goodeidae* está conformada por 20 géneros y 42 especies dulceacuícolas, divididas en dos subfamilias, *Empetrichthyinae* y *Goodeinae*. La subfamilia *Empetrichthyinae* se distribuye en el suroeste de los Estados Unidos, contienen 4 especies distribuidas en 2 géneros, *Crenichthys* y *Empetrichthys*, la cual se caracteriza por la fertilización externa, la ovíparidad y la lecitotrofia. (Doadrio and Domínguez, 2004)

La segunda subfamilia está representada por aproximadamente 42 especies contenidas en 20 géneros, todas ellas restringidas a la Mesa Central de México. (Lombardi and Wourms, 1988) Las especies de esta subfamilia presentan fertilización interna, son vivíparas, matrotónicas y desarrollan trofotenia (White and Turner, 1986).



### 1.6.2 *Goodea atripinnis*.

*Goodea atripinnis* es un organismo nativo de la Mesa Central perteneciente a la familia *Goodeidae*, es considerada la especie de goodeido más ampliamente conocida y distribuida, se localiza principalmente en el sistema Lerma-Chapala.

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Animalia

Phylum: *Chordata*



Clase: *Actinopterygii*

Orden: *Cyprinodontiformes*

Familia: *Goodeidae*

Subfamilia: *Goodeinae*

Género y familia: *Goodea atripinnis*

Es conocida localmente con el nombre común de “mojarrita”, “tiro” ó “charal”. Su cuerpo es alargado y robusto, cerca de la región cefálica se adelgaza hacia la parte posterior. Tiene cabeza ancha, cónica y corta; ojos grandes y muy separados, boca pequeña provista de dientes bífidos. La coloración de los adultos es de color verde olivo oscuro en el dorso y cabeza; pálida amarillenta en los costados, en la región ventral y el pedúnculo caudal; aletas dorsal y anal manchadas. Las escamas son moderadamente grandes (Miranda et al., 2010). *G. atripinnis* es un pez omnívoro, con preferencia por los vegetales en las primeras fases de desarrollo, cambia a tallas mayores cuando consume crustáceos, también consume en menor proporción algas verdes filamentosas y de fauna asociada a éstas como microcrustáceos, moluscos, insectos y gusanos (White and Turner, 1986).

Es una especie vivípara que presenta dimorfismo sexual, los machos miden 66 mm de longitud total y modifican los primeros 5 a 7 radios de la aleta anal formando el gonopodio que permite la transferencia de esperma a la hembra (Domínguez-Domínguez et al., 2006).



Figura 2. *Goodea atripinnis* macho

El gonopodio consiste en una masa muscular piriforme que contiene el conducto urogenital; su extremo distal se sitúa entre el ano y la aleta anal. Durante el apareamiento, mediante contracciones musculares del gonopodio deposita los espermatozoides en el

gonoporo femenino (Nelson, 1975). Las hembras son más oscuras de color, su talla es mayor, 83 mm de longitud total. En las hembras, el lumen del ovario está dividido por un septo mientras que la pared del ovario se pliega formando proyecciones hacia el lumen. El epitelio germinal del ovario contiene células somáticas y germinales, las cuales pueden estar dispersas ó concentradas en ciertas regiones del mismo, la gestación es intraluminal pues la ovulación y la fertilización se llevan a cabo dentro del ovario. (Uribe et al., 2005; Nelson, 1975). Los embriones desarrollan extensiones del tracto intestinal para la absorción de nutrientes suministrados maternalmente que son necesarios para la gestación ya que su reserva de vitelio se consume durante el primer tercio del periodo de gestación. A estas extensiones se le denomina trofotenia. (Aranzábal et al., 2006)

Es una especie con resistencia a la degradación ambiental que parece haber ampliado su distribución debido a su tolerancia a cambios ocasionados por la actividad humana (Tambutti et al., 2002). La carne de *Goodea atripinnis* tiene aceptación por su agradable sabor y es importante en cuanto al consumo local, como lo menciona Cuesta Terrón desde 1925; bien sea



Figura 3. *Goodea atripinnis* hembra



como pescado seco, "charal" o en la elaboración de harina para complementar la dieta del ganado porcino y aves al integrarla a la producción de alimentos balanceados. Dada la tolerancia de estos peces a cambios ambientales, a su régimen alimentario y a sus características de reproducción, podrían considerarse como un recurso potencial en el consumo local, en la producción de alimento balanceado a mayor escala o inclusive como alimento vivo para especies carnívoras de alto valor comercial. Por su fácil adaptación y aclimatación, se emplea como especie de ornato (Ceballos, 2009).



## 1.7 Justificación.

El cadmio, un metal ampliamente utilizado en la industria, se encuentra en forma natural en la corteza terrestre y carece de actividad biológica. Este metal se incorpora a todos los eslabones de la cadena alimenticia y puede ser bioacumulado y biomagnificado; a la fecha, existen pocos estudios sobre los efectos del cadmio en los peces dulceacuícolas y aún menos en los peces endémicos de México. Debido a esto, es importante conocer los efectos deletéreos ocasionados por el cadmio al pez *Goodea atripinnis*, que al ser una especie para consumo humano podría deteriorar la salud de los consumidores.

## 1.8 Hipótesis.

Si el cadmio representa uno de los metales pesados más tóxicos, será posible evidenciar su efecto deletéreo en el pez *Goodea atripinnis* mediante la evaluación de los biomarcadores de daño hepático y estrés oxidativo. Así mismo, la reproducción y desarrollo de los organismos expuestos al metal se verán afectados.



---

# CAPITULO II

## Objetivos

---



## 2 Objetivos.

### 2.1 Objetivo General.

Evaluar el efecto de la exposición al cadmio sobre el estrés oxidativo, el daño hepático y reproductivo en el pez *Goodea atripinnis*.

### 2.2 Objetivos específicos.

- ▶ Determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) del cadmio en el pez *Goodea atripinnis*.
- ▶ Determinar las actividades de las enzimas hepáticas marcadoras de daño hepático (FA y  $\gamma$ -GTP), de la acetilcolinesterasa y de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx), el grado de peroxidación lipídica y el contenido de glucógeno hepático tras una exposición aguda y subcrónica al cadmio.
- ▶ Evaluar la Respuesta Integrada de Biomarcadores (RIB) en *Goodea atripinnis* tras una exposición aguda y subcrónica al cadmio.
- ▶ Evaluar el efecto sobre la reproducción de *Goodea atripinnis* tras una exposición crónica al cadmio.
- ▶ Determinar las variaciones en los índices morfofisiológicos durante el desarrollo de *Goodea atripinnis*.

---

# CAPITULO III

## Metodología

---



### **3 Materiales y métodos.**

#### **3.1 Material Biológico.**

En este trabajo experimental se utilizaron peces de la especie *Goodea atripinnis* proporcionadas por el bioterio del CINVESTAV-IPN, con una longitud estándar de  $7 \pm 2.5$  cm y una media de peso corporal de  $4 \pm 1$ g.

Los peces fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio, utilizando peceras de vidrio de 20 litros con una proporción de agua destilada-agua de la llave de 85:15, temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  y alimentados dos veces al día con el alimento comercial en escamas Wardley, USA. Los niveles de saturación total de oxígeno en el agua se alcanzaron por aeración constante, con un ciclo de luz y oscuridad de 12:12 horas.

#### **3.2 Diseño Experimental.**

Para evaluar los efectos del cadmio sobre *Goodea atripinnis*, el proyecto fue dividido en 3 etapas principales: 1) Determinación de la  $CL_{50}$  en el pez, 2) Evaluación de los efectos agudos y subcrónicos del cadmio y 3) Evaluación de los efectos reproductivos (figura 4).

1.- Se determinó la concentración letal media ( $LC_{50}$ ) mediante bioensayos de tipo estático, sin renovación de la solución de prueba y con una duración total de 96 horas. Para su obtención, se realizaron ensayos a concentraciones crecientes de cloruro de cadmio (Sigma, USA), el cual fue disuelto en el agua mediante sonicación, para lograr uniformidad y homogeneidad en la solución. Los ejemplares ( $n=8$ ) se expusieron a concentraciones de 4 a 78 mg/L de cloruro de cadmio, con un grupo testigo sin adición del compuesto problema. Cada una de las pruebas se realizó por duplicado. Los registros de mortalidad o de efectos



visibles se realizaron durante las 96 horas de la prueba, removiendo los individuos muertos al momento de detectarlos.

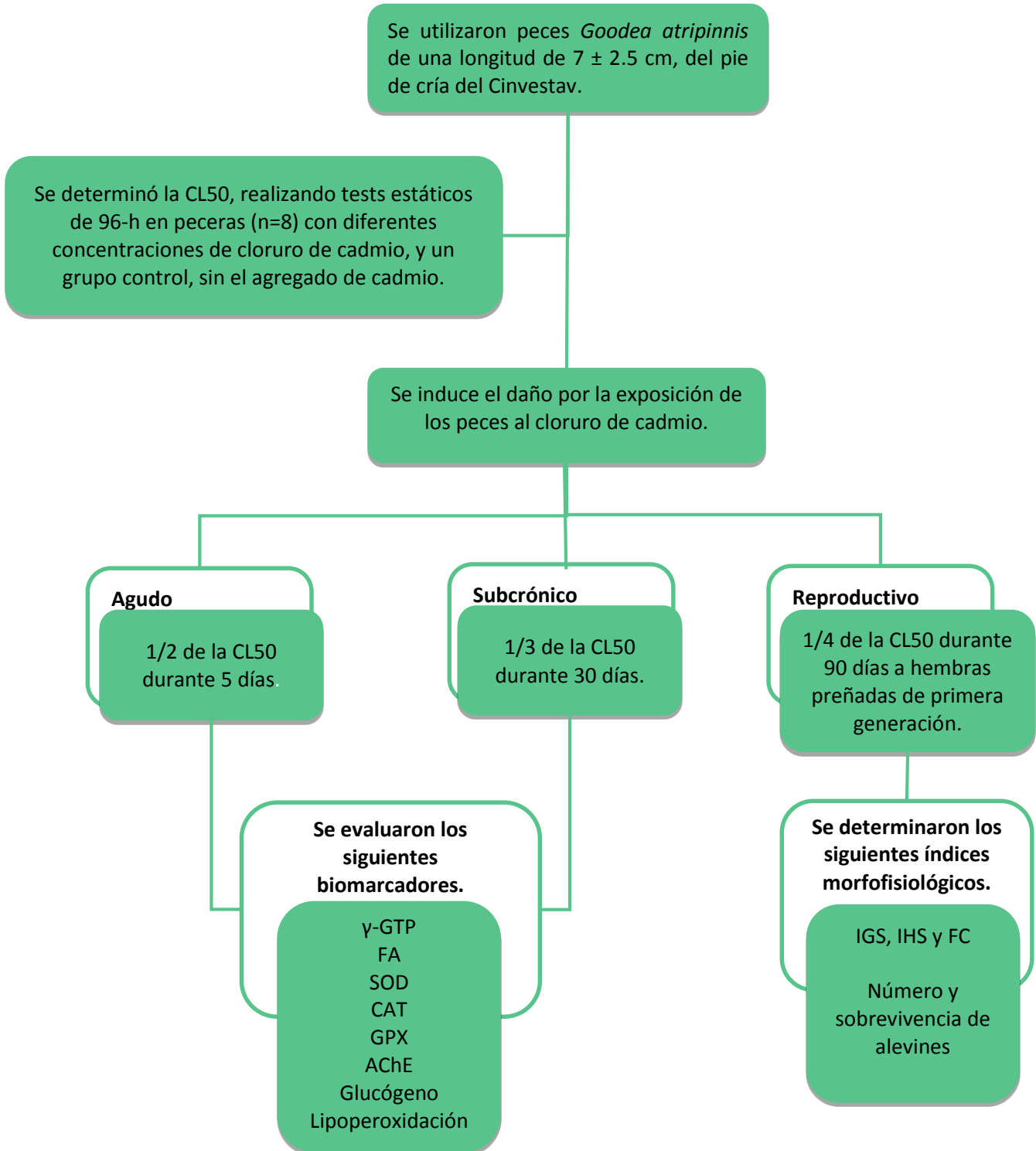


Figura 4. Desarrollo metodológico



Para evaluar el efecto agudo del cadmio se expusieron 8 ejemplares de *Goodea atripinnis* a  $\frac{1}{2}$  de la  $CL_{50}$  por un periodo de 5 días, mientras que para evaluar el efecto subcrónico se expusieron 8 ejemplares a  $\frac{1}{3}$  de la  $CL_{50}$  durante 30 días, realizando cada uno de los ensayos por duplicado. Al finalizar el periodo de exposición, los peces se sacrificaron mediante el bloqueo medular vía craneal a la altura del opérculo y se les extrajo el hígado.

2.- Para la determinación de los biomarcadores se realizaron homogeneizados del hígado al 10% y se determinó la actividad enzimática de la gamma glutamiltranspeptidasa (Glossmann and Neville, 1972), la fosfatasa alcalina (Berger and Rudolph, 1963) y de la acetilcolinesterasa (Hestrin, 1961). También se determinaron las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (Sun and Zigman, 1978), glutatión peroxidasa (Lawrence and Burk, 1976) y catalasa (Cohen et al., 1970), el grado de peroxidación lipídica (Buege and Aust, 1978), el glucógeno (Morris, 1948) y se cuantificaron las proteínas hepáticas totales (Bradford, 1976).

3.- Para evaluar el efecto del cadmio sobre la reproducción de *Goodea atripinnis*, se utilizaron hembras preñadas para evaluar su efecto sobre su descendencia. Se comparó el efecto del cadmio sobre los peces tratados y no tratados, utilizando hembras de la primera generación, las cuales fueron colocadas con machos por un periodo de 10 días con el objetivo de obtener hembras preñadas sincrónicamente. Posteriormente, las hembras fueron expuestas a  $\frac{1}{4}$  de la  $LC_{50}$  durante 90 días. Un grupo control libre de cadmio fue establecido para comparar los efectos sobre la descendencia. Para detectar el posible efecto tóxico del cadmio durante el periodo de gestación, se monitoreo el nacimiento de alevines y se registró el tamaño de la camada (número de peces nacidos). Cada camada de alevines fue colocada en peceras de 20 litros y mantenidas bajo condiciones controladas para observar la mortalidad de la descendencia durante un período de 3 meses. El porcentaje de la sobrevivencia hasta la edad adulta de cada camada fue calculado dividiendo el número de peces adultos entre el total de peces



nacidos. El número y sobrevivencia de alevines fue comparado con su respectivo grupo control.

Finalmente, el efecto del cadmio sobre el desarrollo de los embriones se evaluó mediante la exposición de los alevines durante 1, 2 y 3 meses a un 1/5 de la LC<sub>50</sub>. Al finalizar el periodo de exposición, los organismos fueron sacrificados, medidos y pesados para extraer el hígado y las gónadas. El hígado y la gónada de cada ejemplar también fue medido u pesado para calcular los índices respectivos. En todos los peces se calculó el índice gonadosomático (IGS), el índice hepatosomático (IHS) y el factor de condición (FC) de la siguiente forma:

Índice gonadosomático:

$$\text{IGS} = \frac{\text{Peso de la gonada (g)}}{\text{Peso Eviscerado (g)}} \times 100$$

Índice hepatosomático:

$$\text{IHS} = \frac{\text{Peso del Hígado (g)}}{\text{Peso Eviscerado (g)}} \times 100$$

Factor de condición:

$$\text{FC} = \frac{\text{Peso Eviscerado (g)}}{[\text{Longitud patrón (cm)}]} \times 100$$

### 3.3 Determinación de biomarcadores.

#### 3.3.1 Elaboración de los homogeneizados hepáticos.

Para llevar a cabo los ensayos enzimáticos se elaboró un homogeneizado al 10% para cada pull de órganos (3 hígados). Cada prueba se realizó por duplicado (tabla 4).



Tabla 4. Disolventes utilizados para realizar los homogeneizados hepáticos.

Biomarcadores	Disolvente
$\gamma$ -GTP y FA	Buffer de fosfato 0.1 M, pH 7.0 - 7.4
CAT	Buffer de fosfato de potasio 0.01 M, pH 7.0.
SOD y GPx	Buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.4
AChE	Buffer 0.02 N Tris HCl, pH 7
Proteínas y PL	Agua destilada
Glucógeno	Hidróxido de potasio al 30%

### 3.3.2 Determinación de la fosfatasa alcalina (FA).

Este método se basa en la hidrólisis del p-nitrofenil fosfato por la fosfatasa alcalina para dar fosfato inorgánico y p-nitrofenol, el cual se lee espectrofotométricamente a 410 nm (Berger and Rudolph, 1963).

Procedimiento:

1. A cada tubo se le adicionan:  
0.25 mL de buffer de glicina 0.1 M y de  $MgCl_2$  1 mM, pH 10.5.  
0.25 mL de sustrato p-nitrofenilfosfato.
1. Se coloca en baño maría a 37°C por 5 minutos.
2. Se añaden 50  $\mu$ L del homogeneizado y se agita suavemente; para la preparación del blanco se sigue la misma secuencia de pasos, colocando 50  $\mu$ L de agua en lugar de la muestra.
3. Se incuba 30 minutos a 37°C.
4. Se detiene la reacción con 5 mL de NaOH 0.02 N y se agita por inversión.
5. Se leen las absorbancias en un espectrofotómetro a 410 nm. Los resultados se expresan como  $\mu$ mol/ mg de proteína x minuto.





### Curva estándar para la fosfatasa alcalina

Para realizar la curva estándar de calibración, se preparan las siguientes soluciones:

1. p-nitrofenol, solución estándar de 10  $\mu$ moles/ml.
2. 0.5 mL de solución 1 (std de p-nitrofenol) se llevan a 100 ml con NaOH 0.02 N.
3. NaOH 0.02 N.

En la tabla 5 se muestra la curva de calibración. El blanco se realiza con 5.5 ml de la solución 3, después se leen las absorbancias a 410 nm.

Tabla 5. Curva estándar de la fosfatasa alcalina.

TUBO	Solución 2 (mL)	Solución 3 (mL)	Sustrato hidrolizado ( $\mu$ moles)
1	0.5	5	0.025
2	1.0	4.5	0.050
3	1.5	4.0	0.075
4	2.0	3.5	0.10
5	2.5	3.0	0.125
6	3.0	2.5	0.15
7	3.5	2.0	0.175
8	4.0	1.5	0.20
9	4.5	1.0	0.225
10	5.0	0.5	0.25
11	5.5	0	0.275

### 3.3.3 Determinación de la gamma-glutamyl transpeptidasa ( $\gamma$ -GTP).

Se utilizó el método descrito por Glossmann and Neville (1972), utilizando el sustrato  $\gamma$ -glutamyl-p-nitroanilina que en presencia de la enzima  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa y de un receptor del grupo  $\gamma$ -1-glutamyl (glicil-glicina) produce la  $\gamma$ -



1-glutamilglicil-glicina y la p-nitroanilida que puede ser cuantificada por espectrofotometría a 410nm.

Procedimiento:

1. Se adiciona a cada tubo:  
400  $\mu$ L de Tris-HCl 200 mN, pH 8.2.  
100  $\mu$ L de  $MgCl_2$  200 mM.  
100  $\mu$ L de Glicil-glicina 40 nM, pH 8.2.  
200  $\mu$ L de Gamma-glutamil-p-nitroanilina 10 nM.
2. Se incuba la mezcla de reactivos durante 10 minutos a 37°C.
3. Se inicia la reacción adicionando 200  $\mu$ L del homogeneizado y se incuba a 37°C por 30 minutos. El blanco se realiza sustituyendo los 200  $\mu$ L del homogeneizado por agua.
4. Se detiene la reacción adicionado 2 mL de ácido acético 1.5 M.
5. Se lee la absorbancia a 410 nm y se cuantifica la p-nitroanilina producida mediante la curva estándar. Los resultados se expresan como nmol / mg de proteína x minuto.

Curva estándar para la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa

Para realizar la curva estándar de calibración, se prepara la siguiente solución:

Solución 1: Se pesan 13.81 mg de p-nitroanilina y se llevan a 250 ml con ácido acético 1.5M.

La tabla 6 muestra los reactivos para la curva de calibración y se leen las absorbancias a 410 nm. Nota: Se calibra con agua, no se requiere blanco.



Tabla 6. Curva de calibración de la gamma glutamil transpeptidasa.

Tubo	Solución 1 ( $\mu\text{L}$ )	Agua ( $\mu\text{L}$ )	nmoles / ml	$\mu\text{moles}$ / ml
1	50	1950	10	0.01
2	100	1900	20	0.02
3	150	1850	30	0.03
4	250	1750	50	0.05
5	375	1625	75	0.075
6	500	1500	100	0.1
7	750	1250	150	0.15
8	1000	1000	200	0.20

### 3.3.4 Determinación de la peroxidación lipídica (PL).

El grado de lipoperoxidación se determinó mediante el método del ácido barbitúrico (Buege and Aust, 1978). Este método se basa en la reacción del malondialdehído (MDA), un producto de la degradación de la lipoperoxidación con el ácido barbitúrico (TBA) para producir un cromóforo ABT-malondialdehído, dando como resultado la formación de un producto rosa, el cual tiene un máximo de absorción a 532 nm.

Procedimiento:

1. Se toman 300  $\mu\text{L}$  del homogeneizado al 10% y se agregan 700  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 150 mN para completar 1 mL.
2. Se incuban las muestras a 37°C por 30 minutos.
3. Se agregan 2 mL de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15%
4. Se colocan los tubos a ebullición durante 45 minutos.
5. Se centrifugan a 3,000 rpm por 10 minutos y se lee el sobrenadante a 532 nm. Se determinan las proteínas del homogeneizado y los valores se expresan como nmoles de MDA/mg proteína.



### 3.3.5 Determinación del contenido de glucógeno.

El contenido de glucógeno hepático se determinó utilizando el reactivo de antrona (Morris, 1948). En este método se realiza una hidrólisis alcalina de la porción del hígado para digerir el tejido y romper el glucógeno a sus unidades de glucosa. La cantidad de glucosa formada se mide por la reacción con la antrona, que se puede leer espectrofotométricamente a una longitud de 620 nm.

Procedimiento:

1. Se toman 500  $\mu\text{L}$  de homogeneizado y se le adiciona 1.0 mL de KOH al 30%, se tapan los tubos y se hierven en baño de agua durante 30 minutos.
2. Después de enfriar, se pasan cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, se afora agitando muy bien.
3. Del matraz anterior, se toma 1 mL y en un matraz volumétrico se diluye a 25 mL con agua destilada, de esta dilución se toma 1 mL para realizar la reacción con antrona.
4. Se prepara un blanco con 1 mL de agua bidestilada y un estándar con 20  $\mu\text{L}$  de una solución de glucosa estándar (1 mg/mL) que se completa a 1 mL con agua bidestilada.
5. Se prepara la solución de antrona 0.2% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Se añaden 2 mL de antrona a cada tubo agitando suavemente y enfriando sobre hielo.
6. Se tapan los tubos fríos y se ponen en un baño de agua hirviendo por 15 min.
7. Se enfría de inmediato sobre agua con hielo y se determina la absorbancia de cada muestra a 620 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como gramos de glucógeno por 100 g de hígado.



## Determinación de las enzimas antioxidantes.

### 3.3.6 Actividad de la catalasa (CAT).

La medición de la actividad enzimática se basa en la descomposición del  $H_2O_2$  empleando  $KMnO_4$  (Cohen et al., 1970). Se agrega un exceso del estándar de  $KMnO_4$ , el cual reacciona con el  $H_2O_2$ , de esta forma el  $KMnO_4$  residual será el que se mida a 480 nm.

Procedimiento:

1. Se colocan por duplicado 0.5 mL del homogeneizado y se preparan dos blancos adicionado 0.5 mL de agua bidestilada en los tubos.
2. Se inicia la reacción enzimática adicionando 5.0 mL de  $H_2O_2$  frío, a intervalos de tiempo fijos y se mezcla en vórtex. Se realiza esto con los tubos blancos y los problemas.
3. Después de 3 minutos, se para la reacción adicionando 1 mL de  $H_2SO_4$  6 N y se mezcla en el vórtex con los mismos intervalos de tiempo.
4. Se agregan rápidamente 7.0 mL de  $KMnO_4$ , se mezcla bien y se leen las muestras a 480 nm.
5. Se realiza la preparación del estándar (Std): Se agregan 7 ml de  $KMnO_4$  0.01N a una mezcla de 5.5 ml de Buffer de fosfatos 0.01M y 1.0 ml de  $H_2SO_4$  6N. Se lee la absorbancia a 480 nm.
6. Se calcula la actividad con la constante de velocidad de reacción de la descomposición del  $H_2O_2$  de primer orden, los resultados se expresan mediante  $K \text{ min}^{-1}$ .

### 3.3.7 Actividad de la superóxido dismutasa (SOD).

La actividad de SOD total fue determinada de acuerdo al método descrito por Sun y Zigman (1978), utilizando el sistema xantina/xantina oxidasa como generador



constante del radical superóxido, el cual al entrar en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reduce y forma un producto llamado formazan, cuyo cambio puede ser detectado por espectrofotometría cuando la enzima superóxido dismutasa inhibe la reducción del NBT.

#### Procedimiento:

1. Se prepara la mezcla de reactivos, la cual por cada litro contiene: Xantina 0.1 mmol, DETAPAC 1mmol, albúmina 50 mg, NBT (Cloruro de nitroblue tetrazolium) 25  $\mu$ mol, BCS (Bathocupreine disulfonic acid) 250  $\mu$ mol, carbonato de sodio 40 mmol pH 10.2.
2. Se centrifuga el homogeneizado a 3000 rpm durante 3 minutos a 4°C para obtener el sobrenadante 1.
3. Se toman 0.5 mL del sobrenadante 1 y se agregan 1.5 mL de agua tridestilada, posteriormente se adicionan 0.8 mL de la mezcla 3:5 cloroformo:etanol y se mezcla en el vórtex por 90 seg.
4. La mezcla resultante se centrifuga a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C, obteniendo el sobrenadante 2.
5. En los tubos se colocan 2.45 ml de la mezcla de reactivos.
6. Se hacen dos blancos por duplicado, un blanco colocando 0.5 ml de agua en cada tubo y un blanco de reactivos agregando 0.55 ml de agua en cada tubo.
7. Se colocan 500  $\mu$ l del sobrenadante 2 a todos los tubos con la mezcla de reactivos. Se adicionan 50  $\mu$ l de xantina oxidasa 20 U/ml a todos los tubos excepto al Blanco de reactivos, a intervalos de 20 s, para iniciar la reacción.
8. Se incuba la mezcla durante 20 minutos a 25°C.
9. Se detiene la reacción adicionando 1 mL de cloruro cúprico 0.8 mM a cada tubo por espacio de 20 segundos
10. Se lee la absorbancia de cada muestra a 560 nm en un espectrofotómetro. La actividad de la SOD se expresa como  $U_{\text{totales}} / \text{mg de proteína}$ .



### 3.3.8 Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx).

La actividad de la glutatión peroxidasa fue determinada por el método de Lawrence y Burk (1976) que se basa en la transformación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua, medido por la desaparición de la coenzima NADPH utilizada por la enzima glutatión reductasa, la cual proporcionó la fuente de glutatión reducido (GSH) que utilizó la glutatión peroxidasa.

Procedimiento:

1. Se centrifuga el homogeneizado a 3000 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}C$ , se obtiene un sobrenadante de donde se tomará la muestra para medir proteínas.
2. Se adicionan en un tubo: 2 mL de buffer de fosfatos 75 mM, 50  $\mu L$  de glutatión 60 mM, 0.1 mL de glutatión reductasa de  $30 U mL^{-1}$ , 0.1 mL de EDTA 15nM, 0.1 mL de NADPH 3 mM, 200  $\mu L$  del sobrenadante obtenido del homogeneizado centrifugado y 0.45 mL de agua tridestilada.
3. Se inicia la reacción añadiendo 0.1 mL de hidroperóxido de cumeno 45 mM.
4. La conversión de NADPH a  $NADP^+$  se monitorea continuamente a 340 nm por 4 minutos. La actividad de la GPx se expresa como nmol de NADPH oxidado a  $NADP^+$ /min/mg de proteínas, utilizando un coeficiente de extinción de  $6.22 \times 10^6 cm^{-1}M^{-1}$ .

### 3.3.9 Acetilcolinesterasa (AChE).

Para la determinación de la acetilcolinesterasa se utilizó el método descrito por Hestrin (1961), el cual usa la hidroxilamina para reaccionar con la acetilcolina y formar ácido acetihidroxámico, que en presencia de iones férricos forma un complejo coloreado cuya absorbancia se mide a 540 nm.



#### Procedimiento:

1. Se centrifuga el homogeneizado a 3500 rpm durante 15 minutos a 4°C, para obtener el sobrenadante.
2. El blanco se prepara con 4 ml de Tris HCl, 1.0 ml de Hidroxilamina 2M, 1.0 ml de Ácido Clorhídrico 4 N y 1 mL de Cloruro Férrico.
3. Del sobrenadante se toma una alícuota de 1.0 mL y se adicionan los reactivos en el siguiente orden: 2.0 mL de Tris HCl, pH 7.0 y 1.0 mL de Acetilcolina 8  $\mu\text{mol/mL}$
4. Se agitan los tubos y se dejan incubando a 25°C durante 20 minutos.
5. Se agrega 1.0 mL de Hidroxilamina alcalina 2 M.
6. Se agrega 1.0 mL de ácido clorhídrico 4 N.
7. Se agrega 1.0 mL de Cloruro Férrico 0.37 M.
8. Se agita y centrifuga 5 minutos a 3000 r.p.m., sin refrigeración.
9. Los sobrenadantes se leyeron a una absorbancia de 540 nm y éstas se interpolaron en una curva estándar de acetilcolina. La actividad específica de las AChE, se calculó como los nmoles de acetilcolina hidrolizada/mg de proteína total/min. El contenido total de proteína fue determinado por el método de Bradford (1976).

#### **3.3.10 Determinación de proteínas.**

Se llevó a cabo por el método de Bradford (1976) que se basa en el cambio de color del colorante azul brillante de Coomassie G-250, en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del azul brillante de Coomassie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el colorante se une a la proteína. Experimentalmente,





esta unión causa un incremento en el máximo de absorción del colorante a 595nm.

Para desarrollar esta técnica se prepara el reactivo de Bradford con los siguientes reactivos, los cuales se aforan a un litro de agua:

- ❖ Ácido fosfórico al 85%                      100 mL
- ❖ Alcohol etílico                                      50 mL
- ❖ Azul de Coomassie G-250                      100 mg

Procedimiento:

1. Se tomaron 100  $\mu$ L de homogenizado y se llevaron a 1,000  $\mu$ L con agua tridestilada (1:10).
2. Se tomaron 20  $\mu$ L de la dilución anterior y se le adicionan 80  $\mu$ L de agua tridestilada (2:100).
3. Se prepara el blanco con 100  $\mu$ L de agua.
4. Se añaden 2.4 mL del reactivo de Bradford.
5. Se lee la absorbancia a 595 nm y los valores se expresaron como mg de proteína.

Curva de calibración para las proteínas.

Se prepara una curva de calibración utilizando albumina bovina sérica (1 mg/mL) con alícuotas de 0, 10, 20, 30, 40 50, 60, 70, 80, 90, y 100  $\mu$ L y se llevan a 100  $\mu$ L con agua tridestilada. Posteriormente, se adicionan 2.4 mL del reactivo de Bradford y se leen las absorbancias a 595 nm.

### **3.4 Análisis estadístico de los resultados.**

El valor del CL<sub>50</sub> del cadmio para *Goodea atripinnis* fue obtenido mediante el método Probit (XLSTAT, 2013). Para establecer diferencias significativas entre el



conjunto de medias de cada biomarcador, se empleó el software GraphPad Prim versión 5.00 (CA, USA), mediante el análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey, con una significancia de  $p < 0.05$ . Los experimentos se realizaron dos veces de manera independiente y en cada caso por duplicado. Finalmente, los biomarcadores se estandarizaron y normalizaron para elaborar las gráficas de estrella para obtener la Respuesta Integrada de los Biomarcadores (RIB) siguiendo el procedimiento descrito por Beliaeff and Burgeot (2002).

Para señalar la media de dispersión de cada conjunto de valores en gráficos y tablas se empleó el Error Estándar (SE).

Para la comparación de medias de cada índice somático (IHS e IGS) y para el factor de condición (K), los resultados se sometieron a un análisis de varianza mediante una ANOVA para determinar la diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

---

# CAPITULO III

## Resultados

---



## 4 Resultados.

### 4.1 Cálculo de la Concentración Letal media (CL<sub>50</sub>).

Una vez registrados la relación de organismos vivos y muertos para cada concentración, los valores de CL<sub>50</sub> para el cadmio fueron obtenidos mediante el método Probit (XLSTAT, 2013). El valor de CL<sub>50</sub> a 96-hr fue de 9.44 mg/L, la gráfica siguiente representa la relación concentración-respuesta del cadmio en los organismos expuestos (figura 5).

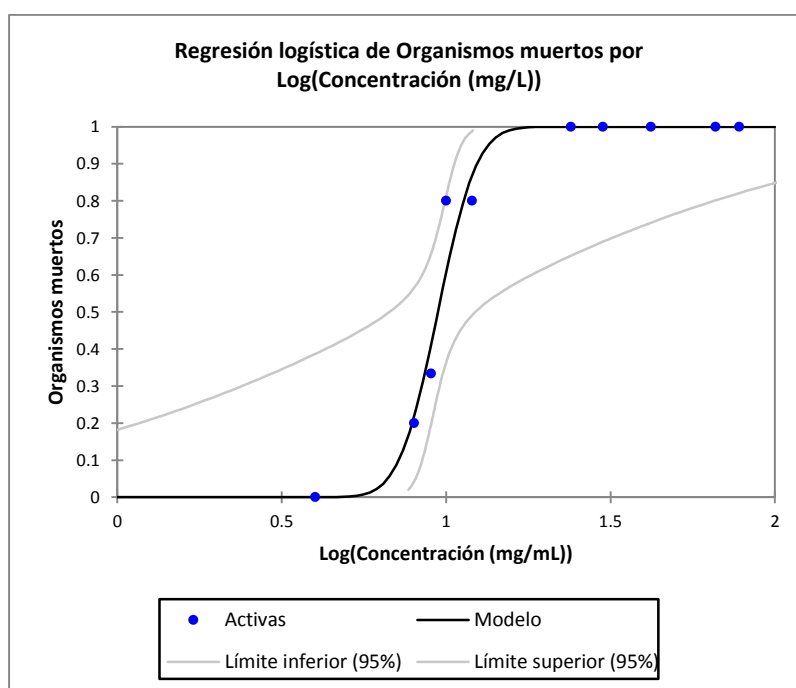


Figura 5. Regresión logística de organismos muertos por Log [concentración (mg/L)].

### 4.2 Exposición aguda.

#### 4.2.1 Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y la gamma glutamiltranspeptidasa.

En la figura 6 se observan los resultados de la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina; el daño de la exposición a cadmio durante 5 días (forma



aguda), tuvo como resultado una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la actividad de la FA de casi el triple comparado con el control.

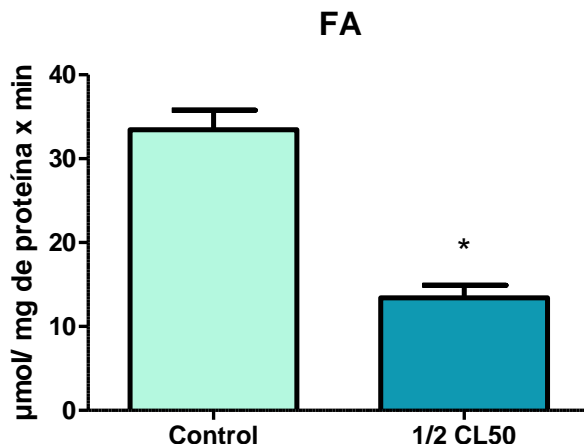


Figura 6. Actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento Agudo. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES,  $n=8$   
\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

El tratamiento agudo con cadmio redujo la actividad de la enzima GGTP aproximadamente al doble con respecto al grupo control (figura 7), el análisis estadístico encontró una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con el tratamiento.

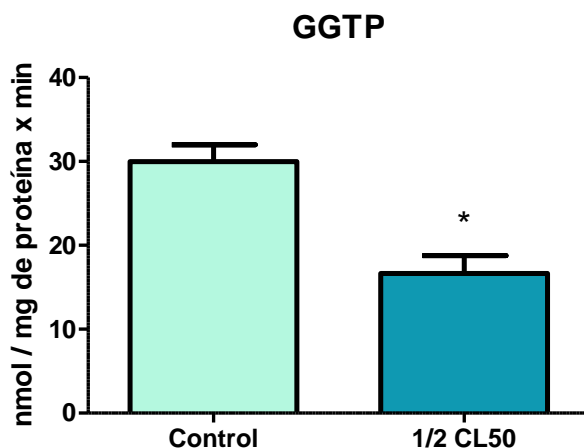


Figura 7. Gamma glutamyltranspeptidasa (GGTP) en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento Agudo. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES,  $n=8$   
\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).



#### 4.2.2 Determinación del contenido de glucógeno y actividad de la enzima acetilcolinesterasa.

El glucógeno hepático (figura 8) en el grupo administrado con cadmio no muestra una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la respuesta basal (control).

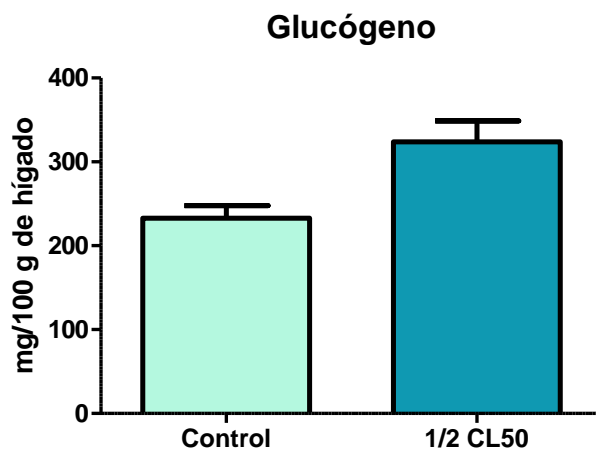


Figura 8. Cantidad de glucógeno hepático en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento Agudo. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES,  $n=8$

La figura 9 muestra la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, la administración aguda del cadmio disminuyó significativamente la actividad de la AchE con respecto al control ( $p < 0.05$ ).

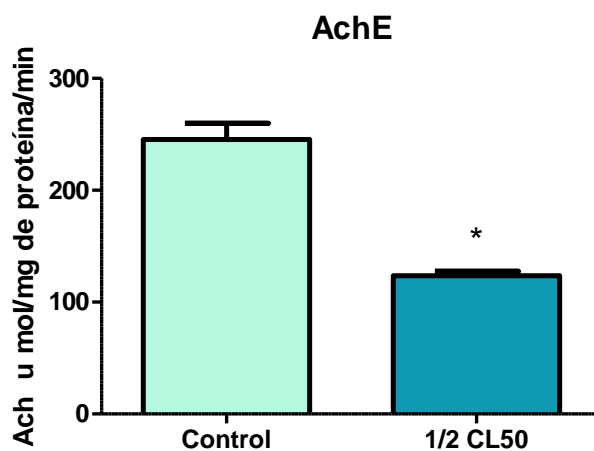


Figura 9. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento Agudo. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES, n=8  
\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.3 Determinación del nivel de peroxidación lipídica.

En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la peroxidación lipídica, cuantificando los niveles de MDA, un metabolito final de dicho proceso. Los valores promedio PL en el hígado de *G. atripinnis* mostraron diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ ).

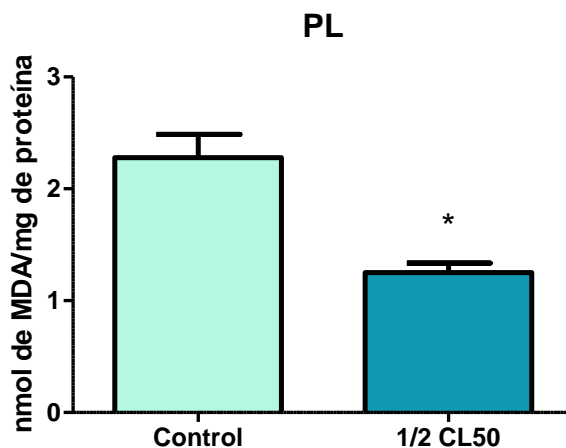


Figura 10. Peroxidación lipídica (PL) en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento Agudo. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES, n=8  
\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2.4 Actividad enzimática de la catalasa, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa.

Como parte de la evaluación de la actividad del cadmio como compuesto tóxico, se determinó la actividad de las enzimas CAT, GPx y SOD en el homogeneizado de hígado. Estas enzimas están encargadas de eliminar los ROS que se producen en el daño hepático. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales en las actividades de la CAT y de la GPx. En cuanto a la SOD, se encontró una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de su actividad en el grupo administrado con cadmio, con respecto al control.



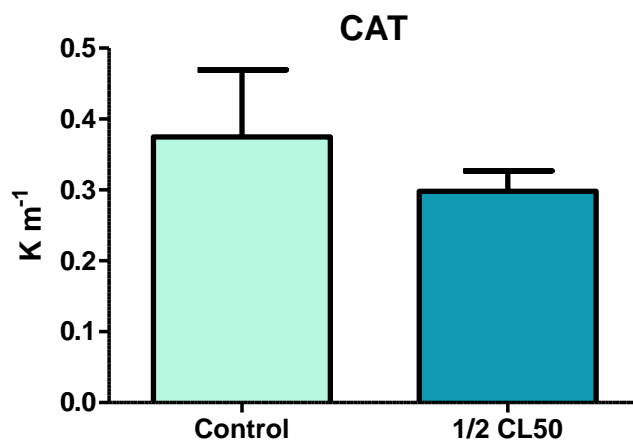


Figura 11. Actividad de la catalasa (CAT) en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento Agudo. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES, n=8

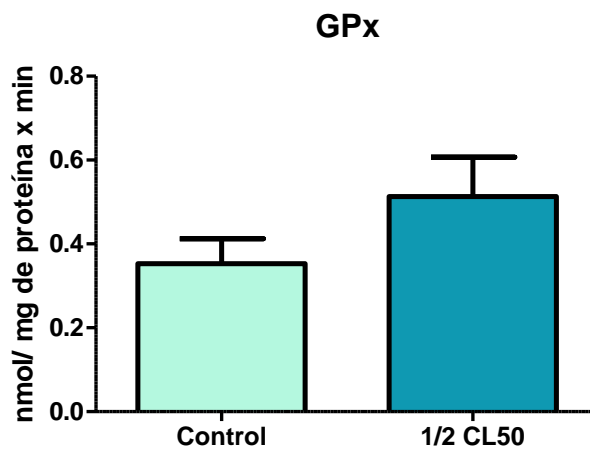


Figura 12. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento Agudo. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES, n=8

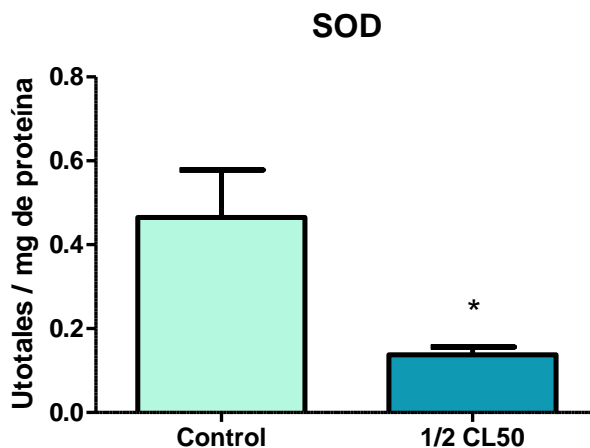


Figura 13. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en *G. atripinnis* control e intoxicados.

Tratamiento Agudo. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES, n=8

\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

### 4.3 Exposición subcrónica

#### 4.3.1 Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y la gamma glutamiltranspeptidasa.

La actividad de las enzimas hepáticas FA y GGTP, en el pez *G. atripinnis* tras una exposición de 30 días al cadmio, mostró un incremento importante, los valores encontrados mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y el grupo intoxicado (figura 14 y 15)

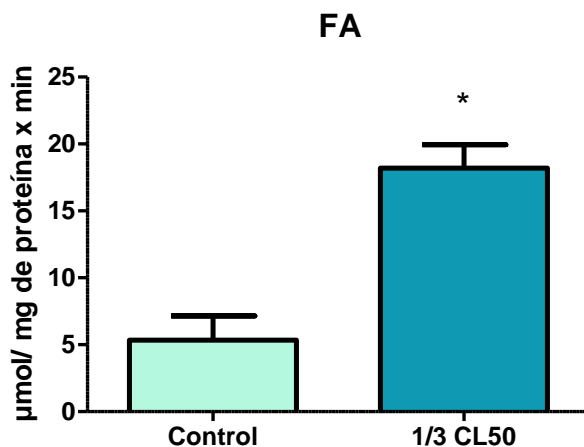


Figura 14. Actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento subcrónico. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES, n=8  
\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

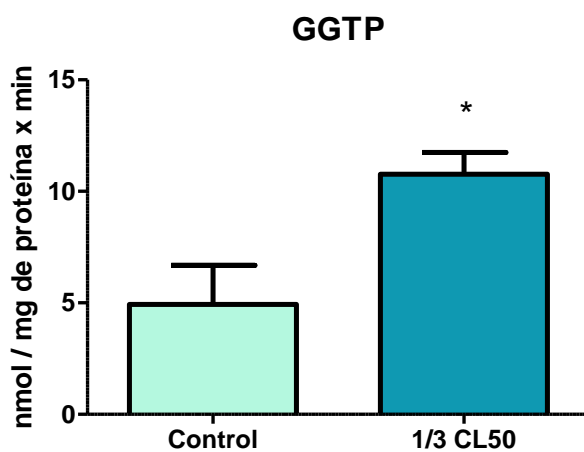


Figura 15. Gamma glutamiltranspeptidasa (GGTP) en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento subcrónico. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES, n=8  
\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

#### 4.3.2 Determinación del contenido de glucógeno y actividad de la enzima acetilcolinesterasa

En la figura 16 se muestra la cantidad de glucógeno presente en los grupos control e intoxicado, el contenido de glucógeno hepático en ambos grupos es muy



semejante no encontrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) tras una exposición subcrónica al cadmio.

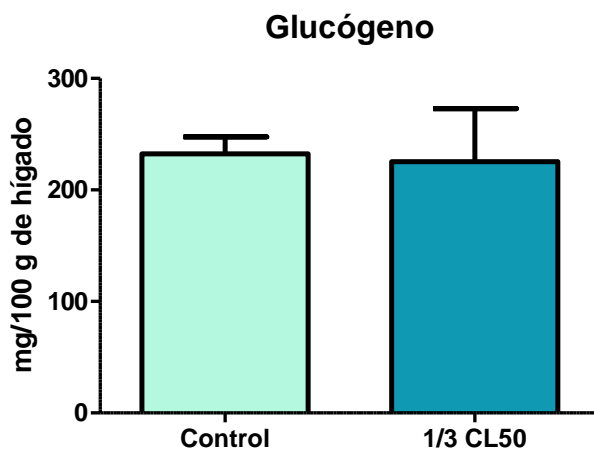


Figura 16. Cantidad de glucógeno hepático en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento subcrónico. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES,  $n=8$

Los valores encontrados para la actividad de la AChE en el hígado de *G. atripinnis* presentan diferencias significativas, con una actividad incrementada significativa en los peces intoxicados (figura 17).

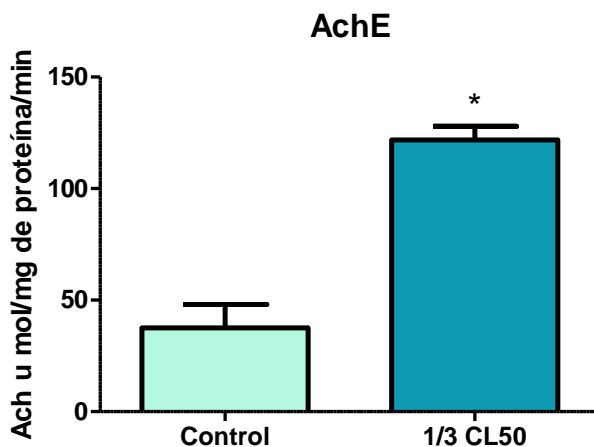


Figura 17. Actividad de la enzima acetilcolinesterasa en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento subcrónico. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES, n=8  
\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

#### 4.3.3 Determinación del nivel de peroxidación lipídica.

Continuando con lo observado en los resultados anteriores, el tratamiento subcrónico con cadmio aumentó los niveles de MDA, lo que es un indicativo del desarrollo de la lipoperoxidación (figura 18).

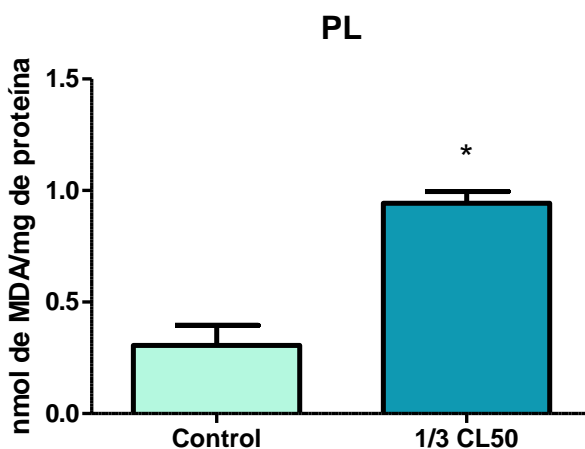


Figura 18. Peroxidación lipídica (PL) en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento subcrónico. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES, n=8  
\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).



#### 4.3.4 Actividad enzimática de la catalasa, la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa

La exposición subcrónica al cadmio en *G. atripinnis* demostró efecto potencial tóxico ya que alteró significativamente ( $p < 0.05$ ) la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (figura 19) y superóxido dismutasa (figura 21). Contrario a lo observado con la CAT y la SOD, la actividad de la GPx en las muestras analizadas no difirió significativamente ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y el expuesto al metal (figura 20).

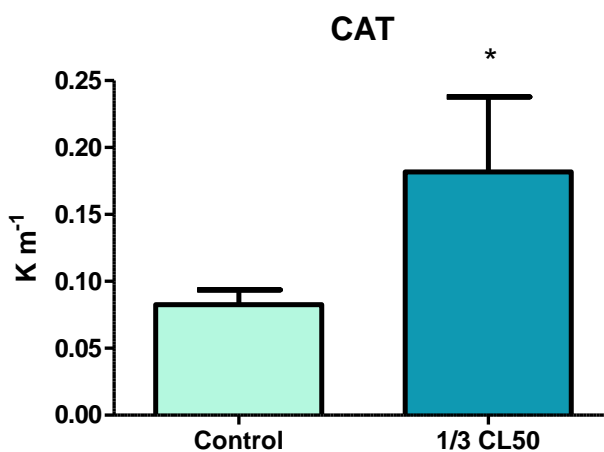


Figura 19. Actividad de la catalasa (CAT) en *G. atripinnis* control e intoxicados.

Tratamiento subcrónico. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES,  $n=8$

\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

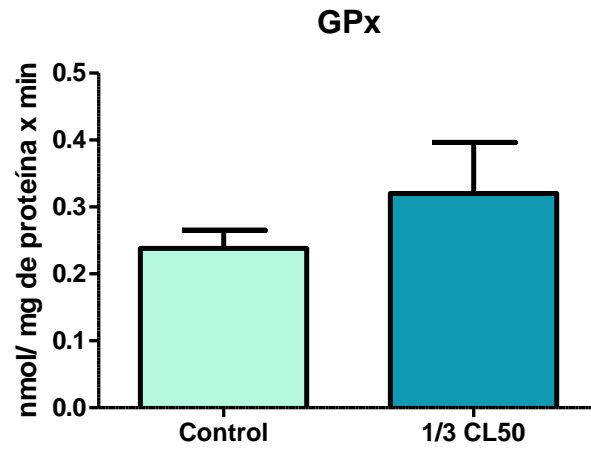


Figura 20. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en *G. atripinnis* control e intoxicados. Tratamiento subcrónico. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES, n= 8

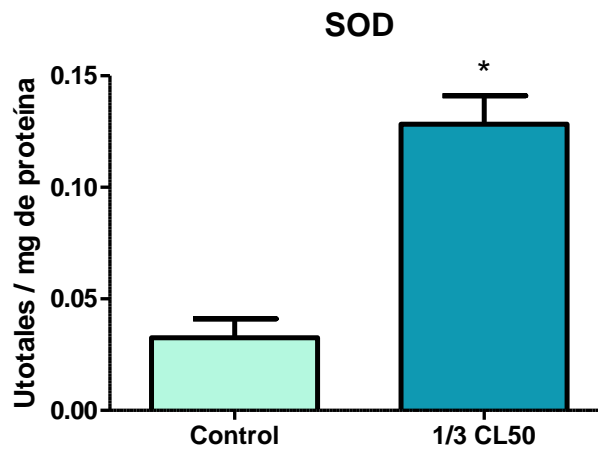


Figura 21. Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en *G. atripinnis* control e intoxicados.

Tratamiento subcrónico. Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES, n=8

\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).



#### 4.4 Respuesta Integrada de Biomarcadores (RIB).

La Respuesta Integrada de Biomarcadores es una herramienta que permite observar el aporte de cada biomarcador a la respuesta conjunta de los biomarcadores evaluados y pone de manifiesto sus interacciones. Para el caso de la RIB para el tratamiento agudo se obtuvo un valor de 13.28, cuyo mayor aporte está dado principalmente por la CAT, la GPx y la PL, lo que sugiere que *Goodea atripinnis* está enfrentando la acción toxica del cadmio, mediada por radicales libres (figura 22). Sin embargo durante la exposición subcrónica al cadmio, el RIB total disminuyó considerablemente a un valor de 6.2; la gráfica de estrella permite visualizar que ninguno de los biomarcadores tuvo un aporte predominante al área, presentando un balance entre todos los biomarcadores de daño temprano (figura 23).

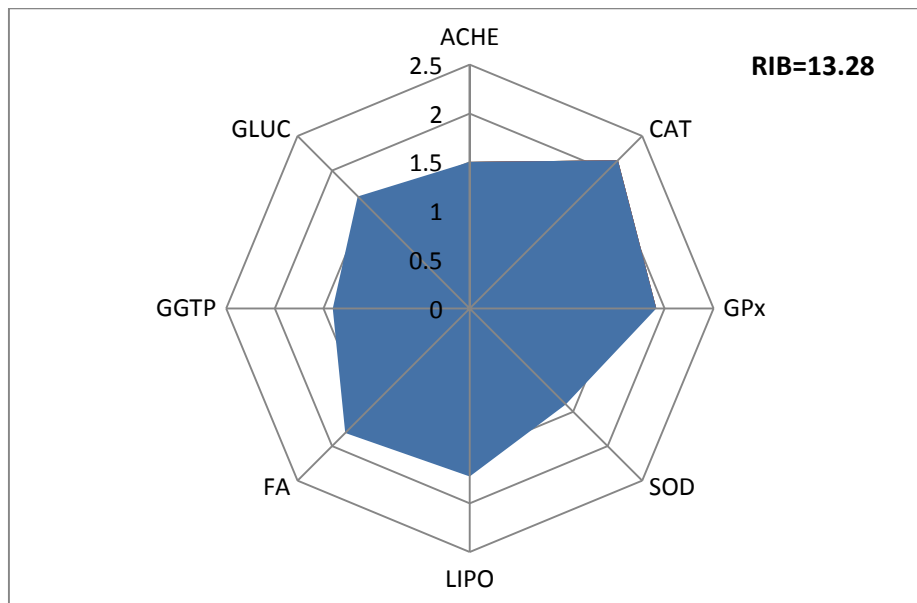


Figura 22. Respuesta Integrada de Biomarcadores (RIB) en el hígado de *Goodea atripinnis*. Exposición aguda.



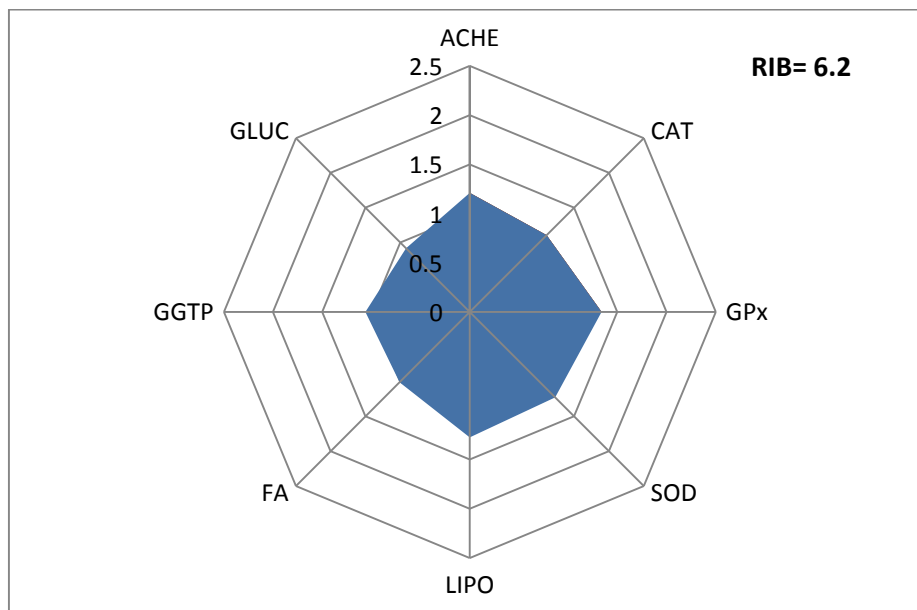


Figura 23. Respuesta Integrada de Biomarcadores (RIB) en el hígado de *Goodea atripinnis*. Exposición subcrónica.

#### 4.5 Evaluación del cadmio en la reproducción y el desarrollo embrionario.

##### 4.5.1 El número y la sobrevivencia de alevines.

El número de alevines de las hembras expuestas a cadmio fue de  $7 \pm 4$ , mientras que para el grupo control fue en promedio de  $14 \pm 2$  alevines nacidos por cada hembra (figura 24). La cantidad promedio de alevines mostró diferencia significativa entre las hembras control respecto a las intoxicadas.

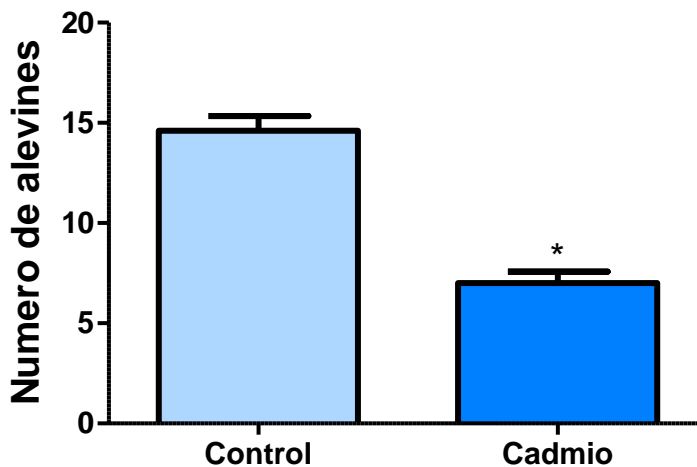


Figura 24. Promedio de alevines en *G. atripinnis*, control e intoxicados  
Cada valor representa el promedio  $\pm$  ES, n=8  
\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

La supervivencia de crías hasta la edad adulta de las hembras expuestas a cadmio fue de 57.1%, mientras que para el grupo control, la mortalidad de la descendencia fue mucho menor, de 87.6 % (figura 25). La proporción de crías supervivientes hasta la edad adulta fue significativamente menor en el grupo expuesto al cadmio que al del grupo control.

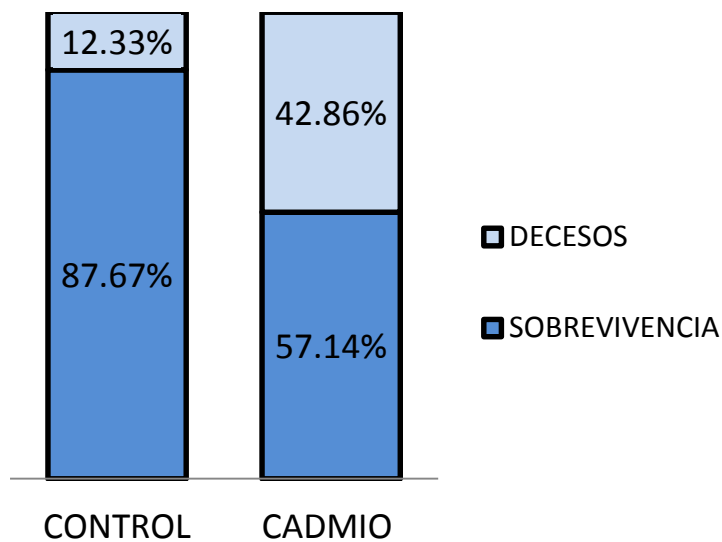


Figura 25. Porcentaje de sobrevivencia de alevines *G. atripinnis*, control e intoxicados.

#### 4.5.2 Evaluación de los índices morfofisiológicos

El factor de condición en los tres grupos expuestos a cadmio no mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto de los grupos control, no importando el tiempo de exposición al xenobiótico (figura 26).

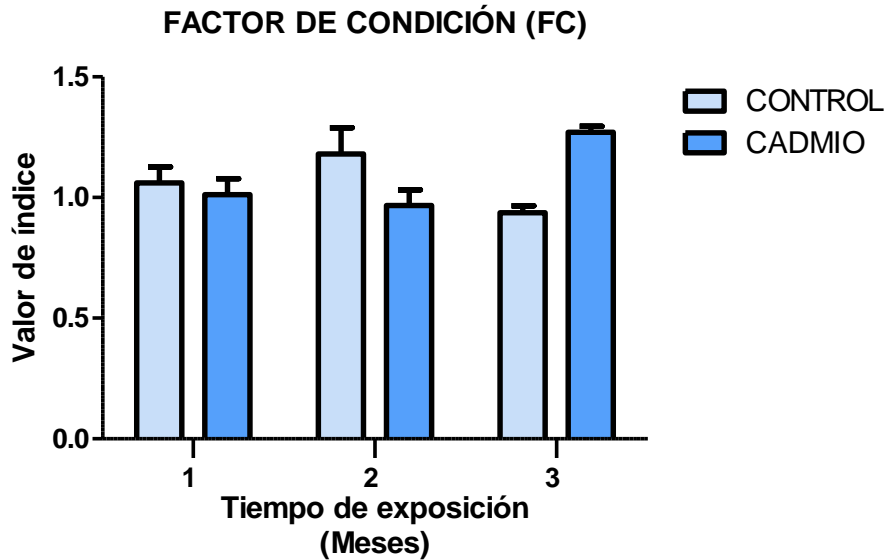


Figura 26. Factor de condición (FC) de alevines *G. atripinnis*, control e intoxicados.

Se encontraron diferencias significativas en los valores del índice gonadosomático (figura 27) y hepatosomático (figura 28) del grupo con cadmio con respecto al control. El índice hepatosomático refleja una tendencia a incrementarse respecto al tiempo, mostrando diferencias significativas en los últimos meses de exposición ( $p < 0.05$ ). Contrario a lo observado en el índice hepatosomático, el índice gonadosomático del grupo expuesto al cadmio muestra una importante disminución a través del tiempo, en el primer mes de exposición se obtuvo un valor de 2.56, sin embargo, a los tres meses de exposición, el índice disminuyó hasta un valor de 0.37, teniendo una importante variación entre los periodos de estudio. En cada uno de los grupos se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control y el expuesto al cadmio.

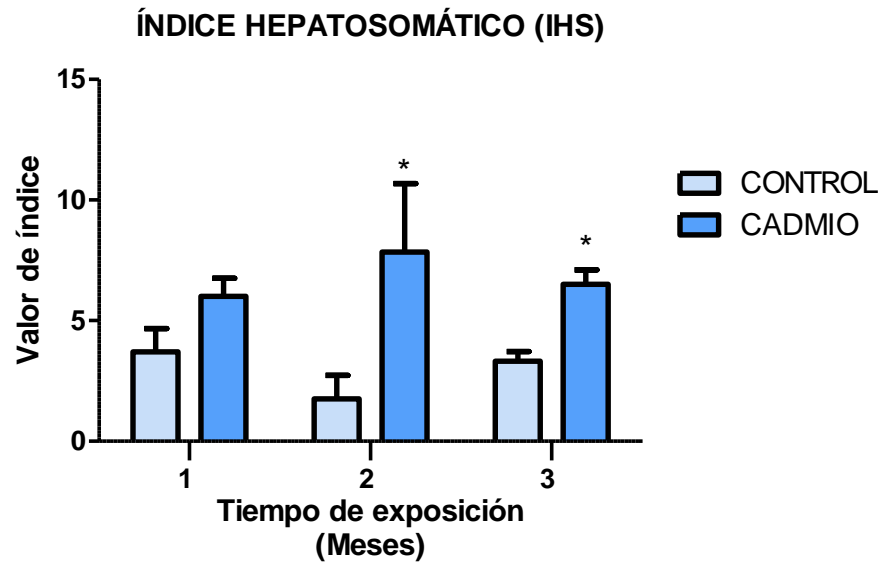


Figura 27. Índice hepatosomático (IGS) de alevines *G. atripinnis*, control e intoxicados.  
\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

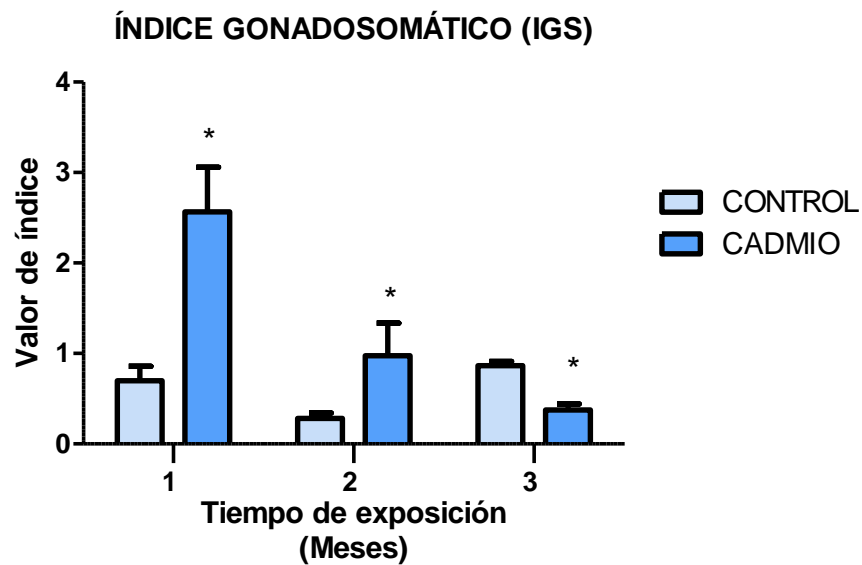


Figura 28. Índice gonadosomático (IGS) de alevines *G. atripinnis*, control e intoxicados.  
\* Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

---

# CAPITULO IV

## Discusión de Resultados

---



## 5 Discusión de Resultados.

A pesar del amplio uso del cadmio en México, no hay datos publicados acerca de la toxicidad aguda en peces nativos. A la fecha, existen pocos estudios sobre los efectos del cadmio en los peces dulceacuícolas y aún menos en los peces endémicos de México.

Los peces *Goodea atripinnis* expuestos mostraron una tolerancia media al cadmio con una  $CL_{50}$  a 96-h de 9.44 mg/L, especies como *Poecilia reticulata* (Yılmaz et al., 2004) o *Channa punctatus* (Dabas et al., 2012) han exhibido tolerancias mayores, reportando en la bibliografía 30.4 mg/L y 26.81 mg/L, respectivamente, indicando que el cadmio es más tóxico para *G. atripinnis* (tabla 7).

Tabla 7. Concentración letal media del cadmio en distintas especies de peces.

Especie	$CL_{50}$ – 96hr (mg/L)	Referencia
<i>Poecilia reticulata</i>	30.4	Yılmaz et al., 2004
<i>Channa punctatus</i>	26.81	Dabas et al., 2012
<i>Oreochromis mossambicus</i>	11,99	James, 2000
<i>Cyprinus carpio</i>	10,72	Alam y Maughan, 1995
<i>Colossoma macropomum</i> <i>x Piaractus brachypomus</i>	9,72	K. Mundarain, 2005
<i>Goodea atripinnis</i>	9.44	Presente estudio



Desde los años setenta, el incremento en la síntesis de productos químicos en respuesta a las actividades tanto agrícolas como industriales ha generado una continua descarga de estos al medio acuático. Estudios sobre los efectos causados por dichos contaminantes y su relación con el estrés oxidativo se han reportado en diversos organismos acuáticos; los peces son un foco de especial atención (Ochoa Cardona and González Mantilla, 2009).

Durante la administración aguda, los resultados muestran una disminución significativa en la enzima antioxidante SOD respecto al grupo control debido probablemente a la unión directa del cadmio con los grupos sulfhidrilo ( $-SH$ ) ó a un mayor uso de la misma para disminuir el estrés oxidativo ya que la CAT no se activó (Dabas et al., 2012). Se han sugerido una serie de mecanismos responsables de la toxicidad del cadmio. Uno de ellos explica cómo el cadmio se uniría a grupos sulfhidrilo de las proteínas que forman parte de las membranas celulares, proteínas citoplasmáticas y enzimas, de tal forma que el cadmio reduciría la actividad de numerosas enzimas (Das and Banerjee, 1980).

Sin embargo, durante la administración subcrónica de cadmio los valores de las enzimas antioxidantes mostraron diferencias significativas respecto al control incrementando su actividad. Estos resultados indican un mecanismo de adaptación a la administración subcrónica del cadmio, sugiriéndose una respuesta bifásica según sea el tiempo de exposición. La actividad antioxidante ha sido estudiada en diversas especies y muchos de los resultados para *Channa punctatus*, *Piaractus brachypomus* y *Oncorhynchus mykiss* han coincidido en el hecho de encontrar una depleción de la actividad cuando los ejemplares son expuestos a contaminantes en períodos agudos; no obstante, su inducción también ha sido observada en peces expuestos a vertientes de desechos industriales; es el caso de *Channa punctatus*, *Oreochromis niloticus* y *Cyprinus*





*carpio* durante periodos crónicos de exposición (Cirillo et al., 2012; Lin et al., 2011; Souid et al., 2013; Almeida et al., 2002).

Un mecanismo muy importante en el daño hepático, es la lipoperoxidación, iniciada por las ROS que atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular extrayendo un hidrógeno y convirtiéndolos por una serie de reacciones posteriores en aldehídos reactivos como el malondialdehído (MDA), el principal producto de la peroxidación. Uno de los mecanismos de toxicidad más reportado para el cadmio es el incremento de la peroxidación lipídica (PL) y la generación de radicales libres, diversos estudios han demostrado que el cadmio es capaz de incrementar la PL por medio del aumento de radicales libres, además del radical superóxido, el radical hidroxilo y los radicales del óxido nítrico (Berlett and Stadtman, 1997; Livingstone, 2001; Viarengo et al., 2000). El cadmio reemplaza al hierro o al cobre en diferentes proteínas, por lo que estos iones al quedar libres ingresan al ciclo de Haber Weiss catalizando la reacción de Fenton causando un incremento en el estrés oxidativo (Godt et al., 2006). Además de este papel generador de especies reactivas de oxígeno, el cadmio también puede afectar a las proteínas antioxidantes, las cuales juegan un papel destacado en la eliminación de las especies reactivas de oxígeno. La lipoperoxidación en nuestro estudio se ve aumentada drásticamente en el grupo de daño (figura 18) tras una administración subcrónica al cadmio; sin embargo, la exposición aguda no mostró diferencias entre el grupo control y el problema, lo que sugiere que el tiempo es un factor condicionante para reflejar un daño ya que posiblemente las defensas antioxidantes contrarresten el mismo.

La reducción en la actividad de diversas proteínas antioxidantes mediada por el cadmio (figura 20 y 21), podría causar la acumulación de especies reactivas de oxígeno en las células. En nuestro estudio, los niveles de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa se vieron alteradas evidenciando el desbalance redox de los peces. De hecho, López López et al. (2006) mostraron



que el cadmio induce peroxidación lipídica, la cual no parece ser mediada directamente por este metal pesado sino como un mecanismo secundario como consecuencia de un aumento de las especies reactivas de oxígeno.

La determinación en plasma de la actividad de algunas enzimas específicas del hígado es importante como medida de la hepatotoxicidad, ya que su presencia, anormalmente incrementada en el plasma indica daño hepático. Actualmente, existe poca información acerca de la actividad hepática de las enzimas GGTP y la FA, ya que la mayoría de los estudios se enfocan en las actividades de las mismas en el plasma, sin embargo, la alteración de la actividad de estas enzimas evidencia el daño hepático causado por el cadmio.

La GGT es una enzima de la membrana del hepatocito cuya función está vinculada a la degradación intracanalicular del glutatión. La determinación de la actividad de la GGT puede considerarse un indicador sensible pero inespecífico de la alteración hepática. Los niveles elevados de GGT, generalmente, se observan en condiciones en las que la capacidad excretora del hígado se encuentra alterada y la mayoría de las veces sus variaciones son paralelas a las de la fosfatasa alcalina (Ahmad et al., 2000). Moreno et al., 2003 menciona que el aumento en la actividad de la GGTP y FA puede atribuirse a la condición de estrés que sufren los organismos al estar expuestos a una mezcla de contaminantes. López López et al. (2011), se han encontrado resultados similares demostrando la alteración en las enzimas hepáticas tras la exposición a una mezcla de xenobióticos de diversa índole y metales pesados.

Situado inmediatamente caudal al corazón, el hígado varía en la coloración dependiendo de los hábitos alimenticios. En condiciones normales, *G. atripinnis* suele mostrar tonos marrones claros o rojizos (figura 29), no obstante, en los ejemplares expuestos al cadmio se puede apreciar que tras una administración aguda y subcrónica se observa una vesícula biliar grande, llena de bilis verde



oscura, mientras que el hígado pierde la morfología normal y su coloración es una coloración blanquecina o amarillenta (hígado graso). La intensidad de cada uno de las alteraciones varió dependiendo del tiempo de exposición, sin embargo fue constante en todos los organismos de estudio (figura 30 y 31).



Figura 29. Hígado control de *Goodea atripinnis*



Figura 30. Hígado de *Goodea atripinnis* expuesto a cadmio. Tratamiento agudo.



Figura 31. Hígado de *Goodea atripinnis* expuesto a cadmio. Tratamiento subcrónico.

Kime (1998) plantea que la alteración de la morfología del hígado y las modificaciones en la actividad enzimática, constituyen una respuesta típica en



peces expuestos a contaminantes, ya que el hígado es el órgano principal de desintoxicación.

El glucógeno es una macromolécula muy importante ya que es una forma de almacenamiento de la glucosa. El glucógeno se sintetiza en el hígado y es un indicador de la funcionalidad y del daño. En el daño hepático, las funciones de la mitocondria se ven comprometidas, con pérdida de ATP y activación de las fosfatasas lo que lleva a la disminución del glucógeno (Javed and Usmani, 2014)

En el presente estudio, el glucógeno hepático no se ve disminuido tras una exposición aguda y subcrónica al cadmio. No obstante a que se esperarían alteraciones en la cantidad de glucógeno hepático, nuestros resultados evidencian la activación de los mecanismos de defensa para prevenir la disminución de la funcionalidad hepática. Existen reportes que los peces, en particular, responden a los factores de estrés ambiental por medio de una variedad de mecanismos compensatorios (Wendelaar Bonga, 1997). Das and Banerjee, (1980) han postulado que los peces durante la exposición al cadmio utilizan la glucosa rápidamente para superar la condición de estrés y aunque la glucogenólisis en el hígado se lleva a cabo, el metabolismo de carbohidratos se ve facilitado.

En una investigación sobre la toxicidad aguda del cadmio en el pez *Ambassis commersoni* se observó un agotamiento casi total del contenido de glucógeno en los músculos y el hígado, además de cambios en la conducta antes de perecer los peces (Shugart, 1994). Estos últimos aspectos han sido previamente observados en otras especies, como *Heteropneustes fossilis* (Sastry and Subhadra, 1982; Larson and Haux, 1982) y *Salmo gairdneri* (Velázquez Velázquez and Vega Cendejas, 2004; Haux and Larsson, 1984)

La acetilcolinesterasa (AChE) que es una enzima esencial con un alto grado de especificidad en cuanto al sustrato, la cual tiene la función de desdoblar



rápida­mente la acetilcolina neurotrasmisora (AC) en colina y ácido acético, y, de esta manera, inactivarla. Aunque comúnmente es utilizada esta enzima como biomarcador de alteraciones nerviosas, la determinación de la actividad de la AChE puede ser utilizada también para el diagnóstico diferencial de las alteraciones hepáticas, ya que la biosíntesis de la AChE tiene lugar precisamente en el hígado.

Como era de esperarse por lo observado en los resultados anteriores, durante la exposición aguda al cadmio el principal efecto fue la inhibición de la AChE (Baatrup, 1991). Existen numerosos estudios sobre los efectos del cadmio en distintas especies de peces (Baatrup, 1991; Navarro, 2008). De La Torre et al., 2002; Lionetto et al., 2003 encontraron que metales pesados como el cadmio son agentes neurotóxicos potentes de colinesterasas (ChE), ya que dichos agentes interfieren con grupos tiólicos, carboxilos y fosfatos y estos autores concluyen que los contaminantes metálicos son buenos inhibidores de la enzima AChE.

No obstante, durante la exposición subcrónica al cadmio, contrariamente a lo observado en el efecto agudo, se obtuvo una disminución significativa de la actividad de la enzima AChE. Este efecto podría ser explicado debido a que los organismos poseen adaptaciones potenciales a cambios en los niveles de la acetilcolinesterasa, como el incremento en la síntesis de las colinesterasas y la reducción en la síntesis de la acetilcolina (Pretto and Loro, 2009). Otros estudios que confirmaron tal efecto es el realizado por Romani et al., 2003, donde se observó un incremento significativo en la actividad de la AChE en tejido cerebral y músculo en *Sparus auratus* durante una exposición al cadmio de 20 días.

Para el cálculo de la Respuesta Integrada de Biomarcadores (RIB), cada uno de los valores obtenidos de los biomarcadores propuestos fueron normalizados y estandarizados mediante el método propuesto por Beliaeff y Burgeot (2002), que permite analizar de manera sencilla datos múltiples mediante el uso de gráficas de



estrella. La RIB en *G. atripinnis* mostró que el tratamiento agudo presentó el valor más alto con respecto al subcrónico, donde la GPx y la CAT fueron las enzimas que respondieron en asociación con el incremento de la PI. De acuerdo a lo anterior, el aumento en los niveles de la PL en *G. atripinnis*, evidencian daño peroxidativo por exposición al cadmio, además de las implicaciones de la actividad de la SOD, la CAT y la GPx que sugieren que la respuesta antioxidante es el resultado del incremento de las ROS, estimuladas por el metal pesado. Estos radicales libres, lograron inhibir la actividad antioxidante de la SOD, sin embargo, también incrementaron la actividad de las enzimas antioxidantes captadoras de radicales libres como la CAT y la GPx, de acuerdo con Perozzi et al. (2003).

El cadmio, además, tuvo efectos sobre la reproducción de los peces. El efecto sobre la descendencia de hembras preñadas expuestas a cadmio se demostró mediante la exposición al metal durante 90 días. El número y la sobrevivencia de los alevines de las hembras expuestas fue de  $7\pm 4$  y 57%, respectivamente, mientras que para el grupo control fue en promedio de  $14\pm 2$  alevines nacidos por cada hembra con una sobrevivencia del 87%.

En teleósteos vivíparos con gestación intrafolicular, como *Goodea atripinnis*, los ovocitos son fertilizados dentro del folículo ovárico y los embriones en desarrollo son retenidos dentro del folículo hasta el momento del parto, con esto se asegura el éxito reproductivo (Uribe et al., 2005). En nuestro estudio, aunque se presentó una mortalidad del 43% en los organismos expuestos a cadmio, se aseguró la reproducción quedando de manifiesto una de las ventajas de la reproducción vivípara.

El proceso de reproducción de muchos de los organismos acuáticos es un complejo de secuencias orquestadas y reguladas hormonalmente en la mayoría de los casos, pasos que pueden ser afectados de diversas maneras por metales pesados y por otros contaminantes ambientales (Rodríguez et al., 2000).



Fingerman *et al.*, (1998) en una revisión sobre este tema mencionan que dentro de los efectos observados en organismos acuáticos que habitan en sitios altamente contaminados con cadmio se presenta de manera muy marcada, una reducción en la fecundidad, ya que uno de los efectos más importantes del cadmio sobre los organismos es su capacidad de alterar el desarrollo embrionario y fetal (Nordberg, 2009).

Los resultados presentados demuestran que el cadmio es un agente embriotóxico y que su posible mecanismo de acción es por la lipoperoxidación (Altamirano Lozano *et al.*, 2005). Organismos que no fueron capaces de afrontar las condiciones adversas, generadas por la presencia del cadmio, no sobrevivieron y solo permanecieron aquellos que pudieron adaptarse al nuevo escenario. Posteriormente, los organismos sobrevivientes realizaron un reajuste energético o "trade off" para enfrentar la presión ejercida por el xenobiótico. Sin embargo, las consecuencias de este reajuste energético pueden ser a corto o largo plazo, por ejemplo, si se emplea la energía destinada para el crecimiento, la talla de los organismos se verá modificada y si se emplea la asignada para la reproducción disminuirá la progenie de la especie (Sun and Zigman, 1978; Collins and Anderson, 1995).

El empleo de los biomarcadores y los índices morfológicos en los peces refleja si estos se encuentran o no sujetos a estrés. El índice hepatosomático tiende a ser mayor en sitios contaminados, por lo cual la exposición al cadmio también puede interpretarse como una consecuencia del crecimiento del hígado (Kurutas *et al.*, 2009). La disminución de los valores del índice gonadosomático pueden reflejar la forma en que los peces se adaptan a las condiciones adversas por medio de ajustes energéticos, bioquímicos y fisiológicos (Fonseca *et al.*, 2009). Un estudio realizado por Altamirano Lozano *et al.*, (2005) en *C. humboldtianum*, encontró diferencias en la sensibilidad de los embriones expuestos al cadmio, los



organismos expuestos durante 96 h mostraron una mayor sensibilidad con respecto a los de 120 h, esto debido probablemente a la mayor capacidad de desintoxicación de estos últimos, por lo tanto, otro factor que puede influenciar nuestros resultados es la edad de los organismos ya que los procesos de bioactivación y desintoxicación aumentan con el crecimiento.

En nuestro estudio se encontraron diferencias significativas en los valores del índice hepatosomático y gonadosomático del grupo expuesto al cadmio con respecto al control. White and Turner (1986) observaron un incremento del tamaño del hígado en peces de ambos sexos provenientes de aguas contaminadas, lo cual pudiera deberse al aumento de la demanda de las enzimas detoxificadoras. El hígado incrementa su tamaño como respuesta no específica a tóxicos. Este cambio está inducido por el aumento de la demanda sobre la actividad enzimática en este órgano. Algunos autores han encontrado un incremento en el IHS como respuesta a la contaminación (Nelson, 1975), pero en otros casos, la relación hallada es inversa (White and Turner, 1984). Lo mismo ha ocurrido con el FC (Nelson, 1975). Según Ortiz Ordóñez et al., (2011), el IHS puede aumentar o disminuir como respuesta a agentes estresantes de diversa índole.

Una cuestión importante es que los índices organosomáticos y el factor de condición pueden variar de acuerdo a la energía disponible para los animales y su distribución de acuerdo al metabolismo. De esta manera, estar sometido a condiciones estresantes como es la intoxicación por cadmio, puede ser un factor que introduzca cambios notables en el valor de los índices debido a que gran parte de la energía almacenada en el pez no se destina a perpetuar la especie (Ochoa Cardona and González Mantilla, 2009; Beliaeff and Burgeot, 2002)



---

# CAPITULO V

## Conclusiones

---



## 6 Conclusiones.

Los resultados evidencian que a pesar de que *Goodea atripinnis* es considerado un organismo tolerante, enfrenta severos daños por estrés oxidativo tras una exposición aguda y subcrónica al cadmio.

Se demostró que los efectos sobre los biomarcadores de daño temprano, varían dependiendo del tiempo de exposición y edad del pez.

Las respuestas antioxidantes muestran diferencias sustanciales, lo cual refleja el efecto del cadmio sobre las defensas antioxidantes de *Goodea atripinnis*. Las dos concentraciones de estudio mostraron su capacidad de impactar negativamente, esta alteración provocó daño oxidativo por el incremento de la peroxidación lipídica y la activación de las enzimas antioxidantes SOD, la CAT y la GPx, como consecuencia de la generación de las especies reactivas de oxígeno.

Se observa que el cadmio puede afectar de manera importante la reproducción de *Goodea atripinnis*, disminuyendo la tasa de natalidad y sobrevivencia de los alevines.

La temporalidad en las variaciones de los índices hepatosomático y gonadosomático sugieren reajustes energéticos realizados por *Goodea atripinnis* para hacer frente al estrés oxidativo generado por la exposición al xenobiótico. Procesos como la síntesis de macromoléculas y el aporte energético suelen ser privilegiados sobre la reproducción.



## 7 Bibliografía.

- AHMAD, I., HAMID, T., FATIMA, M., CHAND, H. S., JAIN, S. K., ATHAR, M. & RAISUDDIN, S. 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1523, 37-48.
- ALBERT, L. & BADILLO, F. 1991. Environmental lead in Mexico. In: WARE, G. (ed.) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York.
- ALMEIDA, J. A., DINIZ, Y. S., MARQUES, S. F. G., FAINE, L. A., RIBAS, B. O., BURNEIKO, R. C. & NOVELLI, E. L. B. 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International*, 27, 673-679.
- ALTAMIRANO LOZANO, M., TOLEDO HERRERA, D., RODRÍGUEZ CANTO, A., FIGUEROA LUCERO, G. & DE PRODUCCIÓN ACUÍCOLA, P. E. 2005. *Chirostoma humboldtianum* como modelo in vitro para el estudio de embriotoxicidad de metales pesados. I. Cloruro de cadmio. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 21, 71-77.
- ARANZÁBAL, M. C. U., DE LA ROSA CRUZ, G., ALARCÓN, A. G., GUERRERO-ESTÉVEZ, S. M. & MORALES, M. A. 2006. Características histológicas de los estadios de atresia de folículos ováricos en dos especies de teleósteos vivíparos: *Ilyodon whitei* (Meek, 1904) y *Goodea atripinnis* (Jordan, 1880)(Goodeidae). *Hidrobiológica*, 16, 67-73.
- ATSDR. 2011. Toxicological profile for cadmium. *Department of Health and Human Services*. Atlanta GA: US: Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- BAATRUP, E. 1991. Structural and functional effects of heavy metals on the nervous system, including sense organs, of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 100, 253-257.
- BELIAEFF, B. & BURGEOT, T. 2002. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 1316-1322.
- BERGER, L. & RUDOLPH, G. N. 1963. Alkaline and acid phosphatases. *Meites (Ed.), Standard Methods in Clinical Chemistry*, Vol. 5 pp. 25-35.
- BERLETT, B. S. & STADTMAN, E. R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 272, 20313-6.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- BUEGE, J. A. & AUST, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. In: SIDNEY, F. & LESTER, P. (eds.) *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- CEBALLOS, G., R. LIST, G. GARDUÑO, R. LÓPEZ CANO, M. J. MUÑOZCANO QUINTANAR, E. COLLADO, J. ELVIN SAN ROMÁN 2009. Diversidad biológica del Estado de México. Estudio de estado. Biblioteca mexicana del bicentenario. Colección mayor, Estado de México.
- CIRILLO, T., AMODIO COCCHIERI, R., FASANO, E., LUCISANO, A., TAFURI, S., FERRANTE, M. C., CARPENÈ, E., ANDREANI, G. & ISANI, G. 2012. Cadmium accumulation and antioxidant responses in *Sparus aurata* exposed to waterborne cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 118-126.



- COHEN, G., DEMBIEC, D. & MARCUS, J. 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 34, 30-38.
- COLLINS, A. L. & ANDERSON, T. A. 1995. The regulation of endogeneous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. *Journal of Fish Biology*, 47, 1004-1015.
- CUESTA TERRÓN, C. 1925. La fauna ictiológica y malacológica comestible del lago de Chapala, Jal., y su pesca. *Memorias de la Sociedad Álzate*, Tomo 24, 39-67.
- DABAS, A., NAGPURE, N. S., KUMAR, R., KUSHWAHA, B., KUMAR, P. & LAKRA, W. S. 2012. Assessment of tissue-specific effect of cadmium on antioxidant defense system and lipid peroxidation in freshwater murrel, *Channa punctatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 469-482.
- DAS, K. & BANERJEE, S. 1980. Cadmium toxicity in fishes. *Hydrobiologia*, 75, 117-121.
- DOADRIO, I. & DOMÍNGUEZ, O. 2004. Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 416-430.
- DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O., DOADRIO, I. & PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. 2006. Historical biogeography of some river basins in central Mexico evidenced by their goodeine freshwater fishes: a preliminary hypothesis using secondary Brooks parsimony analysis. *Journal of Biogeography*, 33, 1437-1447.
- FERNÁNDEZ, A. J. G. & RODRÍGUEZ, F. S. 2012. *Riesgos tóxicos por consumo de animales de caza: Toxicología alimentaria*, Ediciones Díaz de Santos.
- FONSECA, V., SERAFIM, Â., BEBIANNO, M. J. & CABRAL, H. 2009. Effect of copper exposure on growth, condition indices and biomarker response in juvenile sole *Solea senegalensis*. *Scientia Marina*, 73, 51-58.
- FOWLER, B. A. 2009. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, 294-300.
- GLOSSMANN, H. & NEVILLE, D. M. 1972.  $\gamma$ -Glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Letters*, 19, 340-344.
- GODT, J., SCHEIDIG, F., GROSSE SIESTRUP, C., ESCHE, V., BRANDENBURG, P., REICH, A. & GRONEBERG, D. 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 1, 1-6.
- HARMANESCU, M., ALDA, L., MARIA BORDEAN, D., GOGOASA, I. & GERGEN, I. 2011. Heavy metals health risk assessment for population via consumption of vegetables grown in old mining area; a case study: Banat County, Romania. *Chemistry Central Journal*, 5, 1-10.
- HAUX, C. & LARSSON, Å. 1984. Long-term sublethal physiological effects on rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during exposure to cadmium and after subsequent recovery. *Aquatic Toxicology*, 5, 129-142.
- HELLSTRÖM, L., PERSSON, B., BRUDIN, L., GRAWÉ, K. P., ÖBORN, I. & JÄRUP, L. 2007. Cadmium exposure pathways in a population living near a battery plant. *Science of the Total Environment*, 373, 447-455.
- HESTRIN, S. 1961. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. *Journal of Biological Chemistry*, 180, 249-261.
- HOUSTON, M. 2012. The role of mercury and cadmium in cardiovascular disease, hypertension, and stroke. In: LI, Y. V. & ZHANG, J. H. (eds.) *Metal Ion in Stroke*. Springer New York.



- INECC. 2009. *Contaminación por Metales Pesados* [Online]. Available: [http://www.inecc.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=763:aqre-metales&catid=74](http://www.inecc.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=763:aqre-metales&catid=74) [Accessed 22 Octubre 2013].
- JÄRUP, L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin*, 68, 167-182.
- JAVED, M. & USMANI, N. 2014. Impact of heavy metal toxicity on hematology and glycogen status of fish: A review. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 1-12.
- KIME, D. 1998. Disruption of Liver Function. *Endocrine Disruption in Fish*. Springer US.
- KURUTAS, E. B., ŞAHAN, A. & ALTUN, T. 2009. Oxidative stress biomarkers in liver and gill tissues of *Spotted Barb* (Capoeta Barroisi Lortet, 1894) living in ceyhan river, Adana-Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 275-282.
- LAWRENCE, R. A. & BURK, R. F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71, 952-958.
- LIN, Y.-S., TSAI, S.-C., LIN, H.-C., HSIAO, C.-D. & WU, S. M. 2011. Changes of glycogen metabolism in the gills and hepatic tissue of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during short-term Cd exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154, 296-304.
- LIVINGSTONE, D. R. 2001. Contaminant stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 656-666.
- LOMBARDI, J. & WOURMS, J. P. 1988. Embryonic growth and trophotaenial development in goodeid fishes (Teleostei: Atheriniformes). *Journal of Morphology*, 197, 193-208.
- LÓPEZ, E., ARCE, C., OSET-GASQUE, M. J., CAÑADAS, S. & GONZÁLEZ, M. P. 2006. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 940-951.
- LÓPEZ LÓPEZ, E., SEDEÑO DÍAZ, J. E., SOTO, C. & FAVARI, L. 2011. Responses of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in liver of the fish *Goodea atripinnis* exposed to Lake Yuriria water. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 511-522.
- MARTELLI, A., ROUSSELET, E., DYCKE, C., BOURON, A. & MOULIS, J. M. 2006. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie*, 88, 1807-1814.
- MIRANDA, R., GALICIA, D., MONKS, S. & PULIDO-FLORES, G. 2010. Primer registro de *Goodea atripinnis* (Cyprinodontiformes: Goodeidae) del estado de Hidalgo (México) y algunas consideraciones acerca de su posición taxonómica. *Hidrobiológica*, 20, 185-190.
- MORRIS, D. L. 1948. Quantitative Determination of Carbohydrates With Dreywood's Anthrone Reagent. *Science*, 107, 254-255.
- NAWROT, T., STAESSEN, J., ROELS, H., MUNTERS, E., CUYPERS, A., RICHART, T., RUTTENS, A., SMEETS, K., CLIJSTERS, H. & VANGRONVELD, J. 2010. Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *BioMetals*, 23, 769-782.
- NELSON, G. G. 1975. Anatomy of the male urogenital organs of *Goodea atripinnis* and *Characodon lateralis* (Atheriniformes: Cyprinodontoidei), and *G. atripinnis* courtship. *Copeia*, 475-482.
- NORDBERG, G. F. 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, 192-200.
- NORSETH, T. 1988. Variability in toxicokinetics in exposure to metals. In: NOTTEN, W. F., HUNTER, W., HERBER, R. M., MONSTER, A. & ZIELHUIS, R. (eds.) *Health Surveillance of Individual Workers Exposed to Chemical Agents*. Springer Berlin Heidelberg.
- OCHOA CARDONA, D. M. & GONZÁLEZ MANTILLA, J. F. 2009. Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de*



- Zootecnia*; Vol. 55, núm. 2 (2008); 115-126 *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*; Vol. 55, núm. 2 (2008); 115-126 2357-3813 0120-2952.
- ORTIZ ORDÓÑEZ, E., URÍA GALICIA, E., RUIZ PICOS, R. A., SÁNCHEZ DURÁN, A. G., HERNÁNDEZ TREJO, Y., SEDEÑO DÍAZ, J. E. & LÓPEZ LÓPEZ, E. 2011. Effect of yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 443-452.
- PEROZZI, L. F., ORTIZ, M. M. & LÓPEZ, E. L. 2003. Efecto del agua del embalse de la Vega en la lipoperoxidación y los niveles de la acetilcolinesterasa en el hígado y el músculo de *Xiphophorus helleri*. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 19, 145-155.
- PRAVEENA, S., MUTALIB, S., RAZAK, N., ABIDIN, E. & ARIS, A. 2014. Health risk assessment of heavy metal exposure to classroom dust in primary school, Serdang (Malaysia). In: ARIS, A. Z., TENGKU ISMAIL, T. H., HARUN, R., ABDULLAH, A. M. & ISHAK, M. Y. (eds.) *From Sources to Solution*. Springer Singapore.
- SHUGART, L. 1994. Biological monitoring contaminants in the environment. A multidisciplinary assessment of risks to man and others organisms. *Lewis Publishers, New York*.
- SQUID, G., SOUAYED, N., YAKTITI, F. & MAAROUFI, K. 2013. Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89, 1-7.
- SUN, M. & ZIGMAN, S. 1978. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Analytical Biochemistry*, 90, 81-89.
- TAMBUTTI, M., ALDAMA, A., SÁNCHEZ, O., MEDELLÍN, R. & SOBERÓN, J. 2002. La determinación del riesgo de extinción de especies silvestres en México. *Gaceta Ecológica*, 11-21.
- URIBE, M., DE LA ROSA-CRUZ, G. & GARCÍA-ALARCÓN, A. 2005. The ovary of viviparous teleosts. Differences between the ovaries of *Goodea atripinnis* and *Ilyodon whitei* (Goodeidae). *Viviparous Fishes. Uribe, MC & Grier, HJ (Eds.). Homestead, Florida, New Life Publications*, 217-35.
- VÁZQUEZ BOTELLO, A., VILLANUEVA FRAGOSO, S. & ROSALES HOZ, L. 2004. Distribución y contaminación por metales en el Golfo de México. *Diagnostico ambiental del Golfo de México. Compiladores: Caso, MI Pisanty*, 682-712.
- VELÁZQUEZ VELÁZQUEZ, E. & VEGA CENDEJAS, M. 2004. Los peces como indicadores del estado de salud de los ecosistemas acuáticos. *Biodiversitas*, 57, 12-15.
- VIARENGO, A., BURLANDO, B., CERATTO, N. & PANFOLI, I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, 46, 407-417.
- VON OSTEN, J. R. 2005. Uso de biomarcadores en ecosistemas acuáticos. *Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*, 121.
- WENDELAAR BONGA, S. E. 1997. The stress response in fish.
- WHITE, M. & TURNER, B. 1984. Microgeographic differentiation in a stream population of *Goodea atripinnis* (Goodeidae) from the Mexican Plateau. *Environmental Biology of Fishes*, 10, 123-127.
- WHITE, M. M. & TURNER, B. J. 1986. Geographic isolation, gene flow and population differentiation in *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae). *Genetica*, 69, 157-160.
- WHITE, S. & RAINBOW, P. 1987. Heavy-metal concentrations and size effects in the mesopelagic decapod crustacean *Systellaspis debilis*. *Marine Ecology Progress Series*, 37, 147-151.



---

YILMAZ, M., GÜL, A. & KARAKÖSE, E. 2004. Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>; H<sub>2</sub>O) metal salt on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*). *Chemosphere*, 56, 375-380.